

Vitamin E Acetate를 함유한 Nano-emulsion 제조와 Franz Diffusion Cell을 이용한 Vitamin E Acetate의 경표피 흡수에 관한 *In Vitro* 연구

김재현·양희정·원보령·안유진·강명규·박수남[†]

서울산업대학교 자연생명과학대학 정밀화학과
(2009년 5월 22일 접수, 2009년 6월 1일 수정, 2009년 6월 4일 채택)

Preparation of Vitamin E Acetate Nano-emulsion and *In Vitro* Research Regarding Vitamin E Acetate Transdermal Delivery System which Use Franz Diffusion Cell

Jai Hyun Kim, Hee Jung Yang, Bo Ryoung Won, You Jin Ahn, Myung Kyu Kang, and Soo Nam Park[†]

Department of Fine Chemistry, College of Nature and Life Science, Seoul National University of Technology, 172,
Gongneung 2-dong, Nowon-gu, Seoul 139-743, Korea

(Received May 22, 2009; Revised June 1, 2009; Accepted June 4, 2009)

요약: 본 연구에서는 화장품과 의약품 분야에서 항산화 물질로 널리 사용되고 있는 지용성 비타민인 vitamin E acetate (VEA, tocopheryl acetate)를 이용한 스킨토너 제형의 나노 입자 크기의 에멀전을 제조하고, 이 에멀전을 이용해 ICR outbred albino mice (12주령 약 50 g, 암컷) 피부로의 VEA 침투와 receptor phase 구성에 따른 VEA의 용해도 차이에 대한 실험을 수행하였다. VEA를 0.07 wt% 함유한 nano-emulsion의 입자는 에탄올(ethanol, EtOH) 함량이 많을수록 그 크기가 커지는 경향을 보였고 계면활성제 함량이 많은 경우 크기가 작아지는 것을 확인하였다. Receptor phase에서 적절한 EtOH 함량이 VEA의 용해도를 증가시켰다. EtOH 함량이 5.0, 40.0 wt%인 경우보다 10.0, 20.0 wt% 일 때 VEA의 용해도가 높은 것을 확인하였다. Receptor phase의 계면활성제 종류 역시 VEA 용해도에 영향을 주는 것을 확인하였다. 화학구조와 HLB값이 다른 세 가지 계면활성제를 비교한 결과 sorbitan sesquioleate (Arlacel 83: HLB 3.7) > POE (10) hydrogenated castor oil (HCO-10: HLB 6.5) > sorbitan monostearate (Arlacel 60: HLB 4.7) 순으로 VEA에 대한 용해도가 증가하였다. Receptor phase에 첨가된 산화 방지제 종류에 따라 VEA의 용해도는 차이를 보였다. Ascorbic acid를 함유한 시료는 EDTA-2Na가 첨가된 시료보다 VEA 용해도가 높았고 이 두 가지 산화방지제를 혼합한 시료와 초기에 비슷한 용해도를 보였지만 시간이 지남에 따라 양상이 달라져 최종 24 h 뒤에는 2배 정도의 높은 용해도를 보였다. 네 가지 다른 함량의 VEA 함유 nano-emulsion을 이용하여 쥐 피부 Franz diffusion cell 실험을 수행한 결과 EtOH 함량이 10.0 wt%인 경우에 $128.8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 으로 VEA가 가장 높게 검출되었다. 이것은 초기 VEA 투입량인 $220.057 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 과 비교하여 58.53 %가 투과된 것으로 EtOH 함량이 1.0, 20.0 wt%인 에멀전과 비교해 볼 때 각각 45 %, 15 %씩 높았다. 동일한 EtOH 농도로 제조한 에멀전과 비교했을 때, 0.5 wt% 계면활성제를 사용한 에멀전의 입자 크기는 계면활성제 0.007 wt% 에멀전 입자 크기의 1/20 정도인 26.0 nm로 매우 작았다. 하지만 쥐 피부를 투과하는 VEA의 양은 $54.848 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 로 $128.8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 의 투과량을 보인 0.007 wt% 계면활성제 함유 에멀전보다 적었다. 이상의 결과들로 VEA를 함유한 nano-emulsion의 피부 투과도와 receptor phase 구성에 따른 VEA의 용해도 차이를 확인하였다. 이러한 결과들을 이용하여 VEA를 피부 내로 침투시키는 데 필요한 최적의 조건을 확립할 수 있을 것으로 사료된다.

Abstract: In this study, vitamin E acetate (VEA, tocopheryl acetate), a lipid-soluble vitamin which is widely used in the cosmetics and medical supply field as a antioxidant material. The stable nano particle emulsion of skin toner type containing VEA was prepared. To evaluate the skin permeation, experiments on VEA permeation to the skin of the ICR outbred albino mice (12 weeks, about 50 g, female) and on differences of solubility as a function of receptor formulations was performed. The analysis of nano-emulsions containing VEA 0.07 % showed that the higher

[†] 주 저자 (e-mail: snpark@snut.ac.kr)

ethanol contents the larger emulsions were formed, while the higher surfactant contents the size became smaller. A certain contents of ethanol in receptor phase increased VEA solubility on the nano-emulsion. When the ethanol contents were 10.0 % and 20.0 %, the VEA solubility was higher than 5.0 % and 40.0 %, respectively. The type of surfactant in receptor solution influenced to VEA solubility. The comparison between three kind surfactants whose chemical structures and HLB values are different, showed that solubility of VEA was increased as order of sorbitan sesquioleate (Arlacel 83; HLB 3.7) > POE (10) hydrogenated castor oil (HCO-10; HLB 6.5) > sorbitan monostearate (Arlacel 60; HLB 4.7). VEA solubility was also shown to be different according to the type of antioxidant. In early time, the solubility of the sample including ascorbic acid was similar to those of other samples including other types of antioxidants. However, the solubility of the sample including ascorbic acid was 2 times higher than others after 24 h. Franz diffusion cell experiment using mouse skin was performed with four nano-emulsion samples which have different VEA contents. The emulsion of 10 wt% ethanol was shown to be the most permeable at the amount of $128.8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. When the result of 10 % ethanol content was compared with initial input of $220.057 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, the permeated amount was 58.53 % and the permeated amount at 10 % ethanol was higher 45.0 % and 15.0 % than the other results which ethanol contents were 1.0 and 20.0 wt%, respectively. Emulsion particle size used 0.5 % surfactant (HCO-60) was 26.0 nm that is one twentieth time smaller than the size of 0.007 % surfactant (HCO-60) at the same ethanol content. Transepidermal permeation of VEA was $54.848 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ which is smaller than that of particlesize 590.7 nm. Skin permeation of nano-emulsion containing VEA and difference of VEA solubility as a function of receptor phase formulation were determined from the results. Using these results, optimal conditions of transepidermal permeation with VEA were considered to be set up.

Keywords: vitamin E acetate, nano-emulsion, Franz diffusion cell, skin delivery, lipid-soluble antioxidant

1. 서 론

비타민 E (α -tocopherol)는 1922년 Evans와 Bishop에 의해 쥐의 대사에 필수적인 요소로 최초 발견되었다[1]. 비타민 E가 발견된 이래로 80년이 넘는 오랜 기간 동안 비타민 E의 잠재 기능이나 거동, 높은 생물학적 효능[2]에 있어서 광범위한 관점의 다양한 연구가 이루어졌다. 그리고 비타민 E는 비타민의 활성 분자 메커니즘을 설명하는데 있어서 눈에 띄는 생리적 중요성을 지닌다[3].

천연의 비타민 E는 α , β , γ , 그리고 δ -토코페롤(tocopherol)의 네 가지 토코페롤과 이에 대응하는 네 가지 토코트리엔놀(α , β , γ , δ -tocotrienols)의 총 8종의 이성질체를 갖는 지용성 비타민이다[2,4-7]. 천연 비타민 E 8종의 광학 이성질체 중 쥐에 대한 흡수작용과 유기체 내에서의 비타민 E 활성의 평가에서 생물학적 활성이 가장 큰 것은 천연의 R,R,R- α -토코페롤이라고 알려져 있다[8-10]. 비타민 E (α -tocopherol)는 가장 중요한 지용성 항산화제로 지질 과산화 연쇄 반응에서 지질 라디칼 산물에 의한 산화로부터 세포막을 보호한다[2,4,5,11]. α -토코페롤이 지질과산화 라디칼의 반응을 억제할 때, 가장 먼저 생성되는 생성물은 α -토코페롤 라디칼이며 이 라디칼은 수소를 받아들임으로써 α -토코페롤로 재생될 수 있으며 이는 가역적 반응이다(Figure 1). 하지만 지속적인 산화가 일어나면 이 라디칼은 α -토코페롤

퀴논(α -tocopherol quinone, α -TQ)으로 되며 이 반응은 비가역적이다(Figure 1). 이 같은 이론은 α -토코페롤의 재생에 있어서 매우 중요하다. 생체 내에는 α -TQ으로의 비가역 반응이 일어나지 않도록 α -토코페롤 라디칼로부터 α -토코페롤로 재생산되는 정교한 메커니즘이 알려져 있다. 비타민 C (ascorbic acid), 레티놀(retinol), 유비퀴놀(ubiquinol)[10], 일부의 플라보노이드(flavonoids), 카로티노이드(carotenoids)[8] 등이 α -토코페롤의 재생 메커니즘에 관여하고 있다. 일반적으로 사람들이 섭취하는 대부분의 식이에는 최소한의 비타민을 가지고 있기 때문에 정상적인 상태에서 비타민 E의 결핍은 거의 발생되지 않는 것으로 알려져 있다. 그러나 질병상태나 자외선에의 노출은 다른 항산화제의 감소와 함께 α -토코페롤 수준도 감소시켜 활성산소종(ROS)에 의한 조직 손상이 야기된다[8]. 반면 식이에 의한 비타민 E가 항산화제로서 활성 능력이 없다고 보고되기도 하였다[13].

즉, 비타민 E가 인간의 신체 내에서 어떠한 작용을 하는지에 대하여 완전히 밝혀지지 않았다[2]. 하지만 지금까지 많은 연구에서 밝혀진 바로는 비타민 E 중 α -토코페롤은 지용성이 높기 때문에 지질 과산화반응의 현상이라 할 수 있는 세포막이나 세포 소기관 막에 분포되어 있는 것을 특징으로 갖는다. 막에 분포한 비타민 E는 국부적으로 생긴 활성산소에 의한 지질 과산화반응의 연쇄반응을 효율적으로 차단시킨다. 특히 피부에서 자외선 노

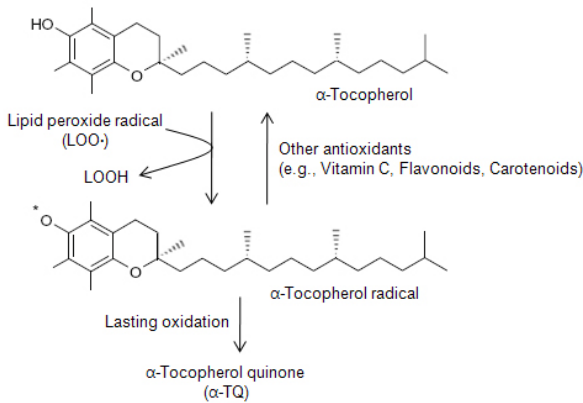


Figure 1. Antioxidant roles of α -tocopherol and α -tocopherol scavenges radicals in lipid peroxidation[17].

출로 생성된 반응성이 큰 1O_2 을 α -토코페롤 자신은 변하지 않고 불활성 시켜 효율적으로 제거할 수 있다. 생체막에서는 한 분자의 α -토코페롤이 적어도 40개의 1O_2 을 소광시킬 수 있다[14]. 뿐만 아니라 α -토코페롤은 1O_2 의 화학반응을 소거할 수 있다[15]. 또한 리놀산 메틸을 기질로 이용할 경우 α -토코페롤의 과산화 라디칼 소거능으로 산출된다고 보고되었다[16]. 그 외에 α -토코페롤은 막에 분포하여 구조적 요소로서 불포화 지방산 또는 지질 과산화물을 안정화시킨다고 보고되었다[8].

본 실험에서는 이러한 이점이 있는 α -토코페롤 중 그 유도체인 토코페릴 아세테이트(tocopheryl acetate)를 이용하였다(Figure 2). 비타민 E 아세테이트(vitamin E acetate, VEA)로도 잘 알려져 있는 토코페릴 아세테이트는 알파 형태인 $C_{31}H_{52}O_3$ 의 분자구조를 가지고 있다[17]. 현재 VEA는 피부 크림과 같은 피부용 제품에 널리 사용되고 있다. VEA는 그 자체로 페놀성 히드록실기가 방어되고 덜 산화적 산물을 제공하기 때문에 비타민 E를 대체하여 사용된다. 그것은 아세테이트가 천천히 가수분해 되어 일단 피부에 흡수되면 토코페롤을 재생시키고 태양 자외선으로부터 보호 기능을 제공한다고 알려져 있다[8].

VEA는 산화방지제로 화장품에 약 0.10 wt% 농도로 사용되고 있다. 본 실험에서는 이에 조금 못 미치는 0.07 wt%의 VEA를 적용시켜 나노 크기의 입자를 갖는 스킨 제형 에멀전을 제조하였다. 그리고 이 에멀전을 이용해 VEA가 쥐의 피부를 투과해 어느 정도로 체내에 흡수되어 효용성을 가지는가에 대하여 연구하였다. 또한 VEA에 대한 용해도가 높은 receptor phase 조성에 대한 실험을 진행하였다.

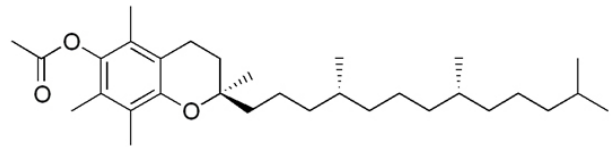


Figure 2. Structure of tocopheryl acetate (vitamin E acetate).

2. 재료 및 실험

2.1. 기기 및 시약

쥐 피부 투과 실험에 사용한 Franz diffusion cell은 PermeGear (USA)의 9 mm Franz diffusion cell (receptor volume 5 mL)과 V6A Stirrer 모델을 사용하였다. High-performance liquid chromatography (HPLC)를 이용하여 VEA를 정량 분석하였다. 사용된 HPLC는 Dionex (USA)의 P580 pump와 UVD 170S lamp이며, 컬럼은 Phenomenex (USA)의 Luna 5μ C18을 사용하였다. VEA의 최대 흡광도 측정을 위해 사용한 UV-visible spectrophotometer는 Varian (Australia)의 Cary 50 모델을 사용하였다.

시약은 각각 vitamin E acetate (98 %, Sigma aldrich, USA), L(+)-ascorbic acid (Junsei chemical, Japan), EDTA-2Na는 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입해 사용하였다. 계면활성제로 사용한 polyoxyethylene hydrogenated castor oil (HCO-10과 HCO-60)은 Nikkol (Japan)에서 구입하여 사용하였다. 완충용액제조에 사용된 $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 과 $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 는 DAEJUNG Chemicals & Metal (Korea) 제품을, 다른 조성물과 VEA를 분리하는 데 사용된 methylene chloride는 DC Chemical (Korea) 제품을, 에탄올(EtOH), 메탄올(MeOH) 등 각종 용매는 시판 특급 시약을 사용하였다.

2.2. VEA를 함유한 Nano-emulsion의 제조

VEA를 함유한 안정한 에멀전을 제조하기 위해 예비 실험을 진행하였다. 총 12개의 시료 중 층 분리가 일어나거나 나노 크기의 입자 범위를 벗어난 에멀전은 본 실험에서 제외시켰다. 2주 이상 안정한 상태를 유지한 Table 1의 네 가지 에멀전을 선정하여 각 100 mL 씩 제조하였다. VEA 0.07 wt%와 계면활성제로 사용한 polyoxyethylene (60) hydrogenated castor oil (HLB 14.0) 0.007 wt%, 그리고 EtOH 1.0, 10.0, 20.0 wt%를 각각 혼합시킨 oil phase를 우선 제조하였다. 여기에 phase inversion emulsifier method[18]를 사용해 준비된 oil phase에 water phase인 3차 증류수를 2 mL/min의 속도로 천천

Table 1. Composition of the VEA Nano-emulsion Formulations

Preparation	Ingredients (wt%)			
	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4
VEA	0.070	0.070	0.070	0.070
HCO-60	0.007	0.007	0.007	0.500
Ethanol	1.000	10.000	20.000	10.000
D.I-water	98.923	89.923	79.923	89.430

Table 2. HPLC Operation Conditions for Determination of VEA

System	Condition of HPLC analysis
Column	Phenomenex Luna 5 μ C18 (250 mm \times 4.6 mm)
Detector	UVD 170S Dionex
Flow rate	1.0 mL/min
Mobile phase	Methanol 100 %
Detector wavelength	285 nm
Injection volume	20 μ L

히 첨가하면서 교반하였다. 실험 시 온도는 75 $^{\circ}$ C를 유지하였다. Table 1에서 보는 바와 같이 시료 1, 2, 3은 EtOH 함량을 다르게 제조한 시료이고, 시료 4는 계면활성제인 HCO-60의 함량을 달리한 시료이다. 이와 같이 구성비가 다른 네 가지 nano-emulsion을 이용하여 UV-visible spectrophotometer로 VEA의 함유 유무를 확인하고 dynamic light scattering (DLS) 입도분석기를 이용하여 입자 크기를 측정, 비교하였다.

2.3. VEA의 HPLC 분석조건과 Modified Fick's Equation

피부를 투과한 VEA와 피부에 잔류하는 VEA의 양 등, VEA의 정량분석은 Dionex (USA)의 HPLC 기기를 사용하였다. 분석 조건으로 column은 Phenomenex (USA)의 Luna 5 μ C18 (250 mm \times 4.6 mm) 모델을 사용하였고 detector는 Dionex (USA)의 UVD 170S 모델을 사용하였다. 이동상은 MeOH 100 %, 이동 속도는 1 mL/min으로 예비 실험 결과 채택하였다. HPLC 분석조건은 Table 2에 나타내었다.

VEA의 피부 투과도는 아래의 modified Fick's equation을 이용해 계산하였다[19].

$$J = \frac{V}{A} \frac{dc}{dt}$$

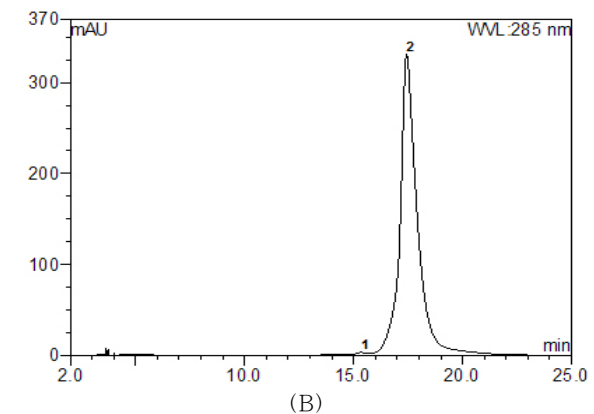
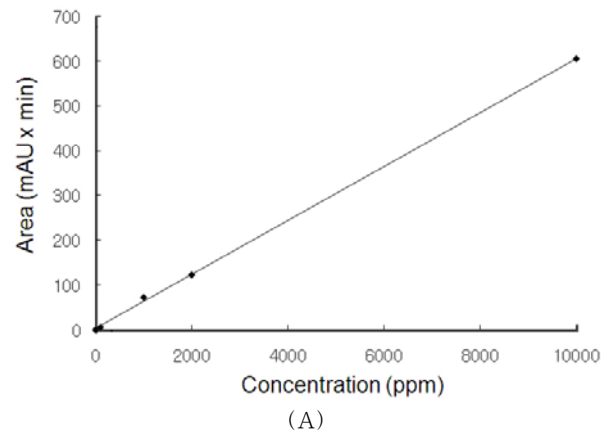


Figure 3. (A) Calibration curve of the VEA standard injected in the range from 100 to 10,000 ppm ($\lambda = 285$ nm). (B) HPLC chromatogram of VEA standard. 2: VEA.

J = steady-state flux ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)

dc/dt = 평형상태에서 단위 시간당 피부를 통과하는 VEA의 농도

V = receptor compartment volume (cm^2)

A = VEA투과가 일어나는 피부의 면적 (cm^2)

위 식을 이용하여 단위 시간 당 경표피를 통과하는 VEA의 농도(dc/dt)를 구하기 위해 VEA의 검량선이 필요하였다. VEA의 검량선을 그리기 위해 100부터 10,000 ppm까지 농도로 HPLC를 이용한 정량 분석에 의해 Figure 3(A)와 같이 $R^2 = 0.999$ 인 검량선을 얻었다. VEA는 Table 2와 같은 분석조건에서 약 18 min (Figure 3(B))에 VEA peak가 나타났다.

2.4. VEA의 용해도를 통한 Receptor Phase 결정

Receptor에서 VEA를 가장 잘 용해시킬 수 있는 용매 조건을 찾기 위해 다양한 실험을 진행하였다. EtOH 함

Table 3. Composition of the Receptor Phase Formulations (Experiment 1)

Preparation	Ingredients (wt%)			
	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4
HCO-10	2.0	2.0	2.0	2.0
EtOH	5.0	10.0	20.0	40.0
PBS	93.0	88.0	78.0	58.0

Table 4. Composition of the Receptor Phase Formulations (Experiment 2)

Preparation	Ingredients (wt%)			
	HCO-10	Arlacel-60	Arlacel-83	GMS-205
Surface active agent	2.0	2.0	2.0	2.0
EtOH	10.0	10.0	10.0	10.0
PBS	88.0	88.0	88.0	88.0

량, 계면활성제의 종류, 그리고 첨가한 산화 방지제의 종류에 따른 VEA의 용해 정도를 비교하고 VEA의 최적 투과 조건을 선정하였다. 이를 통해 VEA의 용해 조건에 관한 특성을 파악할 수 있었다.

2.4.1. EtOH 함량에 따른 VEA 용해도 실험

계면활성제인 polyoxyethylene (10) hydrogenated castor oil (HCO-10)을 2.0 wt% 넣고 EtOH은 5.0, 10.0, 20.0, 40.0 wt%를 각각 넣는다. 이를 상온에서 stirring mixer로 혼합한 뒤 완충용액인 phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4)를 총 용량 100 wt%가 될 때까지 혼합한다. 이렇게 제조된 EtOH 함량이 다른 네 개의 시료를 각각 5 mL 씩 바이알에 담아 V6A Stirrer (Perme gear, USA)로 37.0 °C를 유지하여 교반시켰다. 이 네 개의 시료에 동량의 VEA 0.5 g을 과량으로 첨가 해 24 h 동안 교반시켰다. 24 h 뒤에 0.3 mL를 취해 상대적으로 비중이 큰 methylene chloride를 1 : 1 비율로 넣어 2 min 동안 vortex mixing 해준다. 이 시료를 10,000 rpm에서 10 min 동안 원심분리기 시킨 뒤에 하부의 methylene chloride 층을 취해 HPLC로 분석하였다. EtOH 함량 차이에 따른 VEA의 용해도를 비교하였다.

2.4.2. 계면활성제 종류에 따른 VEA 용해도 실험

Receptor에 사용된 계면활성제 HCO-10이 VEA의 검출에 가장 적합한가를 확인하기 위하여 몇 가지 다른 계면활성제를 사용하여 용해도 비교 실험을 진행하였다.

Table 5. Composition of the Receptor Phase Formulations (Experiment 3)

Preparation	Ingredients (wt%)		
	Sample 1	Sample 2	Sample 3
HCO-10	2.00	2.00	2.00
Vitamin C	0.10	-	0.05
EDTA-2Na	-	0.10	0.05
EtOH	10.00	10.00	10.00
PBS	87.90	87.90	87.90

HCO-10, Arlacel-60, Arlacel-83, 그리고 GMS-205를 각 2.0 wt%로 동일하게 넣고 여기에 EtOH 10.0 wt%를 동량 넣어준다. 이를 상온에서 stirring mixer로 혼합한 뒤 완충용액인 phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4)를 총 용량 100 wt%가 될 때까지 혼합한다. 이렇게 제조된 계면활성제 종류가 다른 네 개의 시료를 각각 5 mL 씩 바이알에 담아 V6A Stirrer (Perme gear, USA)로 37.0 °C를 유지하여 교반시켰다. 이 네 가지 시료에 동량의 VEA 0.1 g을 첨가 해 24 h 동안 교반시켰다. 24 h 뒤에 0.3 mL를 취해 상대적으로 비중이 큰 methylene chloride를 1 : 1 비율로 넣어 2 min 동안 vortex mixing 해준다. 이 시료를 10,000 rpm에서 10 min 동안 원심분리기 시킨 뒤에 하부의 methylene chloride 층을 취해 HPLC로 분석하였다. 계면활성제 종류에 따라 어떤 조건의 VEA가 가장 많이 용해되고 안정적인지 비교하였다.

2.4.3. 산화방지제에 따른 VEA의 용해도 비교 실험

Receptor의 안정성과 VEA 투과량을 늘리기 위하여 두 가지 산화방지제를 첨가해 비교 시험하였다. 사용된 산화 방지제는 금속이온 소거제로 잘 알려져 있는 EDTA-2Na와 강력한 환원제인 ascorbic acid (vitamin C)이다. 비타민 C와 EDTA-2Na의 함량은 0.1 wt%로 동일하게 구성하였고 이 두 가지 산화방지제를 1 : 1로 혼합한 시료 3을 제조하였다. 계면활성제인 HCO-10과 산화방지제를 넣은 뒤 EtOH 10.0 wt%를 넣어 혼합시켜 완전히 용해시켰다. 여기에 완충용액을 넣어 magnetic stirring 시킨 뒤 각각 5 mL 씩 바이알에 담아 V6A Stirrer (Perme gear, USA)로 37.0 °C를 유지하면서 교반시켰다. 이 세 가지의 시료에 동량의 VEA 0.01 g을 첨가 하고 VEA의 용해도를 측정하기 위해 0.5, 4, 8, 12, 24 h 간격으로 5회에 걸쳐 0.3 mL 씩 취하였다. 그리고 취한 시료는 상대적으로 비중이 큰 methylene chloride를 1 : 1 비율로 넣어 2 min 동안 vortex mixing 한 뒤 10,000

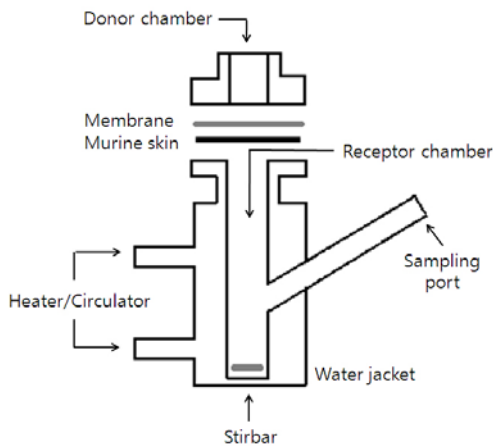


Figure 4. Schematic diagram of Franz diffusion cell apparatus.

rpm에서 10 min 동안 원심분리기 시킨 뒤에 하부의 methylene chloride 층을 취하여 HPLC로 정량 분석하였다. 산화방지제에 따라 VEA가 어떤 양상으로 검출되는지 확인하였다.

2.5. VEA Nano-emulsion 조성에 따른 경표피 투과 실험

앞서 시행한 receptor phase 선정을 통해 최적의 VEA 용해도를 가진 receptor phase 조성을 확정하였다. Table 1에서 제조한 VEA를 함유한 nano-emulsion을 시료로 Franz diffusion cell을 이용한 쥐 피부 투과 실험을 진행하였다. 사용된 쥐의 피부는 경추탈골로 치사시킨 ICR outbred albino mice (12주령, 약 50 g, 암컷)의 배에서 적출하여 사용했다. 적출한 피부에서 피하지방과 조직을 피부가 상하지 않게 제거한 피부 크기는 1.5 cm × 1.5 cm로 진피는 제거하지 않고 사용하였다. 각질 부분이 위로 향하도록 donor와 receptor phase 사이에 피부를 고정시켰다. Receptor phase과 접촉하는 경표피의 면적은 0.6362 cm² 이고, receptor phase는 가장 우수한 VEA 용해도를 보인 HCO-10 : vitamin C : EtOH : PBS = 2.0 : 0.1 : 10.0 : 87.9 (w/w/w/w%)의 혼합액을 사용하였다. 준비된 Franz diffusion cell에 5 mL의 receptor phase를 투여하고 항온수조를 이용해 온도를 37 ± 0.5 °C로 유지하였다. 교반 속도는 150 rpm으로 2 h 동안 일정하게 교반시켰다. 각 시료 0.2 mL를 donor의 경표피 표면에 가한 후 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 16, 24 h 간격(총 8회)으로 매 회 0.3 mL의 receptor phase를 sampling port를 통해 파스퇴르 피펫으로 채취하여 1.5 mL 튜브에 보관하였다. 채취 직후 동량의 신선한 receptor solution으로 보충하였다. 채취한 시료는 동량의 methylene chloride를

넣고 2 min 동안 vortex mixing 한 뒤 10,000 rpm으로 10 min 동안 원심 분리하였다. Methylene chloride 층을 취해 HPLC로 VEA의 양을 정량분석 하였다.

24 h 동안 시료를 채취한 뒤 경표피에 남아있는 VEA 양을 측정하기 위해 우선 diffusion cell에서 꺼낸 직후 2회에 걸쳐 PBS로 세척하였다. 세척 후 receptor phase와 닿았던 부위를 잘라 1.5 mL 튜브에 넣고 수술용 가위를 이용해 세절하였다. 여기에 0.3 mL의 methylene chloride를 넣고 2 min 동안 vortex mixing 후 60 min 동안 초음파 세척기로 혼합하였다. 이를 10,000 rpm으로 10 min 동안 원심분리한 뒤 하층부를 취해 경표피에 남아있는 VEA의 양을 HPLC로 정량하였다. HPLC 조건은 앞서 Table 2에 나타내었다.

2.6. 통계처리

모든 실험은 3회 반복하였고 통계분석은 5 % 유의수준에서 Student's *t*-test를 행하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. VEA를 함유한 Nano-emulsion의 제조와 그 안정성 및 입자 크기 측정

3.1.1. UV-Vis를 이용한 VEA 유무 확인

VEA의 최대 흡광도는 285 nm로 알려져 있다[20]. 제조한 Table 1의 네 가지 nano-emulsion의 최대 흡광도를 UV-visible spectrophotometer로 측정하였다. VEA 단독의 흡광도를 측정한 결과 285 nm에서 최대 흡광도를 나타냈으며, 제조한 네 가지 nano-emulsion 모두에서 VEA의 최대 흡광도가 285 nm 임을 확인하였다(data not shown).

3.1.2. 제조한 VEA Nano-emulsion의 입자 크기 측정

제조한 VEA nano-emulsion의 입자 크기는 광산란 입자 측정기(dynamic light scattering (DLS) particlesizer, ELS-Z, Otsuka Elec., Japan)를 이용하여 측정하였다. 입자의 크기는 시료 3 > 시료 2 > 시료 1 > 시료 4의 순서로 나타났다(Figure 5).

EtOH 함량을 달리 한 시료 중 EtOH 함량이 20.0 wt%인 시료 3의 평균 입자 크기는 804.1 nm로 가장 컸으며 EtOH 함량이 1.0 wt%인 시료 1이 478.6 nm로 가장 작았다. 이러한 경향은 계면활성제 HCO-60을 0.007 wt% 사용한 VEA nano-emulsion에서 EtOH 함량이 5.0 wt%

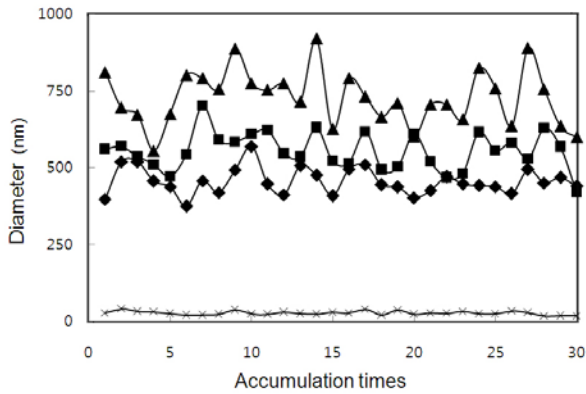


Figure 5. Particle size comparison of VEA nano-emulsion. Sample 1 (◆), sample 2 (■), sample 3 (▲), sample 4 (X).

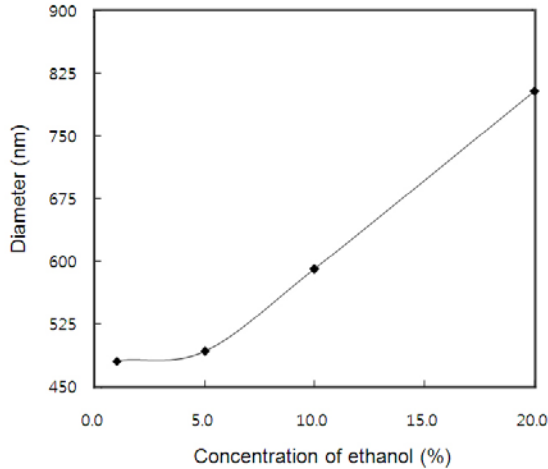


Figure 6. Particle size of VEA nano-emulsion with concentration of EtOH (wt%).

를 넘어서면서 나타난다. EtOH 함량이 5.0 wt%인 경우의 입자 크기는 479.1 nm로 함량이 1.0 wt%인 에멀전과는 0.5 nm 차이밖에 나지 않았다. 하지만 EtOH 함량이 10.0 wt%인 에멀전의 경우 입자 크기는 587.4 nm로 100 nm 이상 차이가 나는 것을 확인하였다. 이는 EtOH 함량이 계면활성제가 oil-water 계면에서 작용할 수 있는 적정 수준을 벗어나 나타나게 되는 Ostwald ripening 현상으로 설명될 수 있다. 제조된 VEA nano-emulsion은 EtOH 함량이 5.0 wt% 정도까지는 어느 정도 비슷한 크기의 안정한 에멀전을 형성하지만, 더 많은 양의 EtOH이 첨가되면 완전히 혼합되지 않은 EtOH이 안정한 에멀전 부근에 존재하게 된다. 이러한 현상으로 인해 입자의 크기 차이가 생기게 되고, 큰 입자와 작은 입자의 표면적

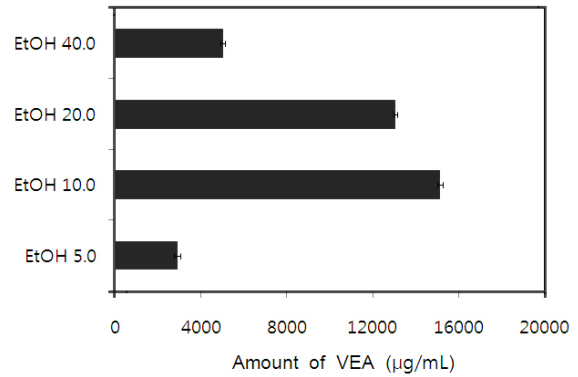


Figure 7. Concentration of VEA from the differential receptor phase formulations of ethanol (mean ± S.D., n = 3).

차이로 인해 발생하는 용해도 차이로 인해 Ostwald ripening이 나타난다. 이로 인해 상대적으로 작은 입자가 큰 입자에 흡수되면서 큰 입자의 크기는 더욱 커지게 된다 [21].

또 다른 경향성을 보기 위해 계면활성제인 HCO-60의 함량에 따른 입자 크기를 비교하였다. HCO-60의 함량을 0.5 wt%로 늘리고 EtOH 함량이 10.0 wt%인 에멀전(시료 4)과 HCO-60 함량이 0.007 wt%이고 다른 조건은 동일한 에멀전(시료 2)의 입자 크기를 비교한 결과 Figure 5에서 보는 바와 같이 시료 4는 에멀전 입자 크기가 26.0 nm로 네 가지 시료 중 가장 작았다. 이것은 810.55 nm인 시료 2와 비교했을 때 1/20에 해당하는 크기로 입자 크기가 쥐 피부 투과와의 상관관계를 밝혀내는 데 사용되었다.

3.2. Receptor Phase의 선택

3.2.1. EtOH 함량에 따른 비교 실험

Receptor phase를 구성하는 EtOH의 함량에 따라 VEA의 용해도에 영향을 줄 것으로 예상되었다. 최적의 VEA 용해도를 갖는 EtOH 함량을 찾기 위해 5.0, 10.0, 20.0, 40.0 wt%의 EtOH 함량을 갖는 네 가지 시료를 준비해 37.0 °C에서 24 h 동안 V6A Stirrer로 교반하였다. 실험 결과 EtOH 함량이 10.0에서 20.0 wt%일 경우 VEA의 용해도가 큰 것으로 나타났다. 일반적으로 지용성 비타민인 VEA는 EtOH에 잘 용해되지만 본 실험에서는 상대적으로 많은 양을 차지하는 PBS에 의해 더 많은 영향을 받는 것으로 생각된다. 즉, VEA의 용해도가 좋은 EtOH 함량은 10.0 ~ 20.0 wt%인 것으로 확인할 수 있다. EtOH 함량이 10.0 wt% 미만인 경우나 20.0 wt%를 초과할 경우에는 상대적으로 용해도가 크게 감

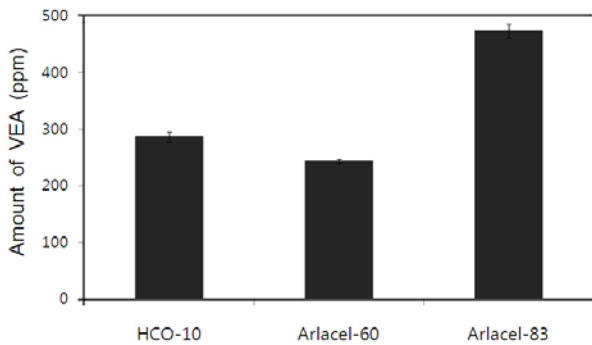


Figure 8. Concentration of VEA from the differential receptor phase formulations of surface active agents (mean \pm S.D., $n = 3$).

소하는 것을 볼 수 있었다(Figure 7). 이는 VEA에 대한 용해도가 높은 receptor phase 조성은 EtOH 함량이 10.0 ~ 20.0 wt%가 적절한 것임을 말해준다. Receptor phase를 구성하는데 있어서 적절한 EtOH 함량은 VEA의 용해도를 높일 수 있는 것으로 나타났다.

3.2.2. 계면활성제 종류에 따른 비교 실험

네 가지 계면활성제 중 VEA에 대한 용해도가 가장 큰 계면활성제를 선택하기 위하여 HPLC로 검출되는 VEA의 양을 비교하였다. 실험결과 Arlcel-83 (HLB 3.7) > HCO-10 (HLB 6.5) > Arlcel-60 (HLB 4.7) > GMS-205 (HLB 3.8) 순으로 VEA에 대한 용해도가 좋은 것으로 나타났다(Figure 8). Arlcel-83은 대표적인 지용성 계면활성제로 화장품과 제약 분야에 널리 사용되는 것으로 알려져 있다. GMS-205의 경우 VEA를 첨가한 직후 굳어지기 시작하여 정량분석에서 제외시켰다. 결과적으로 receptor phase에 사용된 계면활성제 종류에 따라 용해되는 VEA의 양이 달랐고, 이것은 계면활성제의 HLB 값과는 상관관계가 없었다. 다만 화학 구조적으로 VEA를 가장 많이 용해시킨 계면활성제 Arlcel-83에 대한 실험과 논의는 추후 추가 실험을 통해 진행할 것이다. 뒤에 진행된 쥐 피부 투과 실험에서는 HCO-60과 가장 친화력이 좋은 HCO-10을 receptor phase의 계면활성제로 사용하였다.

3.2.3. 산화방지제에 따른 비교 실험

Ascorbic acid와 EDTA-2Na, 그리고 두 산화방지제를 혼합한 receptor phase에 대한 VEA의 용해도를 비교하였다(Figure 9). 0.5 h에서의 VEA 검출량은 ascorbic

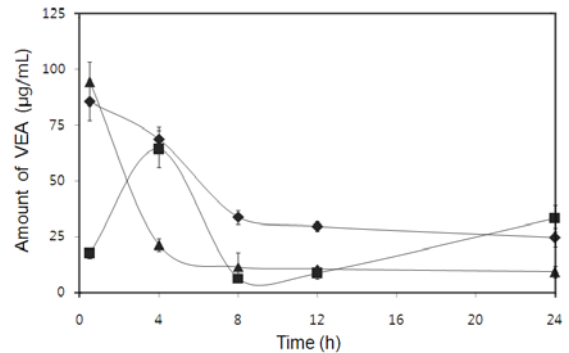


Figure 9. Concentration of VEA from the differential receptor phase formulations (mean \pm S.D., $n = 3$). Sample 1 (◆), sample 2 (■), sample 3 (▲).

acid를 사용한 시료 1과 두 산화방지제를 혼합한 시료 3이 비슷했지만 시간이 흐를 때 따라 양상이 크게 바뀌었다. 4 h 이후부터 24 h까지 2배 정도의 검출량 차이를 보이며 ascorbic acid가 함유된 receptor phase가 VEA에 대한 용해도가 높았다. 이와 달리 EDTA-2Na를 산화방지제로 사용한 경우 VEA의 검출량이 불안정한 것으로 나타났다. 검출량의 시간에 따른 경향성이 보이지 않았고 육안으로 확인한 결과 receptor phase에 VEA가 완전히 용해되지 않는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 ascorbic acid를 사용하는 것이 EDTA-2Na나 두 산화방지제를 혼합하여 사용하는 것보다 VEA를 효과적으로 용해시킴을 보여준다.

이상의 세 가지 비교 실험을 통해 최적의 VEA 용해도를 갖는 receptor phase를 선택하였다. 그 조성비는 HCO-10 : vitamin C : EtOH : PBS = 2.0 : 0.1 : 10.0 : 87.9 (w/w/w/w%)로 하였다. 이 receptor phase를 이용해 Franz diffusion cell에 적용하여 VEA nano-emulsion의 쥐 피부 투과 실험을 진행하였다.

3.3. VEA Nano-emulsion 조성에 따른 쥐 피부 투과 실험

Nano-emulsion 조성에 따른 VEA의 쥐 피부 투과량을 24 h 까지 시간 테이블에 따라 정량분석 하여 이로부터 얻은 피부를 투과한 VEA의 양상을 Figure 10에 나타내었다. 앞서 측정된 에멀전의 입자 크기는 시료 3(804.1 nm) > 시료 2(587.4 nm) > 시료 1(478.6 nm) 순으로 큰 것을 확인하였다. EtOH 함량이 증가함에 따라 입자 크기도 커지는 경향을 보였으나 쥐 피부를 이용한 VEA 투과 실험에서 가장 투과가 잘 된 에멀전은 EtOH 함량이 10.0 wt%인 시료 2였다. 시료 2의 경우 VEA의 최종 투

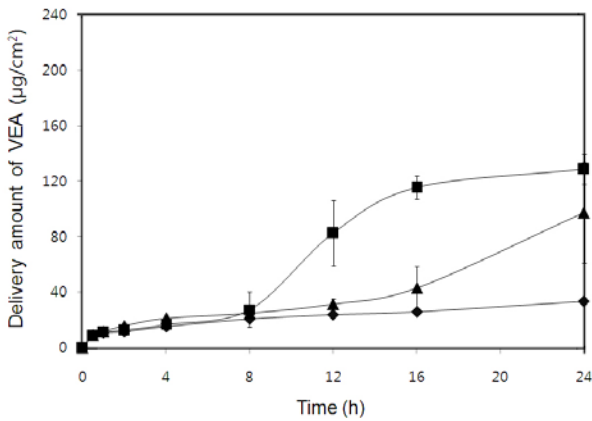


Figure 10. Permeation profiles of VEA through ICR outbred albino mice skin from the differential emulsion formulations (mean \pm S.D., n = 3). Sample 1 (◆), sample 2 (■), sample 3 (▲).

과량은 $128.8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 으로 초기 VEA 투입량 $220.057 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 과 비교하여 58.53 %가 투과된 것을 확인하였다. 초기 8 h 까지 EtOH 함량이 다른 세 가지 에멀전은 비슷한 VEA 투과량을 보였지만, 8 h이 지나면서 EtOH 함량이 10.0 wt%인 시료 2의 투과량이 크게 증가하였다. 시료 3(EtOH 함량 20.0 wt%: 투과량 $97.28 \mu\text{g}/\text{cm}^2$; 초기 투입량 대비 44.21 %)이나 시료 1(EtOH 함량 0.1 wt%: 투과량 $33.67 \mu\text{g}/\text{cm}^2$; 초기 투입량 대비 15.3 %)에 비해 눈에 띄게 많은 양이다(Figure 10). 상대적으로 입자 크기가 작았던 시료 1의 VEA 투과량이 적은 것은 괄목할 만한 부분이다. 이는 에멀전의 입자 크기가 작을수록 피부 투과력을 향상 시키는 것은 아니라는 것을 나타낸다. 시료 2(587.4 nm) > 시료 3(804.1 nm) > 시료 1(478.6 nm)의 순으로 많은 양의 VEA가 쥐 피부를 투과했다. 이러한 결과로 VEA와 같은 활성성분을 피부 내로 투과시키기 위해서는 최적의 에멀전 조성 조건이 있다는 것을 확인하였다. VEA는 EtOH 함량이 10.0 wt%인 에멀전 조성 조건에서 가장 좋은 피부 투과력을 보인 것으로 판단된다.

계면활성제 함량을 달리한 시료 4를 동일 EtOH 농도인 시료 2와 비교한 결과를 Figure 11에 나타냈다. 에멀전 입자의 크기는 계면활성제가 과량으로 들어간 시료 4가 1/20 정도인 26.0 nm로 매우 작았지만 쥐 피부를 투과한 VEA의 최종량은 입자크기가 587.4 nm인 시료 2보다 오히려 적은 $54.848 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 이었다(Figure 11). 계면활성제가 많이 들어간 에멀전의 입자 크기는 작아졌지만 활성성분의 피부 투과력은 향상되지 않았다는 것을 확인할 수 있었다.

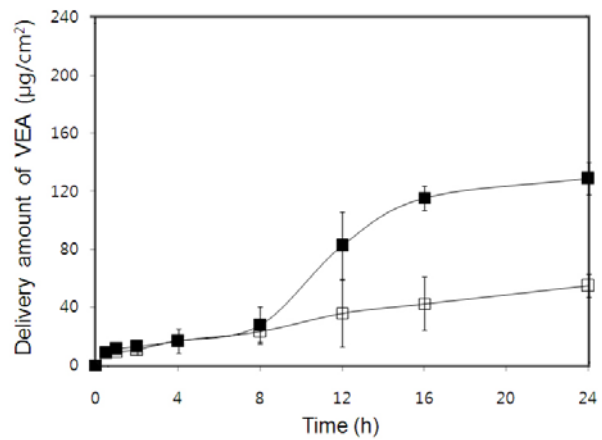


Figure 11. Permeation profiles of VEA through ICR outbred albino mice skin from the differential concentration of HCO-60 formulations (mean \pm S.D., n = 3). Sample 2 (■), sample 4 (□).

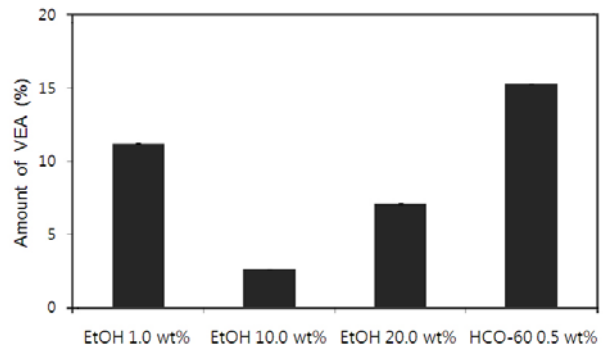


Figure 12. Remaining amounts of VEA through ICR outbred albino mice skin from the differential emulsion formulations (mean \pm S.D., n = 3). Sample 1: EtOH 1.0 wt%; sample 2: EtOH 10.0 wt%; sample 3: EtOH 20.0 wt%; sample 4: HCO-60 0.5 wt%.

24 h 동안 피부를 투과한 VEA의 검출 외에 피부에 남아있는 잔류 VEA의 양을 측정하였다. VEA의 잔류량은 과량의 계면활성제를 함유한 시료 4가 초기 투입량과 비교하여 약 15 %의 VEA가 잔류하여 가장 많았다. 이것은 지용성 계면활성제인 HCO-60이 과량으로 함유된 에멀전에 포함된 VEA가 계면활성제와 함께 피부를 통과하지 못하고 피부에 잔류하는 것을 나타내는 결과이다. 또한 EtOH 함량에 따른 에멀전의 경우 VEA의 잔류량은 시료 1(EtOH 함량 1.0 wt%) > 시료 3(EtOH 함량 20.0 wt%) > 시료 2(EtOH 함량 10.0 wt%) 순으로 나타났다(Figure 12). 이러한 결과는 10.0 wt% EtOH을 함유

한 시료 2의 VEA 피부 투과량이 가장 많았던 결과와 일치한다. 투과량이 많으면 상대적으로 피부에 남아있는 활성성분의 양은 적었다.

이와 같은 결과로 활성성분의 피부 투과력을 향상시키기 위하여 nano-emulsion의 입자 크기도 중요하지만 그 에멀전의 조성이 더 중요하다는 것을 알 수 있었다. 활성성분의 피부 투과력을 증대시키기 위해서는 에멀전에 함유된 EtOH과 계면활성제 함량의 최적 조건을 찾는 것이 중요하다는 것을 다시 한 번 확인하였다.

4. 결 론

1) VEA를 0.07 wt% 함유한 nano-emulsion의 입자 크기는 DLS 입도분석기를 이용해 측정하였다. 네 가지 조성이 다른 nano-emulsion의 입자 크기는 시료 3(EtOH 20.0 wt%) > 시료 2(EtOH 10.0 wt%) > 시료 1(EtOH 1.0 wt%) > 시료 4(HCO-60 0.5 wt%)의 순서로 나타났다. EtOH 함량 증가에 따라 에멀전 입자의 크기는 증가하였으며, 계면활성제 함량이 많은 경우 입자 크기는 작아졌다.

2) Receptor phase의 EtOH 함량을 조절하여 적절한 VEA의 용해도를 확인 할 수 있었다. EtOH 함량이 5.0, 40.0 wt%인 경우보다 10.0 ~ 20.0 wt%인 경우 VEA의 용해도가 높은 것을 확인하였다.

3) Receptor phase에 사용되는 계면활성제의 종류에 따른 VEA 용해도 변화를 확인하였다. 화학구조가 다른 네 가지 계면활성제를 비교한 결과 Arlacel-83 (HLB 3.7) > HCO-10 (HLB 6.5) > Arlacel-60 (HLB 4.7) > GMS-205 (HLB 3.8) 순으로 VEA에 대한 용해도가 높은 것으로 나타났다.

4) Receptor phase에 첨가된 산화 방지제에 따라 VEA의 용해도는 차이를 나타냈다. 측정 초기에는 ascorbic acid가 함유 된 시료 1과 두 산화방지제를 혼합한 시료 3이 비슷한 VEA 검출량을 보였지만 4 h 이후부터 24 h까지 2배 정도의 검출량 차이를 보이며 ascorbic acid가 함유 된 receptor phase가 VEA에 대한 용해도가 높은 것으로 나타났다. 이와 달리 EDTA-2Na를 산화 방지제로 사용한 경우 VEA의 검출량이 일정하지 않은 것으로 나타났다. Ascorbic acid를 사용하는 것이 EDTA-2Na나 두 산화방지제를 혼합하여 사용하는 것보다 VEA를 효과적으로 용해시키는 것을 보여준다.

5) 네 가지 다른 함량의 VEA 함유 nano-emulsion을 쥐 피부를 이용한 Franz diffusion cell에 적용시켜 VEA의 투과량을 측정한 결과 EtOH 함량이 10.0 wt%인 시

료 2의 경우에 $128.8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 으로 가장 많은 양이 검출되는 것을 볼 수 있었다. 이것은 초기 VEA 투입량인 $220.057 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 대비하여 58.53 %가 투과된 것으로 EtOH 함량이 다른 시료 1(1.0 wt%)과 3(20.0 wt%)에 비교해 볼 때 각각 45 %, 15 % 이상 높았다. 시료 2가 상대적으로 입자 크기가 작은 시료 1이나 입자 크기가 크지만 EtOH 함량이 많은 시료 3보다 VEA 투과량에 있어서 더 적절한 조성이라는 것을 확인할 수 있었다. 과량의 계면활성제를 사용한 시료 4의 경우 동일 EtOH 농도로 제조한 시료 2와 비교했을 때 입자 크기는 1/20 정도로 작았지만(26.0 nm) 피부를 투과하는 VEA 양은 시료 2(590.7 nm)보다 오히려 적은 것으로 확인되었다.

이상의 결과들로 항산화제로서 화장품과 의약품에 널리 적용되고 있는 VEA를 함유한 nano-emulsion의 피부 투과도와 receptor phase 조성에 따른 VEA의 용해도 차이를 확인하였다. 이러한 결과들을 이용해 피부 내로 VEA를 침투시키는 데 필요한 최적의 조건 확립에 한 걸음 다가설 수 있을 것으로 보인다.

참 고 문 헌

1. H. M. Evans and K. S. Bishop, On the existence of a hitherto unrecognized dietary factor essential for reproduction, *Science*, **56**, 650 (1922).
2. R. Brigelius-Flohé and M. G. Traber, Vitamin E: function and metabolism, *J. FASEB*, **13**(10), 1145 (1999).
3. R. Stocker and J. F. Keaney Jr., Role of oxidative modifications in atherosclerosis, *Physiol. Rev.*, **84**, 1381 (2004).
4. D. F. Counts, F. Skreko, J. McBee, and A. G. Wich, The effect of retinyl palmitate on skin composition and morphometry, *J. Soc. Cosmetic Chemists*, **39**(4), 235 (1988).
5. B. Idson, Vitamins and the skin, *Cosmet. Toilet*, **108**, 7992 (1993).
6. E. Herrera and C. Barbas, Vitamin E: action, metabolism and perspectives, *J. Physiol. Biochem.*, **57**(2), 43 (2001).
7. L. Packer, S. U. Weber, and G. Rimbach, Molecular aspects of alpha-tocotrienol antioxidant action and cell signalling, *J. Nutr.*, **131**(2), 369 (2001).
8. S. N. Park, Skin aging and antioxidant, *J. Soc.*

- Cosmet. Scientists Korea*, **23**, 75 (1997).
9. H. Moller, A. Ansmann, and S. Wallat, The effects of vitamin E on the skin in topical applications, *Fat. Sci. Technol.*, **8**, 295 (1989).
 10. M. J. Fryer, Evidence for the photoprotective effects of vitamin E, *Photochem. Photobiol.*, **58**, 304 (1993).
 11. M. G. Traber and J. Atkinson, Vitamin E, antioxidant and nothing more, *Free Radic. Biol. Med.*, **43**(1), 4 (2007).
 12. X. Wang and P. Quinn, Vitamin E and its function in membranes, *Prog. Lipid Res.*, **38**(4), 309 (1999).
 13. R. Brigelius-Flohé, Vitamin E: the shrew waiting to be tamed, *Free Radic. Biol. Med.*, **46**(5), 543 (2009).
 14. K. Briviba and H. Sies, Peroxynitrite does not decompose to singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) and nitroxyl (HNO), *FEBS Lett.*, **355**, 287 (1994).
 15. S. Clough, A. Heidemann, and H. Kraxenberger, Torsional relaxation of methyl-group nuclear-spin-symmetry species, *Phys. Rev. Lett.*, **42**, 1298 (1979).
 16. H. Niki, P. D. Maker, C. M. Savage, and L. P. Breitenbach, Fourier transform infrared study of the kinetics and mechanism for the reaction of hydroxyl radical with formaldehyde, *J. Phys. Chem.*, **88**, 5342 (1984).
 17. G. M. Beijersbergen van Henegouwen, H. E. Junginger, and H. de Vries, Hydrolysis of R,R,R-alpha-tocopheryl acetate (vitamin E acetate) in the skin and its UV protecting activity (an *in vivo* study with the rat), *J. Photochem. Photobiol. B.*, **29**(1), 45, (1995).
 18. S. Shahriar, Nanoemulsion formation by phase inversion emulsification: on the nature of inversion, *Langmuir*, **22**, 5597 (2006).
 19. J. S. Kim, D. H. Kwon, D. H. Lim, G. S. Kim, and C. Y. Kang, *in vitro* study of transdermal delivery system for caffeine in slim patch type, *J. Kor. Pharm. Sci.*, **36**(2), 97 (2006).
 20. D. W. Nierenberg, D. C. Lester, and T. A. Colacchio, Determination of tocopherol and tocopherol acetate concentrations in human feces using high-performance liquid chromatography, *J. Chromatography*, **2**(413), 79 (1987).
 21. X. Qingyi, N. Mitsutoshi, N. Hiroshi, I. Satoshi, and L. Xinqi, The effects of ethanol content and emulsifying agent concentration on the stability of vegetable oil-ethanol emulsions, *J. American Oil Chemists' Society*, **12**(78), 1185 (2006).