

고압유화 공정이 적용된 화장품의 피부흡수 및 피부 미백효과 연구

장수임[†] · 이소미 · 백병열 · 한지연 · 김은주 · 이해광

(주)아모레퍼시픽 기술연구원

(2017년 8월 30일 접수, 2017년 9월 25일 수정, 2017년 9월 26일 채택)

A Study on Skin Permeability and Skin Whitening Effect of High Pressure Emulsification Processed Cosmetic

Sue Im Jang[†], So Mi Lee, Byung Ryol Paik, Jiyeon Han, Eun Joo Kim, and Hae Kwang Lee

Amorepacific Corporation/R&D Center, Yongin-si, Gyeonggi-do 17074, Korea

(Received August 30, 2017; Revised September 25, 2017; Accepted September 26, 2017)

요약: 피부는 외부의 유해한 인자로부터 신체를 보호하는 장벽 기능을 한다. 이러한 피부의 장벽기능은 유효 물질이 피부에 투과되기 어려움이 있다. 본 연구에서는 피부의 투과도를 높이기 위해 입자의 크기를 줄이는 고압 유화 공정을 거친 시료를 제작하여 피부에 도포한 후 유효 물질의 투과도를 비침습적으로 측정하고자 하였다. 유효물질인 niacinamide는 고압유화 공정을 거친 시험시료가 그렇지 않은 대조시료에 비해 1.56배 많이 흡수되었으며 tape-stripping을 통해 떼어낸 각질의 여섯 번째 층까지 유의하게 많이 흡수되어 더 깊게 투과되었음을 확인하였다. 또한 niacinamide가 함유된 시험 시료의 미백 효능 평가를 사용 전과 사용 6주 후 평가하였을 때 색소침착 부위와 비색소침착부위에서 유의하게 피부색 명도값이 개선된 것을 확인하였다. 본 연구를 통해 각질 tape-stripping을 통해 비침습적으로 시료의 투과도를 시각적 및 정량적으로 확인할 수 있으며 고압유화 공정으로 입자의 크기를 줄인 시료는 유효물질의 피부 투과도가 높아 피부 미백에 도움을 주는 것으로 사료된다.

Abstract: Skin has a strong barrier function to protect the body from external harmful factors. This strong barrier function of the skin makes for any effective substance difficult to permeate through the skin. The purpose of this study was to evaluate skin permeability of the reduced particle size by non-invasive method. The particles were prepared by high-pressure emulsification. The niacinamide prepared in a high-pressure emulsification was absorbed 1.56 times higher than the control sample. In addition, it was found from the sixth layer of keratin that was removed by tape-stripping method. This was significantly deeper penetration. The whitening efficacy of the sample containing niacinamide was evaluated before and after 6 weeks of use. The skin color was significantly improved in both pigmented area and non-pigmented area. Through this study, it was possible to visually and quantitatively confirm the permeability confirm the permeability of the reduced particle sample into skin.

Keywords: skin permeability, high-pressure emulsification, DESI-MS, skin pigmentation, clinical research

1. 서 론

피부는 최외각층에 존재하여 외부의 유해한 인자 및 미생물로부터 신체를 보호하는 기능을 한다[1]. 따라서

각질층은 강력한 장벽기능을 가지고 있어 항산화제, 미백제 및 항노화 제제 등의 유효 성분이 침투하기 어려움이 있다. 유효 성분의 피부 투과도를 높이기 위해 피부에 구멍을 낸 후, 효능 성분을 피부에 도포하여 약물을 흡수시키는 시스템을 사용하거나 수용성 polymer를 사용하여 피부에서 micro-needle을 용해시켜 유효물질을 침투시키는 방법을 사용하기도 한다[2]. 그러나

[†] 주 저자 (e-mail: sijang@amorepacific.com)
call: 031)280-5812

이러한 방법은 피부에 미세한 상처를 발생시킨다는 단점이 있다. 이번 연구에서는 유효 물질의 피부 투과도를 높이기 위해 고압유화 공정을 이용하여 micro 단위의 분자를 nano 단위의 크기로 쪼개어 유화하였다. 그 후 고압유화 공정을 거친 nano 단위의 제제가 micro 단위의 제제보다 피부에 더 잘 투과되는지를 실험하고자 하였다. Ex vivo에서 경피 투과도를 측정하는 방법으로 Franz-type diffusion cells 방법이 가장 많이 사용된다[3]. 그러나 이 방법은 membrane에 발생하는 기포를 제대로 제거하지 않을 경우 데이터를 신뢰할 수 없다는 단점이 있다[4]. Franz-type diffusion cells의 단점을 보완하고 반고체 형태의 sample의 투과도를 측정하는 방법으로는 Plexiglas cell이 있으나 이 방법 역시 ex vivo의 방법으로 살아있는 인체에서 피부 투과도를 실험하는 방법은 아니다[5]. 비침습적인 방법으로 물질의 피부 투과도를 측정하는 방법으로는 빛의 산란 현상을 원리로 하는 라만 분광 피부측정기가 있다[6]. 라만을 이용할 경우 retinol, niacinamide, arbutin 및 vitamin C 등 분자구조를 알고 있는 특정한 유효성분의 피부 침투량을 계산할 수 있다[7]. 이번 연구에서는 tape-stripping으로 수집한 각질 sample을 이용하여 유효 물질의 침투량을 정량화하고 이미지로 나타내었다. 그리고 고압유화 공정을 거친 시료를 사용전과 사용 후에 색소침착 부위와 비 색소침착 부위의 피부색 변화를 측정하여 시료가 피부색 개선에 주는 영향을 평가하였다.

2. 재료 및 실험

2.1. 피험자

본 연구는 한국 여성 20명(57.80 ± 4.40세)이 참가하였다. 모든 피험자에게 참가 동의서를 받은 후 시험은 2016년 4월부터 8월까지 약 4개월 동안 진행되었다. 피부 질환 및 전신적 질환이 없는 피험자를 대상으로 하였고 이외에 실험의 영향을 최소화하기 위하여 아토피 피부염을 가진 환자, 화장품, 의약품 또는 일상적인 광노출에 대한 반응이 심하거나 알러지가 있는 환자, 3개월 이내에 피부스켈링 또는 피부관리를 받은 환자들은 제외하였으며, 임부나 수유부도 제외하였다.

2.2. 시험 시료

본 실험에 사용한 시험시료는 41%의 오일이 함유된

O/W 유화제품에 1,000 bar, 3 cycles의 고압유화 공정(M110H-30, Microfluidics, USA)을 통하여 오일 입자의 입도를 작게 하여 균질화한 제품(IOPE plant stem cell signature ampoule (Amorepacific Co., Korea))을 사용하였다. 대조시료는 시험시료에서 고압유화 공정을 거치지 않은 시료를 사용하였다. 시험 시료와 대조시료는 모두 Zetasizer (ZEN3600, Malvern, UK)를 이용하여 입자 사이즈를 측정하였다.

2.3. 피부 특성 측정

연구 대상자는 아침에 비누 및 일체의 세정제를 사용하지 않고 샤워를 한 뒤 전완부 및 안면을 물로 씻은 후 30 min간 항온·항습(20-24 °C, 40-60% RH) 조건에서 안정을 취한 뒤 진행하였다.

2.4. 각질 샘플 채취

연구 대상자의 좌우 전완부에 2 × 2 cm 크기의 사각형을 각각 표시하였다. 각 시험 부위에 각각 2 μL/cm² 씩 시험시료 또는 대조시료를 도포하였다. 시료 적용 3 h 경과 후 Corneofix를 이용하여 동일 부위에 같은 압력을 이용하여 각질을 연속적으로 6장 떼어내고 처음 시료는 버린 후 두 번째 장부터 여섯 번째 장까지 총 다섯 장을 분석에 이용하였다.

2.5. DESI-MS (Desorption Electrospray Ionization - Mass Spectrometry)를 이용한 각질 내 물질 양 측정

유리판에 각질 테잎을 부착한 후 DESI 샘플 홀더에 고정하고 Prosolia 2D DESI를 이용하여 95% MeOH (w 0.01% formic acid)이 2 μL/min의 유속으로 spray capillary를 거치면 용액은 전하를 띠게 되는데, 이 전하들이 샘플 표면과 충돌하여 샘플 중 성분들을 기체 상태로 탈착 시켜 이온화시킨다. Waters Synapt G2-MS system를 이용하여 분자량 50-800 Da로 scan 한 후 niacinamide에 수소이온이 하나 붙은 m/z 123 (Chemical formula: C₆H₆N₂O)과 pentaerythrityl tetraethylhexanoate (PTO)에 암모늄 이온이 하나 붙은 m/z 663 (Chemical formula: C₃₇H₆₈O₈) 값을 선택하여 각각의 intensity를 확인하였다. HDI imaging 프로그램을 이용하여 선택한 각 성분의 intensity를 imaging으로 변환하였다.

2.6. 색소침착 개선 및 피부톤(밝기) 평가

시험시료의 색소침착 개선 및 피부톤(밝기) 평가를

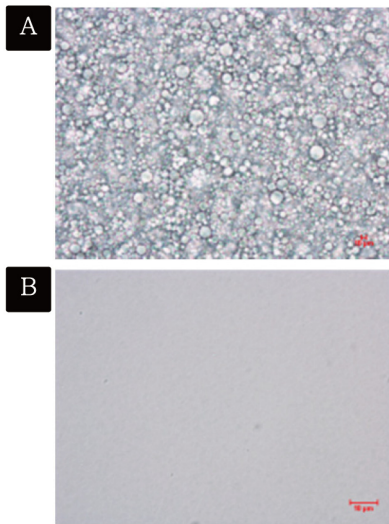


Figure 1. Comparison of particle sizes before and after high-pressure emulsification process. Before the high pressure emulsification process, the particle size was in the unit of micro (A), but the particles under the high pressure emulsification process became in nano unit (B).

위해 Visia-CR[®] (Canfiled Imaging System, USA)을 이용하여 연구 대상자의 안면을 촬영하였다. Cross-polarized mode로 촬영된 안면 사진의 색소침착 부위와 정상부위를 시험부위로 정하였다. Image 분석 소프트웨어(Image-Pro Plus, USA)를 이용하여 안면 사진의 색소 침착 부위와 정상부위에서 V 값의 평균을 도출하였다. 측정은 시료 도포 전, 도포 2주 후, 도포 4주 후 및 도포 6주 후에 진행하였다.

2.7. 통계 검정

통계 분석 프로그램 IBM SPSS statistics version 21.0 을 이용하여 정규성 검정을 한 후 정규성을 만족하는 경우 repeated measures ANOVA 또는 t-test를 이용하여 분석하였고 정규성을 만족하지 않는 경우 Wilcoxon signed-rank test를 통해 분석하였으며 두 방법 모두 각 측정 시점에서 유의성 여부를 가설평균 차 5% ($p < 0.05$)로 확인하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. Zetsasizer를 이용한 고압유화 공정 전 후 물질의 입자 크기 비교

41%의 오일을 O/W로 첫 번째 유화를 시키고 이후

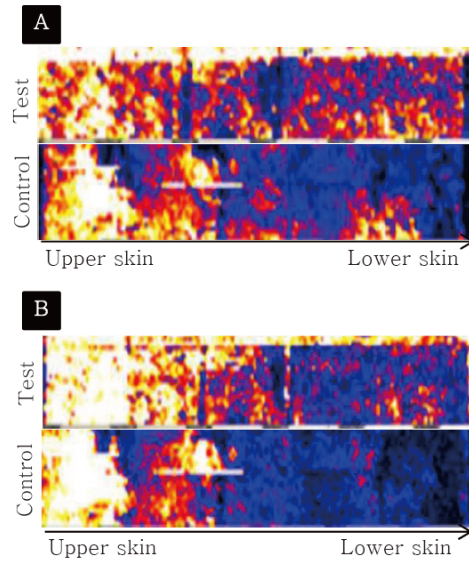


Figure 2. The skin permeability image of water-soluble and lipid-soluble substances. The skin permeability of niacinamide (A), a water-soluble substance, and PTO (B), a lipid-soluble substance, were measured. Test product penetrate deeper than control product.

두 번째 고압 유화 공정(1,000 bar, 3 cycles)을 거쳐 오일 입자 크기를 작게 만든 시험시료와 고압유화 공정을 거치지 않고 첫 번째 유화 공정만 거친 대조시료를 Zetasizer를 이용하여 측정할 결과 오일 입자의 크기가 고압 유화 공정 전에는 10 μ m 또는 그 이상이 되는 입자가 많았으나(Figure 1A) 고압 유화 공정 이후 오일 입자가 평균 138 nm로 작아진 것을 확인하였다(Figure 1B).

3.2. DESI-MS를 이용한 물질의 피부 투과도 Imaging

DESI-MS와 Waters Synapt G2-Ms system를 이용하여 수용성 물질인 niacinamide와 지용성 물질인 PTO의 침투량을 imaging하였다. 첫 번째 tape-stripping한 각질은 측정에서 제외하였으므로 두 번째 장부터 여섯 번째 장까지 성분 분석 후 imaging한 결과 고압유화 공정을 거친 시험 시료가 대조시료에 비해 niacinamide와 PTO가 더 많은 양이 깊게 침투되었음을 확인할 수 있었다(Figure 2A,B).

3.3. 물질의 피부 투과도 정량

DESI-MS를 이용하여 물질의 투과도를 이미징한 후 이미지분석 프로그램을 이용하여 각각의 intensity 값

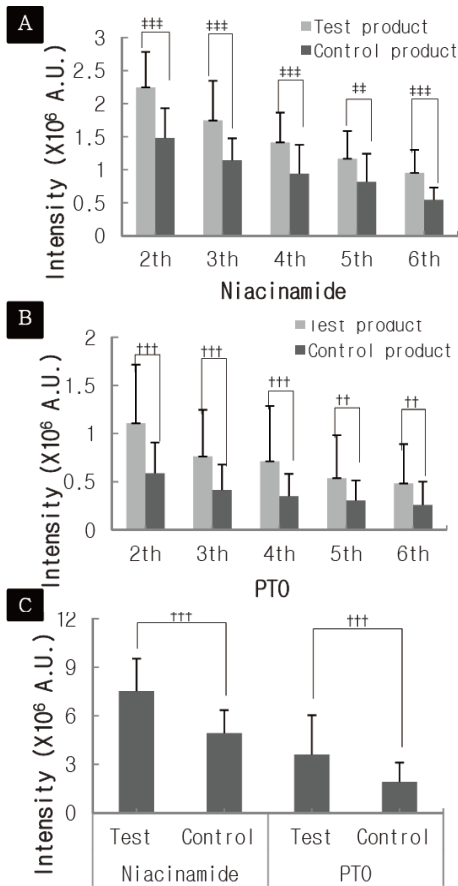


Figure 3. Quantification of skin permeability of water-soluble and lipid-soluble substances. The amounts of niacinamide and PTO were statistically significant in all five layers of tape-stripped stratum corneum at the site of test samples were applied (A-B). (Paired *t*-test ^{†††} $p < 0.001$, ^{††} $p < 0.01$, [†] $p < 0.05$) In the total amount of the substances permeated from the five stratum corneum layers, both niacinamide and PTO were significantly higher at the site of the test sample was applied (C). (Wilcoxon signed-rank test ^{†††} $p < 0.001$, ^{††} $p < 0.01$, [†] $p < 0.05$)

을 계산하여 정량화 하였다. Corneofix와 DESI-MS를 이용한 전박 부위의 intensity 값을 Wilcoxon signed-rank test를 이용하여 분석하였다. 시료 적용 3 h 경과 후 수용성 파트 및 지용성 파트에서 시험시료 적용 부위의 intensity 값이 모든 각질 층에서 유의하게 높았으며(Figure 3A,B) 두 번째 장에서 여섯 번째 장의 intensity 값을 더해 물질 투과량 총량을 비교하였을 때에도 대조시료 적용 부위에 비하여 시험시료 적용 부위가 niacinamide가 1.56배, PTO가 1.9배 통계적으로 유의

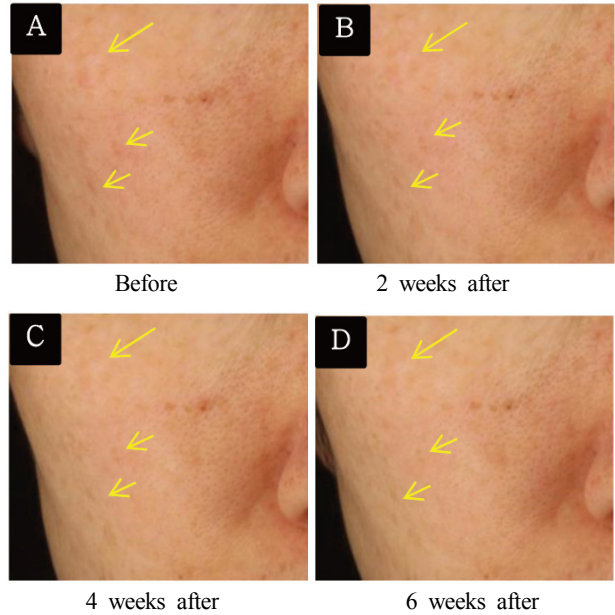


Figure 4. Evaluation of skin color improvement efficacy of test sample. The pigmentation of the skin (yellow arrow) was improved after use of the test sample (A-D).

한 수준으로 높았다(Figure 3C).

3.4. 시험 시료의 피부색 개선 효능 평가

Niacinamide는 피부에 생성된 melanosome이 인접한 keratinocyte로 이동하는 것을 억제하여 피부 미백효과를 주는 주요한 미백 효능 원료이다[8]. 고압유화 공정을 거친 시험시료는 대조시료에 비하여 niacinamide가 피부 속으로 침투되는 양이 많고 더 깊게 침투되므로 시험시료의 사용 전후 미백 효능을 확인하였다. VISIA-CR[®]의 cross-polarized image를 통해 피부색을 촬영하여 이미지를 분석한 결과 사용 전 대비 사용 2주, 사용 4주 및 사용 6주 후 피부의 색소 침착이 점차 열어지는 것을 확인하였다(Figure 4). 색소침착 부위와 비 색소 침착 부위를 나누어 피부색을 Image-Pro Plus를 이용하여 피부색(명도, V value) 분석한 결과 색소 침착 부위는 사용 전 대비 사용 6주 후 0.486%, 비 색소 침착 부위는 0.403% 유의하게 개선되었다(Figure 5A,B).

4. 결 론

본 연구는 각질 tape-stripping을 통해 비침습적으로 유효 물질의 투과도를 확인하고 유효 물질의 효능을

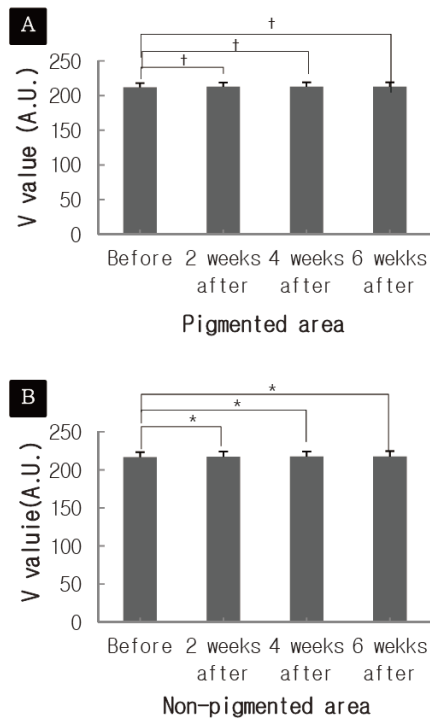


Figure 5. Evaluation of skin color improvement efficacy of test sample. The skin color with pigmented area was statistically significant improved after use test product (A) (*Wilcoxon signed-rank test* $^{+++} p < 0.001$, $^{++} p < 0.01$, $^{+} p < 0.05$) The skin color with non-pigmented area was statistically significant improved after use test product (B). (*Repeated-Measures ANOVA* $^{***} p < 0.001$, $^{**} p < 0.01$, $^{*} p < 0.05$).

평가하기 위해 진행되었다. 피부는 장벽기능이 강하여서 외부의 물질이 침투하기 어렵다. 따라서 이번 연구에서는 유효물질을 피부 속을 침투시키기 위한 방법으로 고압유화 공정을 거쳐 입자 크기를 nano 사이즈로 줄인 시료를 제작하였다(Figure 1). 피부 투과도를 측정하는 방법은 ex vivo에서 Franz-type diffusion cells 방법과 Plexiglas cell이 있으나 살아있는 인체에서 측정하기 어려움이 있다[3-5]. 따라서 물질의 투과도를 비침습적으로 확인하기 위해 DESI-MS를 이용하여 imaging하였고 투과량을 정량화하였다(Figure 2, 3). Niacinamide는 피부의 미백에 효과가 알려져 있는 원료이다[9]. Niacinamide의 침투량을 높인 시험시료를 피부에 도포하였을 때 색소침착 부위와 비 색소침착 부위의 피부색(명도, V value)가 개선되는 것을 정성적, 정량적으로 확인하였다(Figure 4, 5). 따라서 본 연구를 통해 각질 tape-stripping을 통해 비침습적으로 시료의

투과도를 시각적 및 정량적으로 확인할 수 있으며 고압유화 공정으로 입자의 크기를 줄인 시료는 유효물질의 피부 투과도가 높아 피부 미백에 도움을 주는 것으로 사료된다.

Reference

1. A. V. Rawlings and C. R. Harding, Moisturization and skin barrier function, *Dermatol. Ther.*, **17**, 43 (2004).
2. W. Martanto, S. P. Davis, N. R. Holiday, J. Wang, H. S. Gill, and M. R. Prausnitz, Transdermal delivery of insulin using microneedles *in vivo*, *Pharm. Res.*, **21**, 6 (2004).
3. P. P. Sanghvi and C. C. Collins, Comparison of diffusion studies of hydrocortisone between the franz cell and the enhancer cell, *Drug Dec. Ind. Pharm.*, **19**, 1573 (1993).
4. V. P. Shah, J. S. Elkins, J. Hanus, C. Noorizadeh, and J. P. Skelly, *In vitro* release of hydrocortisone from topical preparations and automated procedure, *Pharm. Res.*, **8**, 55 (1991).
5. S. C. Chattaraj, J. Swarbrick, and I. Kanfer, A simple diffusion cell to monitor drug release from semi-solid dosage forms, *Int. J. Pharm.*, **120**, 119 (1995).
6. P. J. Caspers, G. W. Lucassen, H. A. Bruining, and G. J. Puppels. Automated depth-scanning confocal Raman microspectrometer for rapid *in vivo* determination of water concentration profiles in human skin, *J. Raman Spectrosc.*, **31**, 813 (2000).
7. S. Jeon, M. Han, D. Chung, and J. Hwang, The study on the skin penetration of cosmetic ingredient with *in vivo* Raman spectroscopy and *in vitro* Franz cell, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **40**(1), 1 (2014).
8. T. Hakozi, L. Minwalla, J. Zhuang, M. Chhoa, A. Matusubara, K. Miyamoto, A. Greatens, G. G. Hillebrand, D. L. Bissett, and R. E. Boissy, The effect of niacinamide on reducing cutaneous pigmentation and suppression of melanosome transfer, *Br. J. Dermatol.*, **147**, 20 (2002).
9. A. B. Kimball, J. R. Kaczvinsky, J. Li, L. R.

Robinson, P. J. Matts, C. A. Berge, K. Miyamoto, and D. L. Bissett, Reduction in the appearance of facial hyperpigmentation after use of moisturizers with a combination of topical niacinamide and N-acetyl

glucosamine: results of a randomized, double-blind, vehicle-controlled trial, *Br. J. Dermatol.*, **1**(162), 435 (2010).