J. of Korean Oil Chemists' Soc.,
Vol. 24, No. 4. December, 2007. 410~415

Hairless Mouse와 Pig Skin을 활용한 약물 투과성 비교

조완구†

전주대학교 대체의학대학 건강자원학부

(2007년 9월 28일 접수 ; 2007년 11월 29일 채택)

Comparison of Drug Delivery using Hairless Mouse and Pig Skin

Wan Goo-Cho†

College of Alternative Medicine, Jeonju University, Hyoja-dong, Wansan-gu, Jeonju, 560-759, Korea

(Received September 28, 2007 ; Accepted November 29, 2007)

Abstract : Functional cosmetics are intensively investigated for the effectiveness of skin whitening, anti-aging and slimming. For enhancing the effectiveness, active ingredients should be delivered into the cell in the dermis. The amounts of penetration of caffeine and Arbutin® were tested, *in vitro*, using Franz diffusion cell. Oil-in-water emulsions were used for the vehicles of the transport. For the measuring the amounts of active ingredients delivered into the dermal skin, tape stripping was done after finishing the penetration experiments. The amounts of delivered caffeine were 8.45± 1.26ug/ml before tape stripping and 3.45± 1.80ug/ml after tape stripping, however, the amounts of delivered Arbutin® was quite small to detect. From now on, proper vehicles are considered for enhancing the delivery of Arbutin®. Hairless mouse skin was compared with pig skin as a transdermal delivery membrane. The aspects of delivery were similar, but the amount of delivered ingredients using pig skin was larger than that of using hairless mouse skin. Therefore, the pig skin would be considered as a membrane for drug delivery experiments.

Key words : *skin delivery, emulsion, Arbutin®, caffeine, hairless mouse, pig skin*

1. 서 론

피부색을 개선하는데 도움이 되는 미백 기능성 화장품이 새로운 카테고리로 법제화되면서 많은 상품이 출시되고 있다. 그러나 유효 성분의 경피 흡수 미미로 인하여 소비자의 요구를 충족시키지 못하고 있다. 따라서 피부의 멜라닌 세포에 Arbutin®을 비롯한 유효성분을 전달하고자하는 많은 실험이 진행되고 있다[1,2]. 피부는 주변 환경에 직접적으로 접하고 있는 기관으로서 복잡한 구조로 되어있으며, 표피층 중에 특히 최외각인 각질층은 대부분의 물질, 특히 친수성 물질에 대해서 주요한 확산 장벽 기능을 하고 있다[3,4].

Caffeine은 구조적으로 1,3,7-trimethylxanthine로 알려진 알칼로이드이고, 커피, 초콜릿, 차 등에 함유되어 있는 식용 성분으로, 분자량이 작

†주저자(email : wgcho@jj.ac.kr)

고(194.2/mol), 용해도와 흡수율이 좋기 때문에, 피부의 흡수 정도를 연구하는데 많이 이용되며 최근 지방분해 효과가 보고되고 있다[5]. 그리고 Arbutin®은 구조적으로 4-hydroxyphenyl -b-D-glucopyranoside이고, hydroquinone에 glucopyronoside가 결합된 유도체로서 분자량은 272.3이고, 멜라닌 생합성 경로를 억제하기 때문에 화장품 산업에서 미백제로 사용되고 있다[6]. 일반적으로 경피 흡수 실험은 Franz diffusion cell을 이용하여 경피 흡수량을 측정하는 데 피부의 장벽인 각질층과 각질층 상층부에 남아 있는 화장품 제형을 제거하는 하기 위한 세척 등이 실험오차의 발생 가능성을 주는 것으로 알려져 있다[7-10].

본 연구에서는 기능성 화장품의 미백제로 사용되는 Arbutin®과 지방 분해 작용이 보고되어 있는 caffeine의 oil-in-water(o/w) 에멀젼 제형에서의 경피 흡수 정도를 측정하고 또한 pig와 hairless mouse의 피부의 흡수 정도를 비교하여 경피 흡수 실험용 피부로의 사용 가능성을 타진하였다. 또한 경피 흡수 실험 후 피부를 바로 stripping하지 않고 5-6시간 정도 빠르게 건조시켜 tape stripping을 실시하였다.

2. 실 험

2.1. 시약 및 기기

Caffeine과 Arbutin®은 Sigma Chemical Co.(USA)에서 구입한 것을 사용하였다. Methanol 및 acetonitrile은 HPLC급을 사용하였다. 물은 정제수를 가지고 초 순수 제조장치(미래과학, 한국)를 통과시켜 18MW 이상인 것을 사용하였다. Caffeine과 Arbutin® (4-hydroxyphenyl-b-D-glucopyranoside)은 각각 Sigma사와 Bioland사에서 구입하여 사용하였고, trifluroacetic acid 및 기타 유기 용매는 시판 특급 및 일급시약을 사용하였다. 기기는 HPLC(HEWLETT PACKARD, Model series 1050,Hanson research Co. USA), 원심분리기(Avant J-25I, Beckman Industries, USA), Homogenizer(Polytron, Kinematica Ag. Switzerland) 을 사용하였다.

2.2. 실험동물

Hairless mouse(8주령, 수컷)는 주)LG생명과학(대전광역시, 한국)에서 구입하여 1주일 이내에 사용하였고, 피부에 전혀 상처나 긁힌 자국 없는 것으로 선택하였다. 이 hairless mouse를 경추 탈구 방법에 의하여 고통 없이 죽이고 등 피부를 벗긴 후 피하지방을 조심스럽게 제거하였다[11]. 적출한 피부는 적절한 크기로 자른 후 즉시 투과 시험에 사용하였다. Pig 피부의 경우, 주)계룡 과학(대전광역시, 한국)을 통해 구매하였고, 이 피부는 잘 펴서 사용 전까지 -70°C에서 보관하였으며, 실험 전에 상온에서 서서히 해동하여 70% 에탄올로 씻고, phosphate buffered saline solution(PBS)로 분무하였고, 피하지방을 제거하여 사용하였다.

2.3. *in vitro* 경피 흡수 실험

Pig와 hairless mouse 피부는 적출한 후 Franz diffusion cell의 donor compartment에 각질층이 위로 향하게 하여 receptor compartment 사이에 끼운 후 피부 위 표면에 oil-in-water 에멀젼 제형으로 만든 1.0% caffeine과 2.1% Arbutin® 제형을 도포하였다. Receptor compartment에는 pH 7.4 인산 염 완충액 (phosphate buffered saline)을 넣고 온도를 33°C로 유지하면서 600 rpm으로 계속 교반하였다. 이 때 receptor compartment와 접촉하는 피부의 면적은 1.7 cm^2 이었고, receptor compartment의 용량은 7ml이었다. 실험 개시 전 1시간 동안 평형상태 도달을 위하여 방치시켰으며, 그 후 24 시간 동안 분획 수집기를 통하여 최초 작동을 포함하여 6시간마다 총5회 시료를 채취하였다. 샘플링은 포트를 통해 receptor 용액의 0.7ml을 취하였고, 그 양만큼 다시 채우는 방법으로 실시하였으며, 각각의 처방에 대한 실험횟수는 최소 3회 이상 실시하였다. 또한 pig 피부와 hairless mouse의 상층부에 남아 있는 유효성분의 양을 정량하기 위하여 2~3 ml의 PBS를 이용하여 각 피부를 Homogenizer로 분쇄한 후 원심분리기를 이용하여 10,000 rpm으로 회전시켜 상층액 만을 이용하였다.

2.4. Hairless mouse와 pig 피부의 각질층 제거

시료 채취가 끝난 후 피부 속에 남아 있는 caffeine과 Arbutin® 의 정량을 위하여 각질층 상층부에 남아 있는 제형을 제거하였다. 제형

제거는 유기 용매로 가볍게 세척한 후 각질층 상층부와 각질층에 존재하는 시료를 제거하기 위하여 tape stripping 방법을 사용하였다. Pig의 경우 상층부에 남아있는 제형을 제거한 후 바로 tape stripping(3M 스카치 테이프)을 실시하였으나, hairless mouse의 경우 silica gel을 포함한 밀폐된 상자 속에서 5~6시간 정도 표피 상층부에 남아 있는 수분을 증발 시킨 후 tape stripping을 실시하였고, 각질층의 두께를 조사하기 위하여 tape stripping 횟수에 따라 조직을 염색하였다. 우선, 조직을 10% 포르말린 용액에 고정시키고 에탄올의 농도를 높이면서 수분을 제거시킨 후 파라핀으로 고정시켰다. 5㎛의 크기로 단면을 절단시키고 H&E (hematoxylin & eosin)염색을 실시하였다. 대조군은 각질층 존재하에 상층부에 존재하는 제형을 제거하기 위하여 메탄올 0.5ml로 세척 하였다.

2.5. Oil-in-water (o/w) 에멀젼 제조

유효성분을 첨가한 oil-in-water 에멀젼은 Table 1에 나타낸 성분과 함량으로 오일상과 수상을 각각 75°C로 가열 용해 후 4,000rpm으로 5분간 Homogenizer(TK, Japan)를 이용하여 유화 후 실온으로 냉각하여 사용하였다.

2.6. Caffeine과 Arbutin® 의 정량

Franz diffusion cell을 이용하여 매6시간마다 샘플링 된 시료와 각 피부에서 얻어진 시료를 여과기(Millipore filter; pore size 0.45㎛)로 여과하고 약 20㎕씩 HPLC에 주입하였다. Caffeine 및 Arbutin® 분석 및 정량은 UV 검출기, automatic sampler, isocratic pump로 구성된 HPLC를 사용하여 분석하였고, 컬럼은 C18 컬럼(4.6x250mm, particle size 5㎛)을 사용하였다. 그리고 caffeine의 경우 acetaminophen을 internal standard로 하여 최종 HPLC분석 전 단계 처리 과정 중에 생기는 각 개체마다의 오차를 줄여 계산하였다.

UV detector를 사용하여 Arbutin® 은 280nm에서 caffeine은 273nm에서 검출하였다. 물/methanol의 비가 90/10인 혼합용매를 사용하였고, 유속은 0.8ml/min이었다. 추가적으로 Arbutin® 과 같은 파장에서 hydroquinone을 검출하였다. 검출된 hydroquinone은 분자량을 계산하여 Arbutin® 으로 다시 환산하여 Arbutin® 과 hydroquinone의 총량으로 정량 하였다. Caffeine의 경우 이동상으로는 acetonitrile/0.1% trifluroacetic acid인 혼합용매를 12:88의 비로 사용하였고, 유속은 1ml/min이었다.

3. 결과 및 고찰

3.1.Tape stripping에 따른 각질층 제거

경피 흡수 실시 후 hairless mouse의 경우 silica gel을 이용하여 5-6시간 건조 시킨 후

Table 1. Formulations of oil-in-water emulsions.

	Ingredient	Source	wt%		Ingredient	Source	wt%
유상	Cetyl alcohol	Cognis	1.0	수상	D.I. Water		to 100
	Stearyl alcohol	Cognis	1.0		1,3-butylene glycol	Lipo	5.0
	Stearic acid	LG H&H	1.0		Glycerin	LG H&H	5.0
	Liquid paraffin	Witco	5.0		Carboxy vinyl polymer	BF Goodrich	0.05
	Squalane	Lipo	4.0		Imidazoline urea	Sutton Lab	0.3
	Dimethylpolysiloxane	Dow Corning	0.5		Triethanol amine	Japan Catalyst	0.1
	PEG 100 stearate	Unichema	2.0		Propyl paraben	Danil Chem	0.2
	Glyceryl monostearate	Kwangil	1.0		EDTA-3Na	BASF	0.02
	Sorbitan monostearate	Unichema	0.5		Ethanol	Korea Ethanol	2.0
	Isopropyl myristate	Lipo	3.0		Caffenine or Arbutin®	Sigma or Bioland	1.0 2.1

3M scotch 테이프로 3회, 5회, 10회, 20회, 30회 tape stripping을 실시하였다. Pig 피부의 경우는 경피 흡수 후 즉시 3M scotch 테이프로 10회, 20회, 30회, 40회를 실시하여 피부 조직을 절편하여 탈수과정을 거쳐 H&E의 염색법에 의하여 염색을 실시하였다. Hairless mouse의 경우에는 각질이 경피 흡수 후 swelling 되었기 때문에 즉시 tape stripping을 실시할 경우 표피층 전체가 제거 되었다. 그리고 tape stripping은 일반적으로 알려진 횟수보다 적은 3회에서 4회로 충분히 각질층이 제거 되었다 (Figure 1). 그 이상에서는 각질층뿐만 아니라 표피층 전체가 제거 되어 버린 것을 염색으로 확인 할 수 있었다. Pig 피부의 경우 hairless mouse에 비하여 각질층이 두꺼웠기 때문에 평균적으로 20회 정도 실시하였을 경우 각질층이 제거되는 것을 확인하였다. 따라서 경피 흡수 실험 후 각각 6번의 반복을 통하여 tape stripping을 hairless mouse는 3회-4회, 돼지 피부는 20회로 표준화하였다.

3.2. 각질층 제거 전과 제거 후의 피부 내 잔존하는 Arbutin® 과 caffeine의 비교

Franz diffusion cell을 이용한 경피 흡수 24시간 후 각질층 상층부와 각질층에 존재하는 양을 제거하기 위하여 용매로 세척 후 silica gel을 이용하여 5-6시간 건조시키고 tape stripping 방법으로 각질을 제거 하였다. 이전과 같은 방법으로 유기 용매로 각질층 상층부를 제거하고 정량한 hairless mouse의 경우 caffeine은 피부 전체에 8.45± 1.26ug/ml이 존재하는 결과를 보였고, 건조시킨 후 3회 tape stripping을 한 각질층이 제거된 피부에서는 3.45± 1.80ug/ml의 결과를 보였다(Figure 2). Pig 피부의 경우에는 이전과 같은 방법으로는 27.02± 5.56ug/ml이 존재 하는 결과를 보였고 건조시킨 후 20회 tape stripping을 한 후 각질층이 제거된 피부에서는 13.20± 2.44ug/ml의 결과를 보였다. 이 방법으로 피부에서 지금까지 측정했던 방법에 비해 50%정도의 차이를 보였으며[12], 이 차이는 각질층과 각질층 상부에 존재하는 유효성분으로 생각되었다. Arbutin®

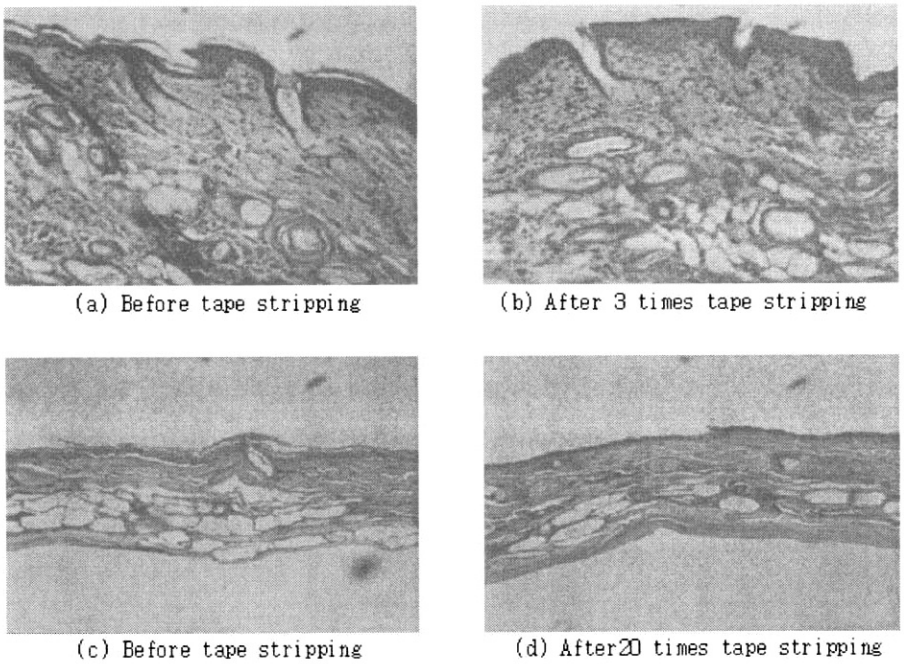

Fig. 1. Comparison of hairless mouse and pig skin before and after tape stripping by H&E staining: (a) and (b) is for hairless mouse skin, (c) and (d) is for pig skin.

의 경우 pig나 hairless mouse의 receptor compartment뿐만 아니라 피부에도 거의 존재하지 않았다. 이는 유효성분인 Arbutin® 의 피부 흡수가 용이하지 않음을 보여주고 있다. 그리고 hairless mouse와 돼지 피부의 전처리 과정 중 caffeine의 경우 internal standard로 acetaminophen을 이용하여 보정하면 좀 더 정확한 data를 얻을 수 있었다. Arbutin® 의 경우 hairless mouse와 pig 피부에서 거의 흡수가 일어나지 않았다.

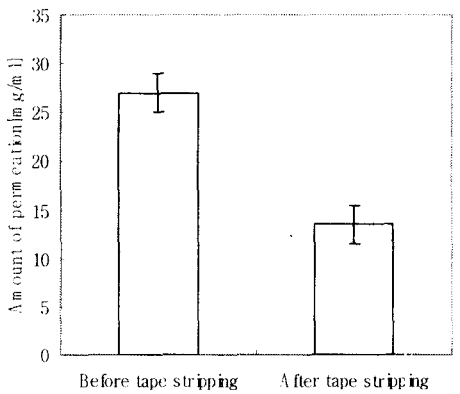

Fig. 2. Amount of caffeine release using pig skin after 24 hours.

3.3. Hairless mouse와 pig 피부의 receptor compartment의 caffeine과 Arbutin® 흡수량 비교

최초에는 hairless mouse가 pig 피부보다 흡수가 작게 되는 양상을 보였으나 시간이 지남에 따라서 hairless mouse의 경우에서도 흡수량이 증가됨을 보여주었다(Figure 3,4). 사람의 피부는 구조적으로 hairless mouse와 다르며, 사용상의 편리성 때문에 이용되어 왔다. 그러나 pig 피부의 경우 구조적이나 형태적으로 사람과 유사하기 때문에 in vitro상에서 hairless mouse보다 흡수 정도를 예측하는데 좋은 지표가 될 수 있다. Pig와 hairless mouse의 피부에서 caffeine의 경우 흡수가 잘 되었지만, Arbutin® 의 경우 양쪽 거의 흡수량을 보이지 않았다. 일정 시간 후의 흡수 총량은 pig 피부에 비해 hairless mouse의 피부를 사용할 때 더 많은 경피 흡수량을 보였다. Hairless mouse의 피부의 마지막 24시간 단계에서 receptor compartment의 소량 흡수된 양은 hydroquinone으로 측정되었으며, 이것은 다시 Arbutin® 으로 환산하여 정량 하였지만 양이 많지 않았다.

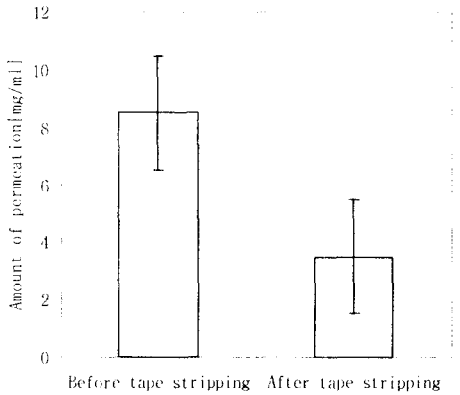

Fig. 3. Amount of caffeine release using hairless mouse skin after 24 hours.

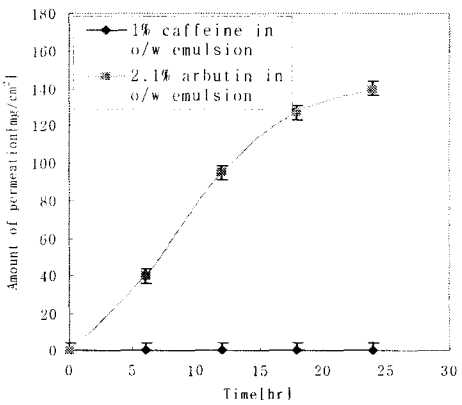

Fig. 4. Amount of drug release versus time using pig skin.

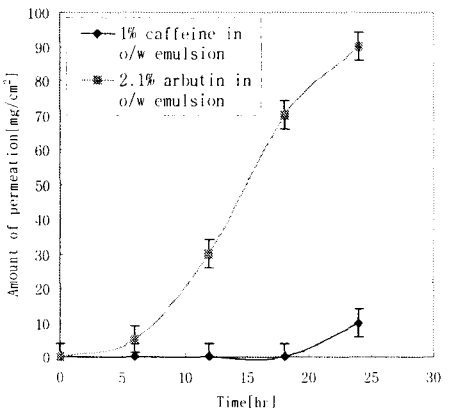

Fig. 5. Amount of drug release versus time using hairless mouse skin.

4. 결론

각질층과 각질층 상층부에 존재하는 성분을 완전히 제거함으로써 경피 흡수 실험을 통해 유효 성분의 진피층 이하의 흡수량을 측정할 수 있었다. caffeine의 흡수는 비교적 양호하였으나 Arbutin® 의 일반적 oil-in-water 에멀젼 제형에서의 흡수는 거의 관찰되지 않았다. 경피 흡수 실험 후 각질층을 효과적으로 제거함으로서 Franz cell을 이용한 경피 흡수 실험 후 용매 세척 과정에서 생기는 오차를 최소화 할 수 있을 뿐만 아니라 피부 조직에 있어서 목표로 하는 부분의 실질적인 흡수량을 측정 할 수 있을 것으로 생각된다. 또한 피부 조직의 구조나 Franz diffusion cell의 수용성 성분에 노출되었을 경우 장벽의 기능의 감소되어 과대평가 되지만, 많은 편리성 때문에 인간 피부 흡수 모델로 사용되고 있는 hairless mouse와 조직의 구조나 흡수량이 인간과 유사성을 가진 pig 피부의 경피 흡수의 비교를 통해서 실험실에서 향후 pig 피부를 이용한 경피 흡수 사용 가능성을 보여 주었다. 소비자들의 기능성 화장품에 관심이 고조되고 있는 현재 주름 미백 및 노화 등에 효능 있는 원료를 연구함과 동시에 개발된 원료들을 효과적으로 피부에 목적하는 곳까지 전달시키려는 본격적인 연구가 앞으로 더 필요할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. W. G. Cho, M. J. Rang, Y.S. Song, Y. H. Lim, and H. W. Park, Enhanced Transdermal Delivery of Vitamin C Derivative using Inotophoretic Gel Patch with Flexible Thin Layer Battery, *J. Soc. Cosmet. Sci., Korea,* **33(1)**, 23 (2007).
2. N. G. Kang, J. M. Lim, M. Y. Chang, S.G. Park, W. G. Cho, and S. Y. Choi, Modified Superoxide Dismutase for Cosmeceuticals, *IFSCC Magazine,* **8(2)**, 87 (2005).
3. K. Rogers. Controlled Release Technology and Delivery Systems, *Cosmetics & Toiletries*, **114(5)**, 53 (1999).
4. G. A. Simon and H. I. Maibach. The Pig as an Experimental Animal Model of Percutaneous Permeation in Man: Qualitative and Quantitative Observations-an Overview, *Skin Pharmacol Appl. Skin Physiol.*, **13**, 229 (2000).
5. J. M. Lim, M. Y. Chang, S. G. Park, N. G. Kang, Y. S. Song, Y. S. Kang, and W. G. Cho, The Penetration Enhancement and the Lipolytic Effects of TAT-GKH, both in vitro, ex-vivo and in-vivo, *IFSCC Magazine,* **7(2)**, 103 (2004).
6. K. S. Doh, J. S. Shin, S. G. Park, W. G. Cho, M. S. Jang, K. S. Suh, and S. T. Kim, The Effect of Arbutin, Medimin C and Pinellia Ternata Extract on the Pigmentary System, *Korean J. of Investigative Dermatology,* **8(3)**, 151 (2001).
7. S. H. Lee and T. S. Jeong, Understading the Skin Barrier, *The J. Skin Barrier Research,* **1**, 8 (1999).
8. D. C. Jung, Skin Penetration Characteristics by Ointment Bases of Clofibrate, *J. of Korean Oil Chemist's Soc.*, **24(2)**, 117 (2007).
9. D. R. Friend. *In-vitro* Skin Penetration Techniques, *Journal of Controlled Release*, **18**, 235 (1992).
10. J. R. Bond and B. W. Barry. Limitations of Hairless Mouse Skin as a Model for *In Vitro* Permeation Studies Through Human Skin : Hydration Damage, *J. Invest. Dermatol.*, **90(4)**, 486 (1988).
11. R. L. Bronaugh and R. F. Stewart. Methods for in vitro Percutaneous Absorption Studies IV: the Flow-through Diffusion Cell, *Journal of Pharmaceutical Sciences.* **74(1)**, 64 (1985).