

# W/O, W/S, O/W, MLV(Multilamellar Vesicles) TYPE에서 Retinyl Palmitate(RP)의 열적 안정성과 효능, 효과에 관한 연구

지홍근, 서봉석, 손근욱, 정민석  
(한국화장품 기술개발 연구소)

## The effect and stability of Retinyl Palmitate in W/O, W/S, O/W, MLV(Multilamellar Vesicles) cream

Hong-keun Ji, Bong-seok Seo, Geun-ug Son, Min-seok Jung  
(Han-Kook Cosmetics co., LTD., R&D Center)

### 요 약

Retinol은 열과 빛에 쉽게 산화되기 때문에 그 유도체인 Retinyl Palmitate(RP)를 사용하고 있으나 이것 또한 안정성이 우려되어 많은 양을 사용하지 못하고 있다. 본 연구에서는 Retinyl Palmitate 5% 와 Tocopheryl Acetate 10%를 함유한 W/O, W/S, O/W, MLV Type의 크림에서 열적 안정성 및 UV 안정성을 CHROMA METERS로 측정하였으며, 25℃, 45℃에서 RP의 함량을 HPLC로 정량 분석하였다. 또한 RP가 열, 빛등에 의해서 어떤 물질로 변화하였는지를 측정하였으며, 변화된 물질의 독성에 대한 연구를 하였다. 각각의 크림 TYPE 마다 입자 SIZE를 측정했으며, DHA와 CHROMA METERS를 사용하여 CELLULAR RENEWAL을 측정하였다.

# 1. 서 론

최근 화장품 개발 방향이 고기능성을 추구하는 코스메디칼 방향으로 진행되고 있다. 그 중에서 최근 환경오염, 공해등 여러 가지 문제로 다시 부각되고 있는 비타민 화장품에 대하여 생각해 보고자 한다.

비타민 A는 axerophthol(항, 건조 안염성 알코올)이라고 해서 동물계에 존재하는 것은 A1, A2가 있고, 식물계에 존재하는 것은 카로티노이드가 있다. 비타민 A2(3-dehydro-retinol)은 A1(retinol)의 약 40% 효력을 가지며, A1, A2 모두 자연계에서 주로 지방산의 에스테르 형태로 존재한다.

비타민 A1의 구조에서 입체적 배치로 보아 isoprene사슬은 모두 trans형이나 일부 cis형을 가진 비타민 A1도 존재한다. 모두 trans형인 것이 생물학적 활성이 가장 강하며, cis형을 가진 이성질체는 모두 trans형에 비하여 75% 활성에 지나지 않는다. 비타민 A는 공기 중의 산소와 빛, 열에 의해서 쉽게 산화 되어 그 효력을 상실하게 된다.(Fig.1.)

RP는 skin normalizer, skin 의 탄력을 증가시키고, 과산화지질을 감소 시키며, 스킨의 UV노출에 따른 피부 거칠음을 방지한다.

Retinol 크림의 formular에서 유상을 증가시키면 thermal isomerization이 일어나고 수상을 증가시키면 decomposition이 일어난다. 그러므로 retinol 크림에서 수상과 유상의 비가 매우 중요하다. 이러한 감소의 원인은 온도에 의한 thermal isomerization, 물에 의한 dehydration, 산소에 의한 decomposition, 수·유상에 쓰여진 surfactant에 의한 것이라 보고되고 있다.(Fig.2.)

RP 크림의 formular에서 RP는 빛, 열에 의해서 노랗게 변색된다. 이러한 변색은 BHA, BHT로 감소 시킬수 있으나 성공적이지는 않다. RP 크림에서 antioxidants 사용으로 RP의 활동을 최소로 하고 유상을 안정화 시킨다. 이때 antioxidants로 dl- $\alpha$ -tocopherol, ascorbyl palmitate가 사용되는데 RP 크림을 dl- $\alpha$ -tocopherol과 함께 사용하면 45°C, 25°C, 빛 조건에서 변색을 방지할수도 있다. 수상에서 물사용시 증류수 또는 deionized의 사용으로 미량 금속을 제거해야 한다. 미량 금속의 제거를 위해서 chelating agent를 사용한다. pH는 5-6 정도가 안정하며, RP는 열에 민감하므로 35-40°C에 투입한다. 이것 또한 성공적이지는 않다.

이러한 것을 기초로하여 본연구에서는 RP 5%를 함유한 W/O, W/S, O/W, MLV TYPE 크림을 45°C, 25°C에서 변색의 안정성을 측정하였으며, 각각의 크림에서 RP의 함량의 변화를 HPLC로 정량 분석하였으며, DHA를 사용하여 CELLULAR RENEWAL을 측정하였다.

## 2. 실험

### 2.1. 실험 재료

본 실험에서 사용된 retinyl palmitate는 BASF 1.0million I.U./g이며, tocopheryl acetate은 BASF사이며, 지질 베이스로 cholesterol, cholesteryl ester, lecithin 등을 원료로 사용했으며, 계면활성제로는 PEG-5-soyasterol, (POE)<sub>n</sub>-cetyler, sorbitan stearate, glyceryl stearate, cetyl dimethicone copolyol, cetyl phosphate를 사용하였다. 물은 음, 양이온 교환수지탑을 통과한 정제수를 사용하였다. 본 실험에 사용된 재료들은 화장품용으로 사용하였다.

### 2.2. 실험 기기

미세 에멀전 제조는 일본 Tokushu Kika Kogyo사 모델인 T. K Auto Homo mixer를 사용하였고, 유화 안정성 평가는 입도 분포 측정 장치인 Laser Light Scattering System(Malvern UK, model PCS 4700)을 이용하여 입도 분포의 변화를 측정하였다.

MLV현상을 알아보기 위해서 Freeze-Fracture Scanning Electron Microscopy로 촬영하였으며, CELLULAR RENEWAL상태 측정 및 25°C, 45°C, UV에서 변색의 변화를 CHROMA METERS(일본, MINOLTA, CM-1000R)를 사용했다. RP의 정량 분석 및 이물질 확인을 위해서 HPLC(WATERS, model 510)를 사용했으며, 그 조건은 다음과 같다.

◆Detection: Ultraviolet spectrophotometer(280nm)(Waters, M441, U.S.A)

◆Column:  $\mu$ -Bondapak C18 (3.9X300mm)(Waters, U.S.A)

◆Flow Rate: 1.0ml/min

◆Mobile phase: Methanol

MLV의 소구체를 만들기 위해서 Microfluidizer(microfluidics corp., USA)를 사용하였다.

### 2.3. 실험 방법

#### 2.3.1. 여러 가지 type 크림의 제조(Table.1.)

#### 2.3.2. W/O, W/S, O/W, MLV크림의 열 및 UV에 의한 COLOR 변화 측정

25°C, 45°C, UV에 넣은 각각의 크림을 1달 후에 COLOR 변화를 CHROMA METERS로 측정하였다.

**Table.1. Formulas of sample W/O, W/S, O/W, MLV creams.**

TYPE	시 료 명		제 조 방 법
O/W	(A)CARBOMER #934 EDTA-2NA GLYCERINE DEA-CETYL PHOSPHATE METHYL PARABEN PURE WATER (B)STEARIC ACID CETYL ALCOHOL SORBITAN STEARATE GLYCERYL STEARATE BHT TOCOPHERYL ACETATE RETINYL PALMITATE MACADAMIA NUT OIL JOJOBA OIL (C)TRIETHANOLAMINE	0.40 0.10 6.00 0.70 0.20 q.s 1.20 1.00 0.50 2.00 0.05 10.00 5.00 12.00 3.00 0.40	(A)→ 가열용해 ↓ 유 화 ← (B) ↓ 중 화 ← (C) ↓ 냉 각 ↓ 완 료
W/O	(A)CETYL DIMETHICONE COPOLYOL MACADAMIA NUT OIL JOJOBA OIL TOCOPHERYL ACETATE RETINYL PALMITATE STEARIC ACID CETYL ALCOHOL BHT (B)SODIUM CHLORIDE METHYL PARABEN PURE WATER (C)POLYACRYAMIDE/ISOPARAFFIN/ LAURETH-7	3.00 12.00 3.00 10.00 5.00 1.20 1.00 0.05 0.50 0.20 q.s 3.00	(B) → 가열용해 ↓ 유 화 ← (A) ↓ 분 산 ← (C) ↓ 냉 각 ↓ 완 료

TYPE	시 료 명	제 조 방 법
W/S	(A)DECAMETHYL/ CYCLOPENTASILOXANE 6.00 METHYL POLYSILOXANE 5.00 POLYOXYETHYLENE/ METHYLPOLYSILOXANE 4.00 TOCOPHERYL ACETATE 10.00 RETINYL PALMITATE 5.00 BHT 0.05 (B)GLYCERINE 4.00 METHYL PARABEN 0.20 SODIUM PCA 2.00 PURE WATER q.s	(B) → 가열용해 ↓ 유 화 ← (A) ↓ 냉 각 ↓ 완 료
MLV	(A)LIPID BASE 10.00 (B)PROPYLENE GLYCOL 5.00 CETYLPHOPHATE 0.50 PURE WATER q.s (C)TOCOPHERYL ACETATE 10.00 RETINYL PALMITATE 5.00 BHT 0.05 (D)POLYACRYLAMIDE/ISOPARAFFIN/ LAURETH-7 3.00	(A) → DISSOLUTION ↓ (B) → SWELLING ↓ (C) → MIXTURE ↓ MICROFLUIDIZER ↓ (D) → DISPER ↓ 완 료

2.3.3. W/O, W/S, O/W, MLV크림의 RP의 함량 변화 및 이물질로 변화측정

25℃, 45℃에 있는 각각의 크림을 RP 5%의 함량이 어떻게 변화했는지를 HPLC로 정량 분석하였으며, RP가 이물질로 변화되었는지를 HPLC로 분석하였다.

#### 2.3.4. DHA를 사용한 CELLULAR RENEWAL 측정

- 1) 4가지 TYPE의 크림을 각각 15일간 매일 팔뚝위에 바른다.
- 2) 15일이 지난후 DHA 4% 함유된 O/W 크림 0.6ml를 5X5cm<sup>2</sup> PATCH를 24시간 동안 부착한다.
- 3) 24시간후 PATCH를 제거후 COLOR 변화를 CHROMA METERS로 측정한다.
- 4) 20일간 매일 COLOR 변화를 조사한다.

#### 2.3.5. MLV liposome 형성 측정

MLV liposome 의 제조 방법에 의하여 만들어진 비타민을 베지클 내부로 투입하여 멀티 라멜라형 베지클의 형성 여부를 확인해 보기 위하여 프랑스 SERO. LAB에 보내 Freeze-Fracture Scanning Electron Microscopy로 측정하였다.

#### 2.3.6. 입자 SIZE의 측정

제조된 4가지 TYPE의 크림을 25°C 항온조에 보관시켜 입자 크기를 측정하였다. 측정기기는 Laser Light Scattering System(PCS 4700 MALVERN. UK)를 이용하였고, 측정시 온도는 자동 콘트롤 장치가 부착되어 있기 때문에 실온에서 측정하였다.

#### 2.3.7. 세포 독성의 측정

Trypsinization에 의하여 회수한 Transformed mouse fibroblast L929 세포를 2% Serum 이 함유된 배지로 희석한 후 96 well tissue culture plate의 각각의 well에 세포 현탁액 (2500-3000cell/well)90  $\mu$ l를 접종한 다음, 37°C에서 5% CO<sub>2</sub> 조건으로 2일간 배양하였다. 배양후 새로운 배지 90  $\mu$ l로 교체하였고, 여기에 10  $\mu$ l의 시험 물질로 처리한 후 2일간 배양하였다. 배양이 끝나면 각 well에 100  $\mu$ l의 neutral red solution(50 $\mu$ g/mL)을 첨가하여 3 시간 동안 반응 시켰다. neutral red 가 완전히 plasma membrane을 통과하여 살아있는 세포 또는 손상받지 않은 세포의 lysosome에 농축된후 1.0%formalin/1.0% CaCl<sub>2</sub> 100  $\mu$ l로 처리한 다음 1.0% acetic acid/50% ethanol solution을 사용하여 세포내의 neutral red를 추출하였다. 추출된 neutral red를 ELISA reader를 이용하여 540nm에서 RP 5% 함유한 MLV 크림의 25°C,45°C에 1년간 보관한 SAMPLE을 세포 독성실험을 수행하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1 W/O, W/S, O/W, MLV크림의 45℃와 UV에 의한 COLOR 안정성

각각의 크림에 대한 45℃와 UV에 의한 COLOR 안정성을 Fig.3.에 나타냈다. Fig.3.에 보는 바와 같이 RP의 영향으로 시간에 따라 45℃와 UV에 의해서 COLOR가 변화하는데 MLV의 크림이 다른 크림에 비해서 45℃에서는 3-13배, UV에서는 2-6배 COLOR 안정성이 있었다. 이는 MLV가 안정한 멀티라멜라구조를 형성하여 RP를 안정화 시킨 것이다.

#### 3.2. W/O, W/S, O/W, MLV크림의 RP의 함량 변화 및 이 물질 변화 측정 및 독성 측정

RP 5%함유한 W/O, W/S, O/W, MLV크림을 25℃,45℃에 넣은후 1개월,1년후에 함량 변화를 측정한 결과를 Fig.4.에 나타냈다. 그림에서 보는 바와 같이 MLV<W/S<O/W<W/O 크림TYPE 순으로 RP 함량이 크게 변화하고 있음을 알수 있다.

RP의 HPLC 피크를 보면 원래의 SAMPLE과 45℃에서 1년간 보관한 SAMPLE을 비교하면 새로운 물질로 변화되었음을 알수 있다.(Fig.5.) 이러한 RP가 이물질로의 변화로 독성에도 영향을 미치는 것으로 생각된다. 25℃, 45℃에서 1년간 보관한 크림의 독성 변화를 Fig.6.에 나타냈다. 25℃ 크림이 45℃크림 보다 독성이 적음을 알수 있다. 그러므로, RP를 효과적으로 장기간 사용하려면 RP 함량 5%를 그대로 유지하고 있는 MLV 크림을 사용하는 방법이 피부에 가장 효과적이라 생각되며, HPLC 분석에 의해 함량의 감소는 RP가 이물질로 바뀌어서 변화된 물질이 독성을 나타낸다고 생각된다.

#### 3.3. CELLULAR RENEWAL 측정

W/O, W/S, O/W, MLV크림의 세포 RENEWAL측정 해 본 결과 MLV 리포솜은 베지클이 한 개의 층으로 2개이상의 다중층막으로 구성되어 있다. 미용성분들은 용액속에 혼합되어 친수부또는 친유부에 투입되고 베지클을 형성한다. MLV 크림은 효과를 오래지속시키며 MOISTURIZER의 침투를 증가 시킨다. 그러므로 MLV크림이 다른 3가지 TYPE(W/O, O/W, W/S)크림에 비하여 1-3일정도 세포 RENEWAL 작용이 빠르게 나타났다.(Fig.7.)

#### 3.4. PARTICLE SIZE 와 MLV 리포솜의 측정

MLV 크림이 리포솜을 형성하는지 증명하기 위하여 Freeze Fracture Scanning Electron

Microscopy로 촬영하여 Fig.8.에 나타냈다. 그림에서 보는 바와 같이 다중층의 라멜라 구조를 형성하고 있음을 보여 주고 있다. 라멜라의 반복 간격은 일차적으로 물과의 접촉에 의한 것이다. 이때 입자의 크기는 0.50~3.90 $\mu$ m이다.

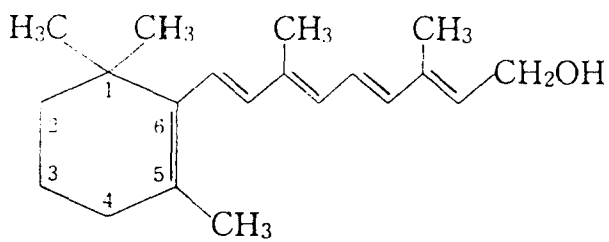
W/O, W/S, O/W, MLV크림에 대한 입자SIZE를 Fig.9.에 나타냈다. MLV 베지클에 대한 입자 SIZE 분포는 0.08~0.90 $\mu$ m이며, 평균입자 SIZE는 0.20 $\mu$ m이다. 미용성분은 다중층으로 형성된 리포솜 베지클의 친수부에 캡슐화 됨을 알수 있다. 이렇게 캡슐화된 미용성분은 매우 안정하여 COLOR 변화에 안정성을 보여 줌을 알수 있다.

## 4. 결 론

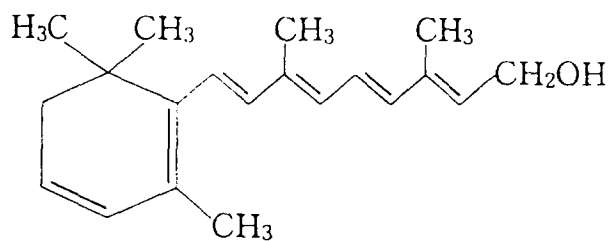
본 연구에서는 RP 5%를 함유한 W/O, W/S, O/W, MLV크림을 제조하여 가장 안정한 TYPE의 BASE와 효능,효과가 가장 우수한 TYPE의 BASE를 얻고자 이 실험을 수행했으며, 다음과 같은 결론을 얻을수 있었다.

- 1.W/O, W/S, O/W, MLV크림중에서 지질BASE와 마이크로플루다이저를 사용해서 리포솜을 형성한 MLV크림은 COLOR변화에서 베지클의 형성으로 우수한 COLOR의 안정성을 보였다.
- 2.RP 5%를 함유한 W/O, W/S, O/W, MLV크림중에서 W/O,W/S,O/W TYPE은 RP의 함량이 급격히 줄어든 반면에 MLV 크림은 RP가 캡슐화되어서 1년뒤에도 함량이 변화되지 않고 안정하게 유지되었다.
- 3.HPLC 측정결과 45 $^{\circ}$ C에서 1년간 보관한 SAMPLE은 시간이 변화함에 따라 RP가 이물질로 변화했으며, 이물질은 독성 실험을 해본 결과 25 $^{\circ}$ C의 크림 SAMPLE에 비하여 독성이 있었다.
- 4.세포 RENEWAL 실험에서 MLV크림이 가장 우수한 효과를 나타냄으로써, 미용성분을 캡슐화 시킨 MLV 크림이 효과를 오래 지속시키며 피부 깊숙히 침투시킴을 증명하였다.

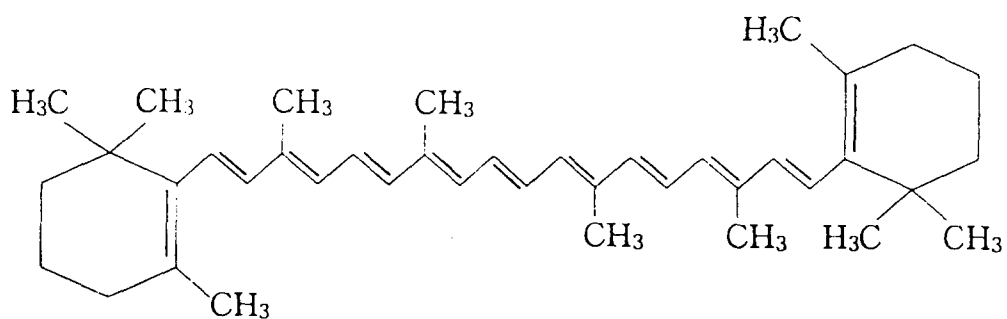




Vitamin A<sub>1</sub>

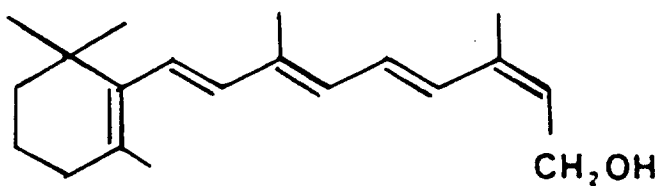


Vitamin A<sub>2</sub>



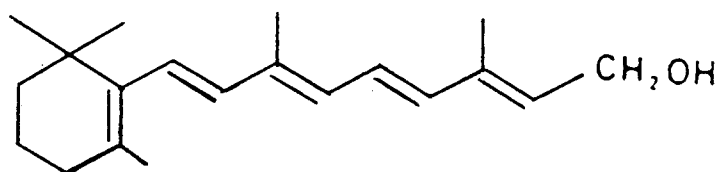
$\beta$ -carotene

**Fig.1. The structure of Vitamin A.**



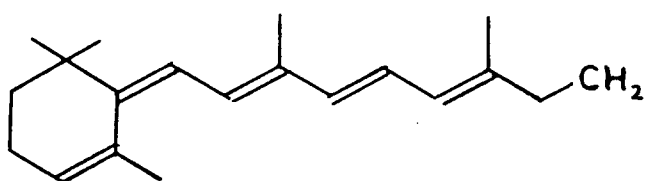
13-*cis*-retinol

↑ **THERMAL ISOMERIZATION**



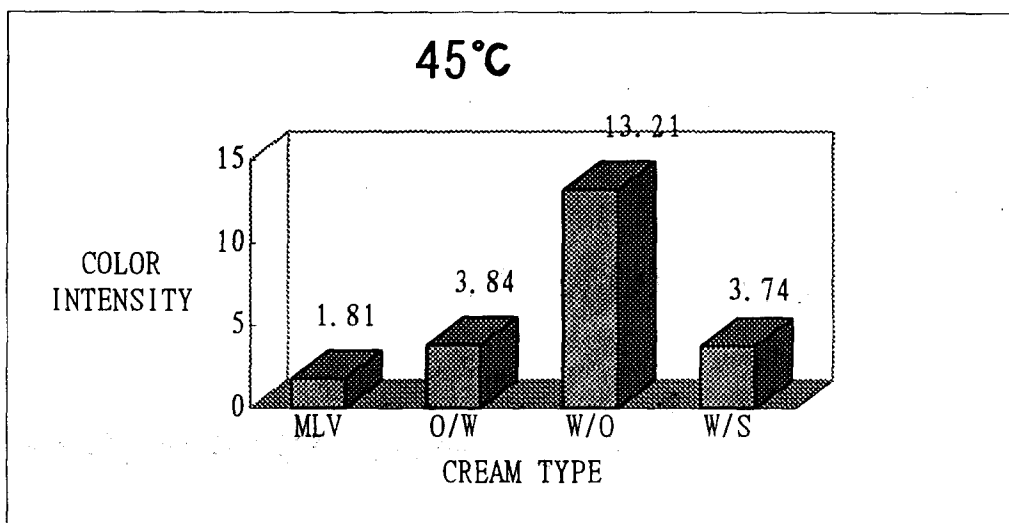
all-*trans*-retinol

↓ **DEHYDRATION**

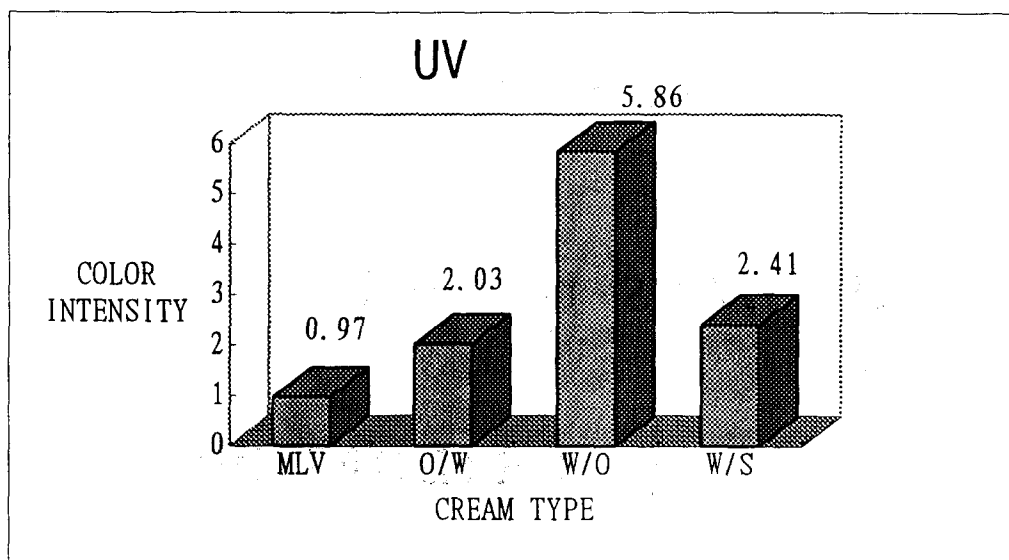


anhydro-vitamin A.

**Fig.2. The structure formulas of all-*trans*-retinol, 13-*cis*-retinol, and anhydrovitamin A.**



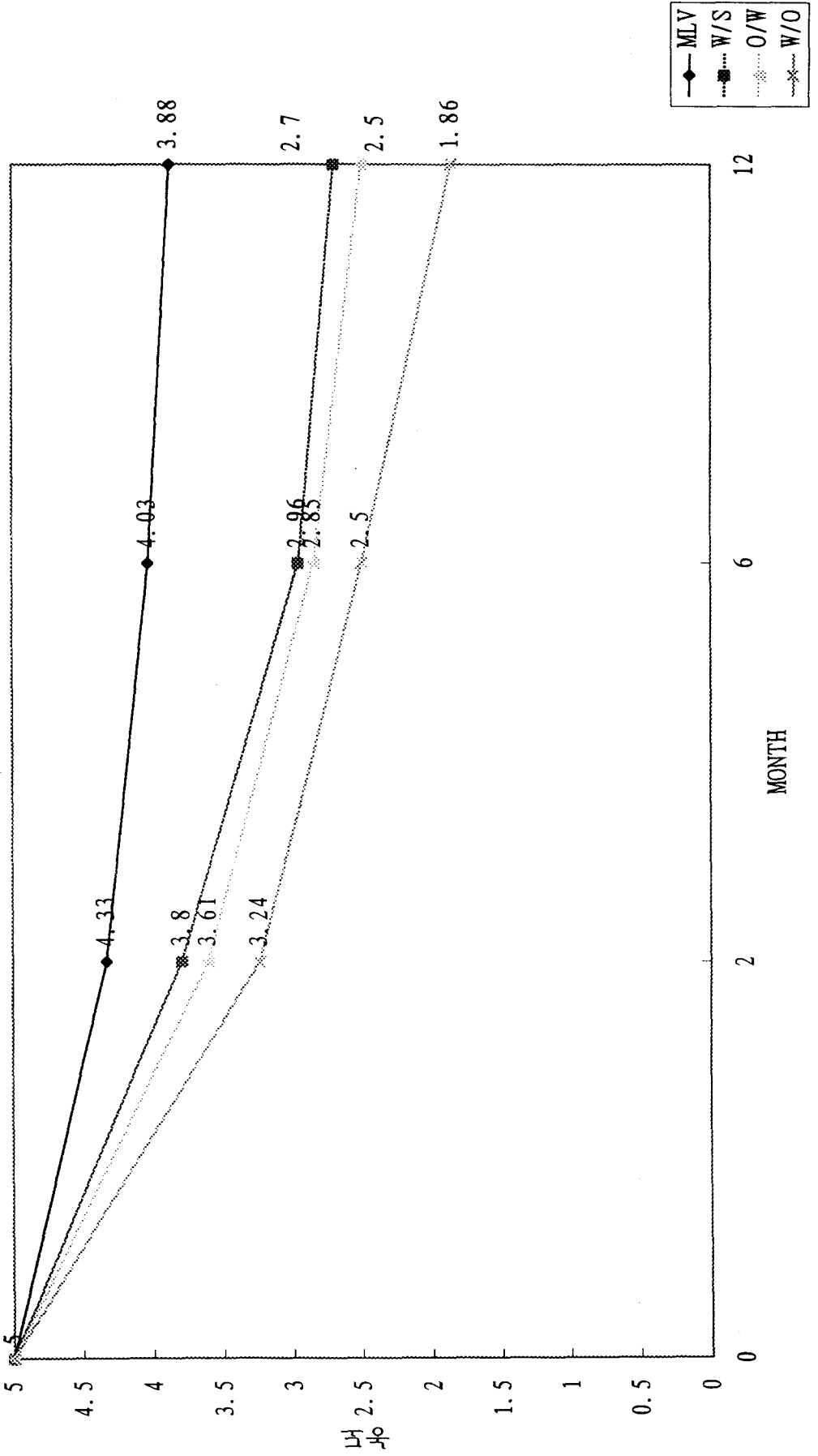
**(a)**



**(b)**

**Fig.3. The color stability of W/O, W/S, O/W, MLV creams after 1 month storage at (a)45°C,(b)UV.**

25°C



(a)

45°C

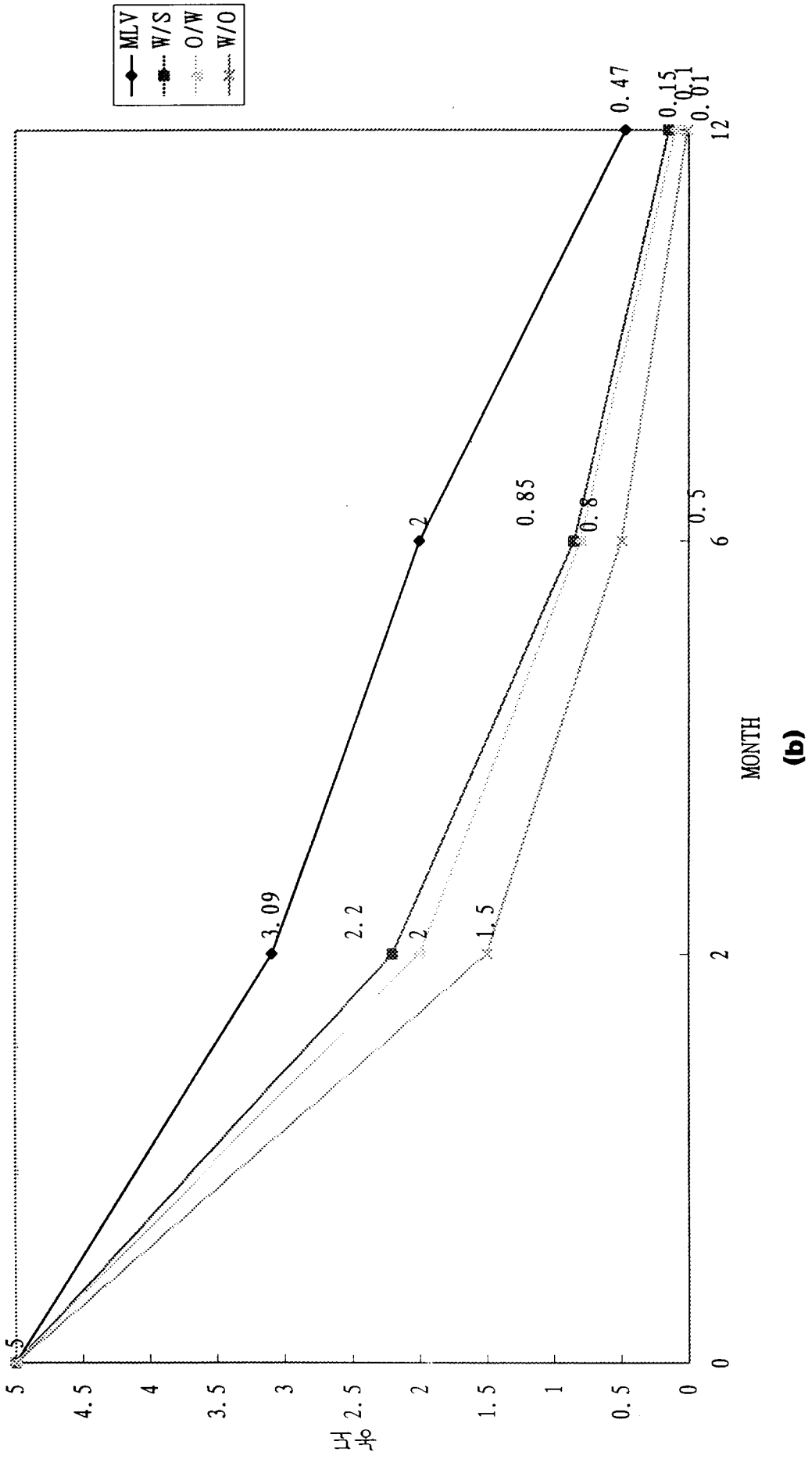
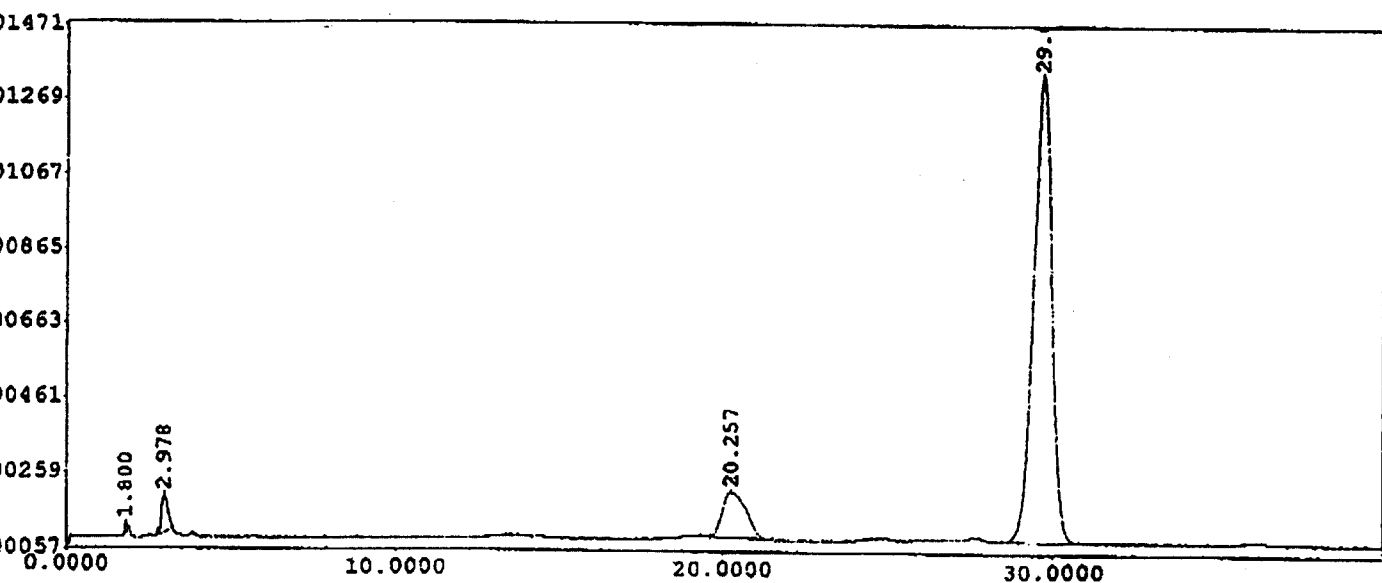
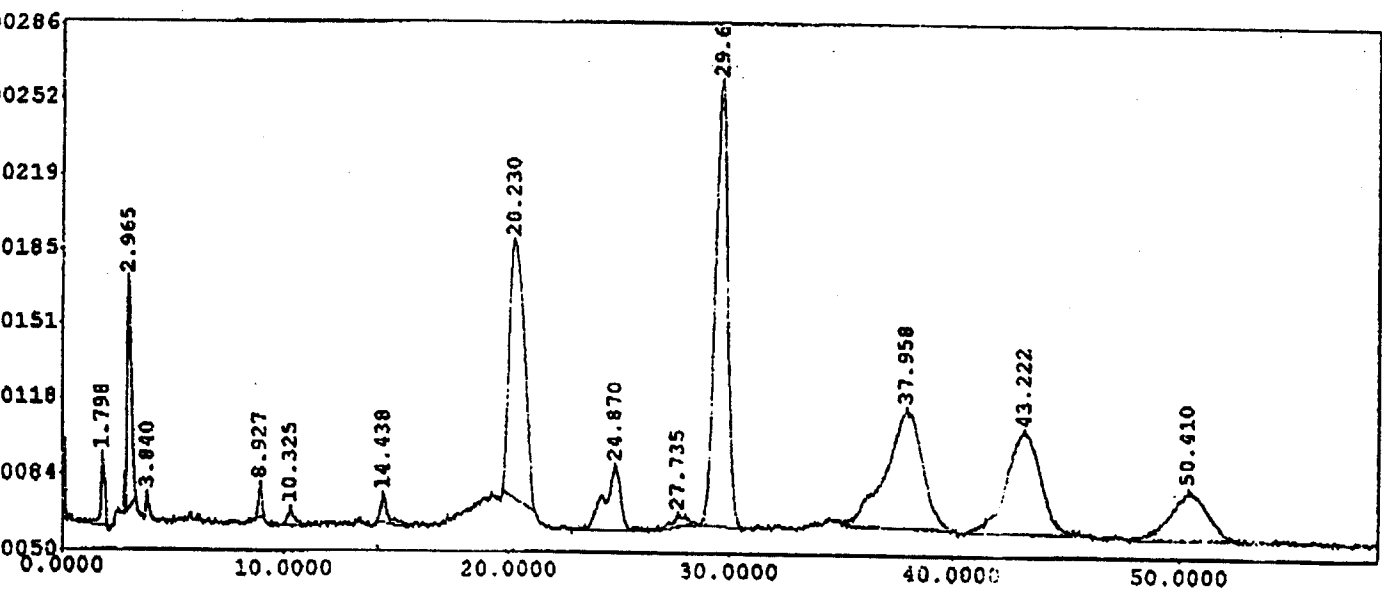


Fig.4. Percent remaining of retinyl palmitate in W/O, W/S, O/W, MLV creams during 12 months storage at (a)25°C,(b)45°C.

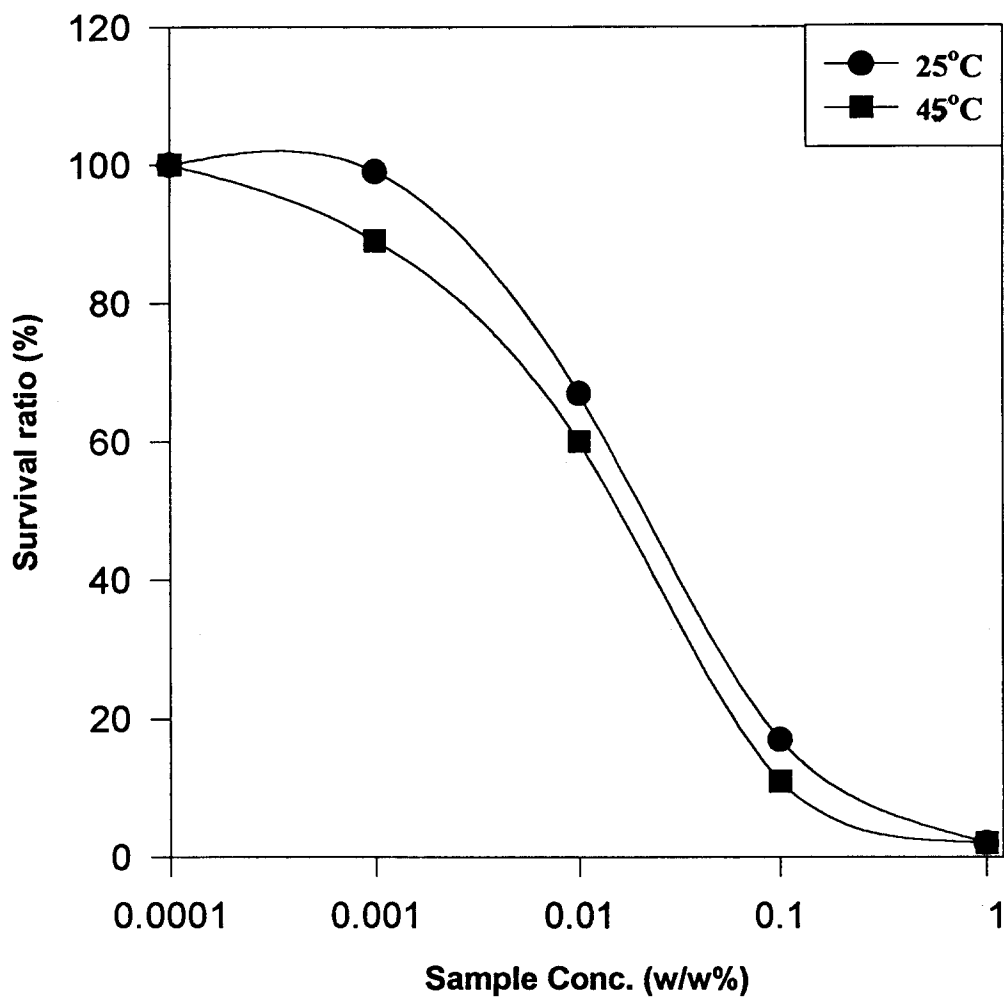


(a)



(b)

**Fig.5. Chromatogram of HPLC(325nm) of retinyl palmitate after 12 months storage at (a)25°C,(b)45°C.**



**Fig.6. Cytotoxicity measurement of retinyl palmitate in cream during 12months storage at (a)25°C,(b)45°C.**

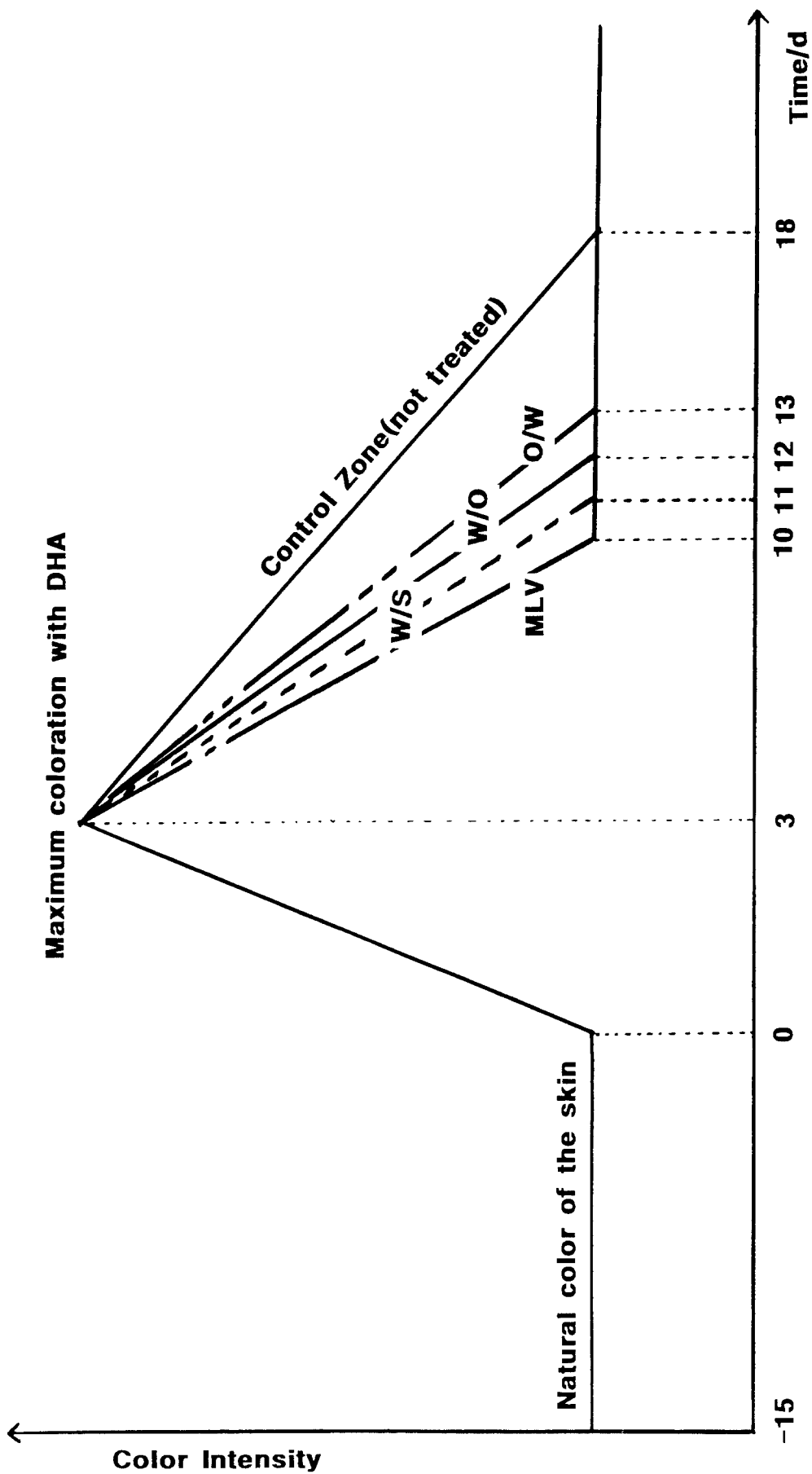
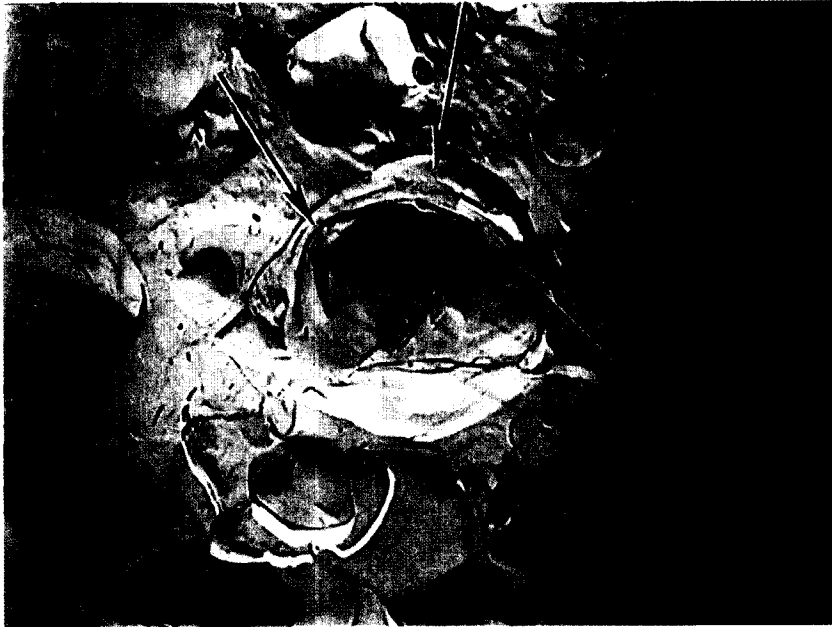
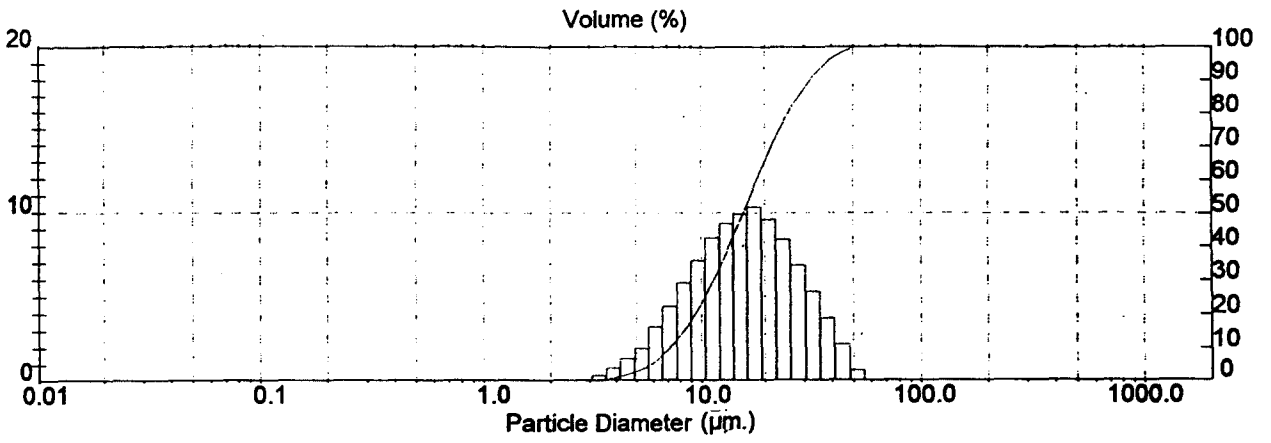


Fig.7. The disappearance of DHA treated skin coloration should be hastened by the use of W/O, W/S, O/W, MLV creams.

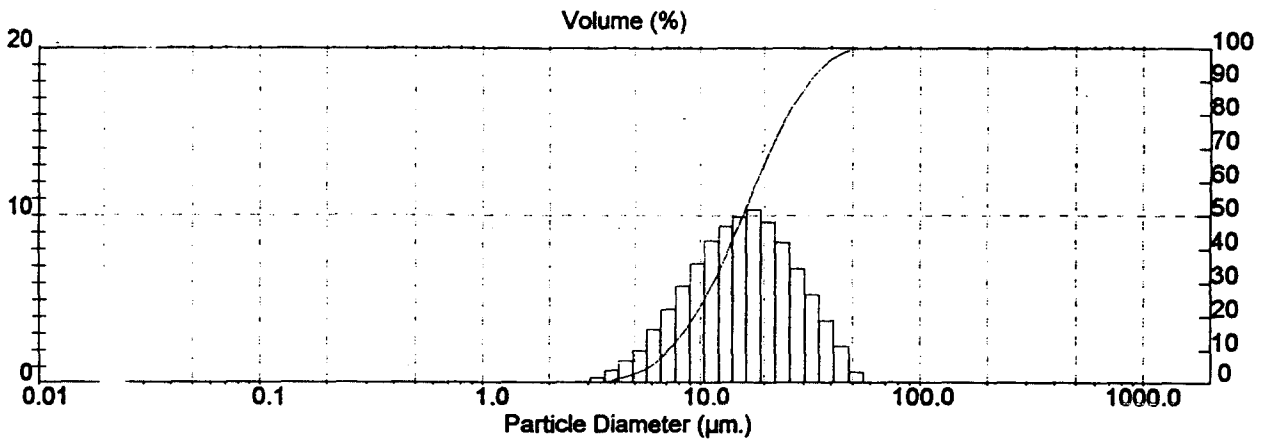




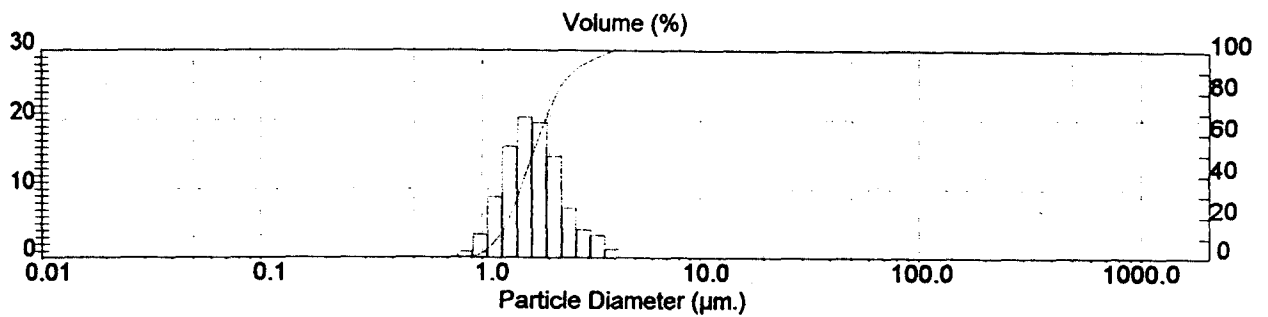
**Fig.8. Scanning electronic microphotograph obtained after freeze-fracture of the MLV. (X16,000)**



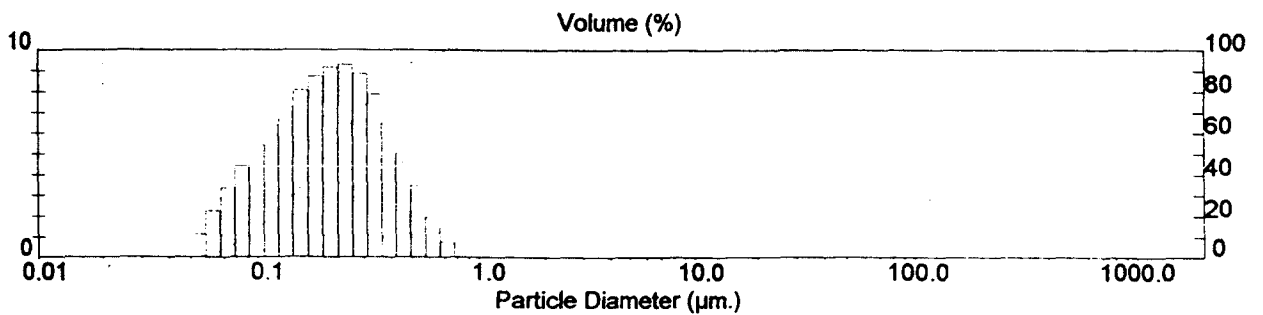
(a)



(b)



(c)



(d)

**Fig.9. Particle size distribution of a(a)W/O, (b)W/S, (c)O/W, (d)MLV creams.**

## Abstract

Retinyl Palmitate, the skin normalizer, is useful to promote greater skin elasticity, to diminish lipid peroxidation and skin roughness following UV exposure, and promote a youthfull general skin appearance.

We knew that the reduction of retinyl palmitate in W/O, W/S, O/W, MLV cream was caused by variable compound factors.

Among the retinoids, we chose retinyl palmitate and studied the stability behavior of retinyl palmitate 5% in W/O, W/S, O/W, MLV cream.

To develop another stable MLV cream base, retinyl palmitate is liposomed. Furthermore, HPLC, CHROMA METERS, LASER LIGHT SCATTERING SYSTEM and FREEZE FRACTURE SCANNING ELECTRON MICROSCOPY was used to analyzing the stability and efficacy of UV and heat.

## 참 고 문 헌

1. Bernard Idson. *Cosmetics & Toiletries.*, 108,79-94(1993)
2. T.TSUNODA, K. TAKABAYASHI, *J.SOC.COSMET.CHM.*,46.191-198(1995)
3. DAVID F. COUNTS, FRANK SKREKO, JULIANNE McBEE, A.G.WICH  
*J.SOC.COSMET.CHM.*, 39,235-240(1988)
4. KATO, *日本油化學會誌.*,45,19-25(1996)
5. ARAI,ARITA,INOUE,*日本油化學會誌.*,45,37-45(1996)
6. W.RAAB, *J.APPL.Cosmetol.*,9,53-55(1991)
7. RUBIN,S.H, *J.SOC.COSMET.CHM.*,11, 160-169(1959)
8. R. Blomhoff, M. H.Green, *Annu.Rev.Nutr.*,12.37(1992)
9. A Jarrett, *J Appl Cosmetol.*, 7. 33 (1989)
10. J kubilus, *J Invest Derm.*, 81, 55 (1983)
11. H Oikarinen, *J Clin Invest.*, 75. 1545 (1985)
12. M Kenney, *Biochem Biophys Acta.*, 899, 156 (1986)
13. DF Counts et al, *J Soc Cosm Chem.*, 39, 235 (1988)

14. D Lawrence, *J Invest Derm.*, 32, 313 (1958)
15. G Klecak, Hoffmann-La Roche, *Intern Commun* (1989)
16. M Connor, *Biochem Pharmacol.*, 36 919 (1987)
17. CG Fthenakis et al, *Ibid.*, 42 211 (1991)
18. PT Pugliese, *J Invest Dermatol.*, 100(2) (1983)
19. D Darr, *J Invest Dermatol.*, 96 590 (1991)
20. C Fox, *Cosm & Toil.*, 108(2) 47-48 (1993)
21. Y.Koizumi, *Fragrance J.Jpn.*, 20, 26-31 (1992)
22. C. Kwasaki and M. Hida, *Vitamins*, 15, 383-386 (1958)
23. T. Tabata, *Vitamins*, 18, 164-167 (1961)
24. S. Hayashi and Y. Nishii, *Vitamins*, 28, 269-273 (1971)
25. K. Tsukida, M. Ito, and F. Ikeda, *J. Vit. Nutr. Tes.*, 41, 158-170 (1971)
26. T. Anmo, M. Washitake, Y. Takashima, M. Isohata, M. Furuya, and K. Koike, *Vitamins*, 46, 193-203 (1972)
27. In-young Kim, Bong-seok Seo, *化粧品學會誌*, 21(2), 1-21(1995)