

## 미백성분이 포함된 나노입자의 제조와 응용

한 성 철 · <sup>1</sup>김 연 주 · † <sup>2</sup>이 기 영 · <sup>3,4</sup>김 동 운  
전남대학교 물질·생물화학공학과, <sup>1</sup>광주보건대학 피부미용과 & 전남대학교 고분자공학과  
<sup>2</sup>전남대학교 응용화학공학부 & 전남대학교 촉매연구소, <sup>3</sup>광양보건대학 보건위생과, <sup>4</sup>(주) 나노바이오메드  
(접수 : 2004. 1. 27., 게재승인 : 2004. 6. 14.)

## Preparation and Application of Whitening Ingredient Entrapped in Solid Lipid Nanoparticle (SLN)

Sung-Chul Han, Yeon-Zu Kim<sup>1</sup>, Ki-Young Lee†<sup>3</sup>, and Dong-Woon Kim<sup>3,4</sup>

Department of Material & Biochemical Engineering, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

<sup>1</sup>Department of Skin and Beauty, Kwangju Health College & Department of Polymer Engineering, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

<sup>2</sup>Faculty of Applied Chemical Engineering & The Research Institute for Catalysis, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

<sup>3</sup>Department of Health and Hygiene, Kwangyang Health College, Kwangyang 545-703, Korea

<sup>4</sup>Nanobiomed Ltd. Chonnam National University Business Center #706, Gwangju 500-757, Korea

(Received : 2004. 1. 27., Accepted : 2004. 6. 14.)

The aim of this study was to investigate the skin-whitening effect of okyong-san and to develop new drug delivery carrier. The extracts of okyong-san were found to have the whitening effect and Eudragit® L 100-55 (EUD) coated solid lipid nanoparticle (E-SLN) was prepared by solvent evaporation method and melt dispersion technique. As a result, E-SLN have a 144-170 nm of particle size, spherical shape, and 33~41% encapsulation efficiency. After release test *in vitro*, release profile of E-SLN depended on pH and temperature. Lastly, closed patch test and skin-whitening test was performed clinically. In conclusion, test sample had non-stimulation and high % whiteness. The results suggest that okyong-san and E-SLN is useful as cosmeceuticals for whitening cosmetics.

**Key Words** : SLN, okyong-san, eudragit, encapsulation, cosmetics

### 서 론

약물의 효율적인 거동을 증가시키고 계의 부작용을 감소시키기 위한 하나의 접근은 가장 필요한 질병의 장소에 가장 적합한 기간동안 필요한 약물의 양을 전달하는 것이다. 기존의 전달체들이 갖는 단점을 해결하기 위하여 liposphere (LS)로 불리는 지질 미세구가 생물 활성인 물질의 전달을 위한 새로운 형태의 fat-based encapsulation system으로서 제안되어 왔으며 이러한 LS는 다음과 같은 장점을 갖는다. (a) 좋은 물리적 안정성, (b) 낮은 재료가격, (c) 제조와 scale up의 쉬움, (d) 친지질성 물질에 대한 높은 포획효율, (e) 좁은 입자 크기

의 분포 등(1). 이와 같은 장점으로 인하여 LS는 경구, 피하주사, 근육주사, 외용약 또는 세포 캡슐화 등 다른 경로에 의해 투여될 수 있으며, 따라서 많은 질병의 치료에 추천되고 있다 (2). 고형지방 나노입자 (solid lipid nanoparticle, SLN)의 제조 방법은 크게 용매증발법 (solvent evaporation method)과 용융분산법 (melt dispersion technique)으로 나누어지며 용매증발법은 용융분산법에 의해 제조된 SLN보다 작은 크기분포를 가지지만 빈약한 기계적 특성을 가지는 것으로 알려져 있다(3). 또한 Rita Cortesi 등은 SLN은 친지질성 약물에 대해서는 높은 캡슐화 효율 (70%이상)을 가지는 반면 친수성 약물에 대해서는 낮은 (2~3%) 효율을 가지는 단점이 있다고 보고 하였으며 W/O/W double emulsion 기법을 이용하여 캡슐화 효율을 50% 이상으로 증가시킬 수 있다고 하였다(1).

환경오염은 피부가 자외선에 노출되는 기회를 증가시키고 있으며 피부노화에 의한 피부색의 변화와 색소침착

† Corresponding Author : Faculty of Applied Chemical Engineering, Chonnam Nat'l Univ., Gwangju 500-757, Korea  
Tel : +82-62-530-1843, Fax : +82-62-530-1849  
E-mail : kileec@chonnam.ac.kr

(pigmentation)을 가중시키고 있다. 또한 미용적인 이유에서 피부 착색에 대한 관심이 높아지고 있으며 이에 보다 안정적이고 효과적인 미백 소재를 발견하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다. 최근 수년간 멜라닌 생성과 제어 메커니즘 연구의 진보는 매우 현저하였으며 이러한 연구 성과에 의해 미백소재에 대한 연구는 tyrosinase 활성억제 소재 연구, 피부 각질층의 제거 촉진 효능을 가진 소재에 대한 연구, 자외선 차단소재 연구, 세포독성억제 소재 연구, 활성산소 제거 소재에 대한 연구 등으로 이루어지고 있다(4). 종래의 미백제로서는, L-ascorbic acid (비타민C), arbutin 및 kojic acid가 유효 성분으로 허가되어 있으며, 최근에 미백제로서 연구 개발되어 보고되고 있는 것으로는, D,L- $\alpha$ -tocopheryl ferulate, 안정형 비타민C 유도체들, ellagic acid,  $\alpha$ -hydroxy acids (AHAs), 3,5-dicaffeoyl-1-quinic acid 등이 있다(5). 그 외에 kojic acid와 유용성 감초 추출물인 glabridin의 병용에 의한 상승적 미백작용에 관한 연구보고도 있다(6). 서시옥용산 등의 한약복합제에 대한 연구도 있으나(7) 옥용산 (okyong-san, 玉容散)은 동의보감 외형편 (東醫寶鑑 外形編)에 “얼굴에 생긴 기미, 작은 부스럼, 뾰루지, 땀띠, 분가시로 생기는 뾰루지와 피부가 가려운 것을 치료하며 기름때를 없앤다.”라고 수록되어 있으며(8), 그 분말과 추출액을 이용한 제품들이 시판되고 있지만 미백효과 검증에 관한 연구는 미흡한 실정이다.

본 연구에서는 SLN을 제조하기 위하여 핵심물질로서 coconut oil과 코팅물질로서 Eudragit<sup>®</sup> L100-55 (EUD)를 사용하였다. 먼저 coconut oil은 녹는점이 23~28℃로서 주로 C<sub>10</sub>, C<sub>12</sub>, C<sub>14</sub>의 포화지방산으로 이루어져 있으며 정제된 것은 식용, 마아가린 등에 사용된다(9). Coconut oil은 dynasan, witepsol 또는 compritol과 같은 semisynthetic lipid와 비교하여 더 좋은 생분해성과 낮은 생체 내 독성을 가지고 있으며 glyceride 내의 지방산의 종류를 변화시킴으로써 물리적 특성을 바꾸는 것도 가능하다. 뿐만 아니라 그 녹는점으로 인하여 온도 의존적인 약물전달을 가능하게 한다(3). 본 실험에 사용된 Eudragit<sup>®</sup> L100-55 (EUD)는 pH 5.5 정도에서 녹는 pH에 민감한 수용성의 음이온성 methacrylic 고분자로서 장용 (duodenums) 약물의 코팅물질로서 많이 이용되고 있다(10). 또한 피부를 통한 약물의 전달에 사용되는 전달체로서도 많은 연구가 있어왔다(11-13)..

생리활성 물질의 경피흡수를 위한 기술들은 전달체들이 피부표면에 머물면서 지속적으로 약물을 방출하는 원리를 이용한 것으로서 약물의 활성시간을 지속시키면서 피부의 자극을 완화시켜주는 작용을 한다. 나노입자를 경피흡수용 전달체로 사용할 경우, 나노입자는 큰 입자의 분산액에는 나타나지 않는 침착성을 나타내며 피부표면에 침착성 필름을 형성하는 특징이 있다. 특히 생체적합성 고분자형 나노입자는 낮은 피부자극과 부작용을 나타내며, 외부의 여러 산화 환경으로부터 불안정한 물질들을 차단하여 안정하게 약물들을 봉입하여 전달할 수 있는 특징이 있다. 입자 크기가 작아지면 입자가 받는 중력이 일반 마이크로 단위 입자보다 줄어들며 물질의 작은 알갱이들이 주위를 둘러싼 기체 분자와의 충돌에 의한 움직임도 활발해져 침투력 또한 좋아지게 된다(14). 피부 표피세포간의 평균 간극은 75 nm 정도이며 각질층의 경우에는 100~200 nm 정도인 것으로 알려져 있으며 입자 크기를 조

절함으로서 피부를 통한 약물의 전달에 대하여 연구한 보고들이 있다(15). 또한 피부의 표면은 pH 5.5 정도의 약산성을 띠며 진피에 도달할수록 pH가 중성에 가까워지게 되어 pH 민감성 약물의 적용을 가능하게 한다(16).

본 연구에서는 첫째, 옥용산의 미백효과를 tyrosinase 저해 활성, free radical 소거활성, 자외선 흡수능을 통해 조사하였고 둘째, 추출물과 비교 시험 군으로서 비타민C를 포함하는 EUD가 코팅된 SLN (E-SLN)을 제조하고 형태, 크기분포, 캡슐화 효율 등의 특성을 규명하였다. 셋째로는 제조된 E-SLN의 온도와 pH 의존적인 약물의 방출을 고찰하였으며 마지막으로 인체 침포시험과 인공 색소침착 후 시료도포에 의한 멜라닌 지수의 측정을 통하여 미백효과를 평가하였다.

## 재료 및 방법

### 재료 및 시약

옥용산의 미백효과 검증을 위한 실험에 사용한 11종의 생약은 시중에서 구입, 정선하여 사용하였고 실험에 사용된 처방은 동의보감 외형편에 의거하였으며 그 구성약물과 양을 Table 1에 나타내었다. DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), tyrosinase, L-tyrosine, coconut oil, 비타민C 등은 Sigma Chemical Co.(USA)에서 구입하여 사용하였고 Eudragit<sup>®</sup> L100-55는 Degussa (Degussa-Hüls Gruppe, Germany)로부터 기증받아 사용하였으며 기타 실험에 필요한 시약은 특급 이상을 더 이상의 정제과정 없이 사용하였다.

Table 1. Composition and dosage of okyong-san

Chinese medicine name	Botanical name	weight (g)
白芨	<i>Gleditsia sinensis lam.</i>	600
升麻	<i>Cinicifuga foetida L.</i>	106
楮實子	<i>Broussonetia papyrifera Vent.</i>	66
白芷	<i>Angelica dahurica(Fisch, ex Hoffm.) Benth. et Hook. f. ex Franch. Sav</i>	13.4
白芨	<i>Bletilla striata (Thunb.) Reichb. f.</i>	13.4
天花粉	<i>Rhichosonthe Japonica Regel</i>	13.4
綠豆粉	<i>Phaseolus radiatus L.</i>	13.4
甘松	<i>Nardostachys chinensis Batal.</i>	6.6
砂仁	<i>Amomum villosum Lour.</i>	6.6
白丁香	<i>Feces of Passer montanus etc.</i>	6.6
糯米	<i>Oryza sativa L.</i>	504
Total amount		1349.4

### 옥용산 추출물의 제조

Park 등의 방법(7)에 따라 옥용산 1,350 g의 10%에 해당하는 135 g을 증류수 1 L를 가하여 감압 하에서 70-80℃로 3 시간 정도 농축하며 끓인 후 거즈로 여과하고, 3200 rpm으로 30분 동안 원심분리하여 상등액을 취하였다. 얻어진 추출액은 동결건조한 후 적량을 증류수에 녹여 실험에 사용하였다. 또한 옥용산을 구성하는 각각의 생약에 대해서도 같은 방법으로 추출하고 동결건조하여 사용하였다.

### 자외선 흡수 스펙트럼의 측정

추출물의 자외선 흡수스펙트럼을 측정함으로써 주름 생성

및 멜라닌 생성에 영향을 미치는 UV-A, B, C 및 가시광선 영역에서의 흡수 패턴을 관찰하였다. 구체적으로, 0.1% (w/v) 농도로 녹인 옥용산 추출물과 구성성분을 200~600 nm의 파장에서 spectrophotometer (Spectra View 2000, Ocean Optics, USA)를 이용하여 측정하였다(6).

**Tyrosinase 저해 활성 측정**

Tyrosinase 저해 활성을 측정하기 위하여 다음의 용액을 혼합한 후 37℃에서 10분간 항온 배양하여 기질혼합물을 준비하였다.

Test solution (okyong-san and components)	0.9 mL
L-Tyrosine (0.3 mg/mL)	1.0 mL
Potassium phosphate buffer (0.1 M, pH 6.8)	1.0 mL

그 후 0.1 mL tyrosinase 용액 (1250 units/mL)을 기질혼합물에 가하고 37℃에서 10분간 항온 배양한 다음, 반응 혼합물을 얼음물에 넣어 반응을 종결시켰으며 475 nm에서 흡광도를 측정하였다. Tyrosinase를 첨가하지 않은 균을 공시험균으로 하고, 시료용액을 첨가하지 않은 균을 대조균으로 하여 다음 식과 같이 효소 저해활성을 계산하였다(5). 생약추출물에 따라 특유한 색을 띠고 이는 최종 흡광도에 영향을 미칠 수 있으므로 반응혼합물의 흡광도에서 기질혼합물의 흡광도를 뺀 값을 계산에 사용하였다.

$$\% \text{ of Inhibition} = \left(1 - \frac{A_{475} \text{ of reactant mixture} - A \text{ of substrate mixture}}{A_{475} \text{ of control}}\right) \times 100$$

**Free radical 소거활성 측정**

옥용산 추출액을 0.04-20 mg/mL의 양이 되게 DMSO (methyl sulfoxide)에 녹이고 96-well microtitre plate에 10 µl 씩 각각 가한 후 200 µl의 100 µM DPPH (in methanol) 용액을 첨가하였다. 혼합물은 37℃에서 30분간 반응시키고 Elisa microtitre plate reader (Bio Rad Laboratories Inc. CA)를 이용하여 490 nm에서 각각 용액의 흡광도 감소를 측정하였다(5). 활성의 크기 (Scavenging activity: SC<sub>50</sub>)는 100 µM DPPH의 농도가 50% 감소되는데 필요한 시료의 농도 (SC<sub>50</sub>, mg/mL)로서 표기하였다(17).

**E-SLN의 제조**

본 연구에서는 E-SLN을 제조하기 위하여 Rita 등(1), Hualiliang 등(18), Alf 등(19)의 방법을 응용하였으며 그 과정을 Fig. 1에 간략히 나타내었다. 요약하면, 15% (w/v)로 녹인 옥용산과 비타민C 수용액을 coconut oil에 1 : 9 (v/v)의 비율로 혼합한 후 30초 동안 sonication (VCX 400, Sonics & Materials Inc., USA)하여 w/o상의 나노에멀전을 형성시킨 후 1~3% (w/v)의 EUD가 녹아있는 20 mL의 에탄올 용액에 1 mL를 첨가하고 다시 sonication하여 분산시켰다. 그 다음 현탁액을 교반중인 200 mL의 증류수에 가하고 3시간 정도 교반하여 용매인 에탄올을 증발시킴으로서 E-SLN을 제조하였다. 제조변수에 따른 크기분포와 캡슐화 효율을 알아보기 위

하여 EUD의 농도, 나노에멀전 제조 시 w/o의 비율, 그리고 pour solution의 온도를 달리하여 E-SLN을 제조하였다. 제조된 E-SLN은 filter paper (Advantec, Toyo Roshi Kaisha, Ltd., Japan)로 여과하여 분석에 사용하였다.

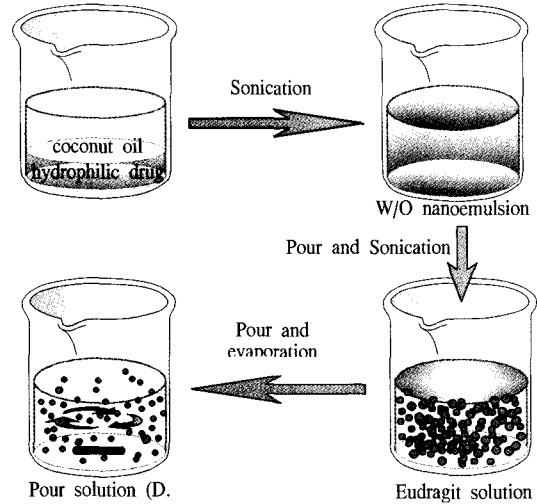


Figure 1. Schematic representation of preparation method for EUD coated SLN.

**투과전자현미경을 통한 E-SLN 관찰**

제조된 E-SLN의 형상은 Transmission Electron Microscopy (TEM, JEM-2000 FXII, Japan)를 통하여 확인하였다. Phosphotungstic acid (2 wt %)를 KOH (1 N)로 pH 6.8이 되게 하여 준비하여 E-SLN 현탁액과 1:1로 혼합한 후 1시간 동안 정치하여 음으로 염색하였다. 그리고 formvar/carbon이 코팅된 grid (200 mesh)에 침지시킨 후 상온에서 24시간 동안 건조하고 TEM을 통해 관찰하였다.

**제조된 입자의 크기분포**

제조된 입자의 입경 및 크기의 분포는 Dynamic Light Scattering (DLS-7000, Otsuka Electronics Co. Ltd., Japan)을 이용하여 확인하였다. 분석하기 위해 시료를 적당한 농도로 희석하였으며 다른 여과과정은 거치지 않았다.

**캡슐화 효율**

E-SLN의 캡슐화 효율을 구하기 위하여 제조된 현탁액과 0.05 µm filter (0.05 µm VMTP, Millipore, USA)로 환의여과한 현탁액을 각각 0.5 mL씩 취하여 동량의 에탄올에 녹인 후 건조하고 1 mL의 증류수로 수용성인 약물을 추출하였다. 그 다음 15,000 rpm에서 10분 동안 원심분리를 하고 표면의 지질을 조심스럽게 제거한 상등액을 UV-spectrophotometer를 이용하여 옥용산은 236 nm (UV-vis scanning에 의하여 흡광도의 최고 값을 나타내는 파장)에서, 비타민C는 260 nm에서 각각 측정하고 다음의 식을 이용하여 계산하였다(20).

$$\text{Encapsulation efficiency (\%)} = \frac{\text{drug in whole solution} - \text{drug in filtrated solution}}{\text{initial loaded drug}} \times 100$$

### in vitro 용출시험

EUD가 pH 의존적으로 pH 5.5에서 물에 용해되는 점을 고려하여 제조된 E-SLN이 피부의 pH와 비슷한 pH 5.5에서 붕괴되고 약물이 방출되는 지를 시험하였다. 요약하면 Szentmihályi 등의 방법(23)에 따라 pH 5.5, 1.4 그리고 7.4인 버퍼를 제조하고 USP XII basket method를 응용하여 30 mL의 버퍼가 담긴 50 mL 플라스틱 용기에 1 mL의 시료를 투석막을 통해 용출시켰다. 일정시간이 지난 후 동일한 조건의 다른 용기에 옮겨 담고 미리 작성한 검량선으로부터 누적 용출량을 산출하고 용출 %를 계산하였다. 또한 coconut oil에 의한 온도 의존적인 약물 방출 거동을 살펴보기 위하여 10, 20, 25, 37°C에서 같은 방법으로 용출시험을 실시하였다.

### in vivo 시험

인체 시험을 위한 피험자는 아래와 같은 선정기준 및 제외 기준에 의거하여 12~30명을 선발하였다. 1) 선정기준 : 20~26세 사이의 여성, 전신상태가 건강할 것, 동의서 작성 및 설문 조사에 응할 것, 2) 제외기준: 현재 전신적인 질환(당뇨, 고혈압, 결핵, 암, AIDS 등)을 갖고 있는 경우, 현재 임신 중인 경우, 과민성 피부염을 경험한 경우, 기존의 화장품이나 약제에 대한 과민성 피부염을 경험한 경우, 현재 피부암, 건선, 화상, 습진 등의 피부질환을 갖고 있는 경우.

### 침포시험을 통한 피부자극도 시험

Lee 등(21)과 Kim 등(22)의 방법에 따라 제조된 두 가지 수용성 약물이 포함된 E-SLN과 옥용산에 대하여 침포시험을 통한 피부자극도 시험을 실시하였다. 침포시험에 사용된 재료는 A: 옥용산을 포함한 E-SLN, B: 옥용산 수용액, C: 비타민C를 포함한 E-SLN, D: 비타민C 수용액으로 하였으며 각각 0.5 mL의 시료를 사용하고 대조군으로서 아무것도 처리하지 않는 침포 (E)를 두었다. 방법은 30명의 피험자에 대해 Finn chamber가 부착된 테이프 (Hill Top chamber, Hill Top Co. Cinninnati, OH, USA)를 사용하였으며 테이프를 부착한 뒤 48시간에 제거하고, 제거 1~2시간 후와 48시간 후에 판독하였다. 결과는 5등급으로 구분하였으며 I은 무반응, II는 홍반만 있는 경우, III은 홍반과 구진, IV는 홍반과 소수포, V는 홍반, 소수포 혹은 수포 및 심한 부종이 있는 것으로 평가하였다.

### 인공광원에 의한 사람피부에서의 색소침착 및 시료의 미백효능 평가

실험 재료: 임상 피험자 15명에 대하여 실험을 실시하였으며 본 연구에서 제조된 5개의 시료를 기본처방 (크림베이스, white lotion, Shirley Price Aromatherapy Ltd., UK)과 함께 사용하였다. 시료는 옥용산 (A)과 비타민C (B)의 농도가 각각 0.34%와 0.002%가 되도록 농축한 E-SLN과 같은 농도의 옥용산 (C)과 vitamin C (D) 수용액을 사용하였다. 모든 시료는 크림베이스에 4% (v/v)만큼 첨가한 후 homogenizer (IKA ULTRA-TURRAX T25 basic, Germany)로 유평하여 사용하였으며 대조군으로서 크림베이스 (E)를 사용한 군과 아무처리도 하지 않은 군 (F)을 두었다.

인공색소침착: 색소침착은 각 피험자의 팔 상박 내측 부분에 Solar simulator (Model 601, Solar Light Co., USA)를 이용하여 6개의 인공 자외선 조사부위 (A-F)를 만들었다. 이때의 자외선 조사에는 UV-A와 UV-B lamp가 이용되었으며 1.0 MED (minimum erythma dose) 범위의 자외선을 일주일 간격으로 총 2회 조사하여 총 자외선 조사량이 2 MED가 되도록 하였다.

시료의 도포: 인공색소침착 부위에 도포할 시료는 위에서 설명한 5개의 실험재료를 사용하였으며, 자외선 조사 종료 일일부터 6개의 인공 자외선 조사부위 (A-F)에 오전, 오후 두 차례에 걸쳐 4주에 걸쳐 도포하도록 하였다.

멜라닌 지수의 측정: 멜라닌 지수의 측정은 자외선 조사 종료 일주일 후인 최초 측정일을 포함하여 1주일 간격으로 실시하였다. 사용된 기기는 Mexameter (MX18, C+K, Germany)이며 이 기기를 통하여 대조군 및 시료 도포부위에서 멜라닌 지수 (Melanin Index, MI)를 각각의 시험군과 대조군에 대하여 3회 측정하여 평균값을 구하였다.

통계 분석 및 효능 판정: 색소 침착이 제대로 되지 않은 피험자와 중도 포기자를 배제한 한명의 피험자를 제외한 총 13명의 피험자를 대상으로 측정된 대조군 부위 1곳과 베이스 대조군 부위1 그리고 시료와 베이스를 혼합한 시험군 4곳의 MI 평균값을 구하였다. 시료 도포 기간 중의 1주 간격으로 측정된 MI 평균값들에 대한 최초 측정일의 MI 평균값의 상대적 비율은 다음의 공식을 사용하여 % Whiteness로서 구하였다. 1주 간격으로 얻어진 각 피험자의 % Whiteness를 기초로 하여 총 15명의 피험자 전체 집단의 % Whiteness 평균값과 표준편차 값을 구한 다음, 대조군과 시료 도포 부위에서의 % Whiteness를 Paired t-test를 통하여 비교하였다. 이 때  $P < 0.05$ 이면 통계적으로 유의차가 있는 것으로 판단하여 시료의 미백효능이 있는 것으로 판정하였다.

$$\% \text{ Whiteness} = \frac{\text{Average of MI at first measurement}}{\text{Average of MI in sample apply}} \times 100$$

### 결과 및 고찰

#### 옥용산의 자외선 흡수 스펙트럼

옥용산의 추출물과 그 구성성분의 추출물을 0.1% (w/v)가 되게 녹여 200~600 nm에서 UV scanning을 수행하였고, 그 대조군으로는 증류수를 사용하였다. UV spectrum을 분석한 결과 옥용산 및 그 구성성분은 대부분 UV 영역에서의 흡수능을 가지고 있는 것으로 확인이 되었으며(Fig. 2) 옥용산은 흡수능이 우수한 백급, 승마, 감송, 조협과 흡수능이 상대적으로 약한 백지, 찻쌀분, 백급, 천화분의 중간정도에 해당하는 UV 흡수능을 가지는 것으로 확인되었다. 옥용산 추출물의 경우 대조군과 비교해 볼 때 UV-C (200~290nm)와 UV-B (290~320nm)에 걸쳐서 특징적인 흡수 peak를 보이고 있으며 UV-A (320~400nm)영역에서는 약한 흡수를 보이는 것으로 확인되었다(Fig. 2. red line). 이 때 옥용산 추출물은 236 nm의 파장에서 최대 UV 흡수능을 가졌으며, 이 파장은 SLN에 포함된 옥용산을 정량 분석하는 데 이용되었다. 옥용

산의 이러한 자외선 흡수경향은 UV-B와 UV-C의 피부침투를 저해하는 자외선 차단제의 원료로서 사용하는 것이 가능하다는 것을 보여준다.

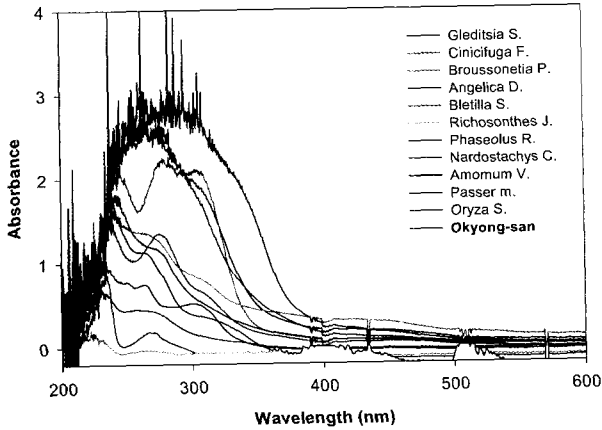


Figure 2. UV-vis scan of 0.1% okyong-san components (a) and okyong-san extracts (b).

**Tyrosinase 저해활성**

본 실험에서는 기질로서 L- tyrosine을 사용하여 11가지 옥용산 구성성분의 추출물을 대상으로 색소형성 억제 정도를 측정함으로써 tyrosinase 저해활성을 평가하였다. 실험 결과, 옥용산과 옥용산 구성성분 중 조합과 저질자가 높은 tyrosinase 저해활성을 나타내었으며 백급, 사인 찻쌀분은 상대적으로 낮은 활성을 나타내었다(Fig. 3). 이 때, 옥용산은 0.4% (w/v) 농도에서부터 tyrosinase 저해 활성을 나타내기 시작하여 0.8% 이상의 농도에서는 80% 이상의 높은 저해활성을 나타내었다(data not shown).

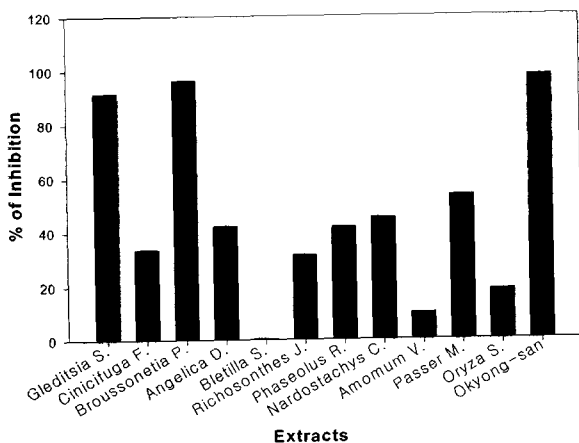


Figure 3. Inhibitory effect of 0.1% extracts of okyong-san components (a) and various concentration of okyong-san (b) on tyrosinase activity.

**Free radical 소거활성**

DPPH 방법을 이용하여 11가지 생약 추출물과 옥용산에 대해 free radical 소거활성을 측정하였고 결과를 Table 2에 나타내었다. 소거활성 측정결과 조합, 승마, 감송, 백정향, 찻쌀분이 높은 활성을 보였으며 옥용산 또한 상대적으로 높은 소거활성을 나타내는 것으로 관찰되었다. 결과적으로 옥용산

은 활성산소종의 형성을 억제하여 멜라닌 생성을 저해함으로써 서 피부미백에 기여할 수 있음을 나타낸다.

Table 2. Free radical scavenging activity of okyong-san extracts

Extracts	SC50 (mg/mL)
<i>Gleditsia sinensis lam.</i> (皂莢)	0.015
<i>Cinicifuga foetida L.</i> (升麻)	0.160
<i>Broussonetia papyrifera Vent.</i> (楮實子)	3.852
<i>Angelica dahurica</i> (Fisch, ex Hoffm.) Benth. et Hook. f. ex Franch. Sav (白芷)	2.121
<i>Bletilla striata</i> (Thunb.) Reichb. f. (白芨)	4.151
<i>Rrichosonthes Japonica Regel</i> (天花粉)	6.125
<i>Phaseolus radiatus L.</i> (綠豆粉)	6.321
<i>Nardostachys chinensis Batal.</i> (甘松)	0.550
<i>Amomum villosum Lour.</i> (砂仁)	4.567
Feces of <i>Passer montanus</i> etc. (白丁香)	0.015
<i>Oryza sativa L.</i> (糯米)	0.478
<i>okyong-san</i> (玉容散)	0.366

**E-SLN의 형태**

TEM을 이용하여 제조된 E-SLN의 형태를 관찰한 결과 옥용산(Fig. 4 (a))이나 비타민C(Fig. 4 (b))를 포함하는 구형의 입자가 양호하게 형성된 것을 관찰할 수 있었고 그 크기는 약 50 nm~300 nm 정도인 것을 알 수 있었다. 옥용산을 포함한 E-SLN의 경우 내부에 포함된 옥용산 수용액이 관찰된다(Fig. 4. (a) 화살표)

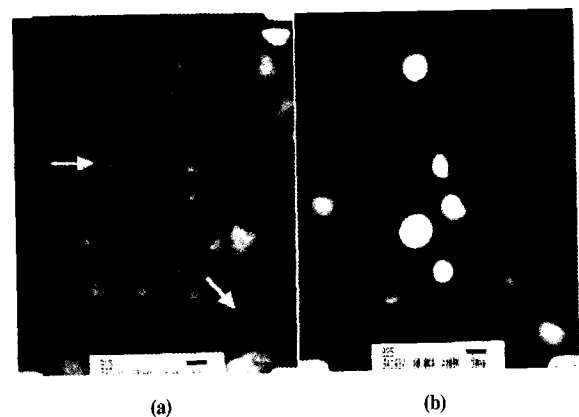


Figure 4. TEM photograph of okyong-san (a) and vitamin C (b) entrapped in E-SLN. Bar corresponds to 200 and 50 nm in panel (a) and (b) respectively.

**크기분포와 캡슐화 효율**

옥용산을 포함한 E-SLN: E-SLN 형성에 EUD의 농도가 미치는 영향을 알아보기 위하여 EUD의 농도를 1.0~3.0%로 달리하여 제조하였다. 이 때 옥용산과 비타민C의 농도는 15% (w/v)를 사용하였으며 w/o 비율은 1 : 9, ethanol의 양은 20 mL, pour solution의 양은 200 mL로 일정하게 유지하였고, 온도는 실온 (25°C~27°C)에서 수행하였다. Table 3에 나타난 결과와 같이 옥용산을 포함한 E-SLN의 경우, EUD의 농도가 1.5% 이하이거나 3.0% 이상일 때에는 2.0%일 때 보다 평균입径이 작기는 하였지만 그 캡슐화 효율이 3%를 넘지 않거나 훨씬 적었다. 또한 2%의 EUD를 사용한 경우에 피부의 각질층과 표피층을 투과할 정도의 입경인 200 nm나

**Table 3.** Effect of preparation parameters on characteristics of okyong-san entrapped in E-SLN

Actual group	Condition	Mean diameter(nm)	Below 100nm(%) <sup>a)</sup>	Below 200nm(%) <sup>b)</sup>	Encapsulation efficiency(%)
Eudragit concentration (%)	1	178	0	87	0.1
	1.5	161	0	90	0.8
	2.0	170	15	61	41.2
	2.5	166	8	58	21.3
	3.0	163	0	80	2.5
w/o ratio	4 : 6	3050	0	21	19.6
	3 : 7	199	2	60	23.1
	2 : 8	192	2	55	10.7
	1 : 9	170	15	61	41.2
Temperature of pour solution(°C)	5	270	21	27	14.5
	25	170	15	61	41.2
	40	204	3	50	33.5

<sup>a)</sup>Cumulative percentage of below the 100 nm diameter<sup>b)</sup>Cumulative percentage of below the 200 nm diameter**Table 4.** Effect of preparation parameters on characteristics of vitamin C entrapped in E-SLN

Actual group	Condition	Mean diameter(nm)	Below 100nm(%)	Below 200nm(%)	Encapsulation efficiency(%)
Eudragit concentration (%)	1	175	0	65	20.4
	1.5	140	3	100	22.3
	2.0	144	13	78	32.8
	2.5	157	0	89	26.1
	3.0	81	76	88	17.9
w/o ratio	6 : 4	162	7	68	5.1
	7 : 3	196	1	55	5.4
	8 : 2	170	15	62	5.0
	9 : 1	144	13	78	32.8
Temperature of pour solution(°C)	5	268	14	40	5.2
	25	144	13	78	32.8
	40	284	14	35	4.9

100 nm이하의 크기를 가진 입자의 양이 상대적으로 많은 것으로 나타났다. EUD의 농도를 2%로 하여 W/O 에멀전을 구성하는 오일과 옥용산의 비율이 E-SLN의 입경과 크기분포, 그리고 캡슐화 효율에 미치는 영향을 살펴보았을 때 오일의 비율이 높아질수록, 그리고 수용액의 비율이 낮아질수록 입자의 평균크기와 200 nm 이하의 입경을 가진 입자의 양이 늘어나는 것을 알 수 있었다. 그리고 이 때 캡슐화 효율은 증가하는 경향을 나타내었다. 2%의 EUD, 그리고 1:9의 w/o 비율에서 Pour solution의 온도에 따른 입경분포와 캡슐화 효율은 25°C에서 가장 양호한 것으로 나타났다. 결과적으로 옥용산을 포함한 E-SLN은 2%의 EUD, w/o 에멀전의 비율은 1:9, 그리고 실온인 25°C에서 가장 양호한 입경 분포와 캡슐화 효율을 가지는 것으로 관찰되었다.

**비타민C를 포함하는 E-SLN:** Table 4에 나타난 것과 같이 비타민 C를 포함하는 E-SLN의 경우, 평균 크기가 옥용산의 경우보다 작았으며 3%의 EUD에서는 81 nm로 관찰되었다. 그러나 캡슐화 효율은 2.0%의 EUD를 사용했을 때가 가장 높음을 알 수 있었다. 에멀전을 구성하는 w/o 비율이나 pour solution의 온도는 옥용산과 마찬가지로 1:9와 25°C에서 가장 적당한 것으로 관찰되었다.

#### **in vitro** 방출시험

**pH에 따른 방출경향** pH에 의존적인 EUD의 용해와 이에 따른 약물의 방출을 확인하기 위하여 각기 다른 pH의 버퍼

를 사용하여 37°C에서 용출시험을 행하였다. 시험에 사용된 버퍼는 pH 1.4, 5.5, 7.4로서 각각 위장, 피부, 혈장의 pH를 대별하며 방출 %는 약물의 방출이 완전히 끝났을 것으로 생각되는 60 시간에서의 약물의 방출량을 100%로 하여 계산하였다. 옥용산을 포함한 E-SLN의 경우, 피부의 pH인 pH 5.5에서 약물의 용출이 가장 잘 일어나는 것을 관찰할 수 있었고, 모든 방출은 10-12시간 사이에 종료되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 5). 비타민C를 포함하는 E-SLN에 대해서도 같은 실험을 하였고 그 결과를 Fig. 6에 나타내었다. 비타민C의 경우에서도 pH에 따라 다른 방출경향을 보이긴 하였지만 옥용산과 달리 pH 1.4에서 pH 5.5와 비슷하게 방출이 잘 일어나는 경향을 나타내었다. 이것은 내부에 포함되어 있는 수용성 약물의 pH가 EUD의 용해와 방출경향에 영향을 미치는 것으로 생각되지만 정확한 평가를 위해서는 내부에 포함되는 수용액의 pH와 E-SLN의 형성과의 관계를 살펴보는 연구가 필요할 것으로 여겨진다.

**온도에 따른 방출경향** Coconut oil의 녹는점이 23~28°C인 것을 고려하여 온도 의존적인 약물의 방출경향을 살펴보았다. 시험은 10, 20, 25, 37°C에서 실시하였고 그 결과를 Fig. 7과 Fig. 8에 나타내었다. 24시간까지의 방출경향을 살펴볼 때 옥용산을 포함하는 E-SLN은 10°C에서 최대 방출량이 20%를 넘지 않았으며 체온인 37°C에서 가장 약물방출이 잘 되었다. 반면 비타민C의 경우, 10°C에서도 55%의 높은 방출 경향을 보임으로서 약물의 방출이 옥용산의 경우와 비교하여

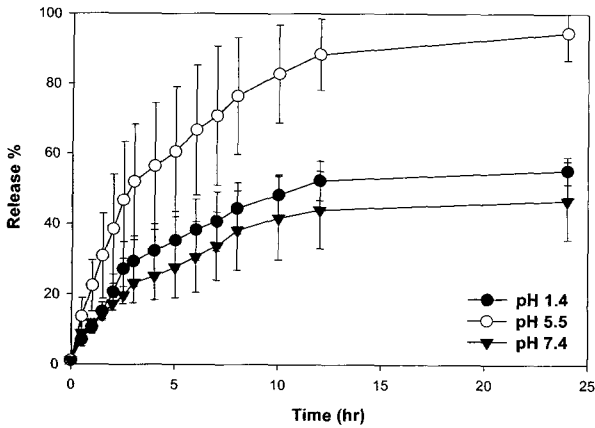


Figure 5. Release profiles of okyong-san entrapped in E-SLN with various pH.

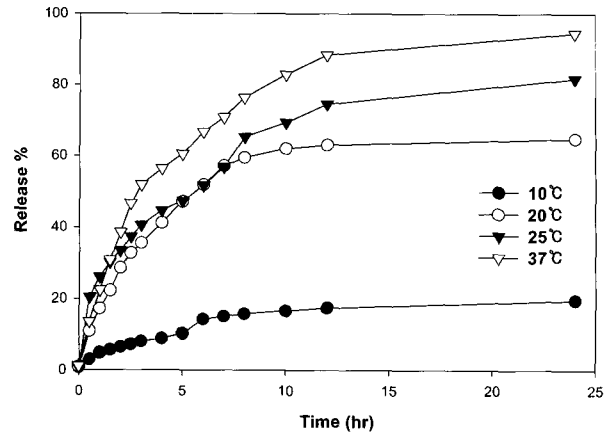


Figure 7. Release profiles of okyong-san entrapped in E-SLN with various temperature.

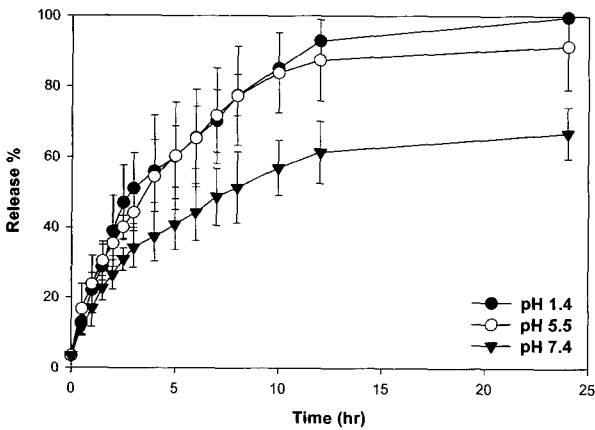


Figure 6. Release profiles of vitamin C entrapped in E-SLN with various pH.

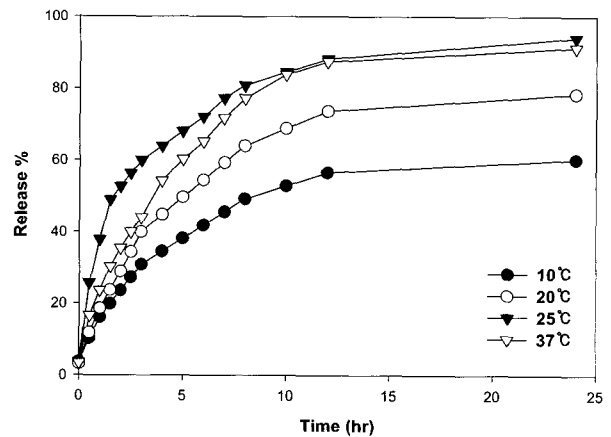


Figure 8. Release profiles of vitamin C entrapped in E-SLN with various temperature.

상대적으로 잘되는 것으로 나타났다. 이 결과는 약물의 캡슐화 효율과 용출시험에 사용된 초기 약물의 양과 상당한 관련이 있는 것으로 보여진다.

**침포시험에 의한 피부자극도**

30명의 자원자에 대해 피부자극도 판정을 위한 침포시험을 실시하였고 피험자 모두 5개의 시험군과 1개의 대조군을 정중선을 제외한 상등부에 폐쇄침포하였다. 시험 중 부작용을 나타내거나 거부 의사를 밝힌 자원자는 없었으며 48시간 후 침포를 제거하고 2시간이 지난 후 제거에 의한 일과성의 홍반의 소실을 기다려 관찰, 판정하였다. 판정결과, 30명 모두 A, B, C, D, E, F의 시험군과 대조군에서 음성(무반응 I)의 판정을 받았다.

**인공색소침착 후 시료 도포에 의한 미백효과**

사람의 팔 안쪽 피부위에 2주에 걸쳐 인공자의선을 조사한 후 1주일이 지난 그 익일부터 시료의 도포를 시작하였고 아무것도 바르지 않은 대조군 그리고 크림베이스와 크림베이스+시료를 도포한 시험군에서의 % whiteness 변화 양상을 측정

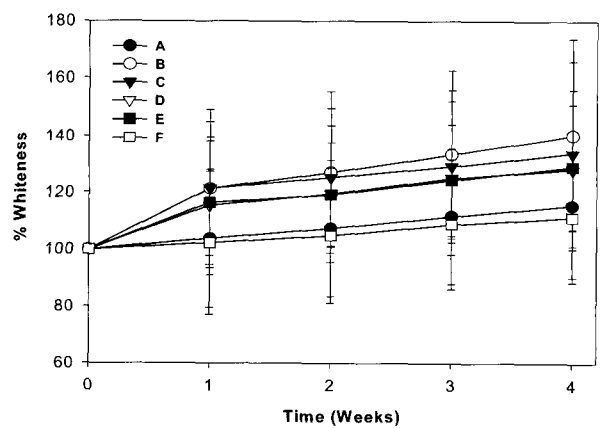


Figure 9. The profiles of % whiteness values in control and various sample applied region. A, B, C, D, E, and F corresponds to cream base, cream base + vitamin C entrapped SLN, cream base + vitamin C, cream base + okyong-san entrapped SLN, cream base + okyong-san and control.

하여 Fig. 9에 나타내었다. 시료 도포 후 1주부터 4주까지 대조군, A, D, E, C, B시료의 순으로 % whiteness가 증가하였으며, paired t-test 결과 통계적으로도 유의차 ( $P < 0.05$ )를 나타내었다. 이 결과는 시료가 첨가된 크림의 미백효능이 1주 후부터 나타남을 의미하는 것으로 볼 수 있다. 그림에서 시료를 첨가한 군 (A, B, C, D)과 첨가하지 않은 군 (E, F)의 % whiteness의 차이가 확실하게 드러나고 있으며 그 중 비타민C를 포함한 E-SLN이 가장 우수함을 알 수 있었다. 옥용산의 경우에는 단일 성분인 비타민C와 비교하여 낮은 미백효과가 나타났으나 비타민C가 단일 성분인 점을 고려하면 옥용산의 미백효과가 뛰어난 것을 알 수 있다. 또한 D시험군과 E에 있어서 주목할 만한 미백효과를 보이긴 하였지만 두 시험군 간의 차이는 매우 적었다. 확인 결과 E-SLN에 포함된 옥용산의 정량 시 적은 양의 EUD가 용해되어 옥용산의 양을 실제 양보다 크게 하였음을 관찰하였으며 이러한 결과로 같은 양의 옥용산이 포함된 시험군에서는 약물을 포함한 E-SLN의 미백효과가 뛰어난 것으로 판단된다. 더욱 유의한 차의 결과를 얻기 위해서는 시험 전 E-SLN에 포함된 약물을 더욱 정밀하게 정량하고 시험에 참여한 표본의 수를 늘리는 것이 필요할 것으로 사료된다.

## 요 약

복합한방 재료인 옥용산에 대해 UV 흡수능, tyrosinase 저해활성 그리고 free radical 소거활성을 측정함으로써 미백활성을 검증하고 비교 시험군으로서 비타민C와 함께 Eudragit 이 코팅된 coconut oil을 이용한 SLN을 제조할 수 있었다. 실험 결과, 옥용산은 UV 영역에서 흡수능을 가지며 tyrosinase 저해 활성과 free radical 소거활성을 가진 것으로 확인되었다. 제조된 E-SLN을 TEM을 이용하여 관찰한 결과 크기 50~300 nm인 구형의 양호한 입자를 형성하고 있음을 확인하였다. 또한 그 크기분포와 캡슐화 효율 분석을 통해 EUD의 농도가 2.0% (w/v), w/o 비율은 1 : 9, emulsion과 pour solution의 비율은 1 : 10, 그리고 실온에서 제조한 E-SLN의 캡슐화 효율이 가장 높고 크기의 분포가 가장 양호한 것을 알 수 있었다. E-SLN을 이용하여 *in vitro* 방출시험을 실시한 결과 E-SLN은 pH와 온도 의존적으로 약물을 방출하는 경향을 나타냈다. 결과적으로 제조된 E-SLN은 pH와 온도 의존적으로 약물을 전달할 필요가 있는 계에 대한 약물 전달 시스템으로 적합할 것으로 보인다. 폐쇄 첩포시험과 자외선 조사에 의한 인공색소침착과 시료도포에 의한 미백효과 판정에 의한 임상시험 결과 옥용산과 비타민C, 그리고 이를 포함하는 E-SLN은 대조군의 경우와 비교하여 미백효과를 가지는 것으로 확인되었으며 이는 기능성화장품에의 응용 가능성을 높여주었다.

## 감 사

본 연구는 2003년도 중소기업기술혁신개발사업 연구비 지원에 의하여 연구되었기에 연구비 지원에 감사드립니다.

## REFERENCES

- Rita, C., E. Elisabetta, L. Giovanni, and N. Claudio (2001), Production of lipospheres as carriers for bioactive compounds, *Biomaterials* **23**, 2283-2294.
- Müller, R. H., M. Radtke, and S. A. Wissing (2002), Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations, *Adv. Drug Delivery Rev.* **54** Suppl. 1 : S131-S155.
- Kim, B. D. (2002), Preparation and Characterization of Solid Lipid Nanoparticle (SLN) made from Coconut Butter Stabilized Curdlan, M. S. Thesis, Dept. of Pharmacy, Chosun University, Kwangju.
- Leiv, O., P. Erik, I. V. Dag, and W. O. Stig (2001), The regulatory basis of melanogenic switching, *J. Theor. Biol.* **215**, 449-468.
- Son, D. S. (2002), Dipigmentation Activity of *Kakamseosikyong-san*, M. S. Thesis, Dept. of Oriental Medicine, Kyung Hee University, Seoul.
- Park, S. N., J. A. Koh, and Y. J. Park (2001), Application of Plant Extracts for Whitening Cosmetics (Cosmeceuticals), M. S. Thesis, Seoul National University, Seoul.
- Park, J. S., W. Y. Nam, Y. J. Moon, K. H. Kim, B. H. Jeon, and W. H. Woo (2000), Effect of Seosikyongsan on the melanogenesis of B16 melanoma cell line, *Kor. J. Orient. Med. Pathol.* **14**, 160-170.
- Heo, J. (1999), Dongeuibogam, p516, Bupinmunwhasa, Korea.
- Moon, S. M. (1988), Chemical product dictionary, pp 1810-1811. Korea Institute of Dictionary Research, Korea.
- Lee, J. H., T. G. Park, and H. K. Choi (1999), Effect of formulation and processing variables on the characteristics of microspheres for water-soluble drugs prepared by w/o/o double emulsion solvent diffusion method, *Intern. J. Pharm.* **196**, 75-83.
- Mayorga, F. P. and G. Couaraze (1996), Formulation study of a transdermal delivery system of primaquine, *Inter. J. Pharm.* **132**, 71-79.
- Sanjay K. J., P. V. Suresh, and V. K. Dixit (1990), Effective and controlled transdermal delivery of ephedrine, *J. Controlled Release* **12**, 257-263.
- Dubey, B. K., O. P. Katore, S. Ranjit, and K. J. Sanjay (1995), Lyophilized aqueous based polymer matrices for transdermal delivery of captopril, *J. Dermatol. Sci.* **10**, 191-195.
- Müller, R. H., M. Radtke, and S. S. Wissing (2002), Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations, *Adv Drug Delivery Rev.* **54** Suppl. 1 : S131-s155.
- Kim, B. G. and H. J. Park (2002), Trend and view of nano technology, *Food Sci. Ind.* **35**, 4-9.
- Heike W., K. H. Kowtka, C. M. Lehr, and U. F. Schaefer (2001), pH profiles in human skin : influence of two *in vitro* test systems for drug delivery testing, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **55**, 57-65.
- Shrishailappa B., K. G. Mahesh, and B. Suresh (2002), Antioxidant activity of the ethanolic extract of *Striga orobanchioides*, *J. Ethnopharmacol.* **85**, 227-230.
- Huailiang, W., R. Chandrasekharan, U. B. Anna, K. Kristen, S. Rong, D. W. Norman, and J. R. Blake (2000), Topical transfection using plasmid DNA in a water-in-oil nanoemulsion, *Int. J. Pharm.* **221**, 23-34.
- Alf, L., Y. Hiromitsu, T. Hirofumi, and K. Yoshiaki (2003), Microsphere design for the colonic delivery of 5-fluorouracil, *J. Controlled Release* (In Press).
- Mark W. G., B. Davey, and V. M., Marc (1996), Analysis of ascorbate in plant tissues by high-performance capillary zone electrophoresis, *Anal. Biochem.* **239**, 8-9.



21. Lee, Y. S. (1970), Studies on side effects of various soaps, cosmetics, and topical medicaments; I. Patch tests with some materials, *Kor. J. Dermatol.* **8**, 17-21.
22. Kim, J. A. (1990), A study on analysis of patch test positive reactivity according to the reading time, *Kor. J. Dermatol.* **28**, 288-294.
23. Szentmihályi, K. E., Forgács, M. Hajdú, and M. Then (2001), In vitro study on the transfer of volatile oil components, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **24**, 1073-1080.