

치자엑스 가수분해물 제제의 피부투과 및 생체 피부조직과의 교차결합에 관한 연구

양재현[†] · 이남희

우석대학교 약학과

(2004년 11월 18일 접수 · 2004년 12월 18일 승인)

Skin Permeation and Crosslinking with Biological Tissue of the Hydrolyzed Products of Gardeniae Fructus Extract

Jae-Heon Yang[†] and Nam-Hee Lee

College of Pharmacy, Woosuk University, Wanju 490, Korea

(Received November 18, 2004 · Accepted December 18, 2004)

ABSTRACT—Gardeniae Fructus is consisted of geniposide and its derivatives. For the purpose of treatment of skin disease, geniposide and hydrolyzed products (HP) of Gardeniae Fructus were studied on skin permeation and crosslinking with biological tissue. The hydrolyzed products (HP) and active ingredients of Gardeniae Fructus were identified and investigated about skin permeability. Genipin has provided low cytotoxic crosslinking reagents and formed stable and biocompatible crosslinked products. The permeation enhancing effects of geniposide and genipin under the hydrolyzed products of cream and hydrogel preparations were tested using Franz type diffusion cell and the skin of hairless mouse. The remaining proportions of geniposide and genipin were measured in the hydrolyzed products of cream and hydrogel preparations. The crosslinking of epidermic and endodermic tissue with genipin under the hydrolyzed products of cream and hydrogel preparation was observed using light microscopy. Increased absorption ratio of the skin of hairless mouse about genipin was higher than that of geniposide. Loads at break, tensile strengths and skin permeation rate of the hydrolyzed products (HP) of cream and hydrogel preparations were higher than the nonhydrolyzed products (NHP). The hydrolyzed products (HP) of cream and hydrogel of Gardeniae Fructus Extracts were proper preparations and crosslinking agents to increase the transdermal absorption with epidermic and endodermic tissue.

Key words—Geniposide, Genipin, Skin permeation, Crosslinking

치자(Gardeniae Fructus)는 담즙분비와 배설을 촉진하고 발열증추를 억제하여 해열작용을 나타내며, 진정작용이 있어서 정신흥분으로 인한 불면이나 심계항진 등의 증상을 완화시키므로 내복용으로 투여될 뿐 아니라 소염작용을 나타내므로 피부의용제로도 사용되어 왔다.^{1,2)} 주성분으로는 색소 성분인 crocin을 비롯하여 geniposide, gardenoside, genipiodisic acid, shanzhiside 등을 함유하고 있다. 치자에 관한 연구로는 Paik 등³⁾의 치자성분에 대한 안정성연구, Han 등⁴⁾의 치자 항산화 활성성분에 대한 연구, Liu⁵⁾ 및 Oshima⁶⁾ 등의 액체크로마토그래피에 의한 치자 주성분의 분리, 정량 등이 보고되어 있다. Akao⁷⁾ 등은 치자의 주성분인 geniposide는 장내 세균의 작용으로 genipin으로 변환되며, 이 과정에서 당이 탈락하게 되어 지용성이 증가하게 된다고 보고하였다. 치자의 genipin은 천연 crosslinking agent로 Mi,⁸⁾ Chang⁹⁾

및 Tsai¹⁰⁾ 등은 natural crosslinking agent와 genipin의 결합을 이용하여 생체 조직의 고정에 응용하였다. 또한 Lynn¹¹⁾ 등은 geniposide의 가수분해물인 genipin의 생체 조직 적합성을 연구하여 보고 하였으며, Sung^{12,13)} 등은 genipin을 돼지 심장의 이식실험에 응용하였다.

경피 치료 시스템은 심혈관계 약물, 항히스타민제 뿐 아니라 소염진통제에서 다양한 연구가 진행되고 있다. 피부는 신체에서 가장 넓은 부위로 많은 모세혈관이 피하조직 및 진피 중에 포함되어 있으므로, 체내 혈류량의 약 1/3이 통과하고 있다. 피부를 통한 약물의 흡수는 피부의 부위, 약물의 종류, 투여방법, 실험방법 등에 따라 영향을 받으며 동물의 종에 따라 다양하다. 피부를 통한 흡수 과정에서 지용성이 큰 약물들은 지질을 통하여 흡수되며 일부 수용성 약물은 피부 부속기관을 통한 흡수 경로를 통한다. 피부 부속기관을 통한 투과는 각질을 통한 경로에 비하여 매우 빠르게 일어나지만 전체 약물의 흡수에 대한 영향은 매우 적은 것으로 알려지고 있다.

[†]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
Tel : 063)290-1570, E-mail : jhyang@woosuk.ac.kr

이에 저자는 치자엑스 주성분 중 가장 많이 함유된 geniposide를 β -glucosidase를 사용하여 genipin으로 전환시켜 지용성을 증가시킴으로서 피부투과를 촉진하고 이를 통하여 항염효과를 증가시킬 뿐 아니라 genipin의 생체피부조직과의 교차결합현상을 관찰하기 위하여 치자엑스 및 그 가수분해물을 크림 및 겔제제로 제조한 다음 점도측정시험, 표면장력 시험, 인장강도측정시험, 피부투과 및 잔류량 측정시험, 피부조직에 대한 현미경 관찰 등을 통하여 효과적인 경피흡수제제를 개발하고자 하였다.

실험 방법

시약

치자 (Gardeniae Fructus)는 익산 보화당 약국에서 구입, 음건하여 사용하였고 geniposide, genipine 및 β -glucosidase (Sigma Chem. Co., U.S.A)는 표준품을 사용하였고, Carbomer 940[®]은 BASF(Deutschland)에서, Labrasol[®]은 Gattefosse Co. (France)에서 구입하여 사용하였으며, 기타 시약은 특급 및 일급 시약을 사용하였다.

실험 동물

무모마우스 (웅성, 20 ± 2 g, Charles River Lab., USA)를 분양받아 사용하였다.

치자 경피흡수 제제의 제조

Yang 등¹⁴⁾의 처방을 응용하여 크림 및 히드로겔을 제조하였는데, 먼저 치자 100 g을 조질로 하여 증류수 1000 mL를 넣고 수욕 상에서 2시간 가열한 후 여과하고 추출액을 감압 농축하여 엑스로 한 후 동결건조 분말로 사용하였다(수율 14.2%). 치자 크림의 제조는 stearyl alcohol 및 white vaselin을 75°C로 가온하고, 따로 tween 80, propylene glycol 및 정제수용액을 75°C로 가온 한 다음 교반하면서 혼합하고 치자엑스분말을 가하여 균질하게 혼합하여 제조하였다. 치자 가수분해물 크림(HP)의 제조는 먼저 치자엑스 분말과 β -glucosidase를 50°C에서 2시간 반응시킨 다음 크림 기제에 가하여 교반하면서 실온까지 냉각하였다. 치자 히드로 겔의 제조는 증류수에 carbomer 940을 넣어 팽윤시키고, 따로 labrasol 및 propylene glycol 혼합용액을 carbomer 940 용액에 가한 후 gel의 pH가 7.0이 되도록 triethanolamine을 가한 다음 치자엑스분말을 소량씩 교반하면서 가해주었다. 치자 가수분해물 히드로겔(HP)의 제조는 먼저 치자엑스 분말과 β -glucosidase를 50°C에서 2시간 반응시킨 다음 히드로 겔 기제에 교반하면서 가해주었다(Table I).

Table I-Formulas of Cream & Hydrogel Preparations

Preparation	Cream	Cream(HP)	Gel	Gel(HP)
GFEP*	1.0	1.0	1.0	1.0
Stearyl alcohol	30	30	-	-
White vaselin	15	15	-	-
Tween 80	3.5	3.5	-	-
Propylene glycol	10	10	20	20
Carbomer 940	-	-	1.0	1.0
Labrasol	-	-	10	10
Triethanolamine	-	-	1.5	1.5
Distilled Water	q.s	q.s	q.s	q.s
β -glucosidase	-	370 unit	-	370 unit
Total	100 g	100 g	100 g	100 g

*GFEP : Gardeniae fructus extract powder

주성분의 확인 및 정량

치자엑스 분말로 제조한 크림 및 히드로겔 제 중 함유되어 있는 geniposide와 그 가수분해물인 genipin의 확인 및 정량을 위하여 Lee 등²⁾의 방법을 응용하였다. 각 제제 1 g을 water 100 ml에 녹인 후 20 μ l씩 HPLC(M920, Youngin Co., Korea)에 주입하였다. 칼럼은 μ -Bondapak C₁₈(3.9 \times 300 mm)을 사용하였고, 이동상으로는 acetonitrile : water (15 : 85 v/v%)의 혼합액을 사용하였다. 검출기는 UV detector로, 파장은 240 nm, 유속은 1.2 mL/min이었고 얻어진 chromatogram의 면적을 측정하여 계산하였다.

점도측정시험

크림 및 히드로겔 제제의 연고용 tube 충전성 및 보관성을 관찰하기 위하여 Suh 등¹⁵⁾의 방법을 응용하여 실험하였으며 기기로는 Brook-Field Viscometer(Spindle No. RV5, Brook Lab. Inc., USA)를 사용하여 50, 37 및 20°C에서 점도를 측정하였다.

표면장력시험

크림 및 히드로겔 제의 표면장력을 비교하기 위하여 Ha 등¹⁶⁾의 방법을 응용하여 실험하였으며 기기로는 surface tensiometer(Model 3010, Yoshida, Co., Japan)를 사용하여 실험하였다. 시료 측정값의 평균(X)을 식(1)에 대입하여 측정장치의 한계계수(Y)를 구하였고, 다시 식(2)을 통하여 표면장력값을 산출하였다.

$$Y = 72.75/X \quad (1)$$

$$\text{표면장력값(dyne/cm)} = X \cdot Y \quad (2)$$

X = 읽은 눈금의 평균값

Y = 한계계수

인장강도 시험

크림 및 히드로겔 제의 인장강도 측정은 Park 등¹⁷⁾의 방법을 응용하여 실험하였으며, 기기로는 Instron material testing machine(Canton, Massachusetts, USA)을 사용하였는데 치자 크림 및 히드로겔을 무모마우스 등피부에 도포한 다음 7시간 후에 제제도포 부위의 표피를 넓이(W) 5 cm, 두께(D) 0.23 cm로 절개한 후 실온에서 10 mm/min의 속도를 이용하여 측정하는 다음 다음 식에 의하여 인장강도(MPa)를 산출하였다.

$$\sigma = F/A_0$$

F; 단위면적에 작용하는 힘(Load at break)

A₀; 단위면적(W X D)

피부투과 실험

Yang 등¹⁴⁾의 피부투과 실험방법에 따라, 기기로는 Skin permeation tester(FCDV-15, Lab. Fine, Korea)를 사용하였으며 치자 크림(이하 GFE 크림) 및 히드로겔 제제를 각각 1.0 g을 취하여 무모마우스 피부에 도포한 후 피부투과율을 geniposide와 genipin의 양으로 측정하였다. Geniposide 및 genipin의 피부투과량을 관찰하기 위하여 Franz modified diffusion cell (면적 : 1.77 cm², 유효용량 : 11.5 mL)을 이용하였다. 무모마우스 피부는 복부를 절개하고 피하지방 및 모세혈관을 조심스럽게 제거한 후 사용하였다. 시험액은 pH 7.4 완충용액을 사용하였다. Franz modified diffusion cell에 무모마우스 피부를 장착하고 GFE 크림 및 히드로겔 제제를 도포한 후 채취시간마다 medium 100 μL씩을 채취하고 새로운 시험액을 동량 보충하였다. 시험액은 37 ± 0.2°C를 유지하도록 하였으며 cell 내의 교반속도는 600 rpm으로 고정하였다.

피부의 단위 면적당 통과한 주성분의 양을 시간에 대한 함수로 나타낸 후 다음의 식을 이용하여 투과 파라미터들을 구하였다.

$$J_s = \frac{1}{A} \left(\frac{dQ}{dt} \right)_{ss} = \frac{DKC}{h}$$

$$D = \frac{h^2}{6T_L}$$

J_s : 평형 상태에서의 투과 속도 (μg/cm²/hr)

A : 투과가 일어나는 피부의 면적 (cm²)

(dQ/dt)_{ss} : 평형 상태에서의 단위 시간당 피부를 통과하는 약물의 양 (μg/hr)

C : 제제중의 약물 농도 (μg/mL)

K : 약물의 분배계수 (피부/기제)

h : 피부의 두께 (cm)

D : 피부를 통한 약물의 확산 계수 (cm²/hr)

T_L : lag time (hr)

피부 잔류량 실험

피부잔류량 실험은 Lee 등²⁾의 방법에 따라 측정 하였는데, 먼저 피부투과실험 직후에 피부상에 잔류되어 있는 크림 및 히드로겔을 제거하고 생리식염수를 사용하여 피부를 충분히 씻어 낸 후 크림 및 히드로겔을 직접 바른 부분의 피부만을 절제하고 -66°C 냉동건조기에 보관 한 다음 해동시켜 무게를 잰 뒤 tris buffer 1 mL을 가하고, homogenizer를 사용하여 균질화 하고, 균질액에 t-butyl ethyl ether 5 mL를 가하여 원심분리 시킨 후 상정액 1 mL를 취하고 50°C에서 증발 건조시킨 후 용제에 녹여 HPLC에 주입한 다음 피크 면적의 양으로써 잔류량을 산출하였다.

피부조직의 광학 현미경적 관찰

피부의 조직학적 구조를 광학 현미경적으로 관찰하기 위하여 Lynn¹¹⁾등의 방법을 응용하였는데 먼저 각각의 실험군의 피부를 7×5 mm로 절취하여 4% paraformaldehyde에 24시간 고정하였다. 4°C, 2% DMSO에서 12시간 담그고 70%와 90% acetone에서 각각 30분간 그리고 100% acetone에서 1시간 탈수하였다. JB-4용액에서 하룻밤 방치시킨 뒤 JB-4와 축매제를 섞은 용액으로 mold tray에 조직을 넣고 embedding(포매)하였다. 조직이 완전히 경화한 후에 supercut (Leica RM2165, Germany)으로 2 μm의 두께의 절편을 제작하여 hematoxylin & eosin(H & E)방법에 의하여 염색하였다. H&E 염색은 핵염색을 위하여 hematoxylin용액에 3분동안 염색을 시행하였고 acetic alcohol로 지나치게 염색된 부위의 염색액을 제거한 후 ammonia water로 핵을 파랗게 한 후 10분간 수세하였다. 또한 세포질염색을 위하여 eosin용액에서 2분간 염색하고 80% alcohol에서 10초간 지나치게 염색된 염색액을 제거하고 실온에서 건조시킨 후 xylene에서 투명화를 시키고 canada balsam으로 표본을 덮어 영구표본을 제작한 후에 광학현미경(Olympus BX50, Olympus Optical Co., Japan)으로 관찰하였다.

결과 및 고찰

치자 경피흡수 제제의 제조

Yang 등¹⁴⁾의 방법에 따라, 치자 크림의 제조는 친수연고 기제를 응용하여 조제하였는데 유화제로는 polysorbate 80을

사용하였고, 유상과 수상을 75°C에서 반응시킨 다음, 치자엑스 분말을 가하고, 교반하면서 실온까지 서서히 냉각시켰다. 치자 가수분해물 크림의 제조는 치자엑스 분말에 β-glucosidase를 가하여 50°C에서 반응시킴으로서 주성분인 geniposide의 일부를 genipin으로 가수분해 시킨 다음 크림 기제에 가해주었다. 치자 히드로겔 제조는 히드로겔화제로 carbomer 940을 사용하였는데 pH 3.0으로 점성이 낮았으나, triethanolamine을 가하여 pH 7.0으로 조정한 결과 높은 점도를 유지하였다. 치자가수분해 히드로겔의 제조는 역시 치자엑스분말에 β-glucosidase를 가하여 주성분을 가수분해 시킨 다음 히드로겔 기제에 가해 주었다.

주성분의 함량

Lee 등²⁾의 방법에 따라 실험하였을 때, 치자 주성분인 geniposide와 그 가수분해물 genipin 표준품을 50% 에탄올 용액에 녹여 HPLC에 주입하였을 때 8.7분에서 geniposide peak가 나타났고, 14.1분에 genipin의 peak가 나타났다. Geni-

poside의 피크 면적으로 작성된 검량선의 회귀 직선식은 (Y = 19627.77x - 6132.92)였고, 직선성을 검정한 결과 그 상관관계수가 r²=0.9998로써 1.0에 접근하여 200 μg/mL 이하의 농도에서는 geniposide의 농도와 피크 면적비간에 직선성이 인정되었으며, genipin의 회귀 방정식은 (y = 26466.74x - 4758.61)였고 직선성은 상관관계수 r²=0.9998로써 1.0에 접근하여 200 μg/mL 이하의 농도에서 genipin의 양과 피크 면적비 간에 직선성이 인정되었다.

치자엑스 1%를 함유한 크림제에서는 geniposide peak만 검출되었고, genipin의 peak는 나타나지 않았으나, 치자 가수분해물에서는 geniposide의 peak가 줄어들고 genipin의 peak가 14.1분에 나타났다. 치자엑스를 함유한 히드로겔 및 히드로겔의 가수분해물 제제에서도 동일한 양상을 보여주었다 (Figure 1). 크림 중의 geniposide 함유량은 0.31%이었고, 크림(HP)의 geniposide 함유량은 0.12%인 반면, genipin의 함유량은 0.17%이었다. 한편 히드로겔 중의 geniposide 함유량은 0.34%이었고 히드로겔(HP)의 geniposide 함유량은 0.11%인 반면 genipin의 함유량은 0.13%로 나타났다(Table II).

점도

Suh 등¹⁵⁾의 방법에 따라 실험하였을 때, 제제중의 온도별 점도 측정결과를 비교해보면, 크림제에서는 50°C에서 4,560 cps에 불과하였으나, 37°C에서는 24,480 cps로 올라갔고, 20°C에서는 44,800 cps를 나타내었다. 크림(HP)에서는 37°C에서는 35,800 cps, 20°C에서는 56,000 cps로서 크림에 비하여 11,000 cps정도 높은 수치를 나타내었다. 한편 히드로겔에서는 50°C에서 17,040 cps, 37°C에서 34,000 cps, 20°C에서 51,000 cps로 크림 보다 더 높게 나타난 반면, 히드로겔(HP)에서는 히드로겔 제제보다 37, 50°C에서 9,000 cps정도 낮아지는 양상을 보여주었다(Table III). 체온에서 각 제제의 점도는 24,000 - 35,000 cps정도의 수치를 나타내어 연고용 tube 에 충전하여 보관하기에 적합하였다.

표면장력

Ha 등¹⁶⁾의 방법에 따라 실험하였을 때, 제제중의 표면장

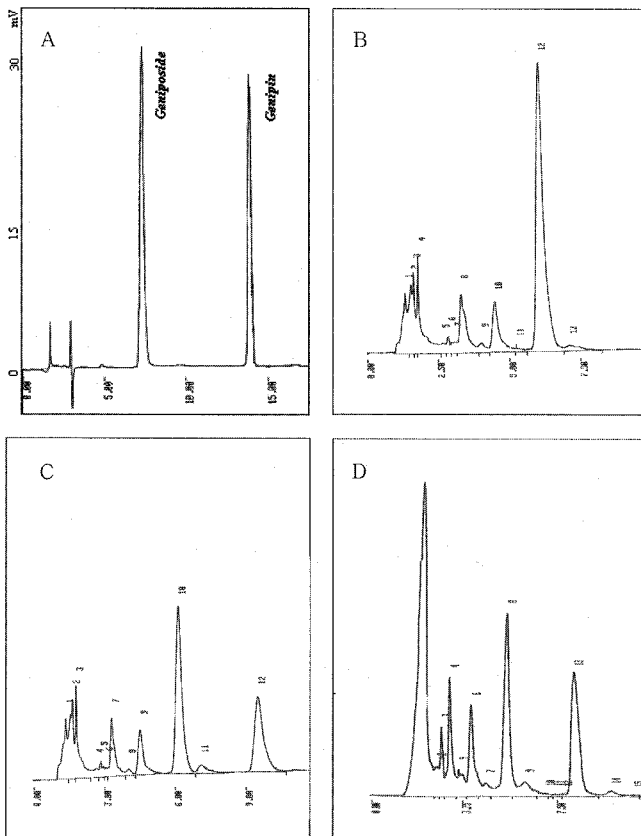


Figure 1—HPLC chromatogram of cream and gel preparation of gardeniae fructus extract. A : Geniposide & Genipin standard, B : Cream, C : Cream(HP), D : Gel(HP)

Table II—Comparison of Contents(%) of Geniposide and Genipin in Cream and Gel Preparations

	Geniposide	Genipin
Cream	0.31±0.028	0.03±0.002
Cream(HP)	0.12±0.011	0.17±0.014
Gel	0.34±0.032	0.02±0.002
Gel(HP)	0.11±0.009	0.13±0.007

Each data represents the mean±SD from 5 experiments.

Table III—Comparison of Viscosity of GFE Cream and Gel Preparations Under Various Temperature

	Viscosity (cps)		
	50°C	37°C	20°C
Cream	4,560±358	24,480±2,480	44,800±3,240
Cream(HP)	6,440±560	35,800±700	56,000±3,800
Gel	17,040±1,040	34,000±1,500	51,000±3,580
Gel(HP)	13,600±1,400	25,400±2,200	42,600±3,460

Each data represents the mean±SD from 5 experiments.

Table IV—Comparison of Surface Tension of GFE Cream and Gel Preparations Under Various Temperature

	Surface Tension (dyne/cm)	
	20°C	37°C
Cream	130.60±1.96	40.26±0.96
Cream(HP)	80.14±1.98	36.88±1.56
Gel	78.06±2.68	37.62±1.56
Gel(HP)	71.46±1.76	42.90±1.77

Each data represents the mean±SD from 5 experiments.

력을 비교해보면 20°C에서 크림의 표면장력은 130.60±1.96 dyne/cm이었으나, 크림(HP)은 80.14±1.98 dyne/cm로 떨어졌고, 히드로겔의 경우 78.06±2.68 dyne/cm이었으나, 히드로겔(HP)에서는 71.46±1.76 dyne/cm으로 약간 감소하였고, 37°C에서는 각 제제에서 36–42 dyne/cm로서 커다란 변화를 보여주지는 못하였다(Table IV). 따라서 체온에서 크림 및 히드로겔 제제를 도포할 경우 비교적 원활하게 약물을 도포할 수 있을 것으로 생각된다.

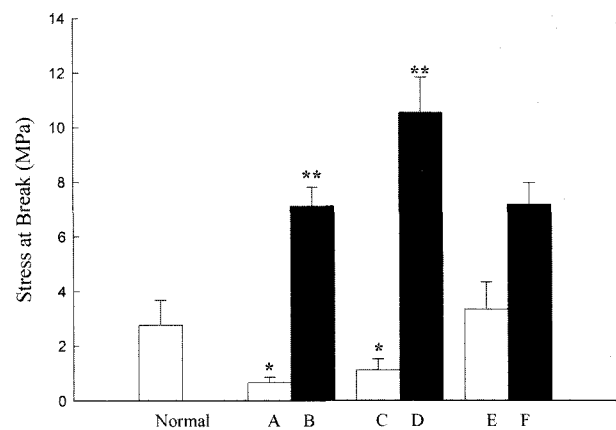
인장강도

Park 등¹⁷⁾의 방법에 따라 실험하였을 때, 크림 및 히드로겔 제제를 무모마우스에 도포한 후 그 피부의 인장강도를 비교해 보면 대조군의 인장강도 2.77±0.9 Mpa이었는데, 크림은 0.66±0.2 Mpa로 떨어졌고, 크림(HP)는 7.12±0.7 Mpa로 10배정도 높아졌고, 대조군에 비해서는 2.5배 정도 높아졌다. 히드로겔에서는 1.12±0.4 Mpa인데 비하여 히드로겔(HP)에서는 10.54±1.3 Mpa로 9배 정도 높은 수치를 나타내었고, 대조군에 비해서는 4배 정도 높아졌다(Tabel V, Figure 2). 한편 크림(GP)에서는 3.34±0.1 Mpa로 나타났으나, 히드로겔(GP)에서는 7.18±0.8 Mpa로 2배 정도 높은 수치를 보여주었다. 크림(HP) 및 히드로겔(HP)가 크림, 히드로겔 및 대조군보다 훨씬 높은 인장강도를 나타낸 것은 가수분해물 제제중에 생성된 genipin이 표피 및 진피층과 교차결합을 이루고 있는 것으로 사료된다.

Table V—Load at Break and Tensile Strengths of Hairless Mouse Skin After Treated with GF Cream & Gels

	Load at Break (N)	Stress at Break (MPa)
Normal	12.75±1.2	2.77±0.9
Cream	0.74±0.3	0.66±0.2
Cream(HP)	8.01±1.1	7.12±0.7
Gel	1.26±0.2	1.12±0.4
Gel(HP)	11.85±1.8	10.54±1.3
Cream(GP)	3.76±0.6	3.34±1.0
Gel(GP)	8.08±1.2	7.18±0.8

Each data represents the mean±SD from 5 experiments.

**Figure 2**—Comparison of tensile strengths(MPa) of the epidermal tissue of each preparation.

Key : A; Cream, B; Cream(HP) C; Gel, D; Gel(HP), E; Cream(GP), F; Gel(GP)

*Significantly different from normal (P<0.05)

**Significantly different from Cream and Gel (P<0.01)

Each data represents the mean±SD from 5 experiments.

피부투과

Yang 등¹⁴⁾의 방법에 따라 실험하였을 때, GFEP 크림 및 히드로겔 제제를 Franz modified diffusion cell에 장착된 무모마우스 피부에 도포한 후 시간별로 투과된 양을 측정된 결과 크림에서는 geniposide 양이 비교적 완만하게 투과되었으며, 7시간 후에 29.15±1.18 µg/cm²이 투과되었으며, 미량이 가수분해 되어 5.01±0.29 µg/cm²의 genipin 양이 검출되었다(Figure 3). 한편 크림(HP)에서는 geniposide의 흡수가 크림에서와 같이 완만하게 이루어져서 7시간 후에 21.33±0.59 µg/cm²이 투과되었으나, 가수분해 된 genipin의 양은 비교적 빠르게 투과되어 3시간 후에 23.59±0.78 µg/cm²가 투과되었고, 7시간 후에는 38.58±0.76 µg/cm²가 투과되어 geniposide 투과량보다 훨씬 많은 양이 투과되었다(Figure 4). 히드로겔 제제에서는 geniposide가 2시간 후까지 8.43±

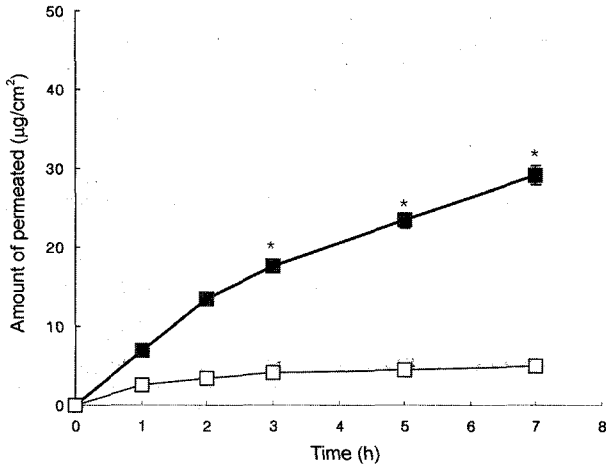


Figure 3—Amount of permeated Geniposide and Genipin in GFE Cream after 7 hours.
 Keys: -■- : Geniposide, -□- : Genipin
 *Significantly different from genipin group (P<0.05)
 Each data represents the mean±SD from 5 experiments.

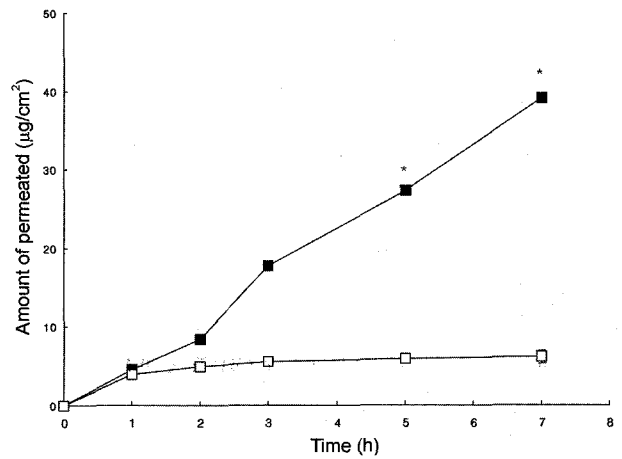


Figure 5—Amount of permeated Geniposide and Genipin in GFE Gel after 7 hours.
 Keys: -■- : Geniposide, -□- : Genipin
 *Significantly different from genipin group (P<0.05)
 Each data represents the mean±SD from 5 experiments.

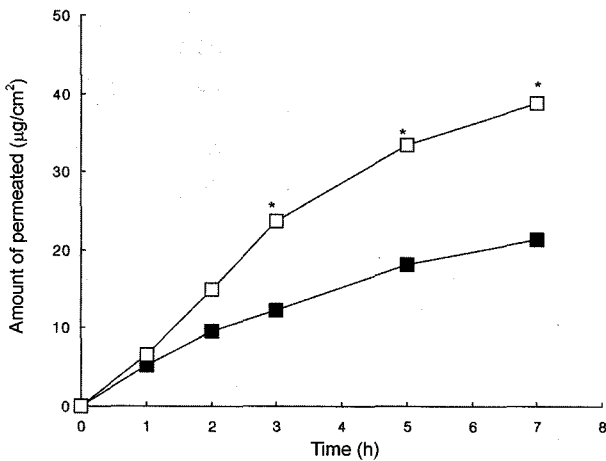


Figure 4—Amount of permeated Geniposide and Genipin in GFE Cream(HP) after 7 hours.
 Keys: -■- : Geniposide, -□- : Genipin
 *Significantly different from geniposide group (P<0.05)
 Each data represents the mean±SD from 5 experiments.

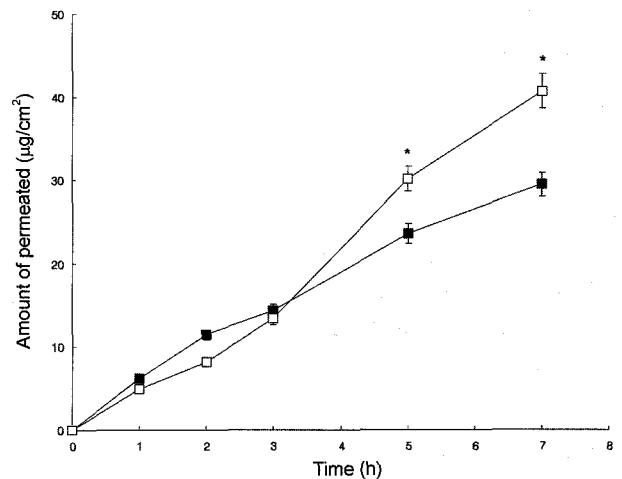


Figure 6—Amount of permeated Geniposide and Genipin in GFE Gel(HP) after 7 hours.
 Keys: -■- : Geniposide, -□- : Genipin
 *Significantly different from geniposide group (P<0.05)
 Each data represents the mean±SD from 5 experiments.

0.33 µg/cm²으로 완만하게 투과되었으나 3시간 이후부터는 빠르게 투과되어 7시간 후에는 39.04 ± 0.54 µg/cm²이 투과되었고, 크림 제제와 마찬가지로 7시간 후에 가수분해물이 6.20 ± 0.24 µg/cm²로 소량 검출되었다(Figure 5). 한편 히드로겔(HP)에서는 3시간 후까지 geniposide 양은 14.36 ± 1.02 µg/cm², genipin 양은 13.34 ± 0.39 µg/cm²로 완만하게 투과되었으나, 7시간 후에는 geniposide 투과량이 29.47 ± 0.70 µg/cm²인 반면 genipin은 40.71 ± 0.81 µg/cm²로 훨씬 높은 수치를 나타내었다(Figure 6).

크림 제제와 히드로겔 제제의 geniposide 투과량을 비교

해 보면 크림 제제가 7시간 후에 29.15 ± 1.18 µg/cm²이 투과된 반면 히드로겔 제제에서는 39.05 ± 0.54 µg/cm²이 투과되어 히드로겔 제제가 크림제제에 비하여 훨씬 높은 양이 투과된 것을 알 수 있었다. 크림(HP)와 히드로겔(HP)제제의 geniposide 투과량을 비교해 보면 크림제에서 7시간 후에 21.34 ± 0.59 µg/cm²인데 비하여 히드로겔(HP)에서는 29.47 ± 0.70 µg/cm²으로 훨씬 높은 수치가 투과되었다(Table VI). Genipin의 투과량은 크림(HP)에서 38.58 ± 0.76 µg/cm², 히드로겔(HP)에서는 40.71 ± 0.81 µg/cm²로서 히드로겔(HP)가 약간 높은 투과량을 나타내었고 또한 크림(gP)와 히드로겔(gP)

Table VI—Permeation Parameters of GF Cream and Gels through Excised Hairless Mouse Skin

Sample	Parameters			
	Preparation	Cumulative amount for 7 hr ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	J_s ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)	T_L (h)
Cream	Geniposide	29.15 ± 1.18	4.16 ± 0.17	0.14 ± 0.034
	Genipin	5.01 ± 0.30	0.72 ± 0.04	0.04 ± 0.01
Cream (HP)	Geniposide	21.34 ± 0.59	3.05 ± 0.09	0.10 ± 0.018
	Genipin	38.58 ± 0.76	5.51 ± 0.11	0.32 ± 0.028
Gel	Geniposide	39.05 ± 0.54	5.58 ± 0.08	0.19 ± 0.016
	Genipin	6.20 ± 0.24	0.89 ± 0.04	10.05 ± 0.0
Gel (HP)	Geniposide	29.47 ± 0.70	4.21 ± 0.10	0.14 ± 0.02
	Genipin	40.71 ± 0.81	5.82 ± 0.12	0.34 ± 0.03

Each data represents the mean \pm SD from 5 experiments.

의 genipin 투과량을 비교해보면 크림에서 $5.01 \pm 0.30 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 이었고, 히드로겔에서 $6.20 \pm 0.24 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 으로 히드로겔이 약간 높은 것으로 나타나, 가수분해물 제제와 동일한 양상을 보여 주었다(Table VI).

크림 및 히드로겔 제제에서 평형상태에서의 lag time을 비교해 보면 크림 제에서 geniposide 0.14 ± 0.034 시간, genipin 0.04 ± 0.034 시간인데 비하여 히드로겔에서는 geniposide 0.19 ± 0.016 시간, genipin 0.05 ± 0.01 시간으로 히드로겔 제제에서 geniposide 및 genipin 모두 더 높은 수치를 나타내었다. 한편 가수분해물 제제에서는 크림(HP) 제에서 geniposide 0.10 ± 0.018 시간, genipin 0.32 ± 0.028 시간인 반면 히드로겔(HP) 제에서는 geniposide 0.14 ± 0.02 시간, genipin 0.34 ± 0.03 시간으로 히드로겔(HP) 제에서 geniposide 및 genipin 모두 더 높은 수치를 나타내었다(Table VI).

전반적으로 크림제에 비하여 히드로겔제에서 주성분 및 가수분해물의 피부 투과량이 더 높은 것을 알 수 있었다.

피부 잔류량

Lee 등²⁾의 방법에 따라 실험하였을 때, 크림 및 히드로겔 제에서 표피 및 진피를 포함하는 피부 잔류량을 비교해 보면 전반적으로 약물 도포 1시간 후에 피부층에 포화되기 시작하여 7시간 후 까지 수치가 크게 증가하지 않았다. Geniposide의 피부잔류량을 비교해 보면 크림제에서 7시간 후에 $6.64 \pm 0.101 (\mu\text{g}/\text{cm}^2)$ 이었고, 크림(HP)제에서는 $5.27 \pm 0.104 (\mu\text{g}/\text{cm}^2)$ 으로 큰 차이를 나타내지는 않았고, 히드로겔제에서는 $8.69 \pm 0.358 (\mu\text{g}/\text{cm}^2)$ 이었고, 히드로겔(HP)제에서는 $7.67 \pm 0.278 (\mu\text{g}/\text{cm}^2)$ 으로 역시 큰 차이를 나타내지는 않았으나, 크림제에 비하여 히드로겔제에서 피부 잔류량이 더 높게 나타났다(Figure 7).

한편 genipin의 피부잔류량을 비교해 보면 크림제에서 7

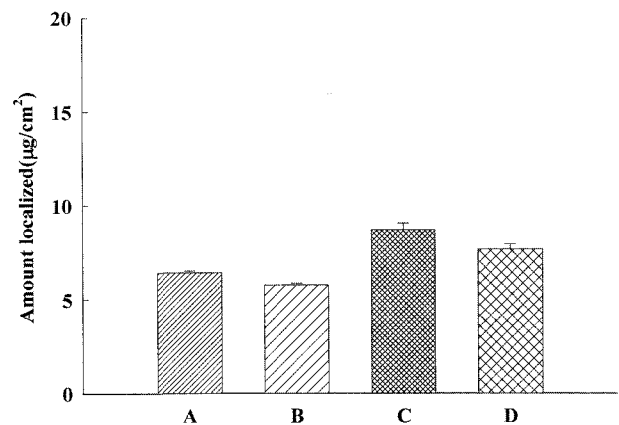


Figure 7—Comparison of residual geniposide on epidermic tissue after 7 hours under various preparations.

Key : A; Cream, B; Cream(HP), C; Gel, D; Gel(HP)

Each data represents the mean \pm SD from 5 experiments.

시간 후에 $2.80 \pm 0.08 (\mu\text{g}/\text{cm}^2)$ 이었고, 크림(HP)제에서는 $3.84 \pm 0.21 (\mu\text{g}/\text{cm}^2)$ 으로 나타났으며, 히드로겔제에서는 $3.41 \pm 0.12 (\mu\text{g}/\text{cm}^2)$ 이었고, 히드로겔(HP)제에서는 $4.19 \pm 0.39 (\mu\text{g}/\text{cm}^2)$ 로 나타나 크림 및 히드로겔제 모두 낮은 수치를 나타냄으로써, 특히 가수 분해물 제제에서는 피부 잔류량 보다 투과된 양이 훨씬 많은 것을 알 수 있었다(Figure 8).

피부조직의 광학 현미경적 관찰

Lynn¹¹⁾등의 방법에 따라 실험하였을 때, 무모마우스 등 피부에 크림 및 히드로겔제를 도포하고 24시간 후 피부를 절제하여 고정 및 포매 시킨 다음 염색하고 피부의 형태를 관찰한 결과 신선한 피부(Normal)는 각질층, 표피, 진피 및 피하 조직이 질서 정연하게 관찰된 반면, 약물을 도포하지 않고 24시간 방치시킨 것(Control)은 표피층 및 진피층이 얇아지고 피하조직이 대부분 떨어져 나갔다(Figure 9). 한편,

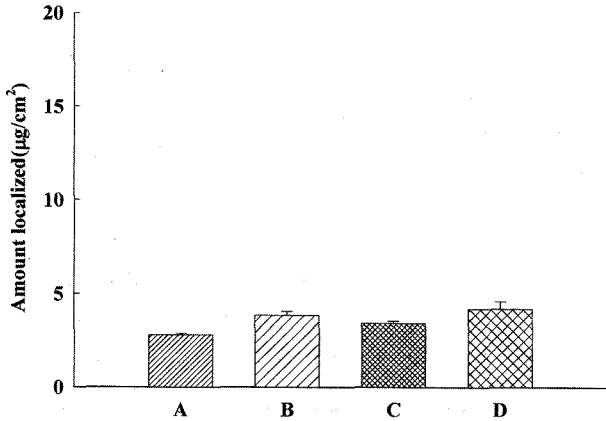


Figure 8—Comparison of residual genipin on epidermic tissue after 7 hours under various preparations.
Key : A; Cream, B; Cream(HP), C; Gel, D; Gel(HP)
Each data represents the mean±SD from 5 experiments.

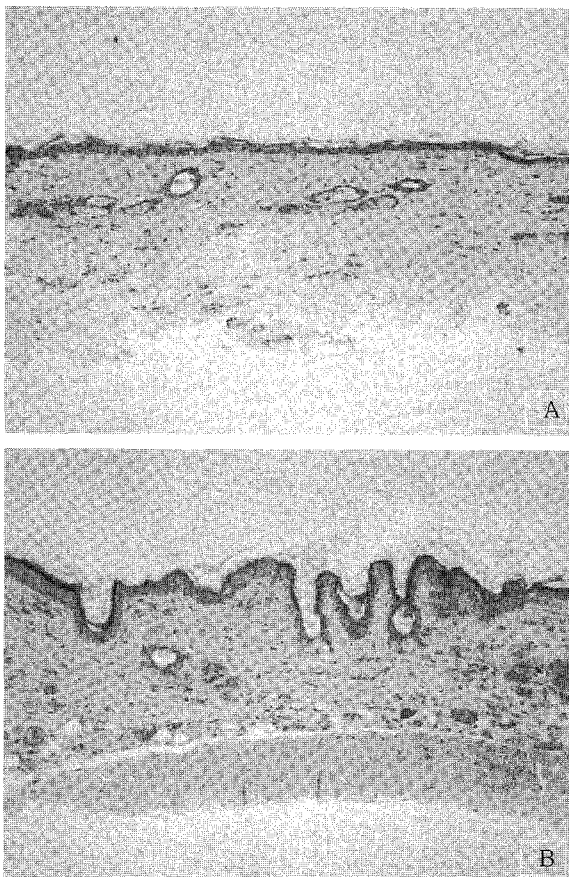


Figure 9—Photomicrographs of Normal(A) and Control tissue(B) stained with hematoxylin and eosin (original magnification ×50) retrieved at 1 week postoperatively.

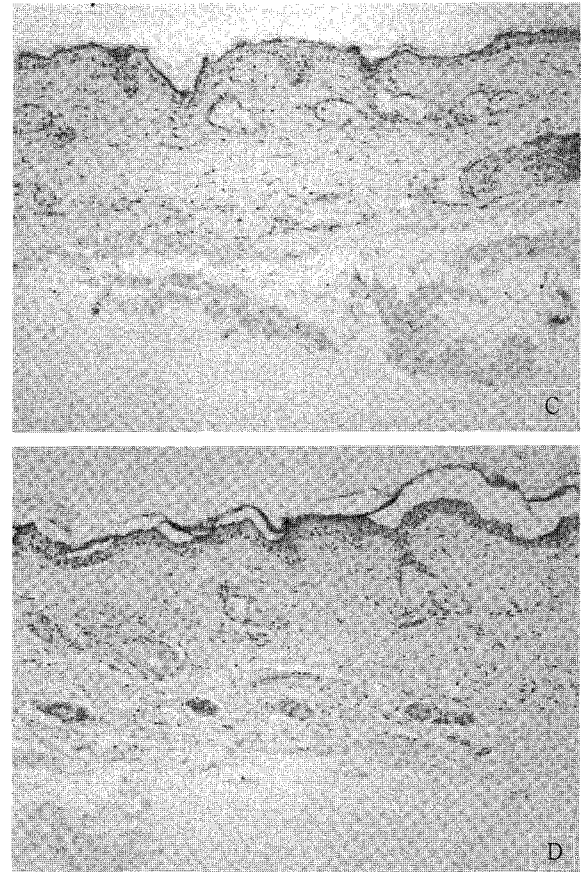


Figure 10—Photomicrographs of Cream(C) and Cream(HP)(D) stained with hematoxylin and eosin (original magnification ×50) retrieved at 1 week postoperatively.

상을 나타내었으며 크림(HP)에서는 진피 부분이 치밀한 양상을 나타내었다(Figure 10). 히드로겔 및 히드로겔(HP)를 도포한 것은 히드로겔의 경우 표피에서는 정상 조직과 유사하였으나 진피층이 비교적 치밀하였으며 히드로겔(HP)에서는 히드로겔에 비하여 더욱 치밀한 양상을 보여주었다(Figure 11).

피부조직 변화와 인장강도 실험의 상관관계를 비교해 보면 표피 및 진피가 치밀할수록 높은 인장강도를 나타내었는데 특히 크림(HP) 및 히드로겔(HP)에서 높은 인장강도 수치를 나타낸 것은 치자가수분해물인 genipin이 피부조직과 교차결합을 이루고 있는 것으로 사료되며 이는 Sung^{12,13} 등의 교차결합에 관한 연구와 일치된다(Figure 12).

결 론

크림 및 크림(HP)를 도포한 것은 표피와 진피는 신선한 조직과 유사한 양상을 보여 주었으나 피하조직이 분리되는 양

치자 엑스 분말을 경피흡수 제제로 개발하기 위하여 크림 및 히드로겔과 그 가수분해 제제를 만든 다음, 주성분 확인

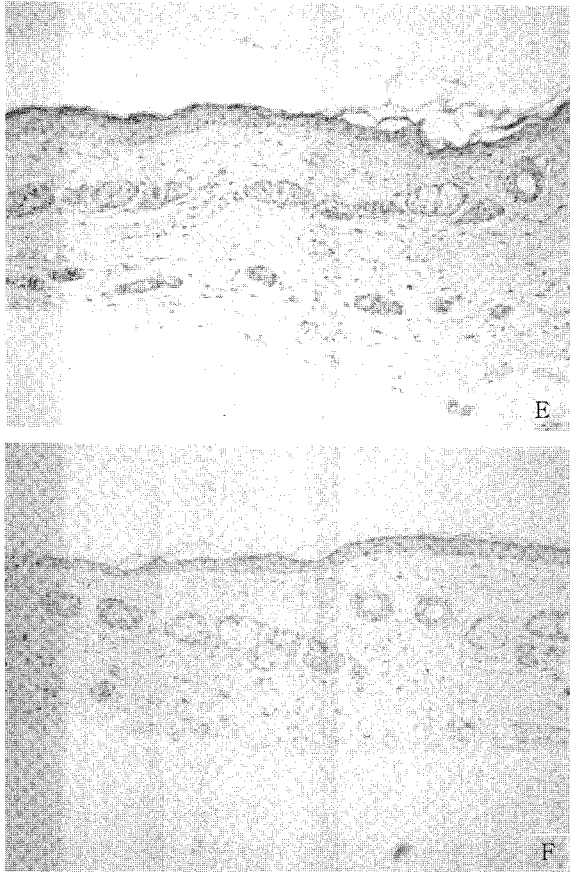


Figure 11—Photomicrographs of Gel(E) and Gel(HP)(F) stained with hematoxylin and eosin (original magnification $\times 50$) retrieved at 1 week postoperatively.

및 정량, 인장 강도 측정, 피부투과 실험, 피부 잔류량 측정 및 피부 조직의 광학 현미경적 관찰을 거쳐 다음과 같은 결론을 얻었다.

제제 중에 함유된 geniposide 및 genipin은 HPLC 방법에 의하여 분리, 정량이 가능하였으며 크림 및 히드로겔에서는 geniposide만 검출되었고 크림(HP) 및 히드로겔(HP)에서는 geniposide 및 genipin이 모두 확인되었다.

제제의 인장강도는 크림(HP)가 크림보다 10배정도 높아졌고, 히드로겔(HP)에서도 히드로겔보다 9배정도 높은 수치를 나타내었다.

제제의 피부투과량은 크림 및 히드로겔에서 geniposide 투과량이 높았으나 genipin의 투과량은 극히 낮았고, 크림(HP) 및 히드로겔(HP)에서는 geniposide의 투과량은 낮아진 반면 genipin의 투과량이 높게 나타났다.

피부 잔류량은 geniposide에서 비교적 높았고 genipin은 낮게 나타났다.

피부 조직에 대한 현미경적인 관찰 결과는 크림 및 히드로겔제에서는 표피와 진피가 신선한 조직과 유사한 양상을 보여 주었으나 크림(HP) 및 히드로겔(HP)에서는 피부 조직 중 특히 진피층이 치밀한 양상을 보여주었다.

이상의 실험결과를 종합해 보면 크림 및 히드로겔제에 비하여 크림(HP) 및 히드로겔(HP)제가 geniposide의 가수분해물인 genipin의 높은 투과율 및 피부조직과의 교차결합 양상을 나타내는 것으로 확인되었다.

감사의 말씀

본 연구는 과학기술부가 지원하는 헬스케어 기술개발 사업단 연구비에 의하여 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

문 헌

- 1) Y. Kawata, M. Hattori, T. Akao, K. Kobashi and T. Namba, Formation of nitrogen containing metabolites from geniposide and gardenoside by human intestinal bacteria, *Planta Med.*, **57**, 536-542 (1991).
- 2) D.U. Lee, C.H. Park, S.I. Kang, E.G. Min, Y.H. Han and C.K. Lee, Isolation of the component transformed into blue pigments by aerobic bacteria in the fruits of gardenia jasminoides, *Kor. J. Pharmacogn.*, **29**(3), 204-208 (1998).
- 3) Y. Paik, C. Lee, M. Cho and T. Hahn, Physical stability of the blue pigments formed from geniposide of gardenia fruits: effects of pH, temperature and light, *J Agric. Food Chem.*, **49**(1), 430-432 (2001).
- 4) Y.N. Han, H.K. Oh, K.H. Hwang and M.S. Lee, Antioxidant

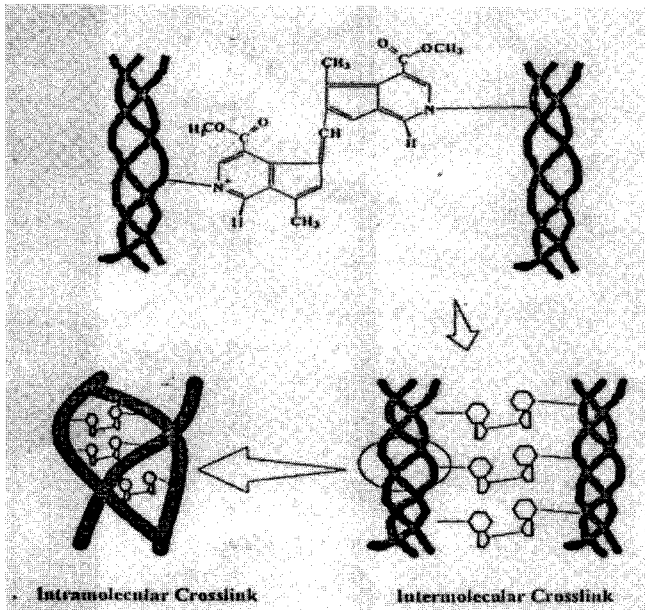


Figure 12—Presumable intramolecular and intermolecular crosslinking structures of the genipin-fixed tissue.

- components of gardenia Fruit, *Kor. J. Pharmacogn.*, **25**(3), 226-232 (1994).
- 5) Y. Liu, G.R. Lu and J. Lu, HPLC determination of iridoids in cape jasmine fruit(zhizi), *Zhinggwo Zhong Yao Za Zhi*, **18**(5), 298-299 (1993).
 - 6) T. Oshima, K. Sagara, T. Yoshida, Y.Y. Tong, G.D. Zhang and Y.H. Chen, Determination of geniposide, gardenoside, geniposidic acid and genipin-1-beta-gentiobioside in gardenia jasminoides by high performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.*, **25**(455), 410-414 (1988).
 - 7) T. Akao, K. Kobashi and M. Aburada, Enzymic studies on animal and intestinal bacterial metabolism of geniposide, *Bio. Pharm. Bull.*, **17**(12), 1573-1576 (1994).
 - 8) F.L. Mi, Y.C. Tan, H.C. Liang, R.N. Huang and H.W. Sung, In vitro evaluation of a chitosan membrane cross-linked with genipin, *J. Biomater Sci Polym Ed.*, **12**(8), 835-850 (2001).
 - 9) Y. Chang, C.C. Tsai, H.C. Liang and H.W. Sung, In vivo evaluation of cellular and acellular bovine pericardium fixed with a naturally occurring crosslinking agent(genipin), *J. Biomater Sci*, **12**(8), 851-852 (2001).
 - 10) C.C. Tsai, Y. Chang, H.W. Sung, J.C. Hsu and C.N. Chen, Effects of heparin immobilization on the surface characteristics of a biological tissue fixed with a naturally occurring crosslinking agent (genipin): an in vitro study, *Biomaterials*, **22**(6), 523-533 (2001).
 - 11) Lynn L.H. Huang, Hsing-wen Sung, Chen-Chi Tsai, Don-Mou Huang, biocompatibility study of a biological tissue fixed with a naturally occurring crosslinking reagent, *J. Biomed. Mater. Res.* **42**(4), 568-576 (1998).
 - 12) Hsing-wen Sung, Rong-Nan Huang, Lynn L. H. Huang, Chen-Chi Tsai, Chi-Tung Chiu, feasibility study of a natural crosslinking reagent for biological tissue fixation, *Journal of Biomedical Materials Research*, **42**(4), 560-567 (1998).
 - 13) H.W. Sung, C.N. Chen, R.N. Huang, J.C. Hsu, W.H. Chang, In vitro surface characterization of a biological patch fixed with naturally occurring crosslinking agent, *Biomaterials*, **21**(13), 1353-1362 (2000).
 - 14) J.H. Yang and N.H. Lee, Skin Permeation and Anti-inflammatory Effects of Hydrolyzed Products of Gardeniae Fructus Extracts, *Journal of Korean Pharmaceutical Sciences*, **34**(2), 115-123 (2004).
 - 15) S.H. Suh, M.T. Cho, B.B. Lee and D.I. Kim, Development of the unsteady capillary tube viscometer and viscosity measurement of blood analogue fluid, *Journal of the Korean Society for Vascular Surgery*, **18**(1), 23-30 (2002).
 - 16) W.S. Ha, I.J. Roh and J.H. Kim, Surface tension and antithrombogenicity of silk fibroin films graft-copolymerized with methyl methacrylate and styrene by cold methane plasma initiation, *Journal of the Korean Society of Textile Engineers and Chemists*, **26**(4), 33-39 (1989).
 - 17) B.H. Park and Y.C. Ko, Temperature effect on tensile strength of filled natural rubber vulcanizates, *Elastomer*, **36**(4), 255-261 (2001).
 - 18) K. Sato, K. Sugibayashi and Y. Morimoto, Effect and mode of action of aliphatic esters on the in vitro skin permeation of nicorandil, *Int. J. Pharm.*, **43**, 31-40 (1988).