

폴리에톡시레이티드레틴아마이드를 함유한 입방상 액정 젤 및 큐보솜의 제조 및 평가

경기열 · 지용길* · 조완구**

엘지생활건강 화장품연구소 *충남대학교 약학대학 **전주대학교 대체의학대학

(2007년 2월 7일 접수 · 2007년 4월 19일 승인)

Preparation and Evaluation of Cubic Liquid Crystalline Phase Gel and Cubosome containing Polyethoxylated Retinamide

Kee Yeol Kyong, Ung-Kil Jee* and Wan Goo Cho**

Cosmetics R&D Center, LG H&H Ltd, Yuseong, Daejeon 305-343, Korea/

*College of Pharmacy, Chungnam National University, Yuseong Daejeon 305-764, Korea/

**College of Alternative Medicine, Jeonju University, Hyoja, Jeonju 560-759, Korea

(Received February 7, 2007 · Accepted April 19, 2007)

ABSTRACT – The objective of this study is to prepare a stable delivery systems containing polyethoxylated retinamide (PERA) - derivatives of retinoic acid, effective anti-wrinkle and anti-acne agent. Cubic liquid crystalline phase gel (CLCPG) and cubosomes containing various concentrations of PERA were prepared to investigate the physicochemical properties. Furthermore, stability and transdermal absorption efficacy of the CLCPG containing PERA were investigated in comparison with oil-in-water (O/W) emulsions which are predominantly used as a topical formulation. CLCPG increase the stability of PERA in comparison with O/W emulsion. For tropical application, CLCPG containing PERA shows higher moisturizing effect than that of O/W emulsion. In skin permeation test, CLCPG shows higher PERA deposit on epidermis. With its specific physicochemical property caused by the glyceryl oleate, CLCPG itself could be used for stabilizer of various actives and applied as an effective delivery system for topical application. Cubosome, nano-sized dispersed CLCPG, is also expected to be applied in a various field of industry like food, cosmetics and pharmaceuticals.

Key words – Polyethoxylated retinamide, Cubic liquid crystalline phase gel, Cubosome, Delivery, Glyceryl oleate, Anti-aging

최근 화장품 산업에서는 피부노화를 개선시키는데 지대한 관심을 두고 연구를 하고 있다. 피부 노화 현상에 따른 가장 큰 피부 고민 중의 하나는 주름살 형성이다. 화장품 분야에서 종전에는 이러한 문제를 해결하고자 주름살 형성을 가속시키는 원인중의 하나인 피부 건조를 방지하고자 보습 효과를 높이는데 많은 노력을 기울여왔다.

이러한 주름살을 개선 또는 완화시키는 효과적인 물질로 레티노이드를 들 수 있다. 이들은 피부에 침투하여 세포 생성을 촉진시키고 콜라겐 섬유의 합성을 증가시킴으로써 주름살 제거 혹은 경감 시키는 것으로 알려져 있다.¹⁾

한편, 레티노이드의 효능은 유지하면서 부작용을 줄이고 안정성 및 경피 흡수성을 향상시킨 새로운 유도체가 개발되고 있지만 안정성의 측면에서 여전히 개선의 여지가 있다. 이들 유도체 중에서 레틴산에 약 10 몰의 폴리에틸렌글리콜

을 아마이드 형태로 결합한 것으로 폴리에톡시레이티드레틴 아마이드(PERA)라는 물질로 이 역시 레티노이드의 일종으로 분류할 수 있다.²⁾

지금까지 레티노이드의 안정화를 위한 많은 연구 중에서 A. Semenzato 등은 레티닐팔미테이트 0.2%가 함유된 Oil-in-water(O/W) 에멀전에서 안정성을 실험한 결과 에멀전의 물리적 안정성과 레티닐팔미테이트의 화학적 안정성이 밀접한 관계가 있다고 보고했다.³⁾ 즉 에멀전의 외상에 존재하는 젤 구조가 안정할수록 유화입자 안에 포함된 레티닐팔미테이트의 안정성은 높아진다고 주장하고 있으나 젤 구조로 인해 레티닐팔미테이트와 물과의 접촉을 막아줌으로써 기인된 것인지 그 이유는 정확히 밝히지 않고 있다. Water-in-oil(W/O), Oil-in-water(O/W), multilamellar liquid crystalline vesicles (MLV) 등에서의 실험결과는 제형에 따라 retinoids의 안정성이 차이가 난다고 보고되었으나 그 원인에 대해서는 역시 정확하게 언급하고 있지 않다.⁴⁾

이외에도 캡슐 혹은 액정(liquid crystal, LC)내에 포접시킴

*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
Tel : 063)220-2064, E-mail : wgcho@jj.ac.kr

으로서 제품 내에서 레티노이드의 안정화 시도를 하고 있으나, 피부외용제나 화장품 같은 경우 장기간 안정성이 확보되어야 한다는 측면에서 볼 때 여전히 미흡한 수준에 머물고 있다. 따라서 이에 대한 새로운 대안으로서의 가능성을 알아보기 위하여 입방상액정젤 및 큐보솜 시스템을 도입하고자 한다.

글리세릴 모노올레이트는 백색에 가까우며 약간의 특이한 냄새를 갖는 페이스트상의 친수성 지질이다. 분자구조 특성으로 인해 인지질과 같은 양친매성 극성지질이 물과 혼합되면 열역학적으로 안정한 지질이중층이 자발적으로 형성되듯이 입방상 액정 구조체 또한 글리세릴 모노올레이트의 수화에 의해 자발적으로 형성된다. 큐보솜은 상기 결과로서 생긴 입방상의 점성이 강한 겔을 유화제를 이용하여 기계적 에너지나 초음파로 물에 분산시켜 놓은 미세한 나노입자를 의미 한다.⁵⁾

이들 액정 구조는 지질을 기제로 하기 때문에 생체의 적합성이 높으며 체내에서 쉽게 분해되므로 생체 내 투여 시 축적되지 않고 독성이 없다. 또한 기존의 에멀전 제형이나 리포솜 제형이 지용성 또는 수용성 약물의 동시 봉입에 문제점이 제기되어 있으나 큐보솜 제형은 지용성, 수용성 약물 뿐만 아니라 양쪽성 약물까지 다양한 종류의 약물 봉입이 가능하고 지용성, 양쪽성 약물의 경우 방출속도가 늦어 서방형 약물전달체제로 이용될 수 있다.⁶⁾

최근 큐보솜의 이러한 제형적 특성으로 약물의 방출제어가 가능하고 약물 전달매체⁶⁾, 에멀전 안정화제⁷⁾, 오염 제거제^{8,9)}, 그리고 다양한 인체용품^{10,11)}으로 응용되고 있다. 이러한 특성들은 큐보솜이 약물 수송체 뿐만 아니라 다양한 분야로의 적용 가능성을 가지고 있음을 보여준다.

큐보솜 나노입자는 통상 두 가지 방법으로 제조된다. 첫 번째 방법은 고점성의 입방상 겔을 분쇄하기 위해 기계적, 초음파적 에너지를 투입하여 미세입자로 분산하는 방법으로 공정은 대량생산이 어렵고 비용이 많이 들며 온도에 민감한 유효 성분들이 파괴될 위험이 있을 뿐만 아니라 과도한 에너지 투입과 여러 차례의 기계 통과로 독특한 입방상이 깨질 수 있다. 두 번째 공정은 에탄올과 같은 용해보조제(hydrotrope)의 존재 하에서 입방상 구조를 형성시키는 제조 방법이다. 이는 글리세릴 모노올레이트-에탄올-물로 구성된 계의 희석과정을 거쳐 자발적으로 형성되는 공정으로, 전통적으로 높은 전단력과 압력을 가하는 파쇄 방법에 비해 더 작고 안정한 구조체가 형성되며, 더욱이 간단한 교반이나 최소 에너지 투입만으로도 제조가 가능한 이점이 있다.¹²⁾ 상기의 두 공정 모두 입자의 응집을 막기 위해 Poloxamer[®] 407이 안정화제로서 소량 사용되며, 이것에 의해 큐보솜은 응집으로부터 안정화 된다.¹⁸⁾ 에탄올이 용해보조제로 사용되고, 희석 되면서 큐보솜은 자발적으로 형성된다. 용해보조제는 스스로 액정을 형

성하지 못하지만, 'salting-in' 거동을 보이며 글리세릴 모노올레이트와 같은 물에 불용성인 지질들의 용해도를 증가시킨다.

최근 입방상의 미세구조특성과 생체 계와의 중요성에 대한 관심이 높아지면서 많은 연구가 발표되었다.¹⁴⁻¹⁶⁾ 몇몇 생체막 지질들은 입방상을 형성하며 또한 다양한 생물학적 경로에 입방상들이 관여한다. 아실글리세롤은 지방소화의 중간 단계에서 입방상 구조를 나타내고 최근 연구에서는 입방상 구조가 다양한 구상단백질을 수용할 수 있다는 보고가 있으며¹⁶⁾ 또한, 서방형 제제에 사용될 수 있다.¹⁷⁾

본 연구에서는 PERA를 입방상액정젤 또는 큐보솜으로 제제화 하여 입도 분석 등을 활용한 안정성, 경피흡수성 및 피부에서의 보습효과 등을 측정하였다.

실험 방법

시약

글리세릴 모노올레이트(Monomuls[®] 90-O18, GMO)는 독일의 Cognis에서 구입하였다(아실기의 순도 >99%, 에스터의 순도 >97%). 에탄올은 한국알코올에서 공급 받아 사용하였다. Poloxamer[®] 407(PEO₉₉-PPO₆₇-PEO₉₉)은 BASF(독일)에서, 폴리에톡시테트라에탄아마이드(PERA)는 LG Life Science(한국)에서, 프로필렌글리콜은 Dow Chem.(미국), 1,2-헥산디올(KMO-6)은 Nisshin Oil(일본)로부터 각각 구입하여 사용하였다. 증류수(Milli-Q, Millipore, 프랑스)는 18.0 MW-cm의 순수한 것을 사용하였다.

기기 및 기구

유화 및 교반 장치로는 Robomics[®](Tokushu Kika, Japan), 고압 유화기 장치로는 Microfluidizer[®](Model 110EH, Microfluidics, USA), 유화물의 안정성 평가는 TURBISCAN LAB (Formulation Co., France), 입자의 측정은 Submicron Particle Sizer(Nicom Co., Model 370), 유변학적 물성은 레오미터(USD 200, Physica, Germany), 시차 열분석 장치(Model 4207, Hart Scientific, USA)를 사용하였으며, 입자의 촬영은 TEM(Jeol 100CX, Jeol Co., Japan), 피부 보습효과 측정에는 Skicon[®] 200(IFS, Japan)과 Comeometer[®] CM 825 (Courage-Khazake, Köln, Germany)를 사용 하였다. 경피흡수 실험은 Franz type 투과시스템 (Hanson Research Corporation, Chatesworth, CA, USA)을 정량분석에는 액체크로마토그래피(Hewlett Packard series 1100)를 사용하였다.

입방상 액정젤의 제조

입방상 액정젤은 Table I의 조성에 따라 제조하였다. 글리세

Table I—Formulations of Cubic Liquid Crystalline Phase Gel Containing Various Concentrations of PERA

Ingredients	Formulations (wt%)			
	CB00	CB01	CB02	CB03
GMO	65	65	65	65
Propylene glycol	12	12	12	12
1,2-Hexanediol	3	3	3	3
Distilled water	20	19	18	17
PERA	-	1	2	3

릴 모노올레이트(GMO)를 40°C로 가열하여 녹인 후 다가 알코올을 가한 후 교반기로 균일하게 용해시킨 후 1500 rpm으로 교반하면서 물과 PERA를 순차적으로 가하여 제조하였다.

입방상 액정젤의 희석에 의한 큐보솜의 제조

큐보솜은 Spicer 등이 사용한 방법으로 제조하였다.¹⁸⁾ 먼저 입방상 액정젤을 제조하였고 조성은 Table II(a)와 같으며 LP00, 01, 03으로 나타내었다. Table II의 (b)의 조성으로 각각의 입방상 액정젤을 취한 다음 Poloxamer[®] 407 수용액으로 희석시킨 후 고압 유회기를 이용하여 제조하여 이를 각각 B00, 01, 02, 03로 나타내었다. Poloxamer[®] 407은 큐보솜 입자의 응집에 대한 안정화제로 소량 사용하였다.

O/W 에멀전의 제조

O/W 에멀전은 Table III 구성에 의해 제조하였다. 제조방

Table II—Formulations of Liquid Precursors(a) and Cubosomes(b) Containing Different Content of PERA

(a) Cubic liquid crystalline phase gel

Ingredients	Formulation (wt%)			
	LP00	LP01	LP02	LP03
GMO	50	50	50	50
Ethanol	30	30	30	30
Water	20	19	18	17
PERA	-	1	2	3

(b) Cubosomes

Ingredients	Formulation (wt%)			
	B00	B01	B02	B03
LP00	10	-	-	-
LP01	-	10	-	-
LP02	-	-	10	-
LP03	-	-	-	10
Poloxamer 407	1	1	1	1
Water	89	89	89	89

Table III—Formulation of Oil in Water Emulsions

Ingredients	Formulations (wt%)		
	O/W00	O/W01	
Phase A (Oil phase)	White vaseline	25	25
	Mineral Oil	10	10
	Cetostearyl alcohol	5	5
	Glyceryl monostearate	5	5
	PEG-40 stearate	5	5
Phase B (Water phase)	Distilled water	35	34
	Propylene glycol	12	12
	1,2- Hexanediol	3	3
	PERA		1

법은 유상 A와 수상 B를 각각 75°C로 가열 용해시킨 다음, 수상에 유상을 첨가하면서 교반기를 이용하여 5000 rpm으로 10분간 혼합하여 실온으로 냉각하였다.

입자크기 측정

큐보솜의 평균 나노 입자크기 측정은 광산란을 이용한 입도측정기를 이용하였다. 시료를 적정농도로 희석하여 주사기를 이용하여 시료주입구에 연결하면 자동으로 희석된다. 자동주입량은 1~10 mL 정도이다.

Cryogenic TEM

챔버의 상대습도는 준비하는 동안 시료로부터 증발을 방지하기 위하여 포화상태에 가깝게 유지하였다. 측정 방법은 Almgren 등의 방법을 이용하였다.^{19,20)}

Differential scanning calorimetry(DSC)

가열과 냉각 주기는 -30°C와 80°C 사이에서 1°C/min 속도로 측정되었고 이 기기의 측정오차는 ±5 µcal/°C이다. 면적은 적분치로서 열량단위(cal/g)로 환산되었다. 결합수는 순수한 물의 용해열 값(79.8 cal/g)을 사용하면서 전체 물의 양에 대해 자유수의 빙결 엔탈피를 프포트하여 계산하였다.

Rheological analysis

각 시료의 유동학적 특성을 알아보기 위하여 레오미터를 사용하여 수행하였다. 사용된 센서는 양면 플레이트 형으로, 여기서 콘의 반지름이 17.5 mm인 것을 사용하였다. 시료의 양은 0.5 mL을 사용하였고, 온도조절 장치로부터 일정 온도의 물을 순환시켜 측정온도를 25±1°C로 일정하게 유지시키고, 측정 전에 영점을 조절하였다. 시료를 측정 셀에 가하고 전단속도를 0~1001/s로 변화시키면서 전단응력의 변화를 측정하여 레오그램을 작성하였다.

PERA의 안정성 평가

제형에 따른 PERA의 안정성을 알아보기 위하여 O/W 에 멀전 및 입방상 액정젤 제제에 PERA를 적용하고 25°C 및 45°C 항온조에 보관한 후 HPLC를 이용하여 잔존량을 분석하였다.

큐보즘의 안정성 평가

큐보즘의 안정성은 Turbiscan[®] LAB을 이용하여 다중 광산란법으로 측정하였다. 큐보즘의 현탁도는 수직 관(내경:13 mm)에 들어있는 각 시료의 높이에 대한 함수로써 측정된다. 시료에 대한 후방산란 또는 투과 된 빛을 퍼센트 곡선으로 나타낸다. 먼저 실린더형의 유리 측정용 셀에 시료를 담아 25°C, 45°C로 조절된 항온기에 넣어서 보관한 후 4 주 동안 측정하였다. 시료가 담긴 셀을 기기에 넣으면 수직 스캔 분석기가 시료가 담긴 셀의 높이 전체를 스캔하면 두 개의 연속적인 탐지기가 작동한다. 이들은 55 mm의 셀의 최대 높이까지 매 40 μ m마다 탐지하는데, 먼저 투과탐지기가 시료를 통과한 빛을 모으고 후방산란 탐지기는 135°에서 샘플에 후방 산란된 빛을 받는다. 광원으로는 880 nm의 파장을 갖는 펄스형의 근적외선이 이용되었다.

보습효과 평가

큐보즘 제형의 보습효과를 측정하기 위하여 피부수분 보유능 측정 장치인 Skicon[®] 200 및 Coneometer[®]를 이용하였다. 먼저 건강한 성인 남성 20명을 대상으로 항온항습실(22°C, 50%)에서 30분 이상 안정을 취하게 한 다음 측정하였다. 피시험자의 팔 안쪽 피부에 일정한 영역을 표시하고 시료를 도포하기 전 대비 도포 후 시간에 따른 수분량을 측정하여 증감 정도를 비교 분석하였다.

PERA의 경피흡수 실험

Pig(100~120 kg, 수컷)는 오정동 농수산물시장(대전시)에서 등 부위를 획득하여 바로 깨끗이 씻고 전기 이발기를 사용하여 털을 제거한 후 주의 깊게 면도하고, 사용 전까지 -70°C에 보관하였다. 적출된 돼지 피부에서 PERA의 제형에 따른 경피흡수를 측정하였다. 적출된 Pig 피부에서 PERA의 제형에 따른 경피흡수 측정을 위하여 HPLC(Hewlett Packard series 1100), Vertically assembled Franz type 투과시스템(Microette transdermal diffusion system, Hanson Research Corporation, Chatesworth, CA, USA), Franz diffusion cell을 등을 사용하여 측정하였다. 이 때 receptor phase와 접촉하는 피부의 면적은 1.766 cm², receptor phase의 용량은 7.0 mL이었다. 피부는 donor compartment와 receptor com-

partment사이에 끼우고 실험 중 피부의 표면은 실온에 노출시켰다. 실험 전에 동결되어 있던 피부를 상온에서 서서히 녹인 후, 피부를 박리하고 dermatome을 사용하여 진피의 일부가 포함되도록 0.75 mm 두께로 자르고 각질층이 위를 향하도록 설치하였다. Receptor phase는 pH 7.4, 50 mM 인산염 완충액이었으며, star-head stirring bar와 magnetic stirrer를 사용하여 600 rpm으로 계속해서 일정하게 교반하였으며 항온순환 펌프로 물을 순환시켜 35°C로 유지하였다. 약 5 mL의 용액을 donor compartment의 피부 표면에 투여하고 피부 표면에 존재하는 기포를 제거하고 6, 12, 24시간에 receptor phase를 0.5 mL씩 채취하고 즉시 동량의 신선한 인산염 완충액(receptor phase medium)으로 보충하였다. 채취된 시료는 membrane filter(pore size, 0.2 μ m, MFS-13, Micro filtration systems, CA, USA)를 이용하여 여과한 후 HPLC로 측정하고 분석하여 투과된 PERA의 양을 계산하였으며, 위의 실험은 3회 반복하였다.

결과 및 고찰

DSC에 의한 관찰

PERA는 일종의 계면활성제와 같은 구조로 되어 있어 입방상 액정젤의 구조형성에도 영향을 미칠 것으로 예상된다. 이에 대한 연구의 하나로 DSC를 이용한 상변화를 측정하였다. 글리세릴 모노올레이트-다가알코올-물로 구성된 입방상 액정젤 내에 PERA를 봉입시켜 DSC를 측정한 결과를 Figure 1에 나타내었다. PERA를 함유하지 않은 입방상 액

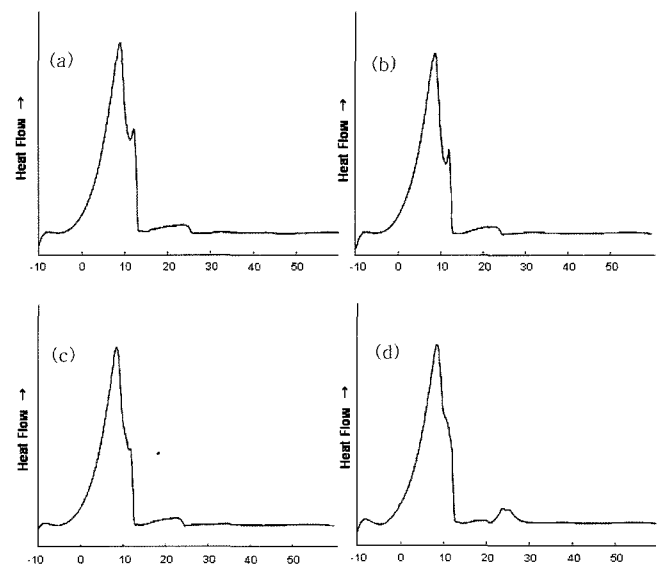


Figure 1—DSC Profiles from cubic liquid crystalline phase gel containing PERA (a): 0 wt%, (b): 1 wt%, (c): 2 wt%, (d): 3 wt%.

정질의 경우 (Figure 1(a)), 10°C와 13°C 근처에서 엔탈피 변화가 나타났으며, 20-25°C부근에서도 약간의 엔탈피 변화가 감지되었다. 여기에 PERA를 각각 1, 2, 3 wt% 첨가한 경우에는 13°C 부근에서의 엔탈피 변화는 줄어든 반면 20-25°C 부근에서는 엔탈피 변화가 상대적으로 약간 증가되었다. 특히, 3 wt% PERA를 첨가한 시료에서는 23-25°C 부근에서 현저한 엔탈피 변화를 나타내었다(Figure 1(d)). 이 역시 PERA의 함량이 3 wt% 이상으로 될 경우, 입방상의 내부구조에 있어서 커다란 변화가 생긴 결과라고 생각된다.

유변학적 특성

피부 외용제에 있어서 유동학적 특성은 제제의 안정성과 관련이 있을 뿐 아니라 피부 도포성과도 밀접한 관련이 있다. 즉, 연고제 같은 통상의 에멀전 제제들은 열역학적으로 불안정한 계이기 때문에 이들의 안정성을 높이기 위해서는 점성을 높이는 시도를 하는 경우가 많다. 그러나 제제의 점성을 높이다 보면 피부에 발리는 특성인 전연성이 떨어지는 단점이 있을 수 있다. 이러한 이유로 피부 외용제에 있어서 요변성(thixotropy) 성질은 매우 중요한데, 이를 이용하면 보관 시에는 높은 점성에 의해 안정성이 유지되면서도 사용 시에는 전단력에 의해 점성이 낮아지기 때문에 피부에 잘 퍼 발라지는 특성을 갖게 된다.

입방상 액정젤의 유동학적 특성을 알아보기 위하여 레오미터를 이용하여 전단속도($\dot{\gamma}$)에 대한 전단응력(τ)을 측정하였다. 또한 전단응력에 대한 저장 탄성률(G')을 측정하였다. 먼저 전단속도에 대한 전단응력을 측정된 결과 Figure 2에서 볼 수 있는 바와 같이 PERA를 함유한 입방상 액정젤의 경우, 2 wt%까지는 blank 시료와 거의 동일한 형태의 유동학적 특성을 보였으며, 요변성 성질은 거의 보이지 않았다. 그러나 3 wt% 이상에서는 급격한 요변성 성질을 나타내었으며 이는 통상의 O/W 에멀전과 유사한 거동을 보였다.

입방상 액정젤의 경우 Figure 2에서 볼 수 있듯이 강한 전단력에서도 요변성 성질은 잘 나타나지 않는 특성이 있다. 이는 전단력에 의해 내부구조의 변화가 거의 없다는 것을 의미한다. 실제 외관상으로 볼 때 입방상 액정젤은 투명하면서도 점성이 강한 성질을 갖고 있으며, 이를 임의의 용기에 담고 외부에서 약간의 충격을 가하면 이른바 울림 현상이 나타나는 특성이 있다. 입방상 액정젤의 이러한 유동학적 특성은 피부에 바를 시 도포성 측면에서는 단점이 될 수 있으나, 글리세릴 모노올레이트의 생체 친화성과 외관 및 촉감의 차별성 측면에서는 새로운 피부 외용제로서의 응용 가능성을 충분히 갖고 있다고 할 수 있다.

또한 PERA를 3 wt% 함유한 제제의 경우에서 볼 수 있

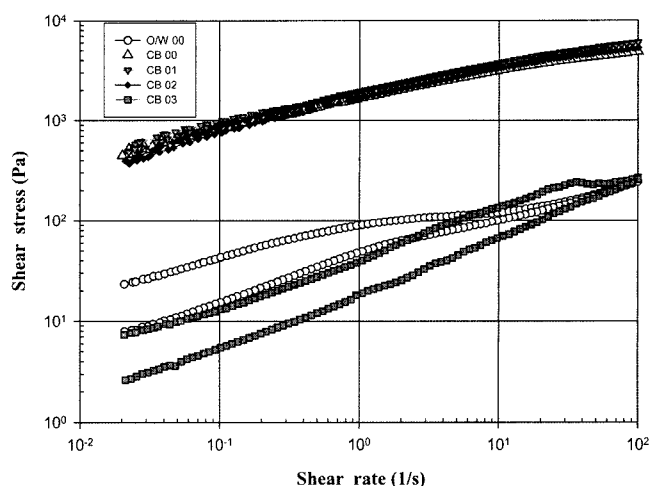


Figure 2—Rheograms of cubic liquid crystalline phase gel containing different content of PERA.

듯이 입방상 액정젤에 요변성을 부여하기 위해서는 계면활성제 및 이와 유사한 보조제 등을 첨가함으로써 어느 정도 조절이 가능할 것으로 사료된다. 그러므로 입방상액정젤 자체의 도포성을 개선하고 O/W 에멀전 제제와 유사한 도포력을 부여할 수 있을 것이다.

한편, Figure 3에서 보듯이 전단응력에 대한 G' 값 측정결과에서도 PERA 2 wt%까지는 강한 탄성의 성질을 보인 반면, 3 wt% 이상에서는 전단응력에 따라 급격한 탄성의 소실을 가져왔다. 그러나 O/W 에멀전의 경우와는 다르게 어느 정도까지만 감소하고 그 이후에는 일정하게 유지되는 특성을 보였다. 이는 일정농도 이상의 PERA는 입방상 액정젤의 구조에 영향을 미칠 수 있음을 시사한다.

입방상 액정젤의 경우 1000 Pa까지의 전단응력에서 PERA

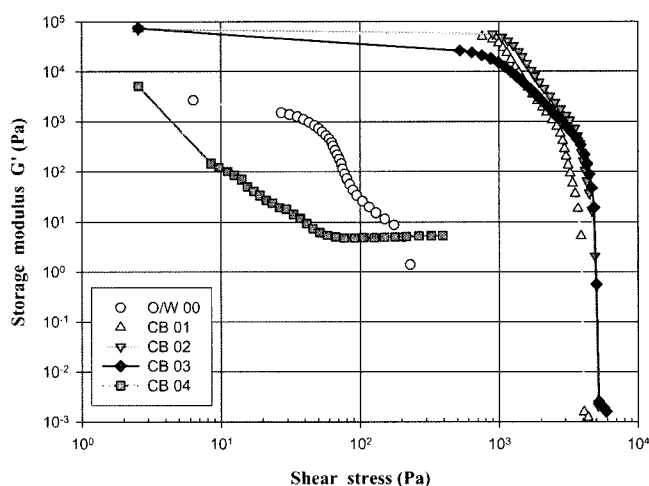


Figure 3—Viscoelastic profiles of cubic liquid crystalline phase gel and O/W emulsion containing different content of PERA.

의 첨가에 따라 어느 정도 농도까지는 상변화가 없이 구조를 유지하였는데, 이는 보통의 O/W 에멀전 제제에 비하여 약 10배 정도 큰 수준이다. 즉, 입방상 액정젤은 강한 탄성을 갖고 있어, 외부로부터의 충격에 대한 저항력이 크기 때문에 계의 안정성은 매우 우수함을 알 수 있다. 그렇지만 요변성 측정 시와 마찬가지로 PERA의 농도가 3 wt% 이상이 되면 낮은 전단응력에 의해서도 상변화가 쉽게 일어남을 알 수 있었다.

PERA의 안정성

레틴산이나 레티놀은 생체 내에서 여러 가지 생리활성 기능을 갖고 있으나, 이는 대개 산소, 열, 광에 의해 쉽게 분해되는 특성이 있다. 그러므로 이를 안정화시키기 위한 여러 가지 방법들이 이용되어 왔는데, 이를 크게 두 가지로 나누어 보면, 먼저 레틴산이나 레티놀을 화학적 변형을 통하여 유도체를 만드는 것에 의해 물질 자체의 화학적 안정성을 높이는 방법이 있다. 또한 이들을 캡슐 또는 비수형 제제 내에 봉입시키는 방법에 의해 산소나 광에 의한 반응을 차단하는 방법이 있을 수 있다. PERA의 경우 화학적 변형에 의해 안정성을 높인 유도체이지만 제제 내에서의 안정성이 장기간 보존할 경우 개선의 여지가 있다.

앞서 설명한 바와 같이 입방상 액정젤 또는 큐보솜 제제의 장점중의 하나는 화학적으로 불안정한 약물의 안정성을 향상시키는 것이다. 여기서는 입방상 액정젤 내에서의 PERA의 경시 보관 조건에 따른 화학적 안정성을 측정해 보았다. 제조된 시료를 20 mL 용기에 담아 25°C 및 45°C 항온조에 각각 보관한 다음 7일 간격으로 HPLC를 이용하여 PERA의 잔존량을 측정하였다. Figure 4에서 보듯이 입방상 액정젤의 경우 O/W 에멀전에 비하여 PERA의 안정성이 향상되는 것을 확인할 수 있었다. 즉, 제조 28일 후에 입방상 액정젤의

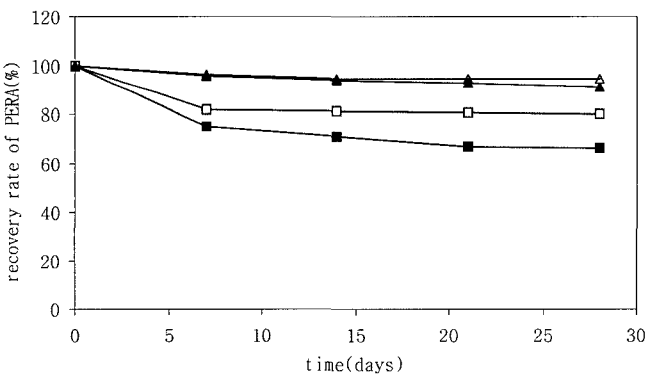


Figure 4—Recovery rate of PERA during storage in cubic liquid crystalline phase gel at 25°C(△-), 45°C(▲-) and in O/W emulsion at 25°C(□-), 45°C(■-).

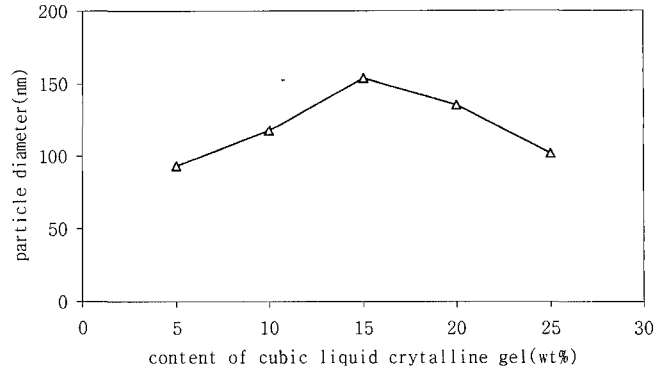


Figure 5—Mean particle size change of cubosome varying the concentration of cubic liquid crystalline gel.

경우 25°C에서 96.0%, 45°C에서 92.0%의 잔존율을 보인 반면, O/W 에멀전의 경우에는 25°C에서 80.2%, 45°C에서 66.1%의 잔존율을 보였다.

제조조건에 따른 큐보솜의 입도 변화

글리세릴 모노올레이트의 함량에 따른 큐보솜의 입도분포를 알아보기 위하여 입방상 액정젤을 만든 다음, 이를 5, 10, 15, 20, 25 w/w%로 변화시키면서 고압유화기를 이용하여 500 bar에서 5회 통과시키는 것에 의해 큐보솜을 제조하고 평균 입자크기를 측정하였다. Figure 5에서 보듯이 입방상 액정젤의 증가에 따라 15 wt%까지는 큐보솜의 평균 입자 크기가 증가하였으나, 그 이상의 농도에서는 평균 입자 크기가 감소하였다. 이는 15 wt%까지는 평균 입자크기가 글리세릴 모노올레이트의 농도에 의존적이었으나, 그 이후에서는 입방상 액정젤의 농도 증가에 따라 Poloxamer[®] 407이 평균 입자크기에 상대적으로 더 영향을 미쳤기 때문으로 사료된다.

큐보솜의 입자 크기는 제조방법이나 제조조건에 따라 많은 차이가 있을 수 있는데, 앞선 연구들에 의하면 동일 제조조건에서 글리세릴 모노올레이트의 함량이 높으면 큐보솜의 입자 크기는 증가하며, Poloxamer[®] 407의 함량이 높으면 큐보솜의 입자크기는 작아진다고 보고하였다.²¹⁾ 이는 Poloxamer[®] 407의 농도 증가에 따라 상대적으로 계의 점도가 상승하면서 고압유 화기의 동일 압력 조건에서 전단력을 더 크게 받았기 때문으로 사료된다.

나노 입자는 기계적 힘을 가하여 소형화 시키는 물리적 접근법인 top-down 방식과 계면 화학적 접근법인 bottom-up 방식으로 제조한다. 용해보조제인 에탄올을 이용하는 bottom-up 제조법에 기계적 에너지를 이용하여 계에 높은 전단력을 줌으로써 더욱 작고 균일한 입방상의 나노 입자 제조가 가능하였다. 장치에 의한 전단력과 난류에 의해 생기는 역학적 힘에 비해서 입자는 더욱 미세해 진다. Figure 6에서

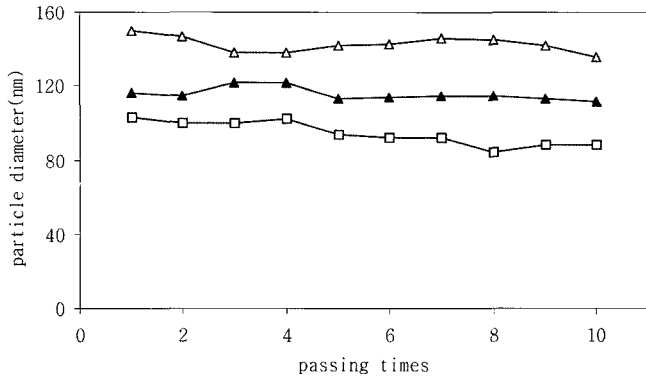


Figure 6-Particle size changes of cubosome against passing times with shear 250 bar(△-), 500 bar(▲-) and 750 bar(□-).

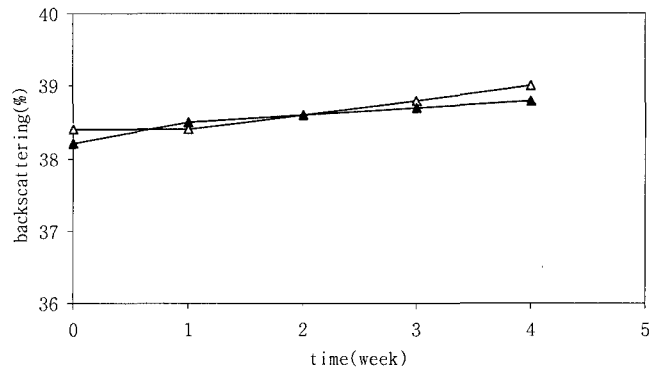


Figure 8-Stability of cubosome B00(backscattering change) with storage time measured by Turbiscan[®] LAB at different temperature (25°C(△), 45°C(▲)).

볼 수 있듯이 고압유화기의 압력을 250, 500, 750 bar로 변화시키며 제조한 입자의 평균 직경은 높은 압력에 의한 전단력의 증가에 따라 입자크기가 미세해지고 입도분포도 협소해짐을 알 수 있었다. 그러나 고압유화기의 통과횟수를 110회로 변화시켜 제조한 입자의 평균 직경 또한 통과횟수에 따라 약간 감소하였지만 5회 이후부터는 입자크기가 크게 작아지지 않고 거의 일정한 결과를 보였다. 이는 큐보솜 제조에 있어서 기계적 에너지의 절대값이 큐보솜의 입자 크기를 결정하는 인자이며, 혼합 또는 균질화 시간은 크게 영향을 미치지 않는다는 것을 의미한다.

한편 동일 조건하에서 PERA를 함유한 큐보솜의 입도 분석 결과에서는 PERA의 농도 증가에 따라 큐보솜의 평균 입자크기가 농도 의존적으로 감소함을 알 수 있었으며, 그 결과는 Figure 7에 나타내었다. 이는 PERA가 일종의 계면활성제와 같은 성질을 갖고 있기 때문에 이에 의한 표면장력의 저하로 인해 나타난 결과로 판단된다.

큐보솜의 안정성 평가

기기적 방법으로 시료의 불안정성을 판정하게 되면 단지

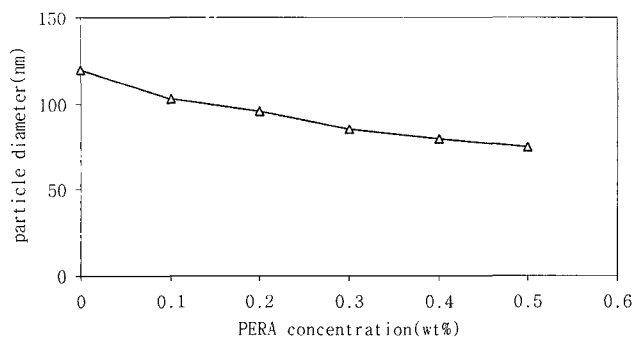


Figure 7-Particle size change of cubosome against PERA concentration.

눈으로 관찰하는 경우에 비하여 4배에서 최대 50배 정도 짧은 시간만으로도 판정이 가능하다. 이를 통하여 각 시료에 대한 안정성을 판단한 결과로 보아 장기 안정성을 예측할 수 있었다.

본 연구에서는 큐보솜에 대한 안정성을 알아보기 위하여 각각의 시료를 25°C, 45°C에서 4주간 보관하면서 Turbiscan[®] LAB 장치를 이용하여 후방산란 및 투과도를 측정하였으며, 그 결과를 Figure 8~9에 나타내었다. PERA를 함유하지 않은 큐보솜 및 이를 함유한 큐보솜 모두 25°C에서는 시간 경과에 따라 후방산란 된 양이 감소하고 고온 (45°C)에서는 역으로 증가하는 결과를 보였다. 두 가지 시료를 비교해 보면 PERA를 함유한 큐보솜 B01 시료가 PERA를 함유하지 않은 시료 큐보솜 B00에 비하여 25°C 및 45°C에서 후방산란 된 양이 거의 일정하여 보다 양호한 안정성을 보였다. 두 가지 시료의 후방산란 그래프를 보면 입자의 이동 현상인 크리밍이나 침전 양상은 거의 보이지 않았으며, 입자 크기의 변화인 합일 혹은 응집이 시간의 함수로써 미세하게 일어남을 인지할 수 있었다.

이를 통하여 육안으로는 관찰하기 어려운 미세한 변화까지도 관찰이 가능하며, 결과를 보다 객관적이고 정량적으로 분석하는 것이 가능하다. Figure 8에서 볼 수 있듯이 시료 큐보솜 B00의 경우, 각 보관조건에서 시간에 따른 후방산란의 변화 정도가 그다지 크지 않은 것으로 보아 안정성이 매우 양호한 것으로 판단되었다. 특히, 25°C 보관조건에서 보다 높은 온도인 45°C에서 시간에 따른 후방산란의 변화 폭이 적은 것으로 확인되었는데, 이는 안정화제로 첨가한 Poloxamer[®] 407의 거동이 온도에 따라 영향을 받기 때문인 것으로 사료된다. 즉, Poloxamer[®] 407의 경우 온도의 증가에 따라 수소결합이 영향을 받으면서 친수성-친유성 밸런스가 변하게 되는데, 이에 따른 결과로 해석된다.

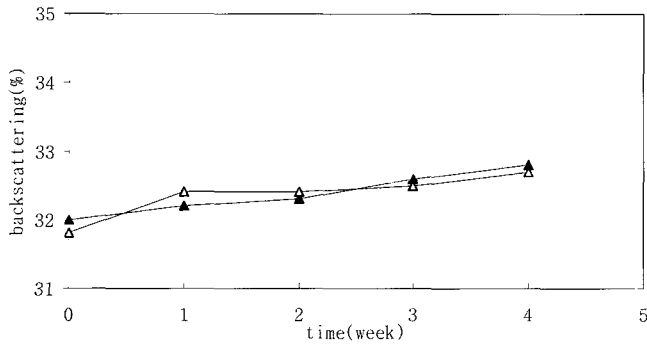


Figure 9—Stability of cubosome B01(backscattering change) with storage time measured by Turbiscan[®] LAB at different temperature (25°C(△), 45°C(▲)).

한편, Figure 9에서 볼 수 있듯이 PERA를 0.1 wt% 함유한 큐보솜의 경우에서도, 각각의 보관조건에서 시간에 따른 후방산란의 변화 정도는 약 0.5%이내로 크지 않았으며 온도에 따른 차이도 거의 없었다. 이는 큐보솜 B00에서와는 달리 계면활성능이 강한 PERA의 첨가에 따라 Poloxamer[®] 407이 계에 미치는 영향이 상대적으로 적었기 때문으로 사료된다. 또한 B02 및 B03의 시료도 PERA의 영향이 관찰되었으나 B01과 유사한 양상을 보였으며 이는 PRRA의 계면활성능에 기인한 것으로 사료된다.

Cryo-TEM에 의한 관찰

제조된 큐보솜의 나노 입자를 Cryo-TEM을 이용하여 관찰한 결과 Figure 10~11과 같이 내부에 규칙적인 입방상 격자구조를 갖는 구형의 나노 입자의 형성을 확인할 수 있었다. Figure 10에서 볼 수 있듯이 PERA를 함유하지 않은 큐보솜 B00의 경우 입자가 클수록 입자상 격자 구조를 잘 형성하는 반면 일부에서는 라멜라 또는 리포솜 형태의 구조를 형성하고 있는 것으로 보인다. 한편 Figure 11에서는 PERA를 0.1 wt% 함유하고 있는 큐보솜 B01의 경우도 비교적 입방상의 격자구조를 형성하고 있다.

보습효과

입방상 액정젤의 피부 외용제적 응용 가능성을 알아보기로 자 사람 피부에 대하여 시간에 따른 수분 증가율을 O/W 에 멀전 제형과 비교하여 측정하였다. 측정은 Skicon[®] 200과 Corneometer[®] CM 820을 이용하였는데, 두 가지 측정방법에 있어서 수분증가율은 약간 다르게 측정되었지만 시간에 따른 경향은 유사한 양상을 보였다.

Figure 12에 나타난 바와 같이 Skicon[®] 200과 Corneometer[®]방법 모두에서 시료 도포 후 3시간까지는 입방상액정젤 도포부위의 수분 보유량이 높았으나, 6시간 후에는 두 가

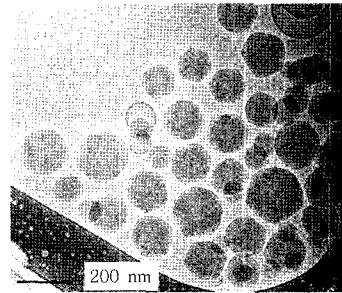


Figure 10—Cryo-TEM image of cubosome B00 formed by liquid precursor dilution method.

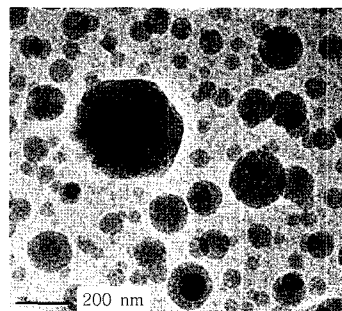


Figure 11—Cryo-TEM image of cubosome B01 formed by liquid precursor dilution method.

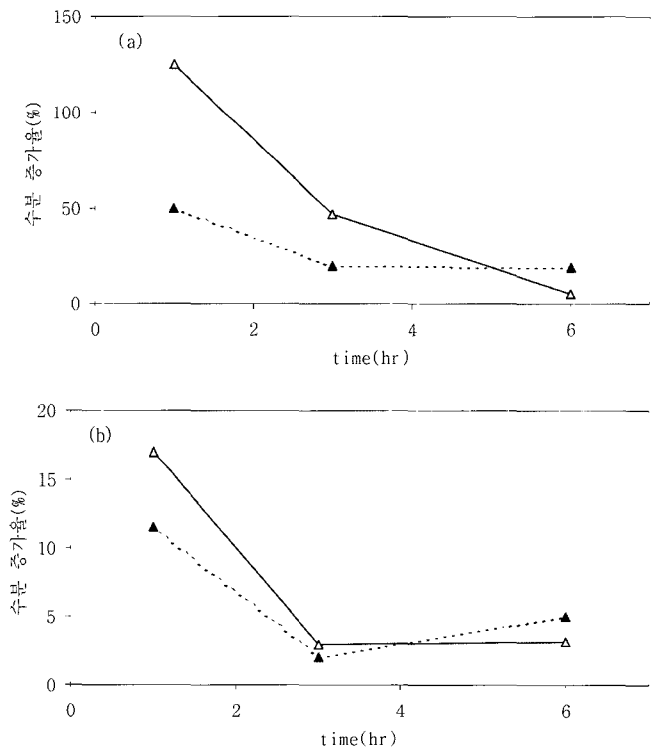


Figure 12—Increasing rate of skin moisture content with application of cubic liquid crystalline phase gel (-△-) and O/W emulsion (-▲-) determined by Skicon[®] 200(a) and Corneometer[®] CM820(b).

Table IV—Bound Water Content of Cubic Liquid Crystalline Phase Gel and O/W Emulsion by Differential Scanning Calorimeter

Sample	Total water(%)	Free water(%)	Bound water(%)
O/W 00	35.0	0.16	38.84
CB 00	35.0	5.39	29.61

지 제형에서 비슷하거나 오히려 O/W 에멀전에서 약간 높게 나타났다. 이것은 입방상 액정젤이 일반 에멀전 제제와는 다르게, 피부에서 폐쇄성 막이 아닌 통기성 막을 형성함에 기인된 것으로 생각된다.

한편 DSC를 이용하여 측정된 결합수량을 Table IV에 나타내었다. 여기에서 보듯이, 결합수량은 입방상 액정젤 보다 O/W 에멀전 제제에서 높게 나타났는데, 이는 O/W 에멀전 제제 내에 포함된 고급 알코올인 세틸 알코올 및 글리세릴 모노스테아레이트로부터 기인된 액정구조의 형성에 기인된 것으로 추정된다. 또한 이들 결과로부터 입방상 액정젤의 경우, 이연속적 구조에 의해 두 부분으로 격리된 수상 통로를 갖고 있으나 여기에 포함된 물이 모두 결합수 상태로 존재

Table V—Permeated and Accumulated Amount of PERA at 24h after Application in Excised Pig Skin

	Cubic phase gel	O/W emulsion
Permeated amount of PERA ($\mu\text{g/mL}$)	1.387 ± 0.392	6.658 ± 1.154
Accumulated amount of PERA ($\mu\text{g/mL}$)	2.950 ± 0.625	0.900 ± 0.173

하지는 않는 것으로 추정할 수 있다. 이는 앞의 Skicon[®] 200이나 Corneometer[®] CM 820을 이용한 측정결과에서, 6시간 후에 입방상 액정젤이 O/W 에멀전 제제에 비하여 수분증가율이 감소한 것에도 연관된다고 볼 수 있다.

경피흡수 및 피부 침적 효과

돼지 피부에 대한 경피 흡수 측정 결과를 Figure 12~13에 나타내었다. 먼저, 투과된 PERA의 양은 입방상 액정젤 제형에 비해 O/W 제형에서 더 높게 나타났다. Figure 12 및 Table V에서 볼 수 있는 바와 같이 24시간 후 흡수된 PERA의 양은 입방상 액정젤에서는 $1.387 \pm 0.392 \mu\text{g/cm}^2$ 인 반면, O/W 에멀전 제제에서는 $6.658 \mu\text{g/cm}^2$ 로 높게 나타났다.

경피흡수 실험 24시간 후 피부에 잔존하는 PERA의 경우에는 입방상 액정젤에서 $2.950 \pm 0.625 \mu\text{g/mL}$ 인 반면, O/W 에멀전 제제에서는 $0.900 \pm 0.173 \mu\text{g/mL}$ 로 나타났다. 이는 O/W 에멀전 제제에 비하여 입방상액정젤 제제의 경우가 피부에서 보다 오래 머무르는 것으로 해석할 수 있으며, 보다 장시간 지속적으로 작용하게 된다는 것을 예상할 수 있다.

결 론

본 연구에서는 피부 주름개선 및 여드름 치유 등에 효과적인 약물로 알려진 PERA를 입방상 액정젤 및 큐보솜 제형을 적용하고 분석하여 물리화학적 특성들을 연구하였다. 또한 일반적으로 피부의용제로 가장 많이 사용되는 제제인 O/W 형태의 에멀전 제제와 비교하여 입방상 액정젤이 유효성분의 안정성 및 경피 흡수에 미치는 영향 등을 검토하였다.

1. PERA에 대한 경시 안정성을 측정한 결과 통상의 O/W 에멀전 제제 내에서 보다 입방상 액정젤 내에서 상대적으로 안정한 것을 확인하였다.

2. 입방상 액정젤을 희석하는 방법으로 제조된 큐보솜의 경우, 큐보솜의 입자 크기는 액상 전구체의 농도에 따라 15 wt%까지는 증가하였으나 그 이후로는 감소를 보이며 같은 액상 전구체 농도에서는 고압유화기의 압력이 클수록 입자 크기는 작아지며 통과 횟수는 큰 영향이 없었다. 또한 PERA의 농도 증가에 따라 큐보솜의 입자 크기는 감소했다.

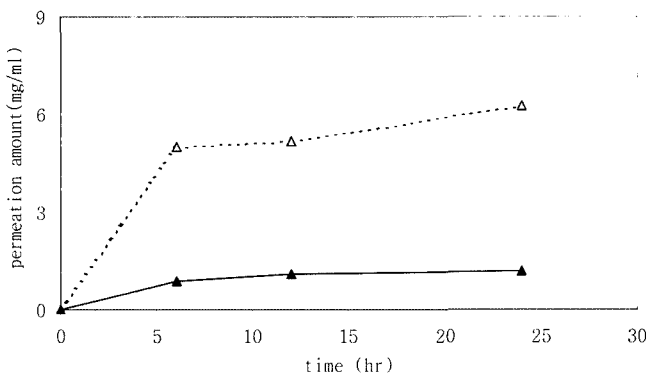


Figure 13—Amount of permeated PERA after application of topical formulations in excised pig skin(Δ : O/W emulsion and \blacktriangle : cubic liquid crystalline gel).

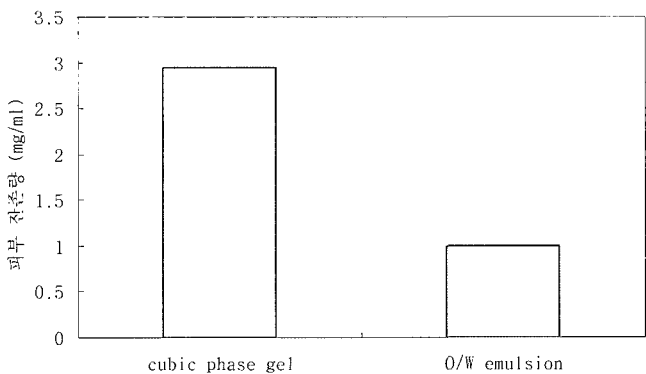


Figure 14—Amount of accumulated PERA after application of topical formulations in excised pig skin.

3. 큐보솜에 대한 Cryo-TEM 분석 결과로부터 큐보솜 나노입자 내부에 입방상 격자구조를 형성하는 것으로 확인할 수 있었으며 이 구조는 PERA를 첨가한 경우에도 잘 유지되는 것을 확인하였다.

4. 입방상 액정젤 제제는 O/W 에멀전에 비해서 초기 3시간까지는 보습효과가 높으나 6시간 후에는 오히려 보습효과가 떨어지는 것으로 나타났는데 이것은 입방상 액정젤의 경우 피부에 폐쇄막을 형성하지 않으며 결합수량이 상대적으로 감소하였기 때문으로 생각된다.

5. PERA에 대한 경피흡수 실험 및 피부 침적 실험결과로부터 입방상 액정젤은 O/W 에멀전 제제에 비하여 피부에 투과된 PERA의 양은 적으나 피부 내에 존재하는 양은 많은 것으로 확인되었으며 이를 통하여 입방상 액정젤은 피부 조직 내에 보다 장시간 존재하며 상대적으로 오랫동안 작용하는 것으로 예상할 수 있다.

이상의 결과들로부터, 입방상 액정젤은 친수성 지질의 일종인 글리세릴 모노올레이트의 특이적 구조에서 기인된 여러 가지 물리화학적 특성으로 그 자체로도 피부적용제제로서 약물의 안정화 및 서방화 제제로서 다양한 이용이 가능할 것으로 생각되며, 입방상 액정젤을 수용액에 나노 입자 크기로 분산시킨 큐보솜 또한 식품이나 화장품 및 의약품용 기재로서 많은 응용이 기대된다.

참고문헌

- O.-H. Mills and A.-M. Kligman, Treatment of acne by vitamin A (Retinol). *Seminars in Derm.*, **1**, 245-249 (1982).
- Y.-S. Song, B.-Y. Chung, S.-G. Park, M.-E. Park, S.-J. Lee, W.-G. Cho and S.-H. Kang, Polyethoxylated retinamide as an anti-wrinkle agent, *Cosmetics and Toiletries*, **114**(6), 53-58 (1999).
- H. Oikarinen, A. Oikarinen, E. Tan, R. Abergel and C. Meeker, Modulation of procollagen gene expression by retinoids, *J. Clin. Invest.*, **75**, 1545-1553 (1985).
- R. Beach and C. Kenny, Vitamin A augments collagen production by corneal endothelial cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **114**, 395-402 (1983).
- M. Tanaka, Recent development of skincare products in japan from the biological standpoint, *Fragrance J.*, **9**, 13-23 (1994).
- S.-G. Alderson, M.-D. Barratt and J.-G. Black, Effect of 2-hydroxy acids on guinea-pig footpad stratum corneum, *Int. J. Cosmet., Sci.*, **6**, 91-100 (1984).
- A.-M. Kligman, Topical tretinoin: indications, safety, and effectiveness, *Cutis.*, **39**(6), 486-488 (1987).
- T. Shukuwa, A.-M. Kligman, M. Christenser and T. Stoudemayer, The effect of short-term topical tretinoin on photo-damaged skin, *J. Dermatological Science*, **4**, **2**, 137-146 (1992).
- P. Morganti, B. James and S. D. Randazzo, The effect of gelatin-glycine on skin hydration, *J. Appl. Cosmetol.*, **8**, 81-88 (1990).
- J. Schreiber and H. Albrecht, Hair care products with disperse liquid crystals exhibiting the cubic phases, DE Patent App. 10,057,769 (2002).
- W. Leesajakul, M. Nakano, A. Taniguchi and T. Handa, Interaction of cubosome with plasma components resulting in the destabilization of cubosomes in plasma, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **34**, 253-258 (2004).
- E.-J. Van Scott and R.-J. Yu, Alpha hydroxy acids: therapeutic potentials, *Canadian J. Dermatol.*, **1**, 108-112 (1989).
- E. Tom, Long term effects after topical application of active palmitate, *J. Appl. Cosmetol.*, **12**, 25-30 (1994).
- J.-H. Fendler, *Membrane mimetic chemistry*, Wiley Intersciences. New York, USA, pp. 158-18 (1982).
- R.-M. Handjani-Vila, A. Riber, B. Rondot and G. Banlerghie, Dispersions of lamellar phase of non-ionic lipids in cosmetic products, *Int. J. Cosmet. Sci.*, **1**, 303-314 (1979).
- L. Tomas and L. Kare, Particles, method of preparing said particles and uses thereof, US Patent 5,531,925 (1996).
- M. Nakano, A. Sugita, H. Matsuoka and T. Handa, Small-angle X-ray scattering and ¹³C NMR investigation on the internal structure of Cubosomes, *Langmuir*, **17**, 3917-3922 (2001).
- P.-T. Spicer and K.-L. Hayden, Novel process for producing cubic liquid crystalline nanoparticles (Cubosomes), *Langmuir*, **17**, 5748-5756 (2001).
- M. Almgren, K. Edwards and J. Gustafsson, Cryo transmission electron microscopy of thin vitrified samples. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, **1**, 270-278 (1996).
- M. Almgren, K. Edwards and G. Karlsson, Cryo transmission electron microscopy of liposomes and related structure, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **174**, 3-21 (2000).
- E. Esposito, M. Drechsler, P. Mariani, E. Sivieri, R. Bozzini, L. Montesi, E. Menegatti and R. Cortesi, Nanosystems for skin hydration: a comparative study, *International J. of Cosmetic Science*, **29**, 39-47 (2007).