

초임계유체를 이용한 우르솔산 함유 고체 가용화 제제의 제조

¹이 상 윤 · ¹정 주 희 · ¹정 인 일 · ²최 문 재 · ²박 의 훈 · ¹유 종 훈 · † ¹임 교 빈
¹수원대학교 공과대학 화공생명공학과, ²네비온(주)
(접수 : 2007. 7. 23., 게재승인 : 2007. 10. 16.)

Preparation of Water-Soluble Solid Forms Containing Ursolic Acid Using Supercritical Fluid

Sang-Yun Lee¹, Ju-Hee Jung¹, In-Il Jung¹, Moon-Jae Choi², Eui-Hoon Park², Jong-Hoon Ryu¹, and Gio-Bin Lim^{† 1}

¹Department of Chemical and Biochemical Engineering, The University of Suwon, Gyeonggi-do, Korea

²Nebion Co., Ltd., Sangdaewon-dong, Jungwon-gu, Seongnam-si, Gyeonggi-do, Korea

(Received : 2007. 7. 23., Accepted : 2007. 10. 16.)

In this work ursolic acid (UA), a poorly water-soluble compound, was inclusion complexed with 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin (HP-β-CD) by various methods such as kneading, solvent evaporation and two types of supercritical fluid processes. The solubility and characteristics of these UA/HP-β-CD complexes were investigated by scanning electron microscopy, x-ray diffraction and HPLC. The water solubilities of the two complexes obtained from solvent evaporation and ASES processes were observed to increase up to 6~240 folds and 12~56 folds, respectively, compared with that of unprocessed UA. The stability of UA/HP-β-CD complex samples in cosmetic formulations was examined at various temperatures for one month. The UA/HP-β-CD complex prepared by solvent evaporation was found to be most stable among all the cosmetic formulations tested in our experiments.

Key Words : Ursolic acid, cyclodextrin, solubility, supercritical fluid, stability

서 론

화장품 산업은 다양한 기술이 접목되는 종합과학적인 산업분야이며 지속적인 성장이 예측되고 있다. 현재 화장품산업에서 기능성 화장품이 차지하는 비율은 빠른 속도로 증가하고 있는 추세이며 특히, 주름개선, 미백, 자외선 차단, 여드름 억제, 피지 조절 등에 효과가 있는 제품에 대한 소비자의 요구와 시장의 확대가 예상되고 있다. 이러한 기능성 화장품은 고부가가치를 창출 할 수 있는 제품군이며 이를 위한 소재기술은 매우 중요한 위치를 차지하고 있다. 화장품 산업에서의 소재기술은 새로운 소재의 개발과 기존의 유효물질을 보다 효율적으로 이용할 수 있는 제형의 개발로 대변될 수 있다. 또한, 기존의 단순한 피부 보호 차원의 화장품 개념에서 벗어나 제약분야의 약물전달시스템의 개념을 도입한 피부 흡수 증진, 나노기술의 도

입 및 난용성 유효물질의 가용화 기술 등의 신기술이 개발되어 빠른 속도로 제품에 적용되고 있는 상황이다.

우르솔산 (Ursolic Acid)은 $C_{30}H_{48}O_3$ 의 분자식과 456.76 Da의 분자량을 가지며 사과, 배, 로즈마리 등 여러 식물체에 함유되어 있는 것으로 알려져 있으며(1-3), 소염(4) 및 주름개선에 탁월한 효능이 있는 것으로 보고된 물질로서 주름개선 효과가 있는 레티놀이나 Alpha Hydroxy Acids (AHA)의 피부 부작용을 극복할 수 있는 원료로 주목받고 있으나 물에 대한 용해도가 매우 낮아 화장품 제형에 응용하기 쉽지 않다는 문제점을 갖고 있다. 이와 같은 난용성 유효물질의 경우 계면활성제의 이용, 용해력 증가를 위한 유기용매의 첨가(5), 시클로덱스트린 (cyclodextrin)과 그 유도체를 이용한 포접복합체 (inclusion complex)의 형성(6-8), polyethylene glycol 등의 수용성고분자를 이용한 고체 분산체의 형성(9, 10), 에멀전 방식을 이용한 리포솜의 생성 등 다양한 방법을 이용하여 난용성 유효물질의 용해도를 향상시키려는 노력이 진행되어 왔으나, 최종제품 내에서의 안정성, 유기용매 사용에 따른 독성 문제, 복잡하고 다단계로 구성된 제조방법, 에너지 소비적인 공정, 다량의 폐유기용매 및 폐계면활성제 등의 배출로 인한 환경오염, 낮은 수율, 고비용, 열민감성 물질의 효능 감소, 최종 제품

† Corresponding Author : Department of Chemical and Biochemical Engineering, The University of Suwon, Gyeonggi-do, Korea

Tel : +82-31-220-2243, Fax : +82-31-220-2528,

E-mail : gblim@suwon.ac.kr

내의 잔류 유기용매 등 개선되어야 할 중요한 문제점이 남아있는 실정이다.

본 연구에서는 환경친화적 대체 기술의 하나로 연구되고 있는 초임계유체 (supercritical fluid, SCF)를 이용한 미세입자 및 용해성이 증가된 유효물질 제제의 제조기술에 대한 연구를 수행하고자 하였으며 특히 시클로덱스트린과의 포접복합체 형성을 중점적으로 검토하였다(11-13). 초임계 공정을 이용한 난용성 물질과 시클로덱스트린의 포접복합체 제조의 경우 대상물질과 시클로덱스트린을 막자사발 또는 믹서 등 균질기를 사용하여 물리적으로 혼합한 후 이를 회분식 반응기에 넣은 후 이산화탄소 등 소량의 초임계유체를 주입하고 일정 시간을 방치하여 포접화합물을 제조하는 방법에 대한 연구가 보고되었다(14-17). 또한 대상 물질을 초임계 이산화탄소를 이용하여 추출한 후 추출된 물질이 함유되어 있는 초임계유체를 시클로덱스트린이 충전된 컬럼을 통과시켜 포접화합물을 제조하는 방식의 추출 및 함침 공정에 대한 연구도 발표되었다(18). 본 연구에서는 회분식 또는 준연속식 초임계유체를 이용한 입자제조 공정을 도입하여 우르솔산과 시클로덱스트린간의 포접복합체 형성 제제의 제조 가능성과 제조된 포접복합체의 화장품 제형 내에서의 기초적 특성을 검토하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 연구에서 사용되어진 우르솔산 (UA)는 95% 순도의 러시아 Nonosibirsk Institute of Organic Chemistry의 제품을 구입하여 후속 정제 과정 없이 사용하였다. UA와 포접체 형성을 위한 시클로덱스트린 (CD)은 치환기가 없는 γ -cyclodextrin (γ -CD, Aldrich, USA)과 hydroxypropyl 기로 치환된 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD, Aldrich, USA)을 사용하였으며 HP- β -CD의 경우 hydroxypropyl기의 몰치환도(molar degree of substitution)는 0.6이었다. 초임계유체로는 99.95% 순도의 이산화탄소를 사용하였으며 UA와 HP- β -CD를 용해시키기 위한 용매로는 ethanol 또는 methylene chloride와 ethanol의 혼합용액을 사용하였다. 실험에 사용된 모든 용매의 경우 Fisher사의 시약급 또는 HPLC급 시약을 사용하였다.

팽창도 측정

초임계유체 공정을 이용한 포접체 제조실험을 수행하기 전에 있어 기초적으로 요구되는 유기용매와 초임계유체로 선정된 이산화탄소간의 혼합 (팽창) 특성을 검토하였다. 초임계유체 내에서의 용매의 팽창도 측정은 초임계유체 공정에 적용할 수 있는 유기용매 도입의 타당성을 검증하는 기초자료를 얻기 위한 실험으로, 계면 상승을 통한 팽창도를 측정하여 용매와 초임계 이산화탄소가 단일상을 이루는지의 여부를 측정하는 방식을 이용하였다. 팽창도는 항온상태로 유지되고 내부 관찰이 가능한 고압 반응기를 사용하여 압력변화에 따라 측정되었다. 팽창도 측정을 위

한 용매를 반응기내에 일정량 (약 5~10 mL)을 주입하고 온도 조절기를 통하여 반응기내의 온도가 정상 상태의 조건에 도달하면 고압펌프를 이용하여 이산화탄소를 선정된 관찰압력으로 반응기내로 투입하였다. 반응기내로의 이산화탄소 투입은 단계적인 압력 증가로 이루어졌으며 측정 조건의 압력부근에서의 미세한 조절을 위하여 미세 압력 조절기를 이용하였다. 모든 조건의 조작이 완료된 후 시간의 경과에 따른 용매의 부피 팽창을 측정하였으며 이때 이산화탄소와 유기용매간의 접촉을 증대시키기 위하여 고압순환펌프를 이용하여 상단의 이산화탄소를 하단부의 용매상으로 순환시켰다. 용매의 팽창도는 초기 주입된 용매에 대한 팽창 후의 부피 백분율로서 규정하였다.

UA/HP- β -CD의 물리적 혼합물 및 가용화 제제 제조

UA의 가용화 제제 제조를 위한 한 방법으로 물리적 혼합물, 반죽법 및 용매증발법을 이용하였다. 물리적 혼합물의 제조를 위해 1 : 1의 몰비에 해당하는 UA와 HP- β -CD를 막자사발에 넣고 약 30분간 균일하게 혼합한 후 표준체 (mesh No. 120)를 이용하여 혼합물이 균일하게 혼합되도록 하여 제조하였다. 반죽법과 용매증발법의 경우 Minqua 등(19)이 제시한 방법을 참조하여 수행하였다. 반죽법에서는 동일 몰비를 지니는 UA와 HP- β -CD를 막자사발에 넣은 후 소량의 물을 가하며 약 30분간 막자를 이용하여 반죽하였으며 제조된 혼합물을 35°C의 진공 건조기에서 48시간 동안 건조하여 수분을 제거한 후 제조물을 일정 크기 이하로 분쇄하였다. 용매증발법의 경우 UA와 HP- β -CD를 95 vol%의 에탄올과 20 vol%의 에탄올에 각각 용해시킨 후 두 용액을 혼합하여 45°C의 감압회전증발기를 이용하여 건조하였으며 이후 35°C의 진공 건조기에서 48시간 동안 추가로 건조하여 수분을 충분히 제거한 후 제조물을 일정 크기 이하로 분쇄하였다. 또한 에탄올과 같은 유기용매를 사용하지 않고 수용액을 사용한 경우에는 Suzuki 등(20)에 의해 제안된 방법에 따라 일정비율의 UA와 HP- β -CD를 3%의 sodium bicarbonate가 포함된 증류수에 분산시킨 후 실온에서 균질교반기 (homogenizer)를 이용하여 12,000 rpm의 속도로 20분간 교반하였다. 이를 55°C에서 감압회전증발기를 이용하여 건조하고 35°C의 진공 건조기에서 48시간 동안 추가로 건조하여 수분을 제거한 후 제조물을 일정 크기 이하로 분쇄하였다. 용해도 측정 등을 통하여 여러 UA 가용화 제제의 용해성 향상 정도를 검토하였다.

초임계유체 공정을 이용한 UA 가용화 제제 제조

UA와 HP- β -CD의 포접화합물의 제조를 위한 초임계유체 공정으로 회분식공정과 반연속식 ASES (Aerosol Solvent Extraction System)공정을 적용하여 제조공정의 효율성을 검토하였다. 회분식 초임계유체 공정을 이용한 포접체 제조 방법에서는 일정량의 UA와 대하여 일정한 몰비에 해당하는 HP- β -CD를 막자사발을 사용하여 균질하게 혼합한 후 혼합한 시료를 10 mL의 내용적을 지니는 회분식 고압 반응기에 투입하여 포접체를 제조하였다. UA와 HP- β -CD 간의 포접체 형성을 위한 매질로는 고압상태의 이산화탄소

를 사용하였으며 초임계유체로 선정된 이산화탄소를 고압 정량주사펌프 (ISCO, 260D, UAS)를 이용하여 일정 압력으로 주입하였다. UA와 HP- β -CD의 혼합물과 이산화탄소로 채워진 고압 반응기는 반응기 외부의 열선과 이를 제어하는 온도조절기에 의해 일정한 온도로 유지될 수 있도록 하였다. 실험온도에서 일정시간 방치시킨 후 반응기내의 이산화탄소를 빠른 속도로 대기 중으로 방출하였으며 반응기내의 UA/HP- β -CD 혼합물의 용해도 측정 등 특성분석을 통하여 포접 정도를 확인하였다.

초임계유체를 이용하여 미세입자를 제조하는 여러 방법 중 ASES의 경우 대상물질을 유기용매 등에 용해시킨 후 용액상태로 초임계유체가 채워있는 고압 침전기내로 노즐을 통하여 분사하여 미세 액적을 형성시키고 액적내의 유기용매와 초임계유체간의 빠른 물질전달에 의해 유도되는 대상물질에 대한 용매의 용해력 저하로 인한 과포화 상태의 형성과 핵 생성 및 입자 성장단계를 거쳐 미세입자가 형성하게 된다.

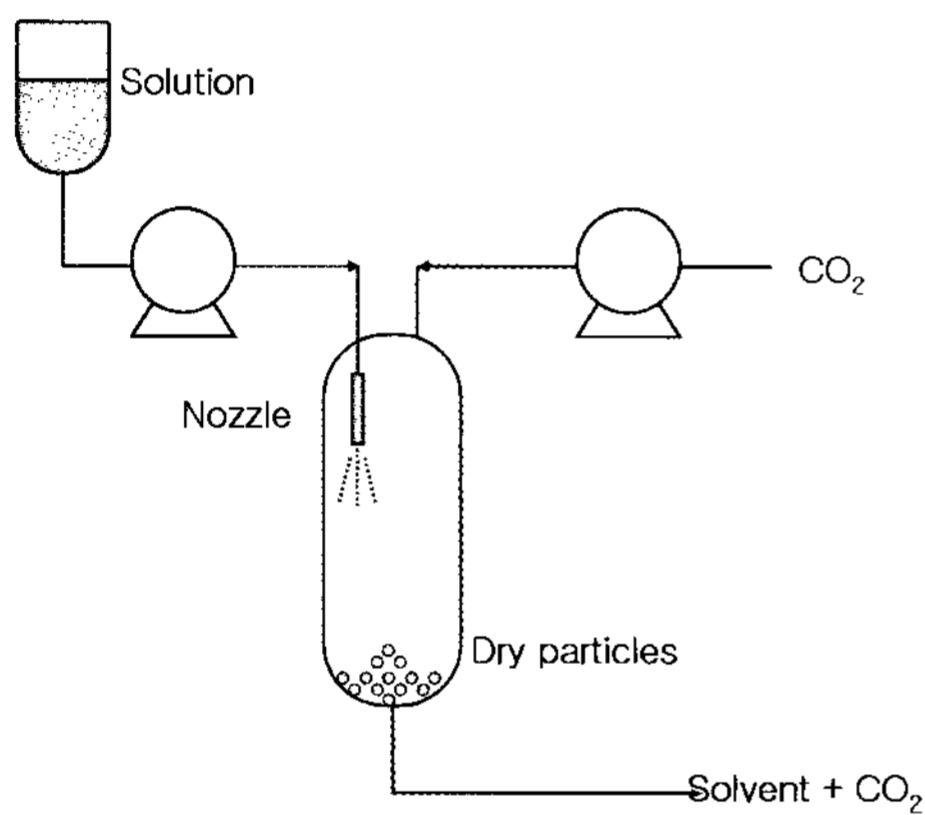


Figure 1. Schematic diagram of ASES process.

본 연구에서 사용된 ASES 공정은 Fig. 1에 나타난 것과 같은 형태로 구성되어 있으며, 크게 이산화탄소 공급펌프, 용액의 주입 및 분사를 위한 고압 정량펌프 및 노즐, 입자형성이 일어나는 고압 침전기 등으로 이루어져 있다. 액화상태의 이산화탄소는 후방압력조절기 (back-pressure regulator, 26-1700, Tescom, USA)에 의해 일정한 압력으로 조절되며 액체 고압 펌프 (Lewa, EL-1, Germany)에 의해 고압 침전기의 상단으로 이송되어 연속적으로 공급된다. Ethanol 또는 methylene chloride와 ethanol 혼합용액에 완전히 용해된 일정 물비의 UA와 HP- β -CD를 포함하는 혼합용액은 주사형 고압 정량펌프 (syringe pump, 100DX, ISCO, USA)에 의해 침전기의 상단에 장착되어진 내경 127 μ m의 노즐로 공급하여 침전기 내부의 초임계 이산화탄소상으로 연속적으로 분사되도록 하였다. 이산화탄소상에서 입자형성 단계를 거친 UA와 HP- β -CD의 포접복합체는 고형의 분체상태로 침전되었다. 침전기 하단에는 0.5 μ m의 공극을 지니는 필터를 장착하여 침전된 결과물의 수집이 이루어지도록 하였다. ASES 공정에 사용된 유기 용매는 침전기 이후에 구성된 용매 회수부에서 감압에 의해 자발적인 분리와 회수가 이루어지도록 하였다.

분석방법

제조된 분체상태의 포접복합체는 주사전자현미경 (scanning electron microscope, SEM, JSM-5200, JEOL, USA)으로 입자의 크기와 형상을 관찰하였으며, X-선 회절분석기 (x-ray diffractometer, D8 Advance, Bruker Axs, German)를 사용하여 포접체의 결정성 변화를 분석하였다. 고체상태의 특성 비교를 위하여 UA와 HP- β -CD 원료물질과 물리적 혼합물 (physical mixture)을 동시에 측정하여 비교대상으로 하였다.

UA, HP- β -CD 원재료 및 물리적 혼합물과 초임계유체 공정을 비롯한 다양한 방법을 통하여 제조된 UA/HP- β -CD 포접복합체의 용해도를 증류수를 사용하여 측정하였다. 2 mL의 증류수에 과량 (약 20 mg)에 해당하는 원료 UA 또는 포접체 분체를 가하고 밀봉한 후 약 20분간 초음파로 처리한 후 25°C의 항온조에서 24시간 150 rpm의 속도로 교반하며 방치하여 충분한 포화상태를 이루도록 하고 다시 24시간을 교반 없이 방치하여 안정화 상태를 형성하도록 하였다. 평형상태에 이른 혼탁 용액을 4,000 rpm으로 15분간 원심분리한 후 상등액을 분획하여 0.45 μ m 멤브레인필터 (Waters, USA)를 통해 여과하고 수용액 내의 UA 함량을 분석하였다. 용해도 측정을 위한 수용액 중의 UA 함량 측정은 HPLC (600 Series, 717 Autosampler, Waters, USA)를 이용하여 분석하였으며, 분석에 사용된 칼럼으로는 ODS Hypersil (5 μ m, 150 \times 4.6 mm, Thermo Electron, USA)을 사용하였다. 이동상으로는 acetonitrile과 물을 9 : 1 (v/v)의 비율로 혼합하여 1.0 mL/min의 유속으로 사용하였으며, 210 nm의 파장에서 검출하여 미리 작성된 표준 곡선을 이용하여 UA의 함량을 계산하였다.

화장품 제형에서의 안정도 및 탁도 측정

여러 방법으로 제조된 시료에 대한 화장품 제형 중의 일반 원료와의 상용성 (compatibility) 분석을 위해 시간의 경과에 따른 제형 내에서의 안정성과 탁도를 검토하였다. 안정성 시험은 가용화제형과 유화제형 두가지 경우에 대하여 수행하였으며 각각의 경우 일반적인 사용농도 이상의 UA를 함유한 가용화 및 유화 제품을 처방하여 조제하였다. 이때 사용된 UA의 양은 가용화제형의 경우 0.3~1.0%였으며 유화제형의 경우 1~2%로 하였다. 제조된 가용화제형과 유화제형에 대하여 냉장상태, 30°C, 45°C에서의 안정도 실험을 한 달간 수행하여 시간에 따른 제형의 변화를 관찰하였다. 또한 투명한 제형인 가용화제형의 경우 원료 투입량 변화에 대하여 30°C에 방치한 제형의 탁도변화를 탁도 관련 규정인 USEPA Method 180.1 중 설계지침인 “감지기의 광 스펙트럼은 400~600 nm 대역의 파장을 갖는 빛일 것”을 참조하여 500 nm의 red 파장을 선택하여 측정하였다. 탁도의 측정을 위해 자외선으로 측정 가능한 투과도 (Transmittance) 값을 이용하였으며, 투명한 물에 대한 투과도 값이 약 1인 점을 고려하여 기준값으로 선정하였다. 즉, 추정 파장에 대한 빛이 조사되었을 경우 모두 투과하면 ‘1’로, 투과하지 못하면 ‘0’으로 설정하고 탁도 값은 투과도를 1에서 뺀 값으로 규정하였다.

결과 및 고찰

이산화탄소 내에서 유기용매의 팽창도

본 연구에서 사용한 초임계유체 공정 중 회분식의 경우 초임계유체인 이산화탄소 또는 소량의 공용매를 포함한 초임계이산화탄소 상이 대상물질인 UA를 용해시키고 이를 HP-β-CD의 공동 (cavity) 구조내로 이동시켜 포접화합물을 형성하는 기본 과정으로 구성되어 있으며, 반연속식 ASES 공정도 용질이 유기용매에 용해되어 있는 상태에서 침전기내로 분무되어 초임계 유체와의 접촉을 통해 유기용매의 팽창이 이루어지며 이로 인한 액적내 용해력 감소로 유도된 용질의 과포화 상태를 거쳐 입자가 형성되는 과정으로 이루어져 있다. 본 연구에서는 대상물질인 UA와 포접복합체 형성을 위한 HP-β-CD를 용해시킬 수 있는 유기용매로서 화장품 제제에 사용 가능하며 피부에 대한 저자극성과 낮은 독성을 지니고 있는 ethanol과 비교적 높은 휘발성을 지니고 있는 methylene chloride를 선정하였으며 이들 각각의 용매에 대한 온도, 압력의 변화에 따른 팽창도를 측정하였다.

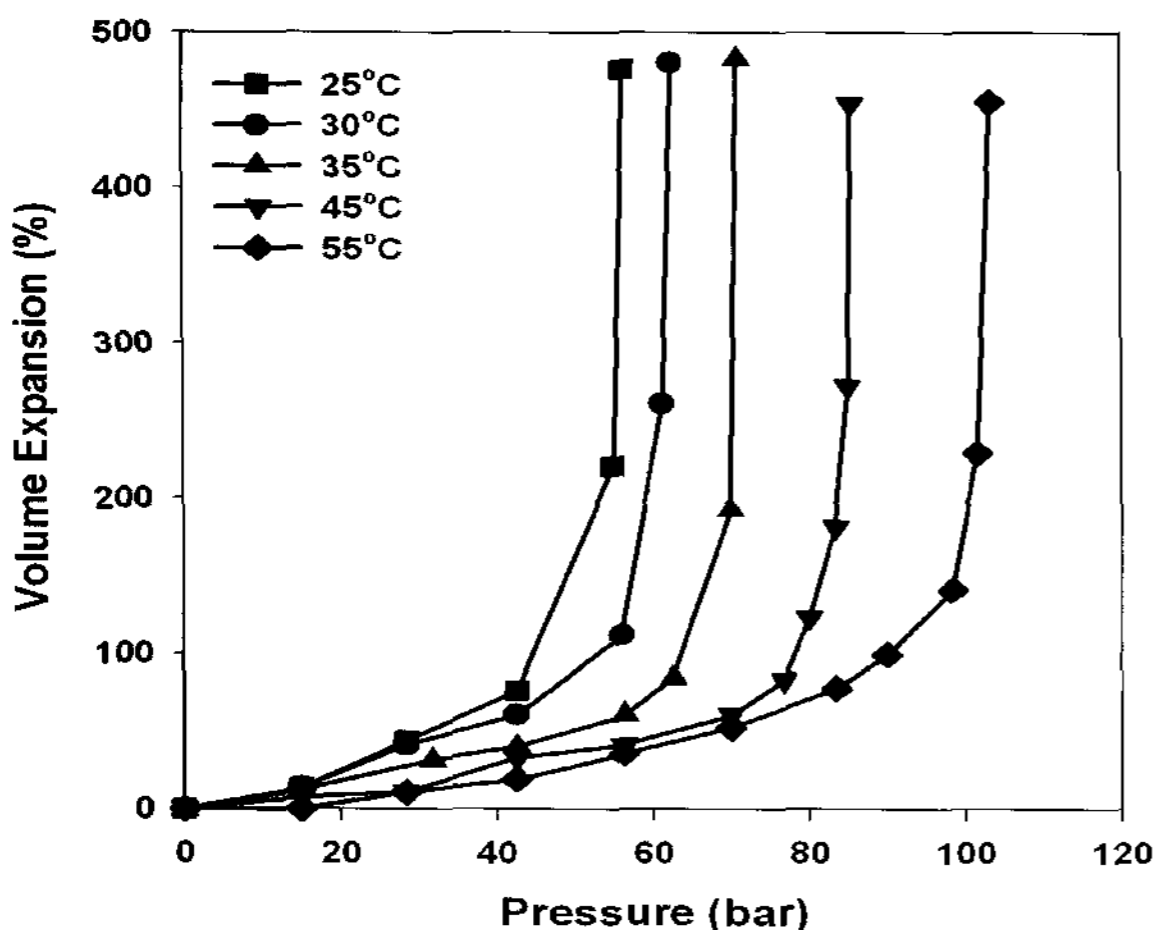


Figure 2. Volume expansion of ethanol in supercritical carbon dioxide.

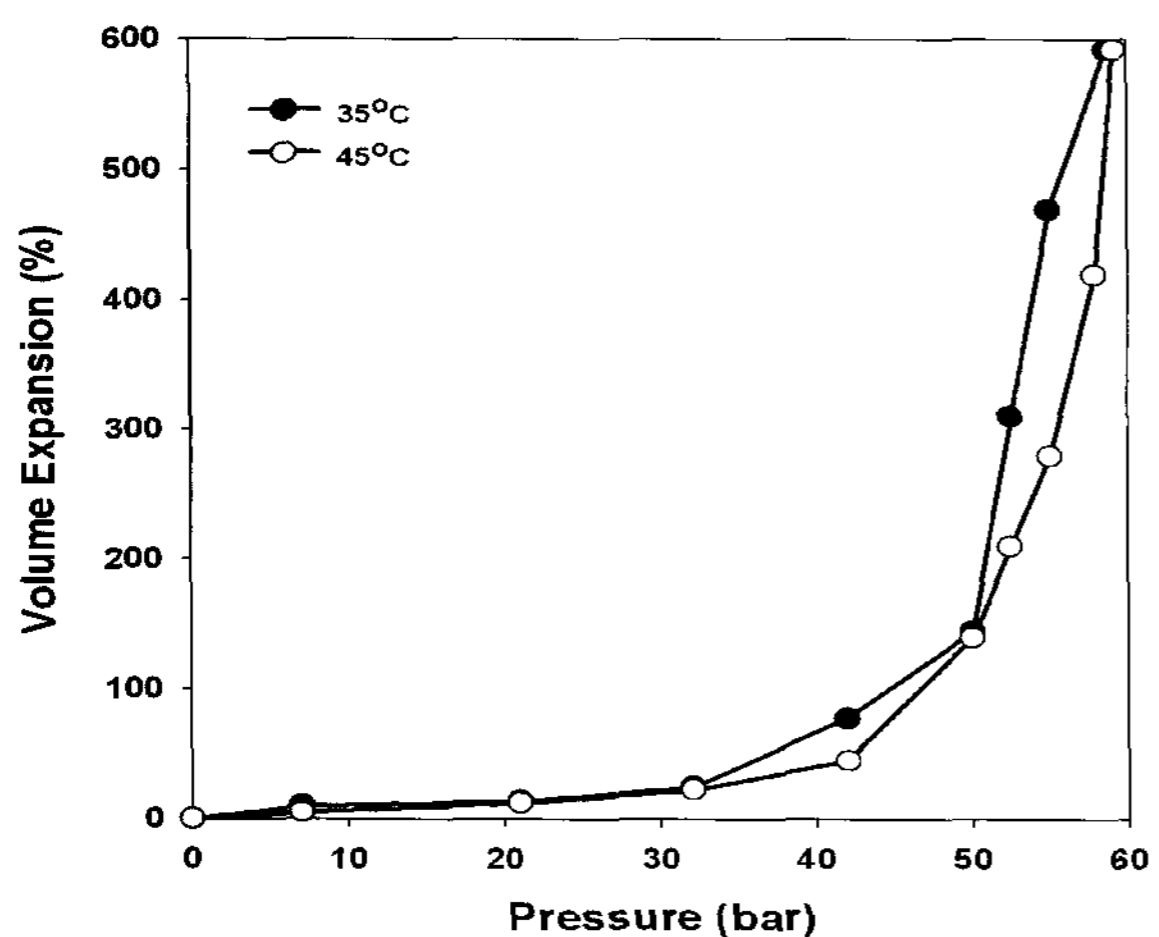


Figure 3. Volume expansion of methylene chloride in supercritical carbon dioxide.

각 용매들의 경우 Fig. 2와 Fig. 3에 제시된 바와 같이 이산화탄소 내에서 동일한 경향의 팽창도 변화를 보였으며 주어진 측정 온도에서 압력이 상승함에 따라 팽창도는 낮은 압력에서는 서서히 증가하다가 일정 압력에 접근하면 급격히 증가하여 500% (v/v) 이상의 팽창도를 보여 용매가 초임계 이산화탄소와 완전히 혼합되어 단일상을 형성하고 온도가 높을수록 동일한 정도의 단일상을 이루는데 요구되는 압력이 증가되는 현상을 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 통하여 ethanol 또는 methylene chloride를 용매로 사용할 경우 25°C 이상의 온도에서는 60 bar 이상의 압력으로 조업하는 것이 유기용매와 이산화탄소간의 우수한 혼합을 유도할 수 있음을 확인할 수 있었다.

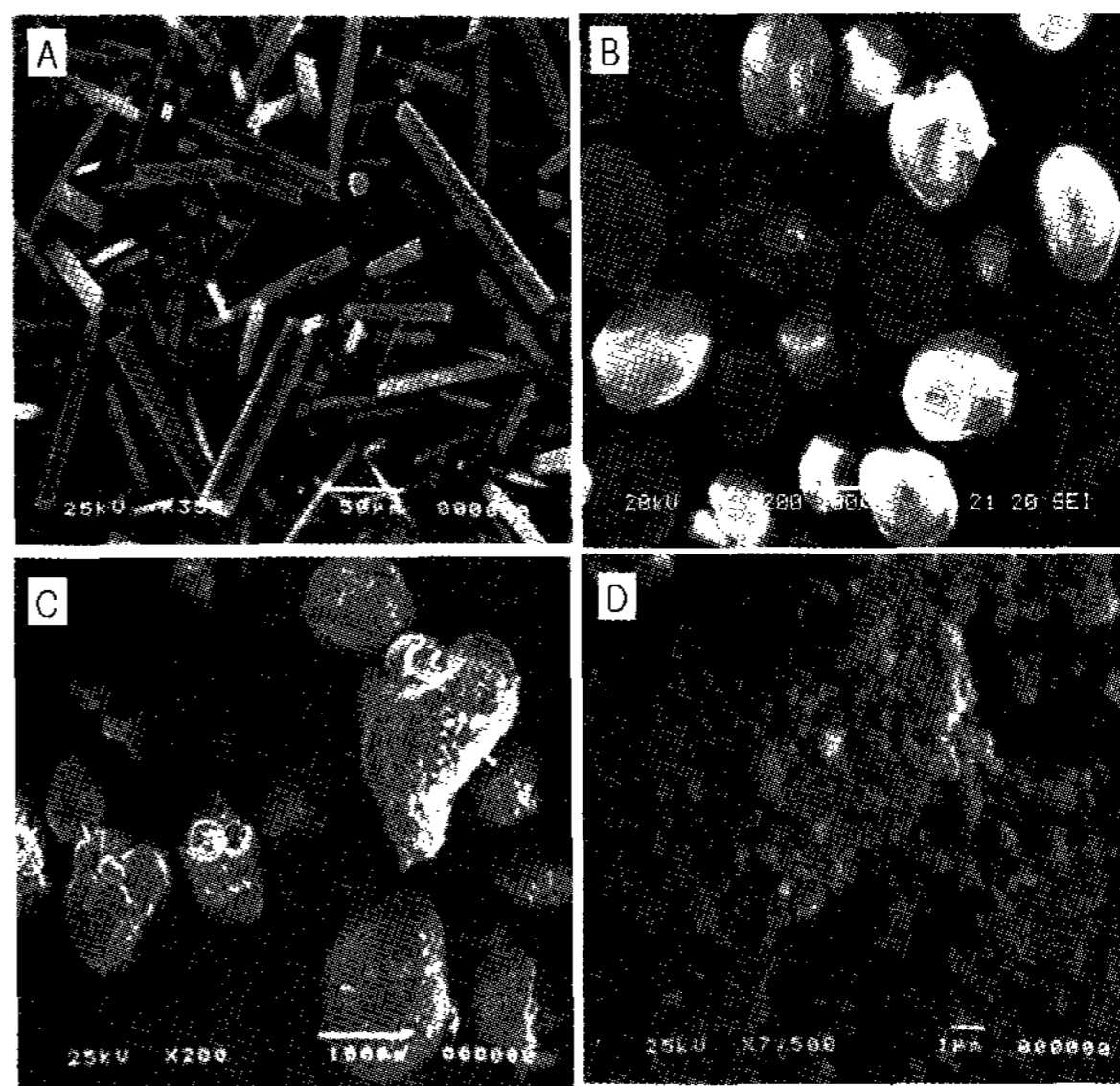


Figure 4. SEM micrographs of (A) ursolic acid, (B) HP-β-CD, (C) a physical mixture with a molar ratio of 1 : 1 (UA:HP-β-CD), and (D) ASES-processed UA/HP-β-CD inclusion complex.

UA/HP-β-CD 물리적 혼합물의 특성

포접화합물과의 비교 분석을 위해 포접체 형성 이전의 원료 UA, HP-β-CD 및 일정 혼합물비 (1 : 1)의 단순한 물리적 혼합물에 대한 형상 및 특성을 관찰하였다. Fig. 4에 원료물질인 UA 및 HP-β-CD와 1 : 1의 몰비로 혼합된 물리적 혼합물 및 ASES 공정을 통해 제조된 시료의 입자 형상을 나타내었다. UA 원료 입자의 경우 5~20 μm 정도의 폭과 100 μm 이상의 길이를 지니는 막대 형상을 가지고 있었으며(Fig. 4A), HP-β-CD의 경우 구형에 가까운 50~100 μm 크기의 형상(Fig. 4B)을 나타내었다. UA/HP-β-CD의 물리적 혼합물(Fig. 4C)의 경우 HP-β-CD의 분쇄는 거의 일어나지 않았으며, 막대형태의 UA만이 일부 분쇄되어 HP-β-CD의 표면에 부착되어 있는 형상이 관측되어 물리적인 혼합 방식으로는 효율적인 포접복합체의 형성이 어렵다는 사실을 추정할 수 있었다. 상기한 여러 시료에 대한 XRD 결과를 Fig. 5에 나타내었으며 제시된 XRD 결과에서 알 수 있듯이 원료물질인 UA의 경우 10~30° 정도의 2θ 범위에서 특성 피크가 강하게 나타나 UA의 결정성을 확인할

수 있었으며(Fig. 5A), HP-β-CD의 경우 10~25°의 2θ 범위에서 결정성의 특성 피크가 존재하지 않았으며 넓은 범위에 걸쳐 무정질적 형태를 나타내었다(Fig. 5B). 한편 1 : 1의 몰비로 혼합된 UA/HP-β-CD 물리적 혼합물의 경우 Fig. 5C에서 쉽게 알 수 있듯이 전체적으로 HP-β-CD의 XRD 형태와 유사한 모습을 보였으나 UA의 결정성 특성피크들이 중첩되어 존재함을 확인할 수 있어 두 물질 대부분이 포접화합물을 형성하지 못하고 단순한 혼합물을 형성하고 있음을 확인할 수 있었다. 한편 원료 UA의 경우 25°C의 증류수내에서 9 μg/mL 이하의 매우 낮은 용해도를 나타내었다. 이러한 낮은 용해도는 단순한 물리적 혼합물에서도 여전히 유지되었으며 이로 부터 단순 물리적 혼합을 통해서 효율적인 포접체 형성을 이룰 수 없음을 확인하였다.

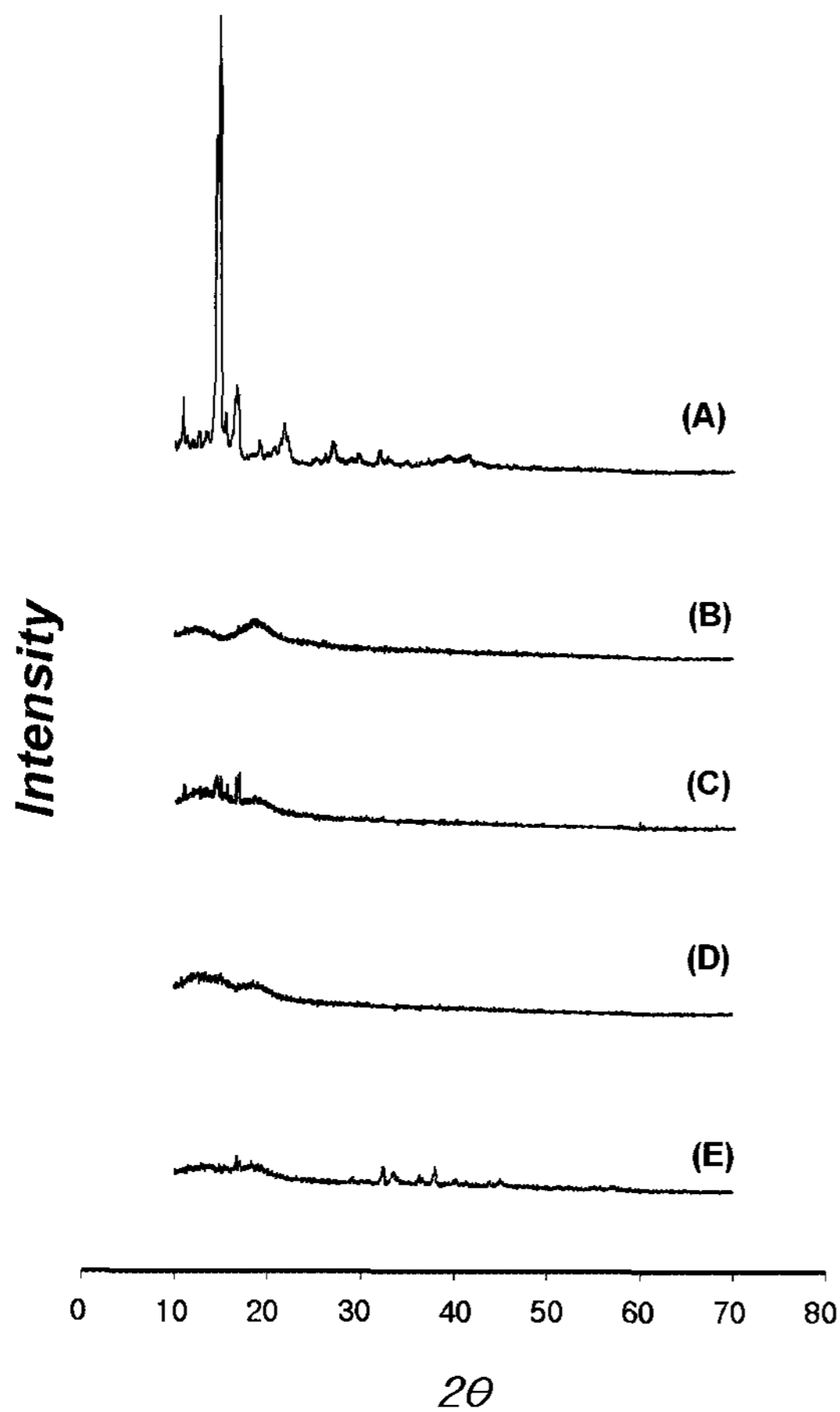


Figure 5. XRD data for (A) ursolic acid, (B) HP-β-CD, (C) a physical mixture of UA/HPβ-CD (1 : 1 mol/mol), (D) inclusion complex powder prepared by solvent evaporation method, and (E) inclusion complex powder prepared by ASES process at 35°C and 140 bar.

반죽법과 용매증발법으로 제조된 UA 가용화 제제

UA의 가용화 제제 제조를 위한 방법으로 반죽법과 용매증발법을 이용하였으며 이때 UA와 HP-β-CD의 혼합비율은 1 : 1의 몰비로 고정하였다. 두 경우 모두 건조 과정 이후 필름형태를 나타내었다. 반죽법에 의해 제조된 1 : 1의 몰비의 UA/HP-β-CD 포접체의 경우 투명한 흰색을 나타내는

필름형태를 보였으며 XRD 분석결과(Fig. 5D) 무정질적인 특성을 확인할 수 있었다. 제조된 UA함유 제제는 증류수에서의 용해도가 약 199.6 μg/mL로 동일한 조건에서 처리되지 않은 원료 UA의 용해도에 비하여 약 20배 정도의 용해도 증가를 나타내었다. 물과 혼합된 에탄올을 용매로 사용하여 용매증발법에 의해 제조된 제제의 경우 약 57 μg/mL의 용해도를 보여 원료 UA에 비해 약 6배 정도의 용해도 증가가 관찰되었다. 또한, 3 %의 sodium bicarbonate가 포함된 증류수에서 분산시킨 후 실온에서 균질혼합기를 이용하여 12,000 rpm의 속도로 20분간 교반 후 55°C에서 감압회전증발기를 이용하여 건조한 제제의 경우 약 2,400 μg/mL 정도의 매우 높은 용해도를 보여 처리이전의 원료 UA에 비하여 약 240배 이상의 높은 용해도 증가를 나타내었다.

초임계유체 공정으로 제조된 UA 가용화 제제

UA와 HP-β-CD의 포접복합체 제조를 위한 초임계유체 공정으로는 회분식공정과 반연속식 ASES 공정을 사용하였으며 각 공정에서 얻어진 결과물을 분석하여 초임계유체 공정의 적용 가능성을 검토하였다. 회분식 초임계 공정을 이용한 포접체 제조 방법에서는 대상 물질 (UA)과 HP-β-CD를 막자사발을 이용하여 균일하게 분쇄, 혼합한 후 이를 회분식 반응기에 넣고 일정 온도 상태에서 다양한 압력조건의 순수 이산화탄소 또는 1~10 vol% 정도의 에탄올이 혼합된 초임계유체를 주입하여 일정 시간동안 방치하여 처리하였다. 회분식 방법을 이용한 포접복합체의 제조는 35~135°C의 온도와 150~450 bar의 압력 범위에서 수행되었으며 UA와 HP-β-CD의 몰비는 1 : 1로 고정하였다. 이때, 일정 온도조건에서 반응기내에서의 이산화탄소와 UA/HP-β-CD 혼합물간의 접촉시간을 3~12시간으로 변화시키면서 시간의 변화에 따른 영향을 검토하였다. 수행된 실험 조건에서 제조된 시료는 백색 또는 옅은 황색의 분말 상태였으며 25°C의 증류수내에서 원료 UA 대비 용해도의 증가가 거의 나타나지 않았다. 이는 초임계 이산화탄소 내에서의 UA의 낮은 용해도에 기인하는 것으로 생각된다. 다만, 135°C와 450 bar의 조건에서 제조된 시료의 경우에는 약 15 μg/mL 정도의 용해도를 보여 다른 조건에서 제조된 시료에 비하여 좀더 높은 용해도를 보였으며, 이는 상대적으로 고온과 고압의 조건에서 UA의 이산화탄소에 대한 용해성이 증가됨과 동시에 HP-β-CD의 녹는점의 저하 및 고온의 온도에 의한 표면상에서의 유동성 증가 때문인 것으로 설명할 수 있다. 그러나 여전히 매우 낮은 용해성을 보여 초임계 이산화탄소를 이용한 회분식 공정은 포접복합체 형성에 효율적이지 못한 방법으로 판단된다. 이러한 제조물의 낮은 용해도는 초임계 이산화탄소에 에탄올을 소량 (1~10 vol%) 첨가하여 사용하였을 경우나 방치시간의 증가에도 큰 변화를 보이지 않았다.

ASES 공정은 35°C의 온도에서 83~140 bar의 압력범위에서 수행되었으며 이산화탄소와 혼합용액의 주입 유량은 각각 39 g/min과 0.5 mL/min으로 유지하였다. 이때 UA와 HP-β-CD의 몰비를 1 : 1로 유지하면서 ethanol을 용매로 사용하여 20 mg/mL 농도의 혼합용액을 제조하여 수행하였

다. ASES 공정을 통하여 얻은 UA/HP-β-CD 복합체는 Fig. 4D에 나타난 바와 같이 전반적으로 0.2~0.5 μm 정도의 크기를 지니는 단위 구성 입자들이 서로 연결되어 있는 형상을 보였으며 포접체 형성 이전의 원료 UA (5~20 μm의 폭과 100 μm 이상의 길이를 지니는 막대형상)와 HP-β-CD (약 50~100 μm 정도의 구형)와 비교해 현저한 크기 및 형상 변화가 있음을 확인하였으나 온도와 압력의 공정 조건 변화에 따라 기본 구조의 큰 변화는 관찰되지 않았다. Fig. 5에 제시된 XRD 결과에서 알 수 있듯이 10~30°의 2θ 범위에서 특성 피크들이 높은 감도로 결정성의 특성을 보여주는 UA(Fig. 5A) 또는 UA와 HP-β-CD의 특성 피크들이 중첩된 모습을 보여 완전한 포접체의 형성이 이루어지지 못했음을 나타내는 물리적 혼합물(Fig. 5C)과는 달리 ASES 공정을 통하여 얻은 UA/HP-β-CD 복합체의 경우 Fig. 5E에서와 같이 UA의 특성 피크들이 감소 또는 소멸되어 HP-β-CD의 경우(Fig. 5B)나 용매증발법(Fig. 5D)과 유사한 무정질적 특성을 보여 포접체를 형성하였음을 확인할 수 있었다. 35°C에서 ASES 공정으로 제조된 제제의 물에 대한 UA의 용해도는 ASES 공정의 압력조건 증가에 따라 증가하였으며(Fig. 6), 35°C와 140 bar의 조건에서 형성된 제제의 경우 약 562.7 μg/mL의 높은 용해도를 보여 원료 UA

에 비하여 약 56배 증가된 결과를 나타내었다. ASES 공정을 통하여 얻은 UA/HP-β-CD 포접복합체는 백색의 분말 형태를 나타냈으며 전체적으로 부피감이 있는 낮은 분체 밀도를 지니고 있었다.

화장품 제형에서의 안정도와 탁도

여러 방법으로 제조된 UA/HP-β-CD 제제에 대한 화장품 제형 내에서의 안정도와 투명제형에서의 탁도를 조사하였다. UA 함유 제제는 초임계유체 공정과 용매증발법에서 얻은 결과물 중 높은 용해도를 보인 시료를 선택하였으며, 비교연구를 위해 프랑스의 Colletica사에서 시판 중인 UA 함유 원료인 Ursolisome을 동일한 방법으로 처리하여 사용하였다. 가용화제형에 대해서는 제형중 UA 농도를 0.3%에서 1%까지 변화시키면서 가용화제형을 제조하여 냉장상태, 30°C 및 45°C에서의 항온 안정도를 관찰하였고, 유화제형에서도 1~2% 범위의 UA를 함유한 유화제형을 제조하여 동일한 온도 조건에서의 항온 안정도를 확인하였다. 안정도 실험에 사용된 가용화제형과 유화제형에 대한 상세 조성을 Table 1과 2에 나타내었다. 각 제형에 대한 안정도 실험은 1개월 동안 이루어졌으며 제형 내에서의 침전물의 생성여부와 점도 변화를 육안으로 관찰하였다. Table 3에

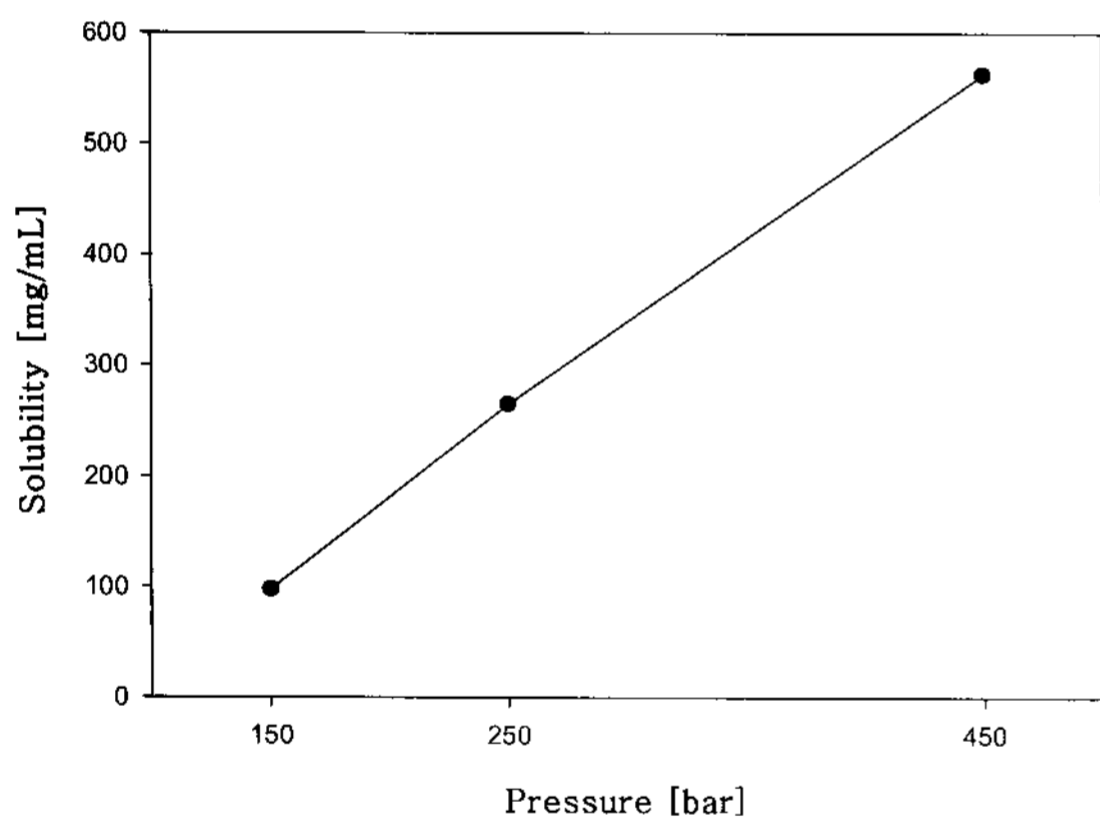


Figure 6. Solubility of unprocessed UA and UA/HP-β-CD inclusion complex powder precipitated by ASES process at 35°C and various pressures.

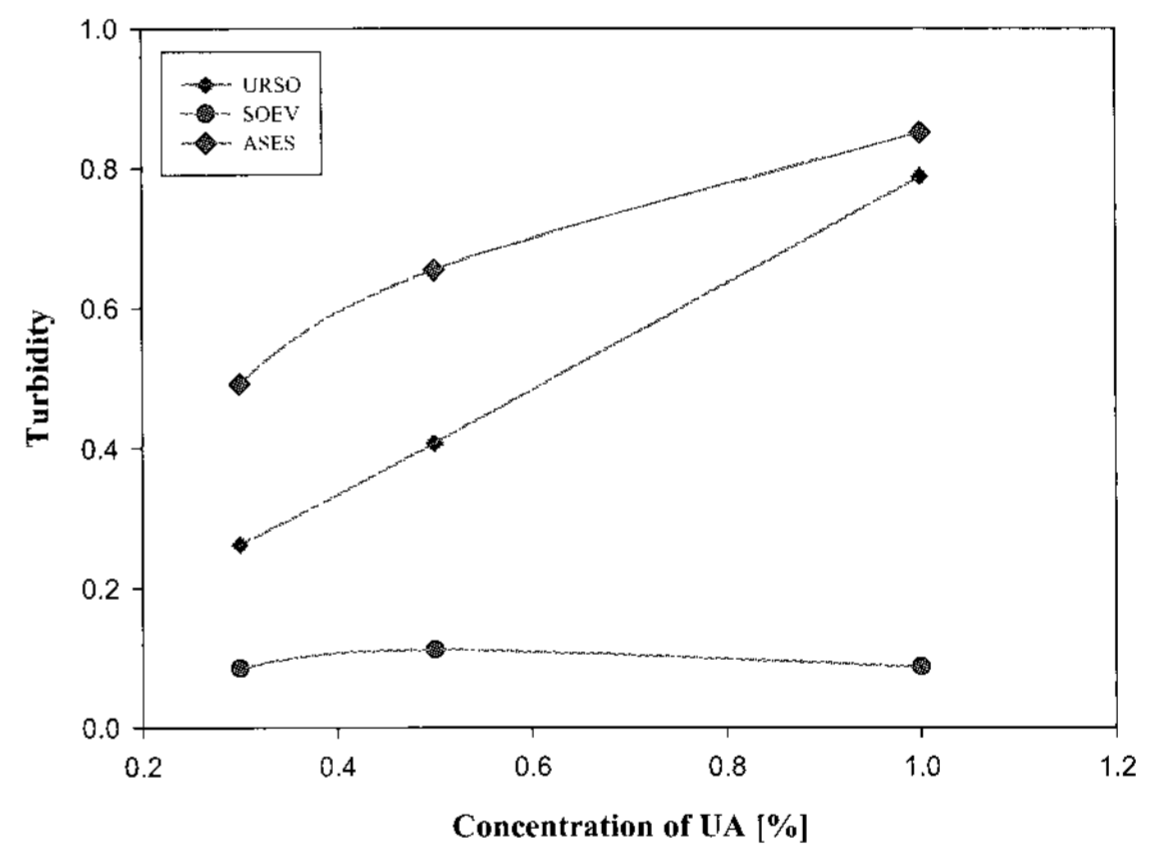


Figure 7. Turbidity variations of water-soluble cosmetic formulations with UA concentration after one month.

Table 1. Composition of water-soluble cosmetic formulations

Component	URSO-W1	ASES-W1	SOEV-W1	URSO-W2	ASES-W2	SOEV-W2	URSO-W3	ASES-W3	SOEV-W3
D.I. Water	82.32	82.32	82.32	82.12	82.12	82.12	81.62	81.62	81.62
EDTA-2Na	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
Treha	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Glycerine	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
PEG/PPG Copolymer	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
URSO ¹⁾	0.30	-	-	0.50	-	-	1.00	-	-
ASES ²⁾	-	0.30	-	-	0.50	-	-	1.00	-
SOEV ³⁾	-	-	0.30	-	-	0.50	-	-	1.00
Alcohol	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
Methyl Paraben	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Hydrogenated Castor oil	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
Fragrance(Aromia)	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07
pH	4.80	4.43	7.10	4.89	4.38	7.49	5.05	4.37	7.59

1) URSO: URSOLISOME(COLLETICA Ltd.)
 2) ASES: ASES-Processed UA/HP-β-CD complex
 3) SOEV: Solvent-evaporated UA/HP-β-CD complex

가용화제형에서 관찰된 제형 변화를 상세하게 나타내었다. UA 함유 제제가 낮은 농도로 첨가된 가용화제형에서는 용매증발법을 통해 얻은 제제의 경우가 온도에 상관없이 투명성을 유지하였으며 ASES 공정으로 제조된 UA 함유 제제의 경우 7~14일 정도 경과 후 약간의 침전물이 발생하였으나 이후 시간 경과에 따라 침전 정도가 심해지지는 않았다. 상대적으로 높은 농도인 1%의 UA 함유 제제를 처방한 경우 ASES 제제의 침전 정도가 증가하였으며 에멀전 방식의 Ursolisome의 경우 낮은 농도에 비해 침전물의 발생과 현탁도의 증가가 관찰되었다.

Fig. 7에 30°C의 온도에서 1개월간 방치된 각 가용화제형에 대한 탁도 측정 결과를 나타내었다. 각 UA 농도에서 용매증발법에 의해 제조된 시료의 경우가 가장 투명한 제형상태를 유지하였으며, Ursolisome과 ASES 제제의 경우 농도 증가에 따라 현탁도가 증가하는 현상을 보였다. 탁도

실험 결과 가용화제형에서 현탁도를 고려할 경우 제제의 안정도는 용매증발법 > Ursolisome > ASES 제제의 순이었다. 반면 유화제형의 경우에는 UA 함유 제제의 농도범위와 실험온도 범위에서 1개월간 안정성을 유지하였으며 유화제형의 pH와 점도의 변화도 나타나지 않아 가용화제형에 비해 보다 안정적인 상태를 유지함을 확인하였다.

요 약

본 연구에서는 뛰어난 주름개선효능을 가지고 있지만 수용액상에서의 낮은 용해도로 인해 사용에 제약이 있는 UA의 용해도를 향상시키기 위하여 HP-β-CD와의 포접체를 형성하는 UA함유 제제를 제조하고자 하였으며 특히 초임계유체 공정기술을 포접화합물 제조에 도입하여 초임계

Table 2. Composition of emulsified cosmetic formulations

Component	ASES-01	SOEV-01	ASES-02	SOEV-02
Cetosteary Alcohol	0.80	0.80	0.80	0.80
Glyceryl Stearate and PEG-100 stearate	0.80	0.80	0.80	0.80
Glyceryl Monostearate	0.50	0.50	0.50	0.50
SAA	0.50	0.50	0.50	0.50
Vegetable Oil	0.50	0.50	0.50	0.50
Methyl Paraben	0.20	0.20	0.20	0.20
Propyl Paraben	0.05	0.05	0.05	0.05
Cetyl Ethyl Hexanoate	2.00	2.00	2.00	2.00
Butylene Glycol Dicaprylate/Dicaprate	3.00	3.00	3.00	3.00
Polydecene	2.00	2.00	2.00	2.00
Dimethicone	1.00	1.00	1.00	1.00
Cyclomethicone	3.00	3.00	3.00	3.00
D.I. Water	67.10	67.10	66.10	66.10
EDTA-2Na	0.02	0.02	0.02	0.02
Glycerine	2.00	2.00	2.00	2.00
Butylene Glycol	2.00	2.00	2.00	2.00
Triethanolamine	0.12	0.12	0.12	0.12
ASES	1.00	-	2.00	-
SOEV	-	1.00	-	2.00
Imidazolidinylurea	0.20	0.20	0.20	0.20
D.I. Water	13.00	13.00	13.00	13.00
Carbomer	0.13	0.13	0.13	0.13
Fragrance(Aromia)	0.08	0.08	0.08	0.08
viscosity(30°C, brookfield Mark II, sp 64)	15,900	15,800	16,100	14,300
pH(10%)	6.82	7.12	6.82	7.21

Table 3. Stability of water-soluble cosmetic formulations during one month.

Sample	Refrigerated	30°C	45°C
URSO-W1	Precipitated in 3 days	Precipitated in 7 days	Precipitated in 7 days
ASES-W1	Weakly precip. in 7days	Weakly precip. in 7days	Weakly precip. in 7days
SOEV-W1	No change	No change	No change
URSO-W2	Precip. in 1 day, highly turbid	Precip. in 1 day, highly turbid	Precip. in 1 day, highly turbid
ASES-W2	Precip. in 1 day	Precip. in 1 day	Precip. in 1 day
SOEV-W2	No change	No change	No change
URSO-W3	Precip., highly turbid	Precip., highly turbid	Precip., highly turbid
ASES-W3	Precip.	Precip.	Precip.
SOEV-W3	Weakly precip. in 1month	No change	No change

기술의 적용의 가능성을 조사하였다.

UA의 용해도를 증가시키기 위한 제조방법으로 HP- β -CD와의 혼합물을 반죽법, 용매증발법 및 초임계유체공정을 이용하여 제조하고, 각 제조시료들의 용해도 증가 및 특성을 확인한 결과 용매증발법과 초임계 ASES공정에 의해 물에 대한 용해도가 증가된 UA/HP- β -CD 제제를 얻을 수 있었다. 각 방법에 의해 제조된 UA 함유 제제의 화장품 제형에서의 안정도 실험을 수행하였으며 실험결과 유화제형에서는 모든 제제가 시간 및 온도에 대한 안정성을 보였으나 가용화제형에서는 ASES 제제와 Ursolisome 제제의 경우 시간이 경과하거나 함유 UA농도가 증가함에 따라 화장품 제형의 현탁도가 증가함을 확인할 수 있었다.

감 사

본 연구는 경기중소기업종합지원센터의 러시아 산·학공 동연구개발지원사업과 에너지관리공단의 학술진흥사업의 연구비지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Tokuda, H., Ohigashi, H., Koshimizu, K., and Y. Ito (1986), *Cancer Lett.* **33**, 279-285.
2. Ohigashi, H., Takamura, H., Koshimizu, K., Tokuda, H., and Y. Ito (1986), *Cancer Lett.* **30**, 143-151.
3. Huang, M. T., Ho, C. T., Wang, Z. Y., Ferraro, T., Lou, Y. R., Stauber, K., Ma, W., Georgiadis, C., Laskin, J. D., and A. H. Conney (1994), *Cancer Res.* **54**, 701-708.
4. Sohn, K. H., Lee, H. Y., Chung, H. Y., Young, H. S., Yi, S. Y. and K. W. Kim (1995), *Cancer Lett.* **94**, 213-218.
5. Jie Liu (2005), Oleanolic acid and ursolic acid: Research perspectives, *J. Ethnopharmacology* **100**, 92-94.
6. Badawy, S. I. F., M. M., Ghorab, and C. M., Adeyeye (1996), Characterization and bioavailability of danazol-hydroxypropyl β -cyclodextrin coprecipitates, *Int. J. Pharm.* **128**, 45-54.
7. Badawy, S. I. F., A. L. Marshall, M. M. Ghorab, and C. M. Adeyeye (1996), A study of the complexation between danazol and hydrophilic cyclodextrin derivatives, *Drug Dev. Ind. Pharm.* **22**, 959-966.
8. Badawy, S. I. F., M. M. Ghorab, and C. M. Adeyeye (1996), Bioavailability of danazol-hydroxypropyl- β -cyclodextrin complex by different routes of administration, *Int. J. Pharm.* **145**, 137-143.
9. Soppimath, K. S., Aminabhavi, T. M., Kulkarni, A. R., and W. E. Rudzinski (2001), Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices, *J. Control Release* **70**, 1-20.
10. Siempmann, J. and N. A. Peppas (2001), Modelling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose, *Adv. Drug Del. Rev.* **48**, 139-157.
11. Chattopadhyay, P. and R. B. Gupta (2002), Supercritical CO₂ based production of magnetically responsive micro- and nanoparticles for drug targeting, *Ind. Eng. Chem. Res.* **41**, 6049-6058.
12. De Gianninis, B., Patrick, J., and P. Subra (2004), Morphology and growth control of griseofulvin recrystallised by compressed carbon dioxide as antisolvent, *J. Crystal. Growth* **262**, 519-526.
13. Jung J. and M. Perrut (2001), Particle design using supercritical fluids: literature and patent survey, *J. Supercrit. Fluids* **20**, 179-219.
14. Foster, N., R., Dehghani, F., Bustami, R. T., and H. K. Chan (2003), Generation of lysozyme-lactose powders using the ASES process, In: Proc 6th Int. Symp Supercrit, *Fluid* **3**, 1831-1836.
15. Foster, N. R., Meure, L. A., Barrett, A. M., Abbasi, F., and F. Dehghani (2003), Micronisation of griseofulvin by the aerosol solvent extraction system, In: Proc 6th Int. Symp. Supercrit, *Fluid* **3**, 1771-1776.
16. Foster, N. R., Ng, A. S., Dehghani, F., and H. L. Regtop (2003), Micronisation of tobramycin using dense gas anti-solvent techniques, In: Proc. 6th Int. Symp. Supercrit, *Fluid* **3**, 1647-1652.
17. Lee, Y. W., Lee, J. W., and J. S. Lim (2003), The formation of aspirin micro particulate using supercritical CO₂ as solvent and antisolvent, In: Proc 6th Int. Symp. Supercrit, *Fluid* **3**, 1777-1782.
18. Charoenchaitrakool, M., F. Dehghani, and N. R. Foster (2002), Utilization of supercritical carbon dioxide for complex formation of ibuprofen and methyl- β -cyclodextrin, *Int. J. Pharm.* **239**, 103-112.
19. Mingqua G., et al. (2003), Studies on the non-covalent complexes between oleanolic acid and cyclodextrins using electrospray ionization tandem mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.* **38**, 723-731.
20. Suzuki, et al. (1994), Water-soluble pentacyclic triterpene composition and method for producing the same, US Patent, 5314877