

오레고닌의 in vitro 방출 특성에 미치는 연고기제의 영향

임태종 · 오일영 · 박영미 · 박종혁 · 이민원 · 조재열* · 이재휘† · 최영욱‡

중앙대학교 약학대학, *강원대학교 바이오산업 공학부
(2007년 6월 7일 접수 · 2007년 6월 19일 승인)

Influence of Ointment Base on In Vitro Release Characteristics of Oregonin

Tae Jong Im, Il Young Oh, Young Mi Park, Jong Hyeok Park,
Min Won Lee, Jae Youl Cho*, Jaehwi Lee† and Young Wook Choi‡

College of Pharmacy, Chung-Ang University, 221 Heuksuk-dong, Dongjak-gu, Seoul 156-756, Korea

*School of Bioscience and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

(Received June 7, 2007 · Accepted June 19, 2007)

ABSTRACT – The bark of *Alnus japonica* has been used for the treatment of fever, hemorrhage and diarrhea in oriental traditional medicine. Recently, it was revealed that the diarylheptanoids from the bark of *Alnus japonica* possess anti-inflammatory activity and are expected to be applicable for atopic dermatitis. In this study, oregonin, one of major active components in the bark of *Alnus japonica*, was developed in the form of semisolid formulations for topical delivery. Oregonin was incorporated into four ointment bases: O/W cream, W/O cream, hydrophilic ointment and lipophilic ointment. Oregonin release from all formulation prepared was evaluated. Franz cell method and immersion method were employed to characterize the release patterns of drug from each formulation based on solvent availability. O/W cream showed a better release profile than the other formulations when evaluated with Franz cell method with an order of O/W cream, hydrophilic ointment, W/O cream and lipophilic ointment. In the immersion method, hydrophilic ointment showed the greatest release rate at times 1 hour exceeding compared to other bases with an order of hydrophilic ointment, O/W cream, W/O cream and lipophilic ointment. Hydrophilicity and solvent availability of formulation seems to significantly influence the release rate of oregonin from ointment bases. In this study, we successfully characterized the oregonin ointment and found that o/w cream is a promising formulation for the topical delivery of oregonin.

Key words – Oregonin, Ointment, Cream, Release, Topical delivery

오리나무(*Alnus japonica* Steud)는 Betulaceae(자작나무과)에 속하는 나엽활엽교목으로 오리나무의 수피를 한방에서는 적양(赤楊)이라 부르며 청열(淸熱), 강화(降火)하는 작용이 있어서 비출혈(鼻出血), 설사, 외상출혈에 쓰였으나,¹⁾ 민간에서는 숙취해소의 목적에 사용되었다.²⁾ 함유 성분에 대한 보고에 따르면 diarylheptanoid 계열^{3,4)}을 비롯한 flavonoid^{5,6)} 및 tannin^{7,8)} 등 페놀성 화합물이 많이 함유된 것으로 알려져 있다. 생리활성에 관한 연구로는 diarylheptanoid 화합물에 의한 NO 및 COX-2 생성억제 효과, 멜라닌생성 억제효과, 항산화 효과 등을 비롯한 다양한 생리활성이 알려져 있다.⁹⁻¹²⁾ 특히 diarylheptanoid 계열의 oregonin(Figure 1)이 선택적으로 5-lipoxygenase inhibitor로서 작용하여 dermal inflammation에 효과가 있다고 보고된 사실¹³⁾은 아토피 피부염 치

료제로서의 가능성을 제시하고 있다.

아토피 피부염의 치료에 있어 약물의 국소 적용은 그 효능이 이미 입증되었으며, 직접 치료 부위로의 적용은 경구 투여에 비해 높은 약물 전달률 및 높은 농도로 약물을 전달할 수 있다는 장점이 있다. 따라서 오레고닌 피부 외용제의 개발은 오레고닌의 아토피 피부염의 적용에 있어 매우 효과적인 제형이라고 사료된다. 외용제로의 개발에 있어서 제제로부터의 약물의 방출은 치료의 효능에 매우 큰 요인이 되며 제제로부터의 약물의 방출은 제형, 용해도, 유체의 입자 크기, 물의 함량 등 많은 요인에 의해 영향을 받는 것으로 알려져 있다. 특히 제형 및 그에 따른 약물의 용해도는 외용제에서 약물 방출에 가장 큰 요인이 되는 것으로 알려져 있다.^{14,15)}

따라서 본 연구에서는 오레고닌을 외용 아토피 피부염 치료제로의 여러 제형을 설계하고 이에 따른 약물의 방출 특성을 평가하였다. 오레고닌의 친수성 또는 소수성 연고제를 설계하였으며 그 방출 특성을 평가함으로써 오레고닌의 아

†본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
Tel : 02)820-5606 (JL), 02)820-5609 (YWC)
E-mail : jaehwi@cau.ac.kr (JL), ywchoi@cau.ac.kr (YWC)

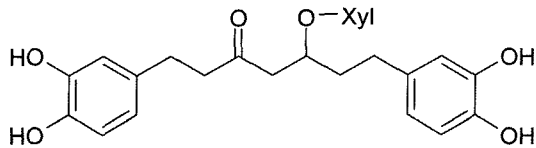


Figure 1 - Chemical structure of oregonin.

토피 피부염 치료제로 개발에 있어 가장 적합한 연고 기제를 선정하였다.

실험 방법

실험재료 및 시약

본 실험에서 사용한 오리나무(*Alnus japonica*, 2006년, 6월) 수피는 서달산(서울 동작구)에서 채집하여 건조 후 사용하였다. 크림 제조에 사용된 폴리글리세릴-3-메칠글루코사이드스테아레이트, 스테아린산, 세탄올, 글리세린은 LG생활건강(서울, 한국)에서 공급받았고, 세스퀴올레인산소르비탄, 트윈 80, 유동 파라핀, 백색 바셀린, 폴리에틸렌글리콜400 및 폴리에틸렌글리콜4000을 덕산화학(한국)에서, phosphate buffer tablet은 Sigma-Aldrich사(한국)에서 구입하였다. 그 외의 시약과 용매는 특급 또는 1급을 사용하였다.

기기 및 기구

본 실험에서는 Hitachi사의 시스템(Pump: Hitachi, L-7100 Detector: Hitachi, L-7400, Integrator: Hitachi, L-7000, 일본)과, Capcell Pak C₁₈ UG 120(Shiseido, Japan, 4.6 mm I.D.×150 mm, 5 μm)을 사용하였고, 이밖에 homogenizer(IKA-T25, IKA Werke GmbH, Staufen, 독일), shaking incubator(SI-900R, JEIO Tech, 한국), 투석막을 MWCO 12000~14000 Spectrum Laboratories(Spectra/Por[®], 미국)에서 구입하여 사용하였다.

오레고닌 추출 및 단리

신선한 오리나무의 수피 2.5 kg을 절단한 후 80% 아세톤으로 실온에서 3회 추출하여 여과하였다. 그 추출액을 감압 농축한 후 정제수에 현탁하여 여과한 후 Sephadex LH-20 컬럼크로마토그래피를 이용하였다. 용매는 물에서부터 메탄올을 10%씩 올려 100%까지 농도를 높였으며 TLC를 실시하여 6개의 분획(Fr.1, Fr.2, Fr.3, Fr.4, Fr.5 and Fr.6)으로 나누었다. Fr.4에 대해서 MCI-gel CHP 20P(40%메탄올→80%메탄올, gradient system)을 통해서 3개의 분획으로 나눈 다음 첫 번째 분획에서 ODS-gel(정제수→메탄올, gradient system)과 Low pressure liquid column chromatography(정

제수→메탄올, gradient system)을 실시하여 오레고닌을 얻었다.

오레고닌의 HPLC 정량

분리, 정제한 표준품 오레고닌 2 mg을 100% 메탄올을 가해 stock solution(100 μg/mL)을 조제하였고, stock solution을 희석하여 10, 20, 40, 60, 80, 100 μg/mL의 농도의 표준용액을 조제하고, 이동상은 아세토니트릴과 물의 혼합액(70:30 v/v)을 사용하였으며, 검출파장은 280 nm, 주입용량은 20 μL, 유속은 1 mL/min로 하였다. 이 조건에서 오레고닌의 retention time은 2.2분이었다. HPLC 분석을 통해, 각 농도와 peak area를 바탕으로 검량선을 작성하였으며, 농도범위 10~100 μg/mL에서 양호한 직선성(R²=0.997)을 나타내었다.

오레고닌 연고제의 제조

다양한 용해성을 갖는 연고기제로부터 오레고닌의 방출 특성을 평가하기 위해 다음의 4가지 연고제를 제조하였다(O/W 크림, W/O 크림, 친수성 연고 및 친유성 연고). 모두 오레고닌의 함량은 1%(w/w)로 고정하였다. O/W 크림, W/O 크림, 친수성 연고 및 친유성 연고의 제조 방법은 다음과 같다.

O/W 크림 - O/W 크림은 Table I의 처방에 따라 제조하였다. 폴리글리세릴-3-메칠글루코사이드스테아레이트, 스테아린산, 세탄올 및 유동 파라핀을 처방에 따라 넣고, 65°C에서 가온하여 유상을 제조하고 글리세린, 정제수, 오레고닌을 넣고 65°C에서 가온하여 완전히 용해시켜 수상을 제조하였다. 같은 온도에서 유상을 수상에 가하고 homogenizer를 사용하

Table I - Formulation of Oregonin o/w Cream

Ingredients	Formulation (%)
Polyglyceryl-3 methylglucose distearate	3
Stearic acid	5
Cetyl alcohol	2
Mineral oil	7
Glycerin	10
Water	73

Table II - Formulation of Oregonin w/o Cream

Ingredients	Formulation (%)
Sorbitan sesquioleate	4
Tween 80	6
Paraffin liquid	8
Vaseline	12
Cetyl alcohol	20
Water	50

여 수분간 유화시킨 후 냉각하여 O/W 크림을 제조하였다.

W/O 크림 - W/O 크림은 Table II의 처방에 따라, 오레고닌을 65°C에서 용해시킨 수상을 세스퀴올레인산소르비탄, 트윈 80, 유동 파라핀, 백색 바셀린 및 세탄올을 처방에 따라 65°C에서 완전히 용해시킨 유상에 넣고, homogenizer를 사용하여 수분간 유화시켜 W/O 크림을 제조하였다.

친수성 연고 - 친수성 연고는 Table III의 처방에 따라 제조하였다. 폴리에틸렌글리콜 400, 폴리에틸렌글리콜 4000을 70°C에서 가온하여 완전히 용해시킨 후, 오레고닌이 용해된 물을 같은 온도에서 폴리에틸렌글리콜 혼합물에 가한 다음 충분히 교반하였다. 30°C로 냉각시키면서 응고 될 때까지 교반을 계속 하여 친수성 연고를 제조하였다.

친유성 연고 - 친유성 연고는 Table IV의 처방에 따라 제조하였다. 백색 바셀린을 70°C에서 가온하여 완전히 용해시키고, 오레고닌이 분산된 유동 파라핀을 70°C에서 백색 바셀린에 가하여 충분히 교반하였다. 30°C로 냉각시키면서 응고 될 때까지 교반을 계속 하여 친유성 연고를 제조하였다.

In vitro 오레고닌 방출 실험

제조된 4가지 연고제를 2가지 방법을 통해 오레고닌의 방출 양상을 평가하였다. 각각의 연고 기제에 따른 결과는 SPSS를 이용하여 ANOVA test로 분석하였고, *p*값이 0.05 미만일 때를 유의하다고 보았다.

Franz cell 법 - Franz diffusion cell(Figure 2)을 사용하여 37±0.5°C에서 각 연고기제로부터 오레고닌의 방출을 측정하였다. Donor compartment와 receptor compartment 사이에 활성화 된 투석막을 고정시키고 각 처방의 연고제 500 mg을 투석막 상부에 탑재하였다. Receptor phase에 pH 7.4 등장 인산염 완충액 12 mL를 채워 방출 실험을 시작하였다. 실험 시작 후 0.5, 1, 2, 3시간마다 시료 채취구를 통해 0.5 mL의 receptor phase를 채취하여 0.45 µm 크기의 시린지 필터로 여과하고 이를 4°C에서 보관, HPLC로 분석하였다. 인산염 완충액 제조를 용이하게 하기 위해 phosphate buffer

Table III - Formulation of Oregonin Hydrophilic Ointment

Ingredients	Formulation (%)
Polyethylene glycol 400	60
Polyethylene glycol 4000	30
Water	10

Table IV - Formulation of Oregonin Lipophilic Ointment

Ingredients	Formulation (%)
Vaseline	90
Paraffin liquid	10

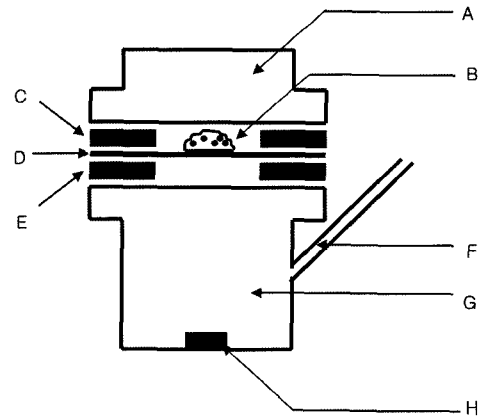


Figure 2 - Schematic diagram of the Franz diffusion cell type apparatus used for oregonin release: A: donor compartment, B: oregonin ointment formulation, C: upper washer, D: dialysis membrane, E: bottom washer, F: sampling arm, G: receiver compartment containing phosphate buffer solution, H: magnetic stirrer.

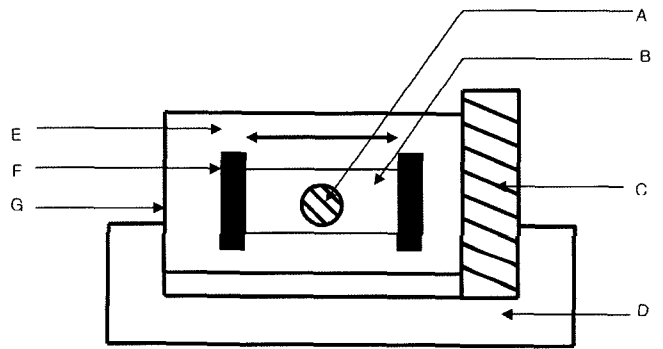


Figure 3 - Experimental set up of the immersion method used for oregonin release: A: oregonin ointment formulation, B: dialysis membrane, C: sieve, D: shaking incubator, E: phosphate buffer solution, F: weighted closures, G: polypropylene cylindrical tube.

tablet를 사용하여 100 mL 정제수에 1정을 넣어 20 Mm의 인산염 완충액을 제조하였다. 시료 채취 후 즉시 37±0.5°C로 유지시킨 동량의 pH 7.4 등장 인산염 완충액을 보충하였다.

Immersion 법 - 원통형의 폴리프로필렌 튜브(3.2 cm 직경, 11.5 cm 길이)를 사용(Figure 3)하여 shaking incubator에서 오레고닌의 방출을 측정하였다. 각 처방의 연고제 300 mg을 투석막에 넣고 양끝을 밀봉하여 pH 7.4 등장 인산염 완충액 60 mL를 채운 원통형의 폴리프로필렌 튜브에 넣고, 0.5, 1, 2, 3시간마다 0.5 mL의 방출 매질을 채취하여 0.45 µm 크기의 시린지 필터로 여과하고 이를 4°C에서 보관, HPLC로 분석하였다. 인산염 완충액 제조를 용이하게 하기 위해 phosphate buffer tablet를 사용하여 100 mL 정제수에 1정을 넣어 20 Mm의 인산염 완충액을 제조하였다. 시료 채취 후 즉시 37±0.5°C로 유지시킨 동량의 pH 7.4 등장 인산염 완충액을 보충하였다.

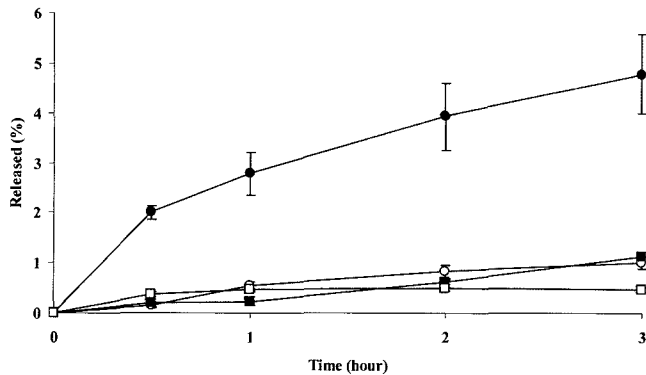


Figure 4 – Release profile of oregonin through the dialysis membrane mounted in Franz diffusion cell. ●: o/w cream, ○: w/o cream, ■: hydrophilic ointment, □: lipophilic ointment. Data are expressed as mean±S.E.. (n=3).($p<0.05$)

결과 및 고찰

In vitro 오레고닌 방출 실험

본 연구에서 각 연고 조성으로부터 오레고닌의 방출을 Franz cell 법과 Immersion 법으로 측정하였다. Franz cell 법은 연고제가 탑재된 투석막을 통해서만 제한된 방출 매질로 약물의 방출이 이루어 지는 반면에 Immersion 법은 연고제가 완전히 방출 매질에 잠겨 있기 때문에 방출에 이용되는 매질의 이용률이 크다. 따라서 수용성인 오레고닌이 방출 매질의 이용도에 따라 각 연고기제로부터 어떻게 방출되는지를 평가하였다.

Franz cell 법 – 각 처방의 1% 오레고닌 함유 연고제를 Franz diffusion cell에 탑재한 후 투석막을 통한 오레고닌의 방출량을 측정하여 Figure 4에 나타내었다. 방출 실험 결과 오레고닌의 방출은 O/W 크림에서 가장 컸다. 실험 3시간 경과 후, O/W 크림으로부터 오레고닌이 4.8%가 방출되었다. 나머지 연고기제로부터 오레고닌의 방출은 친수성 연고, W/O 크림, 친유성 연고 순서로 1.1%, 1.0%, 0.5%의 방출을 나타내었다($p<0.05$). 이는 오레고닌이 물에 잘 녹는 친수성 약물이기 때문에 O/W 크림의 경우 다른 제형보다 외상에 분포하는 오레고닌이 방출 매질과 활발한 상호작용으로 인해 보다 방출이 잘 된 것으로 생각할 수 있다. 반면에 외상이 소수성인 W/O 크림과 친유성 연고에서는 방출이 4시간 경과 후에도 약 1% 이내의 오레고닌만이 방출되었다. 그리고 친수성 연고는 비록 O/W 크림과 같이 매우 친수적인 환경을 제공하여 오레고닌의 방출에 유리한 기제로 생각되지만, 방출 매질의 이용률이 Franz cell 법에서는 매우 제한되어 전체적으로 오레고닌 방출을 높이지는 못했다.

Immersion 법 – 각 처방의 1% 오레고닌 함유 연고제를 투석막에 넣고 양끝을 weighted closures로 밀봉하여 폴리프

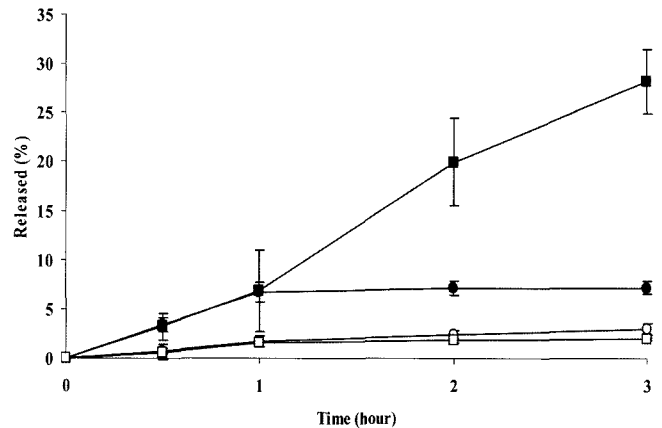


Figure 5 – Release profile of oregonin through the dialysis membrane immersed in phosphate buffer solution. ●: o/w cream, ○: w/o cream, ■: hydrophilic ointment, □: lipophilic ointment. Data are expressed as mean±S.E.. (n=3).

로필렌 튜브 속에 넣고 용매에 완전히 잠기게 한 후 투석막을 통한 오레고닌의 방출량을 측정하여 Figure 5에 나타내었다. 그 결과는 친수성 연고, O/W 크림, W/O 크림, 친유성 연고의 순서로 약 28.2%, 7.2%, 3.0%, 2.0%의 방출량을 나타내었다. O/W 크림, W/O 크림, 친유성 연고로부터 오레고닌의 방출을 Franz cell 법에서 방출한 것보다 방출량이 약 1.5배 가량 방출량이 증가 되었다($p<0.05$). 각 제형

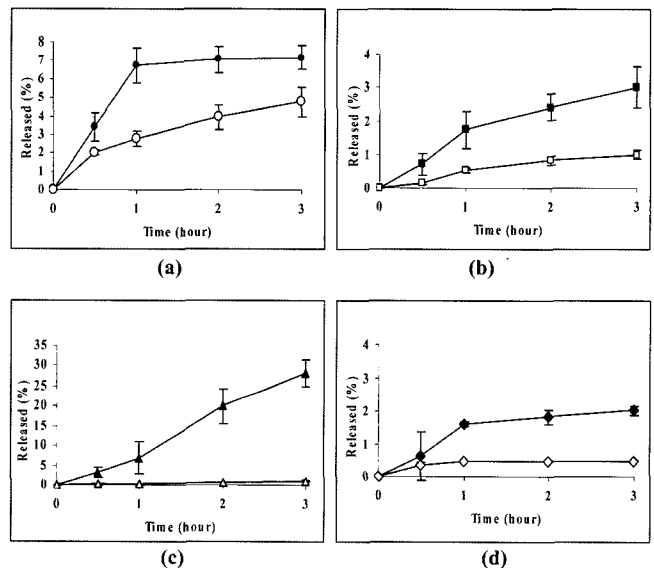


Figure 6 – Release profile of oregonin through the dialysis membrane in difference between Franz cell method and immersion method. (a) ●: o/w cream in immersion method, ○: o/w cream in Franz cell method. (b) ■: w/o cream in immersion method, □: w/o cream in Franz cell method. (c) ▲: hydrophilic ointment in immersion method, △: hydrophilic ointment in Franz cell method. (d) ◆: lipophilic ointment in immersion method, ◇: lipophilic ointment in Franz cell method. Data are expressed as mean±S.E.. (n=3).

에 있어서 방출 실험 방법에 따른 방출 양상을 Figure 6에 별도로 나타내었다. 이는 immersion 법의 경우 연고기제와 방출 매질과의 접촉 면적 및 방출 매질의 양이 Franz cell 법에서 보다 증가함에 따라 각 제형들의 용매 이용률이 증가해 오레고닌의 방출량이 증가한 것으로 사료된다. 또한 친수성 연고의 경우 1시간까지는 O/W 크림과 유사한 방출 양상을 보이나 1시간 이후에는 방출량이 급격히 증가하였다. 이는 방출 실험 시작 후 1시간 뒤에 친수성 연고가 액화되었기 때문으로 생각된다.

연고 기제에 따른 오레고닌의 방출 평가

오레고닌은 물에 잘 녹는 수용성 약물이기 때문에 오레고닌의 수용성을 포함할 수 있는 영역을 가진 연고 기제가 방출에 유리함을 in vitro 방출 실험을 통해 확인하였다. 친유성 연고의 경우 약물의 기제에 대한 용해도가 낮아 오레고닌이 녹지 않은 상태로 분산되어 기제 내 존재하였으며 따라서 기제와 용질 사이에 낮은 농도 구배가 형성되어 약물의 방출이 매우 낮은 것으로 사료된다. 그리고 O/W 크림과 W/O 크림의 경우, 모두 오레고닌이 수상에 약물이 용해되어 있지만 매우 큰 방출 양상의 차이를 보였다. O/W 크림의 경우 오레고닌이 수상에 존재하며 수상 조성물들이 물에 잘 녹아 확산층으로서의 기능을 하고 물의 침투가 용이하여 높은 용출율을 보였다. 하지만 W/O 크림의 경우 수상에 약물이 용해되어 있지만 약물의 기제로부터의 방출을 위해서는 유상을 통과하는 과정이 필요하게 된다. 따라서 유상이 약물의 확산층으로 작용하여 약물의 방출을 억제하는 기능을 하였다. 특히 유상의 경우 물에 용해되지 않아 물의 침투가 용이하지 않기 때문에 낮은 용출율을 보이며 이에 따라 두 제형 사이에 방출 양상에 큰 차이가 나타나는 것으로 사료된다.¹⁶⁾ 이는 코직산을 함유한 W/O, W/O/W 외용제의 방출 양상에서도 확인할 수 있다. 수용성인 코직산을 O/W, W/O/W의 크림 제형을 제조하고 방출 양상을 관찰하였을 시 O/W 크림의 경우 약물의 방출이 신속히 많은 양이 방출됨을 확인하였다. 하지만 W/O/W 크림의 경우 내상에 존재하는 코직산이 확산을 통해 유상을 통과하는 것이 방출 속도 결정 단계로 작용하였으며 따라서 수용성의 코직산의 방출 양상이 늦추어 지고 그 방출량이 감소함을 확인하였다.¹⁷⁾

결 론

본 연구에서는 오레고닌을 함유하는 다양한 연고제를 제조하였으며, in vitro 방출 실험을 통해 연고제의 방출 특성을 확인하였다. Franz cell 법과 immersion 법을 고안하여

4가지 연고제의 방출 실험을 진행하였으며 그 결과 오레고닌이 매우 친수성 약물이기 때문에 제형의 친수성 영역 및 용매 이용률에 의해 방출 특성이 크게 영향을 받음을 확인하였다. 본 실험을 통해 오레고닌을 국소에 적용하는 아토피 치료제로 개발할 경우 O/W 크림이 오레고닌의 방출에 가장 적합한 연고 제형임을 알 수 있었다. 따라서 O/W 크림으로부터 오레고닌 흡수가 증대 될 것으로 기대되며 본 연구실에서는 이에 대한 추가 연구가 진행 중에 있다.

감사의 말씀

본 연구는 중앙대학교 생명의약연구원의 지원을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 1) 中藥大辭典(3권), p. 3042 小學館, 東京, (1985).
- 2) S. J. Lee, Korean Folk Medicine, 서울, **40**, (1966).
- 3) M. W. Lee, M. S. Park, D. W. Jeong, K. H. Kim, H. H. Kim and S. H. Toh, Diarylheptanoids from the leaves of *Alnus hirsuta* Turcz, *Arch. Pharm. Res.*, **23**, 50-53 (2000).
- 4) D. W. Jeong, J. S. Kim, S. M. Cho, Y. A. Lee, K. H. Kim, S. W. Kim and M. W. Lww, Diarylheptanoids from the stem barks of *Alnus hirsuta* var. *sibirica*, *Kor. J. Pharmacog.*, **31**, 28-33 (2000).
- 5) M. W. Lee, D. W. Jeong, Y. A. Lee, M. S. Park, D. W. Jeong and S. H. Toh, Flavonoids from the leave of *Alnus hirsuta*, *Yakhak Hoeji.*, **43**, 547-552 (1999).
- 6) K. W. Ahn, S. H. Toh, D. W. Jeong, J. S. Kim, S. M. Cho and M. W. Lee, Flavonoids from the leave of *Alnus maximowiczii* Call, *Yakhak Hoeji.*, **44**, 41-46 (2000).
- 7) M. W. Lee, T. Tanaka, G. Nonaka and I. Nishioka, Hirsunin, an ellagitannin with a diarylheptanoid moiety from *Alnus hirsuta* var. *microphylla*, *Phytochemistry.*, **31**, 967-970 (1992).
- 8) M. W. Lee, T. Tanaka, G. I. Nonaka and I. Nishioka, Dimeric ellagitannins from *Alnus japonica*, *Phytochemistry.*, **31**, 2835-2839 (1992).
- 9) M. W. Lee, N. Y. Kim, M. S. Park, K. H. Ahn, S. H. Toh, D. R. Hahn, Y. C. Kim and H. T. Chung, Diarylheptanoids with *In vitro* Inducible Nitric Oxide Synthesis Inhibitory Activity from *Alnus hirsuta*, *Planta Med.*, **66**(6), 551-553 (2000).
- 10) M. W. Lee, J. H. Kim, D. W. Jeong, K. H. Ahn, S. H. Toh and Y. J. Surh, Inhibition of Cyclooxygenase-2 Expression by Diarylheptanoids from the Bark of *Alnus hirsuta* var. *sibirica* *Biol. Pharm. Bull.*, **23**(4), 517-518 (2000).
- 11) D. I. Lee, J. K. Chang, M. W. Lee and S. G. Hong, Effects of Oregonin, diarylheptanoid derivative from plant on antitumor, *Chung-Ang J. Pharm. Sci.*, **12**, 50 (1998).

- 12) Y. A. Lee, K. H. Kim, J. S. Kim, S. M. Cho, S. W. Kim and M. W. Lee, Antioxidative Effects of Darylheptanoids from *Alnus hirsuta*, *Yakhak Hoeji.*, **44**, 193-196 (2000).
- 13) R. Yamazaki, H. Hatano, R. Aiyama, T. Matsuzaki, S. Hashimoto, T. Yokokura, Diarylheptanoids suppress expression of leukocyte adhesion molecules on human vascular endothelial cells, *Eur. J. Pharm.*, **404**(3), 375-385 (2000).
- 14) J. Hadgraft, Percutaneous absorption: possibilities and problems, *Int. J. Pharm.*, **16**, 255-270 (1983).
- 15) R. Neubert, W. Wohlrab, In vitro methods for biopharmaceutical evaluation of topical formulation, *Acta. Pharm. Technol.*, **36**, 197-206 (1990).
- 16) I. Eros, Optimization of drug release from dermatological semisolid preparations, *Drug Dev. Res.*, **59**, 316-325 (2003).
- 17) E. W. Park, Drug release and skin Irritancy of hydrogel and cream preparations containing kojic acid, *약제학회지*, **28**(3), 177-183 (1998).