

N-methyl-2-pyrrolidone 제제의 경피흡수촉진효과

이 근 수[†] · 이 동 환 · 김 경 범 · 고 현 주 · 표 형 배

한불화장품(주) 기술연구소

(2010년 5월 3일 접수, 2010년 6월 15일 수정, 2010년 6월 17일 채택)

Synergistic Effects of N-methyl-2-pyrrolidone on Skin Permeation of a Hydrophobic Active Ingredient

Geun Soo Lee[†], Dong Hwan Lee, Kyoung Bum Kim, Hyun Joo Ko, and Hyeong Bae Pyo

R&D Center, Hanbul Cosmetics Co. Ltd, 72-7, Yongsung-ri, Samsung-myun, Umsung-kun,
Chungbuk 369-834, Korea

(Received May 3, 2010; Revised June 15, 2010; Accepted June 17, 2010)

요약: 피부에서 표피를 통한 물질의 수송은 피부의 여러 가지 보호 작용으로 인해 경피 흡수가 쉽게 이루어지지 않아 결과적으로 생리 활성 성분이 그 효과를 발휘하는 진피층까지 도달하기 어렵다. 본 연구는 피부에서 매우 낮은 농도가 투과되는 친수도가 높은 약물(알부틴)의 경피흡수를 촉진하는 화학적 촉진제의 *in vitro* 흡수 양상에 대한 연구이다. 화학적 촉진제로 N-methyl-2-pyrrolidone (NMP)을, 경피흡수장치는 Franz diffusion cell을 사용하였다. NMP는 약물의 경피흡수에 상당히 영향을 준다는 것을 알 수 있었다. NMP는 피부 지질층의 유동성에 영향을 주지 않고 약물의 보조흡수제로 작용하여 알부틴의 경피흡수촉진비율을 약 1.3 ~ 1.5배 증가 시켰지만 지연 시간의 변화는 없었다. 따라서 NMP는 친수성 생리활성 물질의 효과적인 화학적 경피흡수 촉진제로 작용하였으며, 향후 화장품 제형 및 약물전달체계에 응용이 기대된다.

Abstract: The formidable barrier property of the stratum corneum and the high hydrophilicity of active ingredient make it difficult to permeate through the skin and reach to its site of action. The aim of this study was to investigate the effect of chemical penetration enhancers on the skin permeation of a hydrophilic cosmetic active ingredient, such as arbutin. The enhancing effects of N-methyl-2-pyrrolidone (NMP) on the permeation of a hydrophilic cosmetic active ingredient were evaluated by using Franz diffusion cell. The study indicated that NMP has considerable influence on the skin permeability. NMP was not only the most effective enhancer but also increased the skin permeability of arbutin approximately 1.3 ~ 1.5 fold compared with control without penetration enhancer. The lag time did not change with NMP, which suggested no effect of NMP on skin lipid fluidity. This suggest that arbutin co-permeated with NMP. The results indicate NMP is effective enhancer of a hydrophilic cosmetic active ingredient in penetration, with potential applications for drug delivery system.

Keywords: N-methyl-2-pyrrolidone, enhancement ratio, cosmetic, hydrophobic active ingredient

1. 서 론

피부는 조직학적으로 표피, 진피, 피하지방 등으로 구성되어 있으며, 두께는 부위, 연령 및 성별에 따라 다르

다. 다양한 피부조건이 존재하지만, 이러한 피부들은 각각 외부로부터의 장벽기능 및 기타 생리학적 기능 등의 역할을 수행하고 있다. 각질층은 상대적으로 소수성이 높은 불용성 단백질인 케라틴이 고밀도로 집적되어 있는 각화성 상피세포가 지질의 얇은 층인 세포간지질이층막을 사이에 두고 적층 되어 있는 구조로서, 지질과 불용성

[†] 주 저자 (e-mail: aria@hanbul.co.kr)

단백질이 풍부한 매트릭스의 독특한 계층적 구조가 외부 환경 유래의 다양한 형태의 물리, 화학적 요인에 대한 불투과적 성질을 만든다.

따라서 일반적으로 건강한 피부에서 각질을 통한 물질의 수송은 피부의 여러 가지 보호 작용으로 인해 쉽게 이루어지지 않으며, 투과된다고 하여도 매우 낮은 농도만 투과될 뿐이다. 하지만, 화장품의 경우, 포함된 생리활성 물질이 그 효능을 나타내기 위해서는 피부의 최외각층인 각질층을 통과하여야만 하며, 각질층의 이러한 장벽 기능으로 인해, 화장품에 포함된 생리활성물질이 그 기능을 충분히 나타내지 못하는 문제점을 가진다. 이러한 피부 장벽을 극복하고 화장품에 포함된 생리활성물질이 그 기능을 나타내기 위해서는 화장품에 생리활성물질을 고농도로 포함시켜야만 하는데 이 경우, 고가의 활성물질로 인해 제품의 가격 상승 요인이 되며, 고농도로 포함된 생리활성물질로 인해 피부 자극 유발 가능성이 높아지며, 또한 많은 양의 생리활성물질이 화장품의 안정성을 저해하는 특징을 가지고 있어, 고농도로 처방할 경우, 제형화에 문제점을 가진다[1-3].

따라서, 이러한 문제점을 극복하기 위해서는, 소량의 생리활성물질을 피부를 통해 효과적으로 흡수시킬 수 있는 약물전달체계의 개발이 중요하며, 전통적으로 약물 전달체를 이용한 기술 또는 화학적 촉진제를 이용하는 방법이 소개되고 있다[4-7].

본 연구에서 화학적 촉진제로 적용한 N-methyl-2-pyrrolidone (NMP)은 화장품에서 일반적으로 용제 및 유연제로 사용되지만 분자구조가 양이온성인 물질로 약물에 대하여 경피흡수를 촉진한다고 알려져 있다[8-10]. 특히 비수용성 약물의 용해도를 증가시켜주는 용매보조제이며, ethanol, dimethyl sulfoxide 등과 유사한 용해도를 가지고 있고 피부 자극이 낮은 피롤리돈산 유도체로 보고되고 있다[11].

본 연구에서 사용한 알부틴은 피부에 멜라닌 형성과 티로시나아제 효소의 활성을 효과적으로 제어하는 피부 미백제로 잘 알려져 있으며 식품의약품안전청 고시 미백 성분이다[12,13]. 더욱이 친수성 약물인 알부틴(logP value, -1.49)은 *in vitro* 경피흡수실험에서 생체막과 간섭이 없고 분석이 용이하며 안정한 분자 구조를 갖고 있어 model drug으로 사용하기에 적합하다.

본 연구는 화장품에서 친수성 약물의 피부흡수능 향상을 위해 화학적 촉진제로 NMP의 영향에 대한 고찰을 통하여, 향후 경피 흡수 전달 시스템 연구에 보탬이 되고자 한다.

2. 재료 및 실험

2.1. 시약 및 기기

본 실험에 사용한 알부틴(Bioland, Korea), N-methyl-2-pyrrolidone (C_5H_9NO , Sigma, USA)사로부터 구입하여 사용하였으며, 이외의 모든 시약은 특급 혹은 일급시약 그리고 화장품 등급을 사용하였다. 실험에 사용한 모든 완충액은 Milli Q (Mikipore, USA)에 18 M Ω -cm로 통과시켜 제조한 증류수를 사용하였다. 본 실험에 사용한 HPLC는 Waters 2690 alliance separation module (Waters, USA), peristaltic pump (Watson-Marlow, UK), 분획수집기(Reptriver IV, Teledyne ISCO Inc., USA), multi-point magnetic stirrer (Poly15, Variomag, Germany) 및 Franz diffusion cell 등을 사용하였다.

2.2. 세포 생존율 실험

화학적 촉진제로 사용한 NMP의 세포에 대한 독성을 methylthiasoletetrazolium (MTT) 방법을 이용하여 측정하였다. 사람섬유아세포(HDF, human dermal fibroblast, isolated from human neonatal foreskin, Modern Tissue Technology Inc., Korea)를 2×10^4 cell/well 농도로 96 well plate (0.33 cm² / well, NUNC, Denmark)의 well에 N-methyl-2-pyrrolidone를 투입하여 37 °C CO₂ 배양기에서 24 h 배양하였다. MTT액(Sigma, USA) 5 μ g/mL을 첨가하고 4 h 후, 원심분리하여 상등액을 제거하고 Isopropanol-HCl (0.04 N, Sigma, USA) 100 μ L를 첨가한 후 570 nm에서 microplate reader (Biotech Instrument, USA)로 흡광도를 측정하였다.

2.3. *In vitro* 경피흡수 실험

실험에 사용한 피부는 8 ~ 10 주령의 암컷 hairless mouse (체중 170 ~ 200 g)를 제일약품(주)로부터 공급받아 등쪽 피부를 떼어내어 피하 지방과 조직들을 생리 식염수로 피부가 상하지 않도록 주의하여 제거한 다음 피부를 잘 펴서 사용할 때까지 -70 °C에서 보관하였으며, 실험 전에 해동하여 사용하였다. 동결된 hairless mouse 피부를 실험 전에 상온에서 서서히 녹이고 Franz diffusion cell의 donor와 receptor 부위 사이에 피부를 끼운 다음, 피부 위 표면에 시료를 투여하였다. Receptor에는 pH 7.4 인산염 완충액(phosphate buffered saline)을 넣고 온도를 37 °C로 유지하면서 300 rpm으로 계속 교반하였다. 이 때 receptor와 접촉하는 피부의 면적은 2 cm² 이었고 receptor의 용량은 5 mL이었다. 각 시료 1 mL을

Table 1. Composition for Skin Permeation Experiment (wt%)

Sample	Control	Sample A	Sample B	Sample C
NMP	-	1	5	10
Arbutin	2	2	2	2
Ethanol	40	40	40	40.
Water	q.s to 100			

피부 표면에 투여 후, 시료는 분획수집기를 사용하여 일정 시간 간격으로 채취하였다.

그리고 피부잔류량 실험은 Mura와 Bian 등의 방법 [14,15]을 참고로 하여 측정하였는데, 먼저 경피흡수 실험 종료 후에 피부를 생리식염수를 사용하여 충분히 씻어낸다. 시료를 처리한 피부만을 절제하고 -70 °C 냉동 건조기에 보관한 다음 해동시켜 tris buffer 1 mL을 가하고, 초음파 처리하여 균질화 하였다. 균질액에 *t*-butyl ethyl ether 5 mL을 가하여 원심분리 시킨 후 상등 액 1 mL를 취하고, 50 °C에서 증발 건조시킨 후 용제에 녹여 HPLC로 잔류량을 측정하였다.

2.4. HPLC를 이용한 정량

모든 샘플들은 13 mm의 disk filter (pore size 0.45 μ m)로 주입하기 전에 여과하였고 diode array detector system 996 (Waters, USA)를 장착한 Waters 2690 alliance separation module (Waters)로 분석하였다. Xterra RP18 (5 μ m, 4.6 \times 205 mm, Waters) 컬럼을 고정상으로 이용하였고 알부틴의 이동상은 메탄올·물·아세트산 완충액을 10 : 80 : 10의 혼합용매로 유속은 0.8 mL/min, 검출은 280 nm의 파장으로 하였다.

2.5. NMP의 경피흡수촉진 효과

피부투과 촉진 양상을 관찰하기 위하여 Franz diffusion cell에 hairless mouse의 피부를 장치한 다음, Table 1에 나타난 조성을 donor 부위의 피부표면에 적용하여 receptor에서 26 h 동안 1 h 간격으로 1 mL의 시료를 채취하였고, 즉시 동량의 신선한 인산염 완충액으로 보충하였다. 채취 시료의 농도는 전술한 조건의 HPLC를 이용하여 정량하였다.

2.6. NMP 적용 화장품의 경피흡수 양상

화학적 촉진제를 적용한 화장품 제형의 피부투과 촉진 거동을 관찰하기 위하여 Franz diffusion cell에 hairless mouse 피부를 장치한 다음, Table 2에 나타난 조성을 donor의 피부표면에 적용하여 receptor에서 일정 시간 동안

Table 2. Composition of Formulation for Skin Permeation Experiment (wt%)

Ingredients	Control	Product
Polygutanium-37	0.2	0.2
Arbutin	2.0	2.0
NMP	-	5.0
PEG60 Hydrogenated castor oil	0.5	0.5
Glycereth-26	10.0	10.0
Methyl paraben	0.15	0.15
fragrance	0.05	0.05
Ethanol	10.0	10.0
Water	q.s to 100	

1 h 간격으로 1 mL의 시료를 채취하고 동량의 신선한 인산염 완충액으로 보충하였다. 채취시료의 알부틴 함량은 전술한 조건의 HPLC를 이용하여 정량하였다.

2.7. 경피흡수 실험 자료분석

피부의 단위면적 당 투과된 약물의 축적량과 시간에 대한 기울기로부터 평형 상태에서의 flux를 계산하였다. Lag time (T_L)은 직선이 x축을 통과하는 시간으로부터 구하였다. 기체 및 피부투과 촉진제의 효과는 경피흡수 촉진비율(enhancement ratio, ER), 평형상태에서의 flux 및 투과계수 등을 다음 식으로 계산하여 비교 분석하였다[16].

$$J_s = 1 / S (dQ/dt)_{ss} = K_p C_d$$

J_s 는 평형상태에서의 flux, T_L 은 lag time, S는 투과가 일어나는 면적, $(dQ/dt)_{ss}$ 는 평형상태에서 피부를 통과하는 약물의 양을 시간에 대하여 plotting하여 얻은 기울기, C_d 는 약물의 기체에서의 포화농도, 그리고 K_p 는 투과계수를 나타낸다. ER는 다음 식과 같이 구하였다[17].

$$ER = (K_p \text{ with pretreatment} / K_p \text{ without pretreatment})$$

3. 결과 및 고찰

3.1. NMP의 세포 독성

화학적 촉진제의 경우, 우수한 피부장벽 제어능 이외에 피부에 대한 안전성이 중요하다. HDF에 대한 NMP의 세포 독성을 측정한 결과, NMP는 5 wt% 이하의 농도로 처리 시 세포 생존률이 95 % 이상으로 나타나 피부에 안

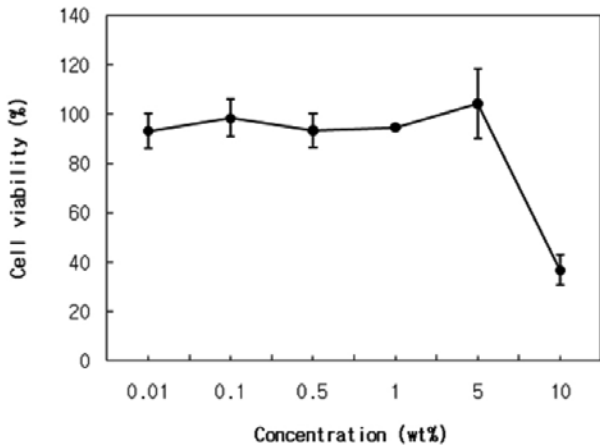


Figure 1. Relative cell viability of NMP on human dermal fibroblast by MTT assay.

전한 것으로 나타났다(Figure 1).

3.2. NMP의 경피흡수 촉진 효과

NMP는 일반적으로 제형 내에서 용매 역할 이외에 보조계면활성제 및 유연제, 분산제로서 화장료에 기여한다. 피부에서 약물의 경피흡수 촉진 메커니즘은 1) system 내 약물 용해도 변화, 2) 열역학적인 활성 증가, 3) 피부 지질층의 유동성 변화를 통한 확산 저항 감소, 4) 약물의 흡수보조제, 5) 피부에서 약물의 용해도 증가 등을 들 수 있다. 상기 메커니즘 중 NMP의 경우, 피부 지질의 유동성 변화에 영향을 줄 만큼 alkyl group의 길이가 충분히 길지 않고 경피흡수 거동 시 lag time의 변화가 없기 때문에 피부장벽의 확산 저항 감소 요인과는 무관하다[18,19].

Table 3과 Figure 2를 보면, NMP는 26 h 후, 대조군에 비해 알부틴의 투과량은 증가하였지만 lag time의 변화는 없었다. 그리고 NMP의 농도가 1 wt%와 5 wt%에서 경피흡수촉진비율이 각각 1.36과 1.33으로 대조군에 비하여 증가하였으나 10 wt%에서는 오히려 저하하였다. 결국 NMP는 피부 지질층의 유동성에 변화에 영향을 주어 알부틴의 투과를 촉진한 것이 아니라 알부틴의 흡수 보조제 역할을 통해 경피흡수를 촉진하였다.

또한 약물의 피부잔류량 실험에서, 26 h 후 알부틴의 피부투과비율을 보면, NMP 함량이 5 wt%까지 알부틴의 피부투과량이 증가하였으나 10 wt%에서는 오히려 화학적 촉진제로 사용한 NMP에 의해 약물의 피부 투과 경로가 막혀 피부 및 수용체 부분의 알부틴 함량이 낮았다(Figure 3). 이 역시 10 wt% 이상 함량부터 NMP가 알부틴의 경피흡수보조제 기능을 상실하였기 때문으로 판단된다.

Table 3. Effect of NMP in 40/60 Ethanol/Water Mixtures on Arbutin Skin Permeation Parameters (after 26 h)

Enhancer	Lag time (h)	Flux ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)	Percutaneous absorption rate (%)	Enhancement ratio (ER)
Control	4.64	2.06	0.54	1
Sample A	4.75	2.80	0.73	1.36
Sample B	4.79	2.74	0.71	1.33
Sample C	5.24	1.29	0.33	0.62

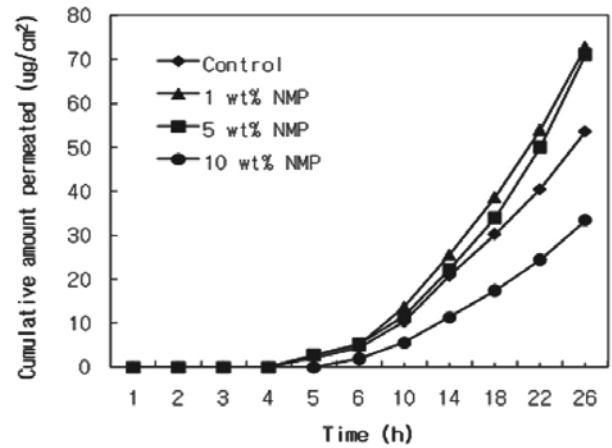


Figure 2. Permeation profiles of arbutin in presence of different concentrations of NMP through hairless mouse skin (after 26 h).

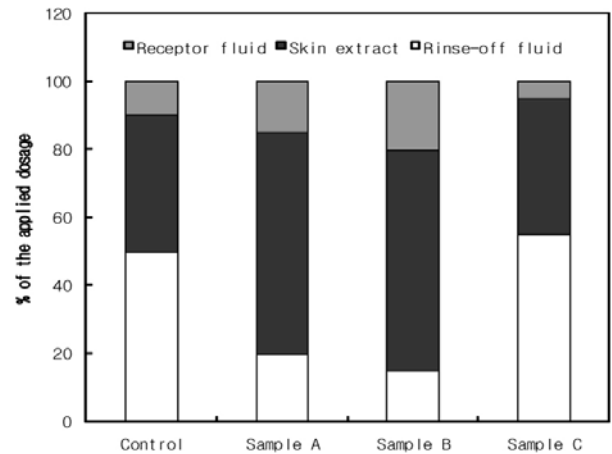


Figure 3. Graphical representation of arbutin penetration rates (after 26 h).

따라서, NMP에 의한 알부틴의 피부 흡수능은 NMP의 함량이 1 ~ 5 wt%의 함량에서 가장 우수하였다. 그리고 10 wt% 함량에서 NMP는 알부틴의 투과량 및 투과비율

Table 4. Effect of NMP in Cosmetic Formulation on Arbutin Skin Permeation Parameters (after 14 h)

Enhancer	Lag time (h)	Flux ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)	Percutaneous absorption rate (%)	Enhancement ratio (ER)
Control	4.98	1.88	0.26	1
Product	4.62	2.89	0.40	1.54

Table 5. Effect of NMP in Cosmetic Formulation on Arbutin Skin Permeation Parameters (after 26 h)

Enhancer	Lag time (h)	Flux ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)	Percutaneous absorption rate (%)	Enhancement ratio (ER)
Control	4.98	5.12	1.33	1
Product	4.62	4.44	1.15	0.87

그리고 경피흡수촉진비율이 저하함에 따라 농도 의존적으로 약물의 피부흡수가 증가하지 않았다.

NMP를 화장품 제형에 적용 시, 알부틴의 피부흡수 양상을 Table 4와 Table 5에 나타내었다. NMP를 5 wt% 적용한 화장료의 알부틴 흡수는 14 h 후, 경피흡수촉진비율이 1.54로 개선되었으며 약물의 피부 투과량도 2.89 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 으로 1.65배 증가하였다. NMP 적용 화장료는 알부틴의 경피흡수를 효과적으로 촉진하였다. 그러나 26 h 까지 long term으로 알부틴의 경피흡수 양상을 측정하였을 경우, 대조군에 비하여 약물의 피부투과량 및 경피흡수비가 줄어 결과적으로 경피흡수촉진비율이 0.87으로 감소 하였다. 이는 알부틴 이외에 화장품 제형 구성 성분이 시간이 경과하면서 생체막의 경피 흡수 통로를 서서히 폐쇄시킨 것으로 생각된다.

따라서 이러한 특성을 가진 NMP는 친수성 생리 활성 물질과 피부에 효과적인 화학적 경피흡수 촉진제로 판단 된다.

4. 결 론

최근 화장품은 단순히 피부의 아름다움을 위한 피부미용제의 역할을 뛰어 넘어 치유의 개념을 포함한 기능성 제품의 개발에 집중되고 있다. 생리활성물질의 연구의 중요도만큼 이들의 피부에서의 효과를 발휘하기 위한 경피흡수 메커니즘이 중요하다. 생리활성물질이 signal cascade를 통해 효능, 효과를 발휘하기 위해서는 표피층을 지나 진피세포까지 효과적으로 도달해야 한다.

따라서, 본 연구에서는 화장품에 일반적으로 많이 사용되는 친수성 활성 물질이 피부에서 실질적인 효과를 극대화를 위하여, 활성성분의 피부 내 전달 촉진 체계의

개선을 목적으로 화학적 촉진제 역할을 하는 NMP를 이용하여 생체막을 이용한 *in vitro* 경피흡수 실험을 하였다. 그 결과, NMP는 알부틴의 경피흡수를 촉진하였으며 피부 안전성도 문제가 없었다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때, 화장품 제형 설계 시 약물의 효과적인 피부 전달을 위해 적절한 화학적 촉진제의 선택은 필요하다.

감사의 글

본 연구는 2008년 지식경제부 지역산업기술개발사업의 연구비 일부에 의하여 이루어진 것으로 지원에 감사드립니다(과제번호 70004243).

참 고 문 헌

1. J. L. Zatz, Optimizing skin delivery, *Cosmet. Toiletr.*, **115**, 31 (2000).
2. J. W. Wiechers, Avoiding transdermal cosmetic delivery, *Cosmet. Toiletr.*, **115**, 39 (2000).
3. S. Magdassi and E. Touitou, Novel Cosmetic Delivery Systems, Marcel Dekker, NewYork, 1 (1999).
4. B. J. Aungst, N. J. Rogers, and E. Shefter, Enhancement of naloxone penetration through human skin *in vitro* using fatty acids, fatty alcohols, surfactants, sulfoxides and amides, *Int. J. Pharm.*, **33**, 225 (1986).
5. H. S. Gwak and I. K. Chun, Effect of vehicles and penetration enhancers on the *in vitro* percutaneous absorption of oxycam through hairless mouse skin, *Int J. Pharm.*, **236**, 57 (2002).
6. D. K. Hinch, A. E. Oliver, and J. H. Crowe, Lipid composition determines the effects of arbutin on the stability of membranes, *Biophysical J.*, **77**, 2024 (1999).
7. N. Kanikkannan, K. Kandimalla, S. S. Lamba, and M. Singh, Structure activity relationship of chemical penetration enhancers in transdermal drug delivery, *Cur. Med. Chem.*, **6**, 593 (1999).
8. Y. G. Bachhav and V. B. Patravale, Exploring the potential of n-methyl pyrrolidine as a cosurfactant in the microemulsion systems, *Int. J. Pharmaceutics*, **326**, 186 (2006).

9. S. Akhter and B. W. Barry, Absorption through human skin of ibuprofen and flurbiprofen, *J. Pharm. Pharmacol.*, **37**, 27 (1985).
10. H. Sasaki and J. Nakamura, Enhancing effect of pyrrolidone derivatives on transdermal drug delivery 1, *Int. J. Pharm.*, **44**, 15 (1988).
11. H. Sasaki and J. Nakamura, A cute toxicity and skin irritation of pyrrolidone derivatives as transdermal penetration enhancer, *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 2308 (1990).
12. Z. M. Hua, Q. Zhoua, and T. C. Lei, Effects of hydroquinone and its glucoside derivatives on melanogenesis and antioxidation, *J. Dermatological Sci.*, **55**(3), 179 (2005).
13. 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 (1998).
14. P. Mura, M. T. Faucci, and P. Corti, Evaluation of hencer from hydrophilic gel formulations, *Eur. J. Pharmaceutical Sci.*, **9**, 365 (2000).
15. S. Bian, J. S. Kim, and D. D. Kim, *In vitro* evaluation of patch formulations for topical delivery of gentisic acid in rats, *Eur. J. Pharmaceutical Sci.*, **18**, 141 (2003).
16. T. K. Ghosh, W. R. Pfister, and S. I. Yum, *Tranderma land Topical Drug Delivery Systems*, Interpharm Press, Buffalo Grove, U.S.A. (1997).
17. A. C. Williams and B. W. Barry, Essential oils as novel human skin penetration enhancers, *Int. J. Pharm.*, **57**, R7 (1989).
18. K. Yoneto and D. K. Lee, Mechanistic studies of the 1-alkyl-2-pyrrolidones as skin permeation enhancers, *J. Pharm Sci.*, **84**, 312 (1995).
19. A. Koizumi and Y. Watanabe, Effect of N-methyl-2-pyrrolidone on skin permeation of estradiol, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **57**, 473 (2004).