

피부흡수 대체시험법의 조건설정을 통한 수용성, 지용성 물질의 투과 특성 연구

서지은* · 이진호** · 김배환*†

*계명대학교 자연과학대학 공중보건학전공

**계명대학교 자연과학대학 화학전공

A Permeation Characteristics Study of Water- or Oil-soluble Substances through Condition Setting for the In Vitro Skin Absorption Method

Ji-Eun Seo*, Jinho Lee**, and Bae-Hwan Kim*†

*Department of Public Health, College of Natural Sciences, Keimyung University, Daegu, Korea

**Department of Chemistry, College of Natural Sciences, Keimyung University, Daegu, Korea

ABSTRACT

Objectives: The purpose of this study was to compare permeation characteristics in three skin types using oil-soluble benzoic acid and water-soluble caffeine after method condition optimization based on OECD guideline 428.

Methods: A Franz diffusion cell, a reliable alternative method for skin permeation, was used. One-milliliter samples were taken and immediately replaced with fresh solution in the receptor chamber at regular time intervals (1, 2, 4, 7, 10 and 24 hr). The amount of test substances was measured by LC-MS/MS.

Results: The permeation rate increased dose-dependently, and the permeation orders were KeraSkin™ > hairless mouse full skin > human cadaver epidermis for skin types, and benzoic acid solution > caffeine solution > benzoic acid cream > caffeine cream for type of test materials.

Conclusion: According to the definitions of Marzulli, benzoic acid and caffeine would be classified as 'fast' and 'moderate' compared with the permeation of other chemical species. The setting conditions and permeation characteristics performed in this study are expected to contribute to future permeation studies.

Keywords: Franz cell, skin permeation, alternative method, condition setting

I. 서 론

피부는 복잡한 구조로 이루어져 있으며, 직접적으로 환경에 접하고 있는 기관으로, 주요 물질 확산에 대한 장벽 기능을 하고 있다^{1,2)}. 또한 체내로부터 수분 손실 방지와 외부로부터의 물질 투과를 방지하는 역할을 수행한다³⁾. 외부로부터 물리화학적 자극으로 피부장벽이 손상되면 표피를 통한 수분 손실

(transepidermal water loss; TEWL)이 발생하고 이는 약물의 투과성을 증가시킨다⁴⁾. 피부를 통한 약물의 투과는 손상되지 않은 표피를 통한 확산과 모낭 및 땀샘과 같은 피부 부속 기관들을 통한 확산 등을 통해 이루어지지만, 피부의 장벽기능으로 인해 물질 흡수는 많은 저항을 받는다⁵⁾.

피부 흡수 효과와 투과량, 위해성 등의 연구는 피부에 도포되는 약물 등의 개발에 중요한 연구항목이

†Corresponding author: Department of Public Health, College of Natural Sciences, Keimyung University, Daegu 42601, Korea, Tel: +82-53-580-5933, Fax: +82-53-580-5164, E-mail: kim9399@kmu.ac.kr

Received: 21 December 2016, Revised: 16 February 2017, Accepted: 20 February 2017

므로⁶⁾, 화장품 또는 피부화학 분야에서 주로 연구되어 왔으나, 최근엔 생활환경이나 산업분야에서도 연구가 다양하게 진행되고 있다⁷⁻⁹⁾. 일상생활이나 산업분야에서 화학물질을 대량 또는 잦은 빈도로 취급하는 경우, 사용방법 및 조건에 따라 노출에 의한 건강장해를 초래할 수도 있기 때문에, 화장품, 의약품, 농약 및 기타 위험 물질 등의 피부노출에 의한 흡수에 대해 제대로 평가할 필요가 있다¹⁰⁾.

이 시험의 경우 시험물질의 제형 차이¹¹⁾, 화학물질의 물리화학적 성질, 피부의 상태(연령, 부위 및 병변여부), 온습도 등 환경요소, 화학물질의 접촉 면적이거나 시간 등 다양한 조건들도 피부흡수에 큰 영향을 줄 수 있기 때문에¹²⁾, 이에 대한 검증연구는 지속적으로 필요하다¹³⁾.

In vitro Franz diffusion cell 피부흡수방법은 장착된 피부를 통과하여 시험물질이 수용액으로 이동한 양을 측정하는 방법으로, 피부투과 특성을 평가하기에 용이하고 시험물질에 대하여 반복 측정도 가능하며, 살아있는 동물을 많이 희생시키지 않아도 되는 유용한 대체시험법으로 알려져 있다¹⁴⁾. 이 방법은 시험물질을 특정 조건하에서 24시간동안 피부에 노출시킨 후 피부를 통과하여 수용액에 녹아 있는 시험물질을 일정한 시간 간격으로 채취하여 시험물질이나 대사물질을 분석하는데, 시료 채취를 일반적으로 24시간 동안 6~12회로 하며, 시험의 목적에 따라 빈도를 조절할 수도 있다. 24시간을 경과하면 피부의 상태가 나빠지므로 시료 채취 시간은 24시간을 초과하지 않도록 하고 있다¹⁴⁾.

피부흡수 연구에 사용되는 피부는 주로 rat, hairless mouse, 돼지 등의 동물 피부와 인체 cadaver를 사용하며, rat이나 hairless mouse 피부가 실험의 편리성 등으로 인해 많이 사용되고는 있지만 사람피부에 비하여 투과도가 높고, 돼지 피부는 사람과 유사하거나 약간 높은 투과도를 나타낸다고 보고되어 있다¹⁵⁾. 피부는 적출 이후 -20°C에서 수개월 보관 가능하며, 보관되어진 피부를 사용할 때는 시험 전 구조적 무

결성을 입증해야 한다. -80°C의 너무 낮은 온도에 보관되었을 때는 오히려 피부조직의 투과가 증가하는 것으로 보고되어 있다^{14,16)}.

피부흡수 대체시험법의 정확도와 신뢰성을 위해 caffeine과 benzoic acid이 표준물질로 지정되어 있다¹⁴⁾. Caffeine은 커피, 초콜릿, 차 등에 함유된 식용 성분으로 분자량이 작고, 물에 대한 용해도와 흡수율이 좋아 수용성 물질의 피부흡수 대조물질로 많이 이용되고¹⁷⁾, benzoic acid는 가장 간단한 carboxylic acid로서 방부제로도 사용되는 물질로 지용성 물질에 대한 피부흡수 표준물질로 많이 사용된다¹⁸⁾.

본 연구에서는 OECD guideline 428에서 제시하고 있는 방법을 바탕으로 수용성인 caffeine과 지용성인 benzoic acid에 대한 피부 투과정도를 피부 3 종류(hairless mouse full skin, human cadaver epidermis, KeraSkin™)를 이용하여 비교 평가 하였으며, 또한 가이드라인에서 제시된 시험조건을 일부 조정 하였을 때의 투과차이를 비교 분석하여 최적의 시험조건을 제시하고자 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시험물질 및 기기

피부흡수 시험물질로 사용한 수용성 물질인 caffeine과 지용성 물질인 benzoic acid는 Sigma-Aldrich사 (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여(Table 1) distilled water(DW) 및 olive oil에 각각 2%, 5%의 농도로 녹여 solution형태로 시험하였으며, 또한 oil in water(O/W) type의 cream base(Table 2)에 시험물질을 각 2%, 5%의 농도로 제조하여 흡수양상을 비교하였다.

경피흡수 실험에 사용한 Franz diffusion cell(Lab fine, Korea) 장치는 receptor volume이 5 ml인 것을 사용하였으며, 경피수분손실량의 측정은 Tewameter (CM825, CK electronic GmbH, Germany)를 사용하였다. 분석은 LC-MS/MS(Waters ACQUITY UPLC,

Table 1. Test substances

Test substances	Characteristic	CAS No.	Molecular weight (g/mol)	K_{ow}
Benzoic acid	Oil-soluble	65-85-0	122.12	1.87
Caffeine	Water-soluble	58-08-2	194.19	-0.07

CAS No.: Chemical Abstracts Service Number, K_{ow} : Octanol-water partition coefficient.

Table 2. Ingredients of cream base

Phase	Trade name	INCI name	Function	Percentage
A (Water-phase)	D.I water	Deionized water	Solvent	79.48
	EDTA 2Na	Disodium EDTA	Chelating agent	0.02
	1,3-B.G	1,3-Butylene glycol	Humectant	5.00
	MP	Methyl paraben	Preserved agent	0.20
B (Oil-phase)	TCG-M	Caprylic/capric triglyceride	Emoliente	10.0
	Lanette O	Cetearyl alcohol	Stabilizer	2.00
	GMS 205	Glyceryl stearate SE	Emulsifier	0.64
	Tween 60	Polysorbate 60	Emulsifier	1.56
	PP	Propyl paraben	Preserved agent	0.10
C (Viscosity agent)	Sepigel 305	Polyacrylamide and C13-14 Isoparaffin and Laureth-7	Viscosity agent	1.00
				100

*add a certain percentage of test materials instead of DI water

Micromass Quattro micro™ API, Applied Biosystems, USA) 방법을 이용하였으며, 분석컬럼은 Cazenda ODS C18(Imtakt, 3 µm, 2.0 × 100 mm, Japan)을 사용하였다.

2. 피부 준비 및 무결성 측정

Hairless mouse full skin을 얻기 위해, 7주령의 수컷 hairless mouse를 (주)오리엔트바이오(경기도, Korea)로부터 분양받아 1주간 온도 22 ± 3°C, 습도 50 ± 5%, 명암주기 12시간 밤과 낮 단위로 조절되는 표준사육시설에서 적응시킨 후 부검하여 피부를 적출하였다. Hairless mouse의 배와 등 부위 피부를 적출하여 피하지방 및 혈관을 제거하고, 피부는 실험 전까지 -20°C 냉동고에 보관하였다가 실험 직전 상온에서 서서히 녹여 실험에 사용하였다. 실험의 모든 과정은 계명대학교 동물실험윤리위원회의 승인(승인번호 KM-2014-44)을 얻은 후 가이드라인에 의거하여 실험을 진행하였다.

Human cadaver epidermis는 (주)한스바이오메드(경기도, 한국)로부터 구입하여 실험 전까지 -20°C 냉동고에 보관하였고, 실험 직전 상온에서 서서히 녹여 실험에 사용하였다. 이는 계명대학교 생명윤리위원회의 승인(승인번호 40525-201404-BR-25-02)을 얻은 후 가이드라인에 의거하여 실험을 진행하였다.

인공피부인 Keraskin™은 (주)MCTT(서울, 한국)에서 구입하였고, 전배양을 거친 후 실험에 사용하였다. 실험에 사용한 피부 두께는 흡수에 영향을 줄 수

있으므로 실험 직전 digital vernier calipers(PK-1012SU, Mitutoyo, Japan)를 사용하여 동일 부위 3회 반복 측정하였다. 피부 무결성 측정을 위해 Tewameter를 이용하여 경피수분손실량(transepidermal water loss, TEWL)을 동일 부위에 10회 반복 비침습 방법으로 측정하였으며, 평균값을 구한 피부 중에 10 mg/m²/h 이상 피부는 손상된 것으로 판단하여 실험에서 제외하였다¹⁹⁾.

3. Franz diffusion cell

사용한 Franz diffusion cell은 Franz method에 따른 static diffusion cell 형태로²⁰⁾, 내경이 10 mm이고 장치 자체의 온도와 stirrer의 회전속도(rpm, revolution per minute)의 조절이 가능하며, donor chamber 및 receptor chamber로 이루어져 있다. Donor chamber는 cap의 개폐가 가능하며, receptor fluid 용량은 5 ml이고, sampling port를 통해 마이크로 피펫이나 syringe를 이용하여 시료를 채취가 가능하다. 바닥에는 마그네틱 바를 넣어 receptor fluid를 골고루 혼합할 수 있다(Fig. 1). Receptor fluid는 시험물질이 잘 녹고, 분석에 영향을 주지 않는 용액으로 결정하며¹⁴⁾, 본 연구에서는 PBS, saline, ethanol/water (1:1, v/v)를 사용하였다.

4. In vitro 경피흡수 실험 및 자료분석

Donor chamber와 receptor chamber 사이에 각질층이 위로 오도록 피부를 고정하고, receptor chamber

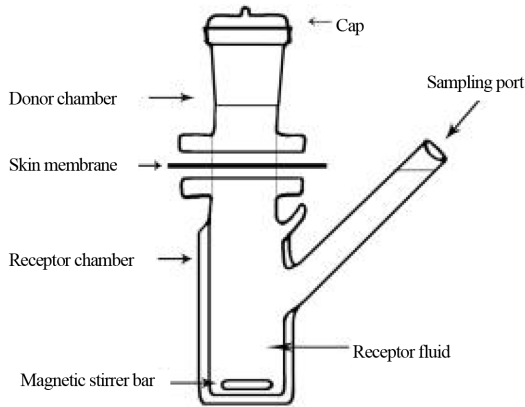


Fig. 1. A typical design example of a static type Franz diffusion cell.

에 receptor fluid를 5 ml 채운 다음, 30분 간 안정화를 시켰다. 온도는 $32 \pm 2^\circ\text{C}$ 로 유지하고, 투과된 시험물질이 골고루 혼합되도록 장비의 stirrer 회전 속도(rpm)는 600으로 유지하였다. 그 후 시험물질 10 mg을 0.785 cm^2 의 도포면적이 되도록 피부 위에 도포하고, 시료 채취 시간은 24시간을 넘기지 않도록 하여 시간별로 채취하였다²¹⁾. 시료 채취 시간은 도포 후 1, 2, 4, 7, 10, 24시간으로 하였으며, receptor fluid에서 추출한 샘플은 분석 전까지 -80°C 에 보관하였다가 LC-MS/MS로 분석하여 농도를 분석하였다. 24시간 이내에 채취한 시료는 정량하여 시간별 투과량 그래프로 나타내었으며, 총 누적투과량도 나타내었다. 단위시간당 일정 면적을 투과하는 물질의 양인 투과속도(flux, $\mu\text{g}/\text{hr}\cdot\text{cm}^2$) 값을 계산 하였으며, flux 값을 시험물질의 초기농도를 나눈 값인 투과계수(K_p , cm/hr) 값도 계산하였다¹¹⁾.

실험 종료 후 시험물질을 도포하였던 피부 윗부분을 ethanol/water (1:1, v/v)로 닦아낸 후, 시험물질 도포 영역만 절제하여 ethanol/water (1:1, v/v) 1 ml

에 담가두었다가, 먼저 1시간 동안 초음파 처리 후 24시간 동안 시험물질을 용출시키고 원심 분리하여 상층액을 얻었다. 샘플은 분석 전까지 -80°C 냉동보관 하였고, LC-MS/MS로 분석하여 피부 내 잔류량을 분석하였다.

5. 조건 설정 실험

다양한 조건에 따른 결과를 비교하기 위해, 시험물질은 수용성인 caffeine과 지용성인 benzoic acid와 사용하였고, 두 농도의 물질, 세 종류 피부, 세 종류 수용액, donor chamber의 cap 여부 및 시료채취 후 분석시간에 따른 결과를 비교하였다. 그 결과를 통해 최종 실험에서는 각 두 시험물질에 대해 2% 농도의 크립제형을 이용하였고, 피부는 hairless mouse full skin, 수용액은 ethanol/water (1:1, v:v), donor chamber의 cap은 씌우지 않은 상태로, 분석시키는 시료채취 후 3일 이내로 설정하여 실험을 실시하였다.

6. LC-MS/MS 분석

각 시간대별로 채취한 receptor fluid와 피부에서 용출한 샘플에서 각 시험물질의 양을 LC-MS/MS로 조건(Table 3)에 맞게 정량하여 피부를 통과한 누적투과량을 시간별로 계산하였다. 시료들은 모두 $0.2 \mu\text{m}$ syringe filter를 이용하여 부유물을 제거시킨 후 LC-MS/MS로 분석하였다. 정량선은 signal to noise ratio가 5 이상이면서 직선성을 보이는 농도 범위에서 작성되었으며 이에 따른 정량범위는 caffeine이 14 ppb에서 3140 ppb였고, benzoic acid는 147 ppb에서 5060 ppb였다.

7. 통계처리

SPSS 21.0 for windows(SPSS Inc., USA) 통계프

Table 3. LC-MS/MS analysis conditions

Parameters	Column	Flow rate (ml/min)	Mobile phase	Injection volume	Column temp
Benzoic acid	Cadenza CD-C ₁₈ 2.0 × 100 mm, 3.0 μm	0.2	A : 10 mM Ammonium acetate in water (10%)	10 μl	30°C
			B : MeOH (90%)		
Caffeine			A : 0.1% Formic acid(water) (40%)		
			B : Acetonitrile (60%)		

로그그램을 이용하여 일원배치분산분석(one-way ANOVA)을 실시하였으며, 분석시기에 따른 결과 비교에 있어서는 repeated measures ANOVA를 실시하였다. 각 그룹 간의 차이를 검정하기 위하여 Duncan's multiple range test를 이용하여 사후분석을 실시하였다. 본 연구의 통계학적인 유의성 검증수준은 $p < 0.05$ 로 하였다.

III. 연구결과

1. 피부 두께 측정 결과

세 종류의 피부 두께를 측정한 결과 KeraSkin™ (0.42 ± 0.01 mm) > hairless mouse full skin (0.23 ± 0.01 mm) > human cadaver epidermis (0.07 ± 0.01 mm)의 순서로 두께 값을 보였다.

2. 피부 구조의 무결성

사용피부의 무결성을 판단하기 위해, hairless mouse full skin (7.29 ± 1.64 g/hr·m²), human cadaver epidermis (8.16 ± 1.66 g/hr·m²) 및 KeraSkin™ (5.27 ± 0.70 g/hr·m²)의 경피수분손실량을 측정한 결과, 세 피부에서 모두 10 이하의 값을 보여 실험에 사용적합으로 판단되었다.

3. 경피흡수 조건 설정실험 결과

세 피부 종류 모두에서 각 시험물질의 농도 의존

적으로 투과량이 증가하였고, flux와 K_p 값에서도 농도 의존적으로 값이 증가하였다. 피부종류에 따른 투과양상에서는 모든 시험물질 군에서 KeraSkin™ > hairless mouse full skin > human cadaver epidermis의 순서로 투과량이 많은 것을 알 수 있었다(Table 4).

Hairless mice 피부를 이용하여 크림제형의 2% caffeine으로 실험한 경우, 3일이내에 분석하였을 때 receptor fluid가 PBS와 saline일 때에 비해 ethanol/water (1:1, v:v)을 사용했을 때에 더 높은 검출량을 나타냈고, flux와 K_p 값도 유의성 있는 증가를 보였다. 시료채취 후 분석기간에 따른 결과에 있어서는 시간이 지날수록 유의성 있게 감소됨이 관찰되었다. Donor chamber의 cap 사용 여부에 따라서는 큰 영향을 나타내지 않았다(Table 5).

Hairless mice 피부를 이용하여 크림제형의 2% benzoic acid로 실험한 경우, receptor fluid가 PBS일 때는 시험물질이 검출되지 않았고, ethanol/water (1:1, v:v)를 사용했을 때는 시료채취 후 분석기간이 오래 지날수록 유의성 있게 감소됨이 관찰되었다. Donor chamber의 cap 사용 여부에 따라서는 큰 영향을 나타내지 않았다(Table 6).

4. 본시험 결과

앞의 실험에서 설정된 조건을 적용하여 benzoic acid와 caffeine 두 가지 물질의 solution과 cream 제형의 투과를 비교해 본 결과, benzoic acid solution

Table 4. The flux and K_p value depending on the concentration of the test substance (cream formulation)

Skin	Test substance	Concentration (%)	Flux (µg/hr·cm ²)	K _p (cm/hr·10 ⁻⁴)
Hairless mouse full skin	Benzoic acid	2	24.12 ± 0.04 ^b	14.06 ± 0.02 ^c
		5	103.70 ± 0.03 ^d	32.74 ± 0.01 ^d
	Caffeine	2	12.21 ± 0.06 ^a	5.11 ± 0.03 ^a
		5	52.30 ± 0.01 ^c	10.46 ± 0.03 ^b
Human cadaver epidermis	Benzoic acid	2	26.10 ± 0.01 ^c	14.05 ± 0.04 ^c
		5	74.32 ± 0.04 ^d	18.86 ± 0.02 ^d
	Caffeine	2	1.31 ± 0.03 ^a	0.65 ± 0.01 ^b
		5	2.35 ± 0.03 ^b	0.47 ± 0.01 ^a
KeraSkin™	Benzoic acid	2	133.47 ± 0.04 ^b	66.73 ± 0.02 ^d
		5	298.33 ± 0.01 ^d	59.67 ± 0.00 ^c
	Caffeine	2	68.87 ± 0.05 ^a	34.43 ± 0.03 ^b
		5	153.27 ± 0.06 ^c	30.65 ± 0.03 ^a

Values represent the mean ± SD of two independent measurements.

Values with different superscripts in the same skin are significantly different ($p < 0.05$) by ANOVA and Duncan's multiple range test.

Table 5. The flux and K_p value depending on analysis period of caffeine (2% cream formulation) in hairless mice full skin

Analysis period	Receptor fluid	Cap	Flux ($\mu\text{g}/\text{hr}\cdot\text{cm}^2$)	K_p ($\text{cm}/\text{hr}\cdot 10^{-4}$)
Within 3 days ^c	Ethanol/water(1:1)	×	8.47 ± 0.04 ^c	4.24 ± 0.02 ^c
		○	10.81 ± 0.88 ^c	5.95 ± 0.29 ^c
	PBS	×	0.22 ± 0.01 ^{bc}	0.11 ± 0.01 ^{bc}
		○	0.58 ± 0.18 ^d	0.29 ± 0.09 ^d
	Saline	×	0.33 ± 0.13 ^c	0.16 ± 0.07 ^c
		○	0.22 ± 0.04 ^{bc}	0.11 ± 0.02 ^{bc}
Within 7 days ^b	PBS	×	0.10 ± 0.02 ^{ab}	0.05 ± 0.01 ^{ab}
		○	0.32 ± 0.03 ^c	0.16 ± 0.01 ^c
	Saline	×	0.14 ± 0.06 ^{ab}	0.07 ± 0.03 ^{ab}
		○	0.05 ± 0.01 ^{ab}	0.02 ± 0.00 ^{ab}
	PBS	×	0.04 ± 0.02 ^a	0.02 ± 0.01 ^a
		○	0.15 ± 0.04 ^{abc}	0.08 ± 0.02 ^{abc}
Saline	×	0.04 ± 0.04 ^a	0.02 ± 0.02 ^a	
	○	0.01 ± 0.00 ^a	0.01 ± 0.00 ^a	

Values represent the mean ± SD of two independent measurements.

Values with different superscripts in the same column are significantly different ($p < 0.05$) by ANOVA and Duncan's multiple range test.

Values with different superscripts in the analysis period are significantly different ($p < 0.05$) by repeated measures ANOVA.

Table 6. The flux and K_p value depending on analysis period of benzoic acid (2% cream formulation) in hairless mice full skin

Analysis period	Receptor fluid	Cap	Flux ($\mu\text{g}/\text{hr}\cdot\text{cm}^2$)	K_p ($\text{cm}/\text{hr}\cdot 10^{-4}$)
Within 3 days ^c	Ethanol/water(1:1)	×	24.63 ± 0.84 ^b	14.31 ± 0.42 ^b
		○	24.51 ± 0.83 ^b	14.26 ± 0.42 ^b
	PBS	×	ND	ND
		○	ND	ND
Within 7 days ^b	Ethanol/water(1:1)	×	11.51 ± 0.03 ^a	5.76 ± 0.01 ^a
		○	11.93 ± 0.30 ^a	5.97 ± 0.15 ^a
	PBS	×	ND	ND
		○	ND	ND
Within 14 days ^a	Ethanol/water(1:1)	×	5.67 ± 0.11 ^a	2.33 ± 0.05 ^a
		○	5.69 ± 0.21 ^a	2.35 ± 0.10 ^a
	PBS	×	ND	ND
		○	ND	ND

ND : not detected. Values represent the mean ± SD of two independent measurements.

Values with different superscripts in the same column are significantly different ($p < 0.05$) by ANOVA and Duncan's multiple range test.

Values with different superscripts in the analysis period are significantly different ($p < 0.05$) by repeated measures ANOVA.

> caffeine solution > benzoic acid cream > caffeine cream의 순서로 많은 투과량을 보였다(Fig. 2). Flux와 K_p 값에서는 benzoic acid가 caffeine에 비해 눈

에 띄게 높은 값을 보였으며, solution은 cream에 비해 약 3배 높은 값을 보였다(Table 7). 계산된 K_p 값을 적용하여 Marzulli의 정의에 따라 판단하였을 때,

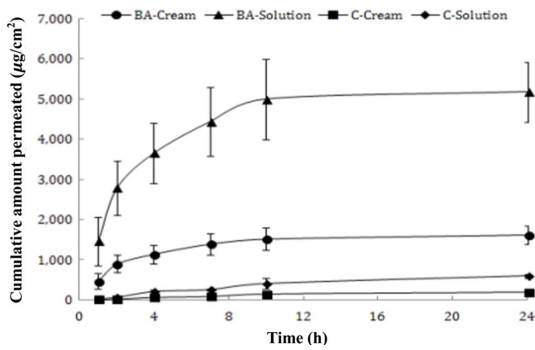


Fig. 2. Permeated cumulative amount of test substances. Values represent the mean ± SD of three independent measurements. BA-Cream : Benzoic acid cream, BA-Solution : Benzoic acid solution, C-Cream : Caffeine cream, C-Solution : Caffeine solution.

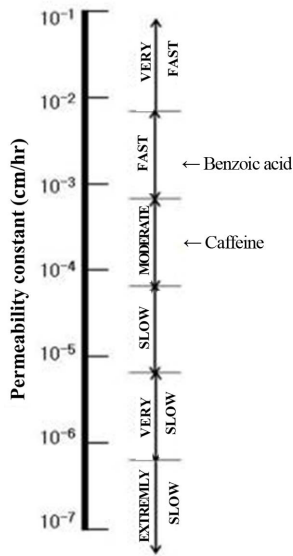


Fig. 3. The permeability coefficient (K_p) of test substances through hairless mouse full skin.

Table 8. The residual quantity of test substances in skin

Concentration (%)	Formulation	Quantity of
		test substance ($\mu\text{g}/\text{m}$)
2	Cream	1.59 ± 0.46^a
	Solution	6.37 ± 1.92^b
	Cream	0.07 ± 0.01^a
	Solution	0.25 ± 0.06^a

Values represent the mean ± SD of three independent measurements.

Values with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$) by ANOVA and Duncan's multiple range test.

benzoic acid는 ‘fast’, caffeine은 ‘moderate’ 정도로 투과하는 것으로 판단할 수 있다(Fig. 3)²²⁾.

시험물질을 도포한 hairless mouse full skin(두께 0.23 mm) 부위(도포 면적 0.785 cm²) 내에 잔류하는 시험물질 양을 분석하였을 때, benzoic acid가 caffeine에 비해 잔류량이 더 높았고, solution이 cream 보다 약 3배 높은 잔류량을 보였다(Table 8).

IV. 고 찰

본 연구에서는 OECD guideline 428에 제시되고 있는 방법을 바탕으로 하여 표준물질인 benzoic acid와 caffeine을 이용하여 피부흡수 시험방법의 다양한 조건을 설정하고, 피부 3 종류(hairless mouse full skin, human cadaver epidermis, KeraSkin™)에 따른 투과 정도를 비교하고자 했으며, 시험물질의 수용성, 지용성 성질에 따른 투과 정도와 시험물질의 제형에 따른 투과 정도를 비교, 평가하고자 하였다.

OECD guideline 428에서 권고되고 있는 시험물질은 benzoic acid, caffeine, testosterone 세 가지로¹⁴⁾,

Table 7. The flux and K_p value of test substances

Concentration (%)	Test substance	Formulation	Flux ($\mu\text{g}/\text{hr}\cdot\text{cm}^2$)	K_p ($\text{cm}/\text{hr}\cdot 10^{-4}$)
2	Benzoic acid	Cream	26.61 ± 71.73^b	14.31 ± 3.86^b
		Solution	84.07 ± 224.71^c	42.54 ± 11.36^c
	Caffeine	Cream	10.83 ± 3.29^a	5.42 ± 1.65^a
		Solution	33.43 ± 10.21^a	16.72 ± 5.10^a

Values represent the mean ± SD of three independent measurements.

Values with different superscripts in the same column are significantly different ($p < 0.05$) by ANOVA and Duncan's multiple range test.

본 실험에서는 분석의 편리성을 고려하여 지용성 물질인 benzoic acid와 수용성 물질인 caffeine을 선택하였다. 피부흡수 대체시험법에서 실험에 사용할 피부는 실험 전에 피부 구조의 무결성을 입증하여야 하며, 그 방법으로는 교류 전기 저항 측정, 삼중수를 이용한 투과성 확인, 3H-sucrose를 첨가하여 적합성 평가를 확인하는 방법 등이 있다¹⁴⁾. 본 실험에서는 경피수분손실량을 측정하였으며, 10 이상의 값은 피부가 손상된 것으로 판단하여 실험에서 제외시킬 수 있는데¹⁹⁾, 측정 결과 모두 10 이하의 값을 얻었으며 실험에 사용할 수 있었다.

농도에 따른 투과에 있어서 임의로 2%와 5%를 설정하여 실험한 결과, 다양한 시험물질은 농도의존적으로 투과가 증가하는 것으로 보고된 선행연구²³⁾와 일치하는 것으로 확인하였다. 분석과정을 고려하여 농도를 설정하고, 피부에 자극을 주지 않는 농도로 결정하는 것이 좋을 것으로 판단된다. 피부종류에 따른 투과에 있어서 KeraSkin™은 피부 두께가 가장 두꺼운 반면 가장 높은 투과를 나타냈는데, 이는 인공피부모델이므로 실제 피부에 비해 피부의 각층이 단순화 되어있으므로 투과량이 높은 것으로 추측된다. 그 외 실제 피부인 hairless mouse full skin은 다른 피부에 비해 투과량이 높다고 보고한 연구¹⁵⁾와 일치하는 것으로 확인되었고, human cadaver epidermis는 표피가 피부 전체의 10분에 1에 해당한다는 가정 하에 full skin의 두께는 0.7 mm 정도라고 추측할 수 있으며 이를 적용하면 hairless mouse full skin에 비해 두께가 두꺼워서 투과량이 적은 것으로 판단할 수 있다.

피부는 공기 중에서의 노출이 많을 것이고, 피부흡수 대체시험법은 실제 노출경로와 유사하게 실험을 진행해야 한다고 생각하여 cap을 씌우는 것과 안 씌운 것을 비교해 보았는데, 본 실험에서 사용한 시험물질은 휘발성 성질이 없었으므로 cap 여부에 따른 영향을 보이지 않았다. 그러나 추후 휘발성 물질을 사용하거나 실험 과정에 있어서 시험물질이 손실이 될 것이라 생각되는 것에 한해서는 cap을 씌워서 손실을 막는 것이 좋을 것으로 판단된다.

Receptor fluid는 시험물질을 잘 용해하는 용액으로 결정하여야 하는데 수용성 시험물질일 때는 pH 7.4의 saline을, 지용성 시험물질일 때는 ethanol/water (1:1, v:v)가 OECD guideline 428에서 제시되고 있

다¹⁴⁾. 본 실험에서는 이를 비교 및 확인하고자 하여 여러 종류의 receptor fluid를 동시에 실험하였으며, 수용성, 지용성 성질에 상관없이 모두 ethanol/water (1:1, v:v)가 시험물질이 가장 용해가 잘 되는 것으로 보여진다. 그러나 극지용성 시험물질은 ethanol/water (1:1, v:v)에 용해되지 않을 수도 있으므로 시험물질에 따라 고려해보아야 한다고 생각된다.

분석기간에 있어서는 채취한 시료의 용액을 똑같이 나누어 -80°C에 보관하였고, 보관하고 있는 기간이 길어지면 검출량 분석에 영향이 있을 것으로 추측이 되어 실험을 실시하였고, 그 결과 시간이 지날수록 검출량이 줄어드는 것으로 나타났다. 추후 연구에 있어서 같은 날짜에 실험한 시료는 같은 기간 안에 분석을 실시하는 것이 좋을 것으로 판단되며, 또한 최대한 빠른 시간 내에 분석을 실시하는 것이 보다 더 정확한 검출량을 알 수 있을 것이다.

OECD guideline 428에 제시된 시험방법 외에 자세하고 다양한 조건을 비교하여 설정된 조건으로 최종실험을 거쳤으며, 그 결과 지용성 시험물질이 수용성 시험물질 보다 더 많은 투과를 보였고, 수용성 물질이 낮은 투과량을 보인다는 기존의 연구와 일치하며, 피부는 친수성을 띄는 시험물질의 확산에 있어서 저항성을 갖는 것이 확인되었다²⁴⁾. 또한 각 시험물질의 제형에 있어서 solution 제형과 cream 제형을 비교하였는데, oil > O/W emulsion > ointment > cream의 순서로 투과가 보고된 연구¹¹⁾와 유사한 결과를 확인할 수 있었다. 피부 내 잔류량 측정에 있어서는 투과량이 많은 지용성 물질이 더 많은 잔류량을 보였고, 피부 내에 잔류하고 있는 시험물질은 추후 시간이 지나면 피부를 통과할 것으로 판단된다.

V. 결 론

본 연구에서, 피부흡수 대체시험법의 다양한 조건에 대하여 비교·평가하여 guideline 방법 외에 농도 및 피부종류, cap 여부, receptor fluid, 분석기간 등 추가적인 조건을 설정하였고, 시험물질의 수용성, 지용성 성질 및 제형에 따른 투과 정도를 확인하였다. 본 연구에서 설정된 조건이 추후에 있을 최적의 조건 확립 연구에 기여할 수 있을 것으로 보이며, 본 시험법을 이용하여 다양한 시험물질 및 피부 등을 이용한 피부흡수 대체시험법 연구가 이루어져야

할 것으로 사료된다. 이에 대한 확인시험과 국제적인 검증연구가 필요하며 그로 인해 국내에서도 피부흡수 대체시험법이 활성화될 것으로 기대된다.

References

1. Simon GA, Maibach HI. The pig as an experimental animal model of percutaneous permeation in man: qualitative and quantitative observations-an overview. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol.* 2000; 13(5): 229-234.
2. Elias PM, Feingold KR, Fluhr JW. Fitzpatrick's dermatology in general medicine. 6th ed. New York: McGraw-Hill. 2003.
3. Rogers J, Harding C, Mayo A, Banks J, Rawlings A. Stratum corneum lipids: the effect of ageing and the seasons. *Arch Dermatol Res.* 1996; 288: 765-770.
4. Fisher GJ, Kang S, Varani J. Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. *Arch Dermatol.* 2002; 138: 1462-1470.
5. Moser K, Kriwet K, Naik A, Kalia YN, Guy RH. Passive skin penetration enhancement and its quantification *in vitro*. *Eur J Pharm Biopharm.* 2001; 52: 103-112.
6. Ackermann K, Borgia SL, Korting HC, Mewes KR, Schäfer-Korting M. The Phenion full-thickness skin model for percutaneous absorption testing. *Skin Pharmacol Physiol.* 2010; 23: 105-12.
7. Brain KR, Walters KA, Green DM. Percutaneous penetration of diethanolamine through human skin *in vitro*: application from cosmetic vehicles. *Food Chem Toxicol.* 2005; 43: 681-690.
8. Mickelsen RL, Hall RC, Chern RT, Myers JR. Evaluation of a simple weight-loss method for determining the permeation of organic liquids through rubber films. *Am Ind Hyg Assoc J.* 2005; 52: 445-447.
9. Riviere JE, Brooks JD. Predicting skin permeability from complex chemical mixtures. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2005; 208: 99-110.
10. Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products (SCCNFP). Opinion concerning "Basic criteria for the *in vitro* assessment of dermal absorption of cosmetic ingredients." SCCNFP/0750/03. 2003.
11. Reichling J, Landvatter U, Wagner H, Kostka KH, Schaefer UF. In vitro studies on release and human skin permeation of Australian tea tree oil (TTO) from topical formulations. *Eur J Pharm Biopharm.* 2006; 64: 222-228.
12. Pappinen S, Tikkinen S, Pasonen-Seppänen S, Murtomäki L, Suhonen M, Urtti A. Rat epidermal keratinocyte organotypic culture (ROC) compared to human cadaver skin: The effect of skin permeation enhancers. *Eur J Pharm Sci.* 2007; 30: 240-250.
13. Rohr UD, Laurent H, Gunther C, Riedl J, Esperling P, Tauber U. Prodrug of gestodene for matrix-type transdermal drug delivery system. *Pharm Res.* 1998; 15: 1419-1424.
14. OECD. OECD guideline for the testing of chemicals, 2004; NO. 428: Skin absorption: *in vitro* method.
15. Chilcott RP, Dalton CH, Hill I, Davison CM, Blohm KL, Clarkson ED, Hamilton MG. In vivo skin absorption and distribution of the nerve agent VX (O-ethyl-S-[2(diisopropylamino)ethyl] methylphosphonothioate) in the domestic white pig. *Hum Exp Toxicol.* 2005; 24: 347-352.
16. Nielsen JB, Plasencia I, Sørensen JA, Bagatolli LA. Storage conditions of skin affect tissue structure and subsequent *in vitro* percutaneous penetration. *Skin Pharmacol Physiol.* 2011; 24: 93-102.
17. Potard G, Laugel C, Baillet A, Schaefer H, Marty JP. Quantitative HPLC analysis of sunscreens and caffeine during *in vitro* percutaneous penetration studies. *Int J Pharm.* 1999; 189: 249-260.
18. van de Sandt JJ, van Burgsteden JA, Cage S, Carmichael PL, Dick I, Kenyon S, Korinth G, Larese F, Limasset JC, Maas WJ, Montomoli L, Nielsen JB, Payan JP, Robinson E, Sartorelli P, Schaller KH, Wilkinson SC, Williams FM. In vitro predictions of skin absorption of caffeine, testosterone, and benzoic acid: a multi-centre comparison study. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2004; 39(3): 271-281.
19. Guth K, Schäfer-Korting M, Fabian E, Landsiedel R, van Ravenzwaay B. Suitability of skin integrity tests for dermal absorption studies *in vitro*. *Toxicol In Vitro* 2015; 29(1): 113-123.
20. Franz TJ. On the relevance of *in vitro* data. *J Invest Dermatol.* 1975; 93: 633-640.
21. Levintova Y, Plakogiannis FM, Bellantone RA. An improved *in vitro* method for measuring skin permeability that controls excess hydration of skin using modified Franz diffusion cells. *Int J Pharm.* 2011; 419: 96-106.
22. Barber ED, Hill T, Schum DB. The percutaneous absorption of hydroquinone (HQ) through rat and human skin *in vitro*. *Toxicol Lett.* 1995; 80: 167-172.
23. Yamashita F, Yoshioka T, Koyama Y, Okamoto H,

Sezaki H, Hashida M. Analysis of skin penetration enhancement based on a two-layer skin diffusion model with polar and nonpolar routes in the stratum corneum: dose-dependent effect of 1-geranylazacycloheptan-2-one on drugs with different lipophilicities. *Biol Pharm Bull.* 1993; 16(7): 690-

697.

24. Wilkinson SC, Maas WJ, Nielsen JB, Greaves LC, van de Sandt JJ, Williams FM. Interactions of skin thickness and physicochemical properties of test compounds in percutaneous penetration studies. *Int Arch Occup Environ Health* 2006; 79: 405-413.