

## 나이아신아마이드의 인공피부조직 투과 개선을 위한 고형지질나노입자의 설계 연구

여 수 호<sup>†</sup>

중앙대학교 약학대학, 박사  
(2021년 5월 11일 접수, 2021년 5월 29일 수정, 2021년 6월 9일 채택)

### Design of Solid Lipid Nanoparticles to Improve Penetration of Niacinamide through Artificial Skin Tissue

SooHo Yeo<sup>†</sup>

College of Pharmacy, Chung-Ang University, 84 Heukseok-ro, Dongjak-gu, Seoul 06974, Korea  
(Received May 11, 2021; Revised May 29, 2021; Accepted June 9, 2021)

**요약:** 본 연구에서는 기능성 미백물질인 나이아신아마이드(NI)의 피부 투과율을 개선시키기 위해 NI를 고형지질 나노입자(solid lipid nanoparticles, SLNs)에 봉입하고 피부 투과율을 평가하였다. NI는 이중 에멀션 가온용융 유회법으로 SLNs 내에 효과적으로 봉입할 수 있었으며, 평균 입자 크기는 263.30 ~ 436.93 nm이었고 제타전위는 -34.77 ~ -57.60 mV인 안정한 입자를 제조하였다. NI의 피부 투과 연구를 위해 인체 표피 조직에서 유래된 피부각질세포로 만든 3차원적 인공피부(SkinEthic<sup>TM</sup> RHE)을 사용하였다. NI의 피부 투과 및 침적 실험 결과 모든 SLNs 제형이 NI의 피부 투과 및 침적율을 개선시켰으며, SLNs을 적용하였을 때가 그렇지 않을 때 보다 투과율은 약 5.4 ~ 7.6 배, 침적율은 9.5 ~ 20.8 배 개선되었음을 확인하였다. 따라서, 본 연구에서 제조된 고형지질나노입자는 기능성 미백물질인 나이아신아마이드의 피부 투과율을 개선하기에 충분한 결과를 보여주었다.

**Abstract:** In this study, Niacinamide (NI) was loaded into solid lipid nanoparticles (SLNs) and skin permeability was evaluated to improve skin permeability of NI, which was a skin whitening substance. NI was able to effectively load within SLN with a double-melting emulsification method, producing stable particles with average particle sizes of 263.30 to 436.93 nm and a zeta potential of -34.77 to -57.60 mV. Artificial skin tissue (SkinEthic<sup>TM</sup> RHE) derived from skin keratinocytes derived from human epidermal tissue was used for the skin permeation study of NI. Skin transmittance and deposition experiments of NI confirmed that all SLN formulations improved skin transmittance and deposition rates of NI, approximately 5.4 ~ 7.6 and 9.5 ~ 20.8 improvement over SLN applications. Therefore, SLN manufactured in this study have shown sufficient results to improve the skin permeability of the functional whitening substance, NI.

**Keywords:** niacinamide, solid lipid nanoparticles, skin whitening, skin penetration, SkinEthic<sup>TM</sup> RHE

<sup>†</sup> 주 저자 (e-mail: sooho32@hanmail.net)  
call: 02-820-5606

## 1. 서 론

사람의 피부색은 멜라닌, 카로틴 및 헤모글로빈의 양에 따라 결정되는데 이 중 멜라닌이 가장 결정적인 요소이다. 멜라닌은 인체 피부 표피 기저층의 멜라닌 세포(melanocyte) 내 멜라노솜(melanosome)에서 합성되며, 검은 색소와 단백질의 복합체이다. 멜라닌은 UV의 빛 에너지를 흡수해 피부 기관 보호 및 피부 노화를 억제하지만, 과잉 생산될 경우 피부 색소 침착, 기미, 주근깨를 형성하고 피부색을 변화시키기도 한다[1].

나이아신아미드(NI)는 미백 물질로 고시되어 있으며, 물질량이 122.12 g/mol이며, IUPAC 명명법으로는 pyridine-3-carboxamide이다. NI의 미백 메커니즘으로는 멜라닌의 생합성에 관여하는 티로시나제(tyrosinase)의 활성을 억제하며, 생성된 멜라노솜이 멜라닌 세포에서 각질세포로 이동하는 것을 억제시켜 최종적으로 피부 색소 침착을 억제한다[2]. 그러나 NI는 수용성 약물로 피부 장벽이라고 불리는 피부 표피의 각질층을 투과하는데 어려움이 있다[3].

고형지질나노입자(solid lipid nanoparticles, SLNs)는 1991년 Lucks 등에 의해서 도입된 약물 운반체로 리포솜이나 에멀션 제형과는 달리 입자 내부가 지질 매트릭스로 구성되어 비교적 높은 약물 봉입율을 보인다[4]. 생체 적합한 지질을 사용하고, 제조과정 중에 유기용매를 사용하지 않으므로 생체에 안전하며 친화성이 높아 피부 투과에 유리하다[5]. 또한 피부 내 세포간 지질 성분을 지질 매트릭스로 사용한다면, 피부에 안전하고 약물 투과에 유리할 것이다. SLNs은 경피 수분 손실을 예방할 수 있는데, 이는 SLN을 피부에 적용하게 되면 얇은 지질막을 형성하기 때문이다.

피부 흡수 시험의 경우 기존에는 rat과 같은 동물을 희생하여 rat 피부에서 진행하였으나, EU, 미국 및 호주 등지에서 동물실험을 금지하였고, 국내에서는 식품의약품안전처에서 화장품의 생체의 피부 흡수시험의 동물대체 가이드라인을 마련하여 국내에 보급하고 있다. 이에 사용되는 조직은 인체 피부 유래 인공피부 조직이다. 따라서 본 피부 투과 시험에서 인공피부 조직(SkinEthic™ RHE)을 사용하여 NI의 피부 투과를 측정하였다[7-8].

본 연구에서는 기능성 미백물질인 NI를 SLNs에 봉입한 후 피부 조직을 사용하여 피부 투과율을 평가하였다. 약물의 봉입율과 투과율을 높이기 위해서 다양한 고형지질과 유화제를 사용하여 SLNs을 제조하였고, 제조된 SLNs의 물

리화학적 특성을 파악하기 위해 입자 크기 및 제타포텐셜을 측정하였다.

## 2. 재료 및 시험방법

### 2.1. 재료

본 연구에서 NI 봉입 SLNs을 제조하기 위해 niacinamide (순도 99.5%, Sigma-Aldrich, USA), palmitic acid, stearic acid (SAMCHUN, Korea), poloxamer 407 (BASF, Germany), behenic acid, Span 40, Span 20, potassium dihydrogen phosphate ( $KH_2PO_4$ ), methanol (Dae Jung Co. Ltd., Korea), 인공피부 조직으로서 SkinEthic™ RHE (SkinEthic Laboratories, France), phosphate-buffered saline (PBS) (Tech & Innovation, Korea) 을 사용하였다.

### 2.2. NI 탑재 SLNs의 제조

NI 함유 SLNs은 Gönüllü 등의 W/O/W 에멀션 방법을 참고로 하여 제조하였다[5]. SLNs은 고형 지질과 계면활성제의 종류를 변화시켜 Table 1과 같이 제조하였다. SLNs의 고형지질로는 palmitic acid, stearic acid 및 behenic acid를 사용하였다. 유화제로는 Span 20, Span 40 및 poloxamer 407을 사용하였다. Palmitic acid와 Span 20을 함유한 유상을 용융점보다 높은 온도인 80 ~ 90 °C에서 용융시켰고, 동일 온도에서 가온된 NI 1 g을 함유하는 수상을 유상에 가하여 W/O의 조에멀션(pre-emulsion) 상태를 만들고 약 2 min 동안 10,000 rpm에서 고속교반(Ultra-Turrax T18, IKA, Germany)을 시켰다. 이것을 최외상인 poloxamer 407 수용액에 가하

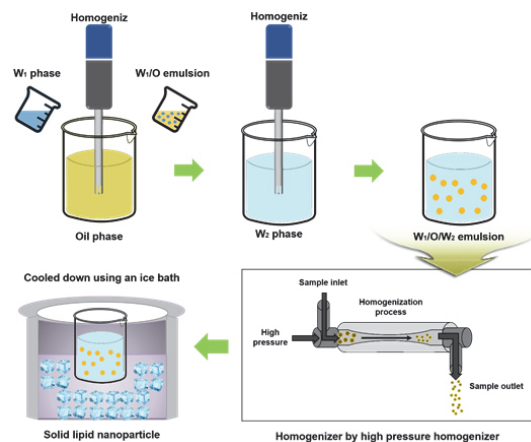


Figure 1. Scheme of fabrication for the niacinamide-loaded lipid nanoparticle.

**Table 1.** The Composition of the Niacinamide-loaded Solid Lipid Nanoparticles

Phase	Formulation		F1	F2	F3	F4	F5	F6
W <sub>1</sub>	Drug	Niacinamide (g)	1	1	1	1	1	1
		Palmitic acid (g)	3	3				
O	Solid lipid	Stearic acid (g)			3	3		
		Behenic acid (g)					3	3
		Lipophilic surfactant	Span 20 (g)	1		1		1
		Span 40 (g)		1		1	1	
W <sub>2</sub>	Hydrophilic surfactant	Poloxamer 407 (g)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5

고 다시 2 min 동안 1,000 rpm에서 고속교반 시켜 W/O/W 에멀션을 형성시켰다. 형성된 W/O/W 에멀션을 고압균질기 (NanoDeBEE homogenizer, BEE International, USA)로 25,000 psi에서 3 cycles로 처리한 후 상온에서 냉각하여 SLNs을 제조하였다. 상기의 palmitic acid 기반의 SLN과 비교를 위해 Table 1의 조성대로 SLNs을 제조하였다.

2.3. SLNs의 입자크기 및 제타전위 측정

샘플을 정제수로 10 배 희석한 후 Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., UK)를 사용하여 평균 입자크기 및 제타전위를 측정하였다. 측정시 한 시료마다 3 회 반복하여 측정하였다.

2.4. SLNs 내 NI의 봉입율 측정

NI의 봉입율 측정은 Gönüllü 등의 방법을 참고로 하여 측정하였다[5]. 제조한 NI 함유 SLNs의 현탁액을 Gyrozen 1580 MGR 초원심분리기(Gyrozen Ltd., Korea)를 이용하여 24,000 g에서 4 °C를 유지한 상태에서 2 h 동안 초원심분리를 하였다. 상등액을 high performance liquid chromatograph (HPLC)로 정량하였다. 얻어진 결과를 아래의 식에 대입하여 약물의 봉입율과 봉입효율을 산출하였다.

$$\text{Loading efficiency} = \frac{\text{Mass of encapsulated drug}}{\text{Mass of drug initially added}} \times 100$$

$$\text{Loading amount} = \frac{\text{Mass of encapsulated drug}}{\text{Mass of nanoparticles}} \times 100$$

2.5. 인공피부 조직을 사용한 In Vitro 피부 투과

NI의 피부 투과는 인체 유래 인공피부조직(SkinEthic™

RHE)을 사용하였다. 24 well 플레이트에 배양된 인공피부 조직을 3 mL의 receptor medium (PBS, pH 7.3)이 있는 6 well 플레이트에 옮긴 후 각 샘플 0.3 mL을 피부에 적용한다. 샘플이 적용된 인공피부 조직을 인큐베이터 진탕기(NB-101SRC, N-BIOTEK, Korea)에서 37 ± 0.5 °C, 0.5% CO<sub>2</sub> 조건에서 100 rpm으로 진탕하였다. 0.5, 1, 2, 4, 8 h 간격으로 공여칸에서 1 mL를 채취하여 HPLC로 정량하였다.

2.6. 인공피부 조직을 사용한 In Vitro 피부 침적

In vitro 투과 후 인공피부조직(SkinEthic™ RHE)을 2 mL의 유지배지가 담긴 유리바이알에 넣고 고속균질기를 사용하여 1,000 rpm에서 균질하였다. 균질된 각 샘플을 0.45 μm PTFE 실린지 필터로 거른 후 HPLC로 분석하였다.

2.7. NI의 HPLC 분석

NI의 함량은 Waters HPLC (Waters, Milford, USA)를 사용하여 분석하였다. 컬럼은 CapCell Pak C<sub>18</sub> MG column (5 μm, 4.6 mm × 250 mm Shiseido, Japan), 이동상은 0.05 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : methanol (85 : 15 v/v)을 사용하여 isocratic으로 진행하였고, 측정파장은 UV 260 nm, 유속은 1.0 mL/min, 주입량은 10 μL 이었다.

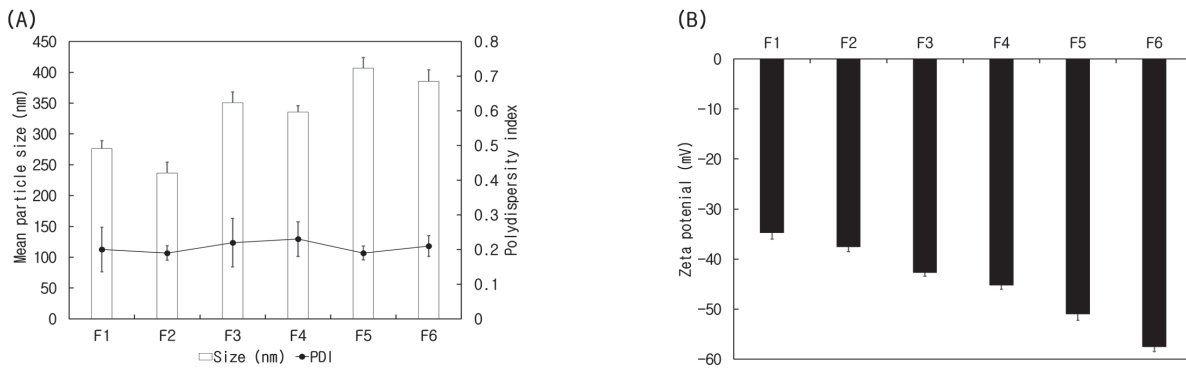
2.8. Statistical Analysis

모든 실험은 3 회 반복하였으며, 분석 수치는 평균값과 표준편차로 나타내었다. 통계분석은 student's t-test로 수행하였다.

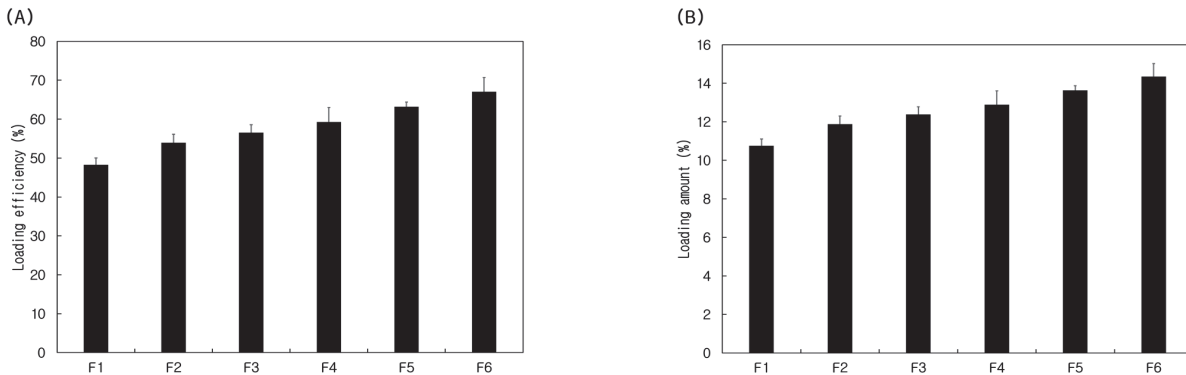
3. 결과 및 고찰

3.1. NI가 탑재된 SLNs의 입자크기 및 제타포텐셜 측정 결과

이중 에멀션 가온용융화법으로 제조한 NI 봉입 SLNs의 입자 크기는 263.30 ± 17.86 ~ 436.93 ± 16.94 nm이고, 입자의 다분산 지수(polydispersity index, PDI)는 0.19 ± 0.02 ~ 0.23 ± 0.05이다. 입자의 제타전위는 -34.77 ± 1.25 ~ -57.60 ± 0.92 mV이다(Figure 2). SLNs의 PDI가 0.2 내외이므로 입자가 균일하다는 것을 확인하였다[5-6]. 입자 사이즈의 경우 지방산의 사슬 길이가 길어질수록 입자크기가 커지는 것으로 나타났다. 이는 탄소 사슬길이가 길어짐에 따라 지질 매트릭스의 부피가 커지기 때문인 것으로 사료된다[6]. 유상 내 친유성 유효제의 경우 Span 40을 사용한 제형의 입



**Figure 2.** (A) Average particle size, polydispersity index (PDI), and (B) zeta potential of the niacinamide-loaded lipid nanoparticles. Results are expressed as the means  $\pm$  SD of three independent experiments (N = 3).



**Figure 3.** (A) Loading efficiency and (B) loading amount of niacinamide-loaded SLNs. Results are expressed as the means  $\pm$  SD of three independent experiments (N = 3).

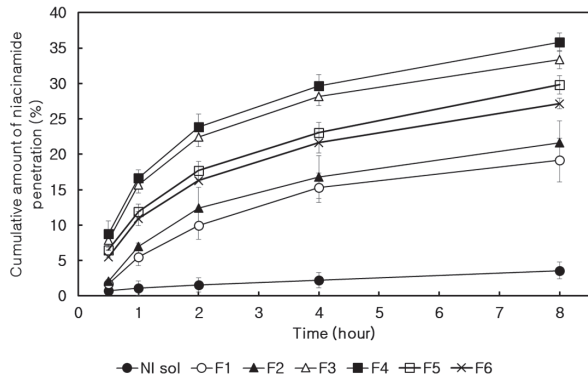
자의 크기가 Span 20을 사용한 제형보다 작아지는 것으로 나타났다. 이는 친유성 유화제는 유중수형(W/O) 에멀션에서 유상 내 수상 계면을 안정화시킬 수 있어, 더 작은 사이즈의 수상을 안정하게 유지하기 때문인 것으로 사료된다. Span 40의 친수성-친유성 밸런스(hydrophile-lipophile balance, HLB)는 6.7이고, Span 20의 HLB는 8.6으로 Span 40이 친유성이 높기 때문에 더 작은 입자가 제조되었다고 사료된다. 제타전위의 경우 고형지질의 사슬 길이가 길어지고 친유성이 높은 유화제를 사용할수록 입자의 제타전위가 높아지는 것으로 나타났다. 이는 지방산의 탄소 사슬 길이가 길어짐에 따라 카르복실기에 내재된 음전하가 높아지며, 음전하가 높아질수록 입자간 척력이 높아져 입자의 합일을 억제하는 것으로 사료된다. 유화제의 경우 친유성이 높을수록 입자크기가 줄어들게 되고, 이는 입자의 표면적을 높여 입자표면에 더 많은 음전하를 노출시켜 제타전위가 높은 것으로 사료된다.

### 3.2. SLNs 내 NI의 봉입율 측정 결과

친수성 약물인 NI의 봉입을 증대시키기 위해 이중 에멀션 가온용유화법으로 SLNs을 제조하였다. NI의 봉입율 및 봉입효율을 측정된 결과 봉입효율은  $48.25 \pm 1.76 \sim 67.08 \pm 3.65\%$  그리고 봉입율은  $10.76 \pm 0.35 \sim 14.36 \pm 0.67\%$ 가 나왔다(Figure 3). SLNs에 사용된 고형지질의 사슬 길이가 길어짐에 따라 분자적으로 분산된 NI를 봉입할 수 있는 지질 매트릭스의 부피가 커져 봉입율이 증가되는 것으로 사료된다. 유화제의 경우 친유성이 높을수록 조에멀션(pre-emulsion)에서 유상 내 수상의 안정성을 높이기 때문에 봉입율이 높아진 것으로 사료된다[6].

### 3.3. 인공피부 조직을 사용한 *In Vitro* 피부 투과 결과

*In vitro* 피부 투과 실험은  $0.5 \text{ cm}^2$ 의 인서트에 배양된 인공피부조직(SkinEthic™ RHE)을 사용하여 8 h동안 NI 봉입 SLNs과 대조군으로 2% NI 수용액의 피부 투과율을 측

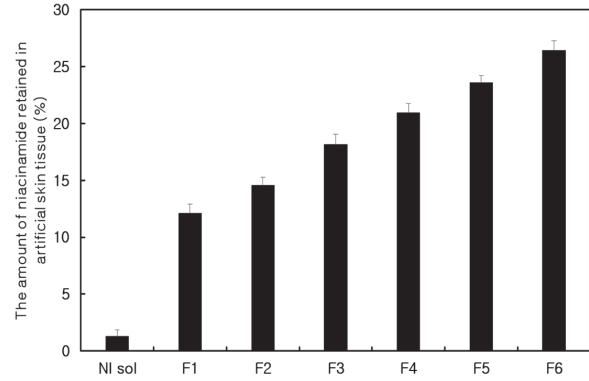


**Figure 4.** Cumulative penetration profiles for niacinamide from solid lipid nanoparticles into the medium. Results are expressed as the means  $\pm$  SD of three independent experiments (N = 3).

정하였다(Figure 4). 2% NI 수용액의 8 h 후 피부 투과율은  $3.56 \pm 1.19\%$ 인 반면, SLNs을 적용한 제형은  $19.16 \pm 3.07 \sim 27.15 \pm 0.75\%$ 로 나타났다. SLNs을 적용하였을 때 적용 전 보다 약 5.4 ~ 7.6 배 정도 피부 투과율이 개선되었음을 확인하였다. SLNs에 사용된 지질과 유화제를 비교해 보면, 유화제의 경우 Span 40을 사용한 제형이 Span 20을 사용한 제형보다 NI의 피부 투과도가 개선되었음을 확인하였다. 이는 친유성이 높은 유화제를 사용할수록 NI의 봉입율이 높아졌기 때문으로 사료된다[6,8]. 고행지질의 경우 지방산의 사슬 길이가 길어짐에 따라 피부 투과율이 증가 되는 경향을 보이는 것을 확인하였다. 이는 지용성이 높을 수록 피부 내 세포간 지질과의 친화성이 높아 피부를 투과 하는데 유리한 것으로 사료된다[5]. 그러나 behenic acid 기반 SLNs의 경우 stearic acid 기반 SLNs보다 피부 투과율이 낮아지는 것을 확인하였다. 이는 상대적으로 탄소 사슬이 긴 behenic acid가 stearic acid보다 높은 점도를 갖으며, 점도가 높을수록 입자가 피부 내로 투과하는데 지연되는 것이라 사료된다[5,6].

### 3.4. 인공피부 조직을 사용한 *In Vitro* 피부 침적 결과

투과 실험이 종료된 후 인공피부조직(SkinEthic™ RHE) 내 NI의 함량을 정량하였다(Figure 5). 2% NI 수용액의 피부 침적량은  $1.27 \pm 0.61\%$ 인 반면, SLNs을 적용한 제형은  $12.09 \pm 0.81 \sim 26.41 \pm 0.85\%$ 로 나타났다. 이는 NI가 SLNs을 적용하기 전 보다 약 9.5 ~ 20.8 배 정도 침적량이 개선되었음을 확인하였다. 이는 SLNs의 지질 성질이 피부 각질층 내 세포간 지질과 상호작용을 하여, SLNs이 효율적으로 세포간 지질 내로 들어갈 수 있다고 생각된다



**Figure 5.** Results for niacinamide retention from niacinamide-loaded SLNs in SkinEthic™ RHE tissue after penetration studies. Results are expressed as means  $\pm$  SD of three independent experiments (N = 3).

[6]. 이를 통해 세포간 지질이 약물의 저장소가 될 수 있어 약물의 서방출을 유도할 수 있을 것으로 사료된다.

## 4. 결론

본 연구에서는 기능성 미백물질인 NI의 피부 투과율을 개선시키기 위해 NI를 SLNs에 봉입하고 피부 투과율을 평가하였다.

NI는 이중 에멀션 가온용융유화법으로 SLNs에 효과적으로 봉입할 수 있었으며, 평균 입자 크기 및 다분산 지수로 판단할 때 경피전달체로 적합하였다. 또한 제타 전위 값은 입자의 물리적 안정성을 확보하기에 적절하였다. 식품의약품안전처의 동물대체 시험법 가이드라인에 따라 인공피부 조직(SkinEthic™ RHE)을 사용한 피부 투과 및 침적 시험에서 NI를 봉입한 SLNs 제형이 SLNs을 적용하지 않은 NI 용액보다 약 5.4 ~ 7.6 배 정도 피부 투과율이 개선되었다. 따라서, 본 연구에서 제조된 고행지질나노입자는 NI의 피부 투과율을 개선하기에 충분한 결과를 보여주었고, 이러한 결과는 기능성 미백물질인 NI을 화장품에 적용하는데 유용한 자료로 활용될 수 있다.

## References

1. J. W. Lin, H. M. Chiang, Y. C. Lin, and K. C. Wen, Natural products with skin-whitening effects, *J. Food Drug Anal.*, **16**(2), 1 (2008).
2. T. Hakozaiki, L. Minwalla, J. Zhuang, M. Chhoa, A.



- Matsubara, K. Miyamoto, A. Greatens, G. G. Hillebrand, D. L. Bissett, and R. E. Boissy, The effect of niacinamide on reducing cutaneous pigmentation and suppression of melanosome transfer, *Br. J. Dermatol.*, **147**(1), 20 (2002).
3. M. H. Lee, K. K. Lee, M. H. Park, S. S. Hyun, S. Y. Kahn, K. S. Joo, H. C. Kang, and W. T. Kwon, *In vivo* anti-melanogenesis activity and *in vitro* skin permeability of niacinamide-loaded flexible liposomes (Bounsphere™), *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, **31**, 147 (2016).
  4. J. S. Lucks, R. H. Muller, and B. Konig, Solid lipid nanoparticles (SLN)-an alternative parenteral drug carrier system, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **38**(33), 149 (1992).
  5. Ü. Gönüllü, M. Üner, G. Yener, E. F. Karaman, and Z. Aydoğmuş, Formulation and characterization of solid lipid nanoparticles, nanostructured lipid carriers and nanoemulsion of lornoxicam for transdermal delivery, *Acta Pharm.*, **65**(1), 1(2015).
  6. K. Mitri, R. Shegokar, S. Gohla, C. Anselmi, and R. H. Müller, Lipid nanocarriers for dermal delivery of lutein: preparation, characterization, stability and performance, *Int. J. Pharm.*, **414**(1-2), 267 (2011).
  7. C. Lotte, C. Patouillet, M. Zanini, A. Messenger, and R. Roguet, Permeation and skin absorption: reproducibility of various industrial reconstructed human skin models, *Skin Pharmacol. Physiol.*, **15**(Suppl. 1), 18 (2002).
  8. D. Monti, P. Chetoni, S. Burgalassi, S. Tampucci, M. Centini, and C. Anselmi, 4-Methylbenzylidene camphor microspheres: reconstituted epidermis (Skinethic®) permeation and distribution, *Int. J. Cosmet. Sci.*, **37**(3), 298 (2015).