

피부 투과 개선을 위한 고형지질나노입자내 Ascorbyl glucoside 봉입 설계 및 특성화

여수호[†]

중앙대학교 약학과, 박사
(2021년 6월 7일 접수: 2021년 6월 25일 수정: 2021년 6월 28일 채택)

Design and Characterization of Ascorbyl Glucoside loaded Solid Lipid Nanoparticles to improve skin penetration

Sooho Yeo[†]

College of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul 06974, Korea
(Received June 7, 2021; Revised June 25, 2021; Accepted June 28, 2021)

요약 : 본 연구에서는 피부 미백 개선 기능성 화장품 소재이자 친수성 소재인 ascorbyl glucoside (AG)의 피부 투과율을 개선시키기 위해 고형지질나노입자(SLN)을 설계하였다. AG는 이중 에멀전 가운 용융유화법으로 SLN 내에 봉입하였다. 제조된 AG 봉입 SLN의 입자크기, 다분산 지수, 제타전위, 봉입률 등의 입자의 물리화학적 특성을 평가하였다. 피부 투과시험의 경우 인체 유래 인조 피부 조직 모델 중 SkinEthic RHE를 사용하였다. 제조된 AG 봉입 SLN의 평균 입자크기는 172.65 - 347.19 nm 이었고, 평균 제타전위는 -22.90 - -41.20 mV이었다. SLN 내 AG의 평균 봉입효율은 44.18 - 57.77%이었고, 평균 봉입률은 12.83 - 16.15%이었다. AG 봉입 SLN의 피부 투과 결과는 SLN을 적용하였을 때가 적용하지 않을 때 보다 약 3.7 - 7.4 배 피부 투과율이 개선되었다. 따라서, 본 연구에서 제조된 SLN은 AG의 국소약물전달시스템으로 사용하는데 유용할 것이다.

주제어 : 아스코빌글루코사이드, 고형지질나노입자, 피부투과, 피부침적, SkinEthic RHE

Abstract : The aim of the present study was to design ascorbyl glucoside (AG) loaded solid lipid nanoparticles (SLNs) to improve skin penetration of AG. AG loaded SLNs were prepared using double emulsion method. The prepared AG loaded SLNs investigated particle characteristics (particle size, polydispersity index, zeta potential, loading capacity). Skin penetration study was carried out using SkinEthic RHE as one of the reconstructed human epidermis models. The mean particle size and zeta potential of SLNs were 172.65 - 347.19 nm and -22.90 - -41.20 mV, respectively. The loading capacity of AG loaded SLNs demonstrated that loading efficiency and loading amount were ranged

[†]Corresponding author
(E-mail: sooho32@hanmail.net)

from 44.18% to 57.77% and 12.83% to 16.15%, respectively. The results of penetration showed that all SLNs enhanced the skin penetration of AG and the amount of AG from SLNs were approximately 3.7 – 7.4 times higher than that from AG solution. Therefore, AG loaded SLN might be a promising topical drug delivery system.

Keywords : Ascorbyl glucoside, Solid lipid nanoparticles, Skin penetration, Skin retention, SkinEthic RHE

1. 서론

사람의 피부색은 멜라닌, 카로틴, 헤모글로빈의 양에 따라 결정되는데 이 중 멜라닌이 가장 중요한 요소이다. 멜라닌은 멜라닌 세포 내 멜라노솜에서 합성되는 검은 색소와 단백질의 복합체이다. 피부 내 멜라닌의 합성 출발 물질은 티로신(tyrosine)이며, 티로시나아제(tyrosinase)에 의해 가수분해되어 최종적으로 붉은 계열의 eumelanin과 갈색 계열의 pheomelanin이 생성된다 [1-2].

Ascorbyl glucoside (AG)는 vitamin C인 ascorbic acid에 glucose를 붙인 약물로 피부에서는 미백 효능이 있는 성분이다. 분자량은 338.26 g/mol이다. AG의 미백 메커니즘으로는 티로시나아제에 의한 티로신 가수분해를 억제하여 최종적으로 멜라노솜 내 멜라닌 생성을 억제한다 [3-5]. 그러나, 수용성 약물인 AG는 피부 장벽이라고 불리는 피부 표피의 각질층을 투과하는데 어려움이 있다.

고형지질나노입자 (solid lipid nanoparticles, SLNs)는 1991년 Lucks 등에 의해서 도입된 약물 운반체이다 [6]. SLN은 기존의 리포솜이나 에멀전 제형과는 달리 입자 내부가 지질 매트릭스로 되어있어 상대적으로 높은 봉입율을 갖는다. SLN은 생체 적합한 지질을 사용할 수 있고 제조시 유기용매를 사용하지 않아 생체 안전성이 높다. 또한 유화제를 사용하여 입자크기와 약물의 봉입율을 조절할 수 있으며, 나노 크기의 입자로 약물이 피부에 침투하는데 유리하다 [7-8, 13-15].

피부 흡수 시험의 경우 기존에는 rat과 같은 동물을 희생하여 진행하였으나, EU, 미국, 호주 등지에서 동물실험을 금지하였고, 식품의약품안전처에서는 화장품의 생체 외 피부 흡수시험의 동물대체 가이드라인을 마련하여 국내에 보급하고 있다 [9]. 따라서, 본 피부 흡수 시험은 인체 피

부 유래 피부 조직 중 하나인 SkinEthic™ RHE 피부 조직을 사용하여 AG의 피부 투과율을 측정하였다 [10,16].

본 연구에서는 기능성 미백물질인 AG의 피부 투과율을 개선시키기 위해서 AG를 SLN에 봉입하였다. 약물의 봉입율과 투과율을 높이기 위해서 다양한 지질과 유화제를 사용하였다. 피부 투과연구에서는 SkinEthic™ RHE 피부 조직을 사용하여 동물을 희생하지 않고 약물의 피부 투과율을 평가하였다.

2. 실험

2.1. 시약

Ascorbyl glucoside와 potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, myristic acid, palmitic acid는 SAMCHUN (Pyeongtaek, Korea)로부터 구입하였다. Behenic acid, Span 20, Span 60, Tween 60은 Dae Jung Co. Ltd. (Busan, Korea)에서 구입하였다. SkinEthic RHE 조직은 SkinEthic Laboratories (Nice, France)에서 구입하였다. Phosphate-buffered saline (PBS)는 Tech & Innovation (Chuncheon, Korea)에서 구입하였다.

2.2. AG 봉입 SLN의 제조

AG 봉입 SLN은 Gönüllü 등의 이중 에멀전 가온용융화법을 참고로 하여 제조하였다 [7]. SLN은 고형 지질과 유화제의 종류를 변화시켜 Table 1과 같이 제조하였다. myristic acid와 Span 20을 함유한 유상을 용융점보다 높은 온도인 80 – 90°C에서 용융시켰고, 동일 온도에서 가온된 1 g의 AG를 함유하는 수상을 유상에 가하여 W/O의 조에멀전 상태를 만들고 약 2분간

Table 1. The composition of AG loaded SLNs

Formulation		F1	F2	F3	F4	F5	F6
Drug	Ascorbyl glucoside (g)	1	1	1	1	1	1
Solid lipid	Myristic acid (g)	2	2				
	Palmitic acid (g)			2	2		
	Behenic acid (g)					2	2
Surfactant	Span 20 (g)	1		1		1	
	Span 60 (g)		1		1		1
	Tween 60 (g)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5

5,000 rpm에서 고속교반(Ultra-Turrax T18, IKA, Staufen, Germany)을 시켰다. 이것을 최외상인 Tween 60 수용액에 가하고 다시 2분간 1,000 rpm에서 고속교반 시켜 W/O/W 에멀전을 형성시켰다. 형성된 W/O/W 에멀전을 high pressure homogenizer (NanoDeBEE homogenizer, BEE International, South Easton, USA)로 20,000 psi에서 5 cycles로 처리한 후 상온에서 냉각하여 SLN을 제조하였다. 상기의 myristic acid 기반 SLN과 비교를 위해 Table 1의 조성대로 SLN을 제조하였다.

2.3. SLN의 입자크기 및 제타전위 측정

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

2.4. SLN 내 AG의 봉입율 측정

AG의 봉입율 측정은 Gönüllü 등의 방법을 참고로 하여 측정하였다 [7]. 제조한 AG 봉입 SLN의 현탁액을 Gyrozen 1580 MGR 초원심분리기(Gyrozen Ltd., Daejeon, Korea)를 이용하여 24,000 g에서 4°C를 유지한 상태에서 2 시간 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. SLN 내 AG의 용출율 평가

SLN 내 AG의 용출율 측정은 Pritchard 등의 방법을 참고로 하여 측정하였다 [11]. 12 - 14 kDa의 투석 튜브 (Spectrum Laboratories, Inc., Compton, CA, USA)에 각 샘플 1 mL을 넣고 50 mL의 release medium (PBS, pH 7.4)이 있는 70 mL 바이알에 투석 튜브를 넣는다. 바이알을 진탕항온수조 (BS-21, LAB companion, Seoul, Korea)에서 37 ± 0.5 °C 조건에서 70 rpm으로 진탕하였다. 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48 시간 간격으로 release medium에서 1 mL을 채취하여 HPLC로 정량하였다.

2.6. SkinEthic RHE 조직을 사용한 In vitro 피부 투과

AG의 피부 투과는 Yeo 등의 연구를 참고하여 진행하였고, 인체피부조직인 SkinEthic RHE를 사용하였다 [12]. 24 well 플레이트에 배양된 SkinEthic RHE 조직을 3 mL의 receptor medium (PBS, pH 7.3)이 있는 6 well 플레이트에 옮긴 후 각 샘플의 0.3 mL을 피부에 적용한다. 샘플이 적용된 SkinEthic RHE 조직을 인큐베이터 진탕기 (NB-101SRC, N-BIOTEK, Korea)에서 37 ± 0.5 °C, 0.5% CO₂ 조건에서 100 rpm으로 진탕하였다. 0.5, 1, 2, 4, 8 시간 간격으로 receptor medium에서 1 mL를 채취하여 HPLC로 정량하였다.

2.7. SkinEthic RHE 조직을 사용한 In vitro 피부 침적

AG의 피부 침적 실험은 Yeo 등의 연구를 참고하여 진행하였다 [12]. In vitro 투과 후 SkinEthic RHE 조직을 2 mL의 maintenance

medium이 담긴 유리바이알에 넣고 고속균질기를 사용하여 1,000 rpm에서 균질하였다. 균질된 각 샘플을 0.45 μm PTFE 실린지 필터로 거른 후 HPLC로 분석하였다.

2.8. AG의 HPLC 분석

AG의 함량은 Huang등의 방법을 참고로 하여 Waters HPLC (Waters, Milford, MA, USA)를 사용하여 분석하였다 [5]. 컬럼은 CapCell Pak C₁₈ MG column (5 μm , 4.6 mm \times 250 mm Shiseido, Tokyo, Japan)를 사용하였다. 이동상은 0.1 M 인산이수소칼륨용액(pH 2.0)을 사용하였고, 측정파장은 UV 240 nm, 유속은 1.0 mL/min, 주입량은 20 μL 이었다.

3. 결과 및 고찰

3.1. AG가 탑재된 SLN의 입자크기 및 제타전위 측정 결과

W/O/W 에멀전 가온용융법으로 제조한 AG 봉입 SLN의 평균 입자 크기는 172.65 - 347.19 nm이고 입자의 평균 다분산 지수 (polydispersity index, PDI)는 0.19 - 0.23이다. 입자의 평균 제타전위는 -22.90 - -41.20 mV 이다 (Figure 1). SLN의 PDI가 0.2 내외이므로 균질한 입자가 형성되었다는 것을 확인하였다. 입자크기 및 제타전위에 대한 지질의 영향을 비교해 보면, 고휘지질의 탄소 사슬 길이가 길어질수록 평균 입자크기와 제타전위가 증가되는 것으로

나타났다. 이는 탄소 사슬 길이가 길어질수록 약 물을 봉입하는 지질 매트릭스의 부피가 커지며, 고휘 지질의 카르복실기에 내재된 음전하가 높아 지기 때문에 사료된다 [8]. 유화제가 입자크기와 제타전위에 미치는 영향에 대해서는, 친유성이 높은 유화제를 사용할수록 입자크기는 작아지고 제타전위는 높아지는 것으로 나타났다. 이는 비교적 친유성이 높은 유화제를 사용할수록 W/O 계면의 안정성이 높아져 입자크기가 작아지는 것으로 사료된다 [7]. 제타전위의 경우 입자크기가 작을수록 입자 표면적이 넓어지므로 입자표면에 더 많은 음전하가 노출되며, 높은 제타전위의 입자는 입자 사이의 척력이 강해져 합일을 억제하여 입자 안정성이 높아지는 것으로 사료된다.

3.2. SLN 내 AG의 봉입율

친수성 약물인 AG의 봉입율을 증대시키기 위해 다양한 고휘지질과 유화제를 사용하여 이중 에멀전 가온용융유화법으로 SLN을 제조하였다. AG의 봉입율 및 봉입효율을 측정된 결과 평균 봉입효율은 44.18 - 57.77%이고, 평균 봉입율은 12.83 - 16.15%이었다 (Figure 2). 고휘지질이 AG의 봉입율에 미치는 영향을 비교해 보면, 지질의 탄소 사슬 길이가 증가함에 따라 AG의 봉입율이 증대되는 것으로 나타났다. 이는 탄소 사슬 길이가 길어질수록 지질 매트릭스 부피가 커져 비교적 많은 약물을 입자 내에 봉입할 수 있기 때문에 사료된다 [8]. 봉입율에 대한 유화제 영향의 경우, 친수성 - 친유성 밸런스 (Hydrophile - lipophile balance, HLB)가 4.7인

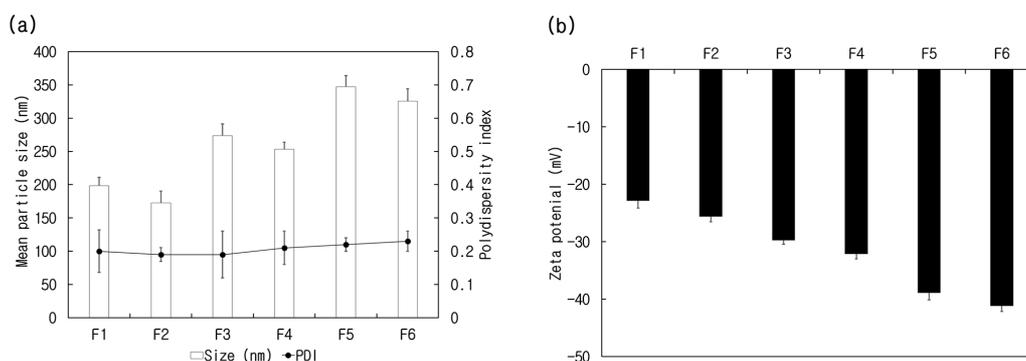


Fig 1. Average particle size, polydispersity index (PDI), and zeta potential of AG loaded SLNs. Results are expressed as the means \pm standard deviations of three independent experiments ($n = 3$). (a) Particle size and PDI and (b) zeta potential of AG loaded SLNs.

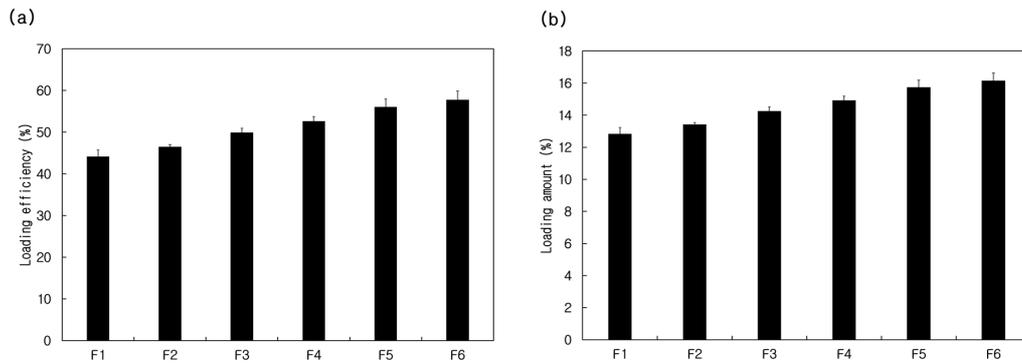


Fig. 2. Loading efficiency and loading amount of AG loaded SLNs. Results are expressed as the means \pm standard deviations of three independent experiments ($n = 3$). (a) Loading efficiency and (b) loading amount of AG loaded SLNs.

Span 60이 HLB가 8.6인 Span 20보다 상대적으로 친유성이 높으며 친유성의 정도가 높을수록 W/O 계면의 안정성이 높아지게 된다. 따라서, 약물이 함유된 수상(W_1)이 약물 매트릭스인 유상(O)에 더 많이 봉입될 수 있으므로 SLN 내 AG의 봉입율이 증가된 것으로 사료된다 [7].

3.3. SLN 내 AG의 용출을 평가 결과

투석튜브를 이용한 AG의 약물방출 결과를 Figure 3에 나타내었다. SLN 제형으로부터 AG의 방출속도는 서방출 양상을 보였다. 고형지질이 약물 용출에 미치는 영향을 비교해 보면, 고형지질의 탄소 사슬이 길어질수록 SLN 내 AG의 방출이 지연되는 것으로 나타났다. 이는 AG가 SLN 내에서 움직이는 것은 탄소 사슬이 방해하므로 탄소 사슬이 긴 지질을 사용할수록 상대적으로 지연된 약물 방출 양상을 보이는 것으로 사료된다. 유화제의 경우, 상대적으로 지용성이 높은 Span 60을 사용한 SLN 제형이 Span 20을 사용한 제형보다 약물 방출이 지연되는 것으로 나타났다. 이는 친유성의 정도가 높을수록 약물이 SLN 내부에 더 많이 봉입되기 때문으로 사료된다 [7]. 또한 SLN 내 AG의 초기 약물 방출은 신속히 일어나지만 12 시간이 지난 시점부터 방출속도가 느려지는 것으로 나타났다. 이는 12 시간까지는 SLN의 입자 표면에 침적된 약물이 방출되었기 때문이며, 12 시간 이후로는 SLN 내부에 봉입된 AG가 입자 밖으로 나오는 것으로 사료된다 [8].

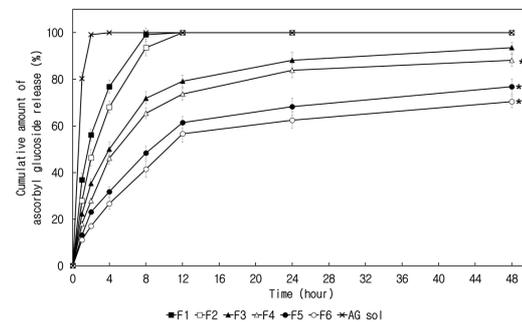


Fig. 3. Cumulative percentage release profiles for AG from SLNs. Results are expressed as the means \pm standard deviations of three independent experiments ($n = 3$). * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ versus AG solution.

3.4. SkinEthic RHE 조직을 사용한 *In vitro* 피부 투과 결과

In vitro 피부 투과 실험은 0.5 cm^2 의 insert에 배양된 SkinEthic RHE 피부 조직을 사용하여 8 시간 동안 AG 봉입 SLN과 대조군인 AG 수용액의 피부 투과율을 측정하였다 (Figure 4). AG 용액의 평균 피부 투과율은 4.77%이었으나, AG 봉입 SLN의 평균 피부 투과율은 17.79 - 35.26%이었다. 이는 SLN을 적용하였을 때 AG의 피부 투과율이 약 3.7 - 7.4 배 개선되었음을 확인하였다. 고형지질이 AG의 피부 투과도에 미치는 영향을 비교해 보면, 지방 사슬 길이가 길어짐에 따라 약물의 피부 투과도가 증대되는 것으로 나타났다. 유화제의 경우 친유성이 비교적

높은 유화제를 사용할수록 AG의 피부 투과율이 높아지는 것으로 나타났다. 이는 친유성이 높은 SLN의 제형일수록 피부 친화도가 높기 때문으로 사료된다 [7-8].

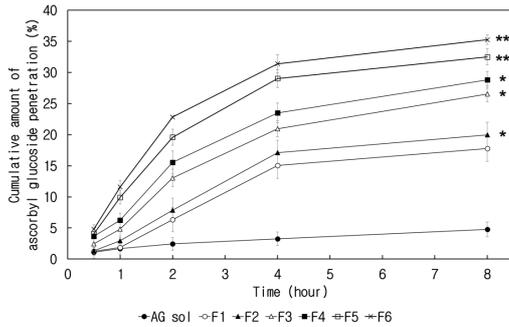


Fig 4. Cumulative penetration profiles for AG from SLNs into SkinEthic RHE tissue. Results are expressed as the means \pm standard deviations of three independent experiments ($n = 3$). * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ versus AG solution.

3.5. SkinEthic RHE 조직을 사용한 *In vitro* 피부 침적 결과

피부 투과 실험 후 SkinEthic RHE 피부 조직 내 AG의 함량을 정량하였다 (Figure 4). AG 봉입 SLN의 AG 피부 침적율은 21.77 - 36.26% 이고, AG 용액은 3.17%로 나타났다. 이는 SLN을 적용하였을 때 AG의 피부 침적율이 약 6.9

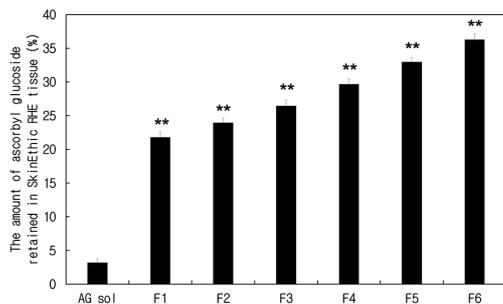


Fig 5. Results for AG retention from AG loaded SLNs in SkinEthic RHE tissue after penetration studies. Results are expressed as means \pm standard deviation of three independent experiments ($n = 3$). * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ versus AG solution.

- 11.4 배 개선되었음을 확인하였다. SLN의 지질 매트릭스가 피부 각질층 내 세포 간 지질과 상호작용을 하여, SLN이 효율적으로 표피 내로 들어갈 수 있다고 사료된다 [7]. 이를 통해 세포 간 지질에 저장된 약물이 서방출될 수 있을 것으로 사료된다 [8].

4. 결론

본 연구에서는 기능성 미백물질인 AG의 피부 투과율을 개선하기 위해서 AG를 이중 에멀전 가온용유화법으로 SLN에 봉입하였다. 평균 입자 크기 및 다분산 지수로 판단할 때 경피약물전달체로 적합하였으며, 평균 제타전위 결과 입자의 물리적 안정성을 확보하기에 적절하였다. 식품의약품안전처의 동물대체 시험법 가이드라인에 따라 인공피부 조직을 사용한 피부 투과 및 침적 시험에서 SLN을 적용하였을 때 AG의 피부투과율이 약 3.7 - 7.4 배 정도 개선되었음을 확인하였다. 따라서, 본 연구에서 제조된 SLN은 AG의 국소약물전달시스템으로 사용하는데 유용할 것이다.

References

1. T. Pillaiyar, M. Manickam, V. Namasivayam, "Skin whitening agents: medicinal chemistry perspective of tyrosinase inhibitors", *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, Vol.32, No.1 pp. 403-425, (2017)
2. M. V. Trinidad, M. L. Antonio, C. B. Carlos, R. T. Andrea, M. L. Alejandro, A. S. Salvador, "Impact of Gloves and Mask Use on Epidermal Barrier Function in Health Care Workers", *Dermatitis*, Vol.32, No.1 pp. 57-62. (2021)
3. J. S. Jeon, H. T. Kim, M. G. Kim, M. S. Oh, S. R. Hong, M. H. Yoon, S. M. Cho, H. C. Shin, J. H. Shim, A. Ramadan, A. M. Abd El-Aty, "Simultaneous Determination of Water-soluble Whitening Ingredients and Adenosine in Different Cosmetic

- Formulations by High-performance Liquid Chromatography coupled with Photodiode Array Detection", *International journal of cosmetic science*, Vol.38. No.3 pp. 286–293, (2016)
4. N. Butwong, T. Kunawong, J. H. Luong, "Simultaneous Analysis of Hydroquinone, Arbutin, and Ascorbyl Glucoside Using a Nanocomposite of Ag@ AgCl Nanoparticles, Ag₂S Nanoparticles, Multiwall Carbon Nanotubes, and Chitosan", *Nanomaterials*, Vol.10. No.8 pp. 1583–1596, (2020)
 5. S. C. Huang, C. C. Lin, M. C. Huang, K. C. Wen, "Simultaneous Determination of Magnesium Ascorbyl Phosphate, Ascorbyl Glucoside, Kojic Acid, Arbutin and Hydroquinone in Skin Whitening Cosmetics by HPLC", *Journal of Food and Drug Analysis*, Vol.12. No.1 pp. 13–18, (2004)
 6. J. S. Lucks, R. H. Muller, B. König, "Solid lipid nanoparticles (SLN)–an Alternative Parenteral Drug Carrier System", *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, Vol.38. No.33, (1992)
 7. Ü. Gönüllü, M. Üner, G. Yener, E. F. Karaman, Z. Aydoğmuş, "Formulation and Characterization of Solid Lipid Nanoparticles, Nanostructured Lipid Carriers and Nanoemulsion of Lornoxicam for Transdermal Delivery" *Acta Pharmaceutica*, Vol.65. No.1 pp. 1–13, (2015)
 8. L. Mitri, R. Shegokar, S. Gohla, C. Anselmi, R. H. Müller, "Lipid Nanocarriers for Dermal Delivery of Lutein: Preparation, Characterization, Stability and Performance", *International Journal of Pharmaceutics*, Vol.414. No.1–2 pp. 267–275, (2011)
 9. C. Lotte, C. Patouillet, M. Zanini, A. Messenger, R. Roguet, "Permeation and Skin Absorption: Reproducibility of Various Industrial Reconstructed Human Skin Models", *Skin Pharmacology and Physiology*, Vol.15. No.1 pp. 18–30, (2002)
 10. D. Monti, P. Chetoni, S. Burgalassi, S. Tampucci, M. Centini, C. Anselmi, "4-Methylbenzylidene Camphor Microspheres: Reconstituted Epidermis (Skinethic®) Permeation and Distribution", *International journal of cosmetic science*, Vol.37. No.3 pp. 298–305, (2015)
 11. E. M. Pritchard, C. Szybala, D. Boison, D. L. Kaplan, "Silk Fibroin Encapsulated Powder Reservoirs for Sustained Release of Adenosine", *Journal of Controlled Release*, Vol.144. No.2 pp. 159–167, (2010)
 12. S. Yeo, D. Kim, M. Park, H. R. Woo, J. M. Yun, and J. L, "Improved Transport of Adenosine Incorporated in Lipid Nanoparticles across Reconstructed Human Epidermis", *Bulletin of the Korean Chemical Society*, Vol.41. No.10 pp. 969–972, (2020)
 13. O. Sarheed, D. Shouqair, K. V. R. N. S. Ramesh, M. Amin, J. Boateng, and M. Drechsler, "Physicochemical characteristics and in vitro permeation of loratadine solid lipid nanoparticles for transdermal delivery", *Therapeutic Delivery*, Vol.11. No.11 pp. 685–700, (2020)
 14. M. Liu, J. Wen, and M. Sharma, "Solid Lipid Nanoparticles for Topical Drug Delivery: Mechanisms, Dosage Form Perspectives, and Translational Status", *Current Pharmaceutical Design*, Vol.26. No.27 pp. 3203–3217, (2020)
 15. P. M. Chaudhari, and A. R. Patil, "Optimization of Itraconazole Solid Lipid Nanoparticles for Topical Delivery", *Nanoscience & Nanotechnology-Asia*, Vol.10. No.4 pp. 381–389 (2020)
 16. N. Alépée, C. Tornier, C. Robert, C. Amsellem, M. H. Roux, O. Doucet, J. Pachot, M. Méloni, and A. D. B. de Fraissinette, "A catch-up validation study on reconstructed human epidermis (SkinEthic™ RHE) for full replacement of the Draize skin irritation test", *Toxicology in Vitro*, Vol.24. No.1 pp. 257–266 (2010)