

Pantothenic acid의 피부 투과 개선을 위한 고형지질나노입자설계 연구

여수호[†]

중앙대학교 약학과, 박사
(2021년 6월 8일 접수: 2021년 8월 22일 수정: 2021년 8월 23일 채택)

A Study on the Design of Solid Lipid Nanoparticles for enhanced Skin Penetration of Pantothenic Acid

Sooho Yeo[†]

*College of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul 06974, Korea
(Received June 8, 2021; Revised August 22, 2021; Accepted August 23, 2021)*

요약 : 본 연구에서는 피부 보습 및 진정효능을 갖는 비타민 B5인 Pantothenic acid (PA)의 피부 투과율을 개선시키기 위해 고형지질나노입자(SLN)를 설계하였다. SLN은 지질과 유화제의 종류를 변화하여 여러 조성으로 제조하였고, PA는 이중 에멀전 가온 용융유화법으로 SLN 내에 봉입하였다. 제조된 PA 봉입 SLN은 입자의 물리화학적 특성인 입자크기, 다분산 지수, 제타전위, 봉입율을 평가하였다. 피부 투과시험의 경우 인체 유래 인조 피부 조직을 사용하였다. 제조된 PA 봉입 SLN의 입자크기는 192.15 - 369.87 nm이었고, 제타전위는 -21.39 - -40.55 mV이었다. SLN 내 PA의 평균 봉입효율은 44.36 - 57.16%이었고, 평균 봉입율은 12.60 - 16.36%이었다. PA 봉입 SLN의 피부 투과 결과는 SLN을 적용한 제형이 적용하지 않은 PA 용액 보다 약 3.8 - 8.8 배 PA의 피부 투과율이 개선되었다. 본 연구에서 제조된 SLN은 PA의 피부 투과율을 개선하였음을 보여주었다. 특히, glyceryl behenate와 Span 60을 사용한 SLN이 PA의 피부 투과율이 가장 높은 결과를 보여 주었다.

주제어 : 판토텐산, 비타민 B5, 고형지질나노입자, 피부 보습, 피부 투과

Abstract : In this study, we designed pantothenic acid (PA) loaded solid lipid nanoparticles (SLNs) for enhanced skin penetration of PA that is used for moisturizing agent in cosmetics with hydrophilic property. SLNs were prepared using various lipids and surfactants. PA loaded SLNs were fabricated using double emulsion method. The fabricated PA loaded SLNs assessed particle size, polydispersity index, zeta potential, loading capacity. Skin penetration study was conducted using artificial skin tissue originated from human epidermis as one of the reconstructed human epidermis models. The mean

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

particle size and zeta potential of SLNs ranged from 192.15 nm to 369.87 nm and -21.39 mV to -40.55 mV, respectively. The loading efficiency and loading amount of PA loaded SLNs were ranged from 44.36% to 57.16% and 12.60% to 16.36%, respectively. The results of penetration demonstrated that all SLNs improved PA skin penetration. In addition, the amount of PA from SLNs were approximately 3.8 – 8.8 times higher than that from PA solution. Therefore, the fabricated SLNs demonstrated the enhancement of skin penetration of PA. Particularly, the SLN, which used glyceryl behenate and Span 60, showed optimal skin penetration of PA.

Keywords : Pantothenic acid, Vitamin B5, Solid lipid nanoparticles, Skin moisturizing agent, Skin penetration

1. 서론

사람의 피부 구조는 크게 3 구조로 표피, 진피, 피하지방으로 나눌 수 있다. 표피는 각질층, 투명층, 과립층, 가시층, 기저층으로 나눌 수 있다. 이 중 각질층은 각질세포와 세포 간 지질로 구성되며, 피부 최외각에 위치하고 있어 외부 환경으로부터 피부를 보호하고 피부 내 수분을 유지시키는 역할을 한다. 특히 세포 간 지질은 경피수분손실(Transepidermal water loss)을 예방하는데 큰 역할을 하기 때문에 세포 간 지질 성분의 생성 및 보충이 피부 보습 및 기능 개선에 중요하다 [1].

Pantothenic acid (PA)는 vitamin B5로 알려져 있는 수용성 약물이며 지방산 생성에 필요한 조효소 A의 합성에 관여한다 [2-5]. 또한 화학구조상 물 분자와 수소결합을 할 수 있는 hydroxyl group을 가지고 있어 피부 보습 및 피부 진정 효능이 있다 [12-15]. 그러나, 수용성인 PA는 피부 장벽인 각질층을 투과하는데 어려움이 있다.

기존에 수용성 약물의 피부 투과율 개선을 위한 경피약물전달체의 경우 리포솜이나 에멀전 제형을 사용하였다. 그러나, 제조 시 유기용매를 사용한다는 점에서 새로운 경피약물전달시스템 개발이 요구되고 있다. 고형지질나노입자(solid lipid nanoparticles, SLNs)는 1991년 Lucks 등에 의해서 도입된 약물 운반체로 제조 시 유기용매를 사용하지 않아 생체 안전성이 비교적 높은 제형이다 [6-7]. 또한 약물을 봉입할 수 있는 입자 내부가 지질 매트릭스로 구성되어있어 리포솜과 에멀전 제형보다 약물의 봉입율이 높고, 생체적합성 지질을 사용하여 피부 친화도가 높다 [8].

피부 흡수 시험은 기존에 rat과 같은 동물을 사용하여 진행하였으나, 식품의약품안전처에서 화장품의 생체 외 피부 흡수시험의 동물대체 가이드라인을 마련하여 국내에 보급하고 있다 [9]. 이에 사용되는 조직은 인체 피부 유래 피부 조직 (SkinEthic™ RHE)이다 [10]. 따라서 본 피부 투과 시험에서 SkinEthic™ RHE 조직을 사용하여 PA의 피부 투과를 측정하였다.

본 연구에서는 피부 보습 성분인 PA의 피부 투과율을 개선시키기 위해 PA 봉입 SLN을 제조하였다. 제조된 SLN의 물리화학적인 특성을 파악하기 위해 입자크기 및 제타전위를 측정하였고, SkinEthic RHE 조직을 사용하여 피부 투과도를 측정하였다.

2. 실험

2.1. 시약

Pantothenic acid와 potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4), glyceryl monooleate는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, glyceryl monostearate, Sorbitan Palmitate (Span 40), Sorbitan Stearate (Span 60), Polysorbate 20 (Tween 20)은 Dae Jung Co. Ltd. (Busan, Korea)에서 구입하였다. Glyceryl behenate는 Gattefosse (Saint-Priest, France)에서 구입하였다. SkinEthic RHE 조직은 SkinEthic Laboratories (Nice, France)에서 구입하였으며, phosphate-buffered saline (PBS)는 Tech & Innovation (Chuncheon, Korea)에서 구입하였다.

2.2. PA 봉입 SLN의 제조

PA는 Gönüllü 등의 이중 에멀전 가온용융화법을 참고로 하여 SLN 내에 봉입하였다 [7]. SLN은 유상에 사용하는 지질과 유화제의 종류를 변화시켜 Table 1과 같이 제조하였다. Glycerol monooleate와 Span 40을 함유한 유상을 용융점보다 높은 온도인 80 - 90°C에서 용융시켰고, 동일 온도에서 가온된 1 g의 PA 함유 수상을 유상에 가하여 W/O의 조에멀전 상태를 만들고 약 2 분간 10,000 rpm에서 고속교반(Ultra-Turrax T18, IKA, Staufen, Germany)을 시켰다. 이것을 최외상인 Tween 20 수용액에 가하고 다시 2 분간 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 25,000 psi에서 3 cycles로 처리한 후 상온에서 냉각하여 SLN을 제조하였다. 상기의 glycerol monooleate 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 PA의 봉입률 측정

SLN 내 PA의 봉입률 측정은 Gönüllü 등의 방법을 참고로 하여 측정하였다 [7]. 제조한 PA 봉입 SLN의 현탁액을 Gyrozen 1580 MGR 초원심분리기(Gyrozen Ltd., Daejeon, Korea)를 이용

하여 24,000 g에서 4°C를 유지한 상태에서 2시간 동안 초원심분리를 하였다. 상등액을 high performance liquid chromatograph (HPLC)로 정량하였다. 얻어진 결과를 아래의 식에 대입하여 약물의 봉입률과 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 PA의 용출률 평가

PA 봉입 SLN 내 PA의 용출률은 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 °C조건에서 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

PA의 피부 투과는 인체피부조직인 SkinEthic RHE를 사용하였다. 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 인큐

Table 1. The composition of PA loaded SLNs

Formulation		F1	F2	F3	F4	F5	F6
Drug	Pantothenic acid (%)	2	2	2	2	2	2
	Glycerol monooleate (%)	4	4				
Solid lipid	Glycerol monostearate (%)			4	4		
	Glycerol behenate (%)					4	4
	Span 40 (%)	2		2		2	
Surfactant	Span 60 (%)		2		2		2
	Tween 20 (%)	3	3	3	3	3	3
	Distilled water (%)	89	89	89	89	89	89
Total (%)		100	100	100	100	100	100

베이터 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

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. PA의 HPLC 분석

PA의 정량은 Waters HPLC (Waters, Milford, MA, USA)를 사용하여 분석하였다. 컬럼은 CapCell Pak C₁₈ MG column (5 µm, 4.6 mm × 250 mm Shiseido, Tokyo, Japan)를 사용하였다. 이동상은 등용매용리로 0.05 M 인산이수소 칼륨용액(pH 3.5)을 사용하였고, 측정파장은 UV 210 nm, 유속은 1.0 mL/min, 주입량은 20 µL이었다.

3. 결과 및 고찰

3.1. PA가 탑재된 SLN의 입자크기 및 제타전위 측정 결과

이중 에멀전 가온용융화법으로 제조한 PA봉입

SLN의 평균 입자 크기는 192.15 - 369.87 nm 이고 입자의 평균 다분산 지수 (polydispersity index, PDI)는 0.19 - 0.23이다. 입자의 평균 제타전위는 -21.39 - -40.55 mV 이다 (Fig 1). SLN의 PDI가 0.2 내외이므로 균질한 입자가 형성되었다는 것을 확인하였다. 고행지질 간 SLN의 입자크기를 비교해 보면, 지방산의 사슬 길이가 길어질수록 입자크기가 커지는 것을 확인하였다. 유화제의 경우 친수성 - 친유성 밸런스 (Hydrophile - lipophile balance, HLB)가 4.7인 Span 60을 사용한 SLN 제형이 HLB가 6.7인 Span 40을 사용한 제형보다 상대적으로 작은 입자가 형성되었음을 확인하였다. 제타전위의 경우 탄소 사슬이 긴 지질과 친유성이 높은 유화제를 사용할수록 제타전위가 높아지는 것을 확인하였다. 이는 지질의 탄소 사슬 길이가 길어짐에 따라 약물을 봉입할 수 있는 지질 매트릭스의 부피가 커지며, 지질 내 카르복실기에 내재된 음전하가 높아지기 때문으로 사료된다 [2,7-8]. 유화제의 경우 친유성이 높은 유화제가 SLN 제조 시 W/O 계면의 안정성을 상대적으로 높여 더 작은 입자를 제조할 수 있으며, 입자크기가 작아질수록 입자 표면적이 넓어져 더 많은 음전하가 입자표면에 노출되는 것으로 사료된다 [8].

3.2. SLN 내 PA의 봉입율

SLN 내 PA의 봉입율 및 봉입효율을 측정된 결과 평균 봉입효율은 44.36 - 57.16%이고, 평균 봉입율은 12.60 - 16.36%이었다 (Fig. 2). 지질 간 PA의 봉입율을 비교해 보면, 지방산의 사

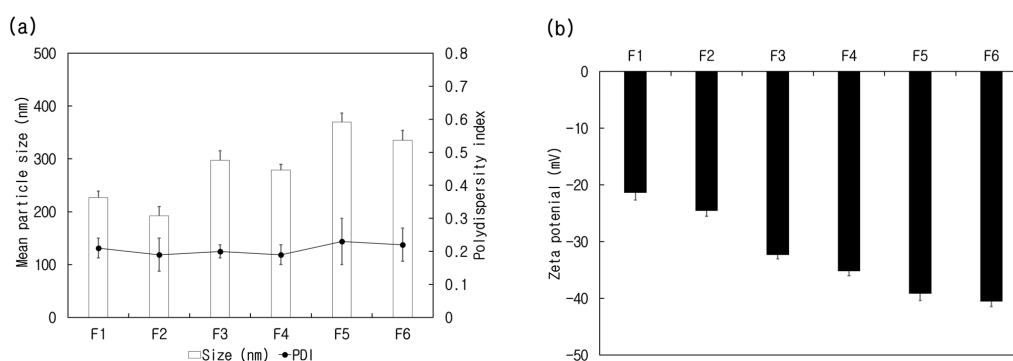


Fig. 1. Average particle size, polydispersity index (PDI), and zeta potential of PA loaded SLNs. Results are expressed as the means \pm standard deviations of three independent experiments ($n = 3$). (a) Particle size and PDI and (b) zeta potential of PA loaded SLNs.

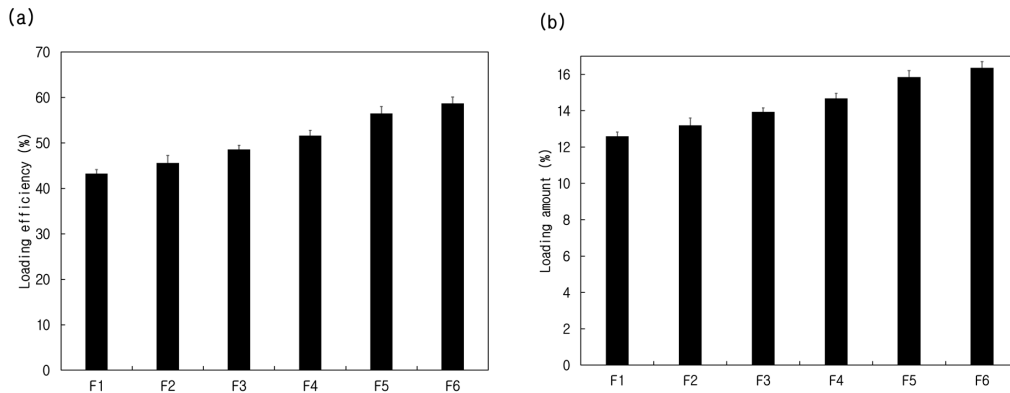


Fig. 2. Loading efficiency and loading amount of PA loaded SLNs. Results are expressed as the means \pm standard deviations of three independent experiments ($n = 3$). (a) Loading efficiency and (b) loading amount of PA loaded SLNs.

슬 길이가 길어짐에 따라 봉입율이 높아지는 것을 확인하였다. 유화제의 경우 비교적 친유성이 높은 Span 60을 사용한 SLN 제형이 PA의 봉입율이 높은 것으로 나타났다. 이는 탄소 사슬 길이가 길어짐에 따라 지질 매트릭스의 부피가 커져 입자 내 비교적 많은 약물을 봉입할 수 있다고 사료된다 [2,8]. 또한 $W_1/O/W_2$ 에멀전 제조 과정 중 W_1/O 에멀전 제조 시 친유성이 높은 유화제를 사용할수록 W_1/O 계면을 안정화 시켜 약물 수용액인 W_1 을 O 상의 지질 내 봉입에 유리한 것으로 사료된다.

3.3. SLN 내 PA의 용출을 평가 결과

투석튜브를 이용한 SLN 내 PA의 약물방출 결과를 Fig. 3에 나타내었다. SLN 내 PA의 방출속도는 서방출 양상을 보였다. PA의 용출은 고형지질의 탄소 사슬 길이가 길어지고 친유성이 높은 유화제를 사용할수록 PA의 방출이 지연되는 것으로 나타났다. 이는 친유성이 높은 유화제를 사용할수록 PA가 SLN 내에 더 많이 봉입되고, 탄소 사슬 길이가 길어질수록 PA가 SLN 밖으로 확산하는 것을 방해하기 때문으로 사료된다 [2,8]. SLN 내 PA의 방출은 2가지 양상으로 나타나는데, 약물 방출 초기에는 PA의 방출이 신속히 일어나지만 12 시간이 지난 시점부터 느려지는 것으로 나타났다. 이는 초기에는 SLN 입자 표면에 침적된 PA가 용출되지만 12 시간 이후로는 입자 내부에 봉입된 PA가 용출되기 때문으로

사료된다 [7].

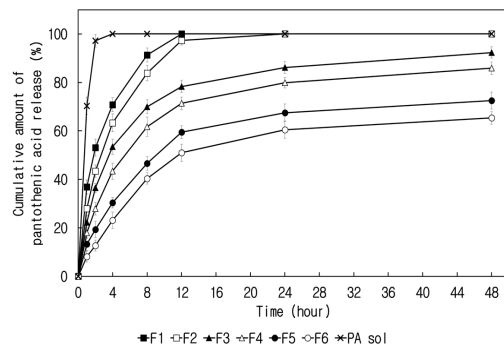


Fig. 3. Cumulative percentage release profiles for PA from SLNs. Results are expressed as the means \pm standard deviations of three independent experiments ($n = 3$).

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

PA 봉입 SLN과 대조군인 PA 용액으로부터의 PA의 *In vitro* 피부 투과 실험은 0.5 cm^2 의 insert에 배양된 SkinEthic RHE 피부 조직을 사용하여 진행하였다 (Fig. 4). 8 시간 후 PA 봉입 SLN의 평균 투과율은 $16.51 - 38.67\%$ 로 4.38% 의 피부 투과율을 보인 PA 용액에 비해 약 3.8 - 8.8 배 개선되었음을 확인하였다. 지질의 탄소 사슬 길이가 길어지고, 친유성이 높은 유화

제를 사용할수록 PA의 피부 투과율이 높아지는 것을 확인하였다 [2,8]. 이는 친유성이 높아질수록 SLN의 피부 친화도가 높기 때문으로 사료된다. 피부 투과에 대한 영향은 유화제 보다 지질이 상대적으로 더 큰 것으로 나타났다. 이는 피부 내 세포 간 지질에 대한 친화도가 유화제 보다 약물이 봉입되는 지질 매트릭스의 영향이 높기 때문으로 사료된다.

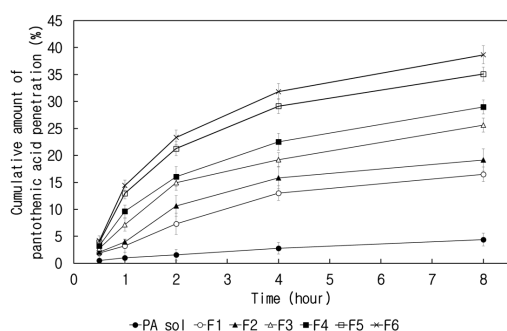


Fig. 4. Cumulative penetration profiles for PA from SLNs into SkinEthic RHE tissue. Results are expressed as the means \pm standard deviations of three independent experiments ($n = 3$).

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

피부 투과 실험 후 SkinEthic RHE 피부 조직 내 PA의 함량을 정량하였다 (Fig. 5). PA 봉입 SLN의 평균 침적율은 12.69 - 25.15%로

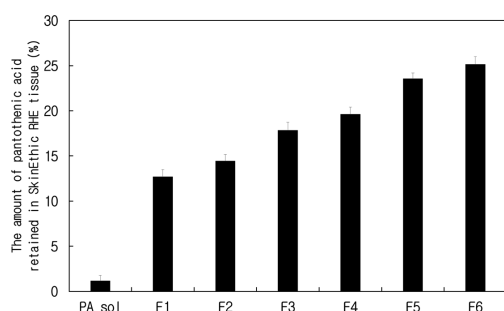


Fig. 5. Results for PA retention from PA loaded SLNs in SkinEthic RHE tissue after penetration studies. Results are expressed as means \pm standard deviation of three independent experiments ($n = 3$).

1.15%인 PA 용액에 비해 약 11.0 - 21.8 배 개선되었음을 확인하였다. 이는 약물을 봉입하는 지질 매트릭스가 피부 각질층의 세포 간 지질과 친화도가 높기 때문으로 사료된다 [2,7]. 이를 통해 PA를 세포 간 지질 내 저장할 수 있어 약물의 서방출을 유도할 수 있을 것으로 사료된다 [8].

4. 결론

본 연구에서는 피부 보습 및 진정 효능이 있는 수용성 PA의 피부 투과율을 개선시키기 위해서 SLN을 제조하였다. 제조된 SLN의 평균 입자 크기 및 제타전위를 통해 경피약물전달시스템으로 적합하였다. 피부 투과 시험의 경우 동물대체 시험법 가이드라인에 따라 인체 유래 인공 피부 조직을 사용하였고, SLN을 적용한 PA의 피부 투과도가 적용하지 않을 때 보다 약 3.8 - 8.8 배 개선되었음을 확인하였다. 따라서 본 연구에서 제조된 SLN은 PA의 피부 투과율을 개선하기에 충분한 결과를 보여 주었고, 이러한 결과는 보습 소재인 PA를 화장품에 적용하는데 유용한 자료로 활용될 수 있다.

References

1. S. H. Lee, S. K. Jeong, S. K. Ahn, "An Update of the Defensive Barrier Function of Skin", *Yonsei medical journal*, Vol.47. No.3 pp. 293-306, (2006)
2. A. Ota, K. Istenič, M. Skrt, N. Šegatin, N. Žnidaršič, K. Kogej, N. P. Ulrih, "Encapsulation of Pantothenic Acid into Liposomes and into Alginate or Alginate-pectin Microparticles loaded with Liposomes", *Journal of Food Engineering*, Vol.229. pp. 21-31, (2018)
3. F. B. Camargo, L. R. Gaspar, P. M. Maia Campos, "Skin Moisturizing Effects of Panthenol-based Formulations", *Journal of cosmetic science*, Vol.62. No.4 pp. 361-369, (2011)
4. H. Stettler, P. Kurka, N. Lunau, C. Manger, A. Böhlting, S. Bielfeldt, K. P.

- Wilhelm, D. P. Stephan, D. Dähnhardt, F. H. H. Brill, H. Lenz, "A new Topical Panthenol-containing Emollient: Results from Two Randomized Controlled Studies assessing its Skin Moisturization and Barrier Restoration Potential, and the Effect on Skin Microflora", *Journal of Dermatological Treatment*, Vol.28. No.2 pp. 173–180, (2017)
5. N. Muhamad, M. M. Yusoff, J. Gimbut, "Thermal Degradation Kinetics of Nicotinic Acid, Pantothenic Acid and Catechin derived from Averrhoa bilimbi fruits", *Rsc Advances*, Vol.5. No.90 pp. 74132–74137, (2015)
 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. F. Tigu, J. Zhang, G. Liu, Z. Cai, Z. Y. Li, "A highly active pantothenate synthetase from *Corynebacterium glutamicum* enables the production of d-pantothenic acid with high productivity", *Applied microbiology and biotechnology*, Vol.102. No.14 pp. 6039–6046, (2018)
 13. V. Váñez-Gomis, G. Peris-Pastor, J. L. Benedé, A. Chisvert, A. Salvador, "Green determination of eight water-soluble B vitamins in cosmetic products by liquid chromatography with ultraviolet detection", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Vol.205. No.25 pp. 114308, (2021)
 14. C. G. Acevedo-Rocha, L. S. Gronenberg, M. Mack, F. M. Commichau, H. J. Genee, "Microbial cell factories for the sustainable manufacturing of B vitamins", *Current opinion in biotechnology*, Vol.56. pp. 18–29 (2019)
 15. N. Muhamad, M. M. Yusoff, J. Gimbut, "Thermal degradation kinetics of nicotinic acid, pantothenic acid and catechin derived from Averrhoa bilimbi fruits", *RSC advances*, Vol.5. No.90 pp. 74132–74137, (2015)