

Quercetin과 Rutin을 함유하는 PCL-*b*-PEG 고분자 미셀의 특성 및 피부 흡수에 관한 *In vitro* 연구

임규남 · 김선영 · 김민지 · 박수남[†]

서울과학기술대학교 정밀화학과, 화장품융합기술연구소

(2011년 11월 28일 접수, 2012년 2월 20일 수정, 2012년 2월 20일 채택)

Physical Characteristic and *In vitro* Transdermal Delivery of PCL-*b*-PEG Micelles Containing Quercetin and Rutin

Gyu Nam Lim, Sun Young Kim, Min Ji Kim, and Soo Nam Park[†]

Department of Fine Chemistry, Cosmetic R&D Center, Seoul National University of Science and Technology,
232 Gongreung-ro, Nowon-gu, Seoul 139-743, Korea

(Received November 28, 2011; Revised February 20, 2012; Accepted February 20, 2012)

초록: 본 연구에서는 항산화 물질로 잘 알려진 quercetin과 그 배당체인 rutin을 함유하는 poly(ϵ -caprolactone)-*b*-poly(ethylene glycol) 미셀을 제조하여, 활성물질(quercetin, rutin)의 *in vitro* 피부 흡수 증진에 관한 연구를 수행하였다. 입자크기는 PCL-*b*-PEG 고분자의 농도가 증가함에 따라 미셀의 초기 입자 크기가 증가하는 경향을 보였다. 고분자 미셀의 표면 전위(Zeta potential)는 비교적 일정함을 확인하였다. 제조한 고분자 미셀의 피부 흡수력을 평가하기 위하여, 용액 상태의 활성물질을 미셀의 대조군으로 하여 Franz cell을 이용한 투과실험을 진행한 결과 용액 상태보다 미셀에서 더 높게 나타났음을 확인하였다. 또한 화장품 소재로서의 안전성 평가를 위한 인체 피부 일차자극 실험(patch test) 결과 어떠한 피부 자극도 관찰되지 않았다.

Abstract: In this study, we prepared polymer micelles containing quercetin and rutin, known as antioxidants, using poly(ϵ -caprolactone)-*b*-poly(ethylene glycol), and evaluated *in vitro* skin permeation of the active materials. Quercetin and rutin loaded micelles were characterized by DSC (differential scanning calorimetry), HPLC (high performance liquid chromatography) and DLS (dynamic light scattering) measurements. The particle size of the polymer micelles increased in a concentration dependent manner (0.5~2.0% PCL-*b*-PEG). The Zeta potential of quercetin and rutin loaded micelles remained constant. To evaluate the skin penetration of PCL-*b*-PEG micelles, Franz diffusion cell experiment was performed. The aqueous solutions of quercetin and rutin were used as the control groups. Quercetin and rutin loaded PCL-*b*-PEG micelles showed more efficient skin permeation than the control groups. Safety assessment (patch test) of quercetin and rutin loaded PCL-*b*-PEG micelles on skin was performed to test application possibility of the polymer micelles to cosmetics. Any adverse symptoms were not observed.

Keywords: PCL-*b*-PEG, micelle, drug delivery system, quercetin, rutin.

서 론

신체의 일차적 장벽 기관인 피부는 여러 가지 자극원의 침입 등 외부의 스트레스로부터 인체를 보호하는 역할을 수행한다. 이러한 피부의 두께는 나이, 성별, 부위에 따라 차이가 있으며, 조직학적으로 표피, 진피, 피하지방 등으로 구성되어 있다. 피부의 최외각 층인 각질층은 케라틴이라고 불리는 소수성이 큰 불용성 섬유상 단백질이 각질 세포를 채우고 있으

며 각질 세포간 지질이 세포 사이에서 라멜라 구조를 형성하고 있다. 이러한 구조적인 특성으로 인하여 각질층은 다양한 형태의 외부환경으로부터 물리, 화학적 저항성을 나타낸다. 따라서 활성물질의 피부 흡수 또한 피부의 장벽 기능 때문에 쉽게 이루어 지지 않고 매우 낮은 농도로 투과된다. 이러한 문제점을 극복하기 위해서 활성물질을 피부를 통해 효과적으로 흡수시킬 수 있는 약물전달체계의 개발이 중요하다. 이러한 연구의 일환으로 의약계에서는 약물전달 시스템(drug delivery system, DDS)에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다.¹⁻¹² 그 중 고분자 미셀 시스템은 약물이 가지고 있는 효과를 극대화 시키고, 부작용을 최소화시키며, 난용성 약물의 가용화를 위한

[†]To whom correspondence should be addressed.
E-mail: snpark@seoultech.ac.kr

제형으로 관심이 높아지고 있다. 고분자 미셀 시스템은 친수성 또는 소수성 약물에 대하여 넓고 다양하게 응용할 수 있으며 작은 입자 크기를 제조할 수 있는 장점을 지닌다.¹³⁻²⁴ 고분자 미셀은 친수성 고분자와 소수성 고분자가 블록공중합체 (block copolymer)의 형태로 결합되어 있는 경우에 형성되며 각 블록을 구성하는 고분자의 종류와 중합도, 용액의 온도, pH 등에 따라 임계 미셀 농도가 결정된다. 고분자 미셀의 중심부인 core는 소수성 약물이나 활성성분을 담지하는 담체의 역할을 하는 부분이며 친수성 부분인 shell은 외부환경으로부터 활성성분 또는 미셀 자신을 보호하는 역할을 한다. 고분자 미셀의 이러한 특성 때문에 소수성 약물은 용매에 대한 고유의 용해도 이상의 농도로 소수성 core 안에 봉입될 수 있고 미셀은 그 구조를 유지한 상태로 수용액 상에 분산될 수 있다.²⁵⁻³²

Quercetin은 자연에 가장 풍부하게 존재하는 대표적인 식물성 폴리페놀 화합물이다.³³ Quercetin의 생리활성에 관한 연구는 활발히 진행되어 왔다. Quercetin은 강력한 항산화작용 및 라디칼 소거능을 보이며, 동맥경화증에 대한 강력한 예방효과를 가지고 있는 것으로 알려져 있다.³⁴⁻³⁸ 또한 quercetin은 항종양제인 독소루비신에 의해 유발되는 심장독성을 저하시키고³⁹ 간장 보호효과,⁴⁰ 항혈소관 응집작용,⁴¹ 항알리지작용,⁴² 항염증작용⁴³ 등과 같은 생리작용을 한다. 이러한 우수한 생리 활성에도 불구하고 quercetin은 물에 대한 용해도가 매우 낮고(3 µg/mL), 위장관 점막에 존재하는 뮤신과 강한 결합을 형성하여 경구투여시 생체활용률이 매우 낮다고 알려져 있다.⁴⁴

Quercetin의 대표적인 배당체이고 운향과 식물인 *Ruta graveolens*에서 처음으로 발견된 rutin은⁴⁵ 과일, 채소, 콩과 식물에 많이 포함되어 있는 플라보놀 배당체(glycoside)의 하나로 연한 노란색 바늘 모양 결정이다. Rutoside, quercetin-3-rutinoside 그리고 sophorin이라고도 불린다.⁴⁶⁻⁵⁰ 또한 모세혈관을 튼튼하게 하고 출혈을 예방하며 혈압을 조절하는 작용을 하여 뇌출혈, 방사선장애, 출혈성 질병예방에 효과가 있으며 항암, 항균 물질로 알려져 있는 비타민 C의 활동요소인 비타민 P라고 알려져 있다.⁵¹⁻⁵⁴

Quercetin과 rutin은 우수한 생리활성을 나타냄에도 불구하고 난용성의 특성 때문에 체내 흡수율이 낮을 뿐만 아니라 이들의 제제화에 큰 어려움을 겪고 있다. 본 연구에서는 강력한 항산화제이며 소수성 활성물질인 quercetin과 그 배당체인 rutin의 가용화를 위하여 생분해성 고분자인 poly(ϵ -caprolactone)(PCL)과 poly(ethylene glycol)(PEG)를 합성한 양친성 이중블록 공중합체를 이용하여 미셀을 제조하였다. 제조된 고분자 미셀은 DLS, HPLC 등을 사용하여 입자 크기, 포집 효율 등의 물리화학적 특성을 평가하였다. 또한 인체피부 일차 자극 실험(patch test)을 통하여 안전성을 평가하였다. 이러한 연구를 바탕으로 난용성 활성물질을 담지한 고분자 미셀의 화장품 제형으로써의 이용가능성을 알아보고자 한다.

실 험

시약 및 재료. 미셀의 크기는 입도분석기 Otsuka ELS-Z Series(Otsuka Electronics, Japan)를 이용하여 측정하였으며, 약물봉입 미셀의 열적 특성은 DSC-60(Shimadzu, Japan)을 사용하였다. 쥐 피부투과 실험에 사용한 Franz diffusion cell은 PermeGear(USA)의 9 mm Franz diffusion cell(receptor volume 5 mL)과 V6A Stirrer 모델을 사용하였다. Quercetin 및 rutin의 정량분석을 위해 HPLC(high performance liquid chromatography)는 Shimadzu(Japan)의 제품을 사용하였다. HPLC는 Shimadzu(Japan)의 LC-20AT pump와 SPD-M20A UV-vis detector로 구성되어 있으며, 컬럼은 Shimadzu(Japan)의 Shim-pack(VP-ODS) C18 analytical column(5 µm, 250 × 4.6 mm)을 사용하였다. PCL-*b*-PEG 고분자는 Polysciences(USA)에서, quercetin과 rutin은 Sigma Chemical(USA)에서 구입하여 사용하였다. Tetrahydrofuran(THF), ethanol(EtOH), 1,2-dichloroethane, ethyl acetate 등 각종 용매 및 모든 시약은 시판 특급 시약을 사용하였으며 정제 없이 구입한 그대로 사용하였다.

미셀 제조 및 활성물질의 포집효율. 포집효율 및 입자 크기를 측정하여 최적의 조건을 확립하였다. 활성물질의 함량을 0.1%로 고정하고, PCL-*b*-PEG 고분자의 함량을 0.5~2.0%의 범위로 하여 THF에 용해시켰다. 이 용액을 40 °C에서 3시간 반응시킨 후 증류수 10 mL에 한방울씩 떨어뜨렸고, 24시간 교반시킨 다음 초기용매를 증발시켰다. 활성물질들의 포집효율을 측정하기 위해 0.45 µm 필터로 여과하였다. 필터를 통과한 고분자 미셀과 통과하지 못한 quercetin과 rutin에 에탄올을 과량 넣어 sonication 후 용매를 증발시키고, 에탄올 10 mL(여과량과 동량)를 넣어 0.45 µm의 syringe filter로 불순물을 제거한 후 HPLC로 정량하였다. Quercetin과 rutin 농도에 따른 검량선을 작성한 후 다음 식을 통하여 고분자 미셀 내의 quercetin과 rutin의 포집효율을 결정하였다.

$$\text{Loading efficiency(\%)} = \frac{\text{Weight of the drug in micelle}}{\text{Weight of the feeding drugs}} \times 100$$

미셀의 입도 및 Zeta Potential 측정. Quercetin과 rutin을 함유하는 PCL-*b*-PEG 미셀의 입자크기와 입도분포는 빛의 산란을 이용하여 입자크기를 분석하는 Otsuka ELS-Z series(Otsuka Electronics, Japan)를 이용하여 측정하였다. 측정온도는 25 °C, 산란각은 165°로 측정하였고, 광원은 Ar 레이저를 사용하였으며 미셀의 크기는 70번씩 3회 측정하였다. 평균입자 크기는 누적분석법을 통하여 나타내었고, 입도 분포는 Contin 법으로 해석하여 나타내었다.

Zeta potential의 측정온도는 25 °C, 산란각은 165°로 측정하였고, 광원은 Ar 레이저를 사용하였으며 미셀의 Zeta potential은 3번씩 3회 측정하였다. Zeta potential은 Smoluchowski법

으로 해석하여 나타내었다.

고분자 및 미셀의 열적 특성 분석. Quercetin과 rutin이 봉입된 미셀의 열적 특성을 알아보기 위하여 DSC-60 (Shimadzu, Japan)를 이용하여 T_m (melting point)를 측정하였다. Aluminum pan에 미셀의 양은 8 mg으로 하였고, 마찬가지로 건조된 고분자와 quercetin, rutin의 양을 동일한 조건으로 준비하였다. 60 mL/min의 질소기류 하에 승온속도는 10 °C/min로 하였고, 0~250 °C의 범위 내에서 측정하였다.

미셀의 경표피 투과실험. Quercetin과 rutin을 함유하는 미셀을 시료로 Franz diffusion cell을 이용한 쥐 피부 투과 실험을 진행하였다. 쥐의 피부는 경추탈골로 치사시킨 ICR outbred albino mice(12주령, 약 50 g, 암컷)의 등에서 적출하여 사용하였다. 적출한 피부(1.5 cm × 1.5 cm)에서 피하지방을 피부가 상하지 않게 제거하였고, 진피는 제거하지 않고 사용하였다. 준비한 ICR mouse 등 피부를 각질층 부분이 위로 향하도록 donor와 receptor phase 사이에 피부를 고정시켰다. Receptor phase와 접촉하는 경표피의 면적은 0.6362 cm²이고, receptor phase는 예비실험에서 가장 우수한 용해도를 보인 2.0% HCO-60(in 20% EtOH)의 혼합액을 사용하였다. 준비된 Franz diffusion cell에 5 mL의 receptor phase를 투여하고, 항온수조를 이용하여 온도를 37.0 ± 0.5 °C로 유지하였다. 교반속도는 150 rpm으로 24시간 동안 일정하게 교반시켰다. 각 시료 0.5 mL를 donor의 경표피 표면에 가한 후 8시간 간격(총3회)으로 24시간 동안 매회 0.75 mL의 receptor phase를 sampling port를 통해 1 mL syringe로 채취하여 1.5 mL 튜브에 보관하였다. 채취 직후 동량의 receptor solution으로 보충하였다. 이 때 채취한 시료는 quercetin과 rutin을 정량하기 위해 HPLC로 분석하였다.

피부에 남아있는 quercetin과 rutin의 양을 측정하기 위해서 우선 diffusion cell에서 피부를 꺼낸 직후 3회에 걸쳐 투과되지 않은 샘플들을 PBS로 세척하였다. 세척 후 샘플과 닿았던 부위를 tape stripping을 3회 실시하고, tape stripping한 피부를 세척하여 tape와 피부를 각각 10 mL falcon tube에 넣은 후, 에탄올을 7 mL 넣고 90분 동안 소니케이티(초음파 발생기)로 tape와 피부에 남아있는 quercetin과 rutin을 추출하였다. EtOH를 증발 건조시킨 후, 다시 0.75 mL의 EtOH로 녹여 HPLC로 피부에 남아있는 quercetin과 rutin을 정량하였다.

미셀의 인체피부 일차자극 실험. 시험 부위를 70% 에탄올로 세척한 뒤 건조시킨다. Quercetin과 rutin을 함유하는 PCL-*b*-PEG 미셀을 IQ UltraTM chamber 내에 20 µL를 적하시킨 후 시험 부위인 팔 안쪽에 얹어 micropore tape으로 고정시켰다. 첩포는 48시간 동안 도포하며, 첩포를 제거한 후에는 skin marker로 시험 부위를 표시하고 30분, 24시간 후에 각 시험 부위를 관찰하였다.

피부 반응은 Frosch & Kligman)과⁵⁵ The Cosmetic, Toiletry,

Table 1. Recording of Patch Test Reactions

Symbol	Grade	Criterion
+	1	Slight erythema, either spotty or diffuse
++	2	Moderate uniform erythema
+++	3	Intense erythema with edema
++++	4	Intense erythema with edema & vesicles

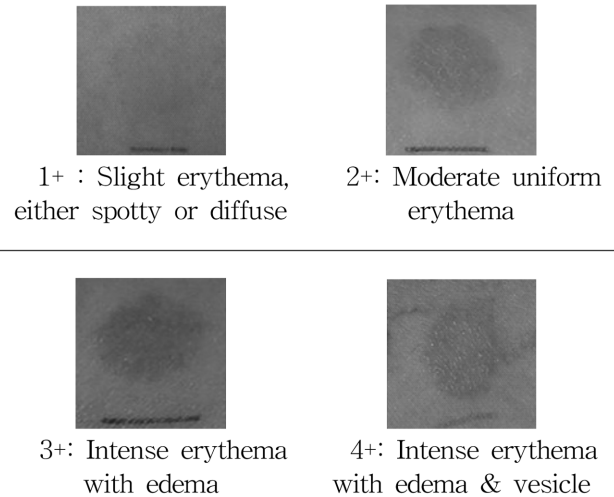


Figure 1. Clinical standard photographs of visual assessment of human patch test.

and Fragrance Association(CTFA) guideline)을⁵⁶ 반영한 다음의 기준에 따라 평가하였다(Table 1, Figure 1). 피험자는 알러지와 피부질환을 앓고 있지 않은 만 18세 이상의 건강한 남녀 지원자 15명을 대상으로 실시하였다.

결과 및 토론

미셀의 활성물질의 포집효율. Quercetin과 rutin의 함량을 0.1%로 고정하고, PCL-*b*-PEG 고분자의 함량을 0.5~2.0%의 범위로 하여 quercetin과 rutin의 함량 및 포집효율을 측정하

Table 2. Loading Efficiency of Quercetin and Rutin in the Micelles with Different PCL-*b*-PEG Concentrations

PCL- <i>b</i> -PEG(%)	Loading efficiency(%)	
	Quercetin	Rutin
0.5	7.69	28.82
1.0	38.14	44.62
1.5	76.27	82.04
2.0	84.97	91.35

여 최적의 조건을 확립하였다. 고분자의 함량 변화에 따른 quercetin과 rutin의 포집효율 data를 Table 2에 나타내었다.

Table 2에서 확인할 수 있듯이 미셀에서 quercetin의 경우 보다 rutin의 경우, 활성물질 함량이 더 높은 것을 알 수 있다. 고분자 농도에 따른 봉입효율 역시 rutin이 더 큰 것을 확인할 수 있었는데, 고분자의 농도가 높아질수록 봉입효율이 증가하는 것을 확인하였다.

미셀의 입도분포 및 안정성. 수용액상에서 형성된 활성물질을 함유하는 미셀의 크기는 광산란기(ELS-Z)에 의하여 측정되었다. Quercetin을 함유하는 미셀의 PCL-b-PEG 고분자의 함량이 0.5%인 경우 160.8 nm, 1.0%일 경우 231.3 nm, 1.5%일 경우 229.3 nm, 2.0%일 경우 261.9 nm로 PCL-b-PEG 고분자 함량이 증가함에 따라 활성물질을 봉입한 미셀의 초기 입자크기가 다소 증가하는 것을 알 수 있었다(Figure 2). Rutin을 함유하는 미셀 역시 PCL-b-PEG 고분자의 함량이 0.5%인 경우 128.3 nm, 1.0%일 경우 180.7 nm, 1.5%일

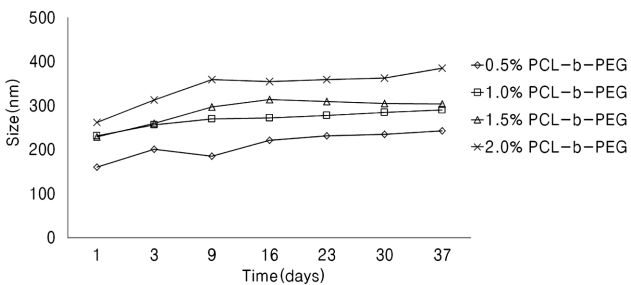


Figure 2. Physical stability of quercetin loaded micelles assessed by size.

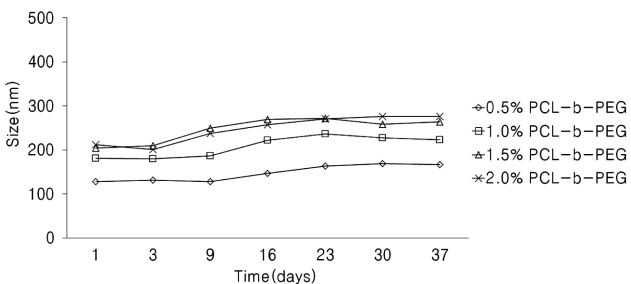


Figure 3. Physical stability of rutin loaded micelles assessed by size.

경우 204.1 nm, 2.0%일 경우 211.6 nm로 같은 경향을 나타내었다(Figure 3). 이는 PCL-b-PEG 고분자의 함량이 커질수록 미셀 core 내부에 활성물질을 담지할 수 있는 영역도 크게 되어 더 많은 활성물질을 함유할 수 있을 것으로 사료된다. 또한 활성물질을 함유하는 미셀이 봉입 후 시간이 지남에 따라 서로 응집 및 침전되어 그 크기가 증가하지만 30일 이후까지 안정한 것을 확인할 수 있었다.

미셀의 Zeta Potential 측정. 용액 중에 분산하고 있는 입자는 +나 -로 하전되어 있다. 입자의 주변에는 이러한 전하를 중화하기 위해 반대 부호의 이온이 모여 전기 이중층이 형성되어 있는데 여기에 전장을 걸면 입자는 하전과는 역방향으로 입자표면에 흡착한 이온층에 따라 영동한다. 이때의 입자와 용매의 계면을 미끄러운 면이라고 하며 그때의 전위를 제타 전위라고 한다. 제타 전위의 절대치가 커지면 정전기적인 반발력이 커지므로 분산성은 좋게 되고, Zeta 전위가 0에 가까워지면 불안정하게 되어 응집하기 쉬워진다. Zeta potential을 측정함으로써 quercetin과 rutin을 함유하는 미셀과 빈 미셀의 분산안정성을 확인하였다(Table 3). PCL-b-PEG 고분자의 농도의 변화에 따라 Zeta potential을 측정할 결과, 활성물질을 함유하지 않은 미셀의 Zeta potential은 -0.9~-1.85 mV로 나타났고, 활성물질을 함유한 미셀의 Zeta potential 값은 -7.77~-16.14 mV로 빈 미셀에 비해 절대치가 커지는 것을 확인하였다. Table 3에서와 같이 활성물질을 함유시킨 미셀은 모든 농도에서 Zeta potential 값이 큰 차이를 나타내지 않음을 확인하였다. Zeta potential 값이 0에 가까운데도 30일 이상의 안정성을 보이는 것은 직선상의 ethylene glycol 주사슬을 가지고 있어 유동성과 유연성이 큰 PEG의 특성 때문에 미셀의 응집과 침전을 줄여 안정성을 증가시킨 것으로 사료된다. Table 3에 있는 수용액 상태에서의 quercetin과 rutin의 Zeta potential 값은 각각 -22.93 및 -33.69 mV로 나타났다. 하지만, quercetin과 rutin은 물에 대한 용해도가 거의 없어 실험에 사용한 0.1%의 농도를 만들 수 없기 때문에 미셀에 포집된 경우와의 비교는 의미가 없는 것으로 사료된다.

미셀의 열적 특성. PCL-b-PEG 고분자와 quercetin과 rutin을 함유하는 미셀의 열적 거동을 알아보기 위하여 시차 주사열량계(DSC)를 통하여 분석하였다(Figures 4, 5). 0.1% Quercetin과 rutin을 함유하는 2.0% PCL-b-PEG 미셀, PCL-b-PEG 고

Table 3. Zeta Potentials (mV) of Quercetin and Rutin Loaded Micelles

Micelle	PCL-b-PEG (%)			
	0.5	1.0	1.5	2.0
Empty micelle	-1.14 ± 0.35	-1.23 ± 0.50	-0.90 ± 0.65	-1.85 ± 0.42
Quercetin loaded micelle	-16.14 ± 2.11	-12.78 ± 0.62	-12.80 ± 0.51	-10.53 ± 0.66
Rutin loaded micelle	-11.47 ± 0.84	-9.02 ± 0.47	-7.77 ± 0.32	-7.90 ± 0.25

1) Zeta potential of quercetin in H₂O (0.1%): -22.93 ± 0.31 mV. 2) Zeta potential of rutin in H₂O (0.1%): -33.69 ± 0.99 mV.

분자, quercetin, rutin을 미셀에 봉입하지 않고 임의적으로 PCL-*b*-PEG 고분자와 혼합된 시료를 대상으로 분석한 결과를 Figures 4와 5에 나타내었다. PCL-*b*-PEG 고분자의 T_m 은 64.04 °C, quercetin은 123.05 °C, rutin은 179.18 °C에서 확인할 수 있었다. 0.1% Quercetin을 함유하는 2.0% PCL-*b*-PEG 미셀은 76.84 °C, 0.1% rutin을 함유하는 2.0% PCL-*b*-PEG 미셀은 75.01 °C에서 각각 용융점을 확인할 수 있었다. PCL-*b*-PEG와 quercetin, rutin을 임의적으로 혼합한 시료에서는 PCL-*b*-PEG와 quercetin, rutin의 T_m 피크가 모두 관찰되는 반면에 quercetin과 rutin을 함유하는 미셀을 측정하는 시료에서는 미셀 표면을 둘러싸고 있는 PCL-*b*-PEG의 T_m 만 관측되고 quercetin, rutin의 T_m 은 관측되지 않았다(d). 이렇게 봉입된 활성물질과 봉입되지 않은 활성물질의 열적 특성 차이는 활성물질이 미셀 내부에 봉입되어 있을 때 PCL-*b*-PEG와 함께 무정형 상태를 이루어 혼합되어 있기 때문임을 확인할 수 있었다.

미셀의 경표피 투과실험. 0.1% Quercetin과 rutin을 함유하는 2.0% PCL-*b*-PEG 미셀의 피부 흡수력을 평가하기 위하여 용액 상태의 quercetin과 rutin을 미셀의 대조군으로 하여 Franz diffusion cell을 이용한 투과실험을 실시하였다. 실험에 사용

된 미셀은 quercetin을 함유하는 2.0% PCL-*b*-PEG 미셀은 261.9 nm, rutin을 함유하는 2.0% PCL-*b*-PEG 미셀은 211.6 nm의 입자크기를 가지는 시료를 사용하였다. 8시간마다 채취한 시료의 최종 누적 투과량을 확인하였을 때, 24시간 후에 Franz diffusion cell(5 mL)로 투과된 quercetin의 양을 측정하고 대조군에서는 전혀 투과하지 못했으며, quercetin을 함유하는 미셀은 46.93 µg을 나타냈다. Rutin은 대조군이 2.52 µg, rutin을 함유하는 미셀이 44.27 µg의 rutin이 피부를 투과하였음을 확인할 수 있었다(Figure 6). Tape stripping을 하여 각질층에 남아있는 quercetin, rutin의 양을 측정하고 대조군에서 quercetin이 36.39 µg, quercetin을 함유하는 미셀이 35.70 µg을 나타냈으며, rutin은 대조군이 1.81 µg, rutin을 함유하는 미셀이 5.90 µg으로 나타났다. 또한 피부에 남아있는 quercetin, rutin 양을 측정하고 각질층을 제외한 피부에는 quercetin은 대조군이 38.51 µg, quercetin을 함유하는 미셀은 46.93 µg의 quercetin이 피부에 존재하였으며, rutin은 대조군이 2.97 µg, rutin을 함유하는 미셀은 54.74 µg의 rutin이 피부에 존재하여 대조군보다 활성물질을 함유하는 미셀 시스템이 보다 많은 양의 활성물질을 피부로 침투시키는 것을 확인하였다(Figures 7, 8).

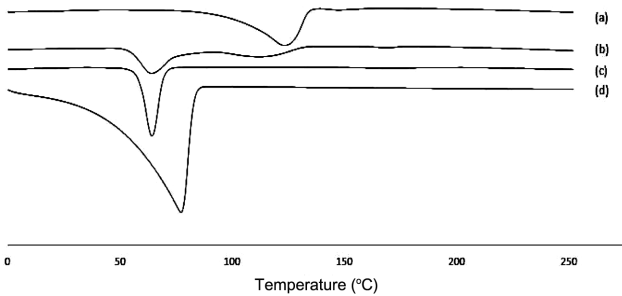


Figure 4. DSC thermograms of quercetin (a); a mixture of PCL-*b*-PEG di-block copolymer and quercetin (b); PCL-*b*-PEG di-block copolymer (c); quercetin loaded micelle (d).

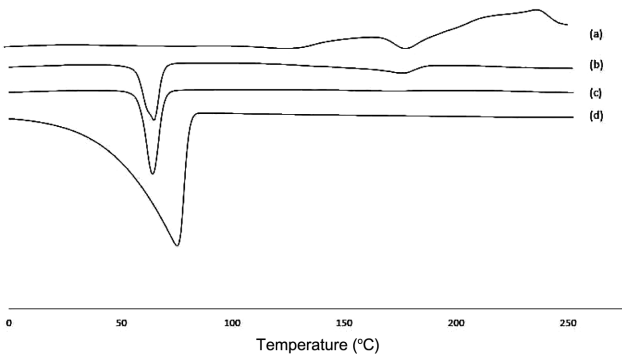


Figure 5. DSC thermograms of rutin (a); a mixture of PCL-*b*-PEG di-block copolymer and rutin (b); PCL-*b*-PEG di-block copolymer (c); and rutin loaded micelle (d).

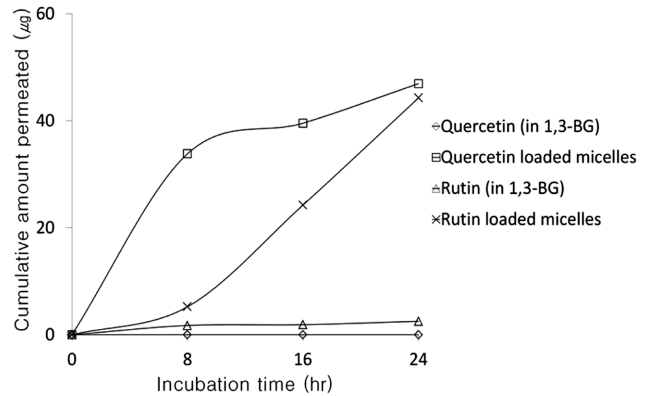


Figure 6. *In vitro* skin permeation profiles of quercetin and rutin through ICR mouse skin.

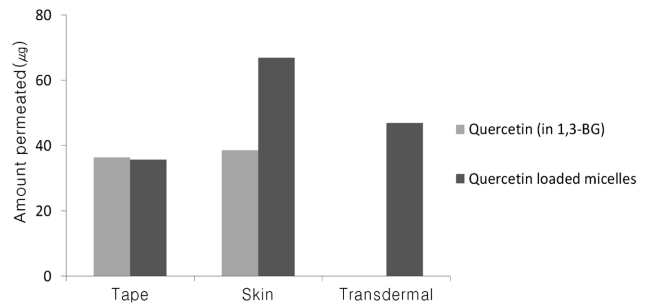


Figure 7. *In vitro* total skin permeation profiles of quercetin through ICR mouse skin.

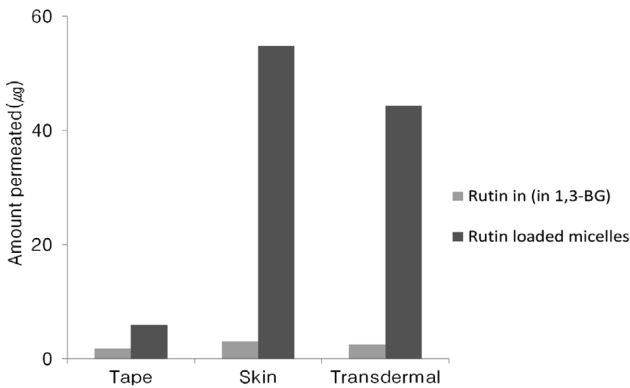


Figure 8. *In vitro* total skin permeation profiles of rutin through ICR mouse skin.

미셀의 인체피부 일차자극 실험. PCL과 PEG가 생분해성을 가진다는 연구결과들이 합성된 PCL-*b*-PEG 고분자를 미셀화하여 화장품에 적용하였을 경우에도 생분해성을 나타내는지 확인하기 위하여 PCL-*b*-PEG로 0.1% quercetin과 rutin을 함유하는 미셀을 제조하여 인체피부 일차자극 실험을 실시하였다. 48시간 첩포 후 첩포를 제거하고 30분, 24시간 후에 Frosch & Kligman과 The Cosmetic, Toiletry, and Fragrance Association(CTFA) guideline을 반영하여 관찰한 결과 첩포 48, 72시간 후에 아무런 피부 반응도 관찰되지 않았다(Table 4).

결론

본 연구에서는 화장품 분야에서 항산화 물질로 널리 사용되고 있는 quercetin과 그 배당체인 rutin의 용해도를 증진시키고, 피부 침투력을 증가시키기 위하여 quercetin과 rutin을 함유하는 PCL-*b*-PEG 미셀을 제조하고, 이 미셀을 이용해 ICR outbred albino mice(12주령, 약 50 g, 암컷)의 피부로 활성물질들의 침투와 인체피부 일차자극 실험을 수행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. PCL-*b*-PEG 고분자 농도에 따른 미셀의 quercetin과 rutin의 포집효율은 PCL-*b*-PEG 고분자의 비율이 2.0%일 때 quercetin의 포집효율은 84.97%로 나타났으며, rutin의 포집효율은 91.35%로 나타났다.
2. Quercetin을 함유하는 미셀의 입자의 크기는 PCL-*b*-

PEG 고분자의 농도에 따라 0.5%(160.8 nm) < 1.0%(231.3 nm) < 1.5%(229.3 nm) < 2.0%(261.9 nm)로 PCL-*b*-PEG 고분자 함량이 증가함에 따라 quercetin을 봉입한 미셀의 초기 입자크기가 다소 증가하는 경향을 보였다. Rutin을 함유하는 미셀 역시 0.5%(128.3 nm) < 1.0%(180.7 nm) < 1.5%(204.1 nm) < 2.0%(211.6 nm)로 같은 경향을 보였다. 또한 시간이 지남에 따라 미셀의 크기가 증가하지만 30일 이후까지 안정한 것으로 나타났다.

3. Quercetin을 함유하는 미셀의 PCL-*b*-PEG 고분자 농도에 따른 Zeta potential은 0.5%(-16.14 mV), 1.0%(-12.78 mV), 1.5%(-12.80 mV), 2.0%(-10.53 mV)로 큰 차이를 보이지 않았다. Rutin을 함유하는 미셀 또한 0.5%(-11.47 mV), 1.0%(-9.02 mV), 1.5%(-7.77 mV), 2.0%(-7.90 mV)로 비슷한 Zeta potential 값을 나타내었다.

4. PCL-*b*-PEG 고분자의 T_m 은 64.04 °C, quercetin은 123.05 °C, rutin은 179.18 °C에서 확인할 수 있었다. 0.1% quercetin을 함유하는 2.0% PCL-*b*-PEG 미셀은 76.84 °C, 0.1% rutin을 함유하는 2.0% PCL-*b*-PEG 미셀은 75.01 °C에서 각각 용융점을 확인할 수 있었다.

5. 0.1% Quercetin과 rutin을 함유하는 2.0% PCL-*b*-PEG 미셀의 피부 흡수력은 8시간마다 채취한 시료의 최종 누적 투과량을 확인하였을 때, 24시간 후에 Franz diffusion cell(5 mL)로 투과된 quercetin의 양을 측정된 결과 대조군에서는 전혀 투과하지 못했으며, quercetin을 함유하는 미셀이 46.93 µg을 나타냈으며, rutin은 대조군이 2.52 µg, rutin을 함유하는 미셀은 44.27 µg의 rutin이 피부를 투과하였음을 확인할 수 있었다. 각질층에 남아있는 quercetin, rutin의 양을 측정된 결과 대조군에서 quercetin이 36.39 µg, quercetin을 함유하는 미셀이 35.70 µg을 나타냈으며, rutin은 대조군이 1.81 µg, rutin을 함유하는 미셀이 5.90 µg으로 나타났다. 또한 피부에 남아있는 quercetin, rutin 양을 측정된 결과 각질층을 제외한 피부에는 quercetin은 대조군이 38.51 µg, quercetin을 함유하는 미셀은 66.85 µg의 quercetin이 피부에 존재하였으며, rutin은 대조군이 2.97 µg, rutin을 함유하는 미셀은 54.74 µg의 rutin이 피부에 존재함을 확인할 수 있었다.

6. PCL-*b*-PEG로 0.1% quercetin과 rutin을 함유하는 미셀을 제조하여 인체피부 일차자극 실험을 실시한 결과 첩포 48, 72시간 후에 아무런 피부 자극도 관찰되지 않았다.

Table 4. Results of Human Skin Primary Irritation Test (n = 15)

Sample for test	48 h			72 h			Irritation category		
	1+	2+	3+	1+	2+	3+	48 h	72 h	Mean
Quercetin micelle	-	-	-	-	-	-	0.0	0.0	0.0
Rutin micelle	-	-	-	-	-	-	0.0	0.0	0.0

참 고 문 헌

1. E. Blanco, E. A. Bey, Y. Dong, B. D. Weinberg, D. M. Sutton, D. A. Boothman, and J. Gao, *J. Control. Release*, **122**, 365 (2007).
2. T. Yi, J. Wan, H. Xu, and X. Yang, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **70**, 439 (2008).
3. C. J. Porter, K. M. Wasan, and P. Constantinides, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **60**, 615 (2008).
4. A. Tan, S. Simovic, A. L. Davey, T. Radws, and C. A. Prestidge, *J. Control. Release*, **134**, 62 (2009).
5. K. M. Huh, H. S. Min, S. C. Lee, H. J. Lee, S. W. Kim, and K. N. Park, *J. Control. Release*, **126**, 122 (2008).
6. C. Li and S. Wallace, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **60**, 886 (2008).
7. S. W. Kim, J. Y. Kim, K. M. Huh, G. Acharya, and K. N. Park, *J. Control. Release*, **132**, 222 (2008).
8. N. Ahuja, O. P. Katare, and B. Singh, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **65**, 26 (2007).
9. N. Nishiyama and K. Kataoka, *Pharmacol. Therapeut.*, **112**, 630 (2006).
10. A. Lavasanifar, J. Samuel, and G. S. Kwon, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **54**, 169 (2002).
11. M. Yokoyama, A. Satoh, Y. Sakurai, T. Okano, Y. Matsumura, T. Kazunori, and K. Kataoka, *J. Control. Release*, **55**, 219 (1998).
12. G. Giammona, G. Puglisi, G. Carallaro, A. Spadaro, and G. Pitarresi, *J. Control. Release*, **33**, 261 (1995).
13. M. Yokoyama, S. Fukushima, R. Uehara, K. Okamoto, K. Kataoka, Y. Sakurai, and T. Okano, *J. Control. Release*, **50**, 79 (1998).
14. J. A. Hubbell, *Science*, **300**, 595 (2003).
15. K. Kataoka, A. Harada, and Y. Nagasaki, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **47**, 113 (2001).
16. S. Kwon, J. H. Park, H. Chung, I. C. Kwon, and S. Y. Jeong, *Langmuir*, **19**, 10188 (2003).
17. A. Cudd, M. Bhogal, J. O'Mullavne, and P. Goddard, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **88**, 10855 (1991).
18. C. F. Skibola and M. T. Smith, *Free Radic. Biol. Med.*, **28**, 375 (2000).
19. P. Mahakunakorn, M. Tohda, Y. Murakami, K. Matsumoto, and H. Watanabe, *Biol. Pharm. Bull.*, **27**, 38 (2004).
20. P. Knekt, R. Jarvinen, A. Reunanen, and J. Maatela, *Br. Med. J.*, **312**, 478 (1996).
21. M. G. Hertog, P. M. Sweetnam, A. M. Fehily, P. C. Elwood, and D. Kromhout, *Am. J. Clin. Nutr.*, **65**, 1489 (1997).
22. C. A. Rice-Evans, N. J. Miller, and G. Paganga, *Trends Plant Sci.*, **2**, 152 (1997).
23. I. Morel, G. Lescoat, P. Cogrel, O. Sergent, N. Padeloup, P. Brissot, P. Cillard, and J. Cillard, *Biochem. Pharmacol.*, **45**, 13 (1993).
24. Y. Sadzuka, T. Sugiyama, K. Shimoi, N. Kinae, and S. Hirota, *Toxicol. Lett.*, **92**, 1 (1997).
25. M. F. Molina, I. Sanchez-Reus, I. Iglesias, and J. Bene, *Biol. Pharm. Bull.*, **26**, 1398 (2003).
26. X. Dong, G. Z. Zhen-Lun, B. J. Ping, and W. Zhong, *Acta. Pharmacol. Sin.*, **16**, 223 (1995).
27. S. M. Thornhill and A. M. Kelly, *Altern. Med. Rev.*, **5**, 448 (2000).
28. D. H. Kim, E. A. Jung, I. S. Sohng, J. A. Han, T. H. Kim, and M. J. Han, *Arch. Pharm. Res.*, **21**, 17 (1998).
29. I. K. Chun and E. H. Suh, *Yakhak Hoeii*, **42**, 59 (1998).
30. A. Weiss, *Pharm. Zentralblatt*, **13**, 903 (1842).
31. I. B. Afanas'ev, E. A. Ostrakhovitch, E. V. Mikhal'chik, G. A. Ibragimova, and L. G. Korkina, *Biochem. Pharmacol.*, **61**, 677 (2001).
32. N. Yildizoglu-Ari, V. M. Altan, O. Altinkurt, and Y. Ozturk, *Phytother. Res.*, **5**, 19 (1991).
33. Y. Matsubara, H. Kumamoto, Y. Iizuka, T. Murakami, K. Okamoto, H. Miyake, and K. Yokoi, *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 909 (1985).
34. K. Iwata, S. Miwa, T. Inayama, H. Sasaki, K. Soeda, and T. Sugahara, *J. Kagawa Nutr. Coll.*, **21**, 55 (1990).
35. J. Q. Griffith, J. F. Couch, and M. A. Lindauer, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **55**, 228 (1944).
36. M. F. A. Bakar, M. Mohamed, A. Rahmat, and J. Fry, *Food Chem.*, **113**, 479 (2009).
37. J. Yang, J. Guo, and J. Tuan, *LWT-Food Sci. Tech.*, **41**, 1060 (2008).
38. C. Wagner, R. Fachineto, C. L. Morel, C. W. Nogueira, and J. B. T. Rocha, *Brain Res.*, **1107**, 192 (2006).
39. I. Krefr, N. Fabha, and M. Germ, *Fagopyrum*, **20**, 7 (2003).
40. K. Kataoka, A. Harada, and Y. Nagasaki, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **47**, 113 (2001).
41. Y. K. Lee, *Macromol. Res.*, **14**, 387 (2006).
42. A. Lavasanifar, J. Samuel, and G. S. Kwon, *J. Control. Release*, **77**, 155 (2001).
43. S. K. Agrawal, N. S. DeLong, J. M. Coburn, G. N. Tew, and S. R. Bhatia, *J. Control. Release*, **112**, 64 (2006).
44. M. L. Adams and G. S. Kwon, *J. Control. Release*, **87**, 23 (2003).
45. G. S. Kwon and K. Kataoka, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **16**, 295 (1995).
46. G. Gausher, M. H. Dufresne, V. P. Sant, N. Kang, D. Maysinger, and J. C. Leroux, *J. Control. Release*, **109**, 169 (2005).
47. K. M. Huh, S. C. Lee, Y. W. Cho, J. Lee, J. H. Jeong, and K. Park, *J. Control. Release*, **101**, 59 (2005).
48. R. T. Liggins and H. M. Burt, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **54**, 191 (2002).
49. S. P. Satu, H. Marina, and I. H. Anu, *J. Sci. Food Agric.*, **79**, 499 (1999).
50. K. Herrmann, *J. Food Technol.*, **11**, 433 (1976).
51. P. J. Frosch and A. M. Kligman, *J. Am. Acad. Dermatol.*, **1**, 35 (1979).
52. *CTFA Safety Testing Guideline*, The Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association, Inc., Washington, D.C., 20005 (1981).
53. K. H. Jeong and Y. J. Kim, *Polymer(Korea)*, **30**, 512 (2006).
54. J. H. Im, Y. K. Lee, and K. M. Huh, *Polymer(Korea)*, **32**, 143 (2008).
55. Y. I. Jeong, M. K. Jang, and J. W. Nah, *Polymer(Korea)*, **33**, 137 (2009).
56. J. Z. Bei, J. M. Li, Z. F. Wang, J. C. Le, and S. G. Wang, *Poly. Adv. Tech.*, **8**, 693 (1997).