

Quercetin과 Rutin의 피부 흡수 증진을 위한 셀룰로오스 다공성 하이드로젤 제형 개발

이민혜 · 김수지 · 박수남[†]

서울과학기술대학교 에너지바이오대학 정밀화학과, 화장품융합기술연구소
(2012년 11월 22일 접수, 2013년 1월 7일 수정, 2013년 1월 22일 채택)

Development of Porous Cellulose-Hydrogel System for Enhanced Transdermal Delivery of Quercetin and Rutin

Min Hye Lee, Su Ji Kim, and Soo Nam Park[†]

Department of Fine Chemistry, Cosmetic R&D Center, College of Energy and Biotechnology,
Soeul National University of Science and Technology, 232 Gongneung-ro, Nowon-gu, Seoul 137-743, Korea
(Received November 22, 2012; Revised January 7, 2013; Accepted January 22, 2013)

초록: 본 연구에서는 항산화제인 quercetin과 그 배당체인 rutin의 피부 흡수를 증진시키기 위한 전달체로 다공성 셀룰로오스 하이드로젤을 제조하였고 그 특성을 연구하였다. Quercetin과 rutin을 위한 최적의 하이드로젤을 가교제인 12% epichlorohydrin(ECH)과 2% 셀룰로오스를 반응용액으로 하여 만들었다. 플라보노이드 함유 하이드로젤의 방출 실험에서, quercetin의 방출은 10~500 μ M 농도에서 확산 속도에 영향을 받았으나, rutin의 경우는 비교적 낮은 농도 (10~50 μ M)에서 하이드로젤의 침식에 의한 방출이 지배적이었다. 플라보노이드에 대한 하이드로젤의 포집효율과 방출량은 quercetin보다도 rutin에서 모두 크게 나타났다. 하지만, Franz diffusion cell을 이용한 피부 투과 실험에서 quercetin이 rutin보다 1.2배나 더 큰 피부 투과능을 나타냈다. 플라보노이드 함유 하이드로젤은 대조군인 20% 1,3-butylene glycol phosphate buffer에서보다도 더 큰 경피 투과능을 나타내었다. 이 결과들은 난용성 항산화제인 플라보노이드의 피부 흡수 증진 전달체로서 셀룰로오스 다공성 하이드로젤이 이용 가능성이 있음을 시사한다.

Abstract: In this study, the porous cellulose hydrogel as a carrier to enhance the skin delivery of quercetin and its glycoside, rutin known as flavonoid antioxidants was prepared and its properties were investigated. The optimum cellulose hydrogel for quercetin and rutin was made by the reaction of 2 wt% cellulose with 12% ECH. In the release test of the hydrogel containing the flavonoids, the release of quercetin was diffusion-controlled at 10~500 μ M, but rutin was released by the erosion of hydrogel system at 10~50 μ M. Both the encapsulation efficiency and release amount of rutin in hydrogel were higher than quercetin. However, in skin permeation experiment using Franz diffusion cell, quercetin showed higher skin permeation capacity than rutin. The hydrogel containing flavonoids showed remarkable transdermal permeation than the control group. These results suggest that porous cellulose hydrogel is potential drug delivery system to enhance transdermal permeation of water-insoluble flavonoid antioxidants.

Keywords: cellulose, hydrogel, quercetin, rutin, transdermal delivery.

서론

플라보노이드류는 자연계에 널리 분포되어 있는 페놀성 화합물로 과일, 채소, 견과류, 와인 및 향신료 등에 함유되어 있다. 이들 플라보노이드는 대부분 배당체 형태로 식물체에 존재하며 항산화, 항알러지, 항염, 항균, 항암 등 다양한 생리활성을 나타내는 것으로 알려져 있다.¹⁻⁵

Quercetin은 플라보놀 구조로 B-ring에 존재하는 카테콜기

(catechol group) 및 C-ring에 존재하는 케톤기 A, B, C-ring에 있는 페놀성 -OH 기가 항산화 활성을 포함하는 다양한 생리활성을 나타내는데 기여하는 것으로 알려져 있다.⁶⁻⁸ Rutin은 quercetin에 당이 2개 결합된 대표적인 quercetin 배당체로 항산화 활성뿐만 아니라 다양한 질환에 효과가 있는 것으로 보고되고 있다.⁹⁻¹¹ 하지만, quercetin 및 rutin은 물에 대한 난용성으로 인해 화장품의 원료로 이용하는 데 한계가 있는 것으로 알려져 있다. 최근에 이들 플라보노이드의 난용성을 해결하고 보다 실질적으로 피부에서 그 효과를 나타내기 위한 다양한 제형 연구들이 진행되고 있고 그 성과가 일부 보고되고 있다.¹²⁻¹⁶ 하지만, 사용 목적에 따른 제제화 연구는 아직도

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

미흡한 실정이고 더 많은 연구가 요구되고 있다.

하이드로젤은 물에 녹지 않고 팽윤되어 구조 내에 많은 양의 수분을 함유할 수 있는 3차원 망상 구조를 갖는 친수성 고분자 물질이다.¹⁷ 하이드로젤은 수용액에서 팽윤된 이후 열역학적으로 안정하고 또한 특유의 친수성과 유연성으로 인해 의학·약학 분야에 다양하게 이용되고 있다. 예를 들면, 소프트 렌즈, 바이오센서, 인공근육 등의 생체 재료 및 약물전달시스템 분야에서 하이드로젤을 이용하고 있다.^{18,19}

최근에 환경 친화적이고 생체 적합성이 큰 제품에 대한 요구가 증가하고 있다. 셀룰로오스는 이에 적합한 재료로서 그 자원 또한 풍부한 천연 고분자이다. 셀룰로오스를 기반으로 한 다공성 하이드로젤의 경우 독성이나 자극성이 없고 생분해성과 높은 팽윤력을 가지기 때문에 여러 분야에서 그 응용에 관한 관심이 증가하고 있다. 셀룰로오스 하이드로젤은 화학적으로 가교 결합된 망상 구조로 인해 안정한 구조와 효과적인 팽윤도를 가질 수 있다. 또한 수 백 μm 크기의 열린 공극 구조를 가지는 다공성 구조로 모세관 현상에 의해 흡수와 팽윤이 빠르게 일어나는 장점이 있다.¹⁷⁻²⁴ 이러한 하이드로젤은 물질을 담지할 때 간단한 혼합만으로도 가능하기 때문에 고효율의 전달시스템을 설계할 수 있고 또한 생리 활성 물질의 방출 시스템으로 사용할 수 있는 적합한 재료이다.

피부 노화는 장기간에 걸쳐서 일어나는 미세한 변화의 축적으로 사람은 노화가 진행되면서 피부 표면이 거칠어지고 칙칙함이 발생하고 점차 잔주름이 발생하며 탄력이 감소한다. 이것을 유발하는 주요한 요인 중 하나가 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)이다. 하지만, 사람의 피부는 외부 환경에 대한 보호 장벽으로써 자외선, 공해, 미생물, 물리적 손상 등으로부터 우리 몸을 보호하는 역할을 수행할 뿐만 아니라 체온 및 수분량 등을 조절하는 역할도 한다. 따라서 피부가 건강한 상태를 유지하기 위해서는 피부 장벽 기능의 항상성을 유지하는 것이 매우 중요하다. 자외선 등의 외부 자극을 지속적으로 받게 되면 피부에서는 활성산소가 생성되고 이들 활성산소는 피부에 있는 항산화 방어 시스템을 붕괴시킨다. 이어서 피부는 홍반, 염증, DNA 손상 및 피부암 등의 다양한 피부 질환의 위험에 직면하게 된다.²⁵ 또한 활성산소에 의해 피부 장벽 기능이 약화되면 피부는 피부에 존재하는 수분의 손실을 가져오게 되고 이어서 피부 건조와 관련된 여러 가지 질병들이 유발되게 된다.²⁶ 따라서 피부 항산화 방어 시스템을 재구축할 수 있도록 적절한 항산화제를 피부에 잘 전달할 수 있는 제형과 함께 피부 내에 수분을 일정하게 유지해 줌으로써 피부 장벽이 항상성을 유지할 수 있도록 해 줄 필요가 있다.²⁷⁻²⁹

본 연구에서는 피부의 항산화 방어 시스템을 보완할 수 있는 대표적인 항산화제로 quercetin과 rutin을 사용하였다. 이들 플라보노이드를 효과적으로 피부에 전달하기 위해서 화학적 가교 반응을 통해 셀룰로오스 하이드로젤을 제조하고 그

특성을 연구하였다.

이 연구의 목적은 난용성의 quercetin과 rutin을 효율적으로 포집하고 방출할 수 있는 시스템으로써 가장 적합한 셀룰로오스 다공성 하이드로젤을 제조하는데 있다. 따라서 제조 조건에 따른 구조적 특성을 이해하고 팽윤력, 포집률, 방출 속도 및 방출률을 비교 연구하였다. 이러한 연구를 바탕으로 하여 난용성의 활성 물질을 효과적으로 담지할 수 있는 약물 전달체로서 셀룰로오스 다공성 하이드로젤의 이용 가능성을 조사하였다.

실 험

기기 및 시약. 셀룰로오스(microcrystalline, powder), ($\pm$)-epichloro hydrin (ECH)($\geq 99.0\%$), quercetin, rutin은 Sigma (USA)에서 구입하여 사용하였다. 에탄올, 아세톤, 1,3-butylene glycol(1,3-BG) 등 각종 용매는 시판 특급 시약을 정제 없이 사용하였다. 하이드로젤 제조를 위해 교반기는 HSD 120-03P (MISUNG SCIENTIFIC Co., Ltd, Korea) 모델을 사용하였고, 원심분리기는 2236R(GYROGEN Co., Ltd, Korea) 모델을 사용하였다. UV Spectrometer는 Cary 100(Agilent, USA)을 사용하였고, HPLC는 Shimadzu(Japan) 모델을 사용하였다.

셀룰로오스 다공성 하이드로젤 제조. 셀룰로오스 파우더를 1, 2, 3%의 농도가 되도록 실온에서 9% NaOH 용액 13.45 mL에 분산시킨 후 -70°C 에서 24시간 동안 동결시켰다. 동결된 셀룰로오스 용액을 실온에서 해동시킨 다음 증류수 11.55 mL를 첨가하면서 투명해질 때까지 교반시켰다. 1, 2, 3% 셀룰로오스 용액에 ECH를 각각 4, 8, 12%의 농도가 되도록 drop-wise 방식으로 첨가하고 충분히 교반시킨 다음 80°C 에서 8시간 동안 가교 반응을 진행하였다. 반응 종료 후 하이드로젤에 남은 NaOH 용액과 형성된 염을 제거하기 위해서 증류수를 이용하여 여러 번 세척하였고, ECH를 완전히 제거하기 위해서 아세톤을 이용하여 세척하였다. 시료는 원심분리기를 이용하여 용매를 제거한 후 상온에서 진공 상태로 건조시키고 -70°C 에서 보관하였다.

제조 조건에 따른 DSC 분석. 제형의 열적 특성은 DSC-60(Shimadzu, Japan)을 이용하여 60 mL/min의 아르곤 기류 하에서 $-20\sim 150^\circ\text{C}$ 까지 $10^\circ\text{C}/\text{min}$ 의 승온 속도로 분석하였다. Aluminum pan에 시료의 양은 8 mg으로 고정하였다. DSC 분석을 통해 가교 결합 내 구성 성분의 결정성 및 구성 성분간에 존재하는 분자 내 상호작용을 확인하였다.

제조 조건에 따른 셀룰로오스 다공성 하이드로젤의 수분 흡수능(Water Uptake) 측정. 수분 흡수능은 모든 하이드로젤 제형에 대해 비교·평가하였다. 수분 흡수능의 경우 하이드로젤의 팽윤도에 의존하는데 건조된 하이드로젤 중량 대비 흡수 가능한 물의 양을 알 수 있다. 이것은 하이드로젤의 물질 포집 및 방출과 직접적인 연관이 있는 수치이기 때문에

원하는 물성을 찾기 위한 기준점이 된다. 이후 물질 포집 및 방출 실험에서 사용한 용액과 동일한 20% 1,3-butylene glycol 인산완충용액(pH 7.4; 20% 1,3-BG/phosphate buffer(PB))을 사용하였고, 건조된 하이드로젤 0.1 g을 용액 5 mL에 넣고 24 시간 동안 팽윤시켰다. 시료는 표면에 남아있는 용액을 주기적으로 제거한 다음 무게를 측정하였다. 셀룰로오스의 수분 흡수능은 다음 식 (1)로 계산하였다:

$$WU = \frac{H_s - H_d}{H_d} \times 100 (\%) \quad (1)$$

WU: 수분흡수능(%)

H_s : 팽윤된 하이드로젤 중량(g)

H_d : 건조된 하이드로젤 중량(g)

그리고 power law 식 (2)를³⁰ 이용하여 셀룰로오스 격자 구조 내로의 용매 확산 속도 및 팽윤 메커니즘에 대해 알아보았다.

$$\frac{W_t}{W_{eq}} = k_{sw} \times t^{n_{sw}} \quad (2)$$

W_t : 시간 t 동안 시스템 내로 흡수된 용액의 양

W_{eq} : 평형상태에서 시스템 내로 흡수된 용액의 양

k_{sw} : 젤 구조 관련 팽윤 상수

n_{sw} : 침투제의 이동 모드 관련 팽윤 지수

k_{sw} 값을 이용하여 제조 조건별 셀룰로오스-다공성 하이드로젤 시스템 내로 용액이 확산되는 속도를 결정하고 n_{sw} 값을 통해 팽윤이 일어나는 메커니즘에 대해 알아보았다.²⁴

셀룰로오스-다공성 하이드로젤 내 물질 포집 효율 측정. 포집 효율을 측정하기 위해 20% 1,3-BG/PB 중에 각각 10, 50, 100, 500 μ M의 quercetin과 rutin의 용액 5 mL에 건조된 하이드로젤 0.1 g을 넣어 24시간 동안 팽윤시켰다. 농도별로 팽윤시킨 하이드로젤은 실온에서 진공상태로 건조시켰다. 포집된 quercetin과 rutin의 농도를 측정하기 위하여 남아있는 용액의 UV 스펙트럼을 측정하였다. Quercetin과 rutin 농도에 따른 검량선(Figure 1)을 작성하여 남아있는 용액의 농도를 결정하였다.

셀룰로오스-다공성 하이드로젤 격자 구조에 포집된 quercetin과 rutin의 농도는 식 (3)을 이용하여 계산하였다:

$$Id_1 = \frac{v_1 c_1 - v_2 c_2}{v_1 c_1} \times 100 (\%) \quad (3)$$

Id_1 : 포집 효율(Incorporating degree)

v_1 : 포집 전 용액의 부피(mL)

c_1 : 물질의 초기 농도(μ g/mL)

v_2 : 포집 후 남아있는 용액의 부피(mL)

c_2 : 포집 후 남아있는 물질의 농도(μ g/mL)

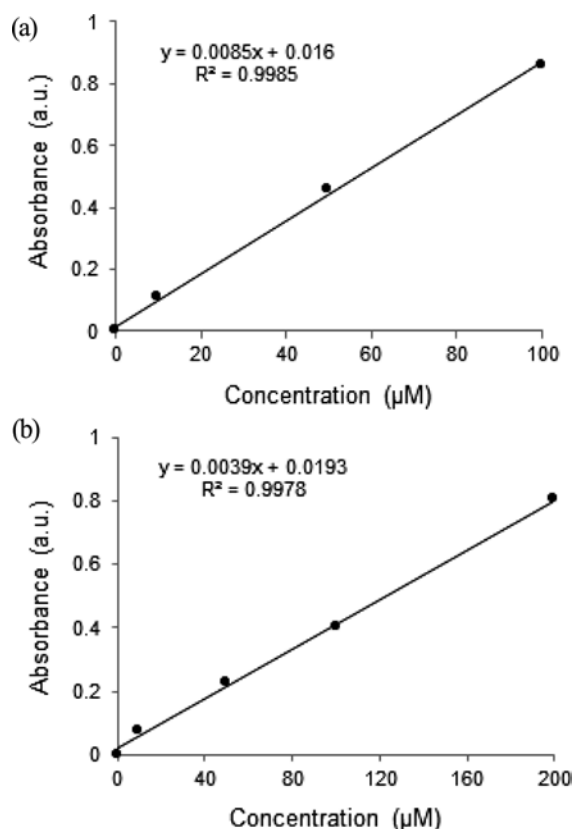


Figure 1. Calibration curve of quercetin and rutin. (a) quercetin ($\lambda_{max} = 370$ nm), equation of line: $y = 0.0085x + 0.016$ ($R^2 = 0.9985$); (b) rutin ($\lambda_{max} = 355$ nm), equation of line: $y = 0.0039x + 0.0193$ ($R^2 = 0.9978$).

셀룰로오스 다공성 하이드로젤로부터 물질 방출 연구. *In vitro* 상에서의 방출 연구는 용출액으로 물질 포집 효율 측정 시 사용하였던 20% 1,3-BG/PB를 사용하였다. 방출 실험을 하는 동안 체온과 동일한 37 ± 0.2 $^{\circ}$ C를 유지하였고 미리 정해 놓은 시간 간격마다 용출액 1 mL를 취한 다음 새로운 용액 1 mL를 다시 채워 넣었다. 시간마다 quercetin과 rutin의 λ_{max} 인 370, 355 nm에서 각각 흡광도를 측정하였다. Quercetin과 rutin에 대한 검량선(Figure 1)으로 농도를 결정하였으며 각 단계에서 희석 배수를 고려하여 계산하였다. 물질의 방출 특성은 시간에 대한 방출 누적 비율의 그래프를 통해 나타내었다.

그리고 Korsmeyer-Peppas 모델을 이용한 다음 식으로 해당 시스템이 활성 물질을 방출할 때의 확산되는 메커니즘을 역학적으로 분석하였다.³¹⁻³³

$$F = \left(\frac{M_t}{M} \right) = k_r \times t^{n_r} \quad (5)$$

F : 활성 성분이 용출된 분율

M_t : 시간 t 동안 용출된 활성 성분의 양

M : 전체 활성 성분의 양

k_r : 시스템 고유의 속도 상수

n_r : 방출 메커니즘과 관련된 확산 지수

팽윤 과정과 마찬가지로 k_r 값을 이용하여 시스템으로부터의 확산 속도를 확인하였고, n_r 값을 이용하여 어떠한 메커니즘으로 활성 성분이 용출되는지 검토하였다.

Quercetin과 Rutin을 함유하는 셀룰로오스 다공성 하이드로젤의 피부 투과 실험. Quercetin과 rutin 500 μ M을 각각 24시간 포집시킨 셀룰로오스 다공성 하이드로젤을 9 mm Franz diffusion cell(receptor volume 5 mL)과 V6A Stirrer 모델(PermeGear, USA)을 이용하여 피부 투과 실험을 하였다. 대조군으로는 증류수와 20% 1,3-BG/PB에 동량의 quercetin과 rutin을 각각 녹인 시료를 사용하였다. 피부는 경추탈골로 치사시킨 8주령 암컷의 ICR hairy mouse의 등에서 적출하여 사용하였다. 피부 적출 전 시중에 판매하는 제모제를 이용하여 깨끗하게 제모한 다음 피부를 적출하였고, 진피를 제거하지 않고 피하지방만 제거한 후 사용하였다. 피부(1.5×1.5 cm²)를 각질층 부분이 위를 향하도록 하여 donor와 receptor phase 사이에 고정시켰다. Receptor phase는 물질 용해도 실험을 통해 2% FANCOL® HCO-40(수소 첨가된 castor oil에 40 몰 ethylene oxide 부가 생성물의 20% EtOH 용액)을 사용하였다. 항온수조를 이용하여 cell 온도를 37.0±0.2 °C로 유지하였고 receptor phase 5 mL를 receptor에 투여한 뒤 교반속도는 150 rpm으로 24시간 동안 일정하게 교반시켰다. 각 시료 0.3 mL를 donor의 경표피 표면(0.6362 cm²)에 가한 후 2, 4, 8, 12, 24시간 간격(총 5회)으로 매회 0.2 mL의 receptor phase를 sampling port를 통해 채취하였고, 즉시 동량의 receptor phase 용액으로 보충하였다. 이 때 채취한 시료는 HPLC를 이용하여 quercetin과 rutin을 정량하였다. 피부에 남아있는 quercetin과 rutin의 양을 측정하기 위해 투과되지 않은 시료를 phosphate buffer saline(pH 7.4) (PBS)으로 세척하였다. 세척 후 각질층에 tape stripping을 4회 실시하고, tape와 남은 피부를 세척하여 각각 EtOH에 넣고 sonicator(Hwashin technology Co., Korea)를 이용하여 quercetin과 rutin을 추출하였다. 추출한 quercetin과 rutin은 HPLC를 이용하여 정량하였다.

결과 및 토론

제조 조건에 따른 DSC 분석. DSC는 하이드로젤 격자 구조 내에 존재하는 분자 내 상호작용을 증명하는 데 많이 쓰이는 분석기법이다. Figure 2는 셀룰로오스 파우더와, 셀룰로오스에 대한 가교제의 비율에 따른 셀룰로오스-다공성 하이드로젤의 DSC thermogram을 나타낸 것이다.

Figure 2에서와 같이 가교가 되어있지 않은 셀룰로오스의 T_{max} 값은 61.59 °C로 다른 피크들에 비해 상대적으로 넓은 흡

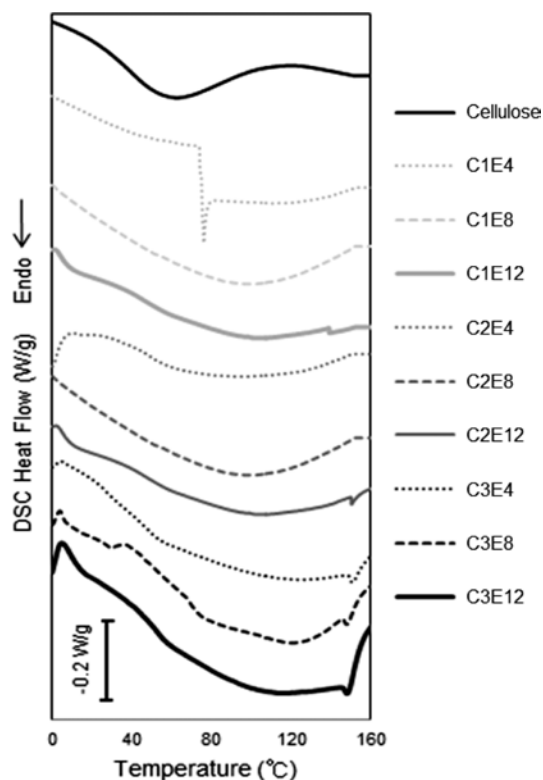


Figure 2. DSC thermogram of cellulose powder and cellulose-porous hydrogels according to preparation conditions. C1, 1% cellulose; C2, 2% cellulose; C3, 3% cellulose; E4, 4% epichlorohydrin (ECH); E8, 8% ECH; E12, 12% ECH.

Table 1. Maximum Temperature of Endothermic Peak (DSC) for Cellulose-Porous Hydrogels according to Preparation Conditions

Sample conditions		T_{max} (°C)
Cellulose conc. (wt/v%)	ECH conc. (wt/v%)	
1	4	75.28
	8	92.4
	12	102.75
2	4	92.81
	8	96.61
	12	105.35
3	4	111.17
	8	112.58
	12	110.26

열 피크를 보이는데 이는 가교되지 않은 셀룰로오스 분자내 상호작용을 반영한 결과이다. 셀룰로오스 다공성 하이드로젤의 경우에도 피크의 경향성은 같았지만 화학적 가교 결합을 유도하는 ECH의 농도 증가와 함께 가교도가 증가하고 T_{max}

값이 온도가 높은 쪽으로 이동하는 경향을 보였다. 셀룰로오스 1%, ECH 4%의 경우는 특이한 형태의 흡열 피크를 나타냈는데 이것은 셀룰로오스의 농도가 낮고 가교제로 사용된 ECH의 양이 작아 다른 조건에 비해 가교도가 낮아서 생긴 결과로 보인다. T_{max} 값은 셀룰로오스의 농도에 비례하여 증가하였고, 1~2% 셀룰로오스에서는 ECH 양에 비례하여 증가하였고, 하이드로젤 내 분자간 상호작용이 강해졌음을 알 수 있으나, 셀룰로오스 3%의 경우는 ECH 양에 따른 차이가 거의 없는 것으로 보아 이 경우 가교결합을 형성하는데 ECH가 큰 영향을 미치지 않은 것으로 추정된다(Table 1).

제조 조건에 따른 셀룰로오스-다공성 하이드로젤의 수분 흡수능 비교. 셀룰로오스의 농도와 가교제로 사용된 ECH의 농도비율은 하이드로젤의 팽윤도 및 수분 흡수능에 중요한 요소로 작용한다. 본 연구에서는 생리 활성 물질이 포함되어 있는 용액을 단시간 내에 많은 양을 팽윤시킬 수 있는 조건을 찾기 위해 각 제조 조건에 따른 셀룰로오스-다공성 하이드로젤을 이용하여 수분 흡수능을 측정하였다(Figure 3).

셀룰로오스 다공성 하이드로젤의 경우, 하이드로젤 내 많은 기공 사이로 침투한 물은 셀룰로오스 및 ECH에 의한 가교 사슬 중에 존재하는 -OH 기와 수소 결합을 형성함으로써 물을 흡수하게 된다. Figure 3은 셀룰로오스와 ECH로 농도별 제조된 하이드로젤을 24시간 동안 팽윤시켰을 때의 수분

흡수능을 나타낸다. 4% ECH를 첨가시킨 경우는 셀룰로오스 농도 1, 2 및 3% 모두에서 수분 흡수능이 $131.02 \pm 11.75\%$ 범위로 낮은 흡수능을 나타냈다. 이는 셀룰로오스의 농도와 ECH의 % 농도 비율이 1:1.33, 1:2.66, 1:4로 셀룰로오스 내에서 ECH 가교 구조를 형성시키는데 충분한 농도가 되지 못함을 반영하고 있다. Figure 3에서 수분 흡수능이 큰 하이드로젤의 경우는 셀룰로오스 2%(ECH 12%), 셀룰로오스 1%(ECH 8%) 및 셀룰로오스 1%(ECH 12%)가 있으며 이들의 셀룰로오스 대 ECH 농도 비율은 각각 1:6, 1:8 및 1:12로 ECH의 농도 비율이 큼을 알 수 있고 따라서 가교 결합이 잘 이루어져 높은 수분 흡수능을 나타낸 것으로 보인다. 셀룰로오스 함량이 3%이고 ECH 농도가 8과 12%인 경우도 셀룰로오스 대 ECH 농도 비율이 각각 1:2.66 및 1:4로 위에서 언급한 바와 같이 ECH 농도 비율이 작고 따라서 셀룰로오스 내 가교 결합이 충분치 않아 수분 흡수능이 중간 정도인 $284 \pm 8.06\%$ 를 나타내고 있다. Figure 3에서 알 수 있듯이 셀룰로오스가 3%인 경우, 4~12%의 ECH 농도로는 셀룰로오스 내에 충분한 가교결합을 형성시키기 힘들고 따라서 가교도가 낮기 때문에 셀룰로오스 1, 2%에 비해 수분 흡수능이 낮은 값을 나타냄을 알 수 있다.

셀룰로오스 1%, ECH 8%로 제조된 하이드로젤은 초기 수분 흡수 속도가 빠른 결과를 보였지만 하이드로젤 자체의 강도가 비교적 낮고 쉽게 분해되는 특성과 낮은 합성 수율로 인해 본 연구의 제형으로 선택하지는 않았다(data not shown). 비교적 안정하고 강도가 있으면서 합성 수율이 높은 2% 셀룰로오스와 12% ECH 조건으로 만들어진 다공성 하이드로젤의 수분 흡수능이 가장 우수한 것으로 나타났다(684.57%). 따라서 이 조건으로 만들어진 셀룰로오스 다공성 하이드로젤을 활성물질을 담지한 피부 흡수 증진 시스템의 제형으로 하여 실험을 진행하였다.

식 (2)로 계산한 제조 조건에 따른 팽윤 메카니즘은 Table 2에 각각 나타내었고, 2% 셀룰로오스(8% ECH) 조건을 제외한 모든 시스템에서 상관계수의 값이 0.9 이상으로 Korsmeyer-Peppas model에 적합하였다. 확산 지수 n_{sw} 에 따르면 모두 이례적인 팽윤 메카니즘을 보이며 Figure 3에서와 같은 경향성을 가지는 속도 상수 k_{sw} 를 확인할 수 있다.

셀룰로오스 다공성 하이드로젤 내 물질 포집 효율 측정. 하이드로젤의 물질 포집 효율은 팽윤도에 의존적이다. 따라서 제조 조건에 따른 셀룰로오스 다공성 하이드로젤의 수분 흡수능 측정 시 가장 좋은 결과를 보인 2% 셀룰로오스(12% ECH) 조건으로 물질의 농도별 포집 효율을 측정하였다. 팽윤 과정 동안 quercetin과 rutin은 용액과 함께 하이드로젤의 기공 내로 침투 및 흡착을 통해 포집이 된다. 셀룰로오스의 격자 구조 내로 포집된 quercetin과 rutin은 분광학적 측정법(Id)을 이용하여 측정하였다(Table 3).

분광학적 측정법은 D. Cioilacu 등의 방법을²⁴ 변형하여 사

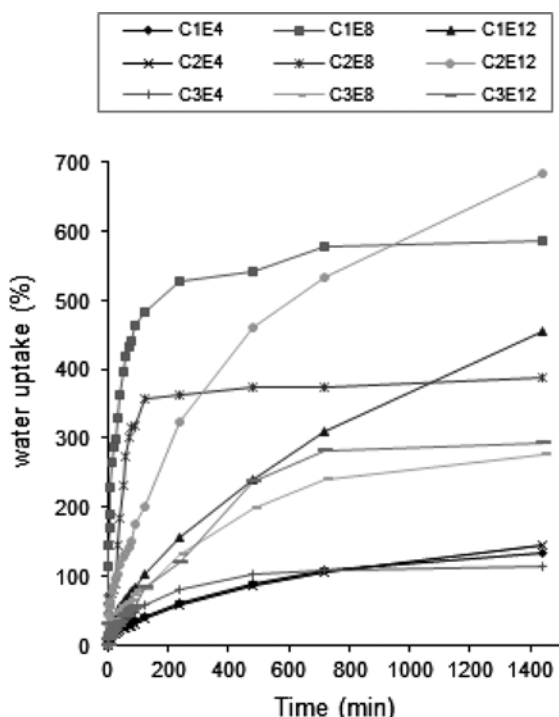


Figure 3. Water uptake degrees of various cellulose hydrogels as a function of time and composition. C1, 1% cellulose; C2, 2% cellulose; C3, 3% cellulose; E4, 4% epichlorohydrin (ECH); E8, 8% ECH; E12, 12% ECH.

Table 2. Maximum Water Uptake Degree and Swelling Kinetic Parameters with Correlation Coefficient of Cellulose-Porous Hydrogels according to Preparation Conditions

Sample conditions		$S_{\max}^a$ (%)	Korsmeyer-Peppas model			Swelling mechanism
Cellulose conc. (wt/v%)	ECH volumes (mL)		K_{sw}^b	n_{sw}^c	R^2	
1	1	133.49	0.48	0.46	1.00	Quasi-Fickian
	2	585.02	3.58	0.26	0.90	Quasi-Fickian
	3	455.52	0.25	0.53	0.99	Anomalous
2	1	144.01	0.31	0.51	1.00	Anomalous
	2	388.35	1.81	0.40	0.83	Quasi-Fickian
	3	684.57	0.44	0.46	0.99	Quasi-Fickian
3	1	115.56	0.67	0.46	0.98	Quasi-Fickian
	2	275.61	0.50	0.44	0.99	Quasi-Fickian
	3	291.73	0.20	0.57	0.92	Anomalous

^aMaximum water uptake (swelling) degree. ^bThe swelling rate constant characteristic of the system. ^cThe power law diffusion exponent, which describes the mode of the penetrant transport mechanism. $n_t < 0.5$, Quasi-Fickian diffusion; $n_t = 0.5$, Fickian diffusion; $0.5 < n_t < 1$, Anomalous transport; $n_t = 1$, Non-Fickian Case-II transport(zero-order release); $n_t > 1$, Non-Fickian special case-II transport.

Table 3. Parameters for the Incorporation of Quercetin (Q) and Rutin (R) in 2% Cellulose-Porous Hydrogel (12% ECH)

Sample conc. (μ M)	Incorporation degree (wt%)
	Id ^a
Q 10	37.82
Q 50	32.23
Q 100	33.52
Q 500	34.25
R 10	40.76
R 50	34.23
R 100	35.45
R 500	38.19

^aDetermined based on UV spectra.

용하였고 quercetin 및 rutin 용액의 초기 부피와 농도를 UV spectrophotometer를 이용하여 측정한 다음 24시간 포집 후 하이드로젤에 포집되고 남은 용액의 부피와 농도를 측정하였다. 식 (3)을 이용하여 계산한 결과 quercetin 10 μ M에서 가장 높은 포집 효율이 나타난 것은 용해도 면에서 용액 내 물질이 가장 고르게 분산되어 있기 때문으로 예상된다. Rutin 10 μ M에서도 같은 경향성이 나타났으며, 물질의 농도가 증가하면서 포집 효율이 조금 증가하는 경향이 나타났으나 큰 폭으로 증가하지는 않았다. 1 mM의 농도에서도 실험을 하였으나 용해도가 적합하지 않아 포집 효율이 현저히 떨어지는 결과를 얻었다(data not shown). Rutin의 경우 quercetin보다 포집 효율이 조금 증가한 결과를 얻을 수 있었는데 이는 극성도의 차이로 인해 수소 결합을 통한 rutin의 기공 내 흡착

가능성이 좀 더 높기 때문인 것으로 보인다.

셀룰로오스 다공성 하이드로젤에 포집된 Quercetin과 Rutin의 방출 연구. 셀룰로오스 격자 구조 내 포집된 quercetin과 rutin의 방출 거동에 대해 알아보기 위해 물질 포집 시와 같은 조건에서 방출 실험을 진행하였다. 시간별로 방출된 quercetin과 rutin을 UV spectrophotometer를 이용하여 흡광도를 측정하고 다음 검량선을 이용하여 정량한 결과를 다음 그래프로 나타내었다(Figure 4).

초기에 물질의 용출이 많이 진행되는 특성에 따라 흡광도는 10~120분까지는 10분 간격으로, 120~240분까지는 30분 간격으로 측정하였고 8, 12, 24시간 경과 후 측정하였다. Quercetin과 rutin의 농도별 방출 거동을 누적량으로 나타내었을 때 물질간 경향성의 차이는 거의 없었고, rutin의 방출량이 quercetin보다 좀 크게 나타난 이유는 동일 몰 농도 대비 분자량의 차이에 따른 결과를 반영한 것으로 볼 수 있다(Figure 4(a), (b)). 하이드로젤에 포집된 물질의 양이 농도에 비례하기 때문에 방출량이 500 μ M에서 현저히 높은 것으로 보이나 포집량 대비 방출량의 비율은 농도간 차이가 크지 않았고 rutin의 경우, 농도에 비례하여 방출량이 약간 증가하는 경향을 나타냈다(Figure 4(c)).

자세한 방출 거동은 식 (5)를 통해 나타낸 Table 4에서 확인할 수 있다. Korsmeyer-Peppas model로 팽윤성 매트릭스로부터 약물이 어떤 메커니즘으로 용출되는지 알 수 있다. 확산 지수 n_t 에 따르면 $0.5 < n_t < 1$ 범위에서는 물질의 확산과 젤의 침식이 동시에 작용하여 물질을 방출하는데 0.5에 가까울수록 물질의 확산이 좀 더 우세하고 1에 가까울수록 젤의 침식으로 인한 방출이 좀 더 우세하다고 말할 수 있다. Quercetin의 경우 모든 농도에서 확산에 의한 약물 방출이 좀

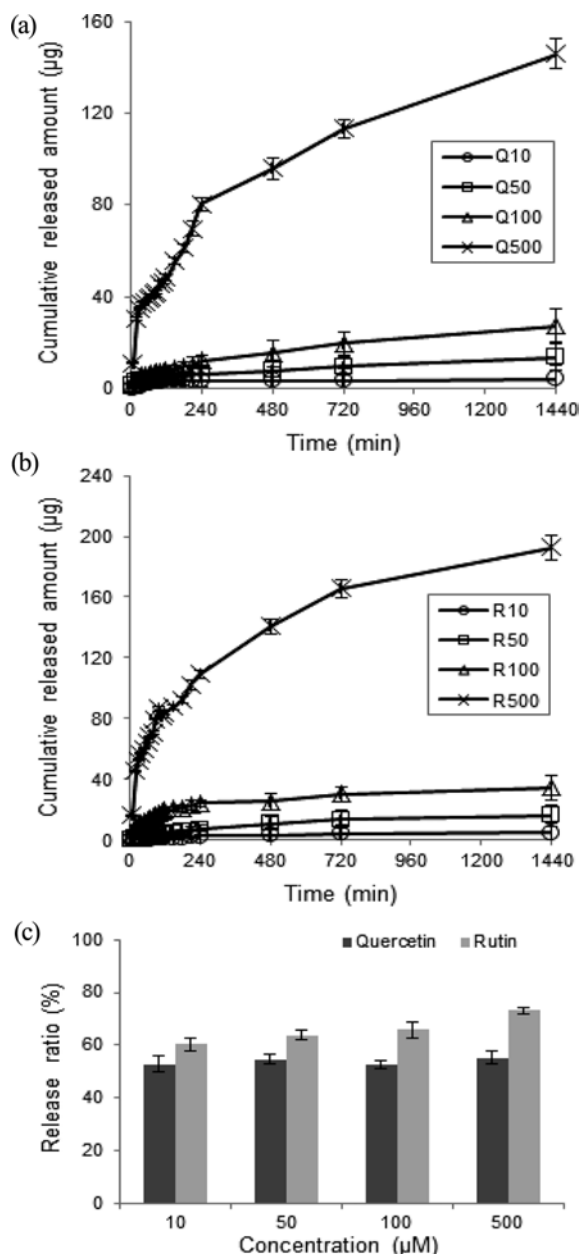


Figure 4. Released amount of quercetin (a); rutin (b) from cellulose-porous hydrogels as a function of time; release ratio (c) of total quercetin and rutin incorporated into cellulose-porous hydrogels.

더 우세한 결과를 보였고 10 µM을 제외하고 모두 이 모델에 적합함을 알 수 있다. 확산 속도의 경우 농도간 큰 차이는 없었다. Rutin의 경우 quercetin과 조금 다른 경향을 보였는데 저농도에서는 하이드로젤의 침식에 따른 약물 방출이 우세하게 나타났고 고농도에서는 물질의 확산에 의한 약물 방출이 우세하게 나타났다. 이러한 결과는 확산 속도 상수에서도 확인할 수 있다.

Table 4에서와 같이, 농도별 활성물질의 방출 파라미터들을

Table 4. *In Vitro* Release Kinetic Parameters with Correlation Coefficient for Cellulose-Porous Hydrogels Containing Quercetin (Q) and Rutin (R)

Sample conc. (µM)	Korsmeyer-Peppas model			Drug release mechanism
	k_r^a	n_r^b	R^2	
Q 10	0.0261	0.51	0.66	Anomalous
Q 50	0.0272	0.41	0.90	Quasi-Fickian
Q 100	0.0146	0.51	0.95	Anomalous
Q 500	0.0231	0.45	0.93	Quasi-Fickian
R 10	0.0001	1.42	0.85	Special case-II
R 50	0.0012	0.96	0.94	Anomalous
R 100	0.0456	0.41	0.86	Quasi-Fickian
R 500	0.0403	0.42	0.90	Quasi-Fickian

^aThe rate constant related to the properties of the drug delivery system.

^bThe diffusional exponent related to the drug transport mechanism. $n_r < 0.5$, Quasi-Fickian diffusion; $n_r = 0.5$, Fickian diffusion; $0.5 < n_r < 1$, Anomalous transport; $n_r = 1$, Non-Fickian Case-II transport (zero-order release); $n_r > 1$, Non-Fickian special case-II transport.

확인함으로써 활성 물질별로 적절한 농도를 선택할 수 있을 것으로 판단된다. 선정된 농도의 활성물질을 함유한 셀룰로오스-다공성 하이드로젤 시스템을 피부에 적용했을 때 활성 물질의 피부 전달이 보다 용이하게 이루어질 수 있을 것으로 보인다.

Quercetin과 Rutin을 함유하는 셀룰로오스 다공성 하이드로젤의 피부 흡수 증진 효과. 본 연구에서는 난용성이고 피부 흡수에 한계가 있는 천연 항산화제인 quercetin 및 rutin의 피부 흡수 증진을 위한 생체친화성의 셀룰로오스 다공성 하이드로젤을 개발하였다. 이 하이드로젤 시스템은 구조 내 많은 기공으로 인해 단시간에 팽윤하면서 손쉽게 많은 물질을 포집할 수 있는 특성을 가지고 있다. 이 시스템을 이용하여 실제 피부에서 quercetin 및 rutin의 흡수 증진 효과를 나타낼 수 있는지 알아보기 위해서 Franz diffusion cell로 피부 투과 실험을 진행하였다. 대조군으로는 화장품에서 보습제로도 사용되고 또한 천연 원료의 용매로서도 사용되는 1,3-BG를 하이드로젤 시스템의 대조군으로 사용하였다. Quercetin과 rutin의 시간 경과에 따른 피부 누적 투과량 및 총 침투량을 Figure 5에 나타내었다.

Quercetin의 조건별 피부 24시간 누적 투과량은 hydrogel (27.94 µg/cm²) > 20% BG/PB(3.57 µg/cm²) > PB(2.37 µg/cm²) 순으로 나타났고(Figure 5(a)), 24시간 후 총 침투량은 적하량 대비 hydrogel(31.77%) > 20% BG/PB(5.14%) > PB(2.48%) 순으로 나타났고(Figure 5(c)). Rutin의 조건별 피부 누적 투과량은 hydrogel(21.07 µg/cm²) > 20% BG/PB(4.27 µg/cm²) > PB(1.76 µg/cm²) 순으로 나타났고(Figure 5(b)), 총 침투량은 적하량 대비 hydrogel(26.35%) > 20% BG/PB(4.48%) >

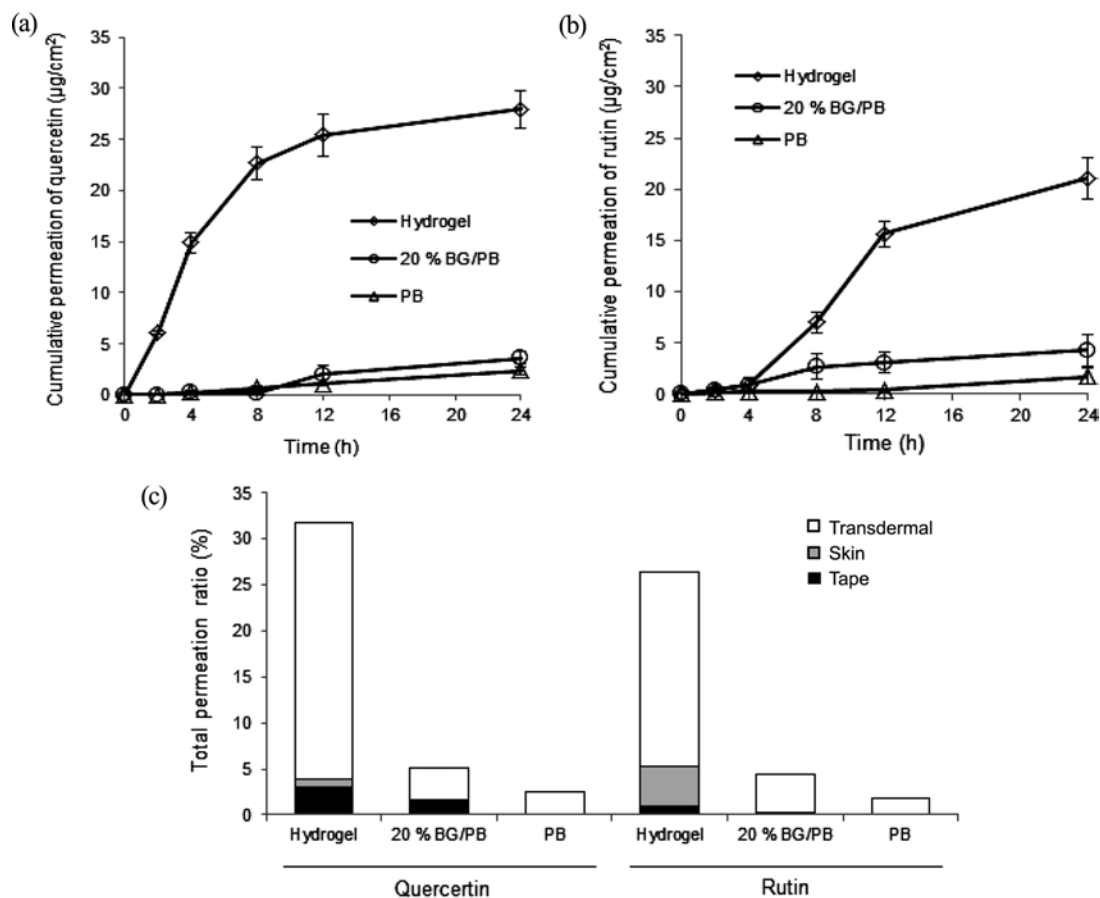


Figure 5. Permeation profiles of quercetin and rutin through ICR mice skin from hydrogel, 20 % BG/PB and PB systems: (a) cumulative permeation of quercetin; (b) cumulative permeation of rutin; (c) total permeation ratio during 24 h.

Table 5. Kinetic Parameters of Skin Penetration with Correlation Coefficient for Cellulose-Porous Hydrogels Containing Quercetin and Rutin

Sample	Korsmeyer-Peppas model			Drug release mechanism
	k_r^a	n_r^b	R^2	
Quercetin	0.0525	0.60	0.86	Anomalous
Rutin	0.0026	1.74	0.94	Special Case-II

^aThe rate constant related to the properties of the drug delivery system.

^bThe diffusional exponent related to the drug transport mechanism. $n_r < 0.5$, Quasi-Fickian diffusion; $n_r = 0.5$, Fickian diffusion; $0.5 < n_r < 1$, Anomalous transport; $n_r = 1$, Non-Fickian Case-II transport (zero-order release); $n_r > 1$, Non-Fickian special case-II transport.

PB(1.89%) 순으로 나타났다. *In vitro* 방출 효과 측정 결과와 반대로 피부 침투는 quercetin이 rutin보다 좀 더 효율적인 것으로 나타났다. Rutin의 경우는 배당체이고 그러므로 하이드로젤 시스템에서 quercetin보다도 물에 더 수화되어 있는 상태이기 때문에 피부 지질 사이를 침투하기가 좀 더 어려울 것으로 예상된다. 이는 확산 속도 및 확산 지수를 통해서도 확인할 수 있다(Table 5). 하지만, 대조군에 비해서는 많은 양

의 quercetin 및 rutin을 피부 투과시킨 것으로 보아 본 시스템은 어느 정도의 난용성 물질도 효과적으로 피부에 전달할 수 있을 것으로 보인다. 일반적으로 quercetin과 rutin은 피부에 도포했을 때 확산을 통해서 그 효능을 나타내기 위한 농도에 도달하기가 어렵지만 셀룰로오스 다공성 하이드로젤의 작용으로 피부가 수화되면 각질층의 장벽 기능이 일시적으로 교란되어 활성물질을 좀 더 잘 흡수시킬 수 있게 된다.

결론

본 연구에서는 난용성의 quercetin과 rutin을 효율적으로 포집하여 피부에 효과적으로 전달할 수 있는 셀룰로오스-다공성 하이드로젤 시스템을 설계하여 제조하고 그 물리화학적 특성을 평가하였다. 최적의 셀룰로오스 다공성 하이드로젤 제조를 위한 셀룰로오스 및 ECH 농도는 각각 2와 12%이었다. Quercetin과 rutin을 셀룰로오스 다공성 하이드로젤에 포집시켰을 때 농도별 포집률에는 큰 차이가 없었으나 quercetin 보다 rutin의 경우가 좀 더 큰 포집률을 나타내었다. *In vitro* 에서 물질 방출 거동을 관찰한 결과 quercetin은 모든 농도에

서 물질의 확산에 의한 방출이 우세하였고, rutin의 경우는 낮은 농도에서는 하이드로젤의 침식에 의한 방출이, 높은 농도에서는 물질의 확산에 의한 방출이 우세한 결과를 나타냈다. 피부 투과 실험에서, quercetin의 피부 누적 투과량(24 h)은 hydrogel($27.94 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) > 20% BG/PB($3.57 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) > PB($2.37 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) 순으로 나타났고, 총 침투량은 적하량 대비 hydrogel(31.77%) > 20% BG/PB (5.14%) > PB (2.48%) 순으로 나타났다. Rutin의 피부 누적 투과량은 hydrogel($21.07 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) > 20% BG/PB($4.27 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) > PB ($1.76 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) 순으로, 총 침투량은 적하량 대비 hydrogel(26.35%) > 20% BG/PB (4.48%) > PB(1.89%) 순으로 나타났다. 본 셀룰로오스 다공성 하이드로젤 시스템은 단시간 내에 많은 양의 물질은 손쉽게 포집할 수 있기 때문에 활용도 면에서 우수하고 건조와 팽윤이 용이한 특징으로 인해 보관이 쉬우며 피부에 바로 적용이 가능하다는 점에서 난용성의 활성 물질을 효과적으로 담지할 수 있는 약물 전달체로서 셀룰로오스 다공성 하이드로젤의 이용 가능성이 충분함을 시사한다.

감사의 글: 본 연구는 보건복지부 보건의료연구개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것임(과제고유번호: A103017).

참 고 문 헌

1. J. Robak and R. J. Cryglewski, *Pol. J. Pharmacol.*, **48**, 555 (1996).
2. I. Erlund, *Nutr. Res.*, **24**, 851 (2004).
3. Y. Yamamoto and R. B. Gaynor, *J. Clin. Invest.*, **107**, 135 (2001).
4. T. P. T. Cushnie and A. J. Lamb, *Int. J. Antimicrob. Agents*, **26**, 343 (2005).
5. R. R. de Sousa, K. C. Queiroz, A. C. Souza, S. A. Gurgueira, A. C. Augusto, M. A. Miranda, M. P. Peppelenbosch, C. V. Ferreira, and H. Aoyama, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, **22**, 439 (2007).
6. C. F. Skibola and M. T. Smith, *Free Radix, Biol. Med.*, **28**, 375 (2000).
7. C. A. Rice-Evans, N. J. Miller, and G. Paganga, *Trends Plant Sci.*, **2**, 152 (1997).
8. I. Morel, G. Lescoat, P. Cogrel, O. Sergeant, N. Padeloup, P. Brissot, P. Cillard, and J. Cillard, *Biochem. Pharmacol.*, **45**, 13 (1993).
9. M. F. A. Bakar, M. Mohgamed, A. Rahmat, and J. Fry, *Food Chem.*, **113**, 479 (2009).
10. J. Yang, J. Guo, and J. Tuan, *LWT-Food Science and Technology*, **41**, 1060 (2008).
11. C. Wangner, R. Fachineto, C. L. Morel, C. W. Nogueira, and J. B. T. Rocha, *Brain Res.*, **1107**, 192 (2006).
12. A. Saija A. Tomaino, D. Trombetta, M. Giacchi, A. D. Pasquate, and F. Bonine, *Int. J. Pharm.*, **175**, 85 (1998).
13. D. Paolino, G. Lucania, D. Mardente, F. Alhaique, and M. Fresta, *J. Control. Release*, **106**, 99 (2005).
14. L. Schwingel, D. Fasolo, M. Holzchuh, I. Lula, R. Sinisterra, L. Koester, H. Teixeira, and V. L. Bassani, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, **62**, 149 (2008).
15. S. N. Park, M. S. Lim, M. A. Park, S. S. Kwon, and S. B. Han, *Polymer(Korea)*, **36**, 705 (2012).
16. G. N. Lim, S. Y. Kim, M. J. Kim, and S. N. Park, *Polymer(Korea)*, **36**, 420 (2012).
17. J. Chen, S. Jo, and K. Park, *Handbook of Biodegradable Polymers*, Overseas Publishers Association, Amsterdam, p 203 (1997).
18. N. A. Peppas, P. Bures, W. Leobandung, and H. Ichikawa, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **50**, 27 (2000).
19. S. J. Park and C. H. Kim, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **4**, 471 (2007).
20. C. Chang and L. Zhang, *Carbohydr. Polym.*, **84**, 40 (2011).
21. S. J. Eichhorn, R. J. Young, and G. R. Davies, *Biomacromolecules*, **6**, 507 (2005).
22. D. Klemm, B. Heublein, H. Fink, and A. Bohn, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **44**, 3358 (2005).
23. J. Schurz, *Prog. Polym. Sci.*, **24**, 481 (1999).
24. D. Ciolacu, A. M. Oprea, N. Anghel, G. Cazacu, and M. Cazacu, *Mat. Sci. Eng. C-Mater.*, **32**, 452 (2012).
25. J. C. Fantone and P. A. Ward, *Ann. J. Path.*, **107**, 397 (1982).
26. G. F. Vile and R. M. Tyrrell, *Free Radical Biol. Med.*, **18**, 721 (1995).
27. T. F. Slater, *Biochem. J.*, **222**, 1 (1984).
28. A. Oikarinen, J. Karvonen, J. Uitto, and M. Hannuksela, *Photodermatology*, **2**, 15 (1985).
29. J. J. Threle, C. Schroeter, S. N. Hsieh, M. Podda, and L. Packer, *Curr. Probl. Dermatol.*, **29**, 26 (2001).
30. P. L. Rittger and N. A. Peppas, *J. Control. Release*, **5**, 37 (1987).
31. G. M. Khan and J. b. Zhu, *J. Control. Release*, **57**, 197 (1999).
32. J. H. Cha, J. K. Hong, S. W. Lee, J. U. Cha, W. H. Ko, H. H. Baek, and H. J. Park, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **44**, 274 (2012).
33. J. Siepmann and N. A. Peppas, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **48**, 139 (2001).