

프란츠 셀을 이용한 아세트아미노펜의 피부투과 특성 연구

권순범·이향렬*

충청북도 증평군 대학로 61 한국교통대학교 보건생명대학 식품생명학부 생명공학전공 27909

Permeation Characteristics of Acetaminophen Using Franz Diffusion Cells

Sun Beom Kwon and Hyang-Yeol Lee*

Department of Biotechnology, Korea National University of Transportation, Jeungpyeong 27909, Korea

ABSTRACT

In vitro diffusive models are an important tool to screen the penetration ability of active ingredients in various cosmetic products. We have investigated the skin permeability characteristics of acetaminophen using Franz Diffusion Cell assay as a model to test for cosmetic ingredients. The concentrations of the drug, acetaminophen, were set to 0.1, 0.2, and 0.4 mg/mL to check whether the permeability characteristics changed for each concentration. The Flux values of acetaminophen at the concentration of 0.1, 0.2, and 0.4 mg/mL were 0.97, 1.44, and 2.58 $\mu\text{g/hr/cm}^2$, respectively. The K_p values of acetaminophen at the concentration of 0.1, 0.2, and 0.4 mg/mL were 9.73, 7.18, and 6.45 $\text{cm/hr} \times 10^{-3}$, respectively. The Flux values increased in proportion to the concentration over time whereas the K_p values decreased. Based on this study, the transmission speed of acetaminophen was found to be at a moderate level as a result of substituting the transmission characteristics of acetaminophen into Mazulli's definition.

Key words : Franz Diffusion Cell, permeability characteristic, acetaminophen, K_p value, Mazulli's definition

1. 서 론

동물실험은 생명공학분야에서 반드시 필요한 실험이다. 하지만 윤리적인 문제 때문에 실험을 수행하기 위한 절차가 까다롭고 실험을 할 수 있는 연구실 또한 제한적이다. 현재 우리나라는 동물보호법에 의거하여 동물실험시설과 동물실험시행기관을 규정해놓고 있다. 또한, 실험을 하기 위해서는 동물실험계획서를 제출하여 위원회의 심의를 받고 승인이 나면 실험이 가능하다. 동물 실험을 진행하기 위해선 3R 대안법(reduction, refinement, replacement)에 의거하여 최대한 동물이 겪는 고통을 줄여야 한다. 이러한 제도적 문제는 동물보호를 위해선 필요한 제도이나, 연구의 실용성과 편의성에는 큰 제약이다. 이로 인해 동물 실험을 대체할 수 있는 많은 실험 방법이 고안되었다. 컴퓨터 시뮬레이션이나 기계모델을 이용한 완전한 대체방안, 미생물이나 식물 등을 이용하는 상대적 대체방안 등이 그 예이다. 피부투과도 실험은 기계모델

을 이용한 완전한 대체방안으로써 Franz Diffusion Cell을 이용한다. Franz Diffusion Cell은 피부투과도 실험을 위해 만들어진 실험장치이다. 제약 및 화장품 분야에선 동물실험을 대체하기 위해 Franz Diffusion Cell을 많이 이용한다(1-7).

약물은 경구투여할 경우, 체내 전반으로 퍼져 넓은 범위의 장소에서 효소와 비특이적 상호반응을 통해 전신 부작용의 위험이 증가한다. 약물을 국소 투여하게 되면 치료 범위는 국소적으로 제한되나, 전신 부작용의 위험이 크게 감소하는 이점이 있다. 국소 투여 방법엔 주사나 패치 제품, 연고 등의 방법이 있으며, 이때 피부에 붙이거나 바르는 제형을 개발할 때 Franz Diffusion Cell assay가 효과적이다(8, 9).

화장품은 많은 사람들이 이용하는 제품인 만큼 그 안전성에 대해 관심이 높다. 체내에 유독한 물질은 최소한으로 투여되어야 비교적 안전한 제품으로 인정받을 수 있다. 또한, 화장품 특성상 피부에 바르는 제품이 대부분을 차지하기 때문에 주름 개선, 미백, 보습 등의 효과를 가지는 인자가 얼마나 피부에 잘 흡수되는지도 중요한 지표로서 작용한다. 이리

* hyl@ut.ac.kr

한 내용은 화장품 개발에 Franz Diffusion Cell assay가 중요하게 작용할 수 있다는 증거이다(10-13).

본 실험에서는 시험 물질로 Acetaminophen을 사용했다. Acetaminophen은 해열진통제로 중추신경계의 체온조절 부위에 직접 작용하여 해열 작용을 나타내고, 시상과 대뇌피질의 통각에 대한 역치를 증가시켜 진통 작용을 나타낸다. 시험 물질 선정 이유는 우리 주변에서 쉽게 볼 수 있는 가장 대표적인 약물이고, 가격이 저렴하고 대량으로 구매할 수 있기 때문에 초기 실험 method를 정립할 때 쓰일 약물로 적절하다고 판단되기 때문이다(14)(Figure 1).

본 실험의 목적은 Franz Diffusion Cell assay를 이용하여 acetaminophen의 피부투과 특성에 대해 알아보고자 하는 것이다.

II. 재료 및 방법

1. 실험 재료

실험의 주재료인 acetaminophen은 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)사의 제품을 이용하였고, PBS는 Sigma-Aldrich사의 tablet 형태로 된 제품을 3차 증류수에 녹여 사용했다. Methanol과 acetonitrile은 삼전사(Seoul, Korea)의 것을 이용했다. Membrane은 Cellu Sep T4 dialysis membrane(Sequin, USA)을 이용하였고, MWCO는 12,000~14,000이다. Franz Diffusion Cell 기기는 비엔씨테크(Daejun, South Korea)에서 제공 받았으며, 분석에 사용한 HPLC는 Waters사의 e2695 모델을 사용하였다.

2. HPLC analysis

Solvent A는 3차 증류수, solvent B는 acetonitrile을 사용했다. 두 용매를 A 80 : B 20 비율의 등용리 조건으로 흘려주었으며 runtime은 10분이다. 유속은 1 mL/min의 속도로 흘려주었다. 컬럼은 phenomenex Gemini 5 μ m C18 110Å 250 \times 4.6

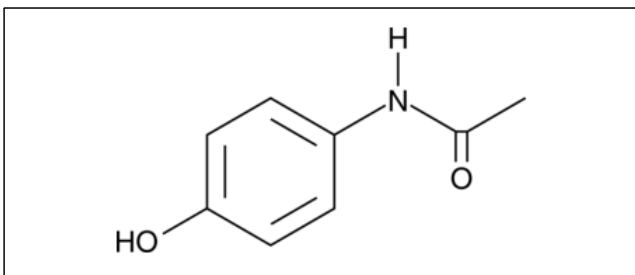


Figure 1. Chemical structure of test substance, acetaminophen.

nm의 제품을 사용하였고, 컬럼 온도는 30°C로 설정하였다. PDA detector에서 254 nm의 파장으로 검출되었다. 실험조건은 Table 1과 같다.

실험에 쓰일 acetaminophen의 정량분석을 위해 acetaminophen 0.1 mg을 PBS : MeOH(6 : 4) 용액 1 mL에 녹인 것을 stock으로 하여 2배씩 희석하여 총 8개의 sample을 만들었다. 만들어진 sample은 바로 HPLC를 통해 정량분석을 실시하였다. R²값이 0.99996으로 매우 신뢰도 있는 결과를 얻었으며, 결과는 Figure 2에 첨부하였다.

3. Franz Diffusion Cell assay

이 실험 장치는 크게 Donor chamber와 Receptor chamber로 이루어져 있으며, Donor chamber와 Receptor chamber 사이에 membrane을 넣고 clamp를 통해 고정시켜 주었다. Receptor chamber엔 receptor fluid를 채우고 magnetic stir bar를 넣어주었다. Donor chamber엔 피부투과도를 측정할 약물을 주입하였다. Receptor chamber는 Heater/circulator에 연결하였다. Heater/circulator는 물을 데우고 순환시켰다. 순환되는 물의 온도는 Heater/circulator에서 설정 가능하며, 보통 피부 온도인 32 \pm 1°C 정도로 설정하였다. 데워진 물은 receptor chamber

Table 1. HPLC analysis conditions

Mobile phase	A: water, B: acetonitrile
Flow rate	1 mL/min
Column	Phenomenex Gemini 5 μ m C18 110Å 250 \times 4.6 nm
Column temperature	30°C
Wave length	254 nm
Runtime	10 min
Method	Isocratic 80%(A) : 20%(B)

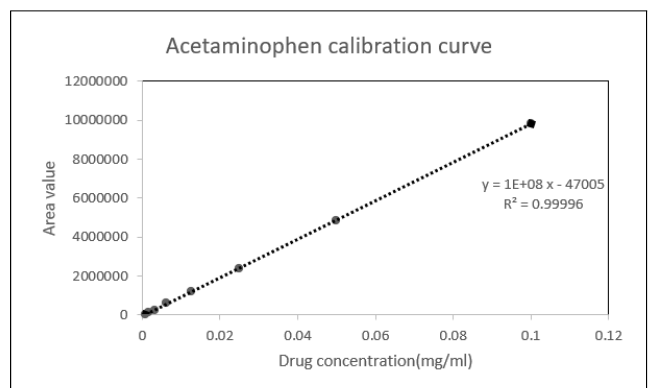


Figure 2. Calibration curve of acetaminophen.

의 Jacket으로 들어가서 receptor fluid를 데우고 그 온도를 유지시켜 주었다. Receptor chamber에는 sampling port가 있어서 syringe나 micro pipette을 이용하여 sampling이 가능하다. 이때 sampling한 양과 동량의 receptor fluid를 다시 receptor chamber 안으로 주입해주어야 한다. 이는 계속되는 sampling 과정에서 생길 수 있는 receptor chamber 안의 공기 방울 생성 방지와 receptor fluid가 실험 도중 모자라는 것을 막아준다. Sampling time은 24시간 안에서 자유롭게 설정이 가능하다. Figure 3과 같이 Franz Diffusion Cell을 통해 얻은 sample은 HPLC를 통한 정량분석을 거쳐 Flux 값과 K_p 값을 구하고, Marzulli의 정의에 적용하여 피부투과도를 측정하였다.

Acetaminophen의 피부투과 특성을 확인하기 위해 Franz Diffusion Cell을 이용해 실험을 진행하였다. 또한, acetaminophen의 농도가 피부투과도에 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위해 약물의 농도를 0.1, 0.2, 0.4 mg/mL의 농도로 달리하여 실험을 진행하였다. Acetaminophen을 receptor fluid에 녹여 실험용 약물을 제조하였으며, receptor fluid는 PBS와 MeOH을 6:4의 비율로 혼합한 것을 사용하였다. 먼저 Heater/circulator에 물을 채운 뒤 온도를 $32\pm 1^\circ\text{C}$ 로 설정해 놓았다. 그 후 receptor chamber에 receptor fluid를 가득 채워주었다. 이때 표면장력이 생길 때까지 가득 채워주지 않으면 membrane을 위에 올렸을 때 공기 방울이 생길 수 있다. 공기 방울은 membrane과 receptor fluid 사이에 빈 공간을 만들어 drug release를 방해하는 가장 큰 요인 중 하나이다. Heater/circulator를 작동시켜, receptor fluid를 피부 온도와 유사한 온도로 데워준다. 끓인 3차 증류수에 30분간 담구어 불려준 membrane을 receptor chamber 위에 올려놓고, 그 위에 donor chamber를 덮어준 뒤 clamp로 고정한다. Donor chamber 안에 약물을 2 mL 주입하고 알루미늄 호일로 sampling port 부분과 donor chamber 윗부분을 막아 receptor fluid의 증발을 최소화해준다. 기계 전원을 작동시켜 magnetic stir bar를 이용해 receptor fluid를 교반한다. 1, 2, 4, 6, 8, 12시간 포인트별로 sampling해준다. 각 sample들은 바로 냉장 보관되었으며, sampling한 뒤 24시간이 지나기 전에 HPLC로 분석하였다.

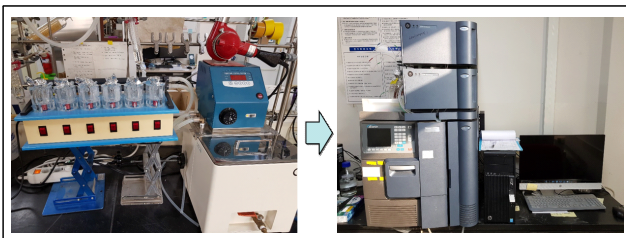


Figure 3. Photos of Franz Diffusion Cell and HPLC.

III. 결과 및 고찰

1. Acetaminophen의 drug release

Acetaminophen의 피부투과도를 측정한 결과, 시간이 지남에 따라 Area 값이 증가하는 것을 볼 수 있었다. 결과는 Figure 4와 같다.

이는 drug release가 잘 이루어지고 있다는 의미로 해석할 수 있다.

2. Acetaminophen의 Flux 값

Flux 값은 단위 시간당 일정한 피부 면적을 통과한 시료의 양을 나타낸 값이다. Acetaminophen의 Flux 값은 농도에 비례하게 높아지지만, 시간이 지남에 따라 값이 낮아지는 경향을 보인다. 그 결과는 Figure 5와 같다.

이는 acetaminophen의 투과 특성이 초반에 빨리 용출되고, 시간이 지남에 따라 용출속도가 감소하는 것으로 판단된다.

3. Acetaminophen의 K_p 값

K_p 값은 Flux 값에서 시료의 초기농도를 나눠준 값으로, 각 물질의 흡수 특성을 대변할 수 있다. Acetaminophen의 K_p 값은 시간이 지남에 따라 감소하는 경향을 보이며, 농도에 반비례한 것으로 나타난다. 결과는 Figure 6과 같다.

K_p 값이 시간이 지남에 따라 감소하는 것은 Flux 값에서 본 acetaminophen의 투과 특성을 대변하는 것으로 보인다. Flux 값과 K_p 값이 농도에 관해서 반대되는 양상을 보이는 것은 농도가 높아지면서 투과되는 용질의 양 자체는 많아졌으나, 투과의 정도를 투과율은 감소한 것으로 보인다.

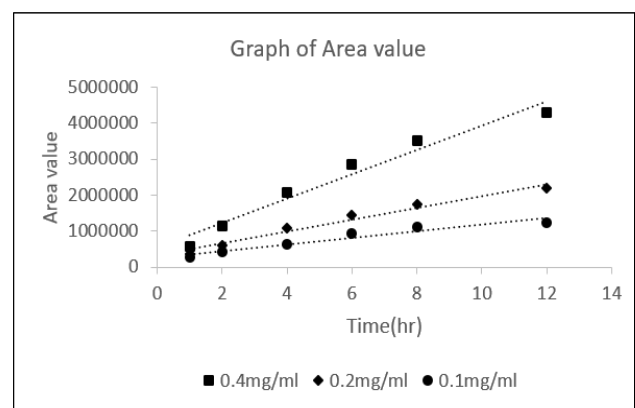


Figure 4. Area values according to drug concentration of acetaminophen.

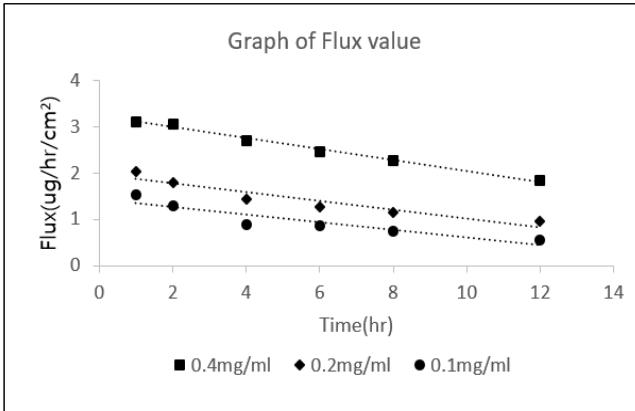


Figure 5. The Flux value depending on the concentration of acetaminophen.

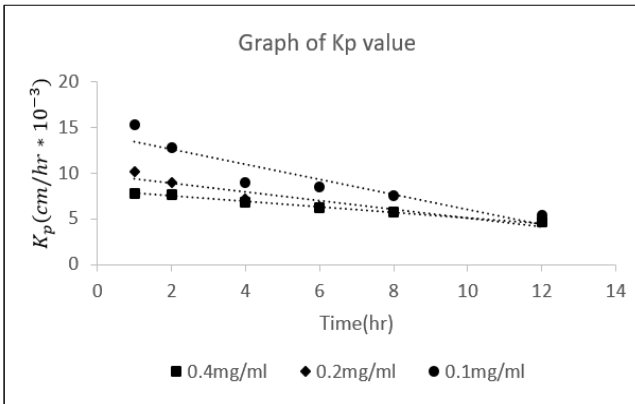


Figure 6. The K_p value depending on the concentration of acetaminophen.

4. Marzulli의 정의에 적용

Marzulli의 정의에 실험 결과를 적용하기 위해 각 농도별 약물에서 얻은 Flux 값과 K_p 값의 평균을 구했으며, 결과는 Table 2와 같다.

Marzulli의 정의에 실험 결과를 적용한 결과, acetaminophen의 투과속도는 보통(moderato)으로 판단된다. 결과는 Figure 7과 같다.

Table 2. Average Flux and K_p value of each sample

	Flux (µg/hr/cm ²)	K _p (cm/hr × 10 ⁻³)
0.1 mg/mL	0.97	9.73
0.2 mg/mL	1.44	7.18
0.4 mg/mL	2.58	6.45

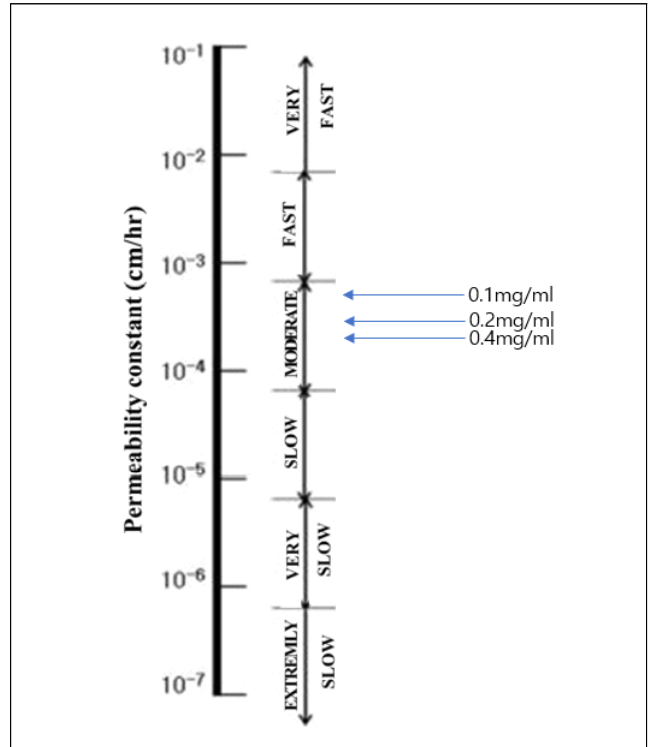


Figure 7. The permeability coefficient (K_p) of acetaminophen through Cellu Sep T4 dialysis membrane.

IV. 결 론

Acetaminophen의 피부투과 특성을 알아보기 위해 Franz Diffusion Cell assay를 이용하여 실험을 진행하였다. 이번 연구를 통해 acetaminophen이 초반에 빠르게 흡수되고, 시간이 지남에 따라 천천히 흡수된다는 것을 알게 되었다. Acetaminophen은 대표적인 경구투여 약물이며(15), 피부투과 특성에 대한 연구가 많이 이루어진 물질로서 후속 연구에 사용될 활성을 지닌 플라보노이드 및 스틸베노이드계의 수용성 및 지용성 물질에 대한 피부투과 특성 연구를 진행하는 데 도움이 될 것으로 예상된다.

참고문헌

1. 김명식. (2007) 동물실험과 심의. 철학. 92, 231~56.
2. 최훈. (2016) 동물실험은 윤리적으로 옹호 가능한가?. 한국실험동물학회 학술발표대회 논문집. 54.
3. 박소영. (2015) 동물의 실험 및 과학적 이용에 관한 윤리적 검토. 석사학위논문. 가톨릭대학교 대학원.
4. Ng SF, Rouse JJ, Sanderson FD, et al. (2010) Validation

- of a static Franz Diffusion Cell system for *in vitro* permeation studies. *AAPS PharmSciTech.* 11, 1432~41.
5. Franz TJ. (1975) Percutaneous absorption. On the relevance of *in vitro* data. *J Invest Dermatol.* 64, 190~5.
 6. Pulsoni I, Lubda M, Aiello M, et al. (2022) Comparison between Franz Diffusion Cell and a novel micro-physiological system for *in vitro* penetration assay using different skin models. *SLAS Technology.* 27, 161~71.
 7. 박교현, 정세훈, 신호상, 김배환. (2016) Franz Diffusion Cell을 이용한 문신용 염료 내 유해물질의 피부 투과특성 연구. *한국환경보건학회지.* 42, 61~70.
 8. Salamanca CH, Barrera-Ocampo A, Lasso JC, Camacho N, Yarce CJ. (2018) Franz Diffusion Cell approach for pre-formulation characterisation of ketoprofen semi-solid dosage forms. *Pharmaceutics.* 10, 148.
 9. Ng SF, Rouse J, Sanderson D, Eccleston G. (2010) A comparative study of transmembrane diffusion and permeation of ibuprofen across synthetic membranes using Franz diffusion cells. *Pharmaceutics.* 2, 209~23.
 10. Weiner N, Lieb L, Niemiec S, et al. (1994) Liposomes: A novel topical delivery system for pharmaceutical and cosmetic applications. *J Drug Target.* 2, 405~10.
 11. El Hussein S, Muret P, Berard M, Makki S, Humbert P. (2007) Assessment of principal parabens used in cosmetics after their passage through human epidermis-dermis layers (*ex-vivo* study). *Exp Dermatol.* 16, 830~6.
 12. Herman A, Herman AP. (2013) Caffeine's mechanisms of action and its cosmetic use. *Skin Pharmacol Physiol.* 26, 8~14.
 13. Hu X, He H. (2021) A review of cosmetic skin delivery. *J Cosmet Dermatol.* 20, 2020~30.
 14. 신현중. (2000) Acetaminophen 속용정의 제제개발 연구. *한국응용약물학회 춘계학술발표논문집.* 20~5.
 15. 서지은, 이진호, 김배환. (2017) 피부흡수 대체시험법의 조건설정을 통한 수용성, 지용성 물질의 투과 특성 연구. *한국환경보건학회지.* 43, 77~86.

Received Nov. 9, 2022, Revised Dec. 8, 2022, Accepted Dec. 14, 2022