

## 생체 피부조직을 이용한 피부보호제 *in-vitro* 시험평가

이은영<sup>1)</sup> · 최후균<sup>1)</sup> · 김상웅<sup>2)</sup> · 서동성<sup>2)</sup> · 조혜은<sup>3)</sup> · 유치호<sup>3)</sup> · 김창환<sup>3)</sup> · 조 영<sup>\*2)</sup>

<sup>1)</sup> (주)셀젠텍 약물전달기술연구팀

<sup>2)</sup> 한소주식회사 부설연구소

<sup>3)</sup> 국방과학연구소 Chem-Bio기술센터

### *In-vitro* Tests of Topical Skin Protectants using a Flow-Through Diffusion Cell System Containing Excised Hairless Mouse Skin

Eun Young Lee<sup>1)</sup> · Hoo Kyun Choi<sup>1)</sup> · Sang Woong Kim<sup>2)</sup> · Dong Sung Seo<sup>2)</sup> · Hae Eun Joe<sup>3)</sup> ·  
Chi Ho Yu<sup>3)</sup> · Chang Hwan Kim<sup>3)</sup> · Young Cho<sup>\*2)</sup>

<sup>1)</sup> Drug Delivery Research Team, Cellgentek Co, LTD., Korea

<sup>2)</sup> Research and Development Center, Hanso Inc., Korea

<sup>3)</sup> Chem-Bio Technology Center, Agency for Defense Development, Korea

(Received 8 March 2022 / Revised 1 July 2022 / Accepted 22 July 2022)

#### Abstract

Highly toxic chemical warfare agents(CWA) could be used in chemical warfare and terrorism. The protection of skin is crucial for civilians and soldiers, because the primary routes of exposure to CWA are inhalation and skin absorption. Thus, topical skin protectants(TSP) have been studied and developed in many countries to complement protective equipments. In this study, *in-vitro* test procedure was optimized and established using a flow-through diffusion cell system containing excised hairless mouse skin in an attempt to assess the effectiveness of various TSP formulations against nerve agent simulants. In addition, the test results on the formulations including the ingredients used in SERPACWA(Skin Exposure Reduction Paste Against Chemical Warfare Agent) and IB-1(TSP of Israel) were included, indicating that the formulations with perfluorinated compounds were more effective than the glycerin-based formulations.

Key Words : Flow-through Diffusion Cell(관류적 확산셀), Topical Skin Protectant(피부보호제), Chemical Warfare Agents(화학작용제), Perfluorinated Polyether(과불화 폴리에테르), Polytetrafluoroethylene(폴리테트라플루오로에틸렌), Glycerin(글리세린)

#### 1. 서론

화학방 상황 및 테러 목적으로 사용되는 화학작용제

\* Corresponding author, E-mail: ycho@hansoinc.com  
Copyright © The Korea Institute of Military Science and Technology

의 주요 인체 유입 경로는 호흡 및 피부가 될 수 있다. 그 중에서 신경작용제(nerve agents)와 수포작용제(vesicating agent)의 경우, 액체 상태로 피부 표면에 오염될 경우 극소량에 의해서도 사망에 이를 수 있는데, 신경작용제 VX의 경우 피부에 오염 시 체중 70 kg 성인을 기준으로 중간 치사량(LD<sub>50</sub>)은 약 10 mg에 불과하다(0.14 mg/kg)<sup>[1]</sup>. 따라서 화학작용제의 피부 침투를 억제할 수 있는 피부보호제 연구개발을 위하여 지금까지 많은 연구가 진행되어 왔다<sup>[2-4]</sup>. 그러므로 이러한 피부보호제의 연구개발을 위하여 작용제의 피부투과도 측정 및 피부보호제의 정량적인 성능평가는 매우 중요하다. 이를 위하여 미국 USAMRICD(US Army Medical Research Institute of Chemical Defense)에서는 M8 화학작용제 탐지지(detection paper)를 사용하였는데,<sup>[5]</sup> M8탐지지는 액체성 신경 및 수포작용제와 접촉되면 색상이 변하여 육안으로 쉽게 식별할 수 있는 원리를 이용하여, 탐지지 표면 위에 피부보호제를 바르고 그 위에 작용제를 가하면 작용제가 보호제 층을 통과 시 탐지지의 색상이 변화가 시작되는 시간(onset time)을 측정함으로써 보호제의 성능을 스크리닝하였다<sup>[5]</sup>. 본 연구팀은 M8탐지지 보다 반응시간(response time)이 더욱 빠른<sup>[6]</sup> M9탐지지를 사용하여 많은 후보물질(조성물)에 대한 스크리닝 시험을 실시한 바가 있다<sup>[7]</sup>.

그러나 실제로 화학작용제가 생체 피부에 오염되었을 경우에 피부투과도를 측정하기 위하여 신경작용제의 경우는 혈액 중의 효소 cholinesterase의 활성도를 측정(*in-vivo* test)함으로써 작용제의 피부투과도를 정량적으로 측정이 가능하다<sup>[8]</sup>. 그러나 실험동물의 생리상태나 개체 차이에 의한 영향 요인이 많으므로 정밀하게 피부투과도를 측정하기에는 한계가 있다. 또한 다른 화학작용제의 경우도 실험동물 피부에 작용제를 오염시키고 경시별로 혈액을 채취하여 피부를 투과한 작용제의 농도를 정량분석할 수는 있지만 생체 내에 존재하는 각종 분해효소에 의해 감소되는 작용제의 양을 정확히 알기 어렵다는 단점이 있다.

따라서 오래 전부터 실험동물의 피부조직 절편을 사용하여 *in-vitro*에서 약물의 피부 투과도를 정량적으로 평가하는 방법이 시도되었다<sup>[9]</sup>. 그 후 이 방법의 표준화를 위하여 OECD 가이드라인<sup>[10]</sup>이 나왔고 수많은 연구자들이 이 가이드라인을 토대로 경피성 지속성 약물(TDDS: Transdermal Drug Delivery System), 특히 피부부착형 패치의 약물 흡수에 대한 약물동력학적(pharmacodynamics)인 연구를 수행하였다<sup>[11-13]</sup>. 이

실험방법은 인체에 영향을 줄 수 있는 각종 위해물질이 인체 피부를 얼마나 통과할 수 있는가를 단위시간별로 정량적으로 평가할 수 있는 *in-vitro* 시험 모델로서 현재도 광범위하게 이용되고 있다<sup>[14]</sup>.

본 연구에서는 이 방법을 기반으로 액체성 수포 및 신경작용제의 피부 침투를 차단하기 위한 피부보호제의 정량적인 성능평가를 위한 하나의 표준방법으로서 실험조건 및 절차를 국내 최초로 확립하고, 유사 신경작용제인 DMNP(dimethyl-4-nitrophenyl phosphate, 또는 paraoxon methyl)와 dichlorvos를 사용하여 피부보호제에 대한 성능평가를 실시하였다.

## 2. 이론 해석

### 2.1 Flow through diffusion cell의 기본 원리

약물의 경피 흡수를 측정하기 위해 다양한 형태의 *in-vitro* 측정 원리들이 문헌에 보고되어 있으나, 그 중에서 대표적인 수직형 기구인 flow through diffusion cell test(이하 FTD-test)을 바탕으로 하여 피부보호제의 성능평가가 가능하도록 실험절차를 확립하였다. 본 실험에서 피부에 투과된 유사 작용제의 총량은 다음과 같이 계산된다<sup>[15]</sup>.

$$M_n = \overline{VC_n(t)} + \frac{S_n}{2} + \sum_{i=1}^{n-1} S_i$$

여기서  $M_n$ 은 투과된 약물 총량,  $S_n/2$ 는 n번째 time point 동안 투과된 유사작용제의 양,  $\overline{C_n(t)}$ 는 n번째까지의 약물의 투과된 평균 농도,  $\overline{VC_n(t)}$ 는 receptor cell에 투과된 약물 총량,  $\sum_{i=1}^{n-1} S_i$ 는 n번째 time point 이전 동안 vial에 받아지는 sample에 투과된 약물의 양에 각각 해당된다.

전체적인 시스템은 완충액을 일정 속도로 diffusion cell로 공급해 주는 연동펌프(peristaltic pump)와 diffusion cell의 receptor chamber로부터 흘러나오는 용액(penetrant)을 경시별로 수집하는 분획수집기(fraction collector), 그리고 diffusion cell을 일정한 온도로 유지시켜주는 항온조로 되어있으며(Fig. 1), 분획수집기에 수집된 용액 중의 약물의 농도는 HPLC를 사용하여 정량분석이 가능하다. 여기서 약물이 피부조직을 통과하는 속도는 완충액의 온도, 유속, receptor chamber의 부피 및 stir

bar의 교반 속도등에 의해 달라질 수 있다. 단위 시간 별 약물의 투과되는 양을 계산하면 약물의 투과 속도를 구할 수 있다.

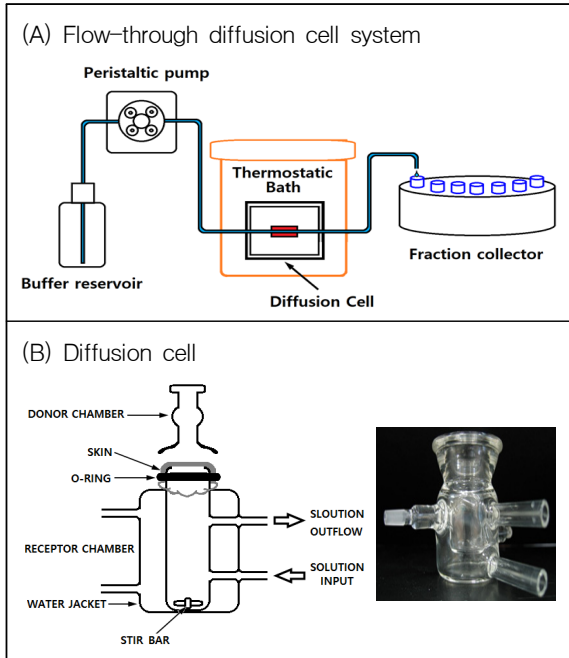


Fig. 1. (A): a Flow-through diffusion cell system in which peristaltic pump and fraction collector are connected to diffusion cells, (B) A diffusion cell containing excised skin<sup>[9]</sup>

2.2 피부보호제 시험평가를 위한 FTD-test의 조건  
 피부보호제로 도포된 피부조직 표면에 유사작용제를 떨어뜨리고 피부투과도를 정량적으로 평가하기위하여 시험평가 조건으로 고려해야할 사항은 다음과 같다.

2.2.1 생체 피부조직의 선정

본 실험을 위한 실험동물의 피부조직을 사용하기 위하여 여러 가지 고려요소가 있으나 가장 이상적인 실험결과를 얻기 위하여는 인체 피부조직과 계통발생학적(phylogenetically)으로 가장 가까운 실험동물의 피부조직을 사용하는 것이 바람직하다. Christopher H. Dalton등은<sup>[16]</sup> 신경작용제 VX의 pig skin, human skin, guinea pig skin에 대한 피부투과율을 비교하기 위하여 FDT-test를 실시하였는데, VX의 24시간 누적 투과량이 guinea pig skin의 경우 약 55 mg/cm<sup>2</sup>, pig skin과

human skin의 경우는 약 10 mg/cm<sup>2</sup>로 나타났다. 즉 guinea pig skin의 경우 pig skin과 human skin 보다 약 5배 정도 VX 투과가 잘 되며, pig skin의 경우 human skin과 거의 유사한 VX 투과도를 나타내었다. Simon, G.A.등은<sup>[17]</sup> pig skin이 계통발생학적으로나 생화학적으로나 human skin과 가장 가깝다고 보고하였는데, Christopher H. Dalton등<sup>[16]</sup>의 실험결과와 일치한다고 볼 수 있다.

본 연구에서는 1차적으로 hairless mouse skin을 사용함으로써 실험 당일에 피부를 적출하여 피부조직의 순기능을 유지하고 향후 human(cadaver) skin등을 사용하여 데이터를 확인할 계획이다. 설치류(rodent)의 피부조직을 사용하는 또 하나의 장점은 신경 및 수포작용제에 대한 in-vivo 연구가 가장 많이 수행된 실험동물<sup>[18,19]</sup>이므로 in-vitro 실험결과 해석에 도움이 될 수 있다.

2.2.2 생체 피부조직 대신 인공 membrane 사용 가능성

FTD-test를 위하여 생체 피부조직을 사용하는 대신 인공적으로 합성된 고분자 membrane을 사용한 사례가 다수 보고되었는데<sup>[20,21]</sup>, 이는 주로 약물의 피부 흡수 보다는 약물 방출(drug release) 연구에 주로 사용된다. 생체 피부조직의 수급이 여의치 않을 때 비용 절감등의 목적으로 고분자 membrane을 사용하게 되는데 실험이 간편하고 재질이 규격화되어 있으므로 실험의 오차범위가 적을 수 있다는 장점이 있으나 어떤 membrane을 사용하느냐에 따라 그 실험결과가 크게 달라질 수 있다. 그럼에도 불구하고 FDA에서는 일부 TDDS 제제에 한정하여 in-vitro FTD-test로 인공 membrane의 사용을 허가한 바 있다<sup>[22]</sup>. 그러나 일반적인 경우는 인공 membrane의 물리화학적 특성에 결과가 좌우되어 TDDS 제제의 피부 흡수가 아닌 약물 방출의 결과로 나타난다는 제한사항이 있다. Simon G.A. 등<sup>[21]</sup>은 여러 종류의 인공 membrane과 pig ear skin을 사용하여 TDDS 제제(패치)에 대한 FDT-test를 실시하여 pig skin과 가장 근접한 인공 membrane을 IVIVC(in vivo-in vitro correlation)의 개념을 사용하여 선별하였다. 그러나 J. Millerioux등<sup>[3]</sup>은 신경작용제 VX에 대한 피부보호제(formulation) 4종에 대한 피부 보호성능 비교를 위하여 실리콘 membrane, pig skin, human skin을 각각 사용하여 FTD-test를 실시하였는데, 실리콘 membrane의 경우는 피부조직과는 상이한 결과가 나오므로 반드시 피부조직을 사용하여 확인 실험을 해야

한다고 보고하였다. 따라서 피부보호제를 성능평가하기 위한 FTD-test에서는 신뢰성있는 실험결과를 얻기 위하여 가급적 인공 membrane을 사용하지 않는 것이 바람직하다고 판단된다.

### 2.2.3 피부보호제 성능평가를 위한 FTD-test 실험 조건

화학작용제의 피부 침투를 차단할 수 있는 피부보호제 조성물(formulation)에 대한 성능실험을 위하여 FTD-test를 기반으로 하되 추가적인 실험조건을 설정할 필요가 있다. 즉 일반적인 TDDS 제제의 실험조건과 달리 본 실험에서는 TDDS 제제 대신 피부보호제를 피부 조직 위에 균질하게 도포하고 그 위에 일정량의 유사 작용제를 가하는 과정이 추가된다. 우선 유사작용제의 적하량을 결정하기 위하여 타 연구사례를 살펴보면 미국 ECBC(Edgewood Chemical and Biological Center)의 JSSED(Joint Service Sensitive Equipment Decontamination)에서 초기오염농도를  $10 \text{ g/m}^2$ (약  $1 \text{ }\mu\text{g/cm}^2$ )으로 설정하였으며<sup>[23]</sup>, 미국 USAMRICD에서는 aTSP(active Topical Skin Protectant) 개발을 위해 보호제 *in-vitro* 성능시험에서 수포작용제 HD는  $10 \text{ }\mu\text{l/cm}^2$ , 신경작용제 GD는  $8 \text{ }\mu\text{l/cm}^2$ 를 각각 사용하였다<sup>[5]</sup>. 피부투과도 측정을 위한 OECD 가이드라인<sup>[10]</sup>에서는 인체 피부에 대한 표준 노출량이 고체의 경우  $1\text{-}5 \text{ mg/cm}^2$ , 액체인 경우  $10 \text{ }\mu\text{l/cm}^2$ 로 권장하고 있다. 따라서 본 연구를 위해 설계 제작한 diffusion cell의 피부조직 면적( $2 \text{ cm}^2$ )을 감안하여 FTD-test에 적용하기 위한 유사작용제의 양은  $5 - 10 \text{ }\mu\text{l/cm}^2$ 로 설정하였다.

또한 receptor cell에 장착된 피부조직 표면에 도포될 피부보호제의 두께를 결정하기 위하여 타 연구사례를 살펴보면, 미국 USAMRICD의 aTSP 연구에서는 피부보호제 도포량이  $20 \text{ }\mu\text{g/cm}^2$ 로서 두께로 환산하면 약  $0.2 \text{ mm}$ 에 해당된다. 또한 미군에서 운용된 피부보호제 SERPACWA의 경우 84 그램(1회 사용분 포장단위)을 노출 취약부위(손목, 목, 발목, 겨드랑이, 사타구니, 허리의 총 면적 계산치는 약  $3,500 \text{ cm}^2$ )에 바르도록 되어 있는데 해당되는 두께는 약  $0.25 \text{ mm}$ 로 계산된다. 본 실험에서는 비교적 가혹조건인 실제 상황에서 피부 표면에 잔류할 수 있는 보호제의 양을 감안하여  $0.08 \text{ mm}$ 가 되도록 실험조건을 설정하였다.

그 외에 diffusion cell의 receptor cell에 고정된 피부조직의 온도를 실제 인체의 피부 표면 온도인  $32 \text{ }^\circ\text{C}$ 로 맞추기 위하여 diffusion cell 내의 용액 온도는  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 로

유지시켰다<sup>[10]</sup>.

## 3. 실험재료 및 방법

### 3.1 실험재료

PFPF(Fomblin Y25<sup>®</sup>) 및 PTFE(Polymist F5A<sup>®</sup>, Algoflon L206<sup>®</sup>)는 Solvay Inc., glycerin은 C.M. Tech, hairless mouse는 오리엔트 바이오, perfluoroalkylethyl phosphate(Flexwet PD30<sup>®</sup>)은 Innovative Chemical Technology, polytrimethyl siloxymethacrylate copolymer(FA4103<sup>®</sup>)은 Dow chemical, Nomcort HK-P<sup>®</sup>는 Nisshin Oillio, boron nitride는 Merck, Baycusan 1008<sup>®</sup>은 Covestro 사 제품을 각각 사용하였다. Mg(OH)<sub>2</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, methanol(HPLC grade), acetonitrile, sodium alginate는 국내 제품, DMNP, dichlorvos는 Aldrich 제품을 각각 사용하였고 diffusion cell은 주문 제작하여 사용하였다.

### 3.2 실험방법

피부보호제의 formulation 제조를 목적으로 각 후보 물질들의 균질화 혼합 및 분산을 위하여 Robomixer<sup>®</sup>(high-speed emulsifier/dispenser, T.K PRIMIX, Japan)를 사용하였으며, FTD-test를 기반으로한 피부보호제 성능시험을 위하여 실험계획서를 작성하고 동물실험 윤리위원회의 승인을 거쳐서 다음 방법으로 실시하였다.

이산화탄소를 이용하여 hairless mouse(8주령, 암컷)를 안락사시키고 피부조직을 적출한 후 지방질과 혈관을 제거하고 일정 면적으로 자른 다음  $2 \text{ cm}^2$ 의 원형 구멍이 뚫린 release liner(두께  $0.08 \text{ mm}$ )를 대고 그 중앙에 측정 대상 시료(피부보호제)를  $50 - 250 \text{ }\mu\text{l}$  떨어뜨린 다음 표면에 얇게 바른다. 그 후 슬라이드글라스를 이용하여 release liner 두께와 일치되도록 피부보호제를 깎아내어 표면을 평탄화시켜 피부보호제 총량( $16 \text{ mg}$ )이 동일조건이 되도록 한다. 그전에 미리 multi-channel peristaltic pump를(sample volume 약  $3 \text{ mL}$  되게 pump 속도 조절) 이용하여 diffusion cell에 pH 6.0 완충액을 공급하고 circulating water bath로 diffusion cell의 온도를  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 로 유지 시켜준다. 앞서 준비된 피부보호제가 도포된 피부조직을 diffusion cell에 장착한 후 유사 작용제를 중앙에 떨어뜨리고 클램프로 고정 시켜준다(Fig. 1B). Diffusion cell을 뒤집어 multi-channel peristaltic pump 속도를 최대로 한 후 diffusion cell 안의 기포를 제거하고 multi-channel magnetic stirrer(rpm:

400)로 diffusion cell 안의 용액을 교반시켜준다. 검액은 4시간 간격으로 diffusion cell에서 6 ml 또는 4 ml vial에 연속적으로 채취한 후 HPLC를 사용하여 정량하며 HPLC 분석조건<sup>[24]</sup>은 다음과 같다.

- 검출기 : UV detector
- 이동상 : HPLC grade methanol : 3차 증류수 (55:45, v/v)(DMNP의 경우)
- column : C8 (4.6 × 100 mm, 5 μm)
- column Temperature : 35 °C
- 유속/주입량 : 1.0 ml/분, 10 μl

#### 4. 실험결과 및 해석

4.1 유사작용제 DMNP 및 dichlorvos의 피부 투과도  
 유사작용제 DMNP는 G계열 신경작용제의 유사작용제로 분류되지만 구조가 V계열 유사작용제인 paraoxon과 유사하므로 V계열 신경작용제 유사작용제로도 사용된다<sup>[25,26]</sup>. 또한 신경작용제 유사작용제 dichlorvos의 경우 G계열 신경작용제의 유사작용제로서 경피흡수(percutaneous absorption) 연구에 유용하게 사용된다<sup>[27,28]</sup>. 우선 피부보호제 없이 피부조직 자체에 대한 이들 유사작용제의 피부투과도를 측정하였는데 그 결과는 다음 Fig. 2와 같다. 즉 유사작용제 10 μl (즉 DMNP 13.83 mg, dichlorvos 14.20 mg)를 가하였을 때 22시간 동안의 피부 투과량은 DMNP가 1.06 mg, dichlorvos가 2.62 mg으로 나타났다. 즉 dichlorvos는 DMNP에 비해 피부투과도가 2.5 배 이상 크며 시간 경과에 따른 피부투과 profile도 dichlorvos의 경우 처음 10시간까지는 급격히 증가하다가 그 이후는 증가폭이 둔화되었으며 DMNP의 경우는 시간이 지날수록 증가폭이 서서히 증가하는 상반된 패턴을 보였다.

약물의 피부투과도를 비교 예측하는 것은 어려운 일이지만 물리화학적 특성과 피부의 생리학적 특성을 고려하여 어느 정도는 예측 가능하다. 피부투과도에 영향을 미치는 주요인자는 유수분배계수(油水分배係數), 분자량, 용점(融點), 수(水)용해도, 분자의 구조적 특징 등을 들 수 있는데, dichlorvos와 DMNP를 이러한 차원에서 비교해 보면 유수분배계수인 LogP 값은 통상 2 ~ 3 정도가 피부투과에 가장 적합하다고 알려져 있어 DMNP(1.25)가 dichlorvos(0.71)보다 우세할 것

으로 예측할 수 있다. 그러나 용점은 dichlorvos(-60 °C)가 DMNP(0 ~ 4 °C)보다 낮아서 피부투과에 유리하며, 분자량 측면에서도 분자량이 작은 dichlorvos가 유리하다. Dichlorvos의 수용해도는 8 g/L로 DMNP와 유사한 구조를 가진 paroxon의 수용해도(0.5 g/L)를 고려 시 dichlorvos의 수용해도가 더 높을 것으로 예측되어 피부투과에 보다 유리하다. 별도로 본 실험조건에서 DMNP의 가수분해효과를 확인하였는데 37 °C에서 24 시간 동안 0.04 %가 분해되어 가수분해효과는 실험에 영향이 거의 없는 것으로 확인되었다.

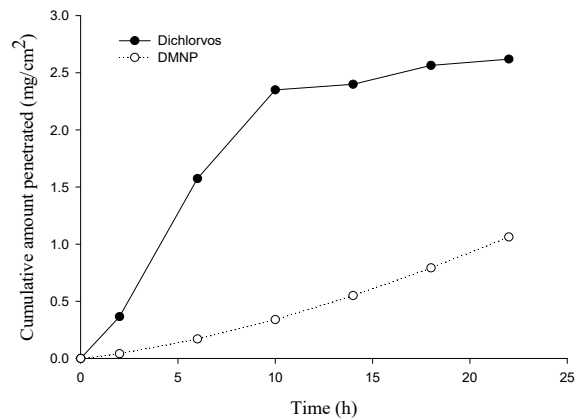


Fig. 2. Profile of skin penetration of DMNP and dichlorvos through hairless mouse skin

#### 4.2 미국 피부보호제 SERPACWA의 주요 성분의 효능 분석

미국 USAMRICD에서 연구개발된 피부보호제 SERPACWA는 MOPP 상황에서 노출에 취약한 피부 부위에 미리 발라서 화학작용제로부터 피부를 보호하는 연고제로서 주성분은 PFPE(perfluorinated polyether, Fomblin Y25<sup>®</sup>, 오일 성분)와 PTFE(polytetrafluoroethylene, Polymist F5A<sup>®</sup>, 미세분말)의 1:1 배합(w/w)으로 이루어져 있다.

따라서 PTFE 함량에 따른 피부보호효과를 시험해보고자 PFPE 1.0 대비 PTFE 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1.0의 5가지 혼합비율로 조성물을 제조하여 우선 M9 탐지지로 실험하여 보았는데 PTFE 농도에 비례하여 보호성능 증가가 관찰되었는데 이를 확인하고자 동일 조성물에 대하여 FTD-test를 실시하였고 그 결과는 Fig. 3과 같다. Fig. 3에서 PTFE의 함량이 증가될수록 이와 비례하여 유사작용제 DMNP에 대한 보호성능이 증가함을

관찰하였고, 동일한 방법과 조건으로 5가지 조성물에 대하여 유사작용제 dichlorvos를 사용하여 실험하였는데 그 결과는 다음 Fig. 4와 같다. Fig. 4에서 dichlorvos의 경우 복합 조성물의 보호성능도 DMNP에 비해 크게 감소하는 것으로 나타났다. 이는 유사작용제 dichlorvos의 피부침투 용이성 때문에 피부보호제의 보호성능이 다소 저하될 수 있는 조건이므로 dichlorvos는 DMNP에 비하여 피부보호제의 보호성능평가에 효과적으로 사용가능한 유사작용제로 판단된다.

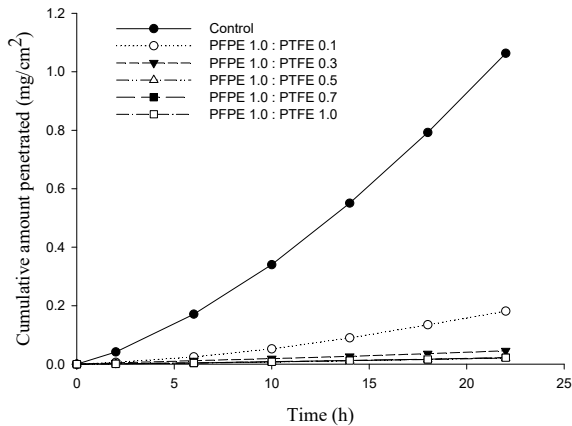


Fig. 3. Percutaneous absorption of DMNP through hairless mouse skin topically applied with the formulations

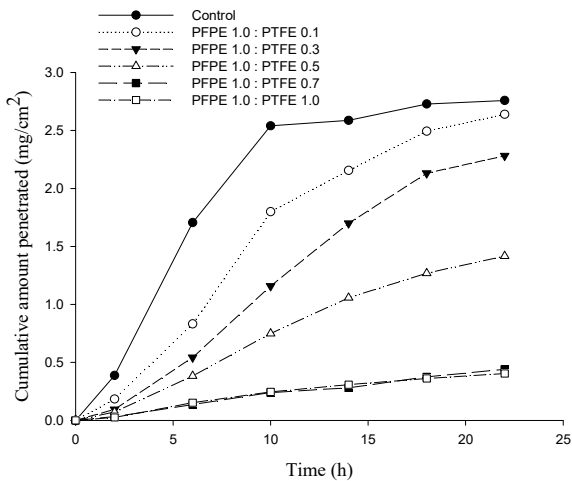


Fig. 4. Percutaneous absorption of dichlorvos through hairless mouse skin topically applied with the formulations

#### 4.3 미국 피부보호제 SERPACWA와 이스라엘 피부보호제 IB-1의 주요 성분 비교실험

피부보호제 IB-1(상품명 Dermostyx<sup>®</sup>)는 IIBR(Israel Institute of Biological Research)에서 개발되어 현재 이스라엘에서 운용 중인 군용 피부보호제로서 주성분은 glycerin인 것으로 알려졌다. IB-1의 우수한 피부보호성능에 대해 다수의 연구결과<sup>[29-31]</sup>가 보고된 바 있다. 따라서 glycerin을 주성분으로 하면서 점도는 더욱 증가시키고 상분리 및 침전현상이 없는 백색크림을 제조하여 미국 SERPACWA의 주요성분과 보호성능을 비교하여 보았는데 그 결과는 다음 Table 1과 같다.

Table 1. Percent of protection provided by TSP formulations with various compositions against percutaneous absorption of DMNP. ( $A_{22hr}$  : cumulative total amount( $\mu$ g) of penetrant for 22 hours,  $D_{initial}$  : Initial dose ( $\mu$ g) of DMNP applied on skin)

Formulations	TSP	TSP-1	IB-1	PSB	GBD-2
Fomblin Y25	50	50	-	-	-
Polymist F5A	50	-	-	-	-
Algoflon L206	-	50	-	-	-
Glycerin	-	-	90	17.8	74.8
Mica	-	-	10	-	-
Sodium alginate	-	-	-	4.4	-
FA4103	-	-	-	-	9.7
Noncomport HK-P	-	-	-	-	5.8
Boron nitride	-	-	-	-	9.7
Water	-	-	-	77.8	-
Percent of protection*	99.9	99.9	98.4	98.8	98.0

$$* \% \text{ of protection} = \left( 1 - \frac{A_{22hr}}{D_{initial}} \right) \times 100$$

Table 1에서 미국 SERPACWA의 주요 성분인 불소계 화합물을 주성분으로 하는 처방(TSP, TSP-1)이 IB-1의 주성분인 glycerin을 주성분으로 하는 처방(IB-1, PSB, GBD-2)보다 유사작용제 DMNP에 대하여 우수한 피부

보호효과를 나타내었다. TSP와 TSP-1으로 도포된 시험군의 경우 glycerin을 포함하는 조성물과는 달리 유사작용제 DMNP가 표면에 퍼지지않고 방울 상태로 맺히는 현상이 관찰되었으며 이와같은 현상이 보호성능을 높일 수 있는 한가지 원인으로 사료된다.

## 5. 고 찰

미국의 피부보호제인 SERPACWA의 주성분인 PFPE와 PTFE는 주로 탄소와 불소로 이루어진 고분자 화합물로서 오래 전부터 화장품 및 윤활유의 원료로 사용되었다. PFPE는 화학적으로 매우 안정하여 인체에 독성이 거의 없으며 어떠한 유기용매에도 녹지않는 특성을 가지고 있다. 특성을 요약해보면 소수성이지만 지방층과도 섞이지 않는, 즉 물과 기름에 모두 섞이지 않으며 PFPE 간에도 서로 반발하는 성질이 있다. 이와 같은 특성으로 비교적 소수성에 가까운 화학작용제에 대한 피부 보호효과가 glycerin 보다 우수한 것으로 해석된다. 그러나 유사작용제간의 피부투과도가 상이하고 유사작용제-피부보호제간의 물리화학적 상호작용이 다를 수 있기 때문에 향후 다양한 종류의 유사작용제 및 실작용제에 대하여 FTD-test를 실시할 필요성이 있을 것으로 판단된다.

## 6. 결 론

TDDS 제제의 약물 방출 및 약물동력학적 연구에 사용되는 FTD-test를 기반으로 화학작용제에 대한 피부보호제를 성능평가할 수 있는 시험평가법을 국내 최초로 확립하였다. 확립된 시험평가 방법에 의해 미국 및 이스라엘의 피부보호제에 사용된 주요 성분들을 위주로 몇가지 복합조성물(formulation)을 제조하였고 이들에 대한 피부보호성능을 비교 평가하여 유의성 있는 결과를 확인하였다. 본 연구에 사용된 유사작용제의 경우 수용액 상에서 가수분해율이 매우 낮아(24시간에 0.04 % 수준) 실험결과에 영향을 주지 않았으며, 신경작용제 VX의 경우도 수용액에서 비교적 안정하므로 유사한 조건에서 실험이 가능하다<sup>[3,16]</sup>. 그러나 신경작용제 GB의 경우는 분해산물 생성을 고려한 실험조건의 설정이 필요할 것으로 판단된다. 따라서 본 연구에서 확립된 시험평가조건은 향후 화학작용제

에 대한 피부보호제의 시험평가에 적용 가능한 하나의 표준시험절차서(SOP; Standard Operational Procedure)로 사용 가능할 것으로 판단된다.

## 후 기

본 연구는 국방과학연구소의 연구비(과제명: rTSP제제 피부 보호 및 제독제 개발) 지원을 받아 수행되었으며 기술적으로 도와주신 국방과학연구소 Chem-Bio 기술센터에 감사 드립니다.

## References

- [1] Frederick R., "Textbook of Military Medicine," Published by the Office of Surgeon General Department of Army, USA, p. 141, 1997.
- [2] J. Millerioux, et al., "Evaluation of *In Vitro* Tests to Assess the Efficacy of Formulations as Topical Skin Protectants against Organophosphorus Compounds," *Toxicol. in Vitro.*, Vol. 23, pp. 127-133, 2009.
- [3] J. Millerioux, et al., "*In Vitro* Selection and Efficacy of Topical Skin Protectants against the Nerve Agent VX," *Toxicol. in Vitro.*, Vol. 23, pp. 539-545, 2009.
- [4] Bignon C., et al., "Barrier Cream Based on CeO<sub>2</sub> Nanoparticles Grafted Polymer as an Active Compound against the Penetration of Organophosphates," *Chemico-Biological Inter.*, Vol. 267, pp. 17-24, 2017.
- [5] Ernest H. Braue, Jr. "Development of an Active Topical Skin Protectant," USAMRICD-TR-16-03, pp. 1-180, Feb. 2016.
- [6] Sandra L. Fox, et al., "Emergency First Responders' Experience with Colorimetric Detection Methods," Idaho National Laboratory U.S. Department of Homeland Security Under DOE Idaho Operations Office Contract DE-AC07-05ID14517, pp. 1-33, 2007. 10.
- [7] Kim S. W., et al., "Study on the Formulations for Topical Skin Protectant against Liquid-Phase Chemical Warfare Agents," *Journal of the Korea Institute of Military Science and Technology*, Vol. 25, No. 2, pp. 210-217, 2022.

- [8] Carl T. Olson, et al., "Evaluation of Compounds as Barriers to Dermal Penetration of Organophosphates using Acetylcholinesterase Inhibition," *Toxicol. Lett.*, Vol. 55, pp. 325-334, 1991.
- [9] William G. Reifenra, et al., "A Comparison of *In Vitro* Skin-Penetration Cells," *J. Pharm. Sci.*, Vol. 83, No. 9, pp. 1229-1233, Sep., 1994.
- [10] OECD Guideline for the Testing of Chemicals, "Skin Absorption: *In Vitro* Method," OECD/OCDE 428 Adopted : 13 April 2004.
- [11] Akhter S., et al., "Automated Diffusion Apparatus for Studying Skin Penetration," *Int. J. Pharm.*, Vol. 21, pp. 17-26, 1984.
- [12] Bronaugh R., et al., "Methods for *In Vitro* Percutaneous Absorption Studies," *J. Pharm. Sci.*, Vol. 74, pp. 64-67, 1985.
- [13] Addicks W., et al., "Validation of a Flow-Through Diffusion Cell for use in Transdermal Research," *Pharm. Res.*, Vol. 4, pp 337-341, 1987.
- [14] Davies J., et al., "Further Development of an *In Vitro* Model for Studying the Penetration of Chemicals Through Compromised Skin," *Toxicol. in Vitro.*, Vol. 38, pp. 101-107, 2017.
- [15] Hoo-Kyun Choi, et al., "Mathematical Analysis and Optimization of a Flow-Through Diffusion Cell System," *Pharm. Res.*, Vol. 11, No. 4, pp. 595-599, 1994.
- [16] Dalton H., et al., "Absorption of the Nerve Agent VX (*O*-ethyl-S-[2(di-isopropylamino)ethyl] methyl phosphonothioate) Through Pig, Human and Guinea Pig Skin *In Vitro*," *Toxicol. in Vitro.*, Vol. 20, pp. 1532-1536, 2006.
- [17] Simon, G. A., et al., "The Pig as an Experimental Animal Model of Percutaneous Permeation in Man," *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.*, Vol. 13, pp. 229-234, 2000.
- [18] Atchinson, C. R., et al., "Development of a Guinea Pig Model for Low Dose, Long Term Exposure to Organophosphorous Nerve Agent," *Toxicol. Mech. Meth.*, Vol. 14, pp. 183-194, 2004.
- [19] Wetherell, J., et al., "Physostigmine and Hyoscine Improves Protection against the Lethal and Incapacitating Effects of Nerve Agent Poisoning in the Guinea Pig," *Neurotoxicol.*, Vol. 23, pp. 341-349, 2002.
- [20] Addicks, W. J., et al., "Validation of a Flow-Through Diffusion Cell for use in Transdermal Research," *Pharm. Res.*, Vol. 4, pp. 337-341, 1987.
- [21] Simon G. A., et al., "Comparative Evaluation of Rivastigmine Permeation from a Transdermal System in the Franz Cell using Synthetic Membranes and Pig Ear Skin with *In Vivo-In Vitro* Correlation," *Inter. J. Pharm.*, Vol. 512, pp. 234-241, 2016.
- [22] FDA. (1997). Guidance for Industry: SUPAC-SS Nonsterile Semisolid Dosage Forms: Scale-Up and Postapproval Changes: Chemistry, Manufacturing, and Controls; *In Vitro* Release Testing and *In Vivo* Bioequivalence Documentation.
- [23] Lalain T., et al., "Chemical Warfare Agents Decontamination Efficiency Testing Large-Scale Chamber mVHP Decontamination Evaluation," ECBC-TR-731, Edgewood Chemical and Biological Center, 2010.
- [24] Lakshmi K., et al., "ZnO/PAN Nanofiber Catalyst for Photodegradation of Methyl Paraoxon and Its Toxicological Evaluation Utilizing Early Life Stages of Zebra Fish," *Chem. Eng. J.*, Vol. 357, pp. 724-736, 2019.
- [25] SHANNON L., et al., "Review of Chemical Warfare Agent Simulants for the Study of Environmental Behavior," *Critical Rev. in Environ. Sci. and Tech.*, Vol. 38, pp. 112-136, 2008.
- [26] Song L., et al., "Photothermal Graphene Fabrics for Ultra Fast Catalytic Degradation of Chemical Warfare Agent Simulants," *J. Hazard. Mater.*, Vol. 393, pp. 122-132, 2020.
- [27] C. A. Moore, et al., "Use of a Human Skin *In Vitro* Model to Investigate the Influence of 'Every-Day' Clothing and Skin Surface Decontamination on the Percutaneous Penetration of Organophosphates," *Toxicol. Lett.*, Vol. 229, pp. 257-264, 2014.
- [28] C. A. Moore, et al., "Percutaneous Absorption and Distribution of Organophosphates (Chlorpyrifos and Dichlorvos) Following Dermal Exposure and Decontamination Scenarios using *In Vitro* Human Skin Model," *Toxicol. Lett.*, Vol. 229, pp. 66-72,



- 2014.
- [29] Dachir S., et al., "Dermostyx (IB1)-High Efficacy and Safe Topical Skin Protectant against Percutaneous Toxic Agents," *Chemico-Biological, Inter.*, Vol. 267, pp. 25-32, 2017.
- [30] Kadar T., et al., "A Topical Skin Protectant against Chemical Warfare Agents," *Israel Med. Ass. J.*, Vol. 5, pp. 717-719, Oct. 2003.
- [31] Ophir N., et al., "Using the Skin Protective Lotion IB1 as a Substitute for Chemical Protective Gloves," *Am. J. Emer. Med.*, Vol. 34, pp. 1986-1990, 2016.