

Kaempferol과 Nicotiflorin을 담지한 탄성 리포솜의 물리적 특성 및 *In Vitro* 피부 투과 연구

박소현 · 신혁수 · 윤민음 · 이상래 · 송바름 · 이난희[†] · 박수남[†]

서울과학기술대학교 정밀화학과 화장품융합기술연구소, 코스메틱 융·복합산업 지원 센터
(2017년 10월 19일 접수, 2017년 11월 29일 수정, 2017년 12월 14일 채택)

Physical Characterization and *In Vitro* Skin Permeation of Elastic Liposomes Loaded with Kaempferol and Nicotiflorin

So Hyun Park, Hyuk Soo Shin, Mid Eum Yun, Sang Lae Lee, Ba Reum Song,
Nan Hee Lee[†], and Soo Nam Park[†]

Department of Fine Chemistry, Cosmetic R&D Center, Cosmetic Industry Coupled Collaboration Center,
Seoul National University of Science and Technology, 232 Gongneung-ro, Nowon-Gu, Seoul 01811, Korea
(Received October 19, 2017; Revised November 29, 2017; Accepted December 14, 2017)

초록: 본 연구에서는 kaempferol 및 nicotiflorin의 피부 전달 시스템으로 인지질(PC)과 계면활성제(cetearyl glucoside)로 구성된 탄성 리포솜을 제조하였으며, 그 물리적 특성 및 *in vitro* 피부 투과능을 평가하였다. Kaempferol을 담지한 리포솜의 입자 크기는 121.5~157.8 nm, 포집 효율은 67.5~81.2%, 가변형률은 2.8~17.6%로 나타났다. Nicotiflorin을 담지한 리포솜의 입자 크기는 125.1~143.1 nm, 포집 효율은 52.0~66.1%, 가변형률은 1.1~17.7%로 나타났다. *In vitro* 피부 투과 실험 결과, 계면활성제가 15%(w/w)인 ELK3 및 ELN3이 일반 리포솜인 CLK 및 CLN보다 더 높은 피부 투과능을 갖는 것을 확인하였다. 최적 조건으로 선정된 EL3은 kaempferol 및 nicotiflorin 피부 흡수 증진을 위한 유용한 전달체로 이용될 것으로 기대된다.

Abstract: In this study, kaempferol and nicotiflorin loaded elastic liposomes (ELs) were investigated to enhance the transdermal delivery. The physical properties and *in vitro* permeation studies were performed using constructed ELs composed of egg phosphatidylcholine (PC) and edge activator (cetearyl glucoside). In kaempferol loaded liposomes, particle size ranged from 121.5 to 157.8 nm, deformability was recorded as 2.8~17.6%, and loading efficiency was from 67.5 to 81.2%. In nicotiflorin loaded liposomes, particle size ranged from 125.1 to 143.1 nm, deformability was recorded as 1.1~17.7%, and loading efficiency was from 52.0 to 66.1%. *In vitro* skin permeation studies demonstrated that elastic liposomes (ELK3 and ELN3) having 15%(w/w) cetearyl glucoside exhibited the higher skin permeability than CLK and CLN, the conventional liposome without cetearyl glucoside. The findings suggest that EL3 selected as the optimal formulation could be used as useful formulation for transdermal delivery of kaempferol and nicotiflorin.

Keywords: elastic liposome, kaempferol, nicotiflorin, transdermal delivery, skin permeation.

서 론

돌외(*gynostemma pentaphyllum*) 및 그라비올라(*annona muricata*) 추출물은 항염, 항균 및 항산화 활성과 같은 다양한 약리학적 활성을 나타내는 작용을 한다.¹⁻³ 저자들은 이전 연구에서 돌외 및 그라비올라의 주성분으로 kaempferol과

nicotiflorin이 있음을 보고한 바 있다. 플라보노이드 계열인 kaempferol 및 그 배당체인 nicotiflorin은 산화적 스트레스에 대한 손상 및 지질과산화를 저해한다고 알려져 있다. 또한 라디칼 소거 활성과 세포 보호 효과 그리고 항염 효과 등이 있는 것으로 보고되어 있다.^{4,6} 하지만, 우수한 활성에도 불구하고 열과 빛에 불안정하며, 용해도가 매우 낮은 이유로 화장품 제형으로 사용할 때 피부에서는 그 효능을 나타내는데 어려움이 있다.⁷

피부는 표피, 진피 및 피하지방의 3개 층으로 구성되어 있고 신체의 전신을 둘러싸고 있다. 그중 표피는 기저층, 유극

[†]To whom correspondence should be addressed.
snpark@seoultech.ac.kr, ORCID[®] 0000-0001-8819-2008
nanhee-cos@hanmail.net, ORCID[®] 0000-0002-2679-0296
©2018 The Polymer Society of Korea. All rights reserved.

층, 과립층 및 각질층으로 이루어져 있다. 피부의 최외각 층인 각질층은 각질세포들이 층을 이루고 있고 그 사이는 세포간지질로 구성되어 있는 brick and mortar 구조이다. 이는 외부의 자극으로부터 피부를 보호하는 강력한 피부장벽의 역할을 담당하고 있어 약물을 투과시키는데 어려움이 있다.^{8,9} 약물의 피부 투과 경로는 크게 피부 부속물을 통한 투과와 각질층을 통한 투과로 나뉜다. 모공, 땀샘과 같은 피부 부속물은 피부의 0.1% 정도 밖에 차지하지 않기 때문에 각질층을 통한 투과가 일반적이다. 특히 각질층에서 세포간지질을 따라 투과하는 것이 보다 효과적인 것으로 보고되고 있다.¹⁰ 따라서 이러한 피부장벽을 극복하고 세포간지질의 투과 효율을 증진시키기 위한 방안으로 다양한 경피 전달 시스템(transdermal delivery systems, TDS)이 개발되고 있는데, 그 중 대표적인 것이 리포솜이다.

리포솜은 양친매성 인지질로 구성된 구형 소포체로 피부 지질막과 유사한 지질 이중층 구조이다. 따라서 생체 친화성이 높으며 친수성 또는 소수성 약물을 모두 포집시켜 피부흡수를 증진시키는 전달체이다.¹¹⁻¹³ 하지만, 리포솜은 낮은 포집 효율, 제형 내에서의 불안정성, 활성 성분의 물에 대한 낮은 용해도, 지질의 산화 및 가수분해 가능성 등의 여러 단점을 가지고 있다. 이러한 문제점을 개선하기 위해 에토솜, 탄성 리포솜, 코팅 리포솜, 양이온 리포솜 등 새로운 전달체 개발에 대한 연구들이 활발히 진행되고 있다.^{14,15}

탄성 리포솜은 1990년대 초 G. Cevc가 새롭게 제안한 피부 전달체로 transfersome, deformable liposome, elastic liposome 등으로 불리우며, 구성은 인지질과 단일 사슬 계면활성제로 되어 있다. 이 시스템에서 계면활성제는 edge activator로 작용하여 높은 곡률 반경을 갖게 하고, 지질 이중층 막에 탄성 및 유연성을 갖게 한다. 이러한 특징으로 인하여 탄성 리포솜은 자신의 크기보다 더 작은 각질층의 구멍을 통과할 수 있기 때문에, 기존 리포솜에 비해 유효 성분을 효과적으로 피부에 전달할 수 있는 것으로 알려져 있다.¹⁶ 탄성 리포솜의 연구에서 edge activator로는 sodium cholate, Tween 80, Span 80 등의 계면활성제가 주로 사용되었다.¹⁷⁻¹⁹ 화장품 제형에서 널리 사용되는 계면활성제 polyethylene glycols(PEG)은 무독성 수용성 고분자 물질로 자체는 독성이 없지만 화장품 제조 공정에서 1,4-dioxane이 부산물로 생성될 수 있으며 독성과 민감성 피부 반응이 보고된 바 있기 때문에 사용이 감소하는 추세이다.²⁰ Cetearyl glucoside는 코코넛 유래의 cetearyl alcohol과 glucose의 축합반응으로 얻을 수 있는 천연 계면활성제로 사용감이 우수하고 피부에 부담을 주지 않는 순한 원료로 각광받고 있다.²¹ 따라서 본문에서는 PEG-free 계면활성제인 cetearyl glucoside를 사용하여 탄성 리포솜을 제조하고자 하였다.

본 연구에서는 항산화 및 피부 세포 보호활성이 있는 플라보노이드 계열의 난용성 물질인 kaempferol 및 nicotiflorin의

피부 흡수 증진을 위한 약물 전달 시스템으로 인지질과 비이온 계면활성제 cetearyl glucoside를 이용한 탄성 리포솜을 제조하였다. 또한 탄성 리포솜의 입자크기, 포집 효율, 가변형률, 제형의 안정성 및 경피 흡수능을 측정하여 비교하였다. 이러한 연구를 통하여 천연 항산화제인 플라보노이드를 담지한 탄성 리포솜 제형이 피부 전달에 어떠한 효과를 나타내는지를 확인함으로써 항노화 및 항산화 화장품 제형으로서의 이용 가능성을 알아보고자 하였다.

실 험

시약 및 기기. *L*- α -Phosphatidylcholine(from egg yolk, $\geq 60\%$, egg PC)는 Sigma-Aldrich(USA)사에서 구입하여 사용하였다. 비이온 계면활성제인 cetearyl glucoside은 한국콜마(주)로부터 제공받았다. 제형 내 담지물질인 kaempferol 및 nicotiflorin은 코아사이언스(Korea)사에서 구입하여 사용하였으며 그 구조는 Figure 1에 나타내었다. Folin-ciocalteu's phenol reagent 및 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-di-phenyltetrazolium bromide(MTT)는 Sigma Chemical Co.(USA)에서 구입하였고, 1,3-butylene glycol, methanol, ethanol, chloroform, acetic acid, acetonitrile 등은 시판 특급시약을 사용하였다.

리포솜 제조에는 회전 증발기(Buchi, Switzerland)와 초음파 파쇄기(Branson, USA)를 사용하였고, 제형의 입자 크기는 ELS-Z2(Otsuka, Japan)를 사용하여 측정하였다. 리포솜의 가변형률 측정은 mini extruder(Avanti polar lipids)와 syringe pump(KDS330 Revodix, Korea)를 사용하여 수행하였다. 포집효율 측정에는 정량 분석을 위해 high-performance liquid chromatography(HPLC)는 Shimadzu(Japan)사 제품을 사용하였으며, 피부 투과 실험에는 Permeagear(USA)사의 9 mm Franz diffusion cell(receptor volume 5 mL)과 V6A Stirrer 모델을 사용하였다. MTT 실험에서 사용되는 ELISA reader는 Tecan(Austria)사의 제품을, pH 미터는 Mettler-Toledo(Switzerland)를 사용하였다.

탄성 리포솜의 제조. 탄성 리포솜은 얇은 막 수화법으로

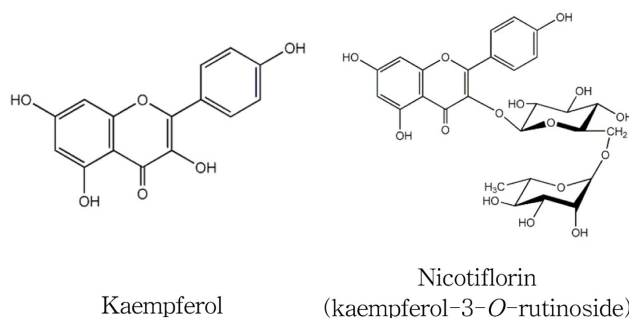


Figure 1. Chemical structures of kaempferol and nicotiflorin (kaempferol-3-O-rutinoside).

Table 1. Composition of Different Types of Liposomes Containing either Kaempferol or Nicotiflorin

	PC ^a (w/w%)	S ^b (w/w%)	Kaempferol (mM)	Nicotiflorin (mM)
CLK	100	-	0.5	-
ELK1	95	5	0.5	-
ELK2	90	10	0.5	-
ELK3	85	15	0.5	-
ELK4	80	20	0.5	-
CLN	100	-	-	0.5
ELN1	95	5	-	0.5
ELN2	90	10	-	0.5
ELN3	85	15	-	0.5
ELN4	80	20	-	0.5

^aPC: Egg phosphatidylcholine, ^bS: Cetearyl glucoside, CLK: Kaempferol loaded conventional liposome, ELK: Kaempferol loaded elastic liposome, CLN: Nicotiflorin loaded conventional liposome, ELN: Nicotiflorin loaded elastic liposome.

제조하였으며, 구성 성분과 조성은 Table 1에 나타내었다. 50 mL 둥근 바닥 플라스크에 kaempferol 및 nicotiflorin을 각각 0.5 mM이 되도록 넣은 후, 인지질과 계면활성제를 각기 다른 비율(100:0, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20)로 하여 메탄올과 클로로포름 1:5(v/v%) 혼합 용액에 용해시킨다. 회전 증발농축기를 이용하여 유기용매를 완전히 제거한 후 벽면에 얇은 지질막을 형성시켰다. 형성된 지질막을 phosphate buffer (1.6 mM NaH₂PO₄ · 2H₂O와 9.6 mM Na₂HPO₄ · 12H₂O, pH 7.4) 10 mL로 수화하여 탄성 리포솜을 형성시킨다. 이렇게 얻어진 탄성 리포솜의 입자 크기를 균일하게 하기 위하여 glass beads를 넣고 30% 세기로 10분 동안 초음파 파쇄기를 가해주었다. 제조된 리포솜 현탁액을 1.2 µm syringe filter (Minisart CA 26 mm, Germany)를 이용하여 포집되지 않은 kaempferol 및 nicotiflorin을 제거한다. 탄성 리포솜 제형의 지질과 계면활성제의 총 함량은 1.0%(w/v)로 하였다.

입자 사이즈 및 제타 포텐셜. 리포솜의 입자 사이즈는 dynamic light scattering(Otsuka ELS-Z2, Otsuka Electronics, Japan)을 이용하여 측정하였다. 측정 온도는 25 °C, 산란각은 165°, 광원으로는 argon 레이저를 사용하였다. 평균 입자 크기는 cumulative 분석법으로 나타내었고 분포도는 contin 법으로 해석하였다. 제타 포텐셜은 zetasizer(Malvern Instruments, UK)를 이용하여 측정하였다. 입자 사이즈는 70번씩 3회 측정하여 평균을 나타내었으며, 제타 포텐셜은 10번씩 3회 측정하였다.

약물 포집 효율. 리포솜 현탁액 1 mL를 취하여 에탄올 10 mL를 넣고 리포솜 막을 파괴시킨다. 회전 증발기를 이용하여 용매를 증발시킨 후 다시 1 mL 에탄올을 넣어준다.

Kaempferol 및 nicotiflorin의 농도를 HPLC를 이용하여 정량하였다. 분석용 column으로는 Shimpack VP-ODS C18 column(4.6×250 mm, 5 µm; Shimadzu, Japan)을 사용하였다. 이동상 용매는 B용매 0.5% acetic acid/50% acetonitrile으로, 유속은 1.0 mL/min, 시료는 10 µL를 주입하여 B용매 100%로 10분간 수행하였다. Column 오븐 온도는 40 °C로 설정하고, UV wavelength는 nicotiflorin 348 nm, kaempferol 367 nm로 고정하여 수행하였다. 표준용액을 이용하여 농도별 kaempferol 및 nicotiflorin의 표준 검정 곡선을 작성한 후 포집된 kaempferol 및 nicotiflorin의 농도를 산출하였고, 나온 값을 식 (1)에 대입하여 리포솜의 포집 효율을 계산하였다.

$$\text{Entrapment efficiency(\%)} = \frac{C_F}{C_T} \times 100 \quad (1)$$

C_T: 처음 넣어준 약물의 농도

C_F: 1.2 µm syringe filter를 통과한 약물의 농도

가변형률. 리포솜 막의 변형률을 평가하기 위해 mini extruder를 사용하였다. 즉, 리포솜에 0.2 MPa의 압력을 1분 동안 가했을 때 0.08 µm 크기의 기공을 갖는 폴리카보네이트 막을 통과시켰다. 압출 전후의 리포솜 입자 크기를 dynamic light scattering를 이용하여 측정하였다. 변형률은 식 (2)에 대입하여 계산하였다.

$$\text{Deformability(\%)} = \frac{S_B - S_A}{S_B} \times 100 \quad (2)$$

S_B: 압출 전 입자 크기

S_A: 압출 후 입자 크기

탄성 리포솜의 안정성. 제조된 리포솜 제형들의 물리적 안정성을 확인하기 위해 리포솜 현탁액을 4주간 4 °C에서 냉장 보관하며 관찰하였다. 4주간 입자 크기, 다분산 지수 (polydispersity index, PDI)값 변화를 측정하였으며 침전 형성의 여부를 관찰하였다. 입자 크기와 PDI값 측정은 앞서 언급한 방법과 동일하게 진행하였다.

형태학적 관찰. 제조된 탄성 리포솜의 형태학적 관찰을 위해 scanning electron microscope(SEM, Tescan Vega3, Tescan, Czech)을 이용하였다. 알루미늄 호일 위에 각 샘플을 10 µL 씩 적하하여 24시간 동안 자연 건조시킨 후 Pt로 코팅하여 관찰하였다.

세포배양. 사람 각질형성 세포주인 HaCaT 세포는 Dr. Fusenig(German Cancer Research Center, DKFZ)로부터 분양받아 사용하였다. 세포배양에 사용된 배지(Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM, Capricorn, Germany)는 10% fetal bovine serum(FBS, PAA, Austria), 1% penicillin/streptomycin(P/S, PAA, Austria)을 혼합하여 사용하였고,

37 °C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

MTT Assay. 세포 생존율은 MTT assay를 이용하여 측정하였다. 살아있는 세포의 미토콘드리아는 dehydrogenase 효소를 가지고 있는데 이 효소는 노란색의 수용성 기질인 MTT를 진청색의 비수용성 formazan으로 변환시킨다. 따라서 생성된 formazan의 양을 측정하면 살아있는 세포 수를 알 수 있다. 실험군을 농도 별로 10배 희석하여 세포에 24시간 처리한 후, DPBS로 2회 세척하고 2 µg/mL 농도의 MTT 용액 (Sigma, USA)을 첨가하여 30분 동안 반응시켜 formazan 결정을 생성시켰다. MTT 용액을 제거하고 생성된 formazan 결정을 DMSO에 용해하여 570 nm 파장에서 ELISA reader로 흡광도를 측정하였다.²² 실험군으로는 빈 탄성 리포솜, kaempferol 및 nicotiflorin을 담지한 탄성 리포솜, 그리고 양성대조군으로서 sodium laureth sulfate(SLES)를 탄성 리포솜의 계면활성제 함량과 동일하게 제조하여 사용하였다.

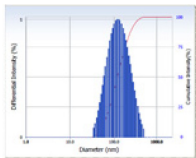
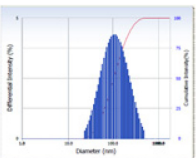
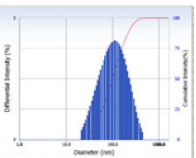
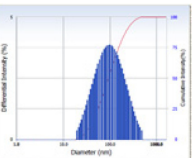
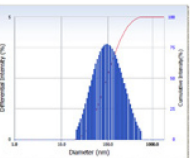
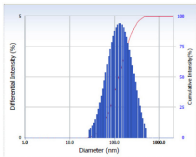
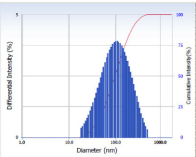
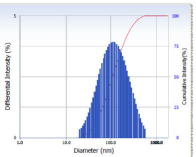
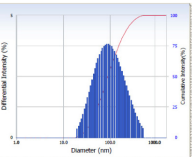
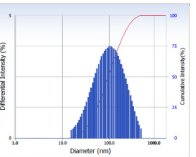
***In Vitro* 피부 투과.** 탄성 리포솜의 *in vitro* 피부 투과 연구는 Franz diffusion cells(PermeGear, USA)를 이용하여 수행하였다. Hairless mice(6 weeks, female)의 등에서 적출한 피부는 피하지방과 과도한 조직들은 제거한 후 사용하였다. Donor와 receptor phase 사이에 각질층이 위로 향하도록 피부를 고정시켰다. 샘플이 적용되는 피부의 면적은 모두 0.6362 cm²로 모두 통일하여 진행하였다. Receptor chamber에 receptor phase(EtOH:PBS = 3:7(v/v %))를 채우고 24시간 동안 150 rpm으로 교반하였다. 항온수조를 이용하여 온도는

37 °C로 유지하였다. Donor compartment 내 피부에 동일한 농도의 시료 0.4 mL를 처리하였다. 24시간 후 sampling port를 통해 receptor phase를 채취하였다. 각질층과 피부가 함유하고 있는 kaempferol 및 nicotiflorin의 양을 측정하기 위해 피부의 표면은 PBS 용액을 이용하여 세척하였다. 각질층은 3 M scotch tape(Korea 3M)를 이용하여 stripping 방법으로 3회 제거하였고, 이 후 tape와 피부 내에 있는 kaempferol 및 nicotiflorin은 각각 100% 에탄올로 sonication을 이용하여 용해시켰다. 채취된 kaempferol 및 nicotiflorin의 농도는 UV/Vis 분광 광도계로 결정하였다.

결과 및 토론

입자 사이즈 및 제타 포텐셜. Kaempferol 및 nicotiflorin을 담지 혹은 담지하지 않은 일반 리포솜 및 탄성 리포솜을 준비하고 물리화학적 특성을 비교하였다. 제조된 리포솜들의 입자 사이즈, PDI 및 제타 포텐셜 값은 Table 2에 나타내었다. 제조된 탄성 리포솜 ELK 및 ELN은 계면활성제의 함량이 5~15%(w/w)로 증가할수록 평균 입자 크기가 각각 157.8~121.5 nm, 143.1~125.1 nm로 감소하였다. 특히, 탄성 리포솜(ELK 및 ELN)의 경우 일반 리포솜(CLK 및 CLN)에 비해 입자 사이즈가 상당히 감소하는 경향을 보였다. 이는 계면활성제인 cetearyl glucoside의 첨가로 인해 막의 유동성이 증가하고 리포솜의 계면장력이 감소되었기 때문이라고 사료된다.^{23,24} 입

Table 2. Mean Particle Size, Polydispersity Index, and Zeta Potential of Liposomes Containing either Kaempferol or Nicotiflorin

Formulation codes	CLK	ELK1	ELK2	ELK3	ELK4
Size of kaempferol loaded liposome (nm)					
	157.8±8.1	133.5±1.6	128.7±7.0	121.5±2.9	138.6±5.7
Zeta potential (mV)	-5.7±0.9	-5.7±0.6	-7.0±1.1	-6.9±1.6	-6.6±1.4
PDI value	0.256±0.003	0.264±0.008	0.269±0.006	0.271±0.006	0.275±0.005
Formulation codes	CLN	ELN1	ELN2	ELN3	ELN4
Size of nicotiflorin loaded liposome (nm)					
	143.1±9.0	139.3± 3.1	137.7±8.2	125.1±7.4	131.6±5.7
Zeta potential (mV)	-6.6±1.6	-7.2±2.0	-6.4±1.1	-8.2±2.0	-9.0±1.0
PDI value	0.265±0.021	0.279±0.004	0.276±0.004	0.281±0.001	0.285±0.002

Values are presented as mean±SD (n=3).

자 사이즈가 작을수록 피부 각질층을 통과하기가 유리하기 때문에 이러한 경향은 활성물질의 투과 효율 증진에 매우 효과적일 것으로 사료된다. 그러나 계면활성제 비율이 20%인 ELK4 및 ELN4 제형은 입자 크기가 커진 것을 확인할 수 있었는데 이는 계면활성제가 edge activator로서 기능할 수 있는 비율 이상으로 과량 첨가되어 지질막을 붕괴시켜 불안정해지면서 입자 크기가 커진 것으로 사료된다. 또한 ELN1~3이 ELK1~3보다 입자 사이즈가 크게 나타났다. 이는 nicotiflorin에 당이 붙어있어 입체 효과로 인해 입자 사이의 간격이 커지면서 나타난 결과로 보여진다. PDI는 모든 제형에서 약 0.3 이하로 입자가 단분산된 형태를 나타내는 것을 알 수 있다.

제타 포텐셜은 리포솜 표면의 정전기적 반발력으로 리포솜과 피부간 상호작용뿐만 아니라 리포솜의 물리적 안정성에도 영향을 미친다. 리포솜 표면의 정전기적 반발력의 존재는 리포솜간의 응집을 방해한다.²⁵ Kaempferol 및 nicotiflorin을 담지한 모든 제형에서 제타 포텐셜 값은 -10~5 mV의 음의 전하 값을 나타내었다. 이는 pH 7.4 buffer에서 PC의 인산기가 음전하를 띠기 때문이다.²⁶

약물 포집 효율. 제형 내 kaempferol 및 nicotiflorin의 포집 효율은 Figure 2에 나타내었다. CLK 및 ELK1~3의 포집 효율은 각각 71.2, 67.5, 76.4, 81.2%로 나타났다. CLN 및 ELN1~3의 포집 효율은 각각 52.0, 56.6, 61.5, 66.1%로 나타났다. 계면활성제 함량이 5~15%로 증가할수록 kaempferol 및 nicotiflorin의 포집효율이 증가함을 확인하였다. 반면, 계면활성제 비율이 20%인 ELK4 및 ELN4는 각각 77.9, 53.9%로

ELK3 및 ELN3보다도 포집효율이 감소하였다. 특정 농도 이상의 계면활성제가 사용되면 마이셀이 형성되어 제형 내에 마이셀과 리포솜이 혼합되므로 리포솜의 포집효율을 감소시킨 것으로 사료된다.²⁷ 따라서 활성 물질의 피부 전달 효율을 낮추는 결과를 가져올 수 있다. 또한 모든 제형에서 nicotiflorin보다 kaempferol의 포집 효율이 다소 높게 나타났다. 이러한 포집 효율의 차이는 당의 유무에 따른 구조적 차이에 의한 것으로 보인다. 리포솜이 형성될 때 비배당체인 kaempferol은 지질막을 따라 인지질 이중층 내부로 포집되지만, 배당체인 nicotiflorin은 수상과의 친화성으로 인해 지질막 바깥쪽에 안정하게 존재할 것이다. 따라서 nicotiflorin은 리포솜 외부의 수상에 존재하는 양이 더 많기 때문에 포집효율이 더 낮게 나타난 것으로 보인다.

가변형률. 탄성 리포솜의 막 유연성은 피부를 통과하기 힘든 기존의 리포솜과 차별화할 수 있는 특성이다. 리포솜 막의 유연한 특성으로 인해 리포솜 자체의 크기보다 훨씬 작은 각질층의 구멍을 통과할 수 있도록 하여 유효성분을 피부 깊숙이 전달할 수 있도록 한다.²⁸ 결과적으로 리포솜은 피부 각질층을 통해 침투할 때 주변 응력 또는 공간 제한에 의해 막이 변형되게 되는데, 이 때 탄성 리포솜은 모양에 변화를 주어 리포솜 막의 변형 및 파괴를 최소화한다. 제조된 제형들의 가변형률은 extruder 장치를 사용하여 평가하였으며 그 결과는 Table 3에 나타내었다. 측정 결과, 계면 활성제가 첨가되지 않은 CLK 및 CLN의 변형률은 각각 17.6, 17.7%로 나타났다. 계면활성제가 첨가된 ELK1~4의 변형률은 각각 12.2, 5.0, 2.8, 6.2%로 일반 리포솜보다 변형률이 낮았으며, ELK3이 가장 변형이 적었다. ELN1~4의 변형률 또한 10.1, 2.8, 1.1, 3.0%로 일반 리포솜보다 변형률이 낮았으며, ELN3이 가장 변형이 적었다. 계면활성제 비율이 일정 농도 이상으로 증가하면 마이셀이 형성되어 막의 유동성을 상실하고 변형률이

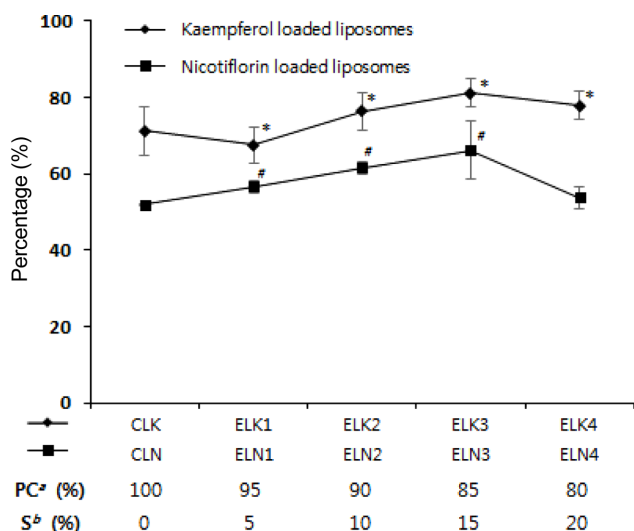


Figure 2. Entrapment efficiency of different liposomal preparations that contained kaempferol and nicotiflorin. * $p < 0.05$ compared with CLK, # $p < 0.05$ compared with CLN. Values are presented as mean $\pm$ SD (n=3).

Table 3. Deformability of Liposomes Containing either Kaempferol or Nicotiflorin

Formulation codes	Deformability (%)
CLK	17.6 $\pm$ 4.0
ELK1	12.2 $\pm$ 4.7
ELK2	5.0 $\pm$ 3.1
ELK3	2.8 $\pm$ 1.2
ELK4	6.2 $\pm$ 1.5
CLN	17.7 $\pm$ 3.9
ELN1	10.1 $\pm$ 4.7
ELN2	2.8 $\pm$ 1.2
ELN3	1.1 $\pm$ 3.4
ELN4	3.0 $\pm$ 3.0

Values are presented as mean $\pm$ SD (n=3).

증가한 것으로 사료된다.²⁷ 결과적으로 일반 리포솜은 압출 후에 크기가 크게 감소된 반면, 계면활성제를 포함하는 최적화된 비율의 탄성 리포솜(ELK3 및 ELN3)은 압출 후 원래의 크기로 거의 회복됨에 따라 연성이 있음을 확인하였다. 이는 리포솜 내 계면활성제가 지질막 이중층에 존재하는 인지질의 패키징에 변화를 줌으로써 막의 탄성이 증진된 결과로 볼 수 있다.²⁹

탄성 리포솜의 안정성. 탄성 리포솜의 저장 기간에 따른 입자 크기 및 PDI 변화는 리포솜 막의 물리적 안정성을 평가하는데 중요한 지표로 작용한다. 일반적으로 리포솜 막이 불안정해지면 리포솜 입자간의 간격이 좁아지게 되면서 입자 크기가 커지는 경향이 있는 것으로 보고되고 있다.³⁰ 본 연구에서는 안정성을 평가하기 위해서 리포솜을 제조한 직후와 4°C에서 4주 동안 보관한 후에 입자 크기 및 PDI 값을 비교하였다. 그 결과 모든 리포솜 제형에서 입자 크기 변화는 제조 직후와 큰 차이를 보이지 않았으며, PDI 값은 0.3 미만으로 일정하게 유지하였다(Figure 3). 또한 관찰 시에 눈에 띄는 응집, 상 분리 현상이 관찰되지 않았다. 따라서 4°C에서 4주 동안 제형의 안정성이 유지됨을 확인할 수 있었다.

또한 다양한 환경 조건에서의 안정성 확인을 위해 25 °C와

pH 5.5에서 입자사이즈, PDI 및 제타 포텐셜 수치 변화를 확인하였다. 25 °C에서 CLK 및 CLN의 입자사이즈는 145.2 및 165.5 nm였고, PDI 값은 0.259 및 0.258이었고, 제타 포텐셜은 -8.4 및 -4.8 mV이었다. 3주 후에는 입자사이즈가 137.9 및 173.2 nm였고, PDI 값은 0.263 및 0.277이었고, 제타 포텐셜은 -13.1 및 -8.7 mV이었다. 그리고 ELK3 및 ELN3의 입자사이즈는 141.5 및 142.8 nm였고, PDI 값은 0.273 및 0.274이었고, 제타 포텐셜은 -5.5 및 -8.8 mV이었다. 3주 후에는 입자사이즈가 132.6 및 152.5 nm였고, PDI 값은 0.27 및 0.279이었고, 제타 포텐셜은 -10.2 및 -16.3 mV이었다.

pH 5.5에서 CLK 및 CLN의 입자사이즈는 96.2 및 105.3 nm였고, PDI 값은 0.258 및 0.262이었고, 제타 포텐셜은 -9.1 및 -6.7 mV이었다. 3주 후에는 입자사이즈가 88.2 및 106.1 nm였고, PDI 값은 0.262 및 0.278이었고, 제타 포텐셜은 -12.3 및 -10.6 mV이었다. 그리고 ELK3 및 ELN3의 입자사이즈는 118.3 및 123.5 nm였고, PDI 값은 0.263 및 0.264이었고, 제타 포텐셜은 -8.9 및 -7.4 mV이었다. 3주 후에는 입자사이즈가 111.0 및 134.5 nm였고, PDI 값은 0.264 및 0.276이었고, 제타 포텐셜은 -12.1 및 -13.3 mV으로 나타났다(data not shown). 따라서 25 °C 및 pH 5.5에서 3주 동안 제형의 안정

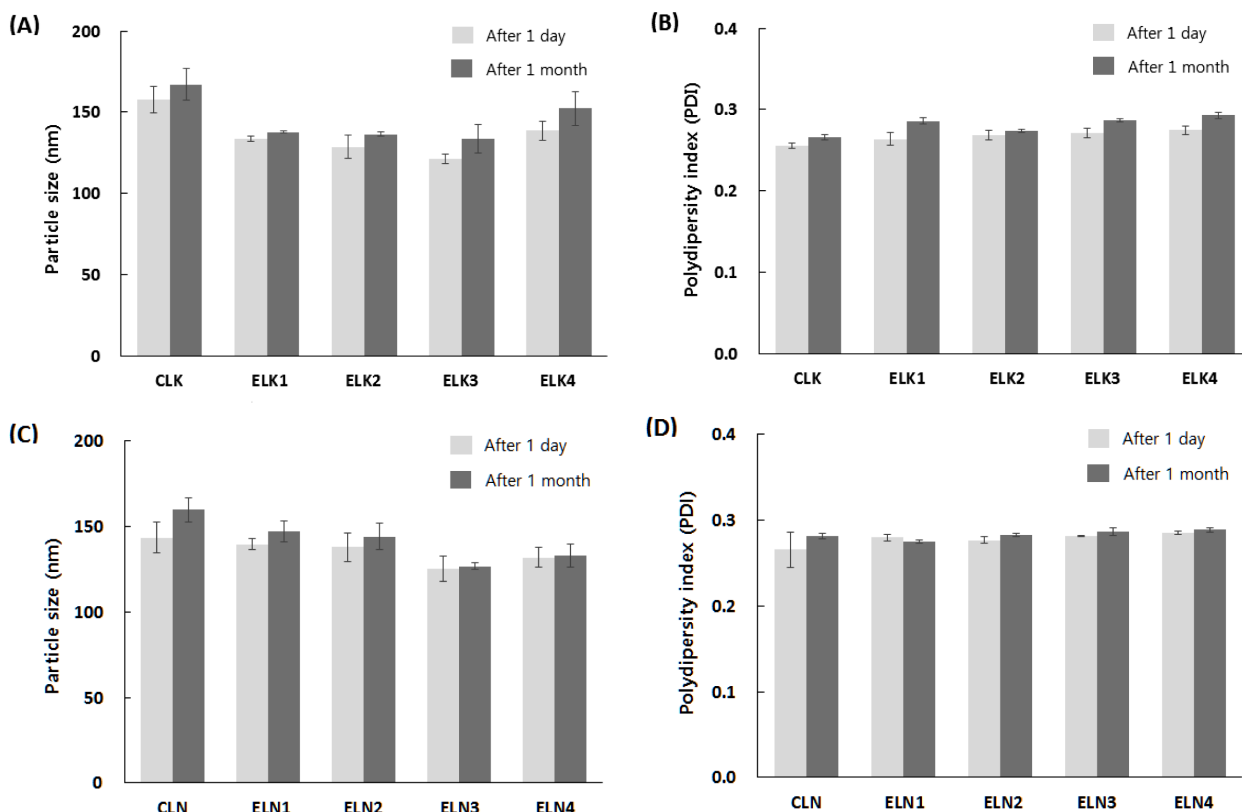


Figure 3. Storage stability of liposomes containing either kaempferol or nicotiflorin: (A) change of particle size of liposomes loaded with kaempferol; (B) change of polydispersity index of liposomes loaded with kaempferol; (C) change of particle size of liposomes loaded with nicotiflorin; (D) change of polydispersity index of liposomes loaded with nicotiflorin over 1 month. Values are presented as mean±SD (n=3).

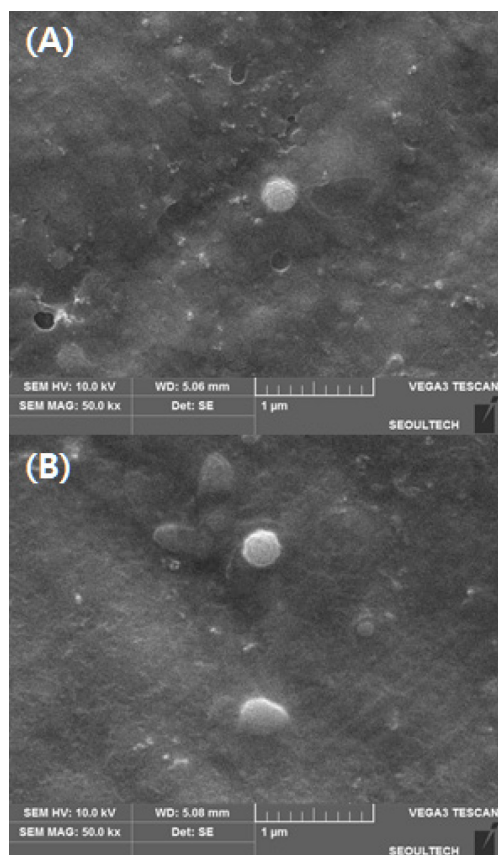


Figure 4. SEM images of (A) kaempferol loaded elastic liposomes; (B) nicotiflorin loaded elastic liposomes.

성이 유지됨을 확인할 수 있었다.

형태학적 관찰. Kaempferol 및 nicotiflorin을 담지한 탄성 리포솜의 형태를 관찰하기 위하여 SEM을 통해 확인하였다 (Figure 4). 높은 포집효율과 낮은 막 변형률을 갖는 계면활성제 15%(w/w)의 제형 ELK3과 ELN3을 최종적으로 선정하여 관찰하였다. 개발된 제형이 안정한 구형을 이루고 있는 것을 확인하였다.

MTT Assay. 새로운 약물 전달 시스템을 개발하였을 때, 실제 적용에 있어서 생물학적 안전성을 평가하는 것은 매우 중요하다. 본 연구에서는 사람 각질 형성세포주인 HaCaT 세포를 이용하여 탄성 리포솜의 세포 독성 평가를 수행하였다 (Figure 5). 최적의 조건으로 선정된 계면활성제 15%(w/w)의 제형 ELK3과 ELN3, 그리고 담지물질 kaempferol 및 nicotiflorin이 미치는 영향을 배제하기 위해 빈 탄성 리포솜 (EL3)을 사용하여 함께 비교하였다. 실험은 세포 독성의 차이를 확연히 나타낼 수 있는 농도 범위(2, 5 및 10%)에서 수행하였다. 모든 제형에서 5% 농도까지는 세포 생존율이 80% 이상으로 나타났다. 그러나 10% 농도에서 EL3은 세포 생존율이 73.9%로 감소하였다. 반면, ELK3은 가장 높은 세포 생

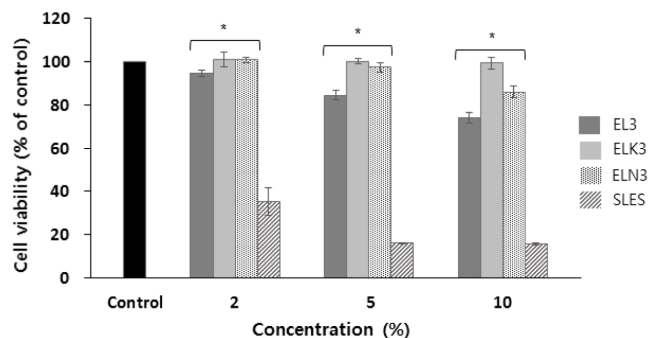


Figure 5. Cell viability of unloaded EL, kaempferol loaded EL, nicotiflorin loaded EL, and SLES solution in HaCaT cell system. (EL3: unloaded elastic liposome with 15%(w/w) surfactant, SLES: sodium laureth sulfate). * $p < 0.05$ compared with SLES. Values are presented as mean $\pm$ SD (n=4).

존율을 나타냈는데, 이는 제형에 담지한 활성물질 kaempferol이 세포 보호 작용이 뛰어나 나타난 결과로 사료된다.³¹ 피부 자극 시험에서 대조군으로 사용되는 SLES의 세포 생존율은 현저히 감소하는 것을 확인했다. 비록 농도가 증가함에 따라 생존율이 감소하는 경향이 관찰되었지만 cetearyl glucoside는 매우 낮은 자극성을 갖는 안전한 계면활성제임을 알 수 있다. 이는 개발된 탄성 리포솜이 천연 계면활성제를 사용함으로써 잠재적인 무독성 경피 전달 시스템이라는 것을 입증한다. 본 연구에서 제시된 MTT 결과는 개발된 탄성 리포솜이 경피 전달체로서 응용 가능성이 있음을 시사한다.

In Vitro 피부 투과. 본 연구에서는 돼지 및 그라비올라의 플라보노이드로 알려진 kaempferol과 nicotiflorin의 피부 흡수 증진을 위해 탄성 리포솜 경피 전달 시스템을 개발하였다. 또한 개발된 전달 시스템이 기존 전달 시스템과 비교하여 피부 흡수능에 어떠한 영향을 미치는지 알아보하고자 Franz diffusion cell을 이용하여 *in vitro* 피부 투과 능력을 평가하였다 (Figure 6). 실험에는 최적의 조건으로 선정된 계면활성제 15%(w/w)의 제형 ELK3과 ELN3, 그리고 일반 리포솜인 CLK와 CLN, 그리고 대조군으로 1,3-butylene glycol(1,3-BG)에 녹인 kaempferol 및 nicotiflorin을 사용하였다. 본 실험에 사용된 kaempferol 및 nicotiflorin 담지 제형들은 밀폐된 조건 하에 24시간 동안 도포되었다. 결과는 24시간 후 kaempferol 및 nicotiflorin의 양을 정량하여 나타낸 것으로, 각질층에 존재하는 물질의 양(tape), 각질층을 제외한 표피와 진피에 존재하는 물질의 양(skin), 피부를 투과한 양(transdermal)으로 구분하여 나타내었다. 개발된 탄성 리포솜을 이용한 결과, 각질층에 존재하는 양(tape)은 대조군과 유사하게 나타났지만, 표피와 진피에 존재하는 양(skin)은 약간 증가하였고 피부를 투과한 양(transdermal)은 크게 증가하였다. 결과적으로 총 피부 흡수능은 대조군인 1,3-BG의 경우 nicotiflorin 7.8%, kaempferol 9.9%로 실험군에 비하여 낮은 피부 흡수능을 보였고, 일반

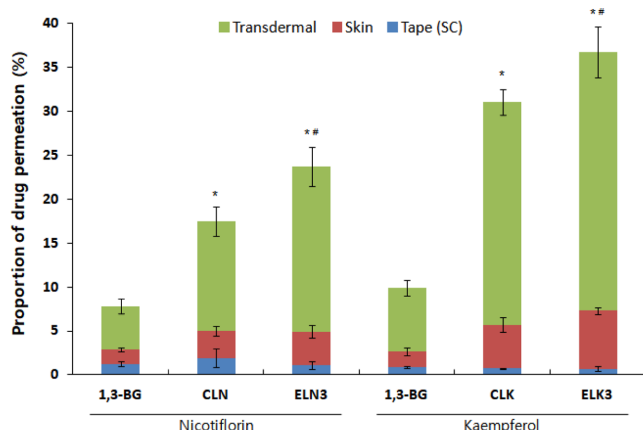


Figure 6. Proportions of permeated kaempferol and nicotiflorin in 1,3-BG solution, conventional liposome and elastic liposome after 24 h. (Tape: stratum corneum, Skin: epidermis without stratum corneum and dermis, Transdermal: permeated through skin, 1,3-BG: 1,3-butylene glycol). * $p < 0.05$ compared with 1,3-BG, # $p < 0.05$ compared with conventional liposome. Values are presented as mean $\pm$ SD (n=3).

리포솜의 경우 nicotiflorin 17.5%, kaempferol 31.1%로 대조군에 비해 크게 향상된 피부 투과능을 나타내었고, 탄성 리포솜의 경우 nicotiflorin 23.7%, kaempferol 36.8%로 일반 리포솜에 비해 더욱 향상된 피부 투과능을 나타내었다. 이는 탄성 리포솜의 작은 입자 크기와 막 유연성이 약물의 높은 피부 투과능에 영향을 미쳤다고 사료된다. 즉, 탄성 리포솜은 지질막 사이에 첨가된 계면활성제가 지질막의 유연성을 증가시키며, 이러한 특성은 리포솜이 생체막과 융합하는 것을 촉진시켜 약물의 피부 투과를 증진시킬 수 있다.³² 또한 kaempferol의 피부 투과율이 nicotiflorin보다 현저히 높게 나타났다. 이는 비배당체 구조가 배당체보다 지질막 사이를 투과하는데 유리하여 나타난 결과로 여겨진다. 이렇게 피부에 전달된 kaempferol 및 nicotiflorin은 산화적 스트레스에 대한 세포 보호 효과 및 항산화 효과를 나타내어 콜라겐이나 엘라스틴과 같은 피부조직의 절단 및 비정상적인 가교결합을 억제할 것이다. 또한 사람 피부 세포에서 콜라겐 및 엘라스틴 분해효소인 matrix metalloproteinases(MMPs)의 활성을 억제하여 피부 노화억제에 효과적으로 작용할 것으로 사료된다. 결론적으로, 24시간 동안 진행한 피부 침투능 실험으로 대조군 및 일반 리포솜과 비교하여 탄성 리포솜이 가장 높은 피부 투과율을 나타내는 것을 확인하였으며, 이는 kaempferol과 nicotiflorin을 피부에 전달하여 다양한 피부 질환을 방어하기 위한 효과적인 약물 전달체로 응용될 수 있음을 시사한다.

결론

본 연구에서는 돌외 및 그라비올라의 플라보노이드로 알려

진 kaempferol과 그 배당체인 nicotiflorin을 보다 효율적으로 피부에 전달하고자 인지질과 비이온 계면활성제로 구성된 탄성 리포솜을 제조하였으며, 이 제형의 물리적 특성, *in vitro* 피부 투과능 및 사람 피부 세포에 대한 독성을 평가하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

(1) Kaempferol을 담지한 일반 리포솜 및 탄성 리포솜은 121.5~157.8 nm의 크기를 나타내었고, nicotiflorin을 담지한 일반 리포솜 및 탄성 리포솜은 125.1~143.1 nm의 크기를 나타내었다. 계면활성제의 함량이 5~15%로 증가할수록 입자 크기가 감소하였으며, 계면활성제 함량이 20%에서는 리포솜 막의 불안정성으로 인해 입자크기가 다시 증가하였다.

(2) 일반 리포솜 및 탄성 리포솜에 포집된 kaempferol의 포집효율은 67.5~81.2%, nicotiflorin의 포집효율은 52.0~66.1%로 kaempferol의 포집효율이 nicotiflorin보다 높게 나타났다. 계면활성제 함량이 5~15%로 증가할수록 포집효율이 증가하는 것을 확인하였으며, 계면활성제 함량이 20%에서는 다시 감소하였다. 가장 높은 포집효율을 나타낸 제형은 ELK3 (81.2%) 및 ELN3(66.1%)이었다.

(3) 일반 리포솜 및 탄성 리포솜의 가변형률을 측정된 결과, CLK 및 CLN은 각각 17.6, 17.7%로 리포솜 크기가 크게 감소하여 막이 파괴되었음을 알 수 있었다. 그러나 계면활성제 함량이 증가할수록 변형률이 2.8, 1.1%까지 감소하여 막의 유연성이 증가했음을 확인하였다. 그러나 20%의 계면활성제를 함유한 제형에서는 변형률이 약간 증가하였다.

(4) 가장 높은 포집효율과 가장 낮은 변형률을 나타낸 최적의 탄성 리포솜은 ELK3과 ELN3이었다. 따라서 이 제형의 적용을 위해 MTT assay를 이용하여 피부 세포에 대한 독성을 평가하였다. 리포솜 용액의 5% 농도에서 세포 생존율 80% 이상을 나타내어 독성 안전성에 대한 결과를 확보하였다. 이는 대조군 SLES에 비해 현저히 높은 생존율이며, 피부 친화성/안전성이 강조된 제형으로서 가능성을 보여준다.

(5) Kaempferol 및 nicotiflorin을 담지한 탄성 리포솜의 *in vitro* 피부 투과능을 측정하였다. 피부 투과능 측정에는 Franz diffusion cell을 이용하였다. 총 피부 흡수능은 탄성 리포솜 (ELK3 36.8%, ELN3 23.7%) > 일반 리포솜(CLK 31.1%, CLN 17.5%) > 1,3-BG(kaempferol 9.9%, nicotiflorin 7.8%)로 나타났다. 탄성 리포솜이 일반 리포솜과 1,3-BG 용액에 비해 더욱 향상된 피부 투과능을 나타내었다.

이상의 결과들은 인지질(egg PC)과 비이온 계면활성제(cetearyl glucoside)로 구성된 탄성 리포솜이 kaempferol 및 nicotiflorin을 비롯한 유효성분에 대하여 효과적인 피부 흡수 증진 시스템이 될 수 있음을 시사한다.

감사의 글: 본 연구는 보건복지부 보건 의료개발사업의 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다(과제고유번호: HN15C0104).

참 고 문 헌

1. D. Srichana, R. Taengtip, and S. Kondo, *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, **42**, 704 (2011).
2. G. A. Asare, D. Afriyie, R. A. Ngala, H. Abutiate, D. Doku, S. A. Mahmood, and H. Rahman, *Integr. Cancer Ther.*, **14**, 65 (2015).
3. I. O. Ishola, O. Awodele, A. M. Olusayero, and C. O. Ochieng, *J. Med. Food*, **17**, 1375 (2014).
4. V. García-Mediavilla, I. Crespo, P. S. Collado, A. Esteller, S. Sánchez-Campos, M. J. Tuñón, and J. González-Gallego, *Eur. J. Pharmacol.*, **557**, 221 (2007).
5. H. B. Lee, E. K. Kim, S. J. Park, S. G. Bang, T. G. Kim, and D. W. Chung, *J. Agric. Food Chem.*, **58**, 4808 (2010).
6. J. S. Park, H. S. Rho, D. H. Kim, and I. S. Chang, *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 2951 (2006).
7. S. M. Lunte, *J. Chromatogr.*, **384**, 371 (1987).
8. A. S. Michaels, S. K. Chandrasekaran, and J. E. Shaw, *AIChE J.*, **21**, 985 (1975).
9. D. P. Otto and M. M. Villiers, *Ther. Deliv.*, **5**, 961 (2014).
10. L. Montenegro, C. Carbone, D. Paolino, R. Drago, A. H. Stancampiano, and G. Puglisi, *Int. J. Cosmet. Sci.*, **30**, 57 (2008).
11. S. N. Park, M. H. Lee, S. J. Kim, and E. R. Yu, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **435**, 361 (2013).
12. D. Cosco, D. Paolino, F. Cilurzo, F. Casale, and M. Fresta, *Int. J. Pharm.*, **422**, 229 (2012).
13. P. Mura, F. Maestrelli, M. L. Gonzalez-Rodriguez, I. Michelacci, C. Ghelardini, and A. M. Rabasco, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **67**, 86 (2007).
14. C. Y. Yoo, J. S. Seong, and S. N. Park, *Colloids Surf., B, Biointerfaces*, **144**, 99 (2016).
15. S. H. Jeon, C. Y. Yoo, and S. N. Park, *Colloids Surf., B, Biointerfaces*, **129**, 7 (2015).
16. M. A. Elsayed, Y. Abdallah, F. Naggat, and M. Khalafallah, *Int. J. Pharm.*, **332**, 1 (2007).
17. C. Kasetvatin, S. Rujivipat, and W. Tiyafoonchai, *Colloids Surf., B*, **135**, 458 (2015).
18. N. Aggarwal and S. Goindi, *Int. J. Pharm.*, **437**, 277 (2012).
19. M. J. Tsai, Y. B. Huang, J. W. Fang, Y. S. Fu, and P. C. Wu, *PLoS One*, **10**, e0131026 (2015).
20. W. Johnson, *Int. J. Toxicol.*, **20**, 13 (2001).
21. M. M. Fiume, B. Heldreth, W. F. Bergfeld, D. V. Belsito, R. A. Hill, C. D. Klaassen, D. Liebler, J. G. Marks, R. C. Shank, T. J. Slaga, P. W. Snyder, and F. A. Andersen, *Int. J. Toxicol.*, **5S**, 22S (2013).
22. T. Mosmann, *J. Immunol. Methods*, **65**, 55 (1983).
23. A. Gillet, F. Lecomte, P. Hubert, E. Ducat, B. Evrard, and G. Piel, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **79**, 43 (2011).
24. A. H. Alomrani, G. A. Shazly, A. A. Amara, and M. M. Badran, *Colloids Surf., B*, **121**, 74 (2014).
25. F. Guo, J. Wang, M. Ma, F. Tan, and N. Li, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **26**, 1 (2015).
26. A. Hommos, *Doctoral dissertation*, Freie Universität Berlin, Berlin, 2009.
27. O. Lopez, A. D. L. Maza, L. Coderch, C. Lopez-Iglesias, E. Wehrli, and J. L. Parra, *FEBS Lett.*, **426**, 314 (1998).
28. N. Aggarwal and S. Goindi, *Int. J. Pharm.*, **437**, 277 (2012).
29. G. M. M. El Maghraby, A. C. Williams, and B. W. Barry, *Int. J. Pharm.*, **276**, 143 (2004).
30. S. N. Park, M. S. Lim, M. A. Park, S. S. Kwon, and S. B. Han, *Polym. Korea*, **36**, 705 (2012).
31. S. N. Park, S. Y. Kim, G. N. Lim, N. R. Jo, and M. H. Lee, *J. Ind. Eng. Chem.*, **18**, 680 (2012).
32. M. S. Nagarsenker, L. Amin, and A. A. Date, *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, **9**, 1165 (2008).