

Phospholipid의 Gelation에 의한 Liposome 형성과 안정성

김인영 · 지홍근 · 홍창용 · 강삼우*

한국화장품(주) 연구소
*한남대학교 화학과

Stability and Formation of the Liposome with Phospholipid Base

Kim, In-Young · Ji, Hong-Keun · Hong, Chang-Yong · Kang, Sam-Woo*

Han-Kook Cosmetics Co., LTD. R&D Center, Bucheon, 421-150, Korea

**Dept. of Chemistry, Han Nam University, Tea-joen, 300-790, Korea*

(Received March, 29, 1996)

ABSTRACT

The liposomes have been developed in many drugs and cosmetics fields. The liposomes prepared with main compounds of the intercellular lipids and lecithin. Amphiphile nonionic surfactants used for (PEG) n-sitosterol(n=5), diethanolamine cetylphosphate.

The effect of gelation for liposomes have been on swelling reaction which have been mixed phospholipid with polyol-group at the high temperature. There were very good encapsulated properties of the active ingredients whether hydrophilic-group(magnesium ascorbyl phosphate, allantoin, sodium hyaluronate) and hydrophobic-group(vitamin-E acetate, vitamin-A palmitate).

Optimum condition of liposomes were passed five times in the microfluidizer(700bar), wetting reaction temperature was at $95 \pm 5^\circ\text{C}$ for a hours. Particle size distribution of the vesicles should be within range 50-560nm(mean 200nm). The stability of liposomes for the course of time was stabilized for six months at 45°C .

Application of the cosmetic was prepared moisturizing cream with liposomes of the phospholipid base.

I. 서 론

화장품에 있어서의 피부보호 효과와 수분을 지속시킴으로서 주름을 완화시키고 또 필요한 미용성분들을 피부에 발라 줌으로써 건강한 피부로 유지시키는 중요한 mechanism 중의 하나로 지질 이중층을 인위적으로 만들어 미용성분을 지속적으로 공급시키는 연구들

이 최근에 많이 연구되어지고 있다. Liposome은 2분자막의 폐쇄 소포체 내에 수용성, 지용성 물질 모두를 내포시킬 수 있고, 크기 및 변형이 용이하다는 특징이 있다. 또 인지질의 사용으로 생체내 독성이 거의 없다는 장점으로 약물 전달 체계(drug delivery system)로 이용되며 활발한 연구가 진행되고 있다.

인지질(Phospholipid)같이 친수부분에 친유그룹이 2개가 붙어 있으며 물에 분산시키면 구상미셀이 아니

라 2분자막(bilayer)을 형성한다. 이러한 폐쇄 소포체를 vesicle이라 하며, 이중 인지질로 형성된 것을 리포솜(liposome)이라고 정의한다.^{1,2)}

Liposome의 응용 분야는 임상용 진단 시약과 화장품에서 응용되고 있고 생체막의 특성을 연구하는데 있어 liposome이 생체막 model로 활용³⁾, 생체막을 통한 물질의 이동, 생체 전기현상, 생체막의 융합 등의 연구가 활발히 진행되고 있다.^{4,5)}

화장품 분야에서 liposome의 응용은 인지질을 사용하여 생체막의 유동성을 증가시켜 물질의 신진대사를 보다 원활히 하고, 미용성분의 피부 흡수를 증가시키려는 데 있다. 그러므로 피부에 대한 유효성분을 liposome화하여 세포의 조직 배양으로 실험한 결과, 세포의 생존 기간이 길어졌다는 보고도 있다. 또한 liposome을 함유한 gel에서 약물의 피부 흡수를 실험한 결과, liposome화하지 않은 경우보다 표피에서는 농도가 5배, 진피에서는 3배가 증가되었다는 보고도 있다.⁶⁾

Liposome의 종류와 그 특징으로는 vesicle의 크기와 형태에 따라 다막리포솜(multilamellar vesicle; MLV)과 단막리포솜(unilamellar vesicle; ULV)로 구분한다. 특히 단막리포솜은 LUV(large unilamellar vesicle)과 SUV(small unilamellar vesicle)로 구분하며, LUV와 SUV의 경계는 100nm로 구분하고 있다. 크기는 대략 MLV는 200~3500nm이고, LUV는 100~1000nm, SUV는 20~50nm 정도로 내포시킬 수 있는 MLV는 5~15%, LUV는 35~65%, SUV는 0.5~1.0%이다. 또 liposome의 조제 방법으로는 기계적인 힘에 의한 방법, 세제제거방법, 용매사출방법, 역상증발법 등이 있다.^{7~10)}

생체막 유래 계면활성제로된 인지질의 수현탁물이 지질 2분자막으로 된 폐쇄 소포체로 된 것이 Bangham^{11, 12)}에 의해 발견된 이래, 이 소포체는 liposome이라 칭하고 수상에 함유된 인지질을 lecithin의 swelling 반응에 의해 vesicle화 하는데 성공하였다. 막모델로써 이것을 microcapsulation시켜 광범위하게 적용되고 있다.¹³⁾ 또한 W. S. Oleniacz는 lecithin, dicetyl phosphate, sterol/caprolactam을 사용하여 moisturizing agents의 효과를 높였다. Microemulsifier를 사용하여 liposome을 형성시켰는데 이것을 안정

화시키기 위하여 micro-mixer로 통과시켰으며, 사용된 원료는 phosphatidylglycerol, egg phosphatidylcholine과 cholesterol의 비를 0.1:0.4:0.5로 하여 안정한 소구체를 형성시켰다고 하였다.¹⁴⁾

이러한 것을 기초로 하여 본 연구에서는 각질 세포간지질을 구성하고 있는 성분들을 선택적으로 사용하여 새로운 phospholipid base를 만들었다. 또 이것의 일부를 취하여 glycerin과 amphiphile surfactant를 포함한 수상과 phospholipid의 gelation 반응을 시켰다. 이 시료를 저온 유평법에 의하여 안정한 유평상태를 만들고, liposome을 만들기 위하여 microfluidizer를 사용하였다. 또한 liposome 형성에 대한 최적 조건을 찾기 위하여 겔화 온도, 유평온도, microfluidizer의 압력, 시료의 통과 횟수에 따른 입자 크기의 변화와 안정성과 안전성에 대하여 조사하였다.

화장품에 응용으로 미용 활성 성분들을 liposome의 vesicle 내부와 외부에 capsulation시켜 moisturizing cream을 만들었다.

II. 재료 및 방법

1. 시 약

본 실험에서는 인지질 베이스를 만들기 위하여 ceramide(Sero lab., France), cholesterol, cholesteryl ester와 wax ester은 독일의 Henkel사 원료를 사용하였으며, squalene과 lecithin은 UPI사(미국)의 화장품용 원료로 사용하였다. 양친매성 비이온 계면활성제는 (PEG)_n-sitosterol(n=5)과 보조계면활성제로는 Merck사의 diethanolamine cetylphosphate를 그대로 사용하였다. 인지질 이중층의 친유부(hydrophobic-group)에 사용된 미용성분은 vitamin-E acetate와 vitamin-A palmitate를 사용하였으며, 친수부(hydrophilic-group)에서 천연에서 추출한 성분으로 magnesium ascorbyl phosphate, allantoin, sodium hyaluronate는 화장품 전용 원료로서 정제하지 않고 그대로 사용하였다. 증류수는 음, 양이온 교환수지탑을 통과한 탈 이온수를 사용하였다. 본 실험에 사용된 모든 재료들은 화장품 규격원료로만 사용하였다.

2. Phospholipid base 제조

인지질 베이스는 사람의 각질 세포간지질을 구성하고 있는 성분은 박층 크로마토그래피로 분석되어진 결과를 기초로 하여 새로운 인지질 베이스를 만들었다. ¹³⁾ 각 조성물들은 사람의 각질 세포간지질과 유사한 lamellar 구조를 형성할 수 있도록 천연에서 추출한 sterol에 polyethyleneglycol을 부가시켜 피부와 친화력이 좋은 양친매성 계면활성제(amphiphile surfactant)는 넓은 pH 범위에서 안정하여 liposome의 겔링화에 좋은 효과를 얻을 수 있다.

피부각질 세포간지질에는 sphingolipid 50%, cholesterol ester 10%, cholesterol 15%, wax ester 20%, 피지선 유래 지질 성분으로 squalene, wax ester,

triglyceride, sphingolipid에는 ceramide가 95%, 당지질 5% 등의 혼합물이 존재한다는 보고도 있다. ¹⁵⁾

본 실험에서는 화장품으로서 전체 베이스에 liposome을 형성할 수 있도록 1차적으로 사람의 각질 세포간지질과 유사한 환경을 가질 수 있도록 하였으며, 사람 피부의 주요 구성 성분을 선택적으로 사용하여 인지질 베이스를 Table 1과 같이 조제하였다. Lecithin, cholesterol, ceramide는 swelling 과정에서 인지질의 이중층을 만드는데 효과적이며 피부와의 친화성이 우수한 특징이 있다.

Table 1의 시료를 일정량 측정하여 chloroform과 methanol을 8:2의 혼합비로 만들어진 solvent에 용해한 다음 60±5°C로 가온하여 vacuum evaporator로 완전히 제거한 후, 전처리하여 wax형태의 순수한

Table 1. Composition of phospholipid base

Order	Ingredients	Content(wt, %)
1	Ceramide	10.0
2	Lecithin	20.0
3	Squalene	Q.S.
4	Cholesterol	10.0
5	Cholesteryl ester	5.0
6	Wax ester	2.0
7	(PEG) _n -sitosterol(n=5)	20.0
8	(DEA)-cetylphosphate	10.0
Total		100.00

Table 2. Composition of moisturizing cream for formation of liposomes

Phase	Ingredients	Content(wt, %)
(A)	Phospholipid base	16.0
(B)	Glycerin	10.0
	(DEA)-cetylphosphate	1.0
	Pure water	Q.S.
(C)	Magnesium ascorbylphosphate	0.5
	Allantoin	0.8
	Sodium hyaluronate	3.0
(D)	Vitamin-E acetate	0.5
	Vitamin-A palmitate	0.5
Total		100.0

phospholipid base를 만들었다.

3. Liposome의 조제 방법

Liposome의 조제 방법은 많은 연구가들에 의해 공개되었으며, 여러가지 형태로 만들어지고 있다. 사람의 피부구조와 유사한 환경을 가질 수 있는 인지질 베이스를 이용하여 지질 이중막을 형성시켜 인지질 이중층의 친수부와 친유부에 용해된 미용 성분들을 vesicle 내부로 투입시킬 수 있도록 하였다. Liposome vesicle을 형성시키기 위하여 일반적으로 사용되고 있는 stand homo-mixer로는 균일한 입자상을 얻어 내기가 어려우며, 경시변화에 따른 안정도 또한 기대하기가 어렵다. 이러한 문제점들을 해결하기 위하여 microfluidizer를 사용해야만 되었다. 조제 방법은 Fig. 1과 같다. Table 2의 (A)상을 $90 \pm 5^\circ\text{C}$ 로 가온 용해한 후 습윤제인 (B)상을 혼합 교반하여 1시간 동안 swelling 반응을 시킨다. 인지질 베이스를 겔화한 다음 천연 추출 미용 성분은 (C)상의 미용 성분을 첨가(40°C)하여 microfluidizer에 통과시키면 liposome bilayer membrane에 capsulation이 되어진다. 그 다음 (D)상을 혼합하여, microfluidizer에 통과시키면 liposome이 형성된다. Microfluidizer의 구조도를 Fig. 2에 나타내었다.

4. Distribution of particle size 측정

위의 실험방법에 의하여 제조한 liposome을 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 항온조에 보관시켜 입자크기를 측정하였다. 한번 측정에 사용한 시료는 재사용하지 않았으며, 측정 횟

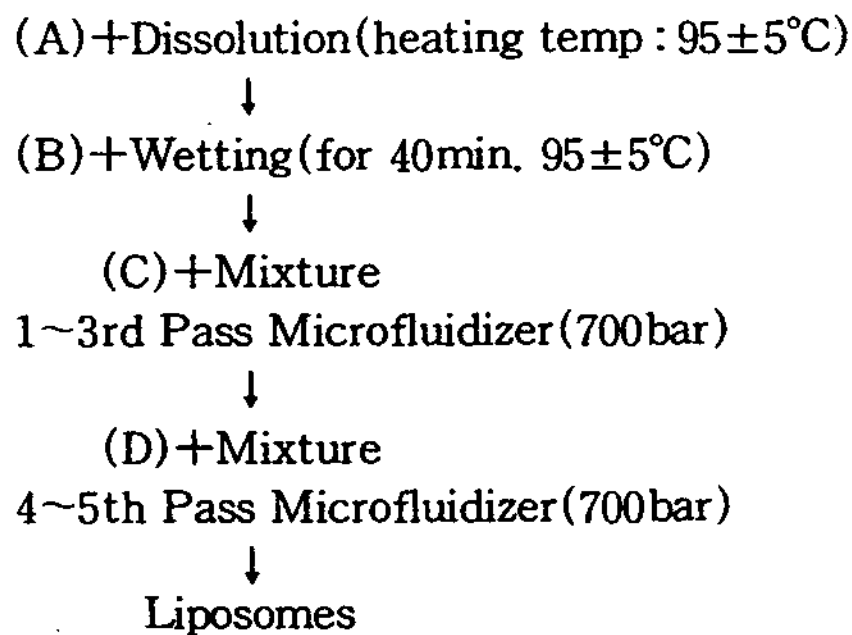


Fig. 1. Manufacturing method on the formation of liposomes.

수는 각각 8회 측정된 평균값으로 계산하였다. 측정기기는 laser light scattering system(PCS 4700, Malvern UK)을 이용하였고, 측정시 온도는 자동콘트롤 장치가 부착되어 있기 때문에 실온에서 실행하였다. 입경분포는 Image Analyzer로 동시에 측정 비교하였다.

5. Liposome 형성 측정

Liposome의 제조 방법에 의하여 만들어진 multilamellar형 vesicle의 친수부와 친유부에 미용성분을 투입시키고 liposome이 형성되었는지의 여부를 확인해보기 위하여 freeze-fracture electron microscopy(Serobiological Research Center)를 적용 측정하였다.

6. Liposome의 Stability와 Safety

Liposome을 만드는 것도 중요하지만 성상의 안정

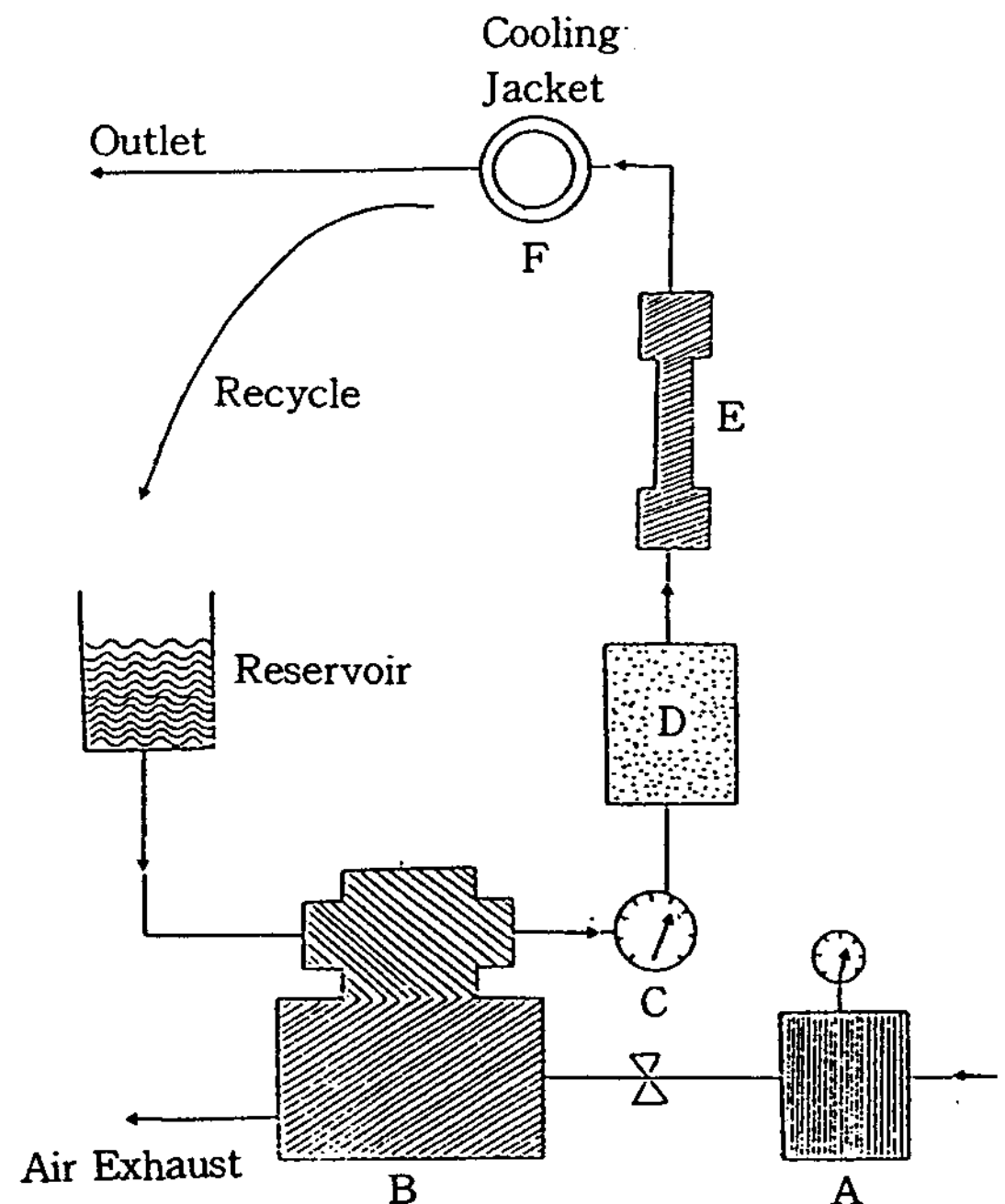


Fig. 2. Schematic diagram of the microfluidizer.
A: Air pressure, B: Pump, C: Pressure guage, D: Filter, E: Interaction Chamber, F: Tube Coil(length ; 50cm, Φ ; 3mm)

성이나 안전성이 확보 되어져야만 실용적인 가치를 얻어낼 수가 있다. 따라서 화장품에 적용하기 위하여 이 두 가지 측면을 고려하여 liposome의 안정성을 관찰하였다. 안정도 시험 조건은 저온($5\pm 1^\circ\text{C}$)과 상온($45\pm 1^\circ\text{C}$)에서 경시 변화에 따른 입자의 stability를 관찰하였다. 피부 안정성 시험에 사용된 균주는 staphylococcus aureus ATCC 6538, escherichia coli ATCC 10536을 사용하였다. 분석 장비는 Image Analyzer와 laser light scattering system으로 동시에 관찰하였고, 안전성은 세포 독성 시험으로 관찰하였다.

III. 결과 및 고찰

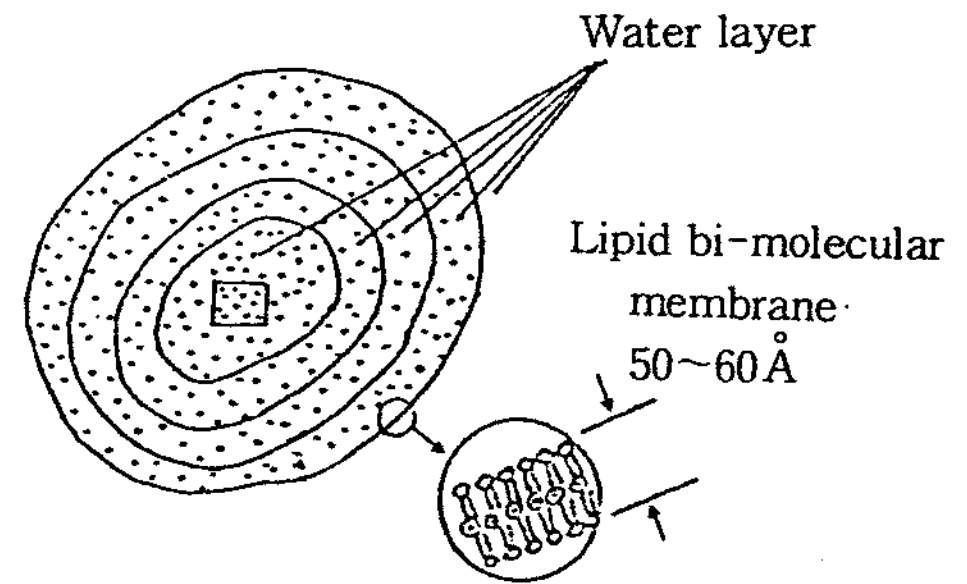
1. 인지질 베이스와 Liposome

일반적으로 사용되고 있는 유화는 열역학적으로 불안정한 상태에 있고, liposome 또한 온도에 대한 안정성에는 많은 문제점들을 가지고 있다. 특히 사람의 피부 구조와 유사한 구조체를 만들고 multilamellar vesicle을 형성시키기 위하여 인지질 베이스를 1차적으로 만들어야만 했다. 인지질 베이스를 이용하여 내용물의 전체상에 미용 성분을 capsulation시켜 안정성의 확보와 효과의 지속성을 높일 수 있는 것에 초점을 맞추었다.

Fig. 3은 liposome의 기본 구조도이다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 (a)SUV, (b)LUV, (c)MLV의 구조를 나타내었다. Vesicle의 크기를 조절할 수 있으며, microfluidizer에 통과 횟수와 원하는 입자크기를 조절할 수가 있다. 화장품에서는 피부의 침투력이나 효과의 지속성인 측면에서 고려해 볼 때 MLV system이 가장 우수하다는 것은 많은 보고를 통해 알려져 있다. 인지질 베이스는 지질이중막을 형성하는데 중요한 역할을 한다. Liposome은 피부에 수분의 전달 체계를 향상시켜 주며 moisturizing effect를 증가시킨다.

2. Microfluidizer 압력의 영향

Microfluidizer는 사용시 상당한 주의를 요한다. 사전에 전처리하여 만들어 놓은 인지질 베이스를 microfluidizer에 통과할 때의 압력조건을 찾기 위하여 200~1,000bar 범위에서 vesicle의 형성 여부를 관찰

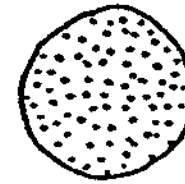


MLV (~several μm)

SUV
20~50nm
(200-500 Å)



LUV (REV)
0.1~1.0 μm



□ Water Soluble Substance
○ Oil Soluble Substance

Fig. 3. Schematic diagrams of liposomes.

Table 3. Particle size of liposomes on air pressure

Pressure(bar)	Particle size(nm)
200	562
300	408
400	349
500	263
600	252
700	200
800	182
900	156
1,000	120

하였다. 통과압력은 700bar에서 가장 안정한 소구체가 형성되는 것을 알 수 있었다.

Table 3에는 압력을 증가하면서 microfluidizer에 시료를 통과한 후의 입자 크기이며, 이 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 낮은 상태의 진공압(500bar 이하)에서는 입자의 크기가 커지며, vesicle이 불균일하게 형성되었다. 또한, 높은 진공압(800bar 이상)에서는 입자크기는 작아졌지만 리포솜의 vesicle이 일그러지는

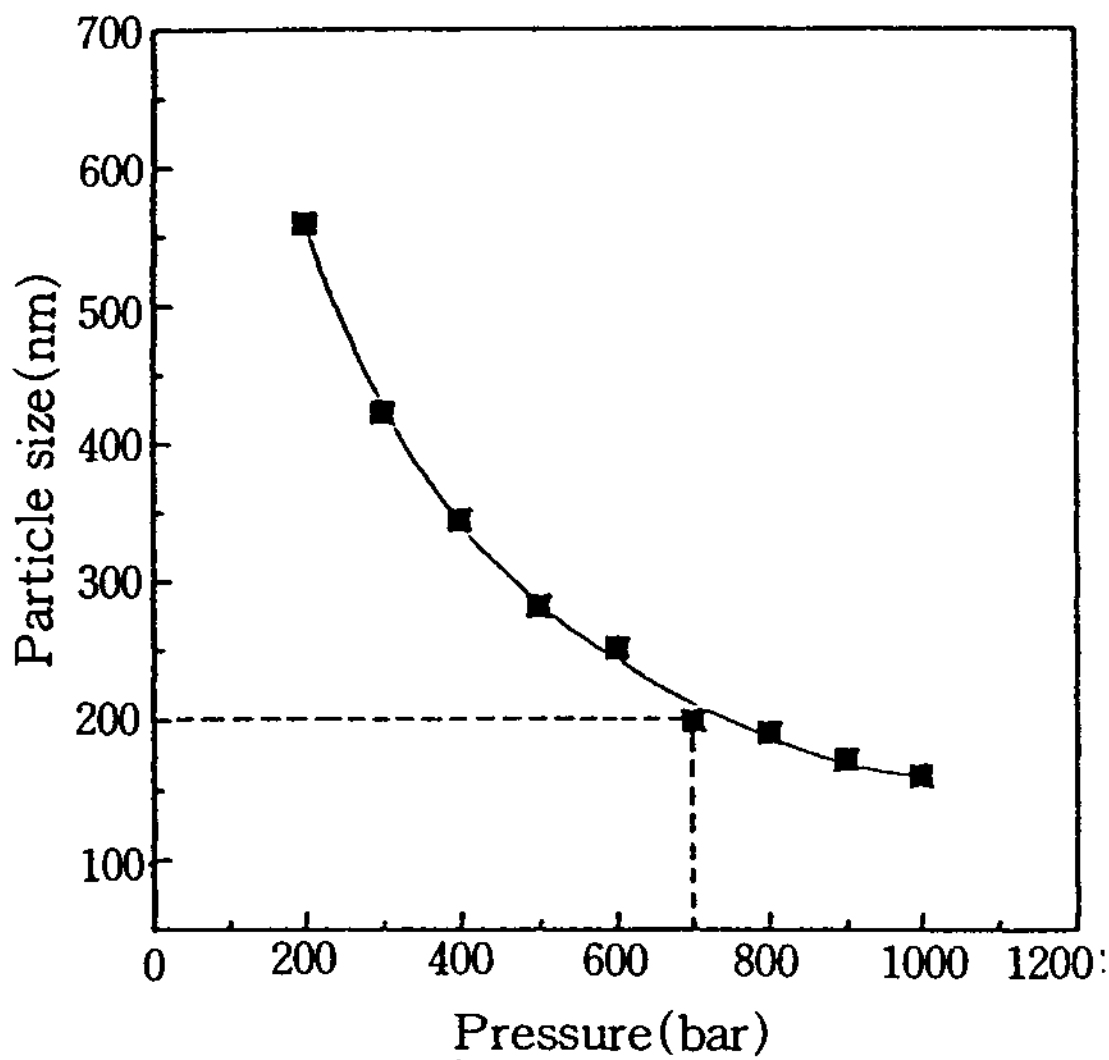


Fig. 4. Effect of pressure on the formation of liposomes.

현상을 발견할 수 있었다. 따라서 microfluidizer의 시료통과 압력을 700bar로 고정하였다.

3. 온도의 영향

Microfluidizer의 통과압력을 700bar로 고정시키고 온도를 변화(20~100°C)시켜 가며 liposome의 형성 여부를 관찰하였다. Liposome에 있어서는 온도가 증가할수록 vesicle의 입자 크기는 다소 작아진 현상은 있었지만 큰 변화는 없음을 확인하였다. Microfluidizer의 통과 온도를 60°C 이상으로 할 경우에는 미용성분의 분해나 activity가 저해됨을 우려하여 40±5°C로 고정하였다(Fig. 5).

4. Microfluidizer 통과 횟수의 변화

Liposome의 형성은 microfluidizer의 통과압력, 온도 그리고 적당한 통과횟수를 고려하지 않으면 안된다. Vesicle을 안정하고 균일하게 만들기 위하여 시료의 통과횟수를 1회부터 10회까지 통과시켜 laser light scattering system으로 vesicle을 측정하였다(Fig. 6).

Fig. 6에서 보는 바와 같이 시료의 통과횟수는 5회 통과시 리포솜은 가장 안정하였으며, 시료를 6회 이상 10회를 통과시킬 경우의 입자크기는 다소 미세해지기

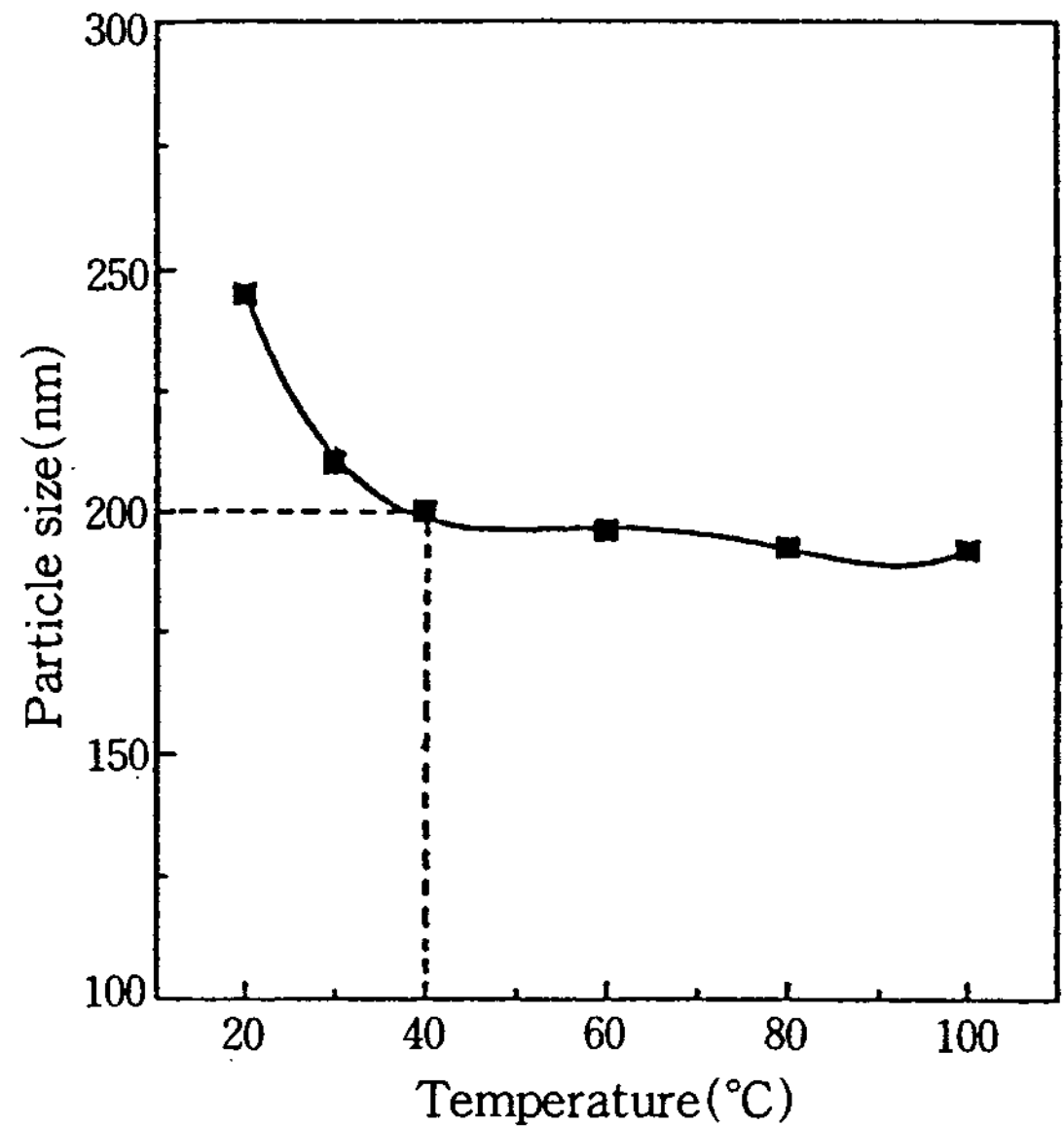


Fig. 5. Condition of temperature on the formation of vesicles.

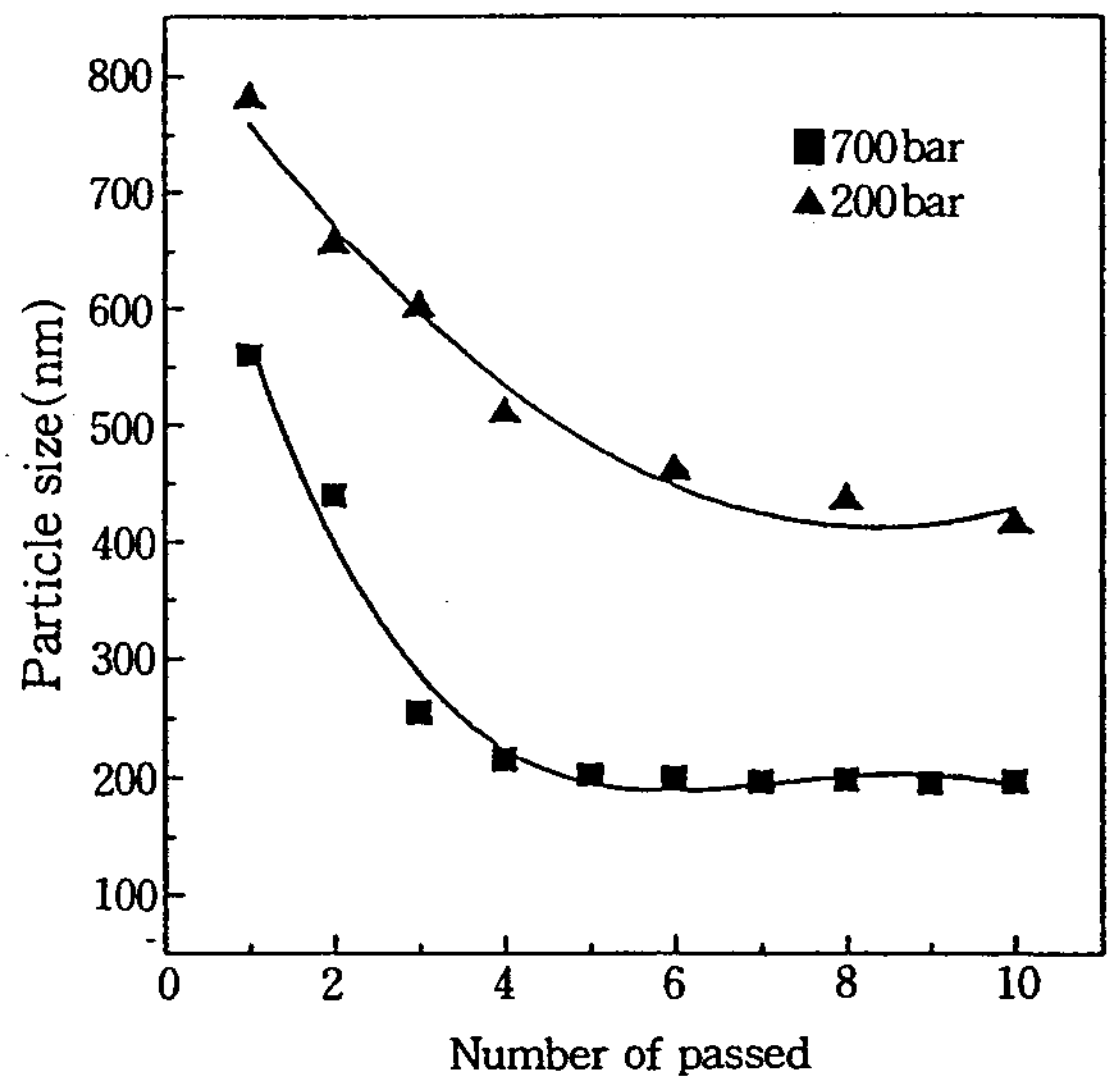


Fig. 6. Effect of numbers of passed on the microfluidizer.

는 하였으나, liposome의 vesicle이 일그러지기 때문에 적당한 통과횟수가 필요하다. Liposome의 경시변화(6개월)에 대한 liposome의 안정도를 관찰해 본 결과 5회 통과시가 가장 안정하였으며 입자크기도 일정

함을 알 수 있었다.

5. Liposome 측정 결과

Liposome을 형성하기 위하여 여러가지 요인들에 대한 최적 조건들을 화장품에 적용하여 moisturizing cream을 만들었다. 이 샘플이 liposome을 형성하였는지를 증명하기 위하여 Freeze-fracture electron microscopy로 촬영하여 Fig. 7에 나타내었다. 이 그림은 프랑스의 Serobiological Research Center에 의뢰하여 측정하였다. Liposome은 microfluidizer에 5회 통과시킬 경우가 가장 잘 형성되었다는 것을 확인하였다. 시료를 동결하여 촬영한 사진의 배율은 16,000배이며 다중층의 lamellar 구조가 형성되었음을 증명할 수 있었다. 평균 입경 분포도는 200nm이며, 미용성분들이 input 됨을 예측할 수 있었다.

6. Liposome의 Stability와 Safety

화장품에 응용으로서 liposome이 형태의 모이스춰 크림의 vesicle의 안정성을 관찰하기 위하여 incubator의 온도를 $5\pm 1^{\circ}\text{C}$ 와 $45\pm 1^{\circ}\text{C}$ 로 고정시킨 후, 시료를 넣어 약 6개월 동안 관찰하였다. Fig. 7에서 보는 바와 같이 저온이나 항온에서도 vesicle은 안정하였으며, 화장품에 적용시 우수한 기능과 효과를 가질 수 있다. 피부 안전성은 staphylococcus aureus ATCC

6538, escherichia coli ATCC 10536을 사용하여 일반적인 피부 독성 시험법으로 관찰해 본 결과 피부 자극 측면에서는 일반 화장품들 보다 저자극성인 것으로 확인 되어졌다. 시험 균주2종을 멸균된 Trypticase Soy Agar(TSA) 사면 배지에 접종하여 37°C , 24시간 배양한 후 이것으로 부터 1백금이 균을 취하여 Trypticase Soy Broth(TSB) 30mL을 함유한 250 mL-Erlenmeyer flask에 재접종하여 37°C 에서 24시간 전배양하였다. TSB배지 100mL을 함유한 500 mL-Erlenmeyer flask에 2%의 전 배양을 접종한 후 37°C 에서 40rpm으로 진탕 배양하면서 6시간 간격으로 1mL씩 sampling하여 일정 배율 희석한 후 TSA plate상에 도말, 배양한 후 평판 위에 생성된 colony 수를 측정하였다. 이 결과 일반적으로 화장품의 독성 보다 liposome 형태로 만든 제품의 독성이 더 작은 것으로 확인되었다. 이것은 피부구조와 같은 lamellar 구조를 형성하기 때문에 피부와의 친화력이 우수한 것으로 생각된다.

IV. 결 론

본 연구에서는 phospholipid base와 microfluidizer를 사용하여 liposome을 형성시키고, 화장품에 응용으로 liposome의 vesicle 속에 미용성분을 capsula-

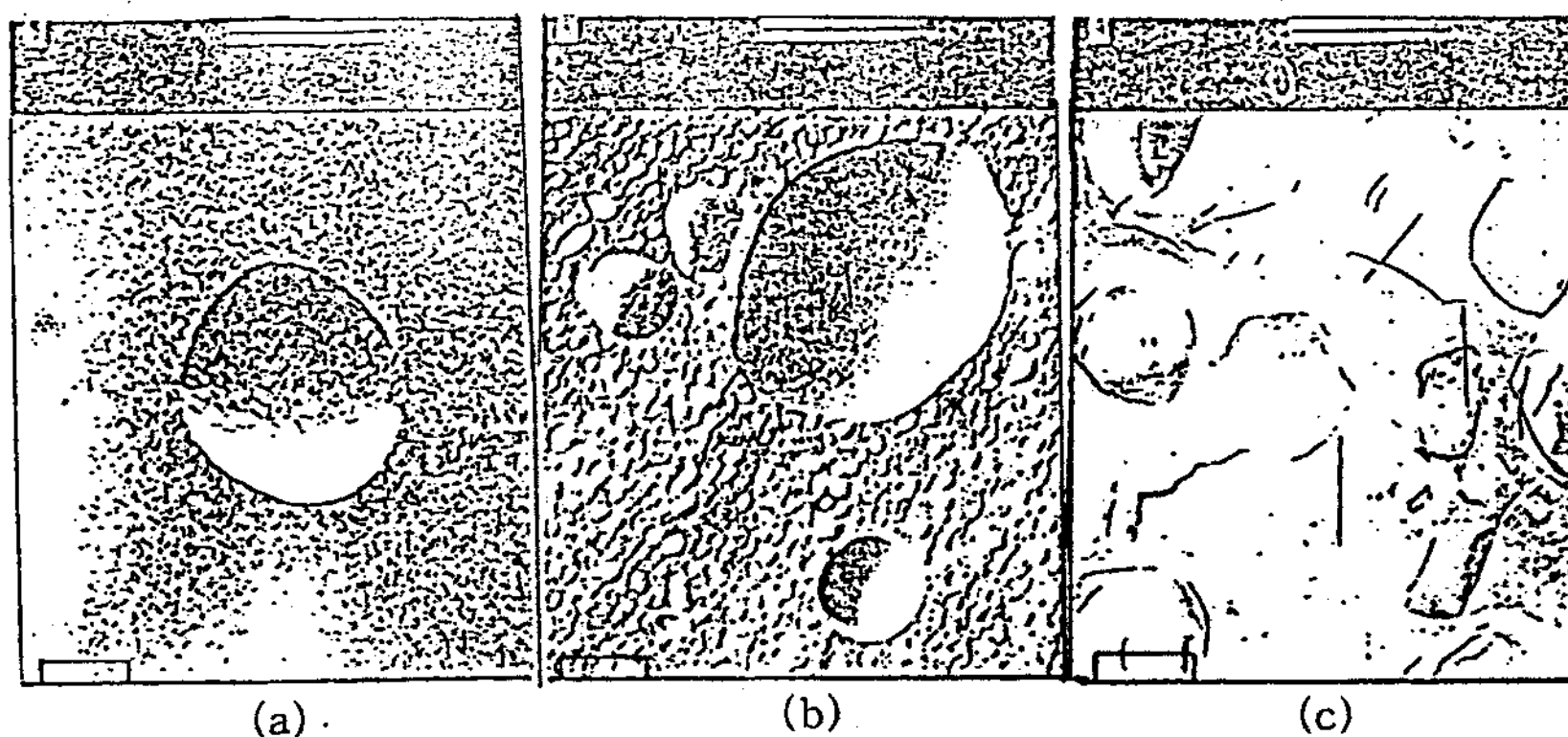


Fig. 7. Freez-fracture electron microscopy photos of liposomes.

- (a) Microemulsified liposome preparation 1times passing using the microfluidizer(Mag. $\times 16,000$).
- (b) Microemulsified liposome preparation 3times passing using the microfluidizer(Mag. $\times 16,000$).
- (c) Microemulsified liposome preparation 5times passing using the microfluidizer(Mag. $\times 16,000$).

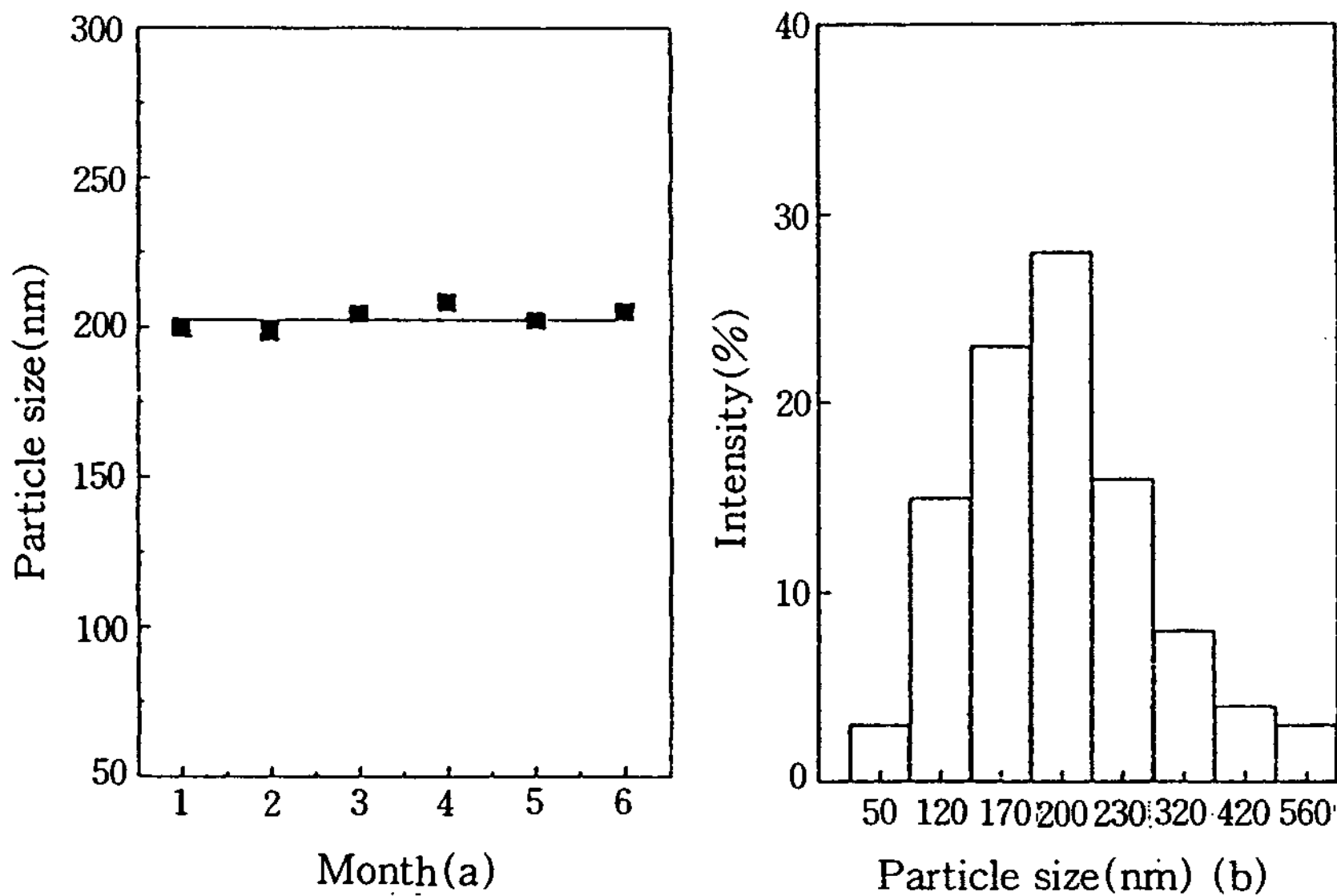


Fig. 8. (a) : Stability of liposome (b) : Distribution of particle size to liposomes.

tion시키는 제조법을 연구하였다. 이것을 적용하여 moisturizing cream을 만들기 위하여 microfluidizer의 여러가지 최적조건을 찾았으며, 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. Phospholipid의 구성성분은 cholesterol 10%, cholesteryl ester 5%, wax ester 2%, squalane(Q. S), lecithin 20%, ceramide 20%를 사용하였으며, 계면활성제는 (PEG)*n*-sitosterol(*n*=5), 보조계면활성제는 (DEA)-cetylphosphate를 사용하여 phospholipid를 제조하였다.

2. Phospholipid base의 gelation 온도는 $95 \pm 5^\circ\text{C}$ 에서 1시간 동안 swelling하는 것이 가장 우수하였다.

3. Liposome을 형성시키기 위하여 microfluidizer의 최적조건은 시료의 통과압력은 700bar, 시료의 온도는 $40 \pm 5^\circ\text{C}$ 이며, sample의 통과횟수는 5회가 가장 적당하였다.

4. 이와 같은 조건으로 하여 liposome 형태의 moisturizing cream을 제조하여 화장품에 응용하였다. 이에 대한 입자크기의 분포도는 50~560nm 범위에 있고 평균 입자 크기는 200nm이며, 경시변화에 따른 안정도를 6개월 동안 저온($5 \pm 1^\circ\text{C}$)과 항온($45 \pm 1^\circ\text{C}$)에서 관찰한 결과 안정하였다. 또한 피부 안전성 시험은

세포 독성 시험법으로 관찰한 결과 일반 유화제품들보다 피부 자극이 적다는 것을 확인할 수 있었다.

5. Liposome의 형성여부를 laser light scattering system으로 측정한 결과 multilamellar type의 vesicle이 형성됨을 증명하였다. 또한 안전성 측면에서도 피부구조와 같은 lamellar 구조체를 형성하고 있기 때문이라는 결론이다.

문 헌

1. H. Kikuchi and K. Inoue : *細胞工學*, 2, No. 9, 1136(1983)
2. H. lautenschlager : *Cosmetics & Toiletries*, 105, 49(1990)
3. H. lautenschlager : *Cosmetics & Toiletries*, 105, 63(1990)
4. S. Kazusinge and S. Kenichi : *Cosmetics & Toiletries*, 105, 65(1990)
5. Sergio Nacht : *Cosmetics & Toiletries*, 110, 25 (1995)
6. 김형만 : *生體膜*, 11-268, 民音社(1987)
7. J. T. Simonnet : *Cosmetics & Toiletries*, 109, 45

(1994)

8. Harry G. Enoch and Philipp Strittmatter : *Biochemistry*, 70, No.1, 145~149(1979)
9. Peter M. Elias : *Arch Dermatol Res.*, 270, 95~117(1981)
10. Monte Magill : *Cosmetics & Toiletries*, 105, 59 (1990)
11. S. M. Johnson, A. D. Bangham, M. W. Hill and E. D. Korn : *Biochim. Biophysica Acta*, 233, 820~826(1971)
12. D. Deamer and A. D. Bangham : *Biochim. Biophysica Acta*, 253~259(1965)
13. G. Imokawa, S. Akasaki, Y. Minematsu and M. Kawai : *Arch Dermatol Res.*, 281, 45~51 (1989)
14. E. Mayhew, R. Izzo, W. J. Vail, J. King and A. M. Green : *Biochim. Biophysica Acta*, 775, 167~174(1984)
15. Vanlerberghe : *U. S. Patent*, 4,217,344(1980)