

## 여뀌 추출물의 세포 보호 작용과 피부 흡수 증진을 위한 리포솜 제형 연구

김정은<sup>†</sup> · 이혜진 · 임명선 · 박민아 · 박수남<sup>†</sup>

서울과학기술대학교 정밀화학과 나노바이오화장품연구실, 화장품종합기술연구소  
(2011년 11월 21일 접수, 2011년 12월 12일 수정, 2011년 12월 15일 채택)

### Cellular Protective Effect and Liposome Formulation for Enhanced Transdermal Delivery of *Persicaria hydropiper* L. Extract

Jung Eun Kim<sup>†</sup>, Hye Jin Lee, Myoung Sun Lim, Min A Park, and Soo Nam Park<sup>†</sup>

Department of Fine Chemistry, Nanobiocosmetic laboratory, and Cosmetic R&D Center,  
Seoul National University of Science and Technology, 232 Gongreung-ro, Nowon-gu, Seoul 139-743, Korea

(Received November 21, 2011; Revised December 12, 2011; Accepted December 15, 2011)

**요약:** 이전 연구에서 저자들은 여뀌 추출물의 항산화, 항노화, 항균 활성 및 여뀌 추출물을 함유한 크림의 보습 효과에 대한 결과를 보고한 바 있다. 본 연구에서는 여뀌 추출물과 그 주요 성분인 isoquercitrin의 사람 적혈구와 HaCaT 세포에서의 세포 보호 효과를 측정하였다. 여뀌 추출물의 피부 전달시스템으로 에토솜 및 탄성 리포솜을 제조하여 입자크기, 포집효율, 안정성 및 피부 흡수 증진 능력을 평가하였다. 적혈구 광용혈에서 여뀌 추출물과 isoquercitrin은 5 µg/mL의 농도에서 α-토코페롤보다도 큰 세포보호효과를 나타내었다. 여뀌 추출물은 HaCaT 세포에 대해 50 µg/mL의 농도에서 독성을 나타내지 않았다, UVB 400 mJ/cm<sup>2</sup>를 HaCaT cell에 조사하였을 때, 여뀌 추출물은 농도 의존적(12.5 ~ 50 µg/mL)으로 자외선으로부터 세포를 보호하였고, 25 µg/mL의 농도에서 양성 대조군(세포 생존율, 36 %)에 비하여 큰 세포보호 활성(생존율, 90 %)을 나타내었다. 0.04 % 여뀌 추출물을 담지한 에토솜의 입자 크기는 173.0 nm, 포집효율은 55.58 %이었다. 에토솜 제조 후 일주일동안 안정한 단분산 형태를 나타내었다. 피부 투과 실험 결과 에토솜은 일반 리포솜이나 에탄올 용액에서보다도 더 큰 피부 투과능을 보여주었다. 0.1 % 여뀌 추출물을 담지한 탄성 리포솜의 최적의 제형은 인지질 대 계면활성제(Tego<sup>®</sup>care 450)의 비율이 95 : 5으로 확인되었다. 0.1 % 여뀌 추출물 함유한 최적의 탄성 리포솜의 입자크기는 176.5 nm, 가변형성은 16.4, 포집효율은 68.8 %이었다. 여뀌 추출물을 담지한 탄성 리포솜은 계면활성제가 포함되지 않은 제형보다 더 큰 피부 투과능을 나타내었다.

**Abstract:** In our previous studies, the antioxidant, anti-aging, and antibacterial activities of *Persicaria hydropiper* L. extract, and the moisturizing effect of cream containing *P. hydropiper* extract were investigated. In this study, the cellular protective effects of *P. hydropiper* extract and isoquercitrin, main component from *P. hydropiper* in <sup>1</sup>O<sub>2</sub>-induced photohemolysis of human erythrocytes and ultraviolet B (UVB)-exposed HaCaT cells were investigated. Liposomes such as ethosome and elastic liposome for enhanced transdermal delivery were prepared. Size, loading efficiency, stability, and cumulative permeated amounts of ethosomes and elastic liposomes were evaluated. *P. hydropiper* extract and isoquercitrin showed more prominent cellular protective effect than (+)-α-tocopherol, known as lipid antioxidant at 5 µg/mL. *P. hydropiper* extract didn't show any characteristics of cytotoxicity at 50 µg/mL. When HaCaT cells were exposed to a single large dose (400 mJ/cm<sup>2</sup>) of UVB, the extract protected the cells against UVB radiation in a concentration dependent manner (12.5 ~ 50 µg/mL). Cell viability of HaCaT cells exposed to UVB 400 mJ/cm<sup>2</sup> was increased by treatment with *P. hydropiper* extract or isoquercitrin from 36 % (cell viability of positive control groups) to 90 % (cell viability of *P. hydropiper* extract or isoquercitrin-treated groups). The size of 0.04 % *P. hydropiper* extract loaded ethosomes was 173.0 nm and the loading efficiency was 55.58 %. 0.04 % *P. hydropiper* extract loaded ethosomes were stable with as monodisperse particles for 1 week. The ethosome exhibited more skin permeability than general liposome and ethanol solution. The optimal ratio of lipid to surfactant

<sup>†</sup> 주 저자 (e-mail: jungeun-cos@hanmail.net, snpark@seoultech.ac.kr)

(Tego<sup>®</sup> care 450) of 0.1 % *P. hydropiper* extract loaded elastic liposomes was observed to be 95 : 5. Vesicle size of 0.1 % *P. hydropiper* extract loaded elastic liposome was 176.5 nm. The deformability index of the elastic liposome was 16.4. The loading efficiency was 68.8 %. The elastic liposome containing *P. hydropiper* extract showed more skin permeability than liposome without surfactant (Tego<sup>®</sup> care 450).

**Keywords:** *Persicaria hydropiper* L., antioxidant, ultraviolet radiation, ethosome, elastic liposome

## 1. 서 론

많은 피부병은 태양 자외선에의 노출과 관련이 있다. 자외선은 피부암, 광노화 및 이들과 관련된 여러 가지 피부 질환을 유발한다. 자외선에 노출된 피부에서는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)이 생성된다. 활성산소는 노화, 특히 피부노화의 원인 물질로 작용하고 있다. 이들은 정상적인 대사과정이나 질병상태, 그리고 스트레스를 받을 때도 생성된다. 활성산소에 대하여 피부에는 활성산소를 제거하는 항산화 방어 시스템이 있다. 그러나 이들 방어 시스템은 자외선 양이 많으면 압도당할 수 있다. 피부세포 및 조직 손상을 주도하는 가장 반응성이 큰 활성산소는  $^1O_2$ 과  $\cdot OH$  등으로 알려져 있다. 이들은 항산화효소와 비효소적 항산화제들로 구성된 항산화 방어 시스템을 파괴함으로써 산화제/항산화제 균형을 산화상태 쪽으로 기울게 하고 결국에는 탄력감소, 주름 및 기미·주근깨 등의 피부노화를 가속화시킨다. 피부노화를 지연시키고 억제시키기 위해서는 생성된 활성산소를 효율적으로 제거하고 활성산소로부터 세포 및 조직을 보호할 수 있는 항산화 방어 시스템 구축이 반드시 필요하다[1-3].

피부는 전신을 둘러싸며 외부로부터 여러 가지 자극 및 장애, 혹은 건조로부터 생체를 보호하는 역할을 담당하고 있다. 피부는 표피, 진피 및 피하조직의 세 개의 층으로 이루어져 있다. 이들 중 표피의 가장 중요한 생리적 기능은 외부에서 오는 여러 가지 자극, 예를 들면, 건조, 자외선, 기타 물리·화학적 자극에 대한 방어력이 되는 적절한 외피, 즉 각질층을 형성하는 것이다. 각질층은 각질세포와 특징적인 라멜라 막으로 구성된 지질이 풍부한 세포외 매트릭스로 구성되어 있으며, 이들이 피부 투과성과 항산화 장벽 기능을 담당한다. 이들 피부 장벽은 태양 자외선으로 유도된 활성산소나 공해, 미생물 등에 의한 산화적 스트레스에 의해 붕괴될 수 있다. 피부의 산화적 손상 및 피부 장벽의 붕괴는 피부노화를 가속화시킨다. 따라서 자외선으로 유도된 산화적 손상으로부터 피부 장벽기능을 복원하고 피부노화를 억제하기 위해서는

항산화 방어 시스템 구축이 필요하다. 이를 위해 항산화 방어시스템 구축에 적합한 항산화제 개발과 이들을 효율적으로 피부에 침투시킬 수 있는 피부 흡수 전달시스템 개발이 필요하다[4].

최근에 항산화제나 기타 생리활성 성분들의 피부 흡수능 향상을 위한 연구 중에서 리포솜을 이용한 연구들이 많은 관심을 받고 있다. 리포솜은 생체 친화성이 높고, 다양한 활성 물질을 생체 내로 전달할 수 있다는 장점을 가지고 있어서 의약품이나 화장품 분야에서 널리 사용되어 왔다[5,6]. 한편으로는 리포솜이 이루고 있는 지질 이중층 막의 물리적 불안정성이나 낮은 포집 효율, 그리고 제형 내에서의 낮은 유화 안정성 등의 문제가 제기되고 있으며[7,8]. 이러한 문제점을 해결하기 위해 다양한 시도들도 이루어지고 있다. 예를 들면, 기능성 소재들의 피부 투과성을 개선시키기 위한 목적으로 막이 유연하게 변형되어 각질세포 사이의 좁은 틈을 더 잘 통과하도록 더 유연하고 탄성이 있는 새로운 베지클(vesicle)들이 개발되고 있다. 이러한 예로 에토솜(ethosome) 및 탄성 리포솜(elastic liposome) 등이 있다[9].

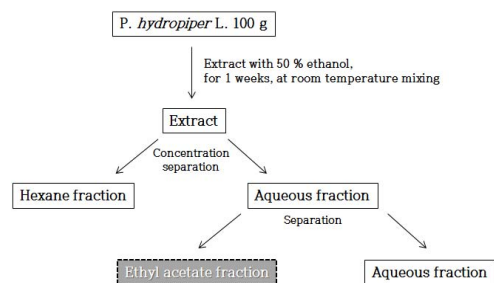
에토솜은 인지질을 에탄올에 녹여서 만드는 베지클이다. 에토솜은 생체 내 물질인 인지질로 만들어지기 때문에 생체 친화성이 높고, 다양한 활성 물질을 생체 내로 전달할 수 있다는 장점을 가지고 있다. 에토솜의 제조에 사용되는 에탄올은 피부 투과 증진작용이 있는 것으로 잘 알려져 있다. 에토솜은 리포솜과 비교하여 베지클의 피부 친화도가 높은 것으로 보고되고 있다. 이러한 특징에 의해 에토솜은 활성 물질의 피부 전달에 효과적이고 더 깊은 곳까지 활성 물질을 전달하는 것으로 알려져 있다[10,11].

탄성 리포솜은 인지질과 계면활성제로 이루어진 지질 이중층 구조로 되어 있다. 탄성 리포솜은 계면활성제의 작용으로 베지클의 지질 이중층 막이 가변형성을 갖게 되어 외부에서 스트레스가 가해졌을 때 쉽게 변형될 수 있다[12]. 따라서 탄성 리포솜은 일반 리포솜보다도 각질층을 더 잘 통과할 수 있으며 피부 내에 활성 물질을 더 많이 침투시킬 수 있는 것으로 알려져 있다[13]. 탄성 리포솜의 제조에 일반적으로 사용되는 계면활성제

로는 sodium cholate, Tween 80, Span 80, dipotassium glycyrrhizinate 등이 있다[14,15]. 하지만 최근 화장품 원료의 안전성에 대한 관심 증대로 polyethyleneglycol (PEG)이 함유되지 않은 PEG-free 계면활성제의 사용이 증가하고 있다. 이러한 계면활성제의 예로 Tego® care 450 (polyglyceryl-3 methylglucose distearate) 등이 있다.

저자들의 연구실에서는, 피부노화 억제를 위한 화장품 개발을 목적으로 다양한 식물추출물로부터 천연 항산화제 및 기능성 소재를 탐색하고 그 활성을 측정하여 제품에 응용하는 연구를 수행하고 있다. 본 연구에 앞서 저자들은 여뀌(*Persicaria hydropiper* L.) 추출물 및 활성 분획에 대하여 free radical 소거활성, 총항산화능, 활성산소로부터 세포보호작용, 타이로시네이즈 저해활성 및 엘라스테이즈 저해 활성을 측정하여 보고한 바 있다[16]. 실험 결과 여뀌 추출물 또는 분획은  $\alpha$ -토코페롤 또는 비타민 C인 아스코르브산과 비교하여 큰 항산화 활성과 세포 보호효과를 나타내었다. 또한 미백제로 알려진 알부틴보다도 훨씬 큰 타이로시네이즈 저해 활성을 나타내었고 울레아놀릭산과 비교하여 엘라스테이즈 저해활성이 큼을 보여 주었다[16]. 이어서 저자들은 항산화 활성이 큰 여뀌 추출물·분획의 성분들을 분석하여 보고하였다. 활성 성분 분석 결과, 여뀌 추출물 및 분획 중에서 주성분으로 quercetin-3-O- $\beta$ -D-glucoside (isoquercitrin) 등의 플라보노이드를 확인할 수 있었다[17]. 그 외에도 여뀌 추출물의 항균활성과 추출물 함유 제품의 인체 보습효능을 측정하였다. 실험결과 여뀌 추출물 중 50% 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획에서 피부 상재균인 황색포도상구균에 대한 항균활성이 대조군인 methyl paraben보다 크게 나타났다. 추출물 함유 크림은 사람 피부에서 수분 보유량의 증가와 경표피 수분 손실양의 감소를 나타내어 보습효과가 있음을 확인하였다[18].

이상의 연구결과들은 여뀌 추출물 또는 분획이 항산화 및 항노화 기능성 화장품 소재로서 충분히 응용 가능성이 있음을 시사한다. 따라서 본 연구에서는 여뀌 추출물·분획 또는 주요 성분(isoquercitrin)이 자외선이 조사된 사람 각질 형성 세포주인 HaCaT 세포와 사람의 적혈구 세포에서도 세포보호 효과가 있는지 확인하였고, 또한 여뀌 추출물을 담지한 에토솜과 탄성 리포솜을 제조하여 이들 제형의 입자 크기, 안정성, 포집효율 및 피부 흡수능 향상을 위한 연구를 수행하였다. 궁극적으로는 이번 연구를 통하여 저자들은 항산화 방어 시스템을 갖춘 항산화 피부 장벽 구축을 통하여 피부노화를 예방할 수 있는 기능성 화장품 소재 및 제품을 개발하고자 수행한 연구 결과를 보고하고자 한다.



Scheme 1. Scheme for preparation of fractions from *P. hydropiper* L.

## 2. 재료 및 실험

### 2.1. 기기 및 시약

적혈구 광용혈에 사용한 Spectronic 20D는 Milton Roy Co. (USA) 제품, 화학발광기는 Berthold (Germany)사의 6-channel LB9505 LT를, pH meter는 Hanna (Korea)사 제품을 사용하였다. 자외선 조사에 사용한 CL-1000 Ultraviolet Crosslinker는 UVP사(USA) 제품을 사용하였다.

실험에 사용한 인지질인 L- $\alpha$ -phosphatidylcholine (egg PC, ~ 60%)은 Sigma (USA)사의 제품을 사용하였고, 에탄올과 클로로포름 등의 용매는 시판 특급시약을 사용하였다. 리포솜 제형 제조 시에 회전 증발기 (BUCHI, Switzerland)와 초음파 파쇄기 (BRANSON, USA)를 사용하였고, 제형의 입자 크기는 ELS-Z (OTSUKA, Japan)를 사용하여 측정하였다. 피부 투과 실험에 사용한 Franz diffusion cell은 PermeGear (USA)사의 9 mm Franz diffusion cell (receptor volume 5 mL)과 V6A Stirrer 모델을 사용하였다. 리포솜 제형에 포집된 여뀌 추출물의 포집 효율과 피부 투과 양을 측정하기 위해 사용한 UV-visible spectrophotometer는 Varian (Australia)사의 Cary 50 제품을 사용하였다.

실험 재료로 사용된 여뀌 추출물은 강원도 홍천군에서 채취한 것을 경동시장을 통하여 구입 사용하였으며, isoquercitrin은 여뀌 추출물로부터 분리·정제하여 사용하였다.

### 2.2. 여뀌 추출물 제조

건조된 여뀌 100 g을 잘게 자른 후, 50% 에탄올 2 L를 이용하여 일주일 동안 침적시킨 후 여과하였다. 이 추출물을 감압·농축한 후 hexan을 이용하여 비극성 성분을 제거하고 이후 에틸아세테이트 분획을 감압·농축하여 파우더를 얻었다(Scheme 1).

### 2.3. Isoquercitrin의 분리 및 항산화 효과 측정

#### 2.3.1. 여뀌 추출물로부터 Isoquercitrin의 분리

여뀌 추출물로부터 isoquercitrin의 분리 및 확인은 TLC 및 HPLC를 이용하였다. TLC의 전개용매는 ethyl acetate : chloroform : formic acid : distilled water = 8 : 1 : 1 : 1을 사용하였다. Isoquercitrin의 성분확인에는 플라보노이드 표준물질의 R<sub>f</sub> 수치와 발색법을 이용하여 확인하였다. HPLC는 2 % acetic acid와 50 % acetonitrile 용액에 0.5 % acetic acid의 농도로 하여 기울기 용리법으로 분리하였다. 실험에 사용한 isoquercitrin은 preparative TLC를 이용하여 얻었다.

#### 2.3.2. Luminol 발광법을 이용한 Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 계에 있어서 활성산소 소거 활성(총 항산화능)

Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 계에 의해 각종 ROS (O<sub>2</sub><sup>·-</sup>, ·OH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 등)가 생성되고, 이때 철이나 구리와 같은 전이금속은 반응성이 가장 큰 hydroxyl radical (·OH)을 생성시키는 촉매로 작용한다. 따라서 이 계를 이용하면 ROS에 대한 총 항산화능을 측정할 수 있다. 이 총 항산화능에는 활성산소의 생성을 막아주는 킬레이트 작용도 포함될 수 있다. Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 계에서 생성된 ROS의 검출은 luminol과 ROS 간의 반응을 통한 화학발광을 측정함으로써 알 수 있다.

화학발광 측정용 튜브에 증류수 1.78 mL을 넣고 다양한 농도의 isoquercitrin을 넣었다. 여기에 2.5 mM EDTA 40 μL 및 5 mM FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O 10 μL를 가한 후 35 mM luminol 80 μL를 넣고 흔들어 섞어 주었다. 이어서 화학발광기의 cell holder에 튜브를 넣고 5 min 동안 항온시킨 후 150 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 40 μL를 넣고 화학발광을 25 min 동안 측정하였다. 대조군은 시료 용액 대신에 증류수를 넣고, 공시험은 시료군과 조건이 동일하나 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O를 첨가하지 않은 것으로 하였다. 화학발광기 6-channel LB9505 LT의 각 채널은 실험 전에 보정하여 채널간의 차이가 거의 없도록 하였다. 화학발광으로 측정된 저해율은 다음 식으로 구하였고, 이를 이용해서 활성산소 소거활성의 크기는 화학발광의 세기가 50 % 감소되는 데 필요한 시료의 농도(reactive oxygen species scavenging activity, OSC<sub>50</sub>, μg/mL)로서 표기하였다.

### 2.4. Photohemolysis법을 이용한 세포 보호 효과 측정

#### 2.4.1. 적혈구 현탁액 제조

적혈구는 건강한 성인으로부터 얻었다. 채혈 즉시 heparin이 첨가된 시험관에 넣은 후, 3,000 rpm으로 5 min 동안 원심분리하여 적혈구와 혈장을 분리하고, 분리한 적혈구는 0.9 % saline phosphate buffer (PBS)로 세척하여 원심분리하고 흰색의 백혈구 층은 제거하였다. 3회 반복하여 세척, 분리한 적혈구는 4 °C의 냉장고에 보관하면서 사용하였고, 모든 실험은 채혈 후 12 h 이내에 행하였다. 광용혈 방법은 이미 확립된 방법에 따라 수행하였다. 실험에 사용된 적혈구 현탁액은 700 nm에서 O.D.가 0.6이었으며 이때 적혈구 수는 1.5 × 10<sup>7</sup> cell/mL이었다.

#### 2.4.2. Isoquercitrin의 광용혈 억제 효과

1.5 × 10<sup>7</sup> cells/mL 적혈구 현탁액 3.5 mL를 파이렉스 시험관(No. 9820)에 넣은 후, isoquercitrin을 농도별로 각각 50 μL씩 첨가하였다. 암소에서 30 min 간 pre-incubation 시킨 후, 광증감제로 rose-bengal (12 μM) 0.5 mL를 가하고 파라필름으로 입구를 봉한 후 15 min 동안 광조사하였다.

광용혈에 필요한 광조사는 내부를 검게 칠한 50 cm × 20 cm × 25 cm 크기의 상자 안에 20 W 형광등을 장치하고, 형광등으로부터 5 cm 거리에 적혈구 현탁액이 담긴 파이렉스 시험관을 형광등과 평행이 되도록 배열한 후 15 min간 광을 조사하였다. 광조사가 끝난 후 암반응(post-incubation) 시간에 따른 적혈구의 파괴정도를 15 min 간격으로 700 nm에서 투광도(% transmittance)로부터 구하였다. 이 과정에서 적혈구 현탁액 투광도의 증가는 적혈구의 용혈정도에 비례한다. 모든 실험은 20 °C 항온실에서 행하였다. Isoquercitrin이 광용혈에 미치는 효과는 암반응 시간과 용혈 정도로 구성된 그래프로부터 적혈구의 50 %가 용혈되는 시간인 τ<sub>50</sub>을 구하여 비교하였다.

대조군은 τ<sub>50</sub>이 31 min으로 오차 범위 ± 1 min 이내로 모든 경우의 실험에서 재현성이 양호하게 나타났다. Rose-bengal을 첨가하고 광조사를 안했을 경우와 rose-bengal을 첨가하지 않고 광조사만 했을 경우는 모두 암반응 120 min까지는 용혈이 거의 일어나지 않았다. 모든 실험은 3회 반복하여 평균하였다.

### 2.5. 세포 배양

사람 각질형성 세포주인 HaCaT 세포는 Dr. Fusenig

(German Cancer Research Center, DKFZ)로부터 분양 받아 사용하였다. 세포배양에 사용된 배지(Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM)는 10 % fetal bovine serum (PAA, Austria), 1 % penicillin-streptomycin (PAA, Austria)을 혼합하여 사용하였고, 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다.

## 2.6. UVB 조사

96 well plate에  $5 \times 10^4$  cells/well로 부착시킨 HaCaT 세포를 PBS로 세척하고 UVB Crosslinker를 이용하여 UVB 400 mJ/cm<sup>2</sup>를 조사하였다. 정상배지 혹은 농도별 여뀌 추출물과 isoquercitrin이 함유된 배지에 자외선 조사를 한 후 적정 시간동안 배양하였다.

## 2.7. 세포 생존율 측정

세포 생존율은 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma, USA) assay로 측정하였다. 살아있는 세포의 mitochondria dehydrogenase의 능력을 이용하여 노란색의 수용성 기질인 MTT를 진청색의 비수용성 formazan으로 변환시키는 방법으로 생성된 formazan의 양은 살아있는 세포 수에 비례한다.

HaCaT 세포를 96 well plate에서 24 h 동안 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> 조건으로 항온 배양한 후, UVB (400 mJ/cm<sup>2</sup>)를 조사하여 각 농도별로 여뀌 추출물 및 isoquercitrin을 처리하였다. 시료 처리 후, 24 h 동안 배양한 세포를 PBS로 세척하고 MTT 용액(2 µg/mL)을 첨가하여 3 h 동안 반응시킨 후, 생성된 formazan을 DMSO에 녹여 570 nm에서 측정하였다.

시료와 자외선 처리를 하지 않은 비조사군을 음성대조군으로 하여 100 % 기준으로 잡아 상대적인 세포 생존율을 구하였다. 시료를 처리하지 않은 자외선 조사군을 양성대조군으로 하였으며, 세포의 생존율은 다음의 식에 따라 계산하였다.

$$\text{세포생존율 (\%)} = \frac{\text{시료 첨가군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$

## 2.8. 제형 제조

### 2.8.1. 에토솜 제조

에토솜의 제조는 얇은 막 수화 방법을 사용하였다 [19-21]. Egg PC (2 %, w/v)와 여뀌 추출물(0.03 % ~

0.1 %, w/v)을 50 mL 둥근 바닥 플라스크에 넣고 클로로포름을 넣어 녹인다. 그 후에 회전 증발기(rotary evaporator)를 이용해서 유기 용매를 증발시킨다. 유기 용매가 증발되면서 플라스크 벽면에 생긴 얇은 막에 20 % 에탄올 용액을 넣고 지질 전이 온도 이상에서 500 rpm으로 교반하며 수화시킨다. 이렇게 얻어진 에토솜이 좀 더 균일한 크기의 베지클이 되도록 해 주기 위해서 glass bead를 넣고 초음파 파쇄기를 30 min 간 가해준다.

### 2.8.2. 탄성 리포솜 제조

탄성 리포솜의 제조는 에토솜 제형 제조와 동일한 방법인 얇은 막 수화법에 의하여 다음과 같이 제조하였다. 50 mL 둥근 바닥 플라스크에 여뀌 추출물 0.1 %를 넣은 후, egg PC와 Tego<sup>®</sup>care 450을 각 다른 비율(100 : 0, 95 : 5, 90 : 10, 85 : 15, 80 : 20)로 넣어 15 mL의 클로로포름에 용해시킨다. 유기용매는 회전 증발기를 이용하여 제거하고, 이때 플라스크 벽면에 지질막이 형성된다. 생성된 얇은 지질막을 phosphate buffer (1.6 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 9.6 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O, pH 7.4) 10 mL로 수화하여 탄성 리포솜을 형성시킨다. 이렇게 얻어진 탄성 리포솜의 입자 크기를 균일하게 하기 위하여 glass bead를 넣고 30 min 동안 초음파 파쇄기를 가해주었다. 탄성 리포솜에 포집되지 않은 여뀌 추출물의 에틸아세테이트 추출물은 1.2 µm 필터를 이용하여 제거하였으며, 탄성 리포솜 제형의 최종 지질 농도는 0.5 % (w/v)이고, 여뀌 추출물의 농도는 0.1 % (w/v)로 하였다.

## 2.9. 입자 크기 측정

용액 중에 분산된 입자는 크기에 따라 브라운 운동을 하는데 이때 광을 조사하게 되면 큰 입자는 느리게 작은 입자는 빠르게 움직임을 나타낸다. 이때 이 움직임을 광전자상관법으로 해석함으로써 Einstein-stokes식을 이용하여 입자의 크기가 구해지게 된다. 용매 중에 있는 리포솜 제형의 크기는 빛의 산란강도를 이용하여 입자크기를 분석하는 입도분석기 Otsuka ELS-Z를 이용하여 측정하였다. He-Ne laser를 이용하여 측정하였으며 입자크기는 누적분석법을 이용하였다. 또한 입경분포 해석방법은 Contin을 이용하여 입경분포를 구하였다.

## 2.10. 포집효율 측정

### 2.10.1. 에토솜 포집효율 측정

완성된 에토솜 현탁액에서 1 mL를 취해 1.2 µm

syringe filter (Minisart CA 26 mm)를 이용하여 포집되지 않은 여뀌 추출물을 제거한다. 그 후 에탄올을 이용하여 에토솜의 막을 파괴시킨다. 에탄올을 회전 증발기를 이용하여 증발시킨 후 다시 1 mL의 에탄올을 넣어준다. 그리고 에토솜 현탁액 속 에탄올에 녹아있는 여뀌 추출물의 양을 보정해주기 위해 동량의 여뀌 추출물을 20 % 에탄올에 녹인 후 이 용액 역시 위와 동일한 방법으로 처리해준다. 이렇게 준비된 시료를 UV를 이용해 여뀌 추출물의 최대 흡수파장인 360 nm에서 측정하였다. UV를 이용해 나온 값을 다음에 나타난 식 (1)에 대입하여 에토솜의 포집효율을 계산하였다.

$$\text{Loading efficiency (\%)} = \{ (C_P - C_E) / C_0 \} \times 100 \quad (1)$$

$C_P$  : 1.2  $\mu\text{m}$  syringe filter를 통과한 여뀌 추출물 농도  
 $C_E$  : 20 % 에탄올 속에 녹아 있는 여뀌 추출물 농도  
 $C_0$  : 처음 넣어준 여뀌 추출물 농도

### 2.10.2. 탄성 리포솜 포집효율 측정

완성된 탄성 리포솜 현탁액 일정량을 취하고 1.2  $\mu\text{m}$  syringe filter를 이용하여 탄성 리포솜 내 포집되지 않은 여뀌 추출물을 제거한다. 그 후 에탄올을 이용하여 탄성 리포솜의 막을 파괴시킨 다음 에탄올은 회전 증발기를 이용하여 증발시키고 다시 1 mL의 에탄올을 넣어준다. UV를 이용해 여뀌 추출물의 최대 흡수파장인 360 nm에서 탄성 리포솜에 포집된 여뀌 추출물을 정량하였다.

또한 농도별 여뀌 추출물의 검량선을 작성한 후 흡광도(360 nm) 값에 의한 여뀌 추출물의 농도를 산출하였고, 탄성 리포솜의 포집효율은 다음에 나타난 식 (2)에 의해 계산하였다.

$$\text{Loading efficiency (\%)} = \{ (T - P) / T \} \times 100 \quad (2)$$

$T$  : 처음 넣어준 여뀌 추출물 농도  
 $P$  : 1.2  $\mu\text{m}$  syringe filter를 통과하지 못한 여뀌 추출물 농도

### 2.11. 탄성 리포솜의 가변형성 측정

제조된 탄성 리포솜의 가변형성 평가를 위해 mini extruder를 사용하여 탄성 리포솜이 인공 투과장벽을 통과하는 정도를 측정하였다. 탄성 리포솜 현탁액을 0.2 MPa의 압력을 1 min 간 가했을 때 0.08  $\mu\text{m}$  크기의 기공을 갖는 polycarbonate membrane을 통과하여 나온 리포

솜 현탁액의 양을 측정하고 membrane을 통과한 리포솜 입자크기를 측정하였다.

탄성 리포솜 막의 탄성 값은  $J_{flux} \times (r_v/r_p)^2$ 에 비례한다 [22,23].

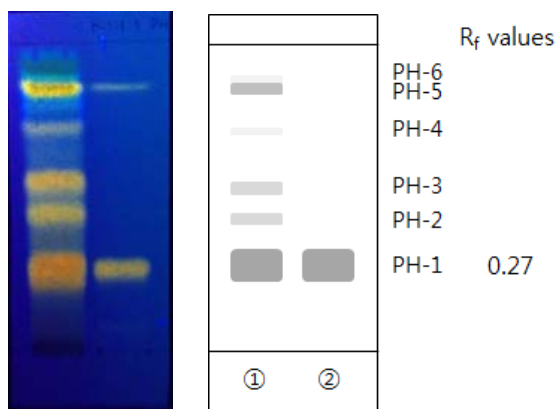
$$\text{Elasticity} = J_{flux} \times (r_v/r_p)^2 \quad (3)$$

여기서  $J_{flux}$ 는 membrane을 통과한 리포솜의 양을 나타내고,  $r_v$ 는 extrusion 후 리포솜 입자크기,  $r_p$ 는 membrane의 기공 크기를 말한다.

### 2.12. In Vitro 피부 투과 실험(Franz Diffusion Cell)

에토솜과 탄성 리포솜이 여뀌 추출물의 피부 투과 증진에 어떠한 효과를 주는지 확인하기 위해 Franz diffusion cell을 이용하여 피부 투과 실험을 진행하였다. 피부 투과 실험에 사용한 쥐의 피부는 경추탈골로 치사시킨 ICR outbred albino mice (8주령, 암컷)의 등에서 적출하여 사용하였다. 적출한 피부는 피하지방과 조직을 제거한 후 사용하였다. Receptor chamber에 receptor phase (HCO-60 : Ethanol : PBS = 2 : 20 : 78 (w/w/w %)) 5 mL를 채운 후 각질층이 위로 향하도록 donor와 receptor phase 사이에 피부를 고정시켰다. 실험이 진행되는 동안 항온수조를 이용해 온도를  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 로 유지하였다. 각 시료 0.2 mL를 donor를 통하여 피부 표면에 가한 후 시간에 따라 매 회 0.5 mL의 receptor phase를 sampling port를 통하여 채취하였다. 채취 직후 동량의 receptor phase를 receptor chamber에 보충하였다. 채취한 시료 속 여뀌 추출물의 양은 UV를 이용하여 360 nm에서 측정하였다.

24 h 후 각질층과 피부에 남아있는 여뀌 추출물의 양을 측정하기 위해 쥐의 피부를 PBS로 3회에 걸쳐 세척하였다. 세척 후 receptor phase와 닿지 않은 부분을 잘라내고 남은 부분에 대해 tape stripping 법을 이용해 각질층에 남아있는 여뀌 추출물의 양을 따로 측정하였다. 각질층에 남아있는 여뀌 추출물의 양을 측정하기 위해 테이프를 이용하여 피부의 각질층 부분을 3회 벗겨내었으며 이렇게 얻어진 테이프에 10 mL의 에탄올을 넣고 1 h 동안 초음파 세척기를 이용하여 여뀌 추출물을 추출하였다. 그 후 회전증발기를 이용하여 에탄올을 증발시키고 추출된 여뀌 추출물을 0.5 mL의 receptor phase에 녹여 내었다. Tape stripping법을 거친 후 각질층이 제거된 피부는 수술용 가위를 이용해 세절하였고 세절한 피부의 처리는 Tape와 동일하게 진행하였다. 이렇게 얻어진 시



**Figure 1.** TLC chromatogram of *P. hydropiper* extract and reference. Eluent system : ethyl acetate : chloroform : formic acid : distilled water = 8 : 1 : 1 : 1 (v/v), ① *P. hydropiper* extract (ethyl acetate fraction), ② isoquercitrin.

료 속 여뀌 추출물의 양은 UV를 이용하여 360 nm에서 측정하였다.

### 2.13. 통계처리

모든 실험은 3회 반복하였고 통계분석은 5 % 유의수준에서 Student's *t*-test를 행하였다.

## 3. 결 과

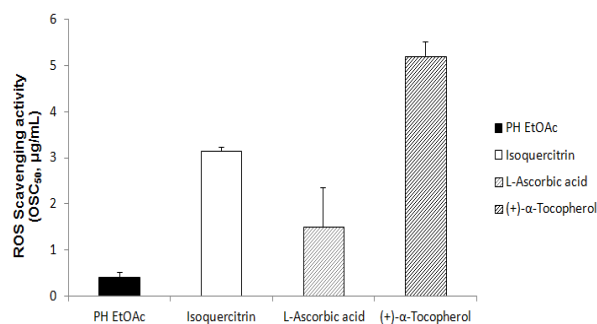
### 3.1. 여뀌 추출물로부터 Isoquercitrin의 분리와 항산화능 측정

#### 3.1.1. Isoquercitrin의 분리 및 확인

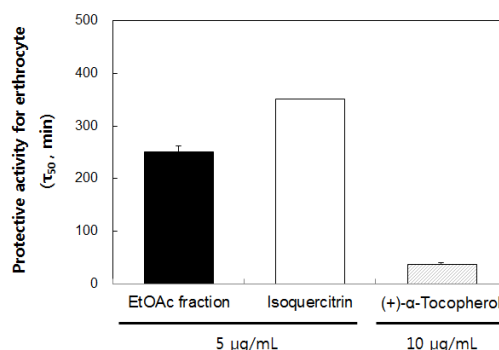
여뀌 추출물에서 isoquercitrin의 분리는 preparative TLC를 이용하였다(Figure 1). 여뀌 추출물 중 에틸아세테이트 분획 및 그 아글리콘의 성분 확인은 이전 연구에서 보고한 바 있다[15]. TLC에서 여뀌 추출물은 총 6개의 띠를 나타내었으며, 그 중에서 R<sub>f</sub>값이 0.27인 isoquercitrin은 여뀌 추출물 중 함량이 가장 많은 주요 성분임을 UV visible 분광기, NP-PEG 발색법 및 IR 등의 분광학적 방법을 통하여 확인하였다. 분리된 isoquercitrin은 다시 정제하여 실험에 사용하였다.

#### 3.1.2. Luminol 발광법을 이용한 Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 계에 있어서 활성산소 소거 활성(총항산화능)

이전 연구에서 여뀌 추출물의 활성산소 소거능(총항산화능, OSC<sub>50</sub>)은 0.4 μg/mL로 우수한 효능을 나타내었다. 여뀌 추출물의 성분 중 주요 성분인 isoquercitrin의



**Figure 2.** Reactive oxygen species scavenging activities of ethyl acetate fraction from *P. hydropiper* extract, isoquercitrin and reference compounds in Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> system by luminol-dependent chemiluminescence assay.

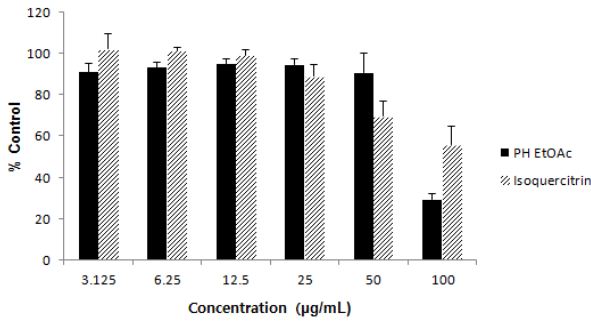


**Figure 3.** Cellular protective effects of ethyl acetate fraction from *P. hydropiper* extract, isoquercitrin and (+)-α-tocopherol on the rose-bengal sensitized photohemolysis of human erythrocytes (Control = 31.0 ± 0.30 min)

활성산소 소거능은 3.13 μg/mL로 나타났으며, 비교물질로 사용된 수용성 항산화제인 L-ascorbic acid (OSC<sub>50</sub> = 1.50 μg/mL)보다는 약간 낮은 활성을 나타내었지만, (+)-α-tocopherol (OSC<sub>50</sub> = 5.20 μg/mL)보다는 총항산화능이 더 큰 것으로 나타났다(Figure 2).

#### 3.1.3. <sup>1</sup>O<sub>2</sub>으로 유도된 사람 적혈구의 파괴에 대한 세포 보호 효과

활성산소에 대한 isoquercitrin의 세포 보호 효과는 rose-bengal 존재 하에서 사람 적혈구 현탁액에 15 min 광 조사 후 <sup>1</sup>O<sub>2</sub>으로 유도된 적혈구의 용혈정도를 암반응 시간에 따라 측정함으로써 구하였다. 대조군의 경우 적혈구 세포가 50 % 용혈 되는데 걸리는 시간(τ<sub>50</sub>)은 약 31.0 min으로 나타났다. Isoquercitrin의 활성산소에 의한 세포손상에 있어서 보호 효과를 측정할 결과를 Figure 3에 나타내었다.



**Figure 4.** Cell viability of *P. hydropiper* extract and isoquercitrin obtained from *P. hydropiper* extract.

적혈구세포가 50 % 파괴되는 데 걸리는 시간 ( $\tau_{50}$ )은 세포 보호 활성이 클수록 크게 나타난다. Isoquercitrin은 5 µg/mL에서  $\tau_{50}$ 이 351.5 min으로 지용성 항산화제이자 지질과산화반응의 라디칼 연쇄반응에서 차단제로 알려진 (+)- $\alpha$ -tocopherol (10 µg/mL,  $\tau_{50}$  = 34.0 min) 보다도 훨씬 큰 세포 보호 활성을 나타냄을 확인하였다. 이는 또한 여뀌 추출물의 에틸아세테이트 분획보다도 큰 보호 활성을 나타내었다. 5 µg/mL의 낮은 농도에서도 isoquercitrin이 매우 큰 세포 보호 활성을 나타낸다는 사실은 흥미로운 일로 다른 플라보노이드 배당체들과는 분명 차별성이 있음을 알 수 있다. Isoquercitrin에 대한 많은 연구가 필요하다고 사료된다.

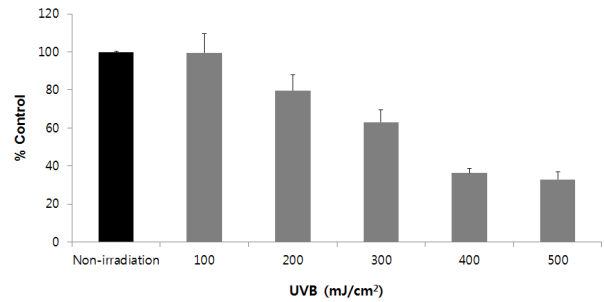
### 3.2. 여뀌 추출물 및 Isoquercitrin의 자외선에 대한 HaCaT 세포 보호 효과

#### 3.2.1. 여뀌 추출물 및 Isoquercitrin의 세포 독성

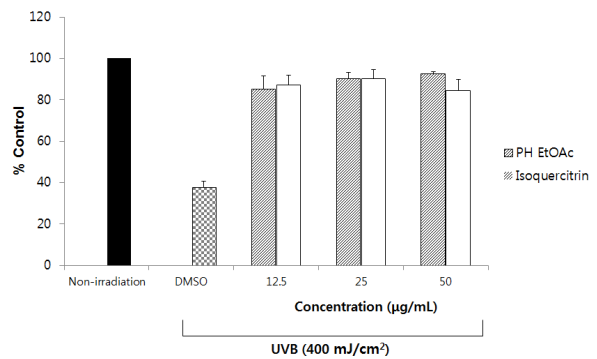
여뀌 추출물이 세포 독성에 미치는 농도를 조사하고, 실험에 사용될 농도 범위 결정을 위해 MTT assay를 시행하였다. HaCaT 세포에 대한 여뀌 추출물의 세포 독성을 측정할 결과 여뀌 추출물의 에틸아세테이트 분획은 50 µg/mL 농도까지는 세포 생존율이 90 % 이상으로 나타났으며, 여뀌 추출물에서 분리한 활성 성분인 isoquercitrin의 경우는 25 µg/mL 농도에서 세포 생존율이 90 % 이상으로 나타났으나, 50 µg/mL 농도 이상에서는 세포독성이 보이기 시작했다(Figure 4).

#### 3.2.2. UVB 조사선량에 따른 세포 생존율

UVB Crosslinker를 이용하여 HaCaT 세포를 대상으로 UVB를 광량별(100 ~ 500 mJ/cm<sup>2</sup>)로 조사하고 세포 생존율에 미치는 영향을 관찰하였다. 100 mJ/cm<sup>2</sup>의 UVB를 조사한 경우는 자외선을 조사하지 않은 경우와



**Figure 5.** Viability of HaCaT cells exposed to different irradiation intensities of UVB irradiation. Cells were exposed with UVB irradiation and the cytotoxicity level was determined by MTT. Blank: no UVB exposure.



**Figure 6.** Cell viability effect of *P. hydropiper* extract (ethyl acetate fraction) and isoquercitrin on UVB-induced cell damage in HaCaT cell system. HaCaT cell were exposed to UVB 400 mJ/cm<sup>2</sup> and stained with MTT to show survival cells compared to non-irradiated group.

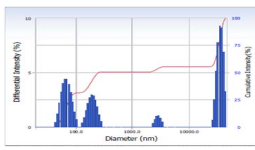
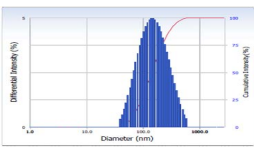
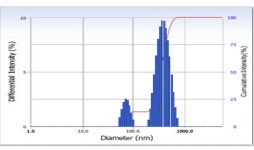
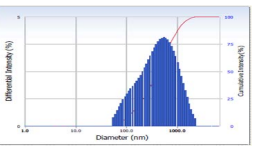
같이 세포 생존율에 큰 영향을 미치지 못했으며, 200 mJ/cm<sup>2</sup>인 경우 세포 생존율은 80 %를 나타내었고, 300 mJ/cm<sup>2</sup>은 63 %, 400 mJ/cm<sup>2</sup>은 36 % 그리고 500 mJ/cm<sup>2</sup>에서는 33 %의 생존율을 나타내었다. 본 연구에서는 자외선으로부터 세포보호 효과를 측정하기 위한 자외선의 광량은 400 mJ/cm<sup>2</sup>를 이용하였다(Figure 5).

#### 3.2.3. UVB 조사 후 여뀌 추출물과 Isoquercitrin을 처리한 세포의 생존율

HaCaT 세포에 400 mJ/cm<sup>2</sup>의 UVB를 조사하고 24 h 동안 농도별 여뀌 추출물과 isoquercitrin을 처리하였을 때의 세포 생존율을 MTT assay를 통해 측정하였다. 400 mJ/cm<sup>2</sup>의 UVB를 조사한 후 세포 생존율은 UVB를 조사하지 않은 대조군에 비하여 36 %의 생존율을 나타내었다. 자외선 조사 전 HaCaT 세포에 12.5, 25 및 50 µg/mL의 여뀌 추출물을 처리한 경우 세포 생존율은 85,



**Table 1.** Size of Ethosomal Vesicles with Different Concentration of *P. hydropiper* Extracts in a System Composed of 2 % Lecithin and 20 % Ethanol

Concentration of PH extract (%)	0.03	0.04	0.05	0.10																																			
Size of ethosome																																							
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Peak</th> <th>Diameter (nm)</th> <th>Std. Dev.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>69.2</td> <td>13.9</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>200.4</td> <td>37.1</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>2,953.0</td> <td>331.0</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>37,773.2</td> <td>4,938.1</td> </tr> </tbody> </table>	Peak	Diameter (nm)	Std. Dev.	1	69.2	13.9	2	200.4	37.1	3	2,953.0	331.0	4	37,773.2	4,938.1	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Peak</th> <th>Diameter (nm)</th> <th>Std. Dev.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>173.0</td> <td>103.4</td> </tr> </tbody> </table>	Peak	Diameter (nm)	Std. Dev.	1	173.0	103.4	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Peak</th> <th>Diameter (nm)</th> <th>Std. Dev.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>74.7</td> <td>12.1</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>408.3</td> <td>115.7</td> </tr> </tbody> </table>	Peak	Diameter (nm)	Std. Dev.	1	74.7	12.1	2	408.3	115.7	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Peak</th> <th>Diameter (nm)</th> <th>Std. Dev.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>572.0</td> <td>447.0</td> </tr> </tbody> </table>	Peak	Diameter (nm)	Std. Dev.	1	572.0
Peak	Diameter (nm)	Std. Dev.																																					
1	69.2	13.9																																					
2	200.4	37.1																																					
3	2,953.0	331.0																																					
4	37,773.2	4,938.1																																					
Peak	Diameter (nm)	Std. Dev.																																					
1	173.0	103.4																																					
Peak	Diameter (nm)	Std. Dev.																																					
1	74.7	12.1																																					
2	408.3	115.7																																					
Peak	Diameter (nm)	Std. Dev.																																					
1	572.0	447.0																																					

PH : *P. hydropiper* L.

**Table 2.** Vesicle Size and Loading Efficiency of 0.04 % *P. hydropiper* Extract Loaded Ethosome

0.04 % <i>P. hydropiper</i> extracts loaded ethosome		
Vesicle size (nm)	After 0 week	173.0 ± 103.4
	After 1 week	190.1 ± 136.9
Loading efficiency (%)	55.58 ± 7.33	

90 및 92 %로 여뀌 추출물은 자외선 조사에서 세포 사멸을 억제하는 효과가 매우 큰 것으로 나타났다. 여뀌 추출물에서와 같이 여뀌 추출물의 주요 성분인 isoquercitrin을 처리한 경우도 각각의 농도(12.5, 25, 50 µg/mL)에서 세포 생존율이 87, 90 및 84 % 자외선에 대하여 매우 큰 세포 보호활성을 나타내었다. 한편 isoquercitrin의 경우 50 µg/mL의 농도에서 세포 생존율이 동일 농도의 여뀌 추출물에서보다 8 % 낮게 나타난 것은 아마도 50 µg/mL에서 isoquercitrin 자체의 세포에 대한 독성을 반영한 결과로 보인다(Figure 1). 결과적으로 여뀌 추출물과 isoquercitrin은 자외선 조사 전에 처리한 경우 자외선에 대하여 큰 세포보호 활성을 나타냄을 알 수 있었다(Figure 6).

### 3.3. 여뀌 추출물을 담지한 에토솜

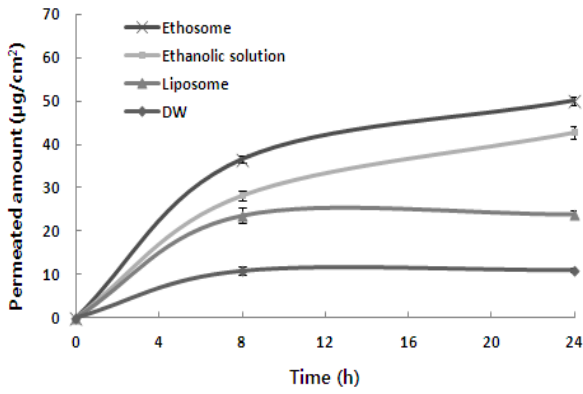
#### 3.3.1. 에토솜의 입자 크기 및 포집 효율

본 연구에 앞서 저자들은 에탄올 농도에 따른 에토솜을 제조하고 이들의 입자 크기 및 안정성 실험을 수행한 바 있다. 실험결과 20 % 에탄올을 함유한 경우 안정한 나노 입자를 형성함을 확인였다(data not shown). 이를 바탕으로 본 연구에서는 다양한 농도의 여뀌 추출물을

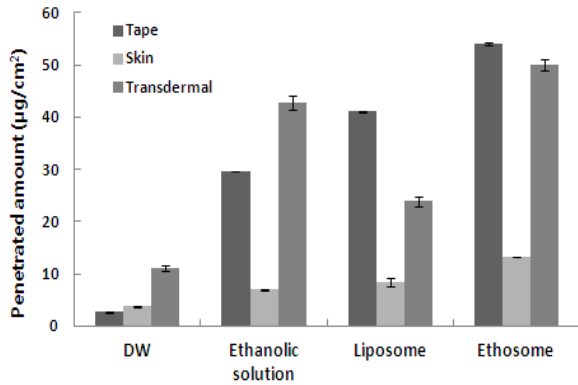
첨가한 20 % 에탄올 함유 에토솜을 제조하였다. 0.03 %, 0.04 %, 0.05 % 및 0.10 %의 여뀌 추출물이 함유된 에토솜을 제조하였을 때 그 중에서 0.04 % 여뀌 추출물 함유 에토솜의 경우 입자 크기가 대략 173.0 nm로 단분산 형태의 안정한 입도 분포를 나타내었다. 0.10 %의 여뀌 추출물 함유 에토솜의 경우도 단분산 형태로 입자 크기는 572.0 nm를 나타냈으나 제조 후 다음날 층 분리가 발생해 불안정함을 나타내었다. 그 외에 0.03 % 및 0.05 %인 경우는 에토솜 제조 후 즉시 다분산 형태를 나타냈고 안정한 에토솜은 형성되지 않았다(Table 1).

Table 2는 0.04 % 여뀌 추출물 함유 에토솜의 포집 효율과 여뀌 추출물 함유 에토솜을 제조 직후와 제조 후 1주일에 입자 크기를 측정하여 시간에 따른 입자 크기 변화 및 안정성을 측정한 결과를 보여주고 있다. 0.04 % 여뀌 추출물 함유 에토솜의 입자 크기는 173.0 ± 103.4 nm, 포집효율은 55.58 ± 7.33 %임을 확인하였다.

일주일 후에 0.04 % 여뀌 추출물 함유 에토솜의 입자 크기는 190.1 ± 136.9 nm로 나타났으며 초기에 비해 입자 크기가 9.8 % 증가하였다. 그러나 일주일 후에도 입자 분포가 단 분산 형태를 유지하였고 침전이나 분리 현상이 관찰되지 않아 안정한 에토솜이 형성되었음을 알 수 있었다. 따라서 일정한 입도 분포와 적절한 입자 크기를 유



**Figure 7.** Comparative cumulative amount of *P. hydropiper* extracts permeated from ethosome, liposome, hydroethanolic solution, and distilled water (DW) solution with time during 24 h via mice dorsal skin.

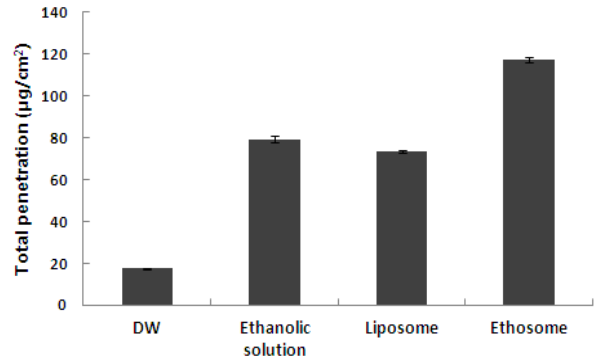


**Figure 8.** Penetrated amount of *P. hydropiper* extracts measured from ethosome, liposome, hydroethanolic solution and distilled water (DW) solution after 24 h via mice dorsal skin (Tape : stratum corneum, skin : epidermis without stratum corneum and dermis, transdermal : permeated through skin).

지하는 안정성이 확인되었으므로 0.04 % 여뀌 추출물을 포집시킨 에토솜을 피부 투과 실험에 적용하였다.

### 3.3.2. 에토솜의 *In Vitro* 피부 투과 실험(Franz Diffusion Cell)

0.04 % 여뀌 추출물을 담지한 20 % 에탄올 함유 에토솜을 제조하고 이를 피부 투과 실험에 사용하였다. 대조군으로는 0.04 % 여뀌 추출물만을 담지한 리포솜과 0.04 % 여뀌 추출물을 녹인 에탄올 용액 그리고 0.04 % 여뀌 추출물을 증류수에 녹인 것을 사용하였다. 시간에 따라 피부에 누적 투과된 여뀌 추출물의 양은 24 h 동안 에토



**Figure 9.** Total penetrated amount of *P. hydropiper* extracts measured from ethosome, liposome, hydroethanolic solution and distilled water (DW) solution after 24 h via mice dorsal skin.

솜 및 대조군으로 사용한 에탄올 용액에서 모두 시간-의존적으로 증가하는 경향을 나타내었다(Figure 7). 24 h 후의 피부 누적 투과량(Transdermal)은 에토솜이  $50.08 \pm 1.01 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 으로 가장 높고, 그 다음 에탄올 용액 ( $42.82 \pm 1.40 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), 리포솜( $23.91 \pm 0.93 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), 증류수( $11.07 \pm 0.46 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) 순으로 나타났다. 그리고 24 h 후 각질층에 남아있는 여뀌 추출물의 양(Tape)은 에토솜( $54.07 \pm 0.21 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) > 리포솜( $41.11 \pm 0.15 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) > 에탄올 용액( $29.59 \pm 0.07 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) > 증류수( $2.67 \pm 0.04 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) 순으로 나타났고, 각질층을 제거한 피부에 남아있는 여뀌 추출물의 양(Skin) 또한 에토솜( $13.26 \pm 0.11 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) > 리포솜( $8.42 \pm 0.74 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) > 에탄올 용액( $6.94 \pm 0.06 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) > 증류수( $3.76 \pm 0.06 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) 순으로 나타났다(Figure 8). 피부 투과 실험에 사용한 여뀌 추출물의 양은 모든 제형에서  $125.75 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 이었고, 여뀌 추출물의 총 피부 투과량은 에토솜( $117.41 \pm 1.28 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) > 에탄올 용액( $79.34 \pm 1.43 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) > 리포솜( $73.44 \pm 0.40 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) > 증류수( $17.50 \pm 0.49 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) 순으로 나타났다(Figure 9). 에토솜의 투과 효율은 93.37 %로 거의 모든 여뀌 추출물이 투과가 된 것으로 나타났고 에탄올 용액, 리포솜, 증류수에서 투과 효율이 각각 63.10, 58.40, 13.92 %로 나타났다. 따라서 0.04 % 여뀌 추출물을 피부로 전달하는 능력은 에토솜이 가장 우수한 것으로 확인되었다.

### 3.4. 여뀌 추출물을 담지한 탄성 리포솜

#### 3.4.1. 탄성 리포솜의 입자 크기

탄성 리포솜의 구성 성분과 조성을 Table 3에 나타내

**Table 3.** Composition and Size of Elastic Liposomal Formulations Before and After Extrusion through Polycarbonate Membrane with a Pore Size of 80 nm

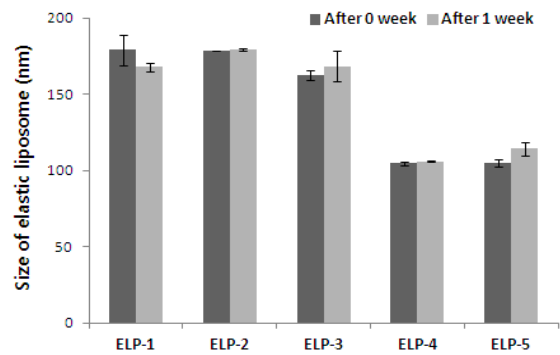
Formulation code	PC <sup>a)</sup> : S <sup>b)</sup> (%w/w)	<i>P. hydropiper</i> extract (mg)	Size before extrusion (nm)	Size after extrusion (nm)
EL <sup>c)</sup> -1	100 : 0	-	161.3 ± 1.1	114.5 ± 9.1
EL <sup>c)</sup> -2	95 : 5	-	183.2 ± 6.2	185.4 ± 5.1
EL <sup>c)</sup> -3	90 : 10	-	121.6 ± 5.1	125.4 ± 5.1
EL <sup>c)</sup> -4	85 : 15	-	95.4 ± 6.1	96.7 ± 3.3
EL <sup>c)</sup> -5	80 : 20	-	137.3 ± 4.2	136.1 ± 1.6
ELP <sup>d)</sup> -1	100 : 0	10.0	178.6 ± 1.6	178.9 ± 10.0
ELP <sup>d)</sup> -2	95 : 5	10.0	176.5 ± 6.2	178.4 ± 0.1
ELP <sup>d)</sup> -3	90 : 10	10.0	172.9 ± 1.4	162.6 ± 3.1
ELP <sup>d)</sup> -4	85 : 15	10.0	105.5 ± 0.7	104.6 ± 1.2
ELP <sup>d)</sup> -5	80 : 20	10.0	107.1 ± 0.2	104.9 ± 2.6

a) PC : Egg phosphatidylcholine, b) S : Tego<sup>®</sup>care 450, c) EL : Elastic liposomal formulation, d) ELP : *P. hydropiper* L. loaded elastic liposomal formulation Values represent Mean ± SD (n = 3)

었다. 탄성 리포솜은 Tego<sup>®</sup>care 450 (계면활성제)과 egg PC의 비율을 다르게 하여 얇은 막 수화법으로 제조하였다. 제조된 리포솜 현탁액은 mini extruder를 이용하여 압출시켜서 제조하였다. 압출 전과 후의 평균 입자크기는 Table 3에 나타내었다.

빈 탄성 리포솜(EL-)의 경우 평균 입자크기는 EL-1은 161.3 nm, EL-2는 183.2 nm로 측정되었고, 그 후 계면활성제의 농도가 증가할수록 입자 크기는 감소하는 경향을 보였으나 인지질과 계면활성제의 비율이 80 : 20인 EL-5의 경우는 입자 크기가 137.3 nm로 나타났다. 여뀌 추출물이 함유된 탄성 리포솜(ELP-)은 계면활성제의 농도가 10 % (w/w) 까지는 입자 크기가 172.9 ~ 178.9 nm로 단분산 형태의 거의 일정한 크기의 입도분포를 보여주었다. 계면활성제의 농도가 15 %와 20 %의 경우는 105.5 ~ 107.1 nm로 입자 크기가 감소한 경향을 나타내었다.

탄성 리포솜의 저장 기간에 따른 입자크기 변화는 리포솜 막의 물리적 안정성을 평가하는 데 중요하다. 일반적으로 리포솜 막이 불안정해지면 리포솜 입자 간의 간격이 좁아지게 되면서 입자 크기가 커지는 경향이 있는 것으로 보고되고 있다. 본 연구에서 제조한 여뀌 추출물 함유 탄성 리포솜을 제조한 직후와 일주일 후(4 °C에 보관)에 입자크기에 변화가 있는지 알아보았다. 제조 후 일



**Figure 10.** Changes in size of elastic liposomal formulation containing *P. hydropiper* extract during 1 week.

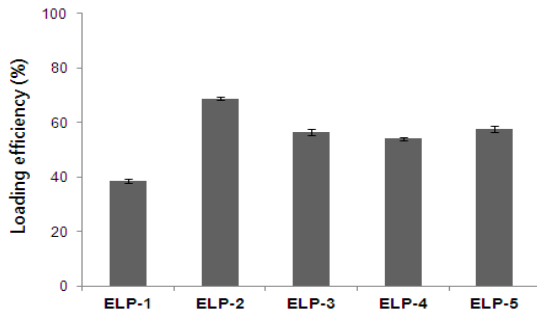
주일 이후 경과된 탄성 리포솜의 입자크기를 측정해본 결과, 입자크기는 제조 직후와 큰 차이가 없었고(Figure 10) 일주일 후에도 막이 깨지거나 또는 층 분리 현상이 관찰되지 않았다. 따라서 제조된 탄성 리포솜들은 일주일간 그 안정성이 유지됨을 확인할 수 있었다.

### 3.4.2. 탄성 리포솜의 가변형성

계면활성제에 의한 리포솜 막의 가변형성은 탄성 리포솜 고유의 독특한 성질이자 다른 리포솜 제형과의 차이점이기도 하다. 이러한 탄성 리포솜은 일반 리포솜과 비

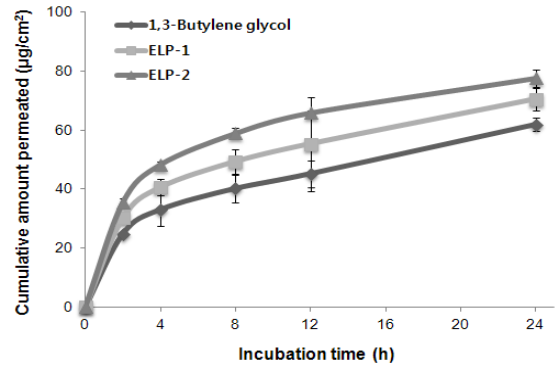
**Table 4.** Deformability Index Value of Elastic Liposomal Formulation

Formulation code	Deformability index
ELP-1	15.0 ± 1.2
ELP-2	16.4 ± 0.8
ELP-3	13.6 ± 0.4
ELP-4	5.3 ± 0.1
ELP-5	5.6 ± 0.2

**Figure 11.** Loading efficiency of elastic liposomal formulations containing *P. hydropiper* extract. Mean ± SD (n = 3).

교했을 때보다 쉽게 각질층을 통과할 수 있다는 장점을 가지고 있다. 따라서 본 연구에서는 계면활성제의 함량을 증가시키면서 탄성 리포솜 제형의 가변형성 지수를 측정하였다(Table 4).

여뀌 추출물을 담지한 ELP-2와 ELP-4를 비교해보면, 계면활성제 함량이 5 %인 ELP-2의 입자 크기는 176.5 nm로 계면활성제 함량이 15 %인 ELP-4 (105.5 nm)보다 입자 크기가 크게 나왔다. 하지만, 가변형성 지수는 계면활성제 양이 적은 ELP-2가 16.4이고 계면활성제 양이 많은 ELP-4가 5.3으로 ELP-2의 가변형 지수가 훨씬 큼을 알 수 있다. 따라서 계면활성제의 양이 일정 농도 증가하면 가변형 지수가 감소함을 알 수 있다. 이는 계면활성제의 농도가 어느 정도 증가면 탄성 리포솜 내에 존재하는 계면활성제 이외에 용액 내에 별도의 보다 많은 마이셀이 형성된 결과 때문인 것으로 생각되고 있다. 따라서 ELP-4의 입자 사이즈는 작게 측정되었고, 또한 가변형성이 감소한 결과를 나타낸 것으로 판단된다. 이러한 결과는 계면활성제의 비율이 일정 이상이 되면 계면활성제가 탄성 리포솜 뿐만 아니라 마이셀을 형성하기 때문에 가변형성이 감소하는 결과를 나타낸다는 이전 보

**Figure 12.** *In vitro* skin permeation profiles of 1,3-butylene glycol solution and ELP-1, ELP-2 containing *P. hydropiper* extract through ICR albino mouse skin. Mean ± SD (n = 3).

고와도 일치하는 결과임을 알 수 있었다[24]. 이러한 결과로 미루어 보아, 여뀌 추출물을 담지한 탄성 리포솜의 가변형성 지수는 계면활성제의 농도에 영향을 받는다는 것을 알 수 있었다.

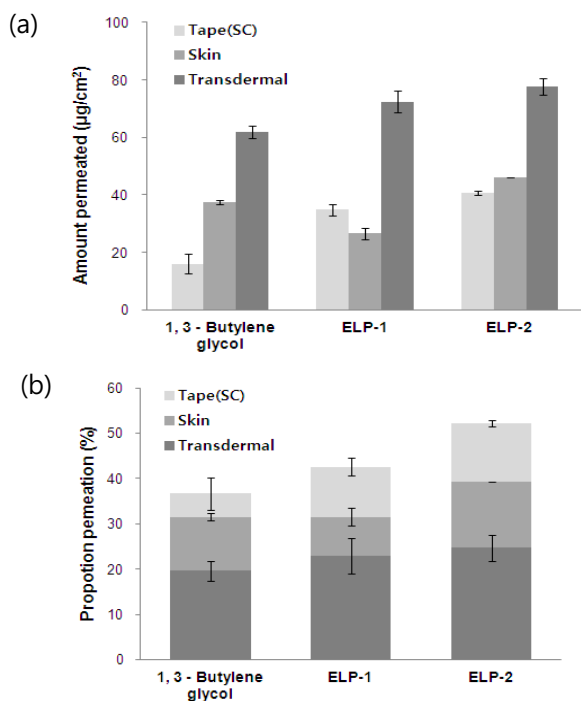
#### 3.4.3. 탄성 리포솜에 있어서 여뀌 추출물의 포집효율

탄성 리포솜에 포집된 여뀌 추출물의 포집효율은 Figure 11에 나타내었다. 탄성 리포솜에 포집된 여뀌 추출물의 양을 측정하기 위해서 UV 분광기를 이용하였다. 계면활성제가 없는 제형인 ELP-1의 경우 38.6 %의 포집효율을 나타내었다. 계면활성제를 5 % 포함하는 ELP-2 제형에서의 포집효율이 68.8 %로 실험한 제형 중에서 가장 큰 포집효율을 나타내었다. 계면활성제의 농도가 10 및 15 %인 ELP-3와 ELP-4의 포집 효율은 각각 56.6, 54.1 %로 ELP-2 제형보다도 낮은 포집효율을 나타내었다. 이는 위에서 설명한 탄성 리포솜의 가변형성에서처럼 혼합 마이셀 형성이 포집효율에도 영향을 미치는 것으로 판단된다.

다시 말해, 특정 농도 이상의 계면활성제가 사용되었을 때 마이셀이 형성되어 제형 내에 마이셀과 리포솜이 혼합되므로 리포솜의 포집효율을 감소시켜서 오히려 피부에 자극을 일으킬 수도 있고 활성 물질의 피부 전달 시스템의 효율을 낮춘다는 이전의 보고와도 일치하는 결과를 나타내었다[24,25].

#### 3.4.4. 탄성 리포솜의 *In Vitro* 피부 투과 실험(Franz Diffusion Cell)

Franz diffusion cell을 이용하여 여뀌 추출물을 담지한 탄성 리포솜의 피부 투과 능력을 평가하였다. 실험에서



**Figure 13.** Proportions of permeated amount of 1,3-butylene glycol solution (*P. hydropiper*.) and ELP-1, ELP-2 containing *P. hydropiper* extract through ICR albino mouse skin after 24 h incubation (Tape: stratum corneum, Skin : epidermis without stratum corneum plus dermis, Transdermal : receptor chamber).

는 높은 가변형성과 최적화된 계면 활성제 5 % (w/w)의 제형인 ELP-2와 계면활성제가 없는 일반 리포솜인 ELP-1, 그리고 보습 효과는 있지만 피부 자극은 거의 없는 1,3-butylene glycol을 대조군 용액으로 사용하였다. 또한 탄성 리포솜의 피부 투과는 수분 기울기(hydration gradient)에 의해 피부에 침투되어 약물을 피부로 전달하므로 샘플 투여부위를 밀폐하지 않은 상태(non-occluded condition)의 조건에서 실시하였다. 피부 일정 면적에 대한 시간별 여뀌 추출물의 투과량은 Figure 12에 나타내었다. 여뀌 추출물을 담지한 탄성 리포솜인 ELP-2는 대조군에 비하여 시간별 여뀌 추출물의 투과량이 유의적으로 크게 나타났다. 여뀌 추출물을 담지한 탄성 리포솜인 ELP-2와 일반 리포솜인 ELP-1 그리고 대조군인 1,3-butylene glycol (*P. hydropiper* extract in stock solution) 용액 모두 8 h까지는 시간 의존적으로 추출물의 투과량이 증가하였다. 또한 24 h 후 여뀌 추출물의 누적 투과량(Transdermal)은 1,3-butylene glycol 용액의 경우 61.8 µg/cm<sup>2</sup>이었고, ELP-1은 72.5 µg/cm<sup>2</sup>,

ELP-2은 77.6 µg/cm<sup>2</sup>으로 초기 적하량 314.4 µg/cm<sup>2</sup>에 대하여 각각 19.7, 23.0 및 24.7 %의 투과율을 나타내었다.

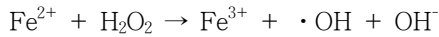
Figure 13에는 24 h 후 각질층에 존재하는 여뀌 추출물(Tape), 각질층을 제외한 표피와 진피에 존재하는 여뀌 추출물(Skin), 그리고 피부를 통과하여 receptor phase에 존재하는 여뀌 추출물(Transdermal)의 함량을 나타내었다.

각질층에 존재하는 여뀌 추출물의 함량(Tape)은 1,3-butylene glycol 용액의 경우는 5.1 %였고, ELP-1이 11.1 %, ELP-2의 경우 12.9 %로 탄성 리포솜 제형인 ELP-2의 경우가 각질층에 약간 더 존재하는 것으로 나타났다. 각질층을 제외한 피부(표피 및 진피)로 침투된 여뀌 추출물의 함량(Skin)은, 1,3-butylene glycol과 ELP-1, ELP-2에서 각각 37.4, 26.6, 46.2 µg/cm<sup>2</sup> (Figure 13a)으로 초기 적하량에 대한 여뀌 추출물의 침투율로 환산할 경우 각각 11.8 및 8.5, 12.9 %로 각질층과 마찬가지로 탄성 리포솜 제형인 ELP-2 (95 : 5)의 경우 표피와 진피에 존재하는 여뀌 추출물의 양이 훨씬 많은 것으로 나타났다. 피부를 통과하여 receptor phase에 존재하는 여뀌 추출물(Transdermal)의 함량 비율은 1,3-butylene glycol과 ELP-1, ELP-2이 각각 19.7 및 23.0, 24.7 %로 ELP-2이 다소 투과량이 크게 나타났음을 보여주고 있다(Figure 13b). 피부에 침투된 여뀌 추출물의 총 함량은 초기 적하량 314.4 µg/cm<sup>2</sup>에 대하여 1,3-butylene glycol과 ELP-1, ELP-2에서 각각 115.3, 133.9 및 164.5 µg/cm<sup>2</sup>으로 측정되었다. 이를 초기 적하량에 대한 여뀌 추출물의 피부 흡수율로 환산하면 각각 36.7, 42.6 및 52.3 %였으며, 이는 탄성 리포솜 제형을 이용할 경우 더 많은 양의 여뀌 추출물을 피부로 전달할 수 있음을 나타내는 결과이다. 피부로 침투한 여뀌 추출물의 총 함량을 측정된 결과 ELP-1과 ELP-2를 비교해 보면 계면활성제에 의해 약 18.6 %정도 더 많은 여뀌 추출물을 피부로 전달하였음을 확인할 수 있다.

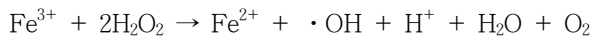
#### 4. 고 찰

피부에서 자외선으로 유도된 손상에 대한 활성산소설의 주 포인트는 다음과 같다. (1) 활성산소는 피부에 대한 자외선의 작용으로 생성된다. (2) 피부에는 활성산소를 파괴하는 항산화 방어계가 있다. 그러나 이들 방어계는 자외선량이 많으면 압도당할 수 있다. (3) 결과적으로 단백질, 지질, DNA와 같은 세포 성분들은 활성산소에 의한 손상을 받게 되어 세포 기능이 변질되고 궁극적으

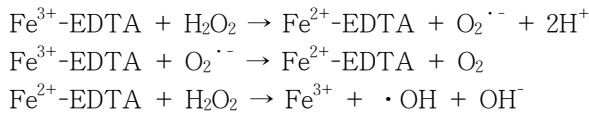
로 광노화나 광발암 등의 피부 질환을 유발시키게 된다 [1]. 피부에서 활성산소의 생성은 광증감제 분자에 의한 태양 자외선의 흡수로 시작된다. 이러한 반응의 주 생성물은  $^1\text{O}_2$ 을 비롯하여  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\cdot\text{OH}$  등을 포함한다. 생명체에서  $\text{O}_2^{\cdot-}$ 과  $\text{H}_2\text{O}_2$ 의 독성 작용은 철 의존성  $\cdot\text{OH}$ 의 생성에 기인된다고 제안되고 있다. 피부 등 생체계에서  $\cdot\text{OH}$ 을 생성시키는 주요 반응은 다음과 같은 Fenton 반응으로 알려져 있다.



그러나  $\text{Fe}^{3+}$  염과 과산화수소의 반응으로도  $\cdot\text{OH}$ 이 생성될 수 있다.



특히  $\text{Fe}^{3+}$ -EDTA를 과산화수소와 함께 반응시키면  $\cdot\text{OH}$ 이 생성되는데 이때 SOD를 첨가할 경우  $\cdot\text{OH}$  생성이 거의 완벽하게 억제되는 것으로부터 다음과 같은 일련의 반응과정들을 통하여  $\cdot\text{OH}$ 이 생성되는 것으로 받아들여지고 있다.



따라서  $\text{Fe}^{3+}$ -EDTA/ $\text{H}_2\text{O}_2$  계에 존재할 수 있는 활성산소종은  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  및  $\cdot\text{OH}$ 이다. Luminol은 이들 활성산소종에 의해 산화되어 들뜬 상태의 아미노프탈산이 된 후 발광하는 것으로 알려져 있다. 이 계에서 측정된 활성산소 소거활성은 다양한 활성산소의 소거작용과 철 이온과의 킬레이팅 작용에 의한 활성산소 생성 억제 작용까지 포함되기 때문에 총항산화능으로 표현될 수 있다 [26-28].

여뀌 추출물의 에틸아세테이트 분획과 그 분획의 주 성분인 isoquercitrin의 활성산소 소거활성(총항산화능)은 (+)- $\alpha$ -tocopherol보다도 큰 활성을 나타내었다. 따라서 (+)- $\alpha$ -tocopherol보다도 더 안정하고 활성이 큰 항산화제로서 화장품에 응용가능성이 높음을 시사한다. 적혈구를 이용한 광용혈 실험은 활성산소종에 의한 광노화 또는 세포손상의 실험 모델로 매우 적합한 점이 많다. 이 연구에서는 광증감제로 rose-bengal을 사용하여  $^1\text{O}_2$  등의 활성산소종을 생성시켰다.  $^1\text{O}_2$ 은 적혈구 세포막의

지질 과산화반응을 일으키고 막단백질의 산화, 구조 단백질의 절단, 지질과산화물로부터 2차 라디칼의 생성, 그리고 헤모글로빈에서 방출된 철과  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ 의 Fenton 반응으로  $\cdot\text{OH}$ 을 생성시킬 수 있다. 결국  $^1\text{O}_2$ 으로 개시된 적혈구막의 지속적인 손상은 적혈구의 용혈로 이어진다.  $^1\text{O}_2$ 으로 유도된 적혈구의 광용혈에 있어서 여뀌 추출물의 에틸아세테이트 분획과 isoquercitrin은 비교물질로 사용한 지용성 항산화제인 (+)- $\alpha$ -tocopherol보다도 매우 큰 세포보호 활성을 나타내었다. 특히 여뀌 추출물의 주 성분인 isoquercitrin은 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서의 세포보호 활성이 농도가 2배 더 큰 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 (+)- $\alpha$ -tocopherol보다도 훨씬 큼을 보여주고 있다(본 실험에서 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도의 (+)- $\alpha$ -tocopherol은 세포보호 활성을 거의 보이지 않았음). 또한 isoquercitrin은 여뀌 추출물의 에틸아세테이트 분획보다도 큰 세포보호 활성을 나타내었다. 이러한 isoquercitrin의 세포보호 활성은  $^1\text{O}_2$ 의 소광, 그리고 이차적으로 암반응에서 생성된  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\cdot\text{OH}$  등의 활성산소 소거작용, 철이온과의 킬레이팅에 의한 활성산소의 생성 억제, 항산화 성분의 세포막으로의 침투 및 지질 과산화반응 차단 등 다양한 요인들이 복합적으로 일어난 결과라고 사료된다.

일반적으로 플라보노이드 배당체는 세포막 침투가 비교적 어려워 세포를 대상으로 하는 산화적 손상 반응에서 큰 효과를 발휘하지 못하는 것으로 알려져 있다. 그럼에도 불구하고 플라보노이드 배당체로 주로 이루어진 isoquercitrin과 여뀌 추출물은 자외선이 조사된 HaCaT 세포에서 무처리 대조군(세포 생존율, 36%)에 비해 매우 높은 세포 생존율(약 90%)을 보여주었다. 결과적으로 여뀌 추출물과 isoquercitrin은 자외선 조사 전에 처리한 경우 자외선에 대항하여 큰 세포보호 활성을 나타낼 수 있었다. 피부의 각질층은 각질세포와 특징적인 라멜라 막으로 구성된 매트릭스로 피부 투과성 장벽과 항산화 장벽 기능을 담당한다. 피부 장벽은 태양 자외선으로 유도된 활성산소 등의 산화적 스트레스에 의해 붕괴되고, 이로써 피부노화가 가속화된다. 따라서 자외선으로 유도된 산화적 손상으로부터 피부 장벽기능을 복원하고 피부노화를 억제하기 위해서는 항산화 방어 시스템 구축이 필요하다. 특히 여뀌 추출물과 그 주 성분인 isoquercitrin은 실험결과들로부터 알 수 있듯이 항산화 방어시스템 구축에 적절한 항산화제로서의 역할을 할 것으로 판단된다. 자외선으로 유도된 산화적 손상으로부터 피부 장벽기능을 복원하고 피부노화를 억제하기 위해서는 항산화 방어시스템 구축에 적합한 항산화제 개발뿐만

아니라 이들을 효율적으로 피부에 침투시킬 수 있는 피부 흡수 전달시스템 개발이 필요하다.

최근에 항산화제나 기타 생리활성 성분들의 피부 흡수능 향상을 위한 연구 중에서 리포솜을 이용한 연구들이 많은 관심을 받고 있다. 리포솜은 생체 친화성이 높고, 다양한 활성 물질을 생체 내로 전달할 수 있다는 장점을 가지고 있어서 의약품이나 화장품 분야에서 널리 사용되어 왔다. 그러나 리포솜의 물리적 불안정성이나 낮은 포집 효율, 그리고 제형 내에서의 낮은 유화 안정성 등의 문제가 제기되고 있다. 따라서 이러한 문제점들을 개선하기 위해서 에토솜 및 탄성 리포솜 등의 새로운 베지클(vesicle)들의 개발과 응용이 시도되고 있다. 저자들은 본 연구에서 다양한 농도의 여뀌 추출물을 첨가한 20% 에탄올 함유 에토솜을 제조하여 이들의 입자 크기, 안정성, 포집효율, 피부 투과능을 실험하였다. 제조된 여뀌 추출물 함유 에토솜의 경우 입자 크기가 대략 173.0 nm로 단분산 형태의 안정한 입도 분포를 나타내었고 포집효율은  $55.58 \pm 7.33\%$  임을 확인하였다. 제조 후 일주일 후에도 입자 분포가 단 분산형태를 유지하였고 침전이나 분리 현상이 관찰되지 않아 안정한 에토솜을 형성함을 확인하였다. 0.04% 여뀌 추출물을 담지한 에토솜을 피부 투과 실험에 사용하였다. 24 h 후 여뀌 추출물의 총 피부 투과량은 에토솜( $117.41 \pm 1.28 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) > 에탄올 용액( $79.34 \pm 1.43 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) > 리포솜( $73.44 \pm 0.40 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) > 증류수( $17.50 \pm 0.49 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) 순으로 에토솜의 경우가 피부 흡수가 가장 잘 이루어짐을 확인하였다. 따라서 0.04% 여뀌 추출물이 포집된 에토솜은 여뀌 추출물의 피부 전달에 있어서 적합한 제형임을 확인하였다.

또 다른 피부 흡수 증진 시스템으로 탄성 리포솜을 제조하여 에토솜에서와 같이 입자크기, 안정성, 포집효율, 가변형성, 피부 투과능을 실험하였다. 탄성 리포솜의 계면활성제로 Tego<sup>®</sup>care 450을 사용하여 얇은 막 수화법으로 제조하였다. 제조된 탄성 리포솜 중(ELP-1 ~ ELP-5)에서 인지질 및 계면활성제 비율이 95 : 5이면서 여뀌 추출물이 0.1% 함유된 탄성 리포솜(ELP-2)이 가장 안정하고 가변형성도 큰 것으로 나타났다. 탄성 리포솜 ELP-2는 입자크기가 176.5 nm로 제조 후 1 주일에도 입자크기가 크게 변하지 않았고, 안정한 입도분포를 나타내었다. 또한 가변형성 지수(16.4)도 가장 큰 것으로 나타났다. 계면활성제를 5% 포함하는 ELP-2 제형의 포집효율은 68.8%로 실험한 제형 중에서 가장 큰 포집효율을 나타내었다. Franz diffusion cell을 이용하여 여뀌 추출물을 담지한 탄성 리포솜의 피부 투과 능력을 평

가하였다. 실험에서는 높은 가변형성과 최적화된 계면활성제 5%(w/w)의 제형인 ELP-2와 계면활성제가 없는 일반 리포솜인 ELP-1, 그리고 1,3-butylene glycol을 대조군 용액으로 사용하였다. 세 가지 비교군에서 여뀌 추출물의 피부 투과 능력은 피부의 각질층(Tape), Skin(각질층 제외한 표피+진피), 그리고 Transdermal(피부를 통과한 receptor phase에 존재)를 합친 누적 투과량은 탄성 리포솜(ELP-2) > 계면활성제가 없는 리포솜(ELP-1) > 1,3-butylene glycol 용액 순으로 나타났다. 이상의 결과들을 통해 Tego<sup>®</sup>care 450을 이용하고 여뀌 추출물을 함유한 탄성 리포솜은 유효성분의 안정화 및 유효성분의 피부 전달에 있어서 적합한 시스템이 될 수 있음을 시사한다. 따라서 저자들이 연구한 에토솜 제형(0.04% 여뀌 추출물 및 20% 에탄올 함유)과 탄성리포솜 제형(ELP-2)은 자외선으로 유도된 산화적 손상으로부터 피부 장벽기능을 복원하고 피부노화를 억제하기 위한 항산화 방어시스템 구축에 적합한 효율적인 피부 흡수 전달시스템이라고 판단된다.

## 5. 결 론

- 1) 여뀌 추출물의 주 성분인 isoquercitrin를 preparative TLC로 분리, 확인하고 실험에 사용하였다.
- 2) Isoquercitrin의 총항산화능(OSC<sub>50</sub>)은 3.13  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 (+)- $\alpha$ -tocopherol보다 활성이 크게 나타났다. 여뀌 추출물의 에틸아세테이트 분획은 L-ascorbic acid 및 (+)- $\alpha$ -tocopherol보다 항산화능이 높은 것으로 나타났다.
- 3) <sup>1</sup>O<sub>2</sub>으로 유도된 적혈구 광용혈 실험에서 isoquercitrin은 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 (+)- $\alpha$ -tocopherol보다 훨씬 큰 세포보호활성을 나타내었다. 또한 isoquercitrin은 여뀌 추출물의 에틸아세테이트 분획보다도 큰 보호 활성을 나타내었다.
- 4) 여뀌 추출물과 isoquercitrin은 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 HaCaT 세포에 대한 세포독성은 나타나지 않았다. 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 여뀌 추출물은 세포 독성이 나타나지 않았으나 isoquercitrin은 약간 나타났다.
- 5) 여뀌 추출물과 isoquercitrin은 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 자외선(400  $\text{mJ}/\text{cm}^2$ )이 조사된 HaCaT 세포의 생존율을 양성 대조군 36%에서 약 90%까지 증가시켰다. 즉 자외선에 대한 세포보호활성이 매우 큼을 나타내었다.
- 6) 피부 전달 시스템으로 안정한 0.04% 여뀌 추출물 함유한 에토솜을 제조하였다. 이 에토솜의 입자 크기는 173.0 nm, 포집효율은 55.58%로 제조 후 일주일에도 안

정한 단분산의 입도 분포를 나타내었다.

7) 0.04 % 여뀌 추출물 함유한 에토솜은 일반 리포솜, 에탄올 용액, 증류수 용액보다도 여뀌 추출물의 높은 피부 투과 능력을 나타내었다. 피부 투과능력은 에토솜 > 에탄올 용액 > 리포솜 > 증류수 용액 순으로 나타났다. 따라서 0.04 % 여뀌 추출물이 포집된 에토솜은 여뀌 추출물을 피부로 전달하는 데 있어서 뛰어난 효과를 나타내므로 여뀌 추출물의 피부 전달에 있어서 적합한 제형임을 알 수 있었다.

8) 0.1 % 여뀌 추출물을 함유한 탄성 리포솜의 입자 크기(176.5 nm)와 가변형성(16.4) 및 포집 효율(68.8 %)을 측정한 결과 인지질(egg PC)과 계면활성제 (Tego<sup>®</sup> care 450) 비율이 95 : 5 (ELP-2)일 때 가장 우수한 제형인 것으로 나타났다.

9) 탄성 리포솜의 피부 투과 실험에 사용한 여뀌 추출물의 양은  $314.4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 이었고 ELP-2는  $164.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  (52.3 %)의 여뀌 추출물이 피부를 투과한 것을 확인하였다. ELP-2는 계면활성제가 없는 제형인 ELP-1 ( $133.9 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , 42.6 %)이나 동량의 여뀌 추출물을 적용한 1,3-butylene glycol 용액( $115.3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , 36.7 %)보다 더 높은 피부 투과 능력을 나타내었다. 이는 탄성 리포솜 제형을 이용할 경우 계면활성제에 의하여 더 많은 양의 여뀌 추출물이 피부로 전달되었음을 확인할 수 있었다. 따라서 인지질과 계면활성제의 비율이 95 : 5인 탄성 리포솜은 여뀌 추출물의 피부 전달 효과를 증진시켜 줄 수 있음이 확인되었다.

## 감사의 글

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

## 참 고 문 헌

1. L. Packer, Ultraviolet radiation (UVA, UVB) and skin antioxidants, In: Free radical damage and its control, eds. C. A. Rice-Evans and R. H. Burdon, Elsevier Science B.V., 239 (1994).
2. K. Scharffetter-Kochanek, Photoaging of the connective tissue of skin: Its prevention and therapy, In: Antioxidants in disease mechanisms and therapy, eds. H. Sies, Advances Pharmacology, (1997).
3. J. J. Thiele, C. O. Barland, R. Ghadially, and P. M. Elias, Permeability and antioxidant Barriers in aged epidermis, Skin Aging (B. A. Gilchrest, J. Krutman, eds), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany, 65 (2006).
4. J. J. Thiele, C. Schroeter, S. N. Hsieh, M. Podda, and L. Packer, The antioxidant network of the stratum corneum, *Curr Probl. Dermatol.*, **29**, 26 (2001).
5. E. J. An, C. K. Kang, J. W. Kim, and B. S. Jin, Lipid-based vesicles as transdermal delivery system, *KIC News*, **13**(4), 24 (2010).
6. M. M. A. Elsayed, O. Y. Abdallah, V. F. Naggar, and N. M. Khalafallah, Lipid vesicles for skin delivery of drugs: Reviewing three decades of research, *Int. J. Pharm.*, **332**, 1 (2007).
7. M. M. A. Elsayed, O. Y. Abdallah, V. F. Naggar, and N. M. Khalafallah, Deformable liposomes and ethosomes: Mechanism of enhanced skin delivery, *Int. J. Pharm.*, **332**, 60 (2007).
8. E. Toutitou, N. Dayan, L. Bergelson, B. Godin, and M. Eliaz, Ethosomes — novel vesicular carriers for enhanced delivery: characterization and skin penetration properties, *J. Control. Release*, **65**, 403 (2000).
9. H. J. Gwak and B. S. Jin, Preparation and Characterization of EGCG Entrapped ethosome, *J. Korean Ind. Eng. Chem.*, **18**(2), 130 (2007).
10. V. Dubey, D. Mishra, T. Dutta, M. Nahar, D. K. Saraf, and N. K. Jain, Dermal and transdermal delivery of an anti-psoriatic agent via ethanolic liposomes, *J. Control. Release*, **123**, 148 (2007).
11. V. Dubey, D. Mishra, and N. K. Jain, Melatonin loaded ethanolic liposomes: physicochemical characterization and enhanced transdermal delivery, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **67**, 398 (2007).
12. P. L. Honeywell-Nguyen, H. W. Wouter Groenink, A. M. de Graaff, and J. A. Bouwstra, The *in vivo* transport of elastic vesicles into human skin: effects of occlusion, volume and duration of application, *J. Controlled Release*, **90**, 243 (2003).
13. G. Ceve, A. Schatzlein, and H. Richardsen, Ultradeformable lipid vesicles can penetrate the skin and other semipermeable barriers unfrag-



- mented. Evidence from double label CLSM experiments and direct size measurements, *Biochim. Biophys. Acta*, **1546**, 21 (2002).
14. M. Trotta, E. Peira, F. Debernardi, and M. Gallarate. Elastic liposomes for skin delivery of dipotassium glycyrrhizinate. *Int. J. Pharm.*, **241**, 319 (2002).
  15. G. M. M. El Maghraby, A. C. Williams, and B. W. Barry, Oestradiol skin delivery from deformable liposomes: refinement of surfactant concentration. *Int. J. Pharm.*, **196**, 63 (2000).
  16. E. H. Kim, J. E. Kim, and S. N. Park, Antioxidative and antiaging effects of *Persicaria hydropiper* L. extracts, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **35**(4), 293 (2009).
  17. J. E. Kim, E. H. Kim, and S. N. Park., Component analysis of *Persicaria hydropiper* L. extracts., *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **36**(1), 89 (2010).
  18. E. H. Kim, J. E. Kim, and S. N. Park, Antibacterial activity of *Persicaria hydropiper* extracts and its application for cosmetic material, *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.*, **38**(1), 170 (2010).
  19. Y. P. Fang, Y. H. Tsai, P. C. Wu, and Y. B. Huang, Comparison of 5-aminolevulinic acid-encapsulated liposome versus ethosome for skin delivery for photodynamic therapy, *Int. J. Pharm.*, **356**, 144 (2008).
  20. D. Paolino, G. Lucania, D. Mardente, F. Alhaique, and M. Fresta, Ethosomes for skin delivery of ammonium glycyrrhizinate: *in vitro* percutaneous permeation through human skin and *in vivo* anti-inflammatory activity on human volunteers, *J. Control. Release*, **106**, 99 (2005).
  21. Y. P. Fang, Y. B. Huang, P. C. Wu, and Y. H. Tsai, Topical delivery of 5-aminolevulinic acid-encapsulated ethosomes in a hyperproliferative skin animal model using the CLSM technique to evaluate the penetration behavior, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **73**, 391 (2009).
  22. G. Cevc, A. Schatzlein, and G. Blume, Transdermal drug carriers: basic properties, optimization and transfer efficiency in the case of epicutaneously applied peptides, *J. Control. Release*, **36**, 3 (1995).
  23. G. Cevc, D. Gebauer, J. Stieber, A. Schatzlein, and G. Blume, Ultraflexible vesicles, transfersomes, have an extremely low pore penetration resistance and transport therapeutic amounts of insulin across the intact mammalian skin, *Biochim. Biophys. Act.*, **1368**, 201 (1998).
  24. S. Jain, N. Jain, D. Bhadra, A. K. Tiwary, and N. K. Jain, Transdermal delivery of an analgesic agent using elastic liposomes: preparation, characterization and performance evaluation, *Curr Drug Deliv.*, **2**, 223 (2005).
  25. C. Hofer, R. Hartung, R. Gobel, P. Deering, A. Lehmer, and J. Breul, New ultradeformable drug carriers for potential transdermal application of interleukin-2 and nterferon-alpha: theoretic and practical aspects, *World J. Surg.*, **24**, 1187 (2000).
  26. S. N. Park, Skin aging and antioxidant, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **23**(1), 75 (1997).
  27. S. N. Park, Antioxidative properties of baicalein, component from *Scutellaria baicalensis* Georgi and its application to cosmetics (I), *J. Korean Ind. Eng. Chem.*, **14**(5), 657 (2003).
  28. S. N. Park, S. Y. Kim, G. N. Lim, N. R. Jo, and M. H. Lee, *In vitro* skin permeation and cellular protective effects of flavonoids isolated from *Suaeda asparagoides* extracts, *J. Ind. Eng. Chem.*, **18**(2), 680 (2012).