

마디풀 추출물의 경피 전달을 위한 탄성 리포솜의 물리적 특성 및 *In Vitro* 피부 투과 연구

한새별 · 권순식 · 정유민 · 공봉주 · 유은령 · 박수남[†]

서울과학기술대학교 정밀화학과 나노바이오 화장품연구실, 화장품종합기술연구소
(2014년 2월 3일 접수, 2014년 5월 2일 수정, 2014년 7월 3일 채택)

Physical Characterizations and *In Vitro* Skin Permeation of Elastic Liposomes for Transdermal Delivery of *Polygonum aviculare* L. Extract

Saet Byeol Han, Soon Sik Kwon, Yoo Min Jeong, Bong Ju Kong, Eun Ryeong Yu, and Soo Nam Park[†]

Department of Fine Chemistry, Nanobiocosmetic Laboratory, and Cosmetic R&D Center,
Seoul National University of Science and Technology, 232 Gongneung-ro, Nowon-gu, Seoul 139-743, Korea
(Received February 3, 2014; Revised May 2, 2014; Accepted July 3, 2014)

초록: 본 연구에서는 다양한 플라보노이드를 주성분으로 하는 마디풀 추출물의 피부 흡수를 증진시키기 위하여 인지질(PC)과 계면활성제(Tego[®] care 450)로 구성된 탄성 리포솜(ELPs)을 제조하였으며, 그것의 물리적 특성 및 *in vitro* 피부 투과능을 평가하였다. 마디풀 추출물을 담지한 탄성 리포솜의 평균 입자 크기는 148.1~262.2 nm, 가변형성 지수는 11.5~25.4, 포집 효율은 53.1~66.3%로 나타났다. Franz diffusion cell을 이용한 *in vitro* 피부 투과 실험 결과, 인지질 대 계면활성제 비율이 85:15인 ELP-4가 계면활성제가 포함되지 않은 일반 리포솜인 ELP-1보다 더 높은 피부 투과능을 갖는 것을 확인하였으며, 이를 형광 이미지 복원 현미경을 통해 가시적으로 확인하였다. 결론적으로 최적 조건으로 선정된 ELP-4는 마디풀 추출물의 피부 흡수 증진을 위한 유용한 피부 전달체로 이용될 수 있음을 확인하였다.

Abstract: In this study, *Polygonum aviculare* L. (*P. aviculare* L.) extract loaded elastic liposomes (ELPs) were investigated to enhance the transdermal delivery of *P. aviculare* L. extract composed of various flavonoids. ELPs were composed of egg phospholipids (PC) and edge activator (Tego[®] care 450) and the physical properties and *in vitro* permeation studies of ELPs were performed. Particle size ranged from 148.1 to 262.2 nm and deformability index was recorded as 11.5~25.4. Loading efficiency was from 53.1 to 66.3%. *In vitro* skin permeation studies using Franz diffusion cell demonstrated that ELP-4 having ratio of 85:15 for PC to Tego[®] care 450 exhibited the higher skin permeability than ELP-1, the general liposome without Tego[®] care 450. It was visually seen by fluorescence image restoration microscopy. The findings suggest that ELP-4 selected as the optimal formulation could be used as useful formulation for transdermal delivery of the extract.

Keywords: elastic liposome, *Polygonum aviculare* L. extract, Tego[®] care 450, Franz diffusion cell, skin permeation.

서 론

신체는 외부 유해 환경에 항상 노출되어 있으며 피부는 이러한 유해 물질로부터 신체를 보호하는 역할을 한다. 피부는 내인적 및 환경적 요인에 의해 노화가 진행되며, 그 중에서도 일상적으로 노출되는 자외선은 체내에 superoxide anion radical(O₂⁻), hydrogen peroxide(H₂O₂), singlet oxygen(¹O₂), hydroxyl radical(·OH)과 같은 활성산소종(reactive oxygen

species, ROS)을 생성시킨다.^{1,2} ROS란 큰 산화력을 가진 유해한 산소종으로 높은 반응성으로 인하여 세포막을 구성하고 있는 지질, 단백질 및 DNA를 산화시키며 matrix metalloproteinases(MMPs)의 발현을 촉진하여 피부의 주요 구성성분인 콜라겐과 엘라스틴 섬유를 분해하는 등 피부 노화를 가속화시킨다.¹⁻³

피부에는 이러한 ROS로부터 자신을 보호하기 위한 여러 항산화 물질이 존재한다. Superoxide dismutase(SOD), catalase(CAT), glutathione peroxidase(GSPHx)와 같은 효소적 항산화제와 비타민 C(L-ascorbic acid), 비타민 E(α-tocopherol), 플라보노이드와 같은 비효소적 항산화제가 상호보완적으로 피

[†]To whom correspondence should be addressed.
E-mail: snpark@seoultech.ac.kr

부 항산화 방어 네트워크를 형성하고 있다. 그러나 지속적인 자외선 노출에 의해 생성된 과량의 ROS는 이러한 항산화 방어막을 붕괴시키기 때문에 외부에서 추가적으로 항산화제가 보충되어야 한다.¹

피부는 크게 표피층, 진피층, 피하지방층으로 구성되어 있으며, 그 중에서도 표피층의 최외각인 각질층은 *corneocyte*와 지질 매트릭스로 이루어져 견고한 방어막을 형성하고 있다. 이들은 유해 환경으로부터 신체를 보호하는 역할을 하지만 유효 성분의 피부 전달에 대하여 투과 장벽으로 작용한다. 따라서 항산화제와 같은 유효 성분을 효과적으로 피부에 전달하기 위하여 피부 전달 시스템 개발이 요구된다.⁴⁶

이러한 피부 전달 시스템 중 리포솜은 세포막 또는 세포간 지질과 유사한 지질 이중층으로 구성되어 있는 소포체로 생체 친화성 및 생분해성이 높고, 내부에 친수성 및 소수성 물질을 모두 담지할 수 있어 의약품 및 화장품 분야에 다양하게 이용되어 왔다.^{5,7} 하지만, 리포솜은 물리화학적 불안정성, 낮은 포집 효율 등의 단점이 보고되었으며, 그 밖에도 유효 성분을 피부 내로 전달하는데 있어 유효 성분이 피부 내로 깊숙이 투과하지 못하는 것으로 보고되었다.⁸ 이러한 단점을 보완하고자 기존 리포솜 막을 변형시켜 피부 투과 효율을 개선시키기 위한 연구가 오랫동안 진행되어 왔다.^{9,10} 그 중에서도 탄성 리포솜은 1990년대 초 G. Cevc가 새롭게 제안한 피부 전달체 시스템으로 인지질과 *edge activator*로 불리는 단일 사슬 계면활성제로 구성되어 있다. *Edge activator*는 높은 곡률 반경을 갖게 하며, 지질 이중층 막을 불안정하게 하여 리포솜 막의 가변형성을 증가시킨다. 이러한 특징으로 인하여 탄성 리포솜은 자신의 크기보다 더 작은 각질층의 구멍을 통과할 수 있으며 따라서 기존 리포솜에 비해 유효 성분을 효과적으로 피부 전달에 전달할 수 있는 것으로 알려져 있다.^{8,9}

본 연구에서 탄성 리포솜 내 유효 성분으로 사용한 마디풀 (*Polygonum aviculare* L.)은 마디풀과에 속하는 일년생 초본 식물로 길가나 풀밭에서 쉽게 자라며, 편축(篇蓄), 분절초(粉節草)라는 생약명을 갖고 있다. 마디풀과 관련하여 *liquiritin*, *avicularin*, *cinaroside* 등의 성분이 확인되었으며,¹¹ 면역증강,¹² 간 보호 효과에¹³ 대해서 보고되었다. 또한 본 연구팀에서는 이전 연구를 통해 마디풀 추출물의 주성분이 *myricitrin*과 그 배당체인 *myricetin*, *quercetin*, *kaempferol* 등의 플라보노이드 류임을 확인하였으며, 이들이 우수한 항산화 활성 및 세포 보호 효과를 갖는 것을 확인하였다.¹⁴ 그러나 이러한 플라보노이드는 우수한 항산화 작용 및 항염, 미백 활성에도 불구하고 물에 거의 녹지 않는 소수성 성질로 인하여 다양한 산업 분야에 응용하는데 한계가 있어 왔다.^{15,16}

따라서 본 연구에서는 다양한 플라보노이드를 주성분으로 하는 마디풀 추출물의 피부 투과 효율을 높이기 위하여 이를 인지질과 비이온 계면활성제인 Tego® care 450을 이용하여 제조한 탄성 리포솜에 포집하였으며, 인지질과 비이온 계면

활성제의 비율을 달리하여 이들 제형의 입자 크기, 가변형성, 포집 효율 및 안정성 등의 물리적 특성을 비교하였다. 또한 Franz diffusion cell을 이용하여 피부 투과능을 평가하였으며, 형광 이미지 복원 현미경을 이용하여 제형의 증진된 피부 투과능을 가시적으로 확인하였다. 이러한 연구를 통해 피부 항산화 방어막 구축에 적합한 마디풀 추출물의 효율적인 피부 전달체로서 탄성 리포솜의 이용가능성을 알아보고자 하였다.

실 험

기기 및 시약. 실험에 사용된 인지질은 egg yolk 유래의 L- α -phosphatidylcholine(egg PC, ~60%)을 Sigma(USA)사에서 구입하였고, 비이온 계면활성제인 Tego® care 450(polyglyceryl-3 methylglucose distearate)은 (주)사임당 화장품으로부터 얻었다. 메탄올과 에탄올, 클로로포름, 헥산, 에틸아세테이트 등의 용매는 시판 특급시약을 사용하였다. 리포솜 제형 제조에는 회전 증발기(BUCHI, Switzerland)와 초음파 파쇄기(BRANSON, USA)를 사용하였고, 제형의 입자 크기는 ELS-Z(OTSUKA, Japan)를 사용하여 측정하였다. 리포솜의 가변형성 측정은 mini extruder(avanti polar lipids)와 syringe pump(KDS330 Revodix, Korea)를 사용하여 수행하였다. 피부 투과 실험에는 PermeGear(USA)사의 9 mm Franz diffusion cell(receptor volume 5 mL)과 V6A Stirrer 모델을 사용하였으며, 마디풀 추출물을 정량 분석하기 위해 사용된 UV-visible spectrophotometer는 Varian(Australia)사의 Cary 100 제품을 사용하였다. 또한 형광 이미지 복원 현미경은 Applied Precision(USA)사의 Delta Vision RT 제품을 사용하였다.

마디풀 추출물 제조. 건조된 마디풀 100 g을 잘게 자른 후, 50% 에탄올 2 L를 이용하여 24시간 동안 침적시킨 후 여과 하였다. 이 추출물을 감압·농축한 후 헥산을 이용하여 비극

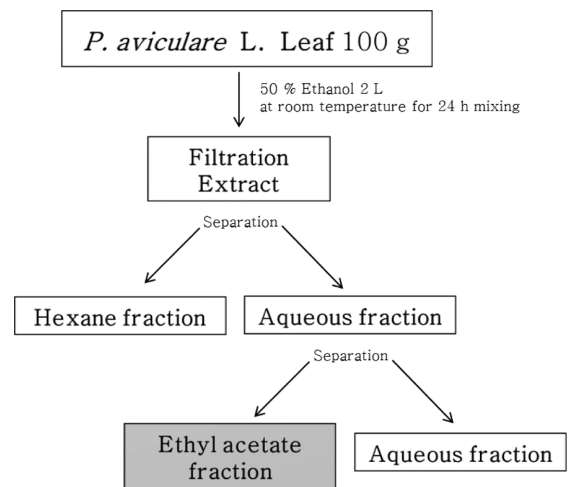


Figure 1. Preparation of *P. aviculare* L. extract (ethyl acetate fraction).

Table 1. Compositions of Elastic Liposomes

Formulation code	PC ^a :S ^b (w/w %)	<i>P. aviculare</i> L. extract (mg)
ELP ^c -1	100 : 0	10.0
ELP ^c -2	95 : 5	10.0
ELP ^c -3	90 : 10	10.0
ELP ^c -4	85 : 15	10.0
ELP ^c -5	80 : 20	10.0

^aPC: Egg phosphatidylcholine. ^bS: Tego[®] care 450. ^cELP: *P. aviculare* L. extract loaded elastic liposome.

성 성분을 제거하고 이후 에틸아세테이트 분획을 감압·농축하여 마디풀 추출물 파우더를 얻었다(Figure 1).

탄성 리포솜 제조. 탄성 리포솜은 얇은 막 수화법으로 제조하였으며,¹⁷ 구성 성분과 조성은 Table 1에 나타내었다. 간단히 말해, 50 mL 등근 바닥 플라스크에 마디풀 추출물 0.1%를 넣은 후, 인지질과 계면활성제를 각기 다른 비율(100:0, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20)로 하여 메탄올과 클로로포름 1:2(v/v) 혼합 용액에 용해시킨다. 유기용매는 회전 증발기를 이용하여 제거하며 이 때 플라스크 벽면에 얇은 지질 막이 형성된다. 형성된 지질 막을 phosphate buffer(1.6 mM NaH₂PO₄·2H₂O과 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 20분 동안 초음파 파쇄기를 가해주었다. 탄성 리포솜 제형의 지질과 계면활성제의 총 함량은 0.5%(w/v)이고, 마디풀 추출물의 함량은 0.1%(w/v)로 하였다.

입자 크기 측정. 탄성 리포솜의 입자 크기와 입도 분포는 빛의 산란을 이용하여 입자 크기를 분석하는 Otsuka ELS-Z series를 이용하여 측정하였다. He-Ne laser를 이용하여 측정하였으며 입자 크기는 누적분석법을 이용하였다. 또한 입경분포 해석방법은 Contin을 이용하여 입경분포를 구하였다.

가변형성 측정. 탄성 리포솜 막의 가변형성을 평가하기 위해 mini extruder를 사용하여 탄성 리포솜이 인공 투과장벽을 통과하는 정도를 측정하였다. 즉, 탄성 리포솜에 0.2 MPa의 압력을 1분 동안 가했을 때 0.08 μm 크기의 기공을 갖는 폴리카보네이트 막을 통과하여 나온 리포솜 현탁액의 양을 측정하였고 이 막을 통과한 리포솜의 입자 크기를 측정하였다. 탄성 리포솜 막의 가변형성은 식 (1)에 비례한다.

$$\text{Deformability index} = J_{\text{flux}} \times (r_v/r_p)^2 \quad (1)$$

여기서, J_{flux} 는 1분 동안 막을 통과한 리포솜 현탁액의 양을 나타내고, r_v 는 extrusion 후 리포솜의 입자 크기, r_p 는 막의 기공 크기를 말한다.

포집 효율 측정. 탄성 리포솜의 포집 효율을 측정하기 위

해 완성된 리포솜 현탁액의 일정량을 취하고 1.2 μm syringe filter(Minisart CA 26 mm)를 이용하여 탄성 리포솜 내 포집되지 않은 마디풀 추출물을 제거한다. 그 후 에탄올을 이용하여 탄성 리포솜의 막을 파괴시킨 후 에탄올은 회전 증발기를 이용하여 증발시키고 다시 1 mL의 에탄올을 넣어준다. UV-vis spectrometer를 이용해 탄성 리포솜에 포집된 마디풀 추출물을 정량 분석하였다.

또한 농도별 마디풀 추출물의 검량선을 작성하여 리포솜 내에 포집된 마디풀 추출물의 농도를 산출하였고, 탄성 리포솜의 포집 효율은 식 (2)에 의해 계산하였다.

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

T : 처음 넣어준 마디풀 추출물 농도, P : 1.2 μm syringe filter를 통과하지 못한 마디풀 추출물 농도.

In Vitro 피부 투과 실험(Franz Diffusion Cell). 제조된 탄성 리포솜의 피부 투과 효율 측정하기 위해 Franz diffusion cell을 이용하여 피부 투과 실험을 진행하였다. 피부 투과 실험에 사용된 쥐의 피부는 경추탈골로 치사시킨 ICR albino mouse(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 피부의 각질층이 위로 향하도록 하여 donor와 receptor phase 사이에 고정시켰다. 실험이 진행되는 동안 항온수조를 이용하여 chamber의 온도를 37±1 °C로 유지하였다. Donor를 통하여 각 샘플 0.2 mL를 피부 표면에 적하한 후 sampling port를 통하여 일정 시간 간격으로 매 회 0.5 mL의 receptor phase를 취하였다. 채취 직후 동량의 receptor phase를 chamber에 보충하였다. 채취한 시료 속 마디풀 추출물의 양은 UV-visible spectrometer를 이용하여 측정하였다.

24시간 후 chamber에 고정시켜 놓은 피부를 빼낸 후 PBS(phosphate buffered saline)로 3회 세척하였다. 세척 후 receptor phase와 닿지 않은 부분의 피부를 잘라내고 남은 부분에 대해 각질층에 남아있는 마디풀 추출물의 양을 측정하기 위해 tape stripping을 실시하였다. 간단히 말해 테이프를 이용하여 피부의 각질층 부분을 3회 벗겨내었으며 이렇게 얻어진 테이프에 10 mL의 에탄올을 넣고 1시간 동안 초음파 세척기를 이용하여 마디풀 추출물을 추출하였다. 그 후 회전 증발기를 이용하여 에탄올을 증발시키고 이를 다시 0.5 mL의 receptor phase에 용해시켰다. Tape stripping을 거친 후 각질층이 제거된 피부는 수술용 가위를 이용하여 세절하였고 세절한 피부 내에 있는 마디풀 추출물은 tape stripping 법과 동일하게 에탄올로 추출한 후 receptor phase로 용해시켰다. 이렇게 얻어진 시료 속 마디풀 추출물의 양은 UV-visible spectrometer를 이용하여 측정하였다.

In Vitro 피부 투과 실험(Fluorescence Image Restoration Microscopy). 탄성 리포솜의 증진된 피부 투과 효율을 가지적으로 확인하기 위하여 형광 이미지 복원 현미경(fluorescence image restoration microscopy)을 이용하였다. 탄성 리포솜 제조는 위에서 서술한 것과 같이 얇은 막 수화법으로 제조하였으며 각각 0.015%의 rhodamine B와 FITC(fluorescein isothiocyanate)를 동시에 포집시켰다. 탄성 리포솜 내부에 포집되지 않은 rhodamine B와 FITC는 1.2 μm syringe filter를 이용하여 제거하였다.

투과 실험을 위해 hairless rat(8주령, 암컷)의 등 피부를 적출하여 피하지방과 조직을 제거하였다. 이후 Franz diffusion cell 준비는 위에 서술한 것과 같이 동일하게 진행하였다. Donor를 통하여 피부에 각 샘플 0.5 mL를 적하하였고 1, 24 시간 후에 피부를 꺼내서 PBS로 3회 세척하였다. 세척 후 receptor phase와 닿지 않은 부분의 피부를 잘라내고 cryo mold에 OCT embedding matrix(Cell Path Ltd., UK)를 처리하여 조직을 -70 $^{\circ}\text{C}$ 에서 동결하였다.

동결 조직은 cryotome(HM505E, Germany)을 이용하여 -20 $^{\circ}\text{C}$ 에서 10 μm 의 두께로 cross-section하여 절편 슬라이드를 제작하였다. 피부 세포의 핵을 염색하기 위하여 slide glass에 고정시킨 조직 절편에 DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole) 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 처리한 후 20분 동안 상온에서 배양하였으며 PBS로 3회 세척하였다. Photobleaching 현상을 감소시키고 피부 조직과 cover glass와의 부착성을 높이기 위해 polyvinyl alcohol mounting medium with DABCO[®](Sigma)을 처리하였다.

형광 시약의 피부 투과 정도를 확인하기 위하여 Delta Vision RT(Applied Precision, USA)를 이용하였으며 피부 조직은 Olympus IX70 Inverted Microscope로 관찰하였다. Rhodamine B와 FITC에 대한 여기 파장은 각각 490/20, 430/10 nm였으며, 방출 파장은 각각 528/38, 470/30 nm였다. DAPI에 대한 여기 파장과 방출 파장은 각각 360/40, 457/50 nm였다.

통계처리. 평균값의 유의적 차이는 student's unpaired *t*-test를 통해 평가되었다. 0.05 이하의 *p* 값이 유의적이라고 간주되었다.

결과 및 토론

입자 크기. 마디풀 추출물이 포집된 탄성 리포솜은 인지질과 계면활성제의 비율을 달리하여 얇은 막 수화법으로 제조하였다. 제조된 리포솜 현탁액은 mini extruder를 이용하여 압출시켰으며 압출 전과 후의 평균 입자 크기를 Table 2에 나타내었다. 제조된 탄성 리포솜은 계면활성제의 함량이 0~15% (w/w)로 증가할수록 평균 입자 크기가 213.9~262.2 nm로 증가하였다. 이는 탄성 리포솜은 일반 리포솜과 달리 지질막 사

Table 2. Sizes of Elastic Liposomes before and after Extrusion through Polycarbonate Membrane with a Pore Size of 80 nm

Formulation code	Size before extrusion (nm)	Size after extrusion (nm)
ELP-1	213.9±6.5	172.1±1.9
ELP-2	213.6±1.5	194.6±3.6
ELP-3	241.1±6.1	202.2±7.4
ELP-4	262.2±2.4	222.9±5.8
ELP-5	148.1±0.4	148.2±1.0

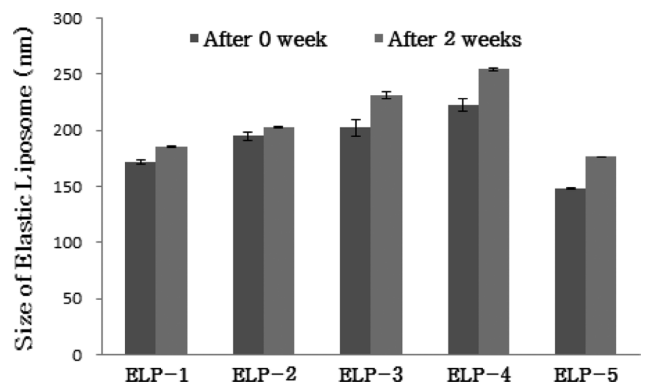


Figure 2. Changes in size of elastic liposomes containing *P. avicularis* L. extract during 2 weeks.

이에 계면활성제가 위치하게 되는데, 계면활성제의 함량이 증가할수록 지질막 사이에 위치하는 계면활성제의 양이 점차 증가하여 나타나는 것으로 생각된다.¹⁸ 하지만, 계면활성제의 함량이 20% 이상으로 증가하자 입자 크기는 148.1 nm로 감소하는 경향을 나타내었다. 이는 일정 농도 이상으로 계면활성제가 증가하게 되면 리포솜 뿐만 아니라 혼합된 마이셀이 형성되어 평균 입자 크기가 감소하는 것으로 여겨진다.^{18,19}

탄성 리포솜은 계면활성제 첨가로 인하여 일반 리포솜보다 막의 안정성이 다소 떨어져 시간 경과에 따라 응집과 침전 현상이 발생할 수 있다.²⁰ 따라서 탄성 리포솜의 저장 기간에 따른 입자 크기 변화는 리포솜 막의 물리적 안정성을 평가하는데 중요한 지표로 작용한다. 본 연구에서는 저장 기간에 따른 탄성 리포솜의 입자 크기 변화를 관찰하기 위하여 리포솜을 제조한 직후와 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 2주일 동안 보관한 후에 입자 크기를 측정하였다. 그 결과 모든 리포솜 제형은 제조 후 2주일 경과 후에 입자 크기가 다소 증가(8.0~31.6 nm)하였지만 응집, 침전되거나 층 분리 현상이 관찰되지 않았다. 따라서 제조된 탄성 리포솜은 2주일간 그 안정성이 유지됨을 확인할 수 있었다(Figure2).

가변형성. 리포솜에 계면활성제를 첨가하게 되면 지질막이 불안정하게 되어 막의 유동성이 증가하게 된다.⁵ 이러한 리포솜 막의 유연성은 가변형성 지수를 통해 확인할 수 있는데

Table 3. Deformability Index of Elastic Liposomes

Formulation code	Deformability index
ELP-1	15.2±0.3
ELP-2	19.7±0.7
ELP-3	21.2±1.5
ELP-4	25.4±1.3
ELP-5	11.5±0.1

이는 탄성 리포솜이 일반 리포솜보다 우수한 피부 투과능을 갖게 하는 주요한 요인이라 할 수 있다. 따라서 본 연구에서는 계면활성제의 함량에 따른 가변형성 지수를 비교하였다 (Table 3).

계면활성제가 첨가되지 않은 ELP-1의 경우, 가변형성 지수가 15.2였으며 계면활성제의 함량이 5~15%로 증가하자 가변형성 지수도 19.7~25.4로 점차 증가하였다. 이는 리포솜 지질막 사이에 계면활성제가 첨가되어 막의 유동성을 증가시킨 결과로 볼 수 있다. 그러나 계면활성제의 함량이 20% 이상 증가하자 가변형성 지수는 11.5로 다시 감소하였다. 이러한 현상은 계면활성제의 함량이 일정 농도 이상으로 증가하게 되면 탄성 리포솜 뿐만 아니라 마이셀이 형성되어 가변형성 지수가 감소하는 것으로 사료되며, 이는 계면활성제의 함량이 20% 이상일 때 입자 크기가 감소하는 것과 상응하는 결과라 할 수 있다.

포집 효율. 계면활성제 함량에 따른 탄성 리포솜의 포집 효율을 Figure 3에 나타내었다. 탄성 리포솜에 포집된 마디풀 추출물의 포집 효율을 측정하기 위하여 UV-visible spectrometer를 이용하였다. 그 결과 마디풀 추출물을 포집한 탄성 리포솜의 포집 효율은 계면활성제의 함량에 따라 증가하는 경향을 나타내었다. 계면활성제가 첨가되지 않은 ELP-1의 포집 효율은 53.1%로 제조된 모든 비율 중 가장 낮은 포집 효율

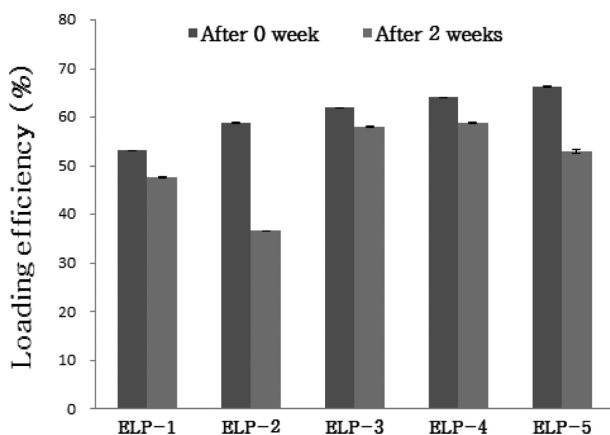


Figure 3. Changes in loading efficiency of elastic liposomes containing *P. aviculare* L. extract during 2 weeks.

을 나타내었다. 계면활성제가 첨가된 ELP-2와 ELP-3, ELP-4의 포집 효율은 각각 58.8, 61.9, 64.0%로 확인되었으며, 계면활성제의 함량이 가장 많은 ELP-5는 66.3%로 가장 높은 포집 효율을 나타내었다.

저장 기간에 따른 포집 효율 변화는 입자 크기 변화와 함께 탄성 리포솜의 물리적 안정성을 측정하는 중요한 지표라 할 수 있다. 따라서 본 연구에서는 2주간의 저장 기간에 따른 탄성 리포솜의 포집 효율 변화를 측정하였다. 그 결과 모든 리포솜 제형은 제조 후 2주가 경과하자 포집 효율이 감소 (5.3~22.2%)하는 경향을 나타내었지만 ELP-1과 ELP-2를 제외한 나머지 제형은 50% 이상의 높은 포집 효율을 나타내었으며 특히 ELP-3과 ELP-4의 포집 효율 감소 정도는 각각 3.9, 5.3%로 매우 작음을 알 수 있다. 따라서 본 연구에서 제조된 탄성 리포솜은 비율간 다소 차이가 있지만 2주일간 그 안정성이 유지됨을 확인할 수 있었다.

In Vitro 피부 투과 실험(Franz Diffusion Cell). Franz diffusion cell을 이용하여 마디풀 추출물을 담지한 탄성 리포솜의 피부 투과 능력을 평가하였다. 피부 투과 실험에는 동량의 마디풀 추출물을 용해시킨 1,3-butylene glycol 용액(1,3-BG)과 계면활성제가 포함되지 않은 일반 리포솜인 ELP-1을 대조군으로 사용하였다. 또한 가변형성 지수가 가장 높은 ELP-4와 가장 작은 평균 입자 크기를 나타낸 ELP-5를 이용하여 피부 투과에 최적화된 비율의 제형을 찾고자 하였다.

일정 피부 면적(0.6362 cm²)에 대한 시간별 마디풀 추출물의 투과량을 Figure 4에 나타내었다. 마디풀 추출물을 담지한 리포솜 제형은 대조군인 1,3-BG보다 월등히 높은 피부 투과율을 나타내었으며 그 중에서도 ELP-4는 다른 리포솜 제형에 비하여 시간별 마디풀 추출물의 투과량이 유의적으로 크게 나타났다. 1,3-BG와 ELP-1의 24시간 후의 누적 투과량(Transdermal)은 각각 11.0, 99.4 μg/cm²로 나타났으며 초기 적하량 314.4 μg/cm²에 대하여 각각 3.5, 31.6%의 피부 투과

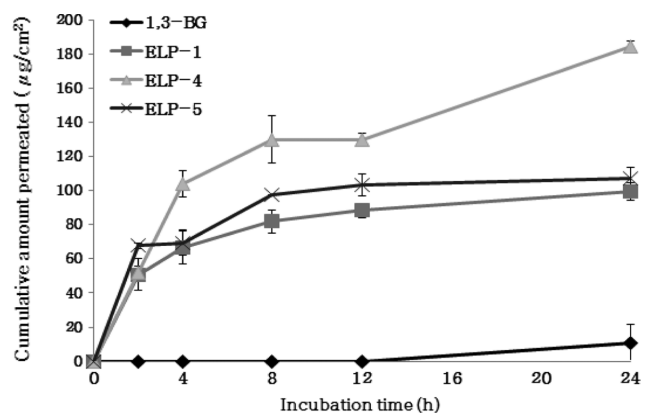


Figure 4. In vitro skin permeation profiles of 1,3-BG, ELP-1, ELP-4 and ELP-5 containing *P. aviculare* L. extract through ICR albino mouse skin.

을 나타내었다. 가변형성 지수가 가장 높았던 ELP-4는 시간 의존적으로 투과량이 증가하였으며 12시간 후에 투과량이 급격히 증가하였다. ELP-4의 24시간 후의 누적 투과량은 184.3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 로 이를 초기 적하량에 대하여 환산하면 58.6%의 투과율을 나타내었다. 또한 평균 입자 크기가 가장 작았던 ELP-5의 24시간 후의 누적 투과량은 107.2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 로 초기 적하량 대비 34.1%의 투과율을 나타내었다. ELP-4와 ELP-5는 각각 높은 가변형성과 작은 입자 크기로 피부 투과에 유리할 것으로 예상되었으나 최종 누적 투과량은 ELP-4가 ELP-5보다 약 1.7배 더 높게 나타났으며 ELP-5의 최종 누적 투과량은 일반 리포솜인 ELP-1과 유사한 수준이었다. 이러한 결과들을 통해 마디풀 추출물을 담지한 탄성 리포솜의 피부 투과능에는 제형의 입자 크기보다 가변형성이 더 큰 영향을 미치는 것을 알 수 있었다.

Figure 5는 24시간 후, 각질층에 존재하는 마디풀 추출물의 함량(Tape), 각질층을 제외한 표피와 진피에 존재하는 마디풀 추출물의 함량(Skin) 그리고 피부를 통과하여 receptor phase에 존재하는 마디풀 추출물의 함량(Transdermal)을 나타낸 것이다. 각질층에 존재하는 마디풀 추출물의 함량(Tape)은 1,3-BG와 ELP-1, ELP-4, ELP-5의 경우 각각 17.5, 38.7, 22.9, 18.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 로 나타났으며(Figure 5(a)), 이를 초기 적하량에 대하여 환산하면 각각 5.6, 12.3, 7.3, 5.7%로 다소 적은 양의 마디풀 추출물이 각질층에 존재하는 것으로 확인되었다(Figure 5(b)). 표피와 진피에 존재하는 마디풀 추출물의 함량(Skin)은 1,3-BG와 ELP-1의 경우 초기 적하량 대비 각각 18.8, 52.5%로 나타났으며, ELP-4, ELP-5의 경우 30.1, 30.3%로 일반 리포솜인 ELP-1이 표피와 진피에 가장 많은 양의 마디풀 추출물을 침투시킨 것으로 확인되었다. 마지막으로 피부를 통과하여 receptor phase에 존재하는 마디풀 추출물의 함량(Transdermal) 비율은 1,3-BG, ELP-1, ELP-4 그리고 ELP-5에 대하여 각각 3.5, 31.6, 58.6, 34.1%로 ELP-4의 피부 투과량이 가장 높게 확인되었다. 피부에 침투된 마디풀 추출물의 총 함량(Tape+Skin+Transdermal)은 1,3-BG, ELP-1, ELP-4, ELP-5에 대하여 각각 87.6, 303.0, 301.8, 220.3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 로 나타났으며 초기 적하량 314.4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 에 대하여 각각 27.9, 96.4, 96.0, 70.1%로 나타났다. 특히 ELP-1과 ELP-4의 경우 피부로 침투된 마디풀 추출물의 총 함량은 유사하였지만, 피부를 통과한 마디풀 추출물의 함량은 ELP-4가 ELP-1보다 약 1.9 배 더 높게 확인되었다. 즉 지질막 사이에 첨가된 계면활성제는 지질막을 불안정하게 하여 막의 유동성을 증가시키며, 이러한 막의 유동성으로 인하여 탄성 리포솜은 대조군에 비하여 더 높은 피부 투과능을 갖게 하는 이전 결과와 일치하는 것을 확인할 수 있었다.⁵ 한편, 계면활성제의 함량이 20% 이상 증가하게 되면 리포솜 뿐만 아니라 혼합된 마이셀이 형성되어 피부 투과에 불리하게 작용하는 것을 확인할 수 있었다.

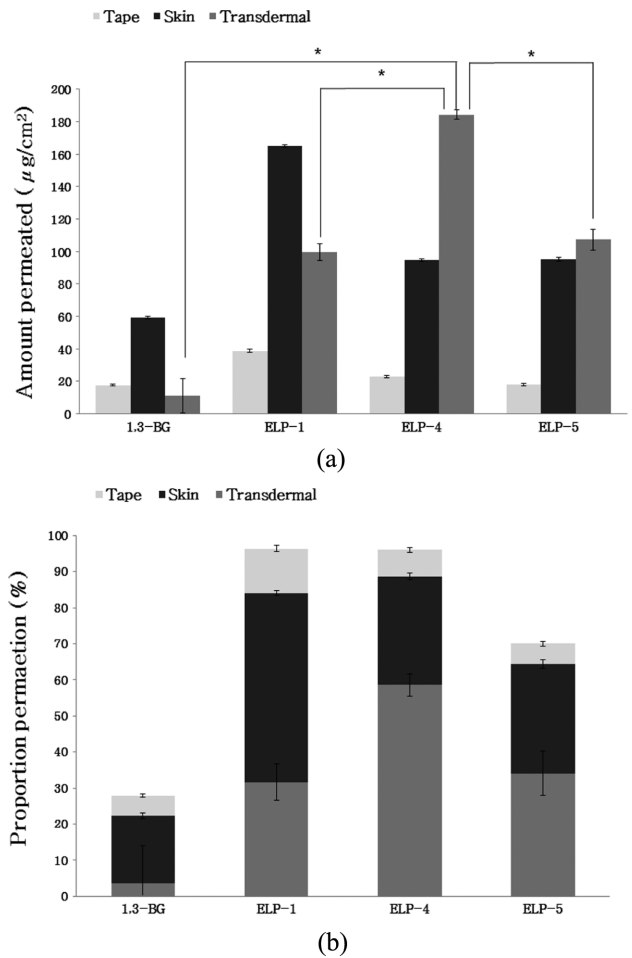


Figure 5. Proportions of permeated amount of 1,3-BG, ELP-1, ELP-4 and ELP-5 containing *P. aviculare* L. extract through ICR albino mouse skin after 24 h incubation (Tape: stratum corneum, Skin: epidermis without stratum corneum plus dermis, Transdermal: receptor chamber). The results represent the mean \pm SD (n=3) ($p < 0.05$).

***In Vitro* 피부 투과 실험(Fluorescence Image Restoration Microscopy).** 본 연구에서는 Franz diffusion cell을 이용한 피부 투과 실험에 더하여 탄성 리포솜을 통한 유효 성분의 피부 투과 증진을 가시적으로 확인하고자 형광 이미지 복원 현미경을 이용하였다. 일반 리포솜인 ELP-1을 대조군으로 하였으며, 앞선 실험 결과를 통해 최적의 계면활성제 비율로 확인된 ELP-4를 실험 제형으로 선정하였다. 리포솜 내에는 마디풀 추출물 대신 rhodamine B와 FITC를 각각 수용성 형광 물질과 지용성 형광 물질 모델로서 동시에 포집시켰으며 시간 경과에 따른 형광 물질의 피부 투과 정도를 관찰하였다(Figure 6).

그 결과 지용성 형광 물질 모델인 FITC는 표피 상층부에 다량 존재하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 리포솜의 인지질 사이에 포집된 FITC가 인지질과 각질층의 세포막과의 상

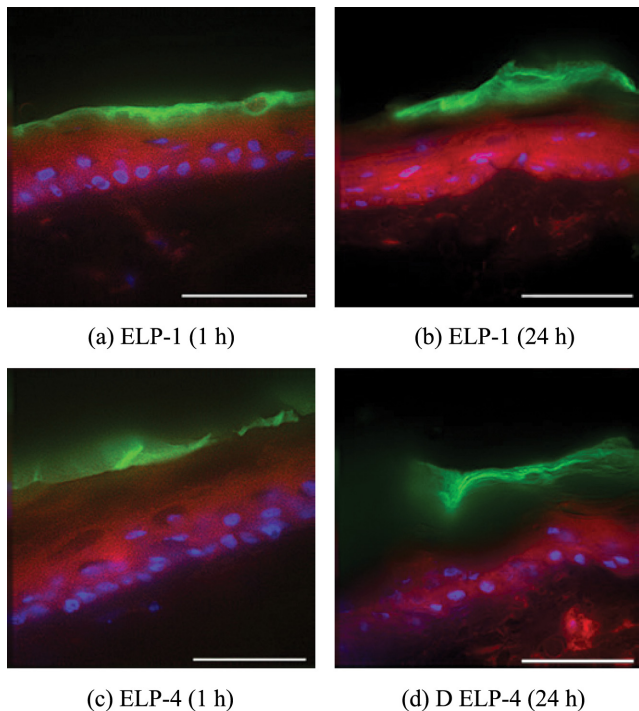


Figure 6. Fluorescence images of a cross-section of hairless rat skin incubating with ELP-1 and ELP-4 containing rhodamine B and FITC for 1 h and 24 h (Red: Rhodamine B, Green: FITC, Blue: DAPI, Size bar: 30 μm).

호작용으로 인하여 각질층에서부터 방출되었을 것으로 예상되며, 유사한 정도의 소수성을 나타내는 표피 상층부까지만 투과한 것으로 사료된다. 한편, 수용성 형광 물질 모델인 rhodamine B는 keratinocyte로 구성된 기저층과 진피 상층부까지 투과된 것을 확인할 수 있다. 이는 리포솜의 인지질과 세포막의 융합과정에서 리포솜 내부의 수용성 중심에 포집된 다량의 rhodamine B가 극성이 큰 표피 하층부와 기저층까지 투과된 것으로 사료된다. 일반 리포솜인 ELP-1과 최적 비율의 탄성 리포솜인 ELP-4를 처리한 후 1시간 경과한 피부 샘플을 보면 rhodamine B와 FITC의 피부 투과 정도는 유사하게 확인되었는데, 두 샘플 모두 rhodamine B는 표피층 전체에 걸쳐 고르게 투과되었으며 소량의 rhodamine B는 진피층 상층부까지 투과되었고, FITC는 각질층 상층부에만 존재하고 있는 것을 볼 수 있다.

하지만, 리포솜 적용 24시간 경과 후에는 ELP-4를 처리한 피부 샘플에서 더 많은 양의 rhodamine B가 표피층을 지나 진피층으로 투과되었음을 확인할 수 있으며, FITC 또한 더 깊은 각질층 내부로 투과되었음을 확인할 수 있다. 이는 Franz diffusion cell을 이용한 피부 투과 실험과 상응하는 결과로 계면활성제가 첨가된 탄성 리포솜이 일반 리포솜보다 유효 성분의 피부 전달 능력이 더 우수함을 나타낸다.

결론

본 연구에서는 이전 연구를 통해 우수한 항산화 활성 및 세포 보호 효과가 확인된 마디풀 추출물의 피부 전달을 증진시키기 위하여 인지질과 비이온 계면활성제로 구성된 탄성 리포솜을 제조하였으며, 이 제형의 물리적 특성 및 *in vitro* 피부 투과능을 평가하였으며 다음과 같은 결론을 얻었다.

(1) 마디풀 추출물을 담지한 탄성 리포솜의 입자 크기는 148.1~262.2 nm로 단분산 형태의 균일한 입자 분포를 나타내었다. 계면활성제의 함량이 0~15%로 증가할수록 탄성 리포솜의 평균 입자 크기는 증가하였으며, 계면활성제의 함량이 20% 이상 증가하자 평균 입자 크기가 다시 감소하는 경향을 나타내었고, 입자 크기가 가장 작게 측정되었던 ELP-5의 입자 크기는 148.1 \pm 0.4 nm였다.

(2) 탄성 리포솜 막의 유연성을 확인할 수 있는 가변형성 지수를 측정하였으며, 계면활성제 함량이 증가할수록(0~15%) 가변형성 지수는 15.2~25.4로 증가하는 경향을 나타내었으며, ELP-4의 가변형성 지수는 25.4 \pm 1.3으로 가장 큰 수치를 나타내었다. 계면활성제 함량이 20% 이상 증가하자 가변형성 지수가 다시 감소하였다. 이는 과량의 계면활성제 첨가로 인하여 탄성 리포솜 뿐만 아니라 마이셀이 형성되었기 때문으로 사료된다.

(3) 계면활성제 함량에 따른 마디풀 추출물의 포집 효율을 측정하였다. 그 결과 계면활성제 함량이 증가할수록(0~20%) 포집 효율이 증가하는 것을 확인하였으며, 최대 포집 효율을 나타낸 ELP-5의 포집 효율은 66.3%였다.

(4) Franz diffusion cell을 이용하여 마디풀 추출물을 담지한 탄성 리포솜의 피부 투과 능력을 평가하였다. 마디풀 추출물을 용해시킨 1,3-butylene glycol 용액(1,3-BG), 일반 리포솜인 ELP-1, 가변형성 지수가 가장 높았던 ELP-4, 평균 입자 크기가 가장 작았던 ELP-5를 실험 제형으로 하여 최적의 탄성 리포솜 조건을 찾고자 하였다.

(5) 일정 피부 면적에 대한 마디풀 추출물의 시간별 투과량을 확인하였다. 24시간 경과 후 마디풀 추출물의 누적 투과량(Transdermal)은 1,3-BG와 ELP-1의 경우, 각각 11.0, 99.4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 였으며 이를 초기 적하량 314.4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 에 대하여 환산하면 각각 3.5, 31.6%였다. ELP-4, ELP-5의 누적 투과량을 초기 적하량에 대하여 환산하면 각각 58.6, 34.1%로 평균 입자 크기가 가장 작았던 ELP-5보다 가변형성 지수가 가장 높았던 ELP-4가 더 많은 양의 마디풀 추출물을 피부 내로 통과시킨 것으로 확인되었다. 이를 통해 계면활성제의 함량이 15%인 ELP-4가 마디풀 추출물의 경피 전달에 있어 최적의 조건임을 확인하였다.

(6) 피부 투과량을 각질층에 존재하는 마디풀 추출물의 함량(Tape), 각질층을 제외한 표피와 진피에 존재하는 마디풀 추출물의 함량(Skin), 피부를 통과하여 receptor phase에 존재

하는 마디풀 추출물의 함량(Transdermal)으로 나누어 비교하였다. 그 결과 1,3-BG와 일반 리포솜인 ELP-1은 Skin에서 가장 많은 양의 마디풀 추출물이 확인되었으며, 그 양은 초기 적하량 대비 각각 18.8, 52.5%였다. ELP-4와 ELP-5의 경우, Transdermal에서 가장 많은 양의 마디풀 추출물이 확인되었다.

(7) 피부에 침투된 마디풀 추출물의 총 함량(Tape+Skin+Transdermal)을 비교한 결과, ELP-1과 ELP-4가 각각 303.0, 301.8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 로 초기 적하량 대비 각각 96.4, 96.0%로 높게 나타났지만, 피부를 통과한 Transdermal 함량은 ELP-4가 ELP-1보다 약 1.9 배 더 높게 확인되었다.

(8) 탄성 리포솜의 증진된 피부 투과능을 가시적으로 확인하기 위하여 ELP-1과 ELP-4에 수용성, 지용성 형광 물질을 담지하여 피부 투과 실험을 진행하였으며, 이를 형광 이미지 복원 현미경으로 관찰하였다. 그 결과 최적 조건의 탄성 리포솜인 ELP-4가 ELP-1보다 더 많은 양의 형광 물질을 피부 내로 투과시키는 것을 확인하였고 이를 통해 마디풀 추출물을 경피에 전달하는데 있어 일반 리포솜보다 계면활성제가 포함된 탄성 리포솜이 더 효과적임을 확인하였다.

이상의 결과들은 최적 조건의 인지질과 비이온 계면활성제로 구성된 탄성 리포솜이 마디풀 추출물을 비롯하여 유효 성분의 피부 전달에 있어서 유용한 전달체로 이용될 수 있음을 시사한다.

감사의 글: 본 연구는 보건복지부 보건의료연구개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것임(과제고유번호: HN10C0001).

참 고 문 헌

1. S. N. Park, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **23**, 75 (1997).
2. M. Yaar and B. A. Gilchrest, *Br. J. Dermatol.*, **157**, 874 (2007).
3. D. H. Won, S. B. Han, J. P. Hwang, S. J. Kim, J. N. Park, and S. N. Park, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **38**, 297 (2012).
4. J. A. Bouwstra and P. L. Honeywell-Nguyen, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **54**, 41 (2002).
5. P. L. Honeywell-Nguyen and J. A. Bouwstra, *Drug Delivery/ Formulation and Nanotechnology*, **2**, 67 (2005).
6. M. S. Lim, S. B. Han, S. S. Kwon, M. A. Park, and S. N. Park, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **38**, 147 (2012).
7. A. Sharma and U. S. Sharma, *Int. J. Pharm.*, **154**, 123 (1997).
8. M. J. Choi and H. I. Mailbach, *Int. J. Cosmet. Sci.*, **27**, 211 (2005).
9. M. M. A. Elsayed, O. Y. Abdallah, V. F. Naggar, and N. M. Khalafallah, *Int. J. Pharm.*, **332**, 1 (2007).
10. V. Harsh, K. Annu, B. Rahul, and J. Vandana, *Int. Res. J. Pharm.*, **3**, 117 (2012).
11. N. A. Yunuskhodzhaeva, K. A. Eshbakova, and V. N. Abdullabekova, *Chem. Nat. Compd.*, **46**, 803 (2010).
12. C. B. Jeon, M. S. Dissertation, Graduate School of Education Chungbuk National University, Korea (2012).
13. C. G. Lee, N. J. Kim, N. D. Hong, and C. H. Kwon, *Kor. J. Pharmacogn.*, **25**, 59 (1994).
14. M. J. Kim, M. S. Dissertation, Graduate School of Seoul National University of Science and Technology, Korea (2012).
15. R. J. Nijveldt, E. V. Nood, D. EC. V. Hoorn, P. G. Boelens, K. V. Norren, and P. A. M. V. Leeuwen, *Am. J. Clin. Nutr.*, **74**, 418 (2001).
16. J. W. Lin, H. M. Chiang, Y. C. Lin, and K. C. Wen, *J. Food Drug Anal.*, **16**, 1 (2008).
17. M. S. Lim, M. A. Park, S. S. Kwon, S. B. Han, and S. N. Park, *Polymer(Korea)*, **36**, 705 (2012).
18. O. Lopez, A. D. L. Maza, L. Coderch, C. Lopez-Iglesias, E. Wehrli, and J. L. Parra, *FEBS*, **426**, 314 (1998).
19. G. Aastha, A. Sandeep, and S. Arvind, *Novel Science - IJPS*, **2**, 1 (2013).
20. A. K. Singh, E. B. Cummings, and D. J. Throckmorton, *Anal. Chem.*, **73**, 1057 (2001).