

친수성 L-ascorbic acid와 소수성 α -tocopherol을 모두 포집하는 ethosome의 특성

임윤미 · 전윤경 · 박세연 · 진병석[†]

동덕여자대학교 자연과학대학 응용화학과
(2014년 4월 14일 접수, 2014년 5월 27일 심사, 2014년 6월 2일 채택)

Coencapsulation of L-Ascorbic Acid and α -Tocopherol in Ethosomes and Their Properties

Yoon Mi Lim, Yoon Kyung Jun, Seyeon Park, and Byung Suk Jin[†]

Department of Applied Chemistry, Dongduk Women's University, Seoul 136-714, Korea
(Received April 14, 2014; Revised May 27, 2014; Accepted June 2, 2014)

초 록

친수성 아스코르빈산(L-ascorbic acid)과 소수성 토코페롤(α -tocopherol)을 모두 함유하는 ethosome 베시클을 제조하면서 이들의 특성을 살펴보았다. Ethosome에 포집되는 아스코르빈산 수용액 농도가 증가할수록 베시클 입자 크기는 작아졌다. 토코페롤은 HPC에 혼합되어 ethosome 베시클 액정막의 구성 성분이 되는데 토코페롤 혼합에 의해 베시클 입자 크기와 아스코르빈산 수용액의 포집효율이 다소 증가하였다. 그러나 혼합비율이 25 wt% 이상이 되면 베시클 막이 불완전한 액정구조로 변하면서 입자크기는 크게 증가하고 포집효율은 크게 감소하였다. 아스코르빈산과 토코페롤이 함께 ethosome에 포집되어 있을 때 항산화 효능이 고온(40 °C)에서도 5주간 안정하게 유지됨을 확인하였다. UV 조사 실험에서도 아스코르빈산은 수용액 상태로 있을 때에 비해 ethosome에 포집되어 있을 때 안정성이 향상되었다.

Abstract

Coencapsulation of hydrophilic L-ascorbic acid and hydrophobic α -tocopherol in ethosome vesicles was attempted and their properties were investigated in this study. The size of vesicles decreased with increasing concentration of L-ascorbic acid solution encapsulated in ethosome. The vesicle size and encapsulation efficiency of ethosomes increased slightly when α -tocopherol was added into the HPC-forming liquid crystalline membrane of ethosome. However, the vesicle size increased highly and the encapsulation efficiency decreased abruptly at mixing ratios above 25 wt% due to the formation of an imperfect liquid crystalline structure within a vesicle membrane. It was observed that antioxidant activity was maintained for 5 weeks at 40 °C when L-ascorbic acid and α -tocopherol were coencapsulated in ethosome. The L-ascorbic acid in ethosome was stable compared to that in aqueous solution under UV radiation.

Keywords: coencapsulation, α -tocopherol, L-ascorbic acid, ethosome, antioxidant

1. 서 론

약물이나 피부활성물질 등을 인위적으로 만든 베시클(vesicle) 안에 포집(encapsulation)시켜 피부투과전달을 용이하게 하는 경피 전달시스템(transdermal delivery system) 중 대표적인 예로 리포솜을 들 수 있다. 리포솜은 효율적인 피부투과 외에도 물, 산소, 빛 등에 의해 산화가 쉬운 불안정한 물질들을 안정화시키거나 또는 포집된 물질의 방출속도를 조절하는 기능이 가능하기 때문에 의약, 화장품, 식품업계에서 오랫동안 많은 관심을 가져왔다. 하지만 리포솜은 막 자체의 물리적 불안정성, 리포솜 막을 구성하는 지질의 산화 및 가수분해 가능성, 제형상의 유화 안정성 등의 문제를 안고 있다. 이외에도 리포솜은 포

집효율이 극히 낮고 또한 리포솜 대부분이 피부 속 깊이 침투하지 못하고 피부 각질층에 그대로 남게 된다는 보고가 잇따르자 이를 해결하기 위해 수많은 연구와 다양한 방법들이 시도되어 왔다.

피부 각질층에서 각질세포 사이의 간격은 대략 수십 나노 정도이기 때문에 최소한 수백 나노미터 이상의 크기를 갖는 리포솜은 이 간격 틈 사이를 통과하기 어렵다. 따라서 베시클이 자체의 직경보다도 작은 구멍을 통과하기 위해서는 좀 더 유연하면서 탄력적으로 베시클 변형이 가능해야 하는데 이러한 원리를 적용하여 transfersome, ethosome 등의 명칭을 갖는 deformable vesicle이 개발되었다.

Cevc에 의해 개발된 transfersome은 인지질에 edge activator라고 일컫는 단일사슬의 계면 활성제를 혼합 구성하여 만들어진다[1,2]. Edge activator는 인지질과 함께 구형 베시클 막의 곡면을 구성하는데 인지질과 다른 곡률반경을 갖는 edge activator는 베시클의 지질 이중층 막을 약화시켜 베시클 막의 변형이 쉽게 일어날 수 있도록 유도한다[3]. Edge activator로는 sodium cholate, sodium deoxycholate, Span 60, Span 65, Span 80, Tween 20, Tween 60, Tween 80, dipotassium glycyrrhizinate 등

[†] Corresponding Author: Dongduk Women's University,
Department of Applied Chemistry, Seoul 136-714, Korea
Tel: +82-2-940-4513 e-mail: bsjin@dongduk.ac.kr

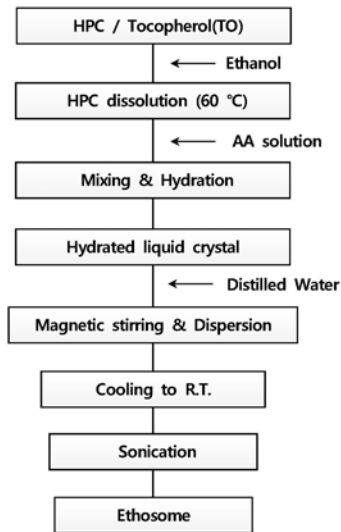


Figure 1. Typical process scheme for the preparation of ethosome encapsulating AA and TO.

이 사용되어 왔고 El Maghraby 등은 인지질과 여러 edge activator 간의 상호작용을 열분석을 통해 살펴면서 지질 이중층의 상전이 및 지질 이중층 막 내에서의 edge activator의 배열 위치와 역할을 분석한 결과를 발표하였다[4]. Ethosome은 Touitou에 의해 개발되었는데 인지질을 에탄올에 녹여 물에 분산시켜 만든 지질 베시클로 제조 과정에서 마이크로 플루다이저와 같은 특별히 강한 전단력을 가하는 장치를 사용하지 않고도 리포솜보다 작은 크기의 입자로 만드는 것이 가능하다[5,6]. 에탄올은 전부터 피부투과 증진제로 많이 알려져 있는데 에탄올은 베시클 막의 유연성을 높여 변형을 유도하면서 계면장력은 낮추고 동시에 각질층의 피부장벽을 낮추는 역할을 하는 것으로 보고 있다[7,8]. 이밖에도 에탄올은 여러 약물의 용해도를 높여 일반 리포솜에 비해 ethosome의 포집효율을 높이는 데도 크게 기여한다.

이들 베시클은 공통적으로 기존의 일반 리포솜에 비해 극단적 변형(ultra-deformation)이 가능하여 표피의 각질세포 간 지질층 사이로 침투이동이 더욱 효과적으로 이루어지지만 유효 성분의 포집효율이 그리 만족스럽지 못하거나 ethosome의 경우에는 물리적 안정성이 낮고 또한 피부 자극이 높은 에탄올 성분을 비교적 많이 함유하는 문제가 지적되어 왔다. 이에 따라 본 연구진은 기존 ethosome 제조 방식과 약간 다르게 2단계 과정(수화과정과 분산과정)으로 수화 액정형 베시클을 만들어 에탄올의 함량을 최소화하면서 ethosome의 포집효율을 더욱 높이는 체계적 고찰을 시도하였다[9,10].

본 연구에서는 친수성 L-ascorbic acid와 소수성 α -tocopherol, 두 유효 물질 모두를 포집하는 ethosome 제조를 시도하였다. 비타민 C의 성분인 L-ascorbic acid는 강력한 항산화 물질로 강한 환원력을 바탕으로 피부 항노화, 주름 개선, 멜라닌 세포 활성 억제, 자외선 차단 등 많은 효능을 갖고 있지만 수용액 상으로 존재하거나 빛, 열, 중금속 등과 같은 외부 환경요인에 노출되면 급격히 산화가 일어나 효능을 잃고 변색, 변취되는 특성으로 인하여 화장품 원료로 광범위하게 사용하기 어려웠다. 또한 α -tocopherol은 비타민 E의 성분으로 세포막의 산화지질 생성을 억제하는 강력한 항산화 작용을 갖지만 소수성이기 때문에 물에 녹지 않아 다양한 분야에서 활용하는데 어려움이 있다. Ethosome이 친수성, 소수성 물질 모두 포집이 가능하고 L-ascorbic acid, α -tocopherol이 같이 존재할 때 항산화 효능 및 안정성 향상 효

과를 기대할 수 있는 점에 착안하여, 베시클에 두 물질 모두를 포집시키고 이에 따른 산화 안정성 향상 여부를 살펴보았다. 또한 포집되는 두 물질의 농도에 따른 액정 배열 및 베시클 입자 형성의 변화, ethosome 특성 등을 살펴보면서 농도에 따른 영향을 분석하였다.

2. 실험

2.1. 재료

본 연구에서 사용한 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical, L-ascorbic acid (이후 AA로 표기), α -Tocopherol (TO)은 모두 Sigma Chemical 회사의 제품을 사용하였다. Ethosome의 주성분인 인지질은 soybean에서 추출한 지질을 수소 첨가시켜 불포화 성분을 없앤 레시틴(Lecithin)으로 Phosphatidyl choline (PC) 성분이 95% 이상인 Emulmetik 950 (Lucas Meyer)을 사용하였으며 편이상 명칭을 HPC (Hydrogenated phosphatidyl choline)로 나타내었다. 레시틴 용해에 사용되는 에탄올은 EP급을 사용하였다. HPLC 이동상 제조 시 쓰이는 phosphoric acid는 Sigma 제품을, 정제수는 HPLC 등급용으로 각각 사용하였다.

2.2. AA와 TO를 모두 포집한 ethosome 제조

HPC에 TO를 0, 5, 10, 15, 20, 25 wt%씩 섞은 HPC 혼합물 1 g과 에탄올 1 mL를 등근바닥 플라스크에 넣은 후 입구를 마개로 막고 60 °C의 항온조에서 완전히 용해시켜 등방성 상태의 투명한 졸 용액을 만든다. 투명한 졸 상태의 용액에 AA 수용액 1 mL (농도 300 mg/mL)를 넣고 2 min 이상 자석 교반시키면 용액은 겔 상태로 변하면서 백색의 수화 액정상(hydrated liquid crystalline phase)이 형성된다. 다음은 수화 액정상의 분산단계로 교반기를 계속 돌린 상태로 전단력을 가하면서 정량용액 펌프를 이용하여 증류수 57 mL를 약 4 mL/min의 속도로 한 방울씩 서서히 첨가하면 수화 액정상은 베시클 형태의 입자로 물속에 분산되는데 이 베시클 입자가 AA와 TO를 모두 포집한 ethosome이다. Ethosome 입자가 분산된 현탁액을 항온조에서 상온으로 옮겨 약 2 h 정도 자석교반 하에 서서히 냉각시키며 베시클 액정을 안정화시킨다. 상온까지 냉각된 ethosome 입자의 현탁액에 초음파를 가하면 ethosome 입자는 더욱 작고 고르게 분산된다. Figure 1에 ethosome 제조 과정을 요약하여 나타내었다.

2.3. 사용기기

Ethosome의 입자 크기는 레이저 광 산란 측정 장치인 PSS의 Nicomp 380 모델을 사용하여 측정하였고 액정의 열적특성을 분석하기 위하여 TA사의 DSC (model Q10)를 사용하였다. 전도도 변화는 conductivity meter (Orion model 150)를 사용하였고 DPPH 실험에서 사용되는 UV-vis spectrophotometer는 MECASYS사의 Optizen 모델을 사용하였다. 표면장력은 Wilhelmy plate 타입의 표면장력계로 KSV사의 sigma 703 모델을 사용하였다. AA의 정량분석을 위해 사용한 HPLC는 Young-Lin Acme 모델을 사용하였다. 초음파 기기는 Sonics & Materials Inc.의 VC505 모델(probe type)을 사용하였다.

2.4. 포집효율 측정

제조된 ethosome의 AA의 포집효율을 측정하기 위해서 stirred ultra-filtration cell (SUC)과 15 nm pore size의 membrane을 사용하였다. 먼저 ethosome 현탁액을 SUC에 넣고 stirrer를 24 h 회전시키면서 현탁액 중 ethosome 베시클을 걸러내고 여과액을 모은다. 여과액의 농도를 HPLC로 측정하여 아래식과 같은 정의에 의해 포집효율을 구하였다.

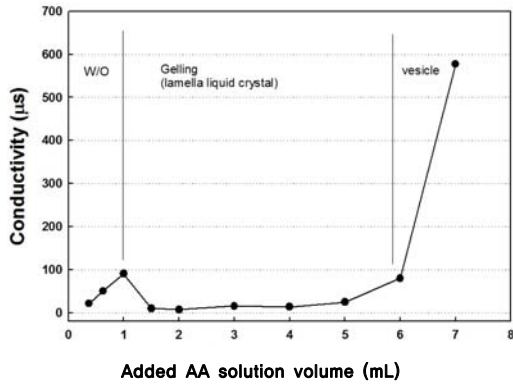


Figure 2. Changes in the conductivity of ethanol-dissolved HPC with addition of AA solution.

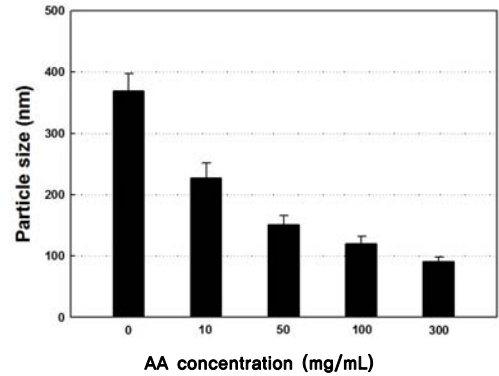


Figure 3. Changes in the particle size of ethosome vesicles with the concentration of AA solution.

$$\text{포집효율}(\%) = \left(1 - \frac{\text{여과액의 AA의 질량}}{\text{전체의 AA의 질량}} \right) \times 100$$

2.5. DPPH radical scavenging activity

시료의 항산화 효능은 DPPH radical scavenging activity를 측정하여 살펴보았다. 0.2 mM DPPH 용액 1 mL에 각각의 시료 용액을 2 mL씩 첨가하여 충분히 섞은 후 실온에서 10 min 동안 반응시킨 후 UV-vis spectrophotometer로 517 nm에서 흡광도를 측정하여 다음 식에 따라 DPPH radical scavenging activity를 구하였다. 시료의 환원력 크기는 DPPH 라디칼 소거능(radical scavenging activity)과 SC₅₀으로 표시하였다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity}(\%) = \left(1 - \frac{S-B}{C} \right) \times 100$$

- S: DPPH 용액에 시료를 첨가한 반응용액의 흡광도
- B: 시료용액의 흡광도
- C: DPPH 용액에 시료를 첨가하지 않은 반응용액의 흡광도 농도

2.6. 산화 안정성 측정

AA와 TO가 ethosome에 포집되었을 때 항산화 효능이 안정화되는 효과를 확인하기 위해 시료별로 보관 시간에 따른 DPPH 라디칼 소거능의 변화를 관측하였다. 시료는 AA 수용액, AA만을 포집한 ethosome 현탁액, AA와 TO를 2 : 1의 비율로 포집한 ethosome 현탁액 등 세 종류로, 각각을 500 ppm 농도로 만들어서 40 °C 오븐과 UVA + B 램프가 장착된 오븐에 각각 보관하였다. 매주 일정량을 채취한 후 에탄올에 100 ppm농도로 희석하여 DPPH 소거능을 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

본 연구에서 ethosome 제조는 HPC를 소량의 에탄올에 용해시킨 후 여기에 적당량의 수용액을 첨가하여 수화에 의한 라멜라 액정상(이화 액정)을 먼저 만들고, 이후에 교반과정을 통해 전단력을 가하면서 동시에 과량의 물을 조금씩 계속적으로 첨가해 나가는 방식으로 만들게 된다. 이러한 제조 과정 중에 연속상은 유상(oil phase)에서 수상(water phase)으로의 상 전환(phase inversion)이 일어나는 등 구성 성분 간 혼합 비율에 따라 여러 상(phase)의 변화가 일어나게 된다. HPC가 용해된 에탄올 용액에 AA 수용액을 첨가하면, 그 첨가되는 양

에 따라 용액 전체의 전도도(conductivity) 값의 변화가 나타나는데 이를 통해 상의 변화를 예측할 수 있다. HPC 1 g과 에탄올 1 mL를 conical tube에 혼합하여 넣고 60 °C의 항온조에서 HPC를 완전 용해시킨 후, AA 수용액을 조금씩 첨가해 가면서 전도도를 측정하고 그 결과를 Figure 2에 나타내었다. HPC를 에탄올에 용해한 후 전도도를 측정하면 그 수치 값은 거의 0에 가까운 유상이 된다. 여기에 AA 수용액을 소량 첨가하면 유상 속에 수상이 분산된 W/O 상태를 유지하면서 첨가량에 비례하여 전도도 값이 증가하게 된다. 하지만 AA 수용액 첨가량이 약 1 mL를 넘으면서 W/O 구조로부터 유상과 수상이 교대로 층을 형성하면서 배열되는 bi-continuous 라멜라 액정 구조로 상 전환이 일어나는데 이 라멜라 액정구조는 젤(gel) 상태이기 때문에 전도도 값이 약간 감소하게 된다. AA 수용액을 더욱 첨가하여 6 mL 이상으로 늘리면 전도도가 수백 µS 이상으로 급격히 증가하는 것을 볼 수 있다. 이는 젤 상태로 있던 라멜라 액정이 베시클 입자 형태로 떨어져 나가면서 수용액 상에 분산(W/O/W 상태)이 되어 전도도가 크게 증가하는 것이다.

AA를 포집한 ethosome을 만들기 위해 에탄올에 용해된 HPC에 AA 수용액을 첨가하는데 이때 첨가되는 AA 수용액의 농도는 최종적으로 만들어진 ethosome 입자 크기에 영향을 주게 된다. Figure 3은 AA 수용액 농도에 따른 ethosome 입자 크기 변화를 나타낸 결과이다. 순수한 물을 첨가하여 만든 ethosome은 400 nm에 가까운 입자크기를 나타내지만, AA 수용액을 첨가하면 이보다 더 작은 크기의 ethosome이 만들어지고 AA의 포화 용해도에 가까운 300 mg/mL 농도의 수용액을 첨가했을 때는 입자 크기가 약 90 nm까지 작아졌다. Ethosome이 분산된 현탁액의 외관에서도 변화가 나타나는데 순수한 물로 만든 경우는 유백색을 나타내지만 AA 수용액의 농도가 증가할수록 옅은 청색 빛의 반투명 용액으로 변해갔다. 일반적으로 AA가 물에 용해되면 AA는 수소이온(H⁺)을 내놓고 ascorbate anion이 된다. Ascorbate anion은 HPC의 극성기와 극성 간 상호작용(polar-polar interaction)함으로써 HPC의 액정형성이 유리하고 더욱 조밀한(compact) 형태의 질서 정연한 분자배열을 유도한다. 따라서 ethosome에 포집된 AA의 농도가 클수록 베시클 입자 크기가 작아지는 것으로 예측된다.

Figure 4는 AA 수용액(농도 300 mg/mL)의 양과 에탄올의 양을 각각 1 mL로 고정하고, HPC에 TO를 혼합해서 ethosome을 제조하였을 때, TO의 혼합비율에 따른 베시클 입자크기 변화를 살펴본 결과로 HPC와 TO를 혼합한 전체량은 1 g으로 고정하였다. HPC 단독으로 만들어진 ethosome은 입자크기가 90 nm이지만 HPC에 TO를 혼합하면

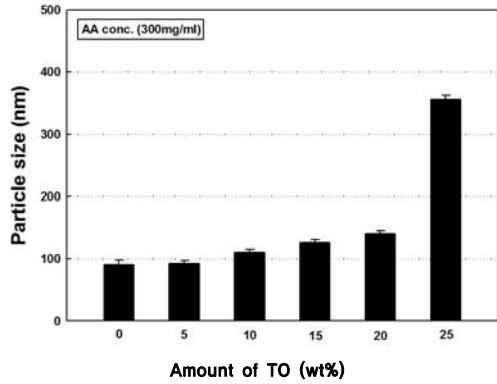


Figure 4. Changes in the particle size of ethosome vesicle due to the addition of TO.

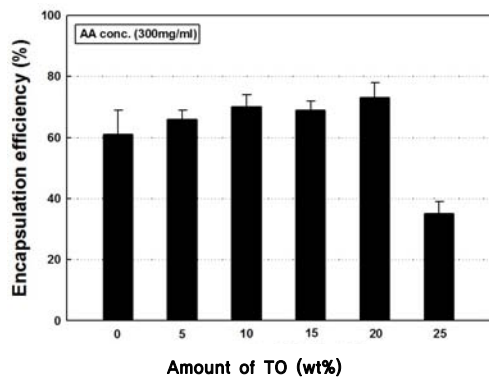


Figure 5. Changes in AA encapsulation efficiency of ethosome with constitution composition.

20 wt% 혼합비율까지는 TO 양에 비례하여 ethosome 입자 크기가 서서히 증가하다 25 wt% 이상의 혼합비율에서는 입자 크기가 360 nm로 크게 증가하는 결과가 나타났다. 리포솜을 연구한 다른 논문에서도 인지질에 TO를 혼합했을 때 리포솜 입자 크기가 증가한 결과를 발표하면서 TO가 인지질 이중층 구조 속에 위치하여 함께 액정 배열을 구성하면서 서로 얽혀진 구조로 액정배열이 조밀하게 형성되지 못하고 이중층 막의 두께가 커짐을 설명하였다[11-13]. 같은 원리로 ethosome에서도 TO이 HPC 액정막 구조에 영향을 주기 때문에 입자 크기가 증가하는 것이다. TO의 chromanol ring 부분은 HPC의 글리세릴 에스터나 또는 인산기와 상호인력이 작용하기 때문에[14,15], 적은 양의 TO는 HPC와 어느 정도 상용성을 갖고 함께 액정배열을 이룰 수 있지만 TO의 혼합비율이 25 wt% 이상이 되면 TO와 HPC 간 상용성이 떨어지면서 TO가 오히려 HPC의 규칙적인 액정 배열을 방해하기 때문에 베시클의 입자 사이즈가 크게 상승하게 된다.

Figure 5는 TO의 혼합 비율에 따른 ethosome의 포집효율 변화를 살펴본 결과이다. TO 20 wt% 혼합까지는 혼합비율이 커질수록 포집효율이 조금씩 상승하는 경향을 보였지만 TO를 25 wt% 혼합한 경우에는 포집효율이 크게 감소하였다. TO는 베시클 막을 안정화시키면서 막의 투과도를 감소시키는 역할을 하기 때문에[16,17] ethosome에 TO를 혼합하면 베시클 막 안에 포집된 AA 수용액의 누출이 적어지면서 포집효율이 상승하게 된다. 하지만 25 wt% 이상으로 혼합되는 TO의 양이 많아지면 토크페놀에 의해 베시클 막 자체의 규칙적인 이중층 분자배열이 깨지면서 AA 수용액의 누출이 많아져서 포집효율은 크게

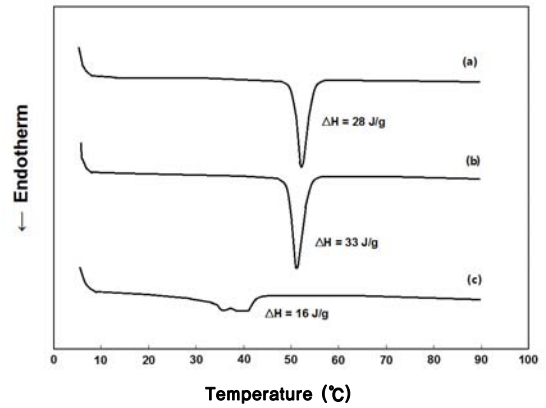


Figure 6. DSC thermograms of hydrated liquid crystalline phase with different compositions (a) HPC 1 g / ethanol 1 mL / water 1 mL, (b) HPC 1 g / ethanol 1 mL / AA solution 1 mL, (c) HPC/TO (0.7/0.3) g / ethanol 1 mL / AA solution 1 mL.

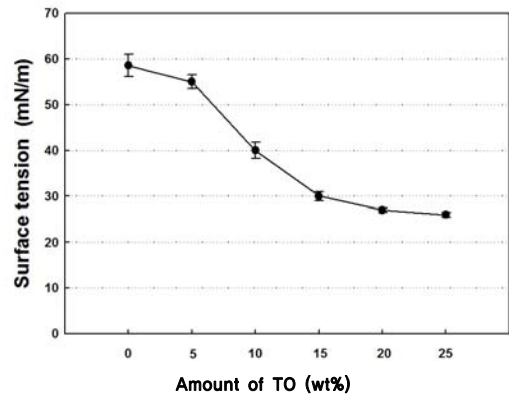


Figure 7. The change in surface tension of ethosome suspensions due to the addition of TO.

감소하게 된다.

Figure 6은 DSC를 사용하여 HPC 수화 액정상의 열적 특성을 관찰한 결과이다. 순수한 물로 수화된 액정(a)보다 AA 수용액으로 수화된 액정(b)의 용융열 값(ΔH)이 5 J/g 정도 더 큰 값이 얻어졌다. 용융열 값이 클수록 액정을 구성하는 분자 간 인력이 강하게 작용하거나 또는 액정의 결정화도(degree of crystallinity)가 높다는 것을 의미한다. 앞서 언급했듯이 AA와 HPC 분자 간에는 상호 인력이 작용하기 때문에 더욱 조밀하게 잘 발달된 수화 액정이 형성되고 따라서 순수한 물보다도 AA 수용액을 첨가하여 만들어진 수화 액정이 더 큰 용융열 값을 갖게 된다. HPC에 TO가 혼합되면 액정의 결정화도가 떨어져 용융열 값이 감소하는데 특히 혼합비율이 25 wt% 이상인 경우에는 불완전한 구조의 액정상이 형성되기 때문에 Figure 6(c)와 같은 불명확한 용융 피크의 모습이 나타나고 용융 온도도 크게 떨어진다. HPC는 계면활성제 역할을 하기 때문에 베시클로 만들어져서 물에 첨가되면 물의 표면장력을 감소시킨다. 순수한 물의 표면장력은 대략 73 mN/m인데 반하여 ethosome이 5 wt% 비율로 함유된 현탁액의 표면장력은 60 mN/m보다 작은 값을 나타냈다(Figure 7). Ethosome 구성 성분에서 소수성이 강한 TO 혼합량이 많아질수록 현탁액의 표면장력은 더욱 감소하는데 이로부터 베시클 막 구성 성분의 친수 소수 특성이 전체 현탁액의 표면장력에 영향을 주는 것을 알 수 있다.

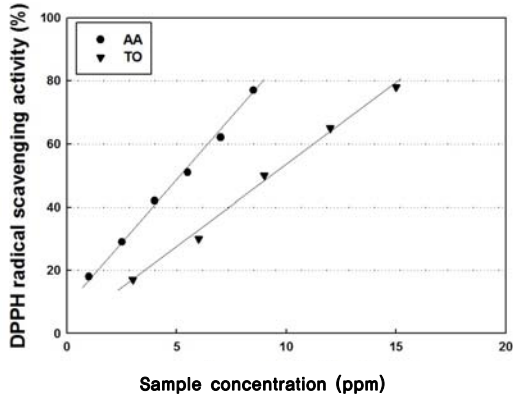
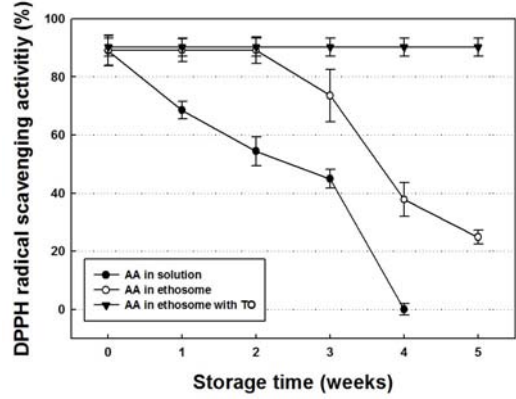
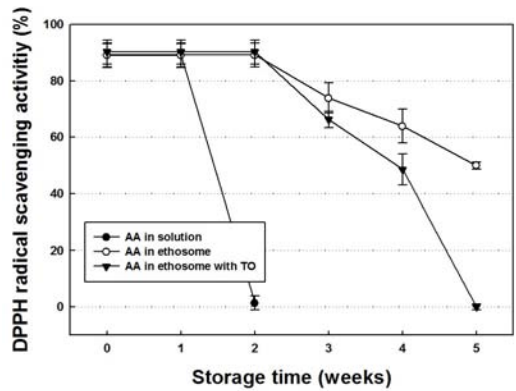


Figure 8. DPPH radical scavenging activities of AA and TO (SC₅₀: AA 5.0 ppm, TO 9.7 ppm).

일반적으로 AA와 TO의 항산화 효능은 널리 알려져 있지만 본 연구에서 사용된 AA와 TO의 항산화 효능 비교를 위해 각각의 농도별 DPPH radical 소거능을 살펴보았다(Figure 8). 그림으로부터 두 물질의 SC₅₀ 값을 유추해보니 대략 AA는 5.0 ppm, TO는 9.7 ppm으로, AA가 TO보다 DPPH radical 소거능이 좀 더 우수한 결과가 나타났다. AA를 TO와 함께 ethosome에 포집시켰을 때 두 물질이 안정화되는지 여부를 살펴보았다. DPPH assay을 이용하여 1주 간격으로 시간 경과에 따른 라디칼 소거능 변화를 살펴보았는데, 40 °C 오븐에 있을 때(a)와 UV 빛이 조사되었을 때(b) 각각의 결과를 Figure 9에 나타내었다. 비교 대상 시료는 AA 수용액, AA만을 포집한 ethosome 현탁액, AA와 TO 모두를 포집한 ethosome 현탁액 등 3가지이다. 40 °C의 오븐에 보관했을 때 AA 수용액은 첫 주부터 산화가 일어나기 시작하여 4주에는 라디칼 소거능이 완전히 소멸되었다. 이에 반해 AA만이 ethosome에 포집된 현탁액의 경우 3주까지도 라디칼 소거능이 70% 이상 유지되는 등 베시클 포집에 의해 AA의 산화가 지연되었다. 더 나아가 AA와 TO가 ethosome에 공동으로 포집된 현탁액의 경우는 관찰된 5주 동안에 라디칼 소거능이 그대로 일정하게 유지되었다. 이는 TO가 베시클 막 성분으로 존재하면서 AA 항산화 효능의 안정화에 기여한 결과로 이미 여러 논문에서 AA와 TO 혼합에 의한 항산화의 시너지 효과를 발표한 바 있다[18,19]. UV 램프가 장착된 오븐에 보관했을 때는 고온 보관과는 약간 다른 양상을 보였다. AA 수용액에 비해 ethosome 현탁액에서 라디칼 소거능이 좀 더 오래 유지되는 경향은 나타났지만 이들도 2주가 지나면서부터 라디칼 소거능 감소가 시작되었다. AA만을 포집한 ethosome에 비해 AA와 TO가 모두 포집된 ethosome 현탁액에서 라디칼 소거능 감소가 더 빨리 진행되었는데 이는 TO가 UV에 대하여 상당히 불안정한 물질이기 때문에 오히려 산화를 촉진하게 된다[20]. AA가 수용액 상태로 있으면 노출된 외부 환경에 따라 산화가 자유롭게 진행될 수 있는데 반하여 ethosome에 포집된 AA는 분자간 규칙적 배향을 갖는 액정 구조 속에 갇힘으로써 상대적으로 분자의 운동이 자유롭지 못하고 이로 인해 산화 반응이 제한되기 때문에 항산화 효능을 좀 더 오래 유지하게 된다. 또한 ethosome의 액정 막은 빛을 산란시킨다는 것 기타 외부로부터의 반응인자를 차단하는 역할을 함으로써 액정 막 내에 포집된 불안정한 물질의 안정성을 향상시킬 수 있게 된다.



(a)



(b)

Figure 9. The change in DPPH radical scavenging activity with the storage time (a) at 40 °C, (b) under UVA+B radiation (15 W).

4. 결 론

친수성 AA와 소수성 TO를 모두 포집하는 ethosome 베시클을 제조하였다. AA를 포집한 ethosome을 만들기 위해 에탄올에 용해된 HPC에 AA 수용액을 첨가하는데 이때 첨가되는 AA 수용액의 농도가 높을수록 ethosome 입자크기가 작아진다. Ethosome 액정막의 구성성분으로 토크페롤이 적은 양으로 혼합되면 베시클 입자 크기와 포집효율이 약간씩 증가하다, 혼합비율이 25 wt% 이상이 되면 입자크기는 크게 상승하고 포집효율은 크게 감소한다. AA를 수용액 상태에서 40 °C의 고온에 두면 산화가 되어 4주 만에 항산화 효능이 완전 소멸되지만 TO가 함께 함유된 ethosome에 포집된 경우 5주 동안 항산화 효능이 그대로 유지되는 결과가 나타났다. 하지만 TO는 UV 빛에 약하기 때문에 UV가 조사되는 조건에서는 TO를 함유하지 않은 ethosome에 포집된 AA가 항산화 효능을 가장 오래 유지하였다.

감 사

본 연구는 보건복지부 글로벌화장품 신소재신기술 연구개발 사업(과제 고유번호 HN13C0074)의 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

References

1. G. Cevc and G. Blume, Lipid vesicles penetrate into intact skin owing to the transdermal osmotic gradients and hydration force, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1104**, 226-232 (1992).
2. G. Cevc, Transfersomes, liposomes and other lipid suspensions on the skin: permeation enhancement, vesicle penetration, and transdermal drug delivery, *Crit. Rev. Ther. Drug. Carrier. Syst.*, **13**, 257-388 (1996).
3. M. M. A. Elsayed, O. Y. Abdallah, V. F. Nagggar, and N. M. Khalafallah, Lipid vesicles for skin delivery of drugs: reviewing three decades of research, *Int. J. Pharm.*, **332**, 1-16 (2007).
4. G. M. M. El Maghraby, A. C. Williams, and B. W. Barry, Interaction of surfactant and skin penetration enhancers with liposomes, *Int. J. Pharm.*, **276**, 143-161 (2004).
5. 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. Rel.*, **65**, 403-418 (2000).
6. E. Toutitou, B. Godin, and C. Weiss, Enhanced delivery of drugs into and across the skin by ethosomal carriers, *Drug Dev. Res.*, **50**, 406-415 (2000).
7. V. Dave, D. Kumar, S. Lewis, and S. Paliwal, Ethosome for enhanced transdermal drug delivery of aceclofenac, *Int. J. Drug Del.*, **2**, 81-92 (2010).
8. N. Upadhyay, S. Mandal, L. Bhatia, S. Shailesh, and P. Chauhan, A Review on Ethosomes: An Emerging Approach for Drug Delivery through the Skin, *Recent Research in Science and Tech.*, **3**(7), 19-24 (2011).
9. B. S. Jin, S. M. Lee, and K. H. Lee, A Study on the Factors affecting entrapment efficiency and particle size of ethosomes, *J. Kor. Ind. Eng. Chem.*, **17**(2), 138-143 (2006).
10. S. M. Lee, M. J. Choi, Y. M. Lee, and B. S. Jin, Preparation and characterization of ethosome containing hydrophobic flavonoid luteolin, *Appl. Chem. Eng.*, **21**(1), 40-45 (2010).
11. M. H-Miller, L. S. S. Guo, and R. L. Hamilton, Tocopherol-phospholipid liposome; maximum content and stability to serum proteins, *Lipids*, **20**(3), 195-200 (1985).
12. N. Liu and H. J. Park, Chitosan-coated nanoliposome as vitamin E carrier, *J. Microencapsul.*, **26**(3), 235-242 (2009).
13. Md. A. Kamal and V. A. Raghunathan, Modulated phases of phospholipid bilayers induced by tocopherols, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1818**, 2486-2493 (2012).
14. M. P. Sanchez-Migallon, F. J. Aranda, and J. C. Gomez-Feernandez, Interaction between α -tocopherol and heteroacid phosphatidylcholines with different amounts of unsaturation, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1279**(2), 251-258 (1996).
15. K. Fukuzawa, W. Ikebata, A. Shibata, I. Kumadaki, T. Sakanaka, and S. Urano, Location and dynamics of alpha-tocopherol in model phospholipid membranes with different charges, *Chem. Phys. Lipids*, **63**, 69-75 (1992).
16. A. K. Samhan-Arias, Y. Y. Tyurina, and V. E. Kagan, Lipid antioxidants: free radical scavenging versus regulation of enzymatic lipid peroxidation, *J. Clin. Biochem. Nutr.*, **48**(1), 91-95 (2011).
17. P. J. Quinn, The effect of tocopherol on the structure and permeability of phosphatidyl-choline liposomes, *J. Control. Rel.*, **160**(2), 158-163 (2012).
18. E. Niki, Interaction of ascorbate and alpha-tocopherol, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **498**, 186-199 (1987).
19. E. Niki, N. Noguchi, H. Tsuchihashi, and N. Gotoh, Interaction among vitamin C, vitamin E, and β -carotene, *Am. J. Clin. Nutr.*, **62**, 1322S-1326S (1995).
20. C. M. Sabliov, C. Fronczek, C. E. Astete, M. Khachatryan, L. Khachatryan, and C. Leonardi, Effects of temperature and UV Light on degradation of α -Tocopherol in free and dissolved form, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **86**, 895-902 (2009).