

비이온 계면활성제가 liposome의 안정도에 미치는 영향

강 학 회

(태평양기술연구소)

I. 서 론

liposome이란 특정한 양쪽성(amphiphile) 물질이 물에 분산되어 만들어지는 밀폐형의 이중막(bilayer) 구조를 말한다.^{1,2)} 지용성 부분인 꼬리를 한 개 갖는 일반 계면활성제의 경우는 수용성인 머리 부분이 물 쪽인 바깥으로 향하고 꼬리부분은 자신들끼리 모이는 특성으로 임계 미셀 농도(CMC) 이상에선 구형인 micelle을 형성하므로 bilayer를 형성하기 어려우나 꼬리가 둘인 인지질은 평면상에서 직사각형 형태로 회합하므로써 이중막의 vesicle을 만들게 된다.³⁾ 이러한 liposome은 생체막과 그 구조가 비슷하여 model membrane system 및 생리학적 물질의 전달 매개체 등으로서 많이 연구되고 있다.^{4,5)}

어떤 특성의 물질을 생체내로 전달시키는 데에는 그 물질과 생체막과의 구조적인 차이 등으로 인해, 그 자체만을 목적하는 곳까지 전달시키는 것은 매우 어렵다. 그러나 이를 생체막과 구조가 유사한 liposome에 포집시키면 생체내로의 전달은 훨씬 쉬워진다.⁶⁾ liposome내부에 포집시켜 응용하는 예로서는 효소, 당지질, 면역성 글로부린, monoclonal 항체 등의 생화학적 물질 뿐만 아니라 약제 특히, 부작용이 심한 항종양제, 항관절염제의 투약 등과 markers, 항생제, 이온, 백신 등이 있으며⁷⁾ 최근에는 의약품, 화장품 등에 있어서, 특정물질을 피부 내로 전달시키는 데에도 연구되고 있다.⁸⁾

이러한 liposome은 그 유용성에도 불구하고 다른 전달 기구에 비해 안정도가 매우 낮은 결점이 있다.⁹⁾ liposome의 안정도에 있어서 제조방법, 온도 변화, 전해질의 첨가, pH 변화 및 계면활성제의 표면 전하 등에 관한 연구는 많이 있으나¹⁰⁻¹³⁾, 비이온 계면활성제의 구조에 따른 영향에 관하여는 구체적인 연구가 이루어지지 않고 있다.¹⁴⁾ liposome의 안정도는 세가지 측면에서 고려할 수 있는데, 화학적 안정도와 물리적 안정도 그리고 미생물학적 안정도가 그것이다.¹⁵⁾

본 연구는 liposome의 물리적 안정도에 있어서, 입자 크기 및 흡광도 변화, 포집 물질의 release 등의 실험을 통해 비이온 활성제의 구조에 따른 영향을 살펴보고 cholesterol, fatty alcohol 등에 의한 안정화 정도에 관한 것이다.

II. 실험

2.1 시료 및 시약

사용한 인지질은 egg yolk로부터 추출한 L- α -phosphatidyl choline (PC, 60%)을 Sigma Co.에서 구입하여 정제하지 않고 그대로 사용하였고, 비이온 계면활성제로는 poly(oxyethylene)n cetyl ether(n=2, 5.5, 7, 15, 20, 30, 40 몰)를 Nikko Co.에서 commercial grade로 구입하여 그대로 사용하였다. 또한, 형광물질로는 CF(5(6)-carboxyfluorescein, Eastmann Kodak)를 정제하지 않고 사용하였고, Buffer 용액은 NaH_2PO_4 (Junsei Chemical Co., 99%) 및 Na_2HPO_4 (Junsei Chemical Co., 99%)를 사용, pH 7.0으로 만들어 사용하였다. liposome 안정화제로 cetyl alcohol (Tokyo Kasei, 99%) 및 cholesterol (Tokyo Kasei, 99%)을 사용하였다.

2.2 기기 및 장치

인지질의 MLV를 SUV로 전환시키기 위해 probe type의 초음파 장치 (Sonics & Material Inc., model VC250)를, 각 계면활성제의 surface tension을 측정하기 위해 고리법 (ring method)의 Fisher autotentiomat (model 215)을 사용하였고, liposome의 입자 크기 및 분포를 측정하는 데는 particle analyzer (Hiac/Royco, Nicomp370)를 사용하였다.

흡광도는 Hitachi Spectrophotometer (model 200-18)를 사용하였고, fluorescence는 Hitachi Fluorescence Spectrophotometer (model 204-s)를 사용하였으며, fluorescence release의 종말점 (end point)을 구하기 위하여 Silverson Homogenizer (model 18519)를 사용하였다. 이때 CF entrap liposome과 외상의 CF를 분리하기 위해 직경 3 cm, 높이 40 cm의 teflon cork glass column을 사용하였다.

또한, liposome의 시간 경과에 따른 안정도 변화 측정용 시료를 보관할 때 중력에 의한 creaming을 방지하기 위해 inverter를 자체 제작, 시료를 capped tube에 담아 3 rpm으로 회전시켰으며, SUV 용액으로부터 MLV와 probe로부터 떨어져 나온 미량의 titanium 가루를 제거하기 위해 Hettich Universal centrifuger (model 13967)를 사용하였다.

2.3 실험방법

1) 표면 장력 측정

전체 실험에서 사용한 물은 이온 교환수를 1회 증류하여 사용하였고, 사용한 계면활성제의 계면활성능력 등을 참고하기 위해 임계미셀 농도를 전후한 $9.53 \times 10^{-6} - 5.0 \times 10^{-2} \text{ mol/l}$ 사이의 계면활성제 용액을 제조하여 25℃에서 24시간 보관한 후 Pt-Ir ring을 사용 그 표면 장력을 측정하였다.

2) MLV 제조

일정량의 lecithin을 1,000ml round bottom flask내에서 hexane에 녹여 이를 rotary evaporator에서 1차 건조시키면서 레시친을 플라스크 벽에 얇은 막으로 고루 퍼지게 한 다음, 진공 상태에서 8시간 이상 방치하여 남아 있는 용매를 완전히 제거시킨다. 여기에 pH 7.0의 buffer 수용액을 가하고 잘 흔들어 MLV를 제조하였다. 이때 최종 레시친 함량은 2.0 wt%로 하며 cholesterol이나 fatty alcohol이 첨가되는 경우는 레시친과 함께 hexane에 녹인다.

3) SUV 제조

MLV를 probe type 초음파 장치에서 30분간 (50% pulse) 초음파 처리하여 최종 레시친 함량 2.0 wt%의 SUV를 얻은 후, 3,000 rpm으로 10분간 원심 분리하여 남아 있는 MLV와 probe로부터 떨어져 나온 titanium가루를 제거한다.

4) 입자 크기 및 흡광도 측정

MLV 용액에 계면활성제 용액을 넣고 초음파 처리하여 SUV를 제조하였다. 이를 24시간 후 Nicomp 370 Particle analyzer를 이용, 25℃에서 입자크기를 측정하고 보관 시료를 증류수로 1/4로 희석하여 Spectrophotometer로 750 - 350 nm사이에서 light scanning하여 absorbance를 측정한다.

5) 시간경과에 따른 입자 크기 측정

초음파 처리 후의 SUV 용액에 계면활성제 용액을 가해 1분간 일정 속도로 stirring하여 14개의 capped tube에 가득 채운 후 완전 밀봉시켜 30℃ inverter에 보관하면서 50일 간에 걸쳐 시간경과에 따른 입자 크기 변화를 측정하였다. 이 경우도 최종 레시친 함량은 2.0 wt%가 되게 하였다.

6) CF Release 측정

대개의 형광 물질은 ppm단위의 농도만으로도 감지가 쉽게되는 장점을 가지고 있다.

liposome 내에 포집된 물질이 외상으로 release 되어 나오는 정도를 측정하고자할 때, liposome 내의 형광 물질은 형광을 띄지 않아야 외상으로 release 된 형광 물질의 농도를 측정할 수 있다. 이러한 특성을 갖는 대표적 물질로 CF (carboxyfluorescein)가 있는데 이는 본 실험에서 측정된 그림 1에 나타난 바와 같이 3.2×10^{-4} mol/l 이상의 농도에선 형광을 띄지 않는 FSQ (fluorescence self quenching) 특성¹⁶⁾을 갖는다.

따라서 liposome에 CF를 고농도로 포집한 후 외상의 free CF를 제거시키므로써 liposome으로부터 release 되는 CF량을 측정할 수 있다.

먼저 CF 8.0×10^{-3} mol/l가 되도록 pH 7.0 Buffer 용액에 평량하여 stirring 하면서 NaOH (1%)를 서서히 첨가하여 CF를 완전히 녹이고 최종 pH는 7.0이 되도록 한다. 이 CF 용액을 레시친과 함께 100ml beaker에 평량하여 Silverson homogenizer로 30분간 homogenizing하므로써 최종 레시친 함량 4.0 wt%, CF 함량 5.3×10^{-3} mol/l인 MLV 용액을 제조한다.

MLV에 entrap 되지 않은 외상의 free CF를 제거하기 위해 Sephadex G-75 gel column을 사용하였으며 구입한 Sephadex G-75는 90-95°C로 7시간 정도 가열하여 swelling 시킨 후 column에 충전하였다. 이 column에 pH 7.0의 buffer 용액을 충분히 통과 시킨 다음 MLV 1ml을 넣고, 다시 buffer 용액을 통과시키면서 용액중에 녹아 있는 CF를 분리하였다. 분리된 최초의 2ml를 취해 미리 37-38°C로 가열되어 있는 149ml의 buffer 용액에 넣고 stirring하면서 60분간 시료를 취해 Fluorescence Spectrophotometer에서 fluorescence를 측정하였다. 여기서 excitation wave length는 최대값인 485nm이며 emission wave length는 최대값인 515nm이다.

III. 결과 및 고찰

1. 비이온 계면활성제의 특성

본 실험에 사용한 비이온 계면활성제 polyoxyethylene cetyl ether의 물성을 알기 위해 표면 장력을 측정된 결과를 부록 I에 나타내었다.

2. 순수 liposome의 안정도

비이온 계면활성제나 기타 첨가제를 넣지 않은 liposome 자체의 안정성을 살피기 위해 입자 크기 및 광학 밀도 변화를 시간별로 측정하였다.

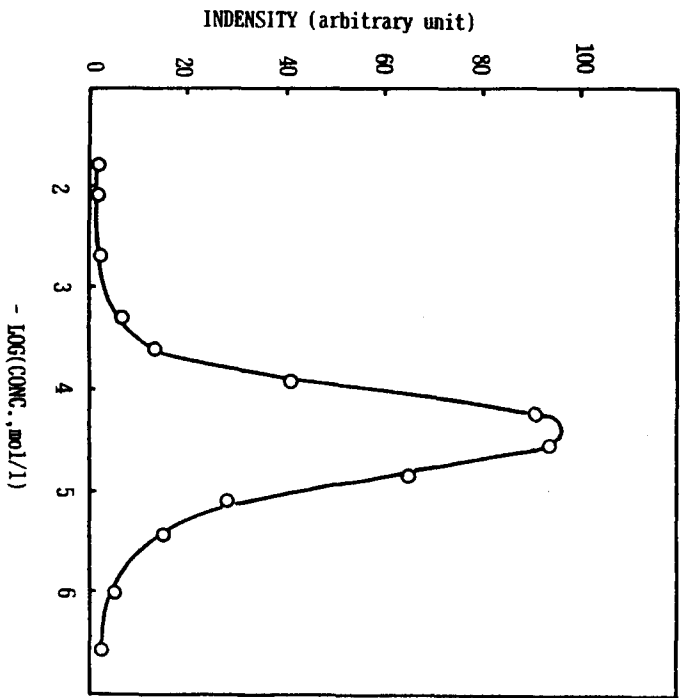


Figure 1. Relative fluorescence of aqueous carboxyfluorescein solution with changing concentration at 25°C, pH = 7.0, 1cm path length cell.

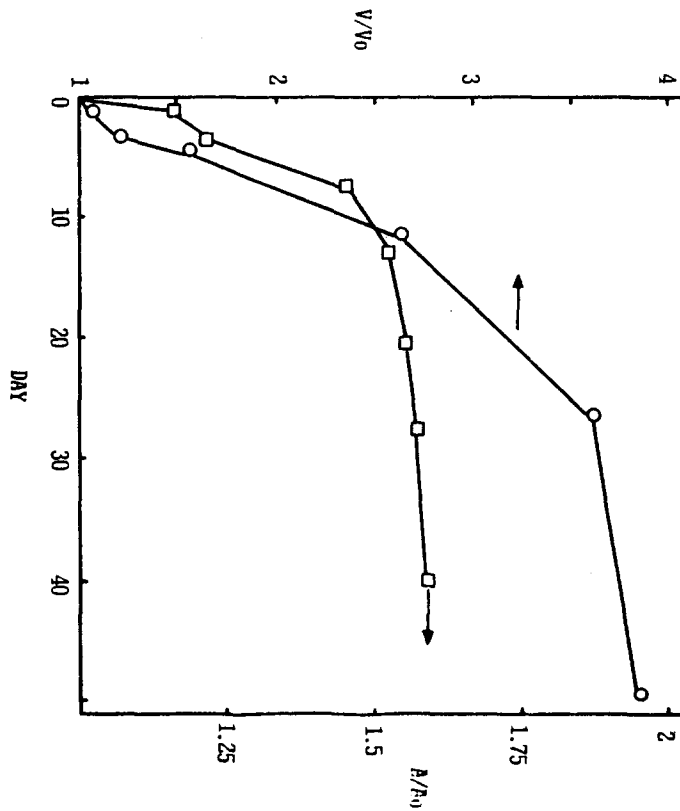


Figure 2. Changes of particle size and absorbance of liposome in time without additives (lecithin = 2.0 wt%).
 $V_0 = 4\pi/3(30.3 \text{ nm})^3$.

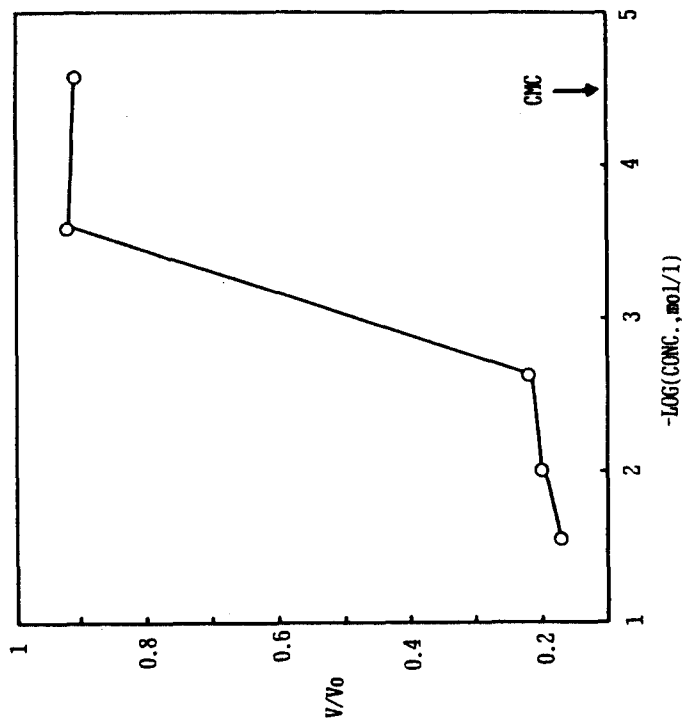


Figure 3. Effects of EO₁₅ concentration on the liposome size at 25°C. sonicated with surfactant.

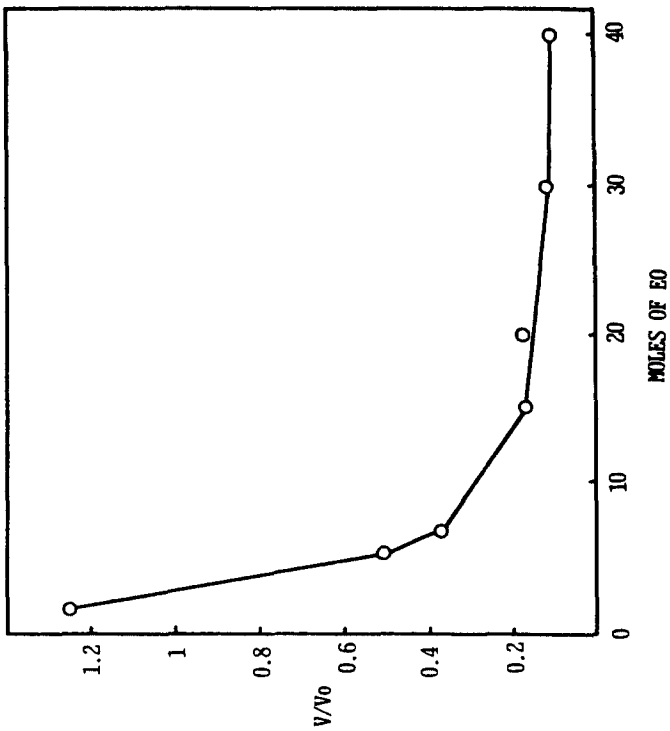


Figure 4. Effects of EO moles on the liposome size at 25°C. Sonicated with surfactants (0.025 mol/l).

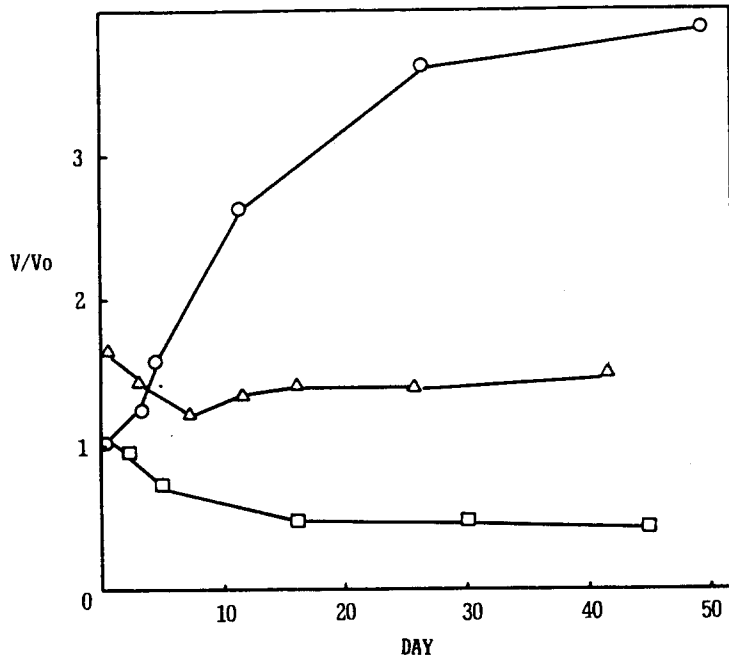


Figure 5. Effects of EO moles on the liposome size with time incubated at 30°C. Adding surfactant after sonication.

○:liposome alone △:with cholesterol+EO₁₅

□:with EO₁₅

EO₁₅ =0.025 (mol/l), cholesterol =3 x 10⁻⁴ (mol/l).

SUV의 경우 그 크기가 대개 20 - 60 nm 정도로 광학 현미경으로 측정기는 곤란하며 본 실험에서는 DLS 원리를 이용한 Nicomp 370에 의해 submicron의 입자 크기를 측정하였다.

그림 2는 순수 liposome의 안정성을 SUV제조 12시간 후부터 50일 간에 걸쳐서 입자 크기와 흡광도의 변화를 나타낸 것으로 liposome의 크기와 흡광도는 시간이 경과함에 따라 증가하고 있다. 이는 liposome이 만들어지면서 레시친과 물사이의 표면 자유 에너지가 증가하고 그로 인해 열역학적 불안정성을 가지고 있는 liposome은 그 표면 자유 에너지를 줄이기 위해 보다 큰 입자로 coalescence되기 때문이다. 또한 입자가 커짐에 따른 탁도 증가로 흡광도가 증가하며 이 두 실험 결과는 비교적 잘 일치하였다.

3. liposome의 안정도에 미치는 영향

3.1 입자 크기 변화

liposome의 계면 활성제에 대한 안정성을 그림 3에 나타내었다. EO₁₅ (ethylene oxide 15mole)를 넣고 SUV를 제조, 24시간 방치한 뒤 입자 크기를 측정함으로써 여기서 V₀란 계면 활성제가 첨가되지 않은 순수 liposome (lecithin 2.0wt%)의 크기이다. 그림에서 보면 계면 활성제의 농도 증가에 따라 liposome의 크기가 점차 감소하며 특히 $3.2 \times 10^{-4} - 3.2 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$ 사이에서 입자 크기의 급격한 변화를 보이고 있다.

표 I-1에서 EO₁₅의 CMC 농도는 ($2.24 \times 10^{-6} \text{ mol/l}$)임을 보여주고 있다. 즉, CMC 이상의 농도가 되면서 크기가 급격히 변하고 있는데 이는 CMC 이상의 농도에서 liposome 내의 레시틴과 계면활성제가 mixed bilayer를 형성하거나 레시틴이 가용화되어 그 크기가 작아지는 것으로 예측된다.

그림 4는 계면 활성제의 CMC 이상의 농도인 0.025 mol/l에서 EO mole 수 변화에 따른 liposome의 크기를 나타낸 것이다. 2 mole의 경우 계면활성 능력은 거의 나타나지 않으며 오히려 계면 활성제의 수용해성 부족으로 자신의 크기가 나타나 있음을 보인다. 그러나 5.5 mole 이상의 경우 입자 크기는 exponential curve로 작아짐을 나타내고 있다.

여기서 2mole의 경우는 HLB 값 (4.0)이 너무 낮아 liposome이 증막에서의 작용이 매우 약하나 적정 HLB(8-18) 구간에서 mixed layer나 가용화가 잘 일어나고 있음을 알 수 있다.

그림 5는 EO몰 수 별로 시간 경과에 따른 liposome의 입자 크기를 측정함으로써 이 SUV를 제조하고, 여기에 계면 활성제를 첨가하여 12시간이 지난 후부터 50일간에 걸쳐 측정하는 것이다. 여기서 V₀는 계면활성제가 첨가되지 않았을 때의 t₀값으로 이 경우에는 시간 경과에 따라 그 입자가 점차 커지고 있다. 그러나 계면 활성제가 첨가되면 시간 경과에 따라 서서히 mixed layer를 형성하거나 레시틴의 부분 가용화가 일어나 결국 입자가 작아지고 있으며 2 mole의 경우는 가용화능 부족으로 거의 가용화를 일으키지 못하고 있음을 보인다. 또한, cholesterol이 첨가되면서 liposome의 안정도는 크게 좋아짐을 보이고 있다.

3.2 CF Release

지금까지 실험한 것은 계면 활성제나 첨가제에 의한 입자 크기 및 흡광도 변화를 실험하였으나 실제 liposome 이중막 자체의 안정성을 예측하는 쉽지 않았다.

여기 FSQ 특성을 갖는 CF를 포집 (entrap)시켜 내상으로부터 외상으로의 CF release를 fluorescence spectrophotometer로 측정하여 그림 6에 나타내었다.

그림에서 순수 liposome의 경우는 40분 정도 경과 시 약 64% 정도의 CF가 release되었으나 EO_{5.5}나 EO₁₅가 첨가된 경우는 93% 정도가 release되었다. 즉 계면 활성제가 liposome에 첨가되면서 liposome내의 레시친을 일부 가용화시키거나 또는 mixed layer를 형성함으로써 이중막을 flexible하게 하여 CF의 release를 촉진시키는 것으로 예측된다.

그러나 그림 7에 나타난 것처럼 첨가제 (cetyl alcohol 및 cholesterol)를 넣은 경우는 그 release가 상당히 줄어들어 들어 포집된 CF의 안정화에 크게 기여하고 있음을 보여주고 있으며 특히 cholesterol과 cetyl alcohol을 혼합 사용할 때의 안정도가 가장 좋았

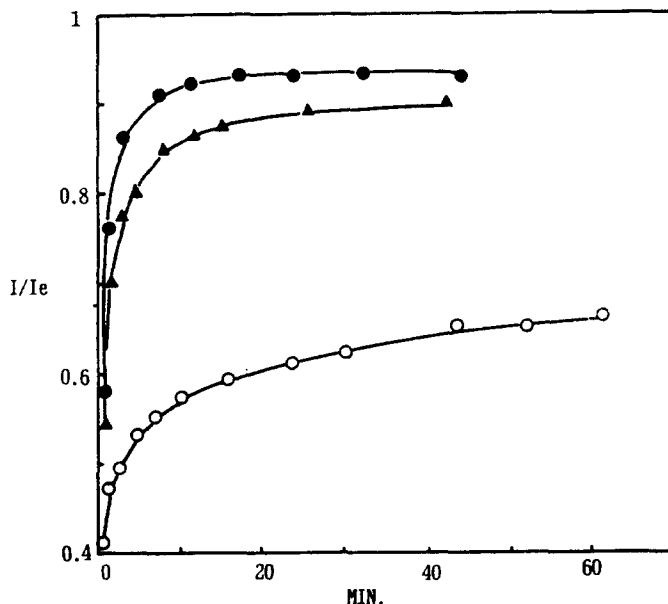


Figure 6. Effects of surfactants on CF release at 37°C. Ie = fluorescence intensity at end point.

○: CF entrapped liposome alone
 ▲: EO_{5.5} ●: EO₁₅

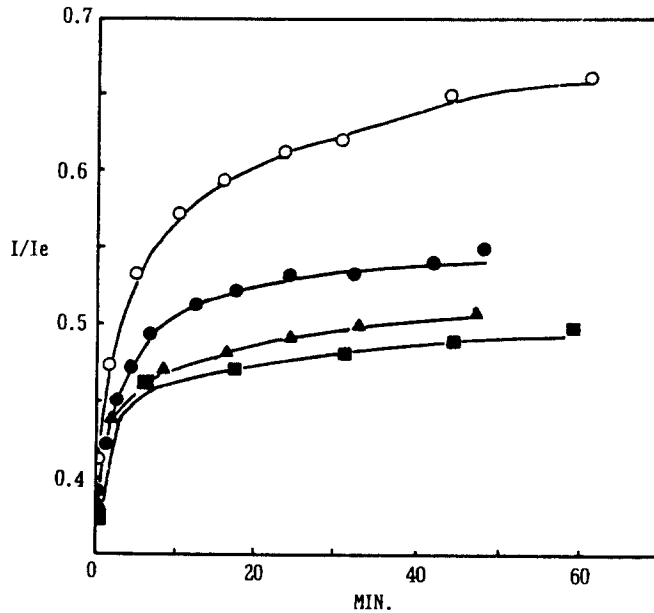


Figure 7. Effects of cholesterol and cetyl alcohol without $C_{16}EO_{15}$ on CF release at $37^{\circ}C$. (lecithin/additives = 0.8/0.2).

- :CF entrapped liposome alone
- :with cetyl alcohol ▲: with cholesterol
- :mixture (1:1)

다. 이는 liposome 에 fatty alcohol 이나 cholesterol 이 첨가되면서 레시틴과 첨가제가 보다 조밀한 구조로 배열됨으로써 이중막을 tight 하게 하여 liposome 의 구조 변화에 대한 저항이 커지기 때문인 것으로 여겨진다.

여기서 알 수 있듯이 cholesterol 이나 fatty alcohol 같은 적당한 안정화제를 혼합 사용하므로써 비이온 계면활성제계에서도 liposome 을 안정화 시킬 수 있음을 알 수 있다.

IV. 결 론

비이온 계면활성제 polyoxyethylene cetyl ether 가 egg yolk lecithin 으로 만들어진 liposome 의 물리적 안정도에 미치는 영향과 그 안정화를 조사하기 위해 초음파 분쇄로 제조된 SUV 입자의 크기와 흡광도를 측정하고 MLV 에 포집된 CF release 를 측정하였다.

순수 liposome 은 입자 크기와 흡광도가 시간에 따라 증가하였으나 계면 활성제를 첨가하고 제조한 SUV는 계면활성제의 농도나 EO몰 수의 증가에 따라 입자 크기와 흡광도가 감소했으며 초음파 분쇄 후의 SUV에 계면활성제를 넣은 경우도 시간경과에 따라 입자 크기와 흡광도가 감소했다.

CF를 포집한 liposome 은 시간이 지나면서 내상의 CF가 release 되나 계면 활성제가 첨가되면 훨씬 빨리 release 되었다.

그러나 cholesterol 이나 fatty alcohol 을 liposome 에 첨가함으로써 입자크기와 흡광도의 변화도 적어지고 CF release 도 크게 막을 수 있었으며 특히 cholesterol 과 fatty alcohol 을 함께 사용할 때가 안정화에 가장 좋았다.

이는 liposome 자체는 그 표면 자유 에너지를 줄이기 위해 입자간에 합체됨으로써 입자와 흡광도는 증가하나, 계면활성제가 첨가되면서 liposome 이중막내의 레시틴 일부를 가용화하거나 mixed layer 를 형성하므로써 그 크기가 작아지고 흡광도도 낮아지는 것으로 여겨진다. 그러나 cholesterol 이나 fatty alcohol 은 이중막내에 조밀하게 배열되어 liposome 을 tight 하게 하므로써 안정화에 기여하는 것으로 예측된다.

V. REFERENCE

- 1) Bangham, A.D., in LIPOSOME, ed. by Ostro, Marcel Dekker, p. 13, N.Y. (1983).
- 2) Mysels, K.J., J. Gen. Physiol., s52s, 113 (1968).
- 3) J.H. Fendler, in MEMBRANE MIMETIC CHEMISTRY, p. 113, John Wiley & Sons, N.Y. (1982).
- 4) Teitel, B.A., Arch. Roum. Path. Exp. Mic., 14, 58, (1945-47).
- 5) Stokenius, W., J. Biophys. Biochem. Cytol., s5s, 491 (1959).
- 6) Atthur A. Sicilliano, Cosmetics & Toiletries, s100s, 43 (1985).
- 7) Gregoriadis, G., in LIPOSOME IN BIOLOGICAL SYSTEMS, ed. by Gregoriadis and Allison, p. 25, John Wiley & Sons, Chichester, (1980).
- 8) M. Tagawa, K. Shinozaki, Y. Kurata, 14th IFSCC Congress, Barcelona, s1s, 395 (1986).
- 9) Weissmann, G. and Finkelstein, M., in LIPOSOME IN BIOLOGICAL SYSTEM, ed. by Gregoriadis, p. 153, John Wiley & Sons, (1980).
- 10) Tin, P.S. Wu, T.Y. Shen, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, s78s, 6211 (1981).

- 11) A.L. Larrabee, *Biochemistry*, s18s, 332 (1979).
- 12) L.S.S. Guo, R.L. Hamilton, J. Goerke, *J. Lipid Research*, s21s, 993 (1980).
- 13) S.E. Schullery, C.F. Schmidt, P. Fendler, *Biochemistry*, s19s, 3919 (1980).
- 14) M. Sila, S. Au and N. Weiner, *Biochim. Biophys. Acta*, s859s, 195 (1986).
- 15) Linter, C.J., in *REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCE*, 15th ed., Mack Pub., Easton, Pa., (1975).
- 16) John N. Weistein, in *LIPOSOME TECHNOLOGY* Vol. 3, ed. by Gregoriadis, Ch. 13, CRC Press, Florida, (1983).
- 17) J.E. Carless, R.A. Challis and B.A. Mulley, *J. Colloid Science*, 19, 201 (1964).

VI. 부 록

1. 표면 장력 측정

본 실험에 사용한 비이온 계면활성제 polyoxyethylene cetyl ether의 물성을 알기 위해 표면 장력을 측정한 결과는 그림 I-1과 같다. 여기서 친수성 부분인 EO(ethylene oxide)mole 수가 많아질수록 CMC 값과 표면 장력이 증가하고 있다. 표 I-1은 이들 계면활성제의 물성치를 나타낸 것으로 γ 는 표면 장력(dyne/cm)을, C는 계면활성제의 농도(mol/l)를 나타낸 것이다.

그러나 CMC 값이 낮고 계면에서의 흡착량이 많다고 해서 반드시 계면 활성능력이 큰 것으로 기대하기는 어렵고 CMC 이상의 농도에서 충분한 계면 활성 능력을 갖기 위해서는 HLB(hydrophilic lipophilic balance)도 적당해야 할 것이다.

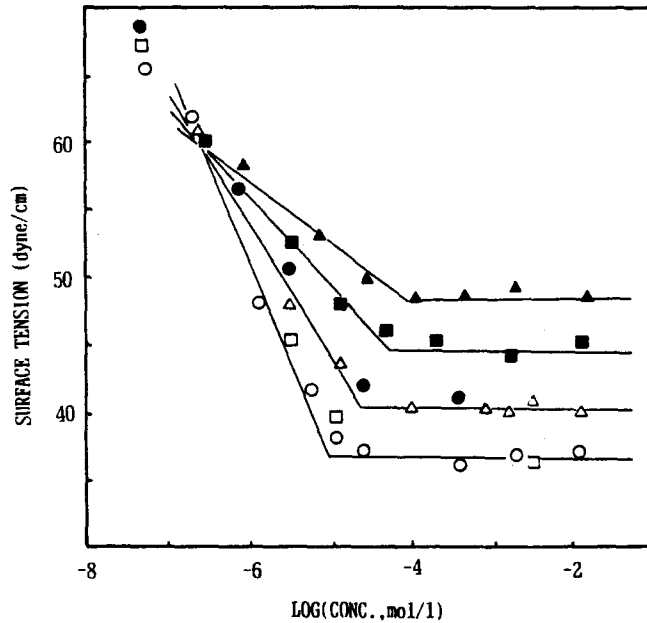


Figure I-1. Surface tension vs log concentration curves of aqueous $G_{16}EOn$ solution by ring method at $25^{\circ}C$.

- | | |
|-----------------------|----------------------|
| ○ : EO _{5.5} | □ : EO ₇ |
| △ : EO ₁₅ | ● : EO ₂₀ |
| ■ : EO ₃₀ | ▲ : EO ₄₀ |

Table I-1. Properties of Air-Water-C₁₂EO_n Interface at 25 °C.

Property EO _n	CMC x 10 ⁶ (mol/l)	γ_{cmc} (dyne/cm)	G x 10 ¹⁰ (mol/cm ²)	HLB
2	-	-	-	4.0
5.5	8.9	36.0	7.14	8.0
7	11	36.5	6.27	11.5
15	22	40.0	4.29	15.5
20	28	41.0	3.94	17.0
30	39	45.0	2.88	19.5
40	63	48.3	1.80	20.0