

## 리포솜 지질막의 성질에 미치는 지질 조성의 영향

김민# · 한석규 · 김종국\*  
부산대학교 약학대학, \*서울대학교 약학대학  
(Received January 29, 1994)

### Effects of Lipid Composition on the Properties of Phospholipid Liposomal Membranes

Min Kim#, Suk Kyu Han and Chong-Kook Kim\*  
College of Pharmacy, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea  
\*College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

**Abstract**—Calcein-encapsulated small unilamellar vesicles of various lipid composition were prepared using the sonication technique, and their stabilities at 20°C were examined by measuring calcein leakage from the liposomes. The fluidity of these liposomal bilayers was also investigated by measuring the fluorescence polarization of DPH labelled into the liposomes. The results showed that liposomes made of PC mixtures with different acyl chain length were very stable, which may be due to the formation of interdigitated bilayer structure. The addition of cholesterol further stabilized these PC liposomes. However, addition of cholesterol reduced the encapsulation efficiencies of liposomes. The fluidity of the liposomes was significantly decreased by cholesterol in the liquid crystalline state, but not changed in the gel state. These results suggest that the enhanced stability of PC mixture liposomes may be ascribed to the formation of stable interdigitated bilayer structure. In membrane-mimetic and drug-delivery studies, vesicles made of mixtures of various phospholipids are recommended instead of addition of cholesterol to the phospholipid.

**Keywords** □ Stability of liposome, calcein, fluorescence self-quenching method, fluidity, fluorescence polarization method, interdigitated bilayer structure.

리포솜을 생체막 모형물질이나 약물수송체로서 응용하는 연구가 활발하다. 이러한 응용에서 일어나는 문제중의 하나는 리포솜의 낮은 안정성이라 할 수 있다.<sup>1)</sup> 리포솜에 약물을 봉입하여 제제로 하였을 때 리포솜 지질막은 barrier로서의 기능은 강하지 못하여 약물이 쉽게 빠져 나올 수 있으며,<sup>2)</sup> 리포솜끼리 aggregation을 일으켜 리포솜이 파괴되고 내용물이 방출되기도 한다.<sup>3)</sup> 또한 봉입한 약물이 리포솜의 안정도에 영향을 미치게 된다. 따라서 리포솜 제제는 shelf-life가 충분히 길지 못한 경우가 많다. 또한 생체에 리포솜에 봉입된 약물을 주입하였을 때 생체내 물질과 접촉에 의하여 목적하는 조직이나 기관에 약물이 도

달하기 전에 리포솜이 파괴되는 것이 문제가 된다.<sup>4,5)</sup> 이러한 리포솜의 안정도를 높이기 위하여는 polymerized liposome을 사용하여 리포솜 지질막의 기계적 강도를 부여하기도 하나 일반적으로 인지질을 콜레스테롤을 가하거나<sup>6)</sup> egg lecithin과 같은 혼합 인지질을 사용하는 것이 보통이다.<sup>7,8)</sup> 이러한 리포솜의 안정도는 사용한 지질의 조성, 제조방법, 형태 및 크기에 따라 크게 영향을 받는다. 이러한 중요성에도 불구하고 지질 조성이 리포솜의 안정성에 미치는 영향에 대한 보다 체계적인 연구는 아직 충분하지 않은 실정이다.

본 연구에서는 길이가 다른 포화 acyl 사슬을 가진 여러 가지 인지질과 콜레스테롤을 가하여 만든 리포

#본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

숨을 사용하여 이들의 안정성과 지질조성의 관계를 규명하였다. 또한 이들 인지질로 만든 리포솜 지질막의 유동성을 측정하여 안정도에 미치는 유동성의 영향을 조사하였다. 안정성의 측정 방법으로는 형광의 자체소광을 일으키는 수용성 calcein을 probe로 하여 리포솜에 봉입한 후 리포솜에서부터 유출되어 나오는 calcein의 형광을 측정하여 그 안정도를 구하였다.<sup>9,10)</sup> 또한 리포솜 지질막의 유동성을 측정하기 위해 리포솜의 지질막에 형광 probe로 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene을 labeling시킨 후에 fluorescence polarization을 측정하여 지질막의 유동성을 측정하였다. 이러한 fluorescence polarization의 온도에 대한 변화를 그린 곡선의 변곡점으로 부터 지질막의 상전이 온도를 구하였다.<sup>11,12)</sup>

### 실험방법

**시약 및 기기**—형광 probe인 calcein은 Sigma Chemical Co.(미국)에서 구입하였으며, 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene(DPH)은 Molecular Probes(미국)에서 구입하였다. 사용한 인지질인 dioctanoyl phosphatidylcholine (DOPC), didecanoyl phosphatidylcholine (DDPC), dilauryl phosphatidylcholine (DLPC), dimyristoyl phosphatidylcholine (DMPC), dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC), distearoyl phosphatidylcholine (DSPC), egg phosphatidylcholine (egg PC), dipalmitoyl phosphatidylethanolamine (DPPE), dipalmitoyl phosphatidylglycerol (DPPG) 및 dipalmitoyl phosphatidic acid (DPPA) 등도 Sigma Chemical Co.에서 구입하였다. 콜레스테롤과 Sephadex G-50도 역시 Sigma Chemical Co.에서 구입하였으며 Triton X-100은 Fluka(스위스)에서 구입하였다. Tris buffer (pH 7.4)는 Tris(hydroxymethyl)aminomethane을 Wako Co.(일본)에서 구입하여 삼차중류수에 녹여서 만들었다. 기타 모든 시약은 순정품을 시중에서 구하여 사용하였다.

형광 분석기로는 Perkin Elmer 사의 spectrofluorometer LS-5 모델을 사용하였고 흡광 광도계는 Varian사의 UV and visible spectrophotometer DMS-90 모델을 사용하였다. 초음파 분쇄기로는 Ultrasonic사의 Ultrasonicator 4522 제품을 사용하였다.

**리포솜의 제조**—Egg PC, DOPC, DDPC, DLPC, DMPC, DPPC, DSPC, DPPE, 그리고 DPPG와 같은 인지질을 단독 혹은 혼합물로, 또는 이들 인지질에 일정량의 콜레스테롤을 가한 뒤, 그 일정량을 클로로포름·메탄올의 혼합액에 녹여서 20 ml의 가지형 플라스크에 넣은 다음 회전식 감압농축기상에서 지질의 상전이 온도 이상을 유지하면서 감압 증발시켜 플라스크의 하저부에 얇은 지질막을 만들었다. 이것을 진공하에서 하룻 동안 방치하여 남아 있는 용매를 모두 날려 보내고 10 mM의 Tris buffer를 가하거나 (유동성 측정용), 50 mM의 calcein이 녹아 있는 Tris buffer를 가하여(안정도 측정용) batch형 sonicator상에서 지질막이 모두 떨어질 때까지 수화시켰다. 현탁액 중의 지질의 농도는 20 mM로 조절하였다. 안정된 small unilamellar vesicle(SUV)을 만들기 위하여 이 현탁액을 titanium tip sonicator를 사용하여 20분간 초음파 분쇄를 행하는데 온도 상승을 막기 위하여 ice-bath를 사용하였다. 현탁액 중에 섞여 있는 titanium 잔사는 원심 분리하여 제거한 뒤 유동성 측정용으로 사용하였다. 안정성 측정시에는 리포솜내에 들어가지 않은 calcein을 초음파 분쇄가 끝난 현탁액을 Sephadex G-50이 들어있는 1×35 cm의 칼럼을 통과시켜 제거하였으며, 이 때 이동상으로서 10 mM의 Tris buffer를 사용하였다. 분리가 끝나면 calcein이 봉입된 리포솜의 지질 농도를 PC의 정량법인 Stewart 방법<sup>13)</sup>에 따라 측정하였다.

**리포솜의 안정성 및 봉입율의 측정**—30 μM의 calcein이 봉입된 리포솜을 20±0.5°C에서 방치하면서 시간에 따라 유출되는 calcein의 형광을 측정하여 calcein의 leakage %를 산출하여 리포솜의 안정성을 조사하였다(excitation 파장은 482 nm, emission 파장은 512 nm). Calcein leakage는 아래의 식에 의해 계산하였다.

$$\text{Calcein Leakage \%} = [(F - F_T) / (F_0 - F_T)] \times 100 \quad (1)$$

여기서  $F_0$ 는 calcein을 봉입한 리포솜의 초기 형광 세기이며,  $F$ 는 일정시간 경과 후의 형광 세기, 그리고  $F_T$ 는 Triton X-100을 가하여 리포솜을 완전히 파괴시켰을 때의 형광 세기이다. 리포솜에 봉입된 calcein의 양은 리포솜 파괴시 유리되는 calcein을 최대 흡광 파장인 482 nm에서의 흡광도를 측정하여 검량

선과 비교함으로써 농도를 결정하거나 유리되는 calcein의 형광을 512 nm에서 측정하여 계산하였다.

**지질막 유동성의 측정** - 리포솜 지질막의 유동성의 측정은 fluorescence polarization 측정 방법을 사용하였으며 다음과 같이 행하였다. 0.4 mM의 지질의 리포솜액에 DPH의 tetrahydrofuran stock solution을 사용하여 DPH의 최종 농도가 1 μM되게 가한 뒤, 암소에서 10분간 incubation한 후 형광을 측정했다. 이 실험은 향온이 유지되는 cell holder와 polarimeter를 갖춘 형광 광도계로 행하였으며, DPH의 excitation excitation 파장은 358 nm로, emission 파장은 430 nm로 하였다. Fluorescence polarization 값은 측정된 형광을 다음 (2)식을 사용하여 계산하였다.

$$P = \frac{(I_v)_v - (I_h)_v G}{(I_v)_v + (I_h)_v G} \quad (2)$$

여기서  $(I_v)_v$ 는 polarizer와 analyzer가 수직으로 위치할 때 측정된 형광의 세기이며,  $(I_h)_v$ 는 polarizer가 수직이면서 analyzer가 수평으로 위치할 때의 형광의 세기이다. G는 수직과 수평으로 편광된 빛에 대한 monochromator의 투과 효율을 나타내는 grating correction factor로서  $(I_v)_h / (I_h)_h$ 이다.  $(I_v)_h$ 는 polarizer가 수평이면서, analyzer가 수직으로 위치할 때의 형광의 세기를 나타내며,  $(I_h)_h$ 는 polarizer와 analyzer가 수평으로 위치할 때의 형광의 세기이다.

**결과 및 고찰**

**지질 조성에 따른 리포솜의 안정성** - 친수성 구조인 head group이 다른 여러 가지 인지질 즉, phosphatidylcholine(PC), phosphatidic acid(PA), phosphatidylethanolamine(PE)과 phosphatidylglycerol(PG)계 인지질로 리포솜을 만들고 여기에 calcein을 봉입시켜 빠져 나오는 calcein의 형광을 측정하여 그 안정도를 측정하였다. 그 결과는 PC계 이외의 인지질인 PA, PG, PE 등은 단독으로는 calcein이 봉입된 안정한 리포솜을 형성하지 않았다. 반면에 PC계 인지질에서는 acyl 사슬 길이에 따라 단독으로도 calcein이 봉입된 리포솜을 만들 수 있었다. PC계 인지질로 만든 리포솜의 상온에서의 안정도를 측정된 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 그 결과는 PC계 인지질 중에서도 탄

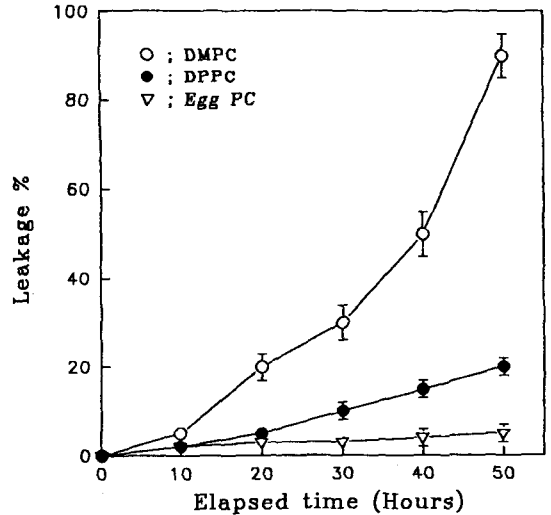


Fig. 1 - Stability of PC liposomes prepared in 50 mM calcein at 20°C. (n=4) The concentration of phospholipids was 30 μM.

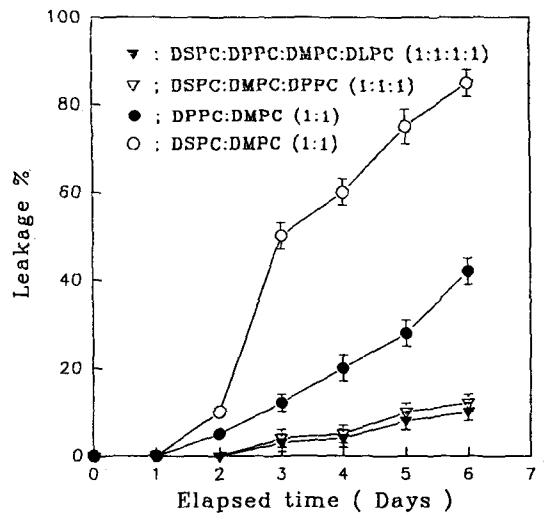
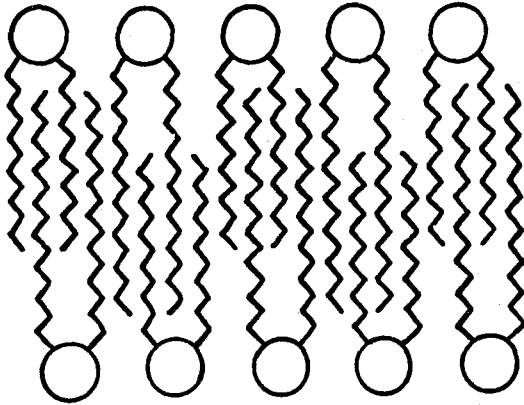


Fig. 2 - Stability of PC mixture liposomes prepared in 50 mM calcein at 20°C. (n=4) The concentration of total phospholipids was 30 μM.

소수가 12이하로 acyl 사슬의 길이가 너무 짧은 DOPC, DDPC와 DLPC 등은 리포솜이 만들어지지 않거나 리포솜이 너무 불안정하여 분리과정 중 calcein이 모두 유출되어 calcein이 봉입된 리포솜을 얻을 수 없었다. 한편 acyl 사슬의 탄소수가 18인 소수성이



Scheme 1—Interdigitated bilayer structure of PC liposomes.

큰 DSPC의 경우에도 리포솜이 형성되지 않았다. 그러나 친수성과 소수성이 이들의 중간인 acyl 사슬의 탄소수가 14와 16인 DMPC와 DPPC, 그리고 여러 종류의 PC의 혼합물인 egg PC의 경우에는 calcein이 봉입된 리포솜이 만들어졌다. 그러나 acyl 사슬이 비교적 짧은 DMPC로 만든 리포솜은 대단히 불안정하였으며, DPPC로 만든 리포솜은 다소 안정하였고 여러 PC의 혼합물인 egg PC로 만든 리포솜은 매우 안정하였다. PC계 인지질을 몇 가지씩 혼합하여 calcein을 봉입한 리포솜을 만들고, 그 안정도를 측정한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 그 결과는 PC를 혼합할 때 리포솜의 안정도는 크게 증가하였으며, 이렇게 만든 리포솜의 안정도의 순서는(DSPC+DMPC), (DPPC+DMPC), (DSPC+DPPC+DMPC), (DSPC+DPPC+DMPC+DLPC)의 순으로 향상되었다. DSPC 단독으로는 실험 조건하에서 리포솜이 만들어지지 않았으나 DSPC에 다른 acyl 사슬 길이가 짧은 PC계 인지질을 가하였을 때는 calcein을 봉입한 안정한 리포솜이 만들어졌다. 그러나 DSPC에 acyl 사슬의 길이가 너무 짧은 DOPC나 DDPC를 가해 주었을 때에는 리포솜은 불안정하여 calcein이 봉입되지 않았다. 또한 DSPC에 소수성이 비교적 큰 DPPC만을 가했을 때에는 리포솜이 만들어 지지 않았다. DSPC에 DPPC와 DMPC를 1:1:1의 비율로 혼합하였을 때는 매우 안정한 리포솜이 만들어 졌으며 여기에 DLPC를 더 가하여도 실험한 시간 범위내에서는 유의한 차이가 나타나지 않았다.

이상의 결과에서 PC계 이외의 인지질인 PA, PG,

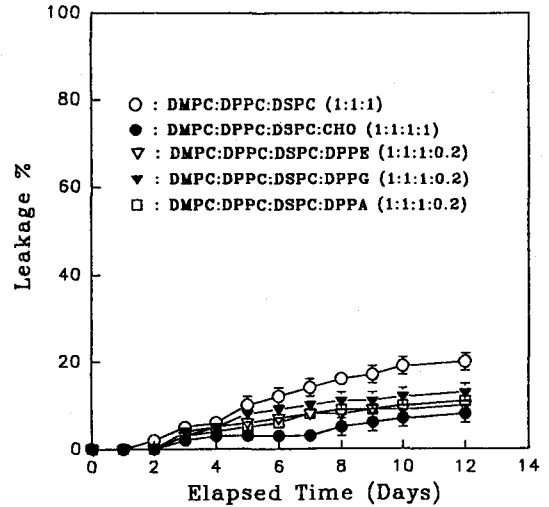


Fig. 3—Stability of PC mixture liposomes prepared in 50 mM calcein at 20°C. (n=4) The concentration of total phospholipids was 30  $\mu$ M.

PE 등은 단독으로 안정한 리포솜이 만들어지지 않음을 보아 안정한 리포솜이 만들어지기 위하여는 인지질의 구조에서 tail인 소수성인 acyl 사슬의 길이와 친수성 head group의 크기 및 전기적 하전 사이의 balance가 중요한 인자임을 알 수 있었다. PC계 인지질은 단독으로 리포솜을 만들 때에는 acyl 사슬의 길이가 너무 짧은 것은 안정한 리포솜을 만들 수 없었으며, acyl 사슬의 길이가 길수록 안정한 리포솜이 만들어지나 사슬의 길이가 너무 길어 소수성이 너무 크면 단독으로 리포솜이 만들어지지 않고 여기에 사슬 길이가 적은 다른 인지질을 혼합할 경우에는 비교적 안정한 리포솜이 만들어지나 사슬 길이가 너무 적은 인지질은 오히려 안정한 리포솜의 형성을 방해함을 알았다. 이러한 결과도 tail과 head group사이의 balance가 안정한 리포솜의 제조에 결정적인 인자임을 암시하여 준다. 또한, 혼합한 인지질은 안정한 리포솜을 만들었으며 그 종류를 많이할 수록 안정도는 증가함을 알 수 있었다. 이는 이들 인지질을 섞었을 때 void가 적은 interdigitated bilayer 구조(Scheme 1)를 만들어 그 기계적 강도가 커져서 barrier로서의 기능이 향상되는데 기인한다고 생각된다.<sup>14)</sup> PC 혼합물로 리포솜을 만들 때 첨가하는 인지질의 acyl 사슬의 길이가 너무 짧으면 리포솜의 안정도가 오히려 저해되는 것은 이들 인지질의 계면활성 능력에 의한

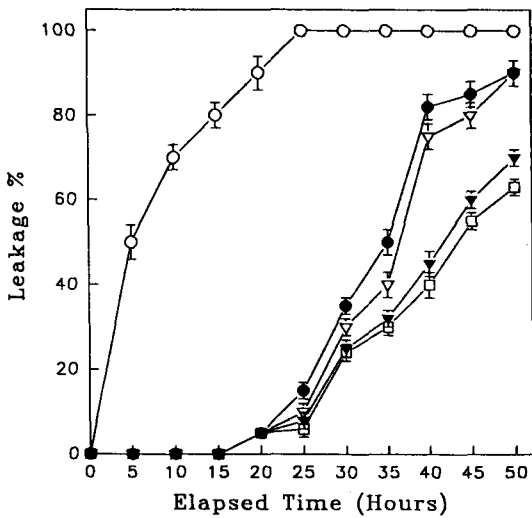


Fig. 4—Effects of cholesterol on the stability of DMPC liposomes at 20°C. (n=4) The concentration of phospholipid was 30 μM.

○: DMPC, ●: DMPC+5 mol% cholesterol, △: DMPC+10 mol% cholesterol, ▼: DMPC+30 mol% cholesterol □: DMPC+50 mol% cholesterol

작용의 가능성을 배제할 수는 없다. 이는 계면활성이 있는 lysolecithin이 리포솜을 파괴하는 작용이 있다는 보고와도 일치한다.<sup>15)</sup>

이렇게 하여 얻어진 비교적 안정한(DSPC+DPPC+DMPC) 리포솜의 안정도를 더욱 증가시키기 위하여 콜레스테롤과 head group이 다른 인지질인 DPPE, DPPG, DPPA를 첨가하여 같은 방법으로 안정도를 측정하여 그 결과를 Fig. 3에 나타내었으며 여기서 콜레스테롤의 첨가는 안정도를 다소 증가시켰으나, 이와 같은 조건에서 head group이 다른 지질들의 첨가는 별 영향이 없었다. 이러한 결과는 이미 몇가지 인지질을 혼합하여 안정한 리포솜이 만들어 졌을 때에는 그 이상의 인지질을 더 가한다 하더라도 안정도에는 더 이상 크게 기여하지 못함을 나타낸다.

**리포솜의 안정성에 대한 콜레스테롤의 영향**—리포솜의 안정도에 미치는 콜레스테롤의 영향을 검토하기 위하여 인지질에 일정량의 cholesterol을 가하여 리포솜을 만들어 안정도 시험을 하였다. 즉 DMPC, DPPC, DSPC 혹은 egg PC에 5~50 mol%의 콜레스테롤을 가한 지질을 사용하여 만든 리포솜에 cal-

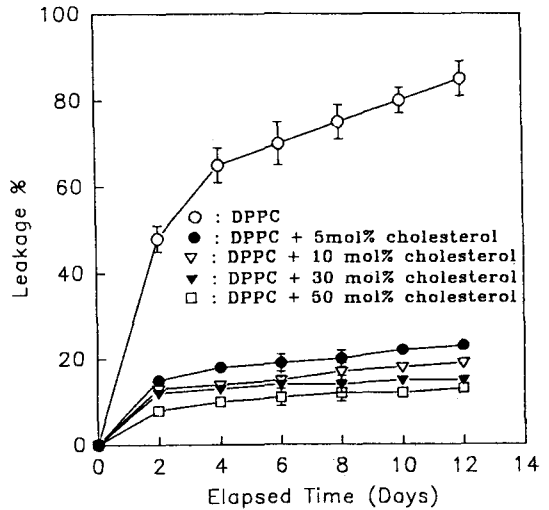


Fig. 5—Effects of cholesterol on the stability of DPPC liposomes at 20°C. (n=4) The concentration of phospholipid was 30 μM.

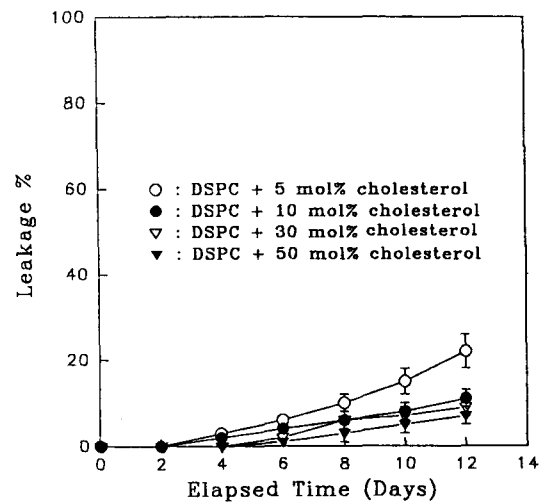


Fig. 6—Effects of cholesterol on the stability of DSPC liposomes at 20°C. (n=4) The concentration of phospholipid was 30 μM.

cein을 봉입한 후 안정도 시험을 행한 결과는 Fig. 4-7에 나타내었다. 이들 결과는 콜레스테롤이 인지질 리포솜의 유출을 막고 안정화시키는 작용이 우수하며 그 작용은 콜레스테롤의 첨가량에 비례함을 알 수 있었다. 그러나 DOPC, DDPC 및 DLPC와 같이 acyl 사슬의 길이가 짧은 PC의 경우에는 콜레스테롤을

첨가하여도 안정화가 이루어지지 않았다. DMPC의 경우에도 콜레스테롤에 의한 안정화 작용이 acyl 사슬의 길이가 긴 다른 인지질에 비하여 크지 못하였다. 즉, DMPC 단독으로 만든 리포솜은 25시간 경과 후 거의 완전히 calcein이 유출 되었으며 5~50 mol%의 콜레스테롤을 첨가하였을 때에는 50시간 경과 후 거의 50% 이상이 유출됨을 알 수 있었다. 이에 반하여 DPPC와 DSPC에 대한 콜레스테롤의 영향은 탁월하였다. 즉, DPPC에 cholesterol을 5~50 mol% 첨가하면 DPPC 단독으로 만든 리포솜에 비하여 크게 안정도가 높아져서 50시간이 지난 후에 거의 10% 이하의 leakage를 나타내었으며, 30 mol% 이상의 콜레스테롤의 첨가는 안정도에 더 기여하지 못함을 보여 주었다. DSPC의 경우에는 콜레스테롤의 첨가로 DSPC 단독으로도 리포솜이 만들어 졌으며, 생성된 리포솜은 매우 안정하여 calcein leakage가 50시간이 경과하여도 2%를 초과하지 않았으며, 10 mol% 이상의 콜레스테롤의 첨가는 필요치 않음을 보여 주었다. 이러한 결과로 부터 콜레스테롤은 리포솜의 안정도를 크게 증가시키며 특히 acyl 사슬의 길이가 긴 인지질일수록 콜레스테롤의 첨가에 의하여 보다 안정한 리포솜을 만들수 있음을 확인하였다. 흥미있는 것은 자체가 혼합물이기 때문에 단독으로도 매우 안정한 리포솜이 만들어지는 egg PC의 경우는 Fig. 7에서 보는 바와 같이 콜레스테롤을 가하더라도 안정도가

증가되지 않으며, 콜레스테롤의 함량을 50 mol%로 높였을 때에는 오히려 안정도가 낮아진다는 것을 관찰하였다. 이러한 결과로 미루어 보아 콜레스테롤의 첨가는 단일 성분의 PC 리포솜의 경우에는 농도에 비례하여 안정화 시키는 작용이 있으나 충분히 interdigitated된 egg PC의 리포솜에서는 그 안정화 작용이 거의 없거나 미약하고 과량의 콜레스테롤의 첨가는

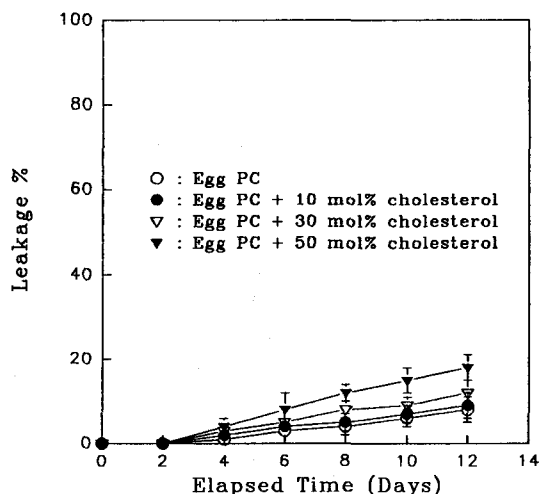


Fig. 7—Effects of cholesterol on the stability of egg PC liposomes at 20°C. (n=4) The concentration of phospholipid was 30  $\mu$ M.

Table I—Effect of cholesterol on the encapsulation efficiency of calcein in PC liposomes (relative fluorescence/ $\mu$ M PC).

PC/mol% of cholesterol	0	5	10	20	30	50
DMPC	3 $\pm$ 0.2	5 $\pm$ 0.3	6 $\pm$ 0.3	10 $\pm$ 0.5	9 $\pm$ 0.4	6 $\pm$ 0.2
DPPC	13 $\pm$ 0.6	16 $\pm$ 0.5	16 $\pm$ 0.6	14 $\pm$ 0.6	16 $\pm$ 0.5	11 $\pm$ 0.5
DSPC		19 $\pm$ 0.8	34 $\pm$ 0.9	21 $\pm$ 0.9	10 $\pm$ 0.2	10 $\pm$ 0.2
Egg PC	21 $\pm$ 0.5	19 $\pm$ 0.5	19 $\pm$ 0.5	18 $\pm$ 0.6	17 $\pm$ 0.5	15 $\pm$ 0.3

Data are the average of four replications with S.D.

Table II—Effect of lipid composition on the encapsulation efficiency of calcein in PC liposomes (relative fluorescence/ $\mu$ M PC).

PC	Encapsulation Efficiency
DMPC+DPPC (1:1)	15 $\pm$ 0.5
DMPC+DPPC+DSPC (1:1:1)	20 $\pm$ 0.5
DMPC+DPPC+DSPC+DPPG (1:1:1:0.2)	23 $\pm$ 0.7
DMPC+DPPC+DSPC+DPPA (1:1:1:0.2)	20 $\pm$ 0.5
DMPC+DPPC+DSPC+DPPE (1:1:1:0.2)	25 $\pm$ 0.5

Data are the average of four replications with S.D.

오히려 interdigitated bilayer 구조의 형성을 방해하여 안정도를 낮춘다고 추정되었다.

**지질의 조성과 콜레스테롤 함량에 따른 calcein의 봉입율**—Calcein을 봉입시킨 후 gel filtration하여 얻은 calcein이 봉입된 리포솜을 Triton X-100로 파괴시킨 후에 용액에 있는 calcein의 농도를 분석하여 일정량의 리포솜에 봉입되는 봉입율을 계산하여 Table I과 II에 실었다. Table I은 PC계 인지질을 단독으로 사용하여 리포솜을 만들시 콜레스테롤 함량에 따른 calcein의 봉입율을 나타낸 것으로 그 결과는 사용한 PC계 인지질의 acyl 사슬의 길이가 길수록 봉입율이 증가하며, 콜레스테롤의 함량이 증가할수록 봉입되는 calcein의 양이 감소하는 것을 보여 주었다. 이러한 결과는 acyl 사슬의 길이가 길수록 크기가 큰 리포솜이 만들어지며, 콜레스테롤의 함량에 비례하여 그 크기가 감소하고 있을 가능성을 보여 주고 있다. 또한 이들 결과는 콜레스테롤은 리포솜의 안정성을 증가시키는 역할도 있지만 너무 함량이 높아지면 약물의 봉입율을 낮추는 경향이 있음을 나타내는 것이다. Table I는 혼합 지질일 때의 calcein의 봉입율을 나타낸 것으로 그 결과는 리포솜을 만들 때 지질의 종류가 많을수록 안정된 봉입율을 나타내고 DPPG나 DPPE의 첨가는 봉입율을 다소 증가시키는 효과를 나타냄을 알 수 있었다.

이들의 결과로부터 약물 수송체로서 리포솜을 제조시에는 콜레스테롤의 첨가에 의한 인지질 리포솜의 안정화보다 여러가지 길이의 PC를 혼합하여 interdigitated bilayer 구조의 형성에 의한 안정화를 이루는 것이 더 바람직함을 알 수 있었다.

**지질막의 유동성에 대한 지질 조성의 영향**—지질의 조성이 리포솜 지질막의 유동성에 미치는 영향과 지질막 유동성의 변화가 리포솜의 안정도에 미치는 영향을 검토하기 위하여 DPPC에 일정량의 콜레스테롤을 가하여 만든 리포솜 지질막에 DPH를 label시킨 후 온도를 변화시키며 DPH의 fluorescence polarization (P)을 측정하여 Fig. 8에 나타내었다. 그 결과는 콜레스테롤은 젤상상태에서는 인지질층의 유동성에 대해 유의한 영향이 없었으나 액정상태에서는 유동성을 크게 감소시킴을 확인하였다. 이 그림에서 온도의 변화에 대하여 P값이 가장 심하게 변하는 온도를 상전이 온도라고 취하였을 때 이 방법으로 측정된

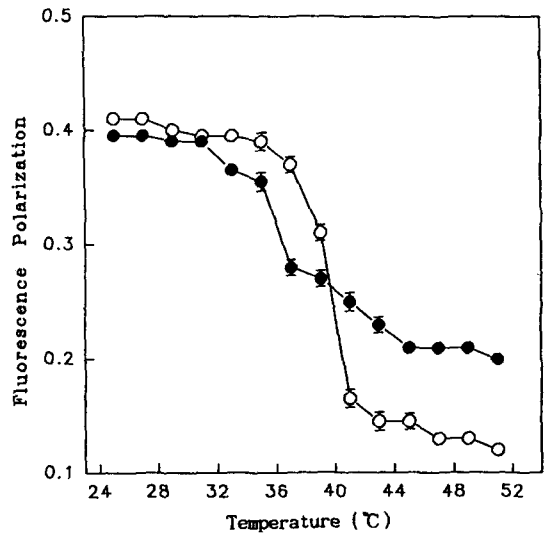


Fig. 8—Fluorescence polarization of DPH in bilayer of DPPC in the absence(○), and presence of cholesterol(●) as a function of temperature. (n=3) The concentration of phospholipid was 0.4 mM. The concentration of cholesterol was 20 mol%.

DPPC의 상전이온도는 42°C였으며 이 값은 DSC 방법으로 측정하여 보고된 값과 일치하였다.<sup>16)</sup> 여기서 콜레스테롤은 DPPC의 상전이온도를 다소 낮추고 그 전이를 일으키는 폭을 넓게 만드는 것을 확인하였다.

앞 실험에서 안정도를 시행한 온도는 20°C 이고 이 온도에서 DPPC의 경우 젤상상태에 있으므로 이 상태에서 콜레스테롤에 의한 유동성에 대한 영향은 크지 못하였다. 따라서 이러한 온도에서의 콜레스테롤에 의한 리포솜의 안정화는 유동성의 감소에 의한 것이 아님을 알 수 있었다. 따라서 이러한 안정화는 단순한 콜레스테롤의 밀폐효과로 추정된다. 그러나 인체내에 존재하는 생체막의 지질은 거의 모두가 액정 상태에 있으므로 체내에서의 지질막의 안정성은 밀폐효과와 아울러 콜레스테롤에 의한 유동성의 감소에도 기인할 가능성을 배제할 수는 없다. DMPC와 DSPC에 20 mol%의 콜레스테롤을 가하여 만든 리포솜에 대하여서도 같은 실험을 행한 결과, 이들에 대한 콜레스테롤의 영향도 DPPC 리포솜 지질막에 대한 영향과 거의 같은 양상을 나타내었으며 DMPC와 DSPC 리포솜의 상전이 온도 전후의 지질막의 유동성은

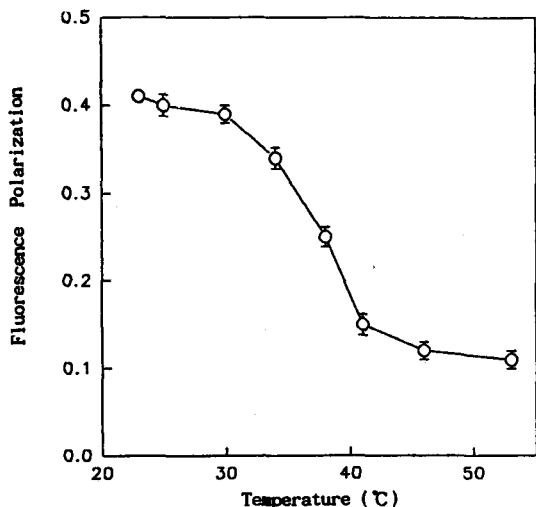


Fig. 9—Fluorescence polarization of DPH in bilayer of DMPC:DPPC:DSPC (1:1:1) liposomes as a function of temperature. (n=3) The concentration of total phospholipids was 0.4 mM.

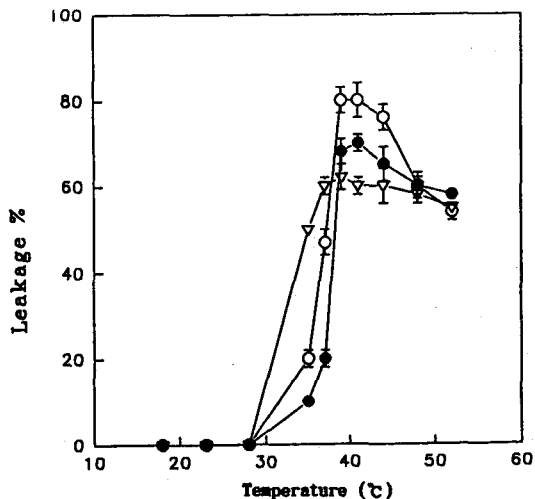


Fig. 10—Effects of cholesterol on the leakage of calcein entrapped in DPPC liposomes as a function of temperature. (n=4) The concentration of phospholipid was 30 μM.

DPPC의 경우와 거의 같았다. 이러한 결과는 acyl 사슬의 길이가 다른 PC 리포솜 사이에는 유의할 만한 유동성의 차이가 없다는 것을 보여 주었다.

또한 DSPC에 DMPC와 DPPC를 동일한 mol 비율로 혼합하여 만든 리포솜에 DPH를 label 시킨 후 온도의 변화에 대한 fluorescence polarization의 변화를 측정하여 그 결과를 Fig. 9에 나타내었다. 문헌에 보고된<sup>16)</sup> DSPC의 상전이 온도가 55°C 이고, DPPC의 상전이 온도는 41°C, 그리고 DMPC의 경우는 23°C 인데 비하여 혼합 지질 리포솜은 이들 상전이 온도의 평균값에 가까운 38°C에서 하나의 상전이 온도가 나타났다. 이러한 결과로 보아 이들 혼합물은 공유 혼합물을 형성하고 있음을 알 수 있었다. 인지질을 혼합하여 만든 리포솜은 액정 상태에서 인지질 단독으로 만든 리포솜과 비교하여 유동성의 변화를 나타내지 않았다. 이상의 결과에서 여러 가지 인지질을 혼합시의 안정도의 증가는 유동성의 변화에 기인하지 않고 interdigitated bilayer 구조의 형성으로 조직이 치밀하여져서 barrier로서의 기능이 커지는 것이라 생각된다.

**리포솜의 안정성에 미치는 온도의 영향**—콜레스테롤의 함량을 달리 하는 DPPC 리포솜에 calcein을 봉입시킨 후 이 용액을 각각 온도를 달리한 항온조

속에 넣어 10분간 방치한 뒤 유출되는 calcein의 형광을 측정하여 온도에 따른 calcein 유출율을 측정하였으며 그 결과를 Fig. 10에 나타내었다. 그 결과를 보면 DPPC 지질막의 상전이 온도인 42°C 부근에서 리포솜에 봉입한 calcein의 유출이 급격히 일어나고 있음을 알 수 있었으며 이러한 유출은 콜레스테롤의 첨가에 의해서 다소 억제되었다. 이 결과는 리포솜을 형성하는 인지질이 겔 상태에서 액정 상태로의 상전이가 일어날 때 봉입된 물질의 유출이 급격히 커지며 이는 결정과 액정 사이에 존재하는 interfacial lipid에서 큰 공극이 생긴다는 것을 보여준다. 여기서도 콜레스테롤은 이러한 공극을 밀폐시켜 리포솜의 안정성을 증가시킨다고 생각된다. 여러가지 인지질을 혼합하여 리포솜을 만들 때에는 지질의 혼합에 의하여 급격한 상전이라도 억제되어 안정화에 기여할 수도 있으며 인지질의 종류의 선택에 의하여 상전이 온도의 조절로서 온도 의존형 리포솜의 개발 가능성이 있음을 알 수 있었다.

결론

리포솜의 안정성에 대한 지질의 조성의 영향을 알아보기 위하여 여러 종류의 인지질을 단독으로, 또는



혼합하거나 콜레스테롤을 첨가하여 calcein을 봉입한 리포솜을 만들었으며, 이를 상온에서 방치 하면서 봉입한 calcein의 유출율을 측정하여 리포솜의 안정도를 측정 하였다. 또한 리포솜에 DPH를 label시켜 fluorescence polarization을 측정하여 그 유동성을 조사한 결과에서 부터 다음과 같은 결론을 얻었다.

안정한 리포솜을 만들기 위하여는 인지질의 head와 tail 사이의 balance가 중요함을 알 수 있었다. 특히 PC계 인지질은 단독으로도 안정한 리포솜을 만들 수 있었고, 이때 acyl 사슬의 길이가 너무 짧거나 길어서는 안되며 적당한 길이가 요구되었다. 그러나 PC계 인지질을 몇 가지로 혼합하거나 cholesterol을 첨가할 때에는 안정한 리포솜이 만들어지고 이때 안정화의 정도는 인지질의 acyl 사슬의 길이가 길수록, 또한 혼합하는 인지질의 수가 많을수록 안정화가 더 잘 이루어짐을 알 수 있었다. 이러한 안정화는 지질막의 유동성의 변화에 의한 것이기 보다는 인지질의 혼합에 의한 interdigitated bilayer 구조의 형성에 기인한다고 생각된다. 또한 콜레스테롤에 의한 안정화는 리포솜의 봉입율을 낮추는 데 반하여 여러 가지 인지질을 혼합하여 리포솜을 만든 경우는 봉입율을 낮추는 경향이 없었으므로 리포솜을 약물 수송체로서 응용할 때에는 콜레스테롤의 첨가에 의한 것보다 여러 가지 인지질의 혼합에 의한 리포솜의 안정화가 더 바람직함을 알 수 있었다.

## 문 헌

- 1) Gregoriadis, G.: *Liposome technology* Vol. II, CRC Press, (1984).
- 2) Keizo, I.: Permeability properties of liposomes prepared from dipalmitoyl lecithin, dimyristoyl lecithin, egg lecithin, rat liver lecithin and beef brain sphingomyelin, *Biochem. J.* **186**, 591 (1980).
- 3) Michael, J. S. and Thompson, T. E.: Effect of phospholipid oxidation products on transbilayer movement of phospholipids in single lamellar vesicles, *Biochemistry*, **21**, 920 (1982).
- 4) Fusao, H. and Julius, A.: Phospholipid methylation and biological signal transmission, *Science*, Vol. **209**, 1082 (1980).
- 5) Wilschut, J. and Papahadjopoulos, D.:  $Ca^{2+}$  induced fusion of phospholipid vesicles monitored by mixing of aqueous contents, *Nature*, Vol. **281**, 690 (1979).
- 6) Christophen, K., Jacqui, C. and Gregory, G.: Effect of the cholesterol content of small unilamellar liposomes on their stability in vivo and in vitro, *Biochem. J.* **186**, 591 (1980).
- 7) Roger, R. C. New.: *Liposomes; A practical approach*, p. 33 IRL Press, Oxford, England, (1989).
- 8) Jain, M. K., Wu, N. M. and Vary, L. V.: Drug-induced phase change in bilayer as possible mode of action of membrane expanding drugs, *Nature*, **255**, 494-496 (1975).
- 9) Hagins, W. A. and Yoshikami, S.: Intracellular transmission of visual excitation in photoreceptors; Electrical effects of chelating agents introduced into rods by vesicle fusion, in vertebrate photoreceptors, Fatt, P. and Barlow, H. B. Eds., Academic Press, N.Y., 97 (1978).
- 10) Diehl, H.: Calcein, calmagite and o,o'-dihydroxyazobenzene: *Titrimetric, Colorimetric, and Fluorometric Reagents for Calcium and Magnesium*, G. Fredrick Smith Chemical Co., Columbus, Ohio, (1964).
- 11) Lakowicz, J. R., Prendergast, F. G. and Hogen, D.: Differential polarized phase fluorometric investigations of diphenylhexatriene in lipid bilayers. Quantitation of hindered depolarizing rotations. *Biochemistry*, **18**, 508 (1979).
- 12) Radda, G. K.: Fluorescence probes in membrane studies. in Korn E. D. (ed): *Methods in Membrane biology*, Vol. **4**. Biophysical Approaches. Plenum Press, N.Y., 97(1975).
- 13) Roger, R. C. New.: *Liposomes; Practical approach*, p. 108, IRL Press at Oxford University, (1989).
- 14) Parthasarathy, N., Elizabeth, S. R. and Thomas, J. M.: Studies of the ethanol-induced interdigitated gel phase in phosphatidylcholine using the fluorophore 1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatriene, *Biochemistry*, **27**, 9175 (1988).
- 15) Roger, R. C. New.: *Liposomes; Practical approach*, p. 101, IRL Press at Oxford University, (1989).
- 16) Ladbroke, B. D. and Chapman, D.: Thermal analysis of lipids, proteins and biological membranes *Chem. Phys. Lipids*, **3**, 304 (1969).