

마이크로플루다이저를 사용한 MLV liposome 형성에 관한 연구

김인영, 김종희, 박성순, 서봉석
(한국화장품 기술개발 연구소)

A study on manufacturing formation of the MLV liposomes by the microfluidizer

In-young Kim, Joong-hoi Kim, Seong-soon Park, Bong-seok Seo
(Han-Kook Cosmetics R&D Center)

요 약

Liposome은 의약과 화장품 분야에서 많은 발전을 하였다. 본 연구에서는 세포간지질의 주요성분인 cholesterol, palmitic acid, cholesterol ester와 lecithin을 사용하여 swelling 반응에 의해 MLV liposome을 제조 하였다. 지질베이스와 마이크로플루다이저를 사용하여 MLV liposome 형성에 대한 특성들을 연구 하였다. MLV liposome은 multilamellar vesicle로서 형성 되었다. MLV liposome의 Gelation효과는 고온($90\pm 5^{\circ}\text{C}$)에서 polyol과 water phase에 지질을 혼합한것에 스웰링 반응을 하였다. MLV liposome에 alpha hydroxy acid 성분들을 투입 제조하였다.

MLV liposome의 최적조건은, 마이크로플루다이저에 3회 통과하였으며, vesicle의 입자크기는 150-350nm범위이고, 이것을 freeze-fracture electron microscopy로 확인 하였다.

1. 서 론

인지질같이 친수부분에 친유그룹이 2개가 붙어 있고 물에 분산시키면 단분자막 미셀이 아니라 2분자막(bilayer)을 형성하는 이러한 폐쇄 소포체를 Vesicle 이라 하며 이중 인지질로 형성된 것을 리포솜이라고 한다^{1,2}.

리포솜은 (1)2분자막의 폐쇄 소포체 내에 수용성, 지용성 물질 모두를 내포시킬 수 있고 (2)크기 및 변형이 용이하다. (3)인지질의 사용으로 생체내 독성이 거의 없다는 장점을 가지고 있어서 약물전달 체계(drug delivery system)로 이용되며 이에 대한 활발한 연구에 진행되고 있다^{3,4}. 그리하여 리포솜은 임상용 진단 시약과 화장품분야에서 응용되고 있고, 또 생체막의 특성을 연구하는데 있어 리포솜을 생체막 모델로 활용하거나 생체막을 통한 물질의 이동, 생체 전기현상, 생체막의 융합 등의 연구에 활발히 응용하고 있다^{5,6,7}.

리포솜을 의약품인 경우 어떤약물, 특히 독성이 강한 약물인 경우 리포솜내에 내포되는 약물은 겔 여과크로마토그래피(gel filtration chromatography), 초원심분리(ultracentrifugation), 투석(dialysis)등의 방법으로 제거하여 주어야 하지만 화장품에서는 내포되지 않은 물질을 꼭 제거하여야 할 필요는 없는 것이다^{8,9}.

또한, 화장품 분야에서 리포솜의 응용의 목적은 인지질의 생체막의 유동성을 증가시켜 물질의 신진대사를 보다 원활히 하고, 미용 성분의 피부 흡수를 증가시키려는데 있다. 그리하여 피부에 대한 유효성분을 리포솜화하여 세포의 조직 배양으로 실험한 결과, 세포의 생존 기간이 길어졌다는 보고도 있으며^{10,11,12}, 리포솜을 함유한 겔에서 약물의 피부 흡수를 실험한 결과, 리포솜화하지 않은 경우보다 표피에서는 농도가 5배, 진피에서는 3배가 증가되었다는 보고도 있다^{13,14}.

리포솜은 생체막 유래 계면활성제로 된 인지질의 수현탁물이 지질 2분자막으로 된 폐쇄소포체로 된 것으로 Bangham⁵에 의해 발견된 이래, 이 소포체를 리포솜(Liposome)이라 칭하고 막모델로써 이것을 마이크로 캡슐화(microcapsulation)하여 광범위하게 적용하고 있다. 특히 최근에는 면역에 응용되어 리포솜이 더욱 주목되는데 그 이유로서는 (1)생체막 유래 지질을 사용했다는 것, 즉 "biodegradable"로 해를 끼치는 것이 아주 적다고 생각되는 것, (2) 세포 레벨의 상호작용을 생각하여 생체막과 유사 구조체를 형성함으로써의 장점이 있다는 것, (3)고분자를 함유시키기 위하여 여러 종류의 물질을 리포솜 내의 수층에 투입하기도 하고, 막내로 캡슐레이션(capsulation)이 가능하다는 것등을 특징으로 말할 수 있다^{15,16}.

리포솜의 종류와 그 특징을 알아보자. 리포솜의 종류와 그 특징으로는 vesicle의 크기와 형태에 따라 다막리포솜(Multilamella Vesicle:MLV)과 단막 리포솜(Unilamella

Vesicle;ULV)로 구분한다. 특히 단막 리포솜은 LUV (Large Unilamella Vesicle)과 SUV(Small Unilamella Vesicle)로 구분하며, LUV와 SUV의 경계는 100nm로 구분하고 있다. 크기는 대략 MLV는 200-3500nm이고 LUV는 100-1000nm, SUV는 20-50nm 정도이다. 또 리포솜의 조제 방법으로는 기계적인 힘에 의한 방법, 세제 제거 방법, 용매사출방법, 역상중발법 등이 있다^{17,18,19,20}.

이러한 것을 기초로 하여 본 연구에서는 각질 세포간지질을 구성하고 있는 성분들을 선택적으로 사용하여 새로운 지질베이스를 만들었다. 또 이것의 일부를 취하여 다 가알코올류와 양친매성 계면활성제를 포함한 수상과 지질과의 스웰링 반응을 시켰다. 이 시료를 저온유화법에 의하여 안정한 유화상태를 만들었고, MLV liposome을 만들 기위하여 마이크로 플루다이저를 사용하였다. 또한 MLV liposome 형성에 대한 최적 조건을 찾기 위하여 유화 온도, 마이크로 플루다이저의 압력, 시료 통과 횟수에 따른 입자 크기의 변화와 안정성을 조사하였다.

2. 실험

2.1 실험재료

본 실험에서 지질베이스로 cholesterol, cholesteryl ester, lecithin등을 원료로 사용했으며, 계면활성제는 PEG-5-soyasterol, (POE)n-cetyletcher를, 보조계면활성제는 cetyl phosphate를 사용하였다.

화장품용 미용성분들은 Lactic acid, Malic acid, Tartaric acid를 사용하였다. 물은 음,양이온 교환 수지탑을 통과한 정제수를 사용하였다. 본 실험에 사용된 재료들은 화장품용으로 사용하였다.

2.2 지질 베이스 제조

지질 베이스는 사람의 각질 세포간지질을 구성하고 있는 성분들로 일본의 Gengi Imokawa¹¹에 의해 박층 크로마토그래피로 분석되어진 결과를 기초로 하여 새로운 지질베이스를 만들었다. 각 조성물들은 사람의 각질 세포간지질과 유사한 라멜라 구조를 형성할 수 있도록 천연에서 추출한 스테롤에 Polyethyleneglycol을 부가시켜 피부와 친화력이 좋은 양친매성 계면활성제(Amphiphilic Surfactant)와 넓은 pH범위에서 안정하며 리포솜의 겔링화에 좋은 효과를 주는 (POE)n-cetyletcher를 사용하였다.

피부 각질 세포간지질에는 스펡고지질 50%, 콜레스테롤 에스터 10%, 콜레스테롤 15%, 지방산 20%, 피지선 유래 지질 성분으로 스쿠알렌, 왁스에스텔, 트리글리세라이드, 스펡고지질에는 세라마이드가 95%, 당지질 5% 등의 혼합물이 존재한다는 보고도 있다^{21,22}.

본 실험에서는 화장품으로서 전체 베이스에 리포솜을 형성할 수 있도록 하기 위해 1차적으로 사람의 각질 세포간지질과 유사한 환경을 가질 수 있도록 하였으며, 사람 피부의 주요 구성성분을 선택적으로 사용하여 지질 베이스를 조제하였다. 시료를 일정량 칭량하여 클로로포름과 메탄올을 8:2로 혼합하여 용해한 다음 60±5℃로 가온하여 진공증발기로 전처리하여 왁스형태의 순수한지질 베이스를 만들었다.

2.3 MLV 리포솜 조제 방법

리포솜의 조제 방법은 많은 연구가들에 의해 공개되었으며, 여러가지 형태로 만들어지고 있다. 사람의 피부구조와 유사한 환경을 가질 수 있는 지질베이스를 이용하여 지질이중막을 형성시켜 지질이중층의 친수부에 용해된 아하성분들을 베지클 내부로 투입시킬수 있도록 하였다. 이 베지클을 형성시키기 위하여 일반적으로 사용되고 있는 T.K homo mixer로는 균일한 입자상을 얻어 내기가 어려우며, 경시변화에 따른 안정도 또한 기대하기가 어렵다. 이러한 문제점들을 해결하기 위하여 마이크로플루다이저를 사용해야만 한다(그림1). 조제 방법은 그림2과 같다. 표2의 (A)상을 90 ±5℃로 가온 용해한후 습윤제인 (B)상을 혼합 교반하여 습윤시킨다음, 천연 추출 미용 성분인 (C)상 AHA성분을 첨가하여 마이크로플루다이저에 통과시키면서 리포솜 2분자막내에 캡슐화 시켰다.

phase	Ingredients of MLV liposome	Content(%)
(A)	Lipid base	15.0 - 20.0
(B)	Propylene glycol Cetylphosphate pure water	5.0 0.5 qs
(C)	Malic acid Tartaric acid Lactic acid	1.0 1.0 1.0
T o t a l		100.00

Table 1. Composition of formation on the MLV liposomes

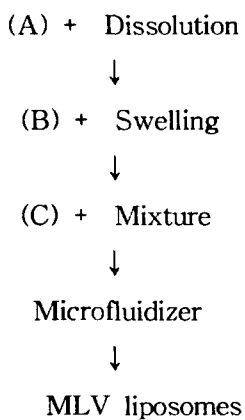


Fig. 2. Method of Manufacture on the MLV liposomes formation.

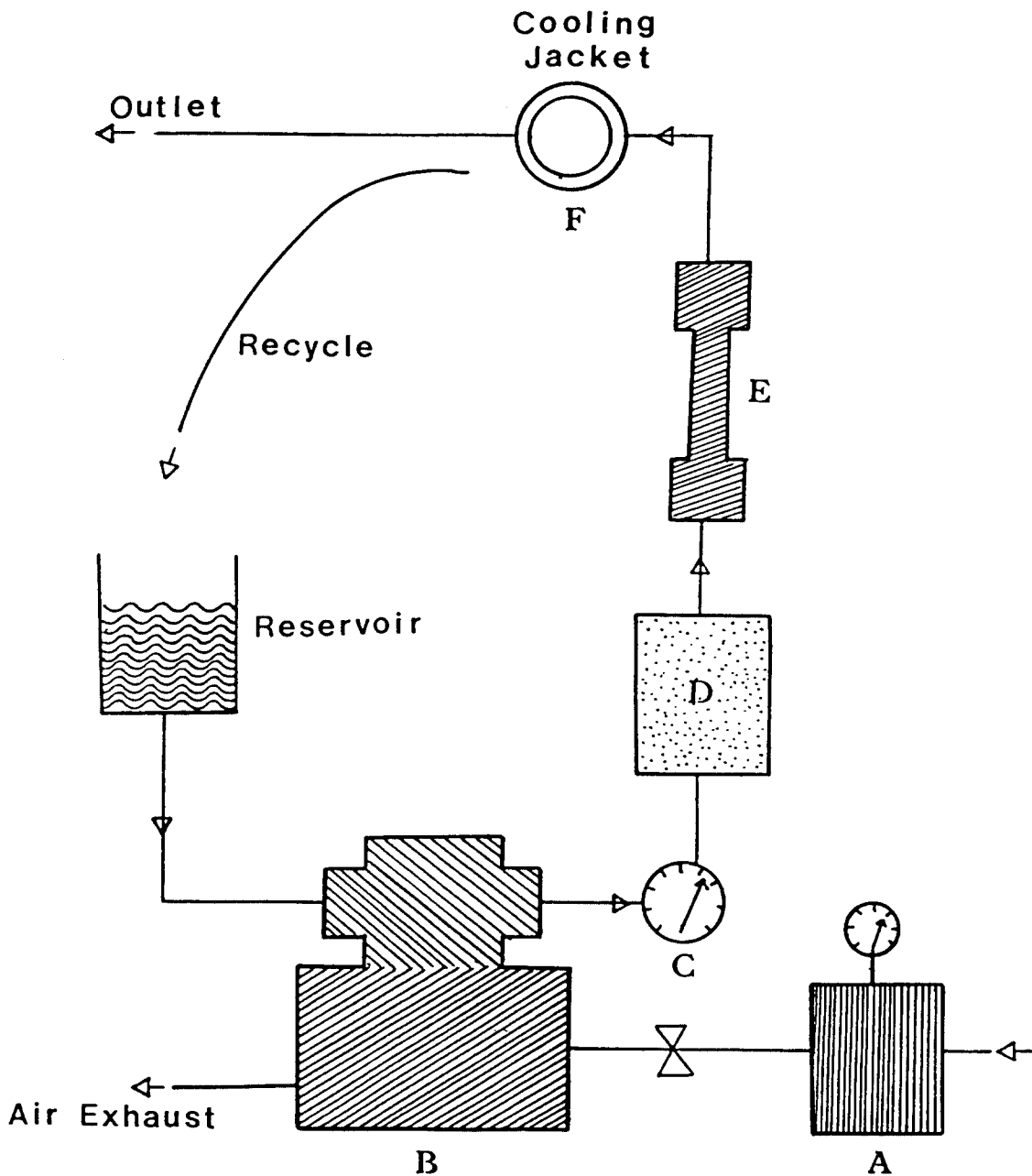


Figure 1. Schematic diagram of the microfluidizer.

A: Air pressure, B: pump C: pressure gauge D: filter

E: patented interaction chamber, F: coil (coil length: 50cm, ϕ 3mm)

2.4 입자크기 측정

제조한 MLV liposome을 $25\pm 1^\circ\text{C}$ 항온조에 보관시켜 입자크기를 측정하였다. 한번 측정에 사용한 시료는 재사용하지 않았으며, 측정 횟수는 각각 5회측정한 평균값으로 계산하였다. 측정기기는 Laser Light Scattering System (PCS 4700, Malvern U.K)을 이용하였고, 측정시 온도는 자동컨트롤 장치가 부착되어 있기 때문에 실온에서 실행하였다.

2.5 MLV liposome 형성 측정

MLV liposome의 제조 방법에 의하여 만들어진 아하성분을 베지클 내부로 투입하였다. 멀티라멜라형 베지클의 형성 여부를 확인해보기 위하여 Freeze-Fracture Electron Microscopy로 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 지질베이스와 MLV liposomes

일반적으로 사용되고 있는 유화는 열역학적으로 불안정한 상태에 있고, MLV liposome 또한 온도에 대한 안정성에는 많은 문제점들을 갖고 있다. 특히 사람의 피부구조와 유사한 구조체를 만들고 다중라멜라 베지클을 형성시키기 위하여 지질베이스를 1차적으로 만들어야만 했다. 이 지질베이스를 이용, 내용물의 전체상에 아하성분을 캡슐화하여 안정성을 확보하는 것과 효과의 지속성을 높일 수 있는 가능성에 초점을 맞추었다.

그림3은 리포솜의 기본 구조도이다. 그림3에서는 베지클이 한 개의 층으로 형성된 것과 두 개 이상의 다중층막으로 형성하고 있음을 보여준다. 미용성분들은 용액속에 혼합되어 친수부에 투여되고 베지클을 형성한다. 이번 실험에서 새롭게 지질베이스는 지질 이중막을 형성하는데 중요한 역할을 한다. MLV liposome의 특징으로는 수분의 전달 체계를 향상시켜주며 Moisturizer의 침투를 증가시킨다. 마이크로플루다이를 사용하여 리포솜의 안정화를 위하여 여러가지 최적 조건들을 찾았다.

3.1.1 압력의 변화

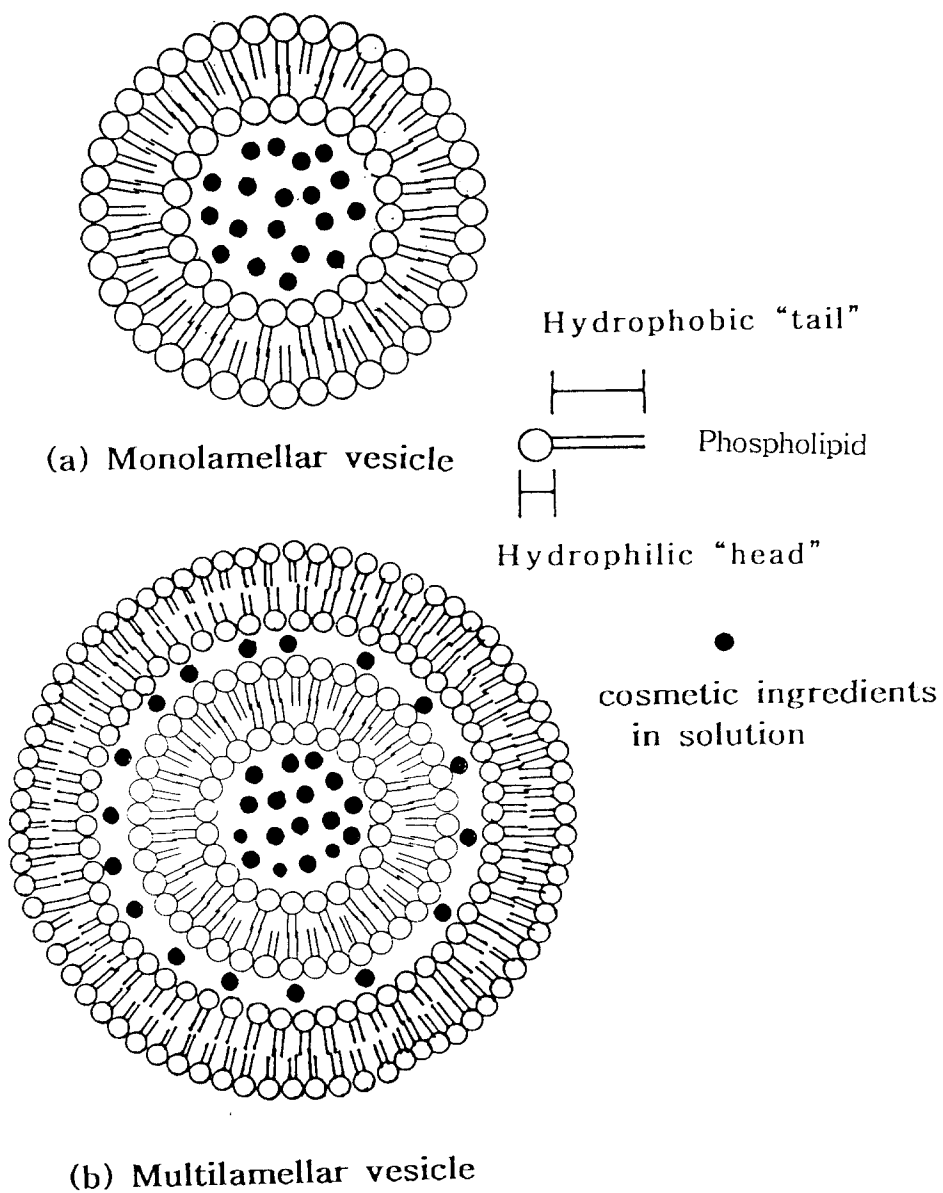


Figure 3. MLV liposomes

마이크로플루다이저는 사용시 상당한 주의를 요한다. 사전에 전처리하여 만들어 놓은 지질베이스를 마이크로플루다이저에 통과할때의 압력조건을 찾기위하여 100 bar-1,000 bar 범위에서 베지클의 형성 여부를 실험하였다. 통과압력은 600 bar에서 가장 안정한 베지클이 형성되는 것을 알 수 있었다(그림4). 낮은 상태의 가압(400bar 이하)에서는 입자사이즈가 크고 베지클이 불균일하게 형성하였으며, 높은 가압(800 bar이상)에서는 입자크기는 작아졌지만 리포솜의 베지클이 일그러지는 현상을 발견 할 수 있었다.

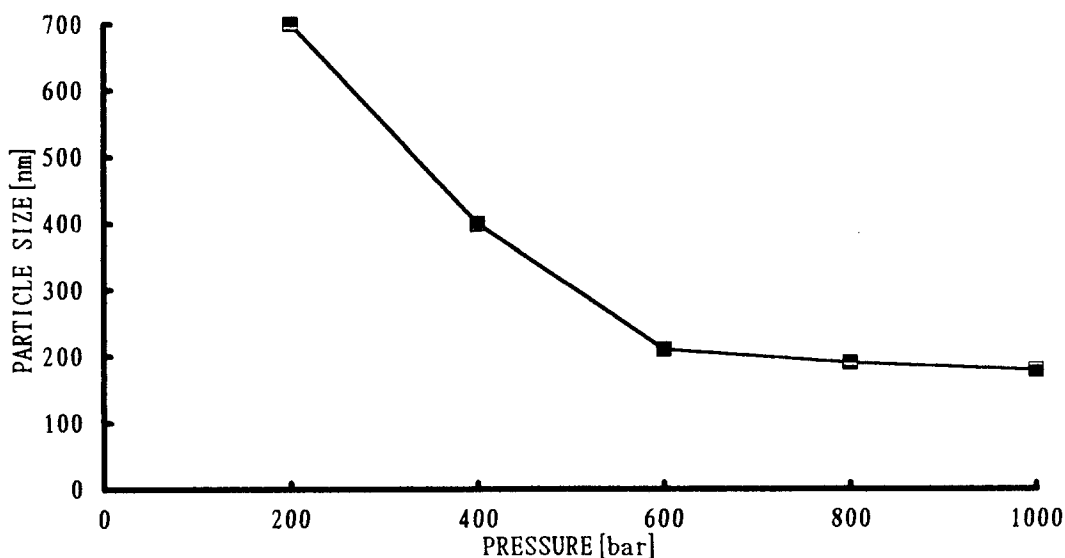


Fig. 4. Effect of air pressure on the formation of MLV liposomes.

3.1.2 온도의 영향

마이크로플루다이저의 통과압력을 600bar로 고정시키고 온도를 변화(20-80℃)시켜 가며 리포솜의 형성여부를 관찰 하였다. MLV liposome에 있어서는 온도가 증가 할 수록 리포솜의 의 입자 사이즈는 다소 작아지는 현상은 있었지만 큰변화는 없음을 확인하였다.

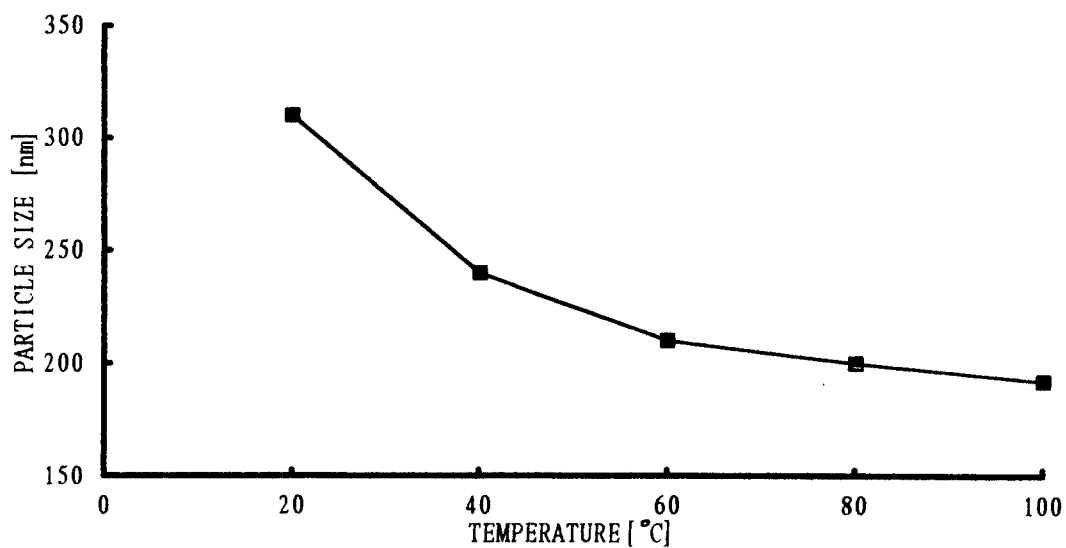


Fig. 5. Effect of temperature on the vesicles.

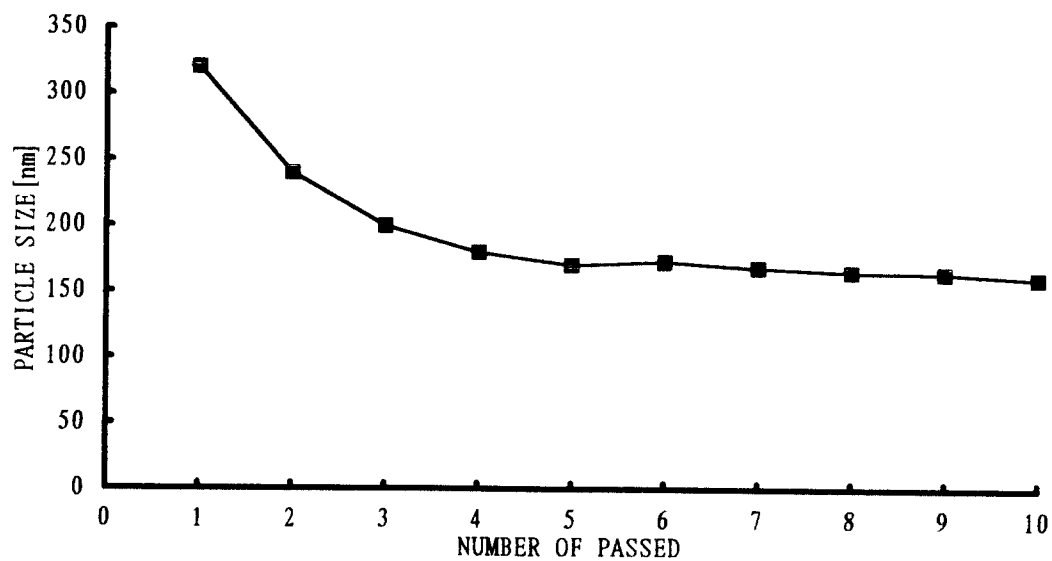


Fig. 6. Effect of number of passed on the microfluidizer.

3.1.3 마이크로플루다이저 통과횟수의 변화

리포좀의 형성은 마이크로플루다이저의 통과압력, 온도 그리고 적당한 통과횟수를 고려하지 않으면 안된다. 베지클을 안정하고 균일하게 만들기 위하여 시료의 통과횟수를 0회부터 10회까지 통과시켜 Laser Light Scattering System으로 베지클의 입자 크기를 측정하였다(그림6).

그림6에서 보는 바와 같이 시료의 통과횟수는 3회 통과시 리포좀은 가장 안정하였으며, 시료를 4회이상 10회를 통과시켜 입자사이즈의 변화를 측정해본 결과 일정하다는 것을 알 수 있었다. 4회이상 과도하게 마이크로플루다이저에 통과시키면 리포좀의 베지클이 일그러지기 때문에 적당한 통과횟수가 필요하다. MLV리포좀의 경시 변화(6개월)에 대한 리포좀의 안정도를 관찰해본 결과 3회 통과시가 가장 안정하였으며 입자사이즈도 일정함을 알 수 있었다.

3.2 MLV liposome 측정결과.

MLV 리포좀을 형성하기 위하여 여러가지 요인들에 대한 최적 조건들을 찾아내었다. 또, 이 샘플이 리포좀을 형성하였는지를 증명하기 위하여 프랑스 Serobiological Research Center에 의뢰하여 Freeze-Fracture Electron Microscopy로 촬영하여 그림7에 나타내었다.

촬영사진에서 보는 바와 같이 다중층의 라멜라구조를 형성하고 있음을 알 수 있었다. 베지클에 대한 입경 분포는 150-350nm이며, 평균 입자 사이즈는 200nm이다. 아하성분은 다중층으로 형성된 리포좀 베지클의 친수부에 캡슐됨을 추측할 수 있었다.

본 연구에서 적용한 지질베이스와 마이크로플루다이저를 이용하여 여러가지 기능들을 갖고 있는 미용성분들을 베지클내로 투입시킬 수 있다. 연속상에 용해가 가능한 미용성분들은 친수부내에, 오일상에 혼합이 가능한 미용성분들은 친유부내에 투입이 가능한 특징을 가지고 있다.

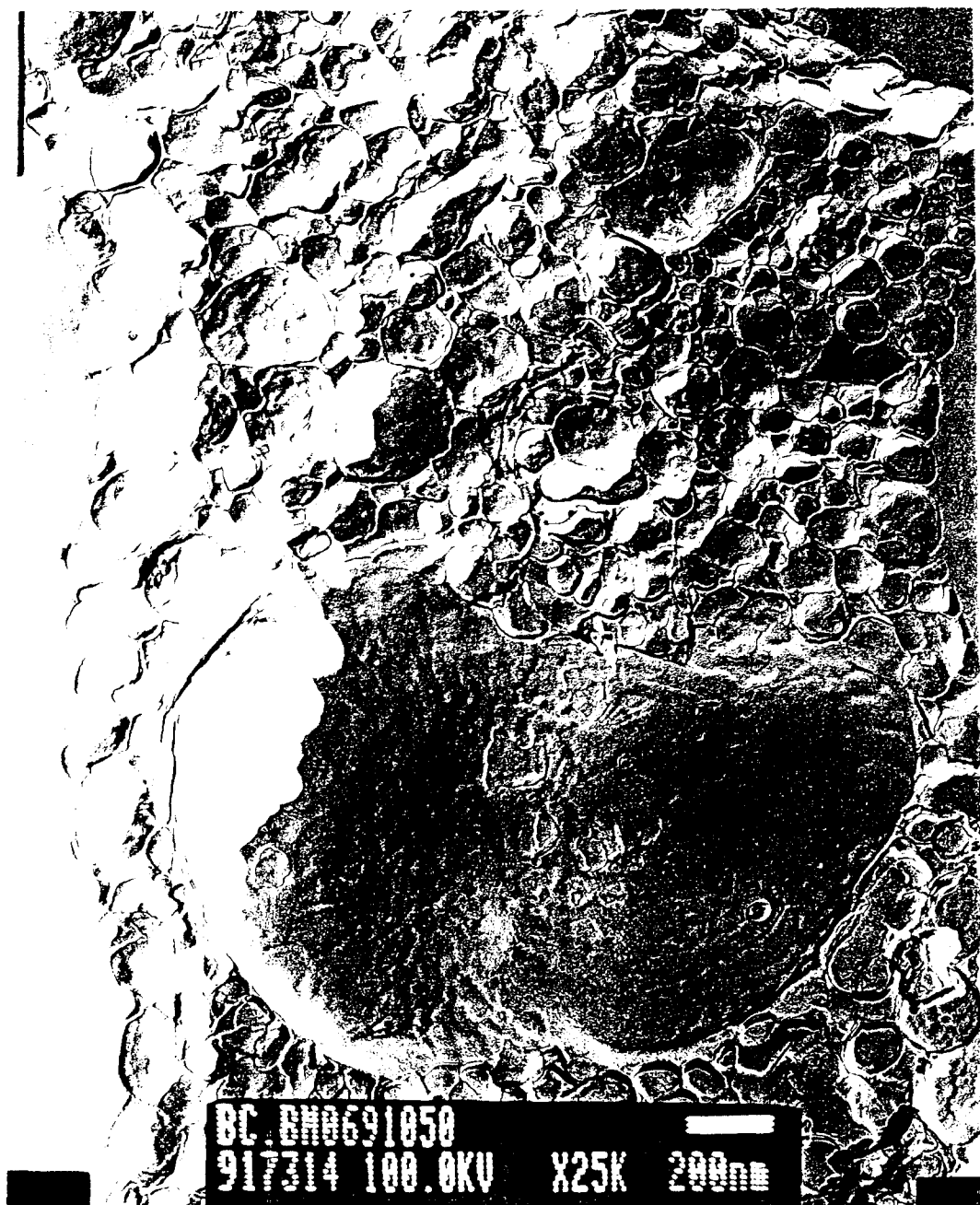


Fig. 7. MLV liposomes preparation after 3rd passed using the microfluidizer.(Mag X 25,000)

4. 결 론

본 연구에서는 마이크로플루다이저를 사용한 리포솜을 형성시키기 위하여 새로운 지질베이스를 제조하였으며, 또한 아하성분을 MLV liposome의 베지클 내부에 캡슐화하는 제조법을 연구하였다. 이것을 적용하여 리포솜을 만들기 위한 마이크로 플루다이저의 여러가지 최적 조건들을 찾아 내면서 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. 지질베이스의 구성성분은 cholesterol, cholesteryl ester, squalane, lecithin, Palmitic acid를 원료로 사용했으며, 계면활성제는 PEG-5-soyasterol, (POE)n-cetyether를, 보조 계면활성제는 cetylphosphate를 사용하여 사람의 표피와 유사한지질베이스를 제조하였다.
2. 이와같은 조건으로하여 MLV 리포솜을 제조하여 베지클의 입자사이즈는 150-350nm였으며, alpha hydroxy acids성분인 malic acid, tartaric acid, lactic acid를 리포솜베지클 친수부에 투입시켜, 베지클화 하였다. 경시변화에 따른 안정도는 6개월동안 실온에서 관찰한 결과 안정하였다.
3. MLV리포솜의 형성여부를 freeze-fracture electron microscopy로 측정한 결과 다중 라멜라 타입의 베지클이 형성함을 증명하였다.

Abstract

The liposomes have been developed in many drugs and cosmetics fields.

In this context, it should be mentioned that MLV liposomes can be prepared standing with the main compounds of the intercellular lipids, cholesterol, palmitic acid, cholesteryl ester and lecithin, by swelling reaction.

We report properties of the formation of MLV liposomes with use of the lipid base and Microfluidizer. MLV liposomes formed as multilamellar vesicles(MLV). The effect of the gelation of MLV liposomes have been on swelling reaction

which have been mixed lipid with polyol and water phase at high temperature(90 ± 5 °C.). MLV liposomes have been prepared in incorporating alpha hydroxy acid ingredients.

Optimum condition of MLV liposomes were passed three times in the microfluidizer, particle size of the vesicles should be within range 150-350nm and those confirmed by freeze-fracture electron microscopy.

참 고 문 헌

1. 김형만, [生體膜],
2. H. Kikuchi, K. Inoue, 細胞工學, 2, 1136(1983)
3. S.B. Kulkarni, E. I. Vargha-Butler, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 4, 77-85(1995)
4. J.T. Simonnet, Skin Care and Treatment, 109, 45(1994)
5. AD.Bangham et al, J.Mol Biol, B 253-259(1965)
6. H.Lautenschlager, Cosmetics & Toiletries, 105.89(1990)
7. D.Deamer and A.D. Bangham, Biochimica et, Biophysica Acta, 443, 629-634(1976)
8. D.Papahadjopoulos et al, Biochimica et Biophysica Acta. 394, 483-634(1976)
9. S.M. Johnson, A.D. Bangham, M.W. Hill and E.D. Korn, Biochim, Biophys, Acta, 233, 820-826(1971)
10. G.Imokawa, S.Akasaki, Y. Minematsu and M. Kawai, Arch Dermatol Res, 281, 45-51(1989)
11. H.Lautenschlager, Cosmetics and Toiletries, 105, 63(1990)
12. B.W. Barry, Journal of Controlled Release, 6, 85-97(1987)
13. Ruth K. Freinkel, M. D and Thomas N. Traczyk B. S, The Journal of investigative Dermatology, 85, 295-298(1985)
14. Genji Imokawa, The Journal of Investigative Dermatology, 84, 282-284(1985)
15. Harry G. Endch and Philipp Strittmatter, Biochemistry , 76, 145-149(1979)
16. Peter M. Elias, Arch Dermatol Res, 270, 95-117(1981)

17. M. Magill, *Cosmetics and Toiletries*, 105, 59(1990)
18. K. Suzuki and Kenichi Sakon, *Cosmetics and Toiletries*, 105, 65(1990)
19. James A. Hayward, *Cosmetics and Toiletries*, 105, 47(1990)
20. Genji Imokawa, Shuichi Akasaki, Akira Kawamata, Shinji Yano and Naotake Takashi, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 40, 273-285(1989)
21. Genji Imokawa, *Fragrance Journal*, 4, 26-35(1990)
22. M.Mahjour, B. Mauser, Z. Rashidbaigi and M. B. Fawzi, *Journal of Controlled Release*, 14, 243-252(1990)