

레티날 안정화를 위한 사이클로덱스트린-리포솜에 관한 연구

하지훈^{*,†} · 최형^{*,†} · 홍인기^{*} · 한상근^{*} · 빈범호^{**,††}

*한국콜마 종합기술원

**아주대학교 생명과학과, 조교수

(2022년 3월 23일 접수, 2022년 3월 30일 수정, 2022년 3월 30일 채택)

Study on Stabilization of Retinaldehyde using Drug-in-Cyclodextrin-in-Liposome (DCL) for Skin Wrinkle Improvement

Ji Hoon Ha^{1,†}, Hyeong Choi^{1,†}, In Ki Hong¹, Sang-Kuen Han¹, and Bum Ho Bin^{2,††}

¹Skincare R&D Center, HK Kolmar, 61, 8-gil, Heollenung-ro, Seocho-gu, Seoul 06800, Korea

²Department of Biological Sciences, Ajou University

(Received March 23, 2022; Revised March 30, 2022; Accepted March 30, 2022)

요약: 레티날(RA)은 레티놀과 레티노익애씨드의 중간체로 비타민A 유도체이며 주름개선 효과가 우수하다. 본 연구에서는 drug-in-cyclodextrin-in-liposome (DCL)을 이용하여 레티날의 안정성을 높였다. 레티날과 hydroxypropyl-β-cyclodextrin (HP-β-CD) 복합체를 동결건조 방식으로 제조하였고, UV-Vis 분광법, FT-IR 및 SEM 이미지로 레티날의 포집 여부를 확인하였다. 레티날과 HP-β-CD의 비율이 1 : 15 (w/w)일 때 약 95.6% 포집되었다. 레티날-HP-β-CD 복합체는 호모믹서 및 마이크로플루다이저로 리포솜에 담지시켰으며, 평균 입자 크기는 215.3 ± 4.2 nm, 제타포텐셜 -33.2 ± 1.5 mv로 나타났다. 레티날의 분해 안정도 평가에서, 물에서 레티날-HP-β-CD-리포솜의 레티날 감소율은 1.8%로 레티날-리포솜(5.8%), 레티날-HP-β-CD복합체(9.7%), 레티날 단독(37.6%)보다 높게 나타났다. 레티날-HP-β-CD-리포솜이 함유된 크림(0.05% RA 함유)을 제조하여, 미간, 이마, 목, 눈가, 입가, 팔자 주름개선 효능 및 피부 치밀도를 2 ~ 4 주간 평가하였다. 그 결과 레티날 크림은 피부 자극 없이 유의한 주름 개선 효과를 보였다. 결론적으로, DCL시스템을 이용한 이중 안정화 기술은 레티날의 안정화를 높여 피부 주름 개선 효과에 기여함을 확인하였다.

Abstract: Retinaldehyde (RA), vitamin A derivative, is an intermediate between retinol and retinoic acid and has an excellent wrinkle improving effect. In this study, Drug-in-cyclodextrin-in-liposome (DCL) was used to enhance the stability and skin penetration of RA. The complex of RA and hydroxypropyl-beta-cyclodextrin (HP-β-CD) was prepared by the freeze-drying method, and the presence or absence of inclusion of retinal was confirmed by UV-Vis spectrometer, FT-IR and SEM images. RA was captured in HP-β-CD about 95.6% on 1 : 15 (w/w). The retinal-HP-β-CD complex was encapsulated in liposomes using a homomixer and microfluidizer, with an average particle size of 215 ± 4.2 nm and a zeta potential of -31.2 ± 0.5 mv. In the evaluation of the degradation stability of RA, degradation rate of RA-HP-β-CD-liposomes in water was 1.8% higher than RA-liposome (5.8%), RA-HP-β-CD complex (9.7%) and RA alone (37.6%). RA cream (0.05% RA) including RA-HP-β-CD-liposomes was prepared for clinical test with wrinkle-improving efficacy and skin dermis denseness evaluated for 2 or 4 weeks. RA cream showed a significant wrinkle improving effect without skin irritation.

† 주 저자 (e-mail: jh_cos@kolmar.co.kr, jecniclous@kolmar.co.kr)
call: 02-3459-5512, 02-3459-5504

†† 교신저자 (e-mail: bhb@ajou.ac.kr)
call: 031-219-2618

In conclusion, it was confirmed that the double stabilization technology using the DCL system contributes to the effect of improving skin wrinkles by increasing the stabilization of retinal.

Keywords: retinoids, retinaldehyde, cyclodextrin, liposome, anti-aging

1. 서 론

레티노이드계 성분은 주름 개선 효과가 뛰어나다고 알려져 있으며 비타민A인 레티놀과 그 산화 형태인 레티알(retinaldehyde, RA)과 레티노익애씨드가 대표적이다. 레티노익애씨드는 레티노이드계 성분들 중에서 가장 주름개선 효과가 뛰어나지만 피부 자극이 심하여 의약 소재로만 사용되고 있다. 반면에 레티노익애씨의 환형형인 레티놀과 레티알은 레티노익애씨드에 비해 피부자극이 적어 화장품에 많이 이용되고 있다[1].

레티놀은 피부내에서 산화되어 레티알을 거쳐 레티노익애씨드로 전환되며(Figure 1), 최종적으로는 레티노익애씨가 핵수용체에 결합하여 주름 개선 효과를 나타낸다. 레티놀은 피부 표피내 분화 중인 각질 형성 세포에서 레티알보다 레티노익애씨드로 전환되는 속도가 약 11 배 늦고, 분화 중이지 않은 세포에서 레티알은 레티노익애씨드로 전환되

는 반면에 레티놀은 전환되지 않는다. 이로 인해 레티알은 레티노익애씨드와 유사한 주름 개선 효과를 내지만, 레티놀은 레티노익애씨드보다 약 20 배 효과가 낮게 나타났다[2,3].

레티알은 레티노익애씨드로 전환되어 항노화 효과를 나타낼 뿐만 아니라 레티알이 직접 항노화인자인 cellular retinoic acid binding protein-II (CRABP-2)의 발현을 증가시켜 MMP-2 발현의 감소 및 진피 섬유아세포의 증식으로 주름 개선 효과를 나타낸다. 또한, 표피 두께 증가, 각질 형성 세포 결합 단백질인 transglutaminase, filaggrin 및 involucrin을 증가시켜 피부 장벽을 강화할 수 있다[4]. 그 외에도 레티알은 멜라닌 생성 억제, 항산화 및 항염증 효과, 미백 효과 및 상처 치유 효과가 있다고 알려져 있다[5].

레티알의 용해도를 높이기 위해 수용성 담지체인 사이클로덱스트린을 사용했다. 사이클로덱스트린은 6 개 또는 그 이상의 D-glucopyranose 분자가 결합된 고리형 올리고당으로 내부는 소수성, 외부는 친수성을 띠고 있다[6-8]. 사

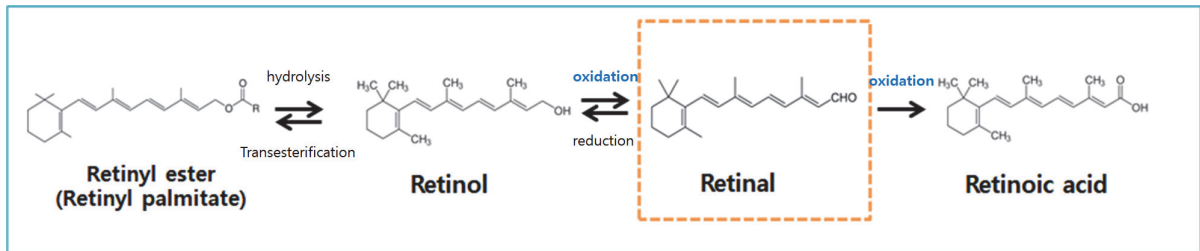
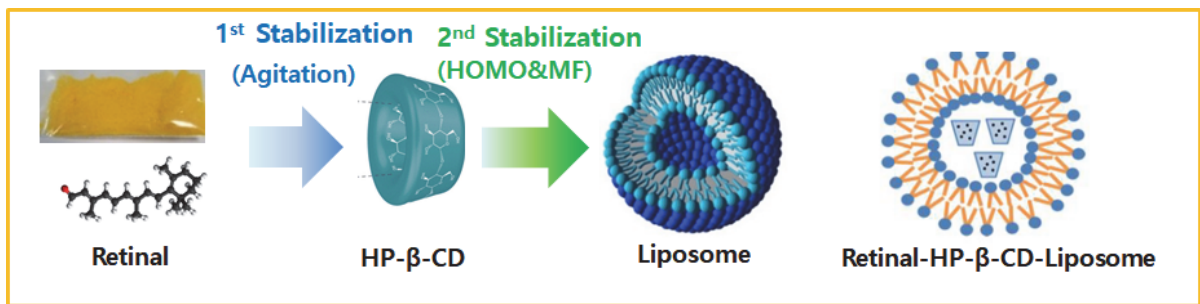


Figure 1. Chemical structure of retinoids.



* HP-β-CD: Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin

Figure 2. Drug-in-cyclodextrin-in-liposome (DCL) technology.

이클로덱스트린은 소수성 약물을 포접하여 용해도 및 안정성을 향상시키고 약물 방출을 제어할 수 있다[9,10]. 그 중에서 하이드록시프로필- β -사이클로덱스트린(HP- β -CD)은 용해도 및 높은 안전성으로 의약 및 식품 등에도 널리 사용되고 있다[11,12].

리포솜은 잘 알려진 약물전달체로 세포막과 유사한 지질 이중층과 주변의 수상구획으로 구성되어 있으며, 낮은 독성, 생체 친화성(biocompatibility) 및 생분해성(biodegradability)이 높고, 소포체 내부에 친수성 및 소수성 물질을 모두 담지할 수 있어 다양한 응용을 기대할 수 있다[13-16]. 그러나 리포솜은 지용성 약물 담지 시 라멜라 구조의 지질 이중층 내부에 함유되어 구조적 불안정성을 유발하며, 리포솜 코어에 존재할 때보다 외부로 약물이 새어나갈 수 있다[17,18]. 이러한 결점을 극복하고 약물과 물과의 접촉을 차단하기 위해 약물을 사이클로덱스트린으로 포접시켜 1차 안정화하고 이를 리포솜의 친수성 중심부에 2중 안정화하여 담지한 “drug-in-cyclodextrin-in-liposome (DCL)” 시스템이 연구되고 있다[19-21].

본 연구에서는 물에서 안정도가 좋지 않은 레틴알을 용해도가 우수한 HP- β -CD에 포접하여 1차 안정화된 레틴알-HP- β -CD 복합체를 제조하고, 이를 리포솜에 포접하여 2중 안정화함으로써 물로부터 레틴알을 보호하고 안정화하여 주름개선 효능을 증진시키고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험 재료

레틴알(> 98%)은 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하였다. 리포솜 제조에는 레시틴(Lipoid S75, Lipoid, Germany)과 콜레스테롤(Cholesterol JP, Nippon Fine Chemical Co., LTD, Japan)을 사용하였다. HPLC (high-performance liquid chromatography)는 Shimadzu (Japan)사 제품을 사용하였으며, HPLC 용매로 사용한 메탄올, 정제수, 아세트나이트릴 및 sodium hexanesulfonate는 Sigma-Aldrich (USA) 제품으로 모두 HPLC 급을 사용하였다. 리포솜을 제조하기 위하여 호모믹서(T.K. Auto homomixer mark II 2.5, Tokushukika, Japan)와 고압분산기(Nanodisperser, ISA-NLM100, Ilshin autoclave, Korea)를 사용하였다. 입자크기, 제타 포텐셜 및 다분산지수(polydispersity index, PDI) 측정을 위해 입도제타사이저(Otsuka ELS-Z2, Otsuka Electronics, Chiba, Japan)를 사용하였다. 레틴알과 hydroxypropyl- β -cyclodextrin는 98% 이상의

순도로 Sigma-Aldrich (USA)사의 제품을 사용했다.

2.2. HPLC 분석

레틴알(RA)을 정량하기 위해 이동상 용매로 0.1% formic acid가 포함된 H₂O (A-용매)와 100% acetonitril (ACN, B-용매)으로 구성되었다. HPLC 분리조건으로 유속은 1 mL/min, 시료는 20 μ L를 주입하여 A-용매 10 ~ 0%, B-용매 90 ~ 100%로 농도에 변화를 주어 수행하였다. Column 오븐 온도는 40 $^{\circ}$ C로 설정하고 UV wavelength는 390.8 nm로 고정하여 수행하였다. 농도별 RA 표준용액을 이용하여 상기의 HPLC 조건에 따라 표준 검정 곡선을 얻어 제형 내 존재하는 RA 양을 정량하였다

2.3. 레틴알-HP- β -CD복합체 제조

레틴알과 CD 복합체는 freeze-drying 방식을 통해 제조하였다[13]. 레틴알과 HP- β -CD를 중량비(w/w) 1 : 1 ~ 15로 넣고 50% 에탄올로 전체 100 g이 되도록 녹인 후, 빛 차단 하에 상온에서 300 rpm으로 1 h 동안 이지믹서(Agitator 2.5, Sinwon ENG, Korea)로 교반시킨다. 그 후, 감압 증류하여 파우더로 만들고 현탁액에서 복합체에 포집되지 않은 여분의 레틴알을 제거하기 위해 원심분리 후 상층액을 제거하였다. 침전물을 물에 재용해 후 -60 $^{\circ}$ C에서 24 h 동안 냉동시키고, 동결건조기(Ilshin biobase, Seoul, Korea)로 동결 건조시켜 복합체 파우더를 얻었다. 제조된 복합체 파우더를 50% ACN에 섞어서 녹이고 상층액을 분리하여 HPLC를 이용하여 복합체에 포집된 레틴알의 양을 정량하였다.

2.4. Fourier Transform Infrared (FT-IR) 분광법

레틴알, HP- β -CD 및 레틴알-HP- β -CD 복합체는 FT-IR (Nexus Nicolet FT-IR, Thermo Scientific, Idstein, Germany)로 측정하였다. Smart Orbit ATR accessory인 diamond crystal 와 Omnic 8.0 software를 사용하여 400 ~ 4,000 cm^{-1} 범위에서 32 번 스캔하여 측정하였다.

2.5. Scanning Electron Microscopy (SEM) 이미지 분석

레틴알이 HP- β -CD에 잘 포집되었는지 확인하기 위해 Field-emission scanning electron microscopy (FE-SEM, Inspect F, FEI Corporation, USA)으로 입자를 촬영하였다. 건조된 시료를 금속 스티브에 붙은 양면 카본테이프에 묻힌 뒤, 전도도를 부여하기 위해 금으로 시료 표면을 코팅하고 진

공하에서 20 kV의 가속전압에서 이미지를 촬영하였다.

2.6. 레티알-HP-β-CD-리포솜

레티알-HP-β-CD 복합체를 포함한 리포솜을 제조하기 위하여 레시틴과 콜레스테롤을 포함한 유상부와 수상부인 물을 각각 60 ~ 65 °C로 가온하여 용해시킨 후 수상에 유상을 첨가하면서 호모믹서로 6,000 rpm, 5 min 동안 유회시켜 리포솜을 제조하고 40 °C로 냉각하였다. 리포솜의 비율은 Table 2과 Table 3을 따라 제조되었다. 제조된 리포솜을 40 ~ 45 °C에서 압력 700 bar, 통과 횟수 2 회 조건으로 고압유회 처리하여 레티알-HP-β-CD-리포솜을 제조하였다.

2.7. 리포솜 입자 크기 및 제타포텐셜 측정

레티알-HP-β-CD-리포솜(RA-HP-β-CD-liposome)의 입자 크기와 입도 분포는 dynamic light scattering을 이용하여 입자 크기를 분석하였다. 측정온도는 25 °C, 산란각은 165°, 광원은 Ar 레이저를 사용하였으며, 리포솜의 입자크기는 70 번씩 3 회 측정하였다. 평균 입자크기는 누적 분석법을 이용하였으며, 제타포텐셜은 10 번씩 3 번 측정하여 평균하였다.

2.8. 레티알 포집 효율 측정

레티알의 포집 효율을 측정하기 위해 완성된 리포솜 현탁액의 일정량을 취하고 원심분리(10,000 rpm, 30 min)하여 상층액에 포집되지 않은 레티알을 제거한다. 침전물에 에탄올을 이용하여 분산시킨 후 회전 증발기를 이용하여 증발시키고 다시 1 mL의 에탄올을 넣어준다. UV-VIS spectrometer (Cari 50, Varian, Australia)를 이용해 리포솜에 포집된 레티알을 정량 분석하였다. HPLC를 이용하여 농도별 레티알의 검량선을 작성하여 리포솜 내에 포집된 레티알의 농도를 산출하였고, 레티알의 포집 효율은 다음에 나타난 식 (1)에 의해 계산하였다.

$$\text{Entrapment efficiency (EE\%)} = \frac{(RA_T - RA_F)}{RA_T} \times 100 \quad (1)$$

RA_T : 처음 넣어준 RA 의 농도

RA_F : 리포솜에 포집되지 않은 free 한 RA 의 농도

2.9. 리포솜의 저장 안정성

제조된 리포솜들의 저장 안정성을 확인하기 위해 리포

솜 현탁액을 4 주 또는 8 주간 4 °C에서 냉장 보관하며 관찰하였다. 4 주간 입자 크기, 제타포텐셜 및 다분산 지수(PDI)값 변화를 측정하였으며 침전 형성의 여부를 관찰하였다. 보관 기간 동안 유의적인 변동차이가 있을 경우 부적합 처리하였다.

2.10. 주름 개선 임상 시험

본 임상시험은 피엔케이피부부임상연구센터(주)(P&K Skin Research Center, PNK-20810-K1R1)에 의뢰하여 진행하였으며, 임상기관 실험 규정 및 임상시험 실시 기준에 따라 실시되었다(IRB Number. P2008-1349). 일반적으로 남성보다 여성이 화장품 사용량이 많기 때문에 여성피험자를 모집했다. 만 25 ~ 55 세 한국 성인여성들 중 이마, 미간, 눈가, 팔자, 입가, 목주름이 있고 피부질환 및 신체 질환이 없는 건강한 지원자 34 명을 대상으로 실시되었다. 미세 잔주름, 탄력, 볼 리프팅, 피부 치밀도, 피부 탄성회복력(스프링효과) 개선에 대한 효과를 평가하였다. 레티알의 함유량을 500 ppm 이 되도록 레티알-HP-β-CD-리포솜이 함유된 크림을 제조하였다. 이 크림을 매일 아침, 저녁 세안 후 얼굴 펴발라 흡수시켜 사용하였다. 이 크림을 피부에 처리하고 2 주 및 4 주 후에 주름 개선 효능 평가를 실시하였다. 피험자는 크림을 사용하는 기간 동안 피부에 이상 반응을 나타내지 않았다.

2.11. 평가 부위 및 측정 방법

기기적 평가를 위하여 시험대상자는 실내온도 20 ~ 25 °C, 습도 40 ~ 60%의 항온 항습조건인 대기실에서 30 min 동안 안정을 취하여 피부 표면 온도와 습도를 측정 공간의 환경에 적응하게 하였으며, 안정을 취하는 동안에는 수분 섭취를 제한하였다. 객관적 측정을 위하여 연구자 1 인이 측정하였으며, 매 측정 시 동일한 부위를 측정하였다.

2.12. 눈가, 이마, 미간, 팔자, 입가, 목잔주름측정

눈가, 이마, 미간, 팔자, 입가, 목 잔주름 측정은 3D 피부 촬영 장치인 Antera 3D CS (Miravex Ltd., Ireland)를 이용하여 시험제품 사용 전후에 동일한 좌측 눈가, 이마, 미간, 좌측팔자, 좌측입가, 목 부위 주름을 촬영하였다. 저장된 이미지를 wrinkle 모드 중 small 모드로 변경한 다음, 특정 영역을 지정하여 범위내 주름의 거칠기를 분석하였다. 눈가, 이마, 미간, 목주름은 원형의 범위로 평균 거칠기를 분석하여 단위는 단위 상수인 arbitrary unit (A.U.)이며 분석값이 줄어 들수록 주름이 개선됨을 의미한다. 팔자, 입

가 주름은 주름을 따라 그린 선형의 범위로 평균거칠기를 분석하여 단위는 mm로 분석값이 줄어들수록 주름이 개선됨을 의미한다.

2.13. 피부 치밀도 평가

피부 치밀도 측정은 skin scanner DUB-USB (TPM taberna pro medicum, Germany)를 이용하여 제품 사용 전후에 동일한 좌측 눈가 부위를 측정된 화상을 통해 피부 치밀도를 분석하였다. 피부 치밀도의 측정 파라미터는 density이며, 단위는 %이다. Density(%) 값이 증가할수록 피부 치밀도가 개선됨을 의미 한다.

2.14. 통계방법

본 실험에서 측정된 결과는 평균과 표준편차로 나타냈으며, 분석결과 통계처리는 one-way ANOVA를 수행하여, p 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의적인 결과로 판단 하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 레티날(RA)-HP-β-CD 복합체의 포접 분석

RA-HP-β-CD 복합체 제조의 최적 비율을 확인하기 위해 레티날과 HP-β-CD를 1 : 1 ~ 15 (w/w) 비율로 변경해가며 복합체(#1 ~ #5)를 제조하였다(Table 1). 복합체#4 와 복합체#5의 레티날 포접율은 90% 이상 나타났으며, HP-β-CD 함량이 가장 많은 복합체#5는 95.6%로 가장 높게 나타났다. 그 이상의 농도에서는 큰 편차를 보이지 않았다. 이론적으로 레티날과 HP-β-CD의 이상적인 포접 비율을 몰랄 비율 1 : 2로 보고되고 있으며[22], 복합체#4의 비율이 이와 유사하다. 레티날의 긴 탄소사슬이 HP-β-CD 2 개에 들어간 형태이다(Figure 3). 상대적으로 작은 분자량을 갖는 caffeic acid은 사이클로덱스트린과 1 : 1로 포접한다고 알려져 있다[23]. 이론상 1 : 2 비율이 가장 이상적이거나 포접 환경(시간, 온도, 용매) 조건에 따라 최적 포접율이 다른 것

으로 사료된다. 본 연구에서는 실용적인 생산성을 추구하기 위하여 1 h으로 기존에 진행되던 포접 방법보다 시간이 짧아 HP-β-CD의 함량이 더 많이 필요한 것으로 사료된다.

FT-IR 분석에서 레티날의 카복시기(-COOH)의 피크가 RA-HP-β-CD 복합체 형성으로 1644 cm⁻¹에서 1672 cm⁻¹로 이동되었다(Figure 4). 이는 레티날의 카르복시기의 수소원자가 HP-β-CD 외벽에 존재하는 하이드록시기(-OH)와 수소 결합하여 피크가 이동된 것으로 사료된다[24]. 복합체#5의 포접 상태를 확인하기 위해 파장 분석을 진행하였다. 레티날-HP-β-CD 복합체의 최대 흡광도(λ_{max})는 레티날보다 왼쪽으로 이동되었으며(390.8 nm > 371.1 nm), HP-β-CD 파장은 나타나지 않았다. SEM 이미지 분석에서 레티날은 각진 사다리꼴 형태를 띄었고, HP-β-CD는 둥근 형태를 보였다(Figure 5). 그러나 복합체#5인 RA-HP-β-CD는 HP-β-CD와 동일한 둥근 형태가 나타났다. 이는 레티날과

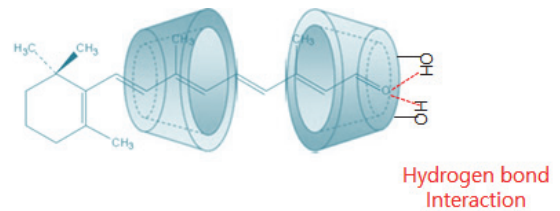


Figure 3. Theoretical inclusion form of RA-HP-β-CD complex.

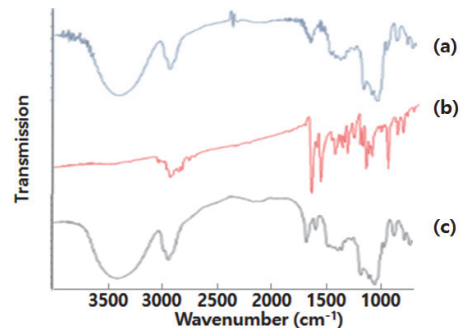


Figure 4. Fourier transform-infrared (FT-IR) spectra. (A) HP-β-CD, (B) Retinal, (C) RA-HP-β-CD complex.

Table 1. Entrapment Efficiency of Retinaldehyde with Different Ratios of RA-HP-β-CD Complex

		#1	#2	#3	#4	#5
Ingredients	RA (g)	1	1	1	1	1
	HP-β-CD (g)	1	2	5	10	15
Solution	50% Ethanol	to 100	to 100	to 100	to 100	to 100
Entrapment efficiency (%)		4.2 ± 3.3	10.1 ± 3.5	48 ± 3.2	91.2 ± 5.1	95.6 ± 3.5

HP- β -CD이 포접되어 레티날의 특징은 사라지고, HP- β -CD의 특징이 나타나는 것으로 사료된다[25]. 레티날과 복합체#5를 물에 분산 하였을 때 레티날은 물에 분산되지 않고 표면에 떠 있다가 가라앉았고, 복합체#5는 넣자마자 물에 분산되었다(Figure 6). 이 결과들을 통해 복합체#5는 레티날이 HP- β -CD 내부로 완전히 포접 되었음을 확인할 수 있었으며 이를 최적 조건으로 선정하였다.

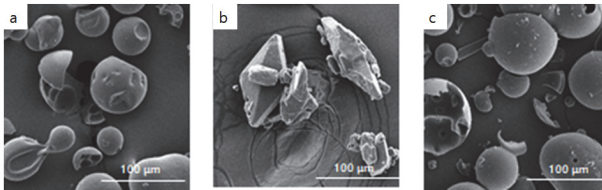


Figure 5. Scanning electron microscope (SEM) image. (A) HP- β -CD, (B) Retinal, (C) RA-HP- β -CD complex.

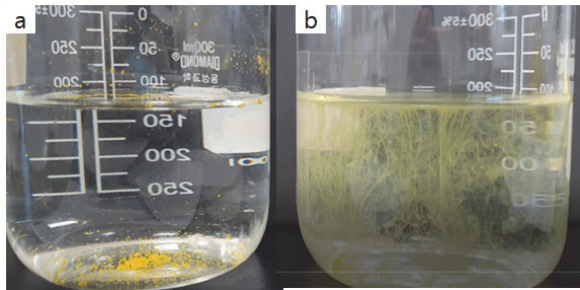


Figure 6. Solubility of retinal in water. (A) Retinal, (B) RA-HP- β -CD complex.

3.2. 레티날(RA)-HP- β -CD-리포솜의 특징

3.2.1. 리포솜 특징 및 안정성

RA-HP- β -CD-리포솜을 제조하기 위해 리포솜에 대한 복합체#5의 최적 포집 조건을 확인하였다. 복합체#5와 레시틴의 비율을 1 : 1 ~ 4 (w/w)로 조절하여 리포솜 #5-1부터 #5-4을 제조하였다(Table 2). 리포솜의 입자 크기는 215.2 ~ 362.4 nm, 제타포텐셜 -25.2에서 -35.1 mv로 나타났다. 레시틴 함량이 적을수록 리포솜의 입자가 커지는 경향을 나타냈다. 또한 입자가 클수록 균일하지 않았으며 복합체#5-1은 제타 포텐셜도 -25 mv로 안정적인 ± 30 mv 전하보다 낮아 다른 복합체들에 비해 안정도가 좋지 않았다. RA-HP- β -CD 복합체와 레시틴 비율이 1 : 3 및 1 : 4 인 복합체#5-3, #5-4가 안정적으로 나타났다. 그러나 그 이상의 레시틴을 첨가하였을 경우 고압 유회 과정에서 젤링 현상이 나타났다.

3.2.2. 리포솜의 포집효율

포집 효율 평가에서, RA-HP- β -CD-리포솜은 레시틴의 함량이 높아질수록 레티날 포집 효율이 높아졌으며, 복합체 #5-4에서 레티날 포집효율이 65%로 가장 높게 나타났다(Table 2). 이전 연구에서 콜레스테롤이 사이클로덱스트린과 상호작용하여 리포솜에 잘 부착되도록 도와준다고 알려져 있다[26]. 이에 RA-HP- β -CD-리포솜 대비 콜레스테롤 함량(1 ~ 15%)을 조절하여 리포솜#5-4-1부터 #5-4-4를 제조하고 레티날 포집효율을 평가하였다(Table 3). RA-HP- β -CD-리포솜에 함유된 콜레스테롤 함량이 많아질수록 입자의 크기가 커지고, 레티날 포집 함량이 증가했다. 특히,

Table 2. Formula for RA-HP- β -CD-Liposome with Different Complex Conditions

	#5-1	#5-2	#5-3	#5-4
Complex #5 : Lecithin (w/w)	1 : 1	1 : 2	1 : 3	1 : 4
Particle Size (nm)	362.4 \pm 15.1	266.4 \pm 10.6	235.5 \pm 5.2	215.2 \pm 4.2
Zeta potential (mv)	-25.2 \pm 8.2	-26.0 \pm 5.2	-35.1 \pm 1.4	-33.2 \pm 1.5
Polydispersity index (PDI)	0.55 \pm 0.10	0.42 \pm 0.08	0.33 \pm 0.04	0.23 \pm 0.05
Encapsulation efficiency (%)	33.3 \pm 6.1	36.2 \pm 2.2	56.1 \pm 4.5	65.2 \pm 3.2
Stability (25 °C, 4 weeks)	X	X	O	O

Table 3. Formula for RA-HP- β -CD-Liposome with Different Cholesterol Ratios

	#5-4-1	#5-4-2	#5-4-3	#5-4-4
Cholesterol ratio (%) in RA-HP- β -CD-Liposome(w/w)	1	3	5	10
Encapsulation efficiency (%)	71.1 \pm 3.5	77.2 \pm 2.1	79.3 \pm 2.2	81.2 \pm 3.5

리포솜#5-44에서 $81.2 \pm 3.5\%$ 로 가장 높게 나타났다. 이는 콜레스테롤의 복합체내 작용하는 상호작용 외에 콜레스테롤이 리포솜의 지질부분에 포집되면서 리포솜 크기가 커지면서 중심부에 포집할 수 있는 공간의 크기가 증가하여 포집 효율 증가에 도움을 주었을 것으로 사료 된다. 그러나 콜레스테롤 함량 10% 이상 추가한 경우 리포솜에 함유되지 않은 콜레스테롤이 석출되어 리포솜 안정성이 좋지 않았다. 레티날의 포집 효율이 100%가 나오지 않았는데, 그 이유로는 RA-HP-β-CD 복합체를 리포솜에 넣는 과정에서 가온 및 가압 과정으로 인해 레티날이 일부 손실되는 것으로 사료된다. 이 결과들을 통해 적정량의 콜레스테롤이 리포솜내로 사이클로덱스트린 복합체가 포집되는데 도움을 주는 것을 확인 하였으며, 결과들을 토대로 리포솜 #5-44을 최종 RA-HP-β-CD-리포솜으로 선정하였다.

3.2.3. 물에서의 레티날 안정성

레티날(RA)-HP-β-CD 복합체 및 리포솜의 분해 안정성을 측정하기 위해 제형들을 물에 분산하고 24 h 후 레티날 함량을 측정했다(Figure 7, 레티날(in 20% ethanol))은 물에

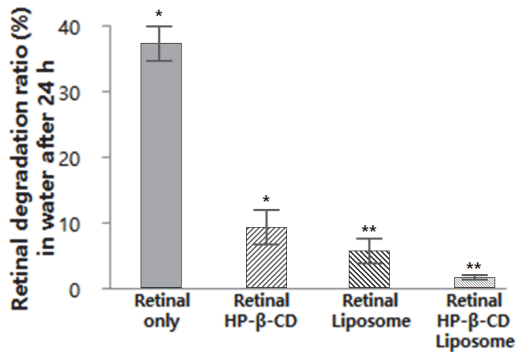


Figure 7. Degradation ratio of retinal with different formulas after 24 h in water. The results were expressed as the mean ± SD, **p* < 0.05, ***p* < 0.01, compared with retinal only.

서 37.6% 감소했다. 이에 반해 레티날(RA)-HP-β-CD-리포솜은 1.8%로 RA-HP-β-CD 복합체(9.6%) 레티날 리포솜(5.8%)보다 현저히 낮은 분해율을 나타냈다. HP-β-CD에 레티날이 포집되었지만, 산화 가능한 카복시기가 물에 노출되어 있으며, 이와 달리 리포솜은 레티날을 전체적으로 덮어 상대적으로 물과의 접촉을 차단시킬 수 있어 조금 더 산화를 방지하는 효과를 나타낸다. 본 연구를 통해 이중 안정화된 RA-HP-β-CD-리포솜이 각각을 1개만 적용했을 때보다 레티날 안정화 효과가 뛰어난 것을 확인하였다.

3.3. 피부 잔주름 개선 효과

레티날(RA)-HP-β-CD-리포솜을 함유한 크림(레티날 0.05% 함유)을 제조하여, 매일 2 회 2 주간 얼굴에 바르고 피부 주름 상태를 측정 했다. 미간, 이마, 목, 눈가, 입가, 팔자 잔주름에 대해 각각 7.93%, 7.54%, 5.07%, 6.01%, 6.81%, 10.81%로 유의한 주름 개선 효과를 나타냈다(Table 4). 피부 치밀도 평가에서는 레티날 크림을 바르고 평균적으로 2주 후 5.14% 4 주 후 9.54% 유의하게 증가하였다(Figure 8). RA-HP-β-CD-리포솜을 함유한 크림은 피부 자극 없이 피부 진피층을 채워 주름 개선에 도움을 주었음을 확인하였다.

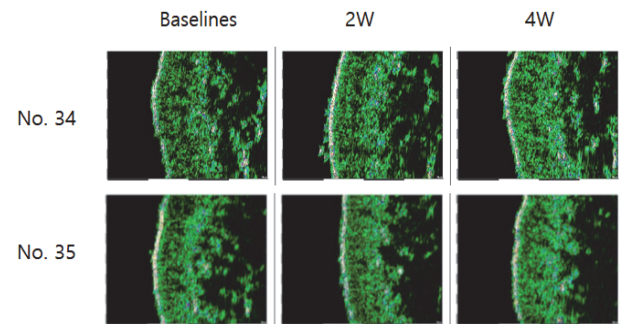


Figure 8. Effect of the test product on dermis denseness. *N; trial subject number

Table 4. Evaluation of the Targeted Facial Areas

	Glabellas (A.U.)	Forehead (A.U.)	Neck (A.U.)	Crows feet (A.U.)	Perioral (mm)	Nasolabial folds (mm)
D0	0.063 ± 0.027	0.053 ± 0.018	11.872 ± 3.001	14.472 ± 3.753	0.044 ± 0.012	0.037 ± 0.011
D14	0.058 ± 0.027	0.049 ± 0.017	11.270 ± 2.828	13.602 ± 3.293	0.041 ± 0.012	0.033 ± 0.010
ΔD0-D14, %	7.937	7.547	5.071	6.012	6.818	10.811

*arbitrary unit (A.U)

4. 결 론

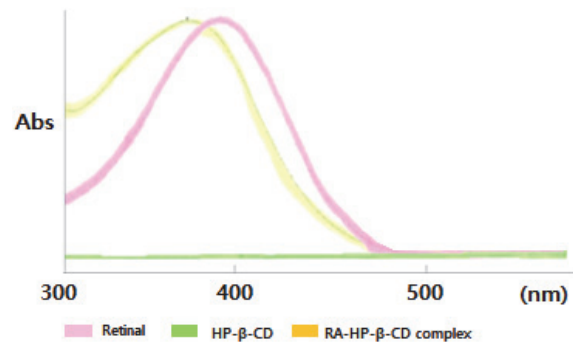
레티날이 HP- β -CD에 포접되는 최적 비율을 확인하였다. 레티날 포접율은 HP- β -CD 함량이 많을수록 높았으며, 레티날과 HP- β -CD의 비율이 1 : 15 (w/w)에서 가장 높게 나타났다. 레티날-HP- β -CD복합체의 포접여부는 FT-IR과 UV-VIS 스펙트럼을 통해 레티날의 단독 파장과 복합체 파장의 이동으로 확인할 수 있었다. SEM이미지에서 레티날은 HP- β -CD에 포접된 후 레티날의 특징이 사라진 것을 확인하였다. 실제 레티날과 레티날-HP- β -CD 복합체를 물에 풀었을 때 레티날은 물에 분산되지 않고 위에 잔류하는 반면에, 레티날-HP- β -CD 복합체는 물에 잘 분산되는 것을 확인함으로써 잘 포접되었음을 알 수 있었다.

리포솜으로 2 차 안정화한 레티날-HP- β -CD-리포솜은 레티날-HP- β -CD 복합체와 레시틴의 중량비가 1 : 3 및 1 : 4 (w/w)에서 입자 크기 및 제타포텐셜이 안정적이었으며, 그 이상의 레시틴을 추가하였을 때는 제조 시 겔링되는 현상을 나타냈다. 특히 중량비가 1 : 4인 복합체 #5-4는 레티날 포집효율이 65%로 가장 높았다. 사이클로덱스트린과 리포솜의 상호작용을 도와준다고 알려진 콜레스테롤을 추가하였을 경우, 없을 때보다 레티날 포집효율이 약 16% 증가하였으며 입자의 안정성이 증가하였다. 최종 선정된 레티날-HP- β -CD-리포솜 #5-4-4는 레티날 및 레티날-HP- β -CD 복합체보다 물에서 레티날 분해율이 최대 37%까지 크게 감소함을 확인하였으며, 이는 레티날이 HP- β -CD로 1 차 안정화되고 리포솜으로 2 차 안정화되면서 물과의 접촉을 크게 차단한 것으로 사료된다.

레티날-HP- β -CD-리포솜을 함유한 크림은 피부 자극 없이 주름 개선 효과를 나타냈다. 특히 크림을 바르고 2 주 후 팔자 주름이 약 10%이상으로 크게 감소하였으며, 피부 치밀도는 4 주 후 9%이상 개선되었다. 일반적으로 레티노이드 계열의 성분들은 피부 자극 및 붉어짐 현상을 유발한다고 알려져 있다. 그러나 본연구에서 사용된 레티날-HP- β -CD-리포솜에서 그러한 부작용이 없었다. 이는 레티날-HP- β -CD-리포솜이 레티날을 서방형으로 방출하여 세포에 손상이 적을 것으로 사료된다.

본 연구를 통해 drug-in-cyclodextrin-in-liposome (DCL) 이 중 캡슐화 기술이 물에서 불안정한 레티날과 같은 유효성분의 안정성을 높이고 주름 개선 효능 증진에 기여함을 확인하였다. 이러한 결과를 바탕으로 DCL 기술이 유효성분의 안정화에 유용함을 확인하였으며, 물에서 불안정한 유효

성분들의 담지체로 활용 가능성이 높을 것으로 기대된다.



Supplement 1. UV spectrum of Retinal, RA-HP- β -CD and RA-HP- β -CD complex.

References

1. S. Gibbs, C. Backendorf, and M. Ponec, Regulation of keratinocyte proliferation and differentiation by all-trans-retinoic acid, 9-cis-retinoic acid and 1, 25-dihydroxy vitamin D3, *Arch. Dermatol. Res.*, **288**(12), 729 (1996).
2. S. Mukherjee, A. Date, V. Patravale, H. Christian Korting, A. Roeder, and G. Weindl, Retinoids in the treatment of skin aging: an overview of clinical efficacy and safety, *Clin. Interv. Aging*, **1**(4), 327 (2006).
3. G. Siegenthaler, J. H. Saurat and M. Ponec, Retinol and retinal metabolism. Relationship to the state of differentiation of cultured human keratinocytes, *Biochem J.*, **268**(2), 371 (1990).
4. J. H Saurat, L. Didierjean, E. Masgrau, P.A. Piletta, S. Jaconi, D. Chatellard-Gruaz, D. Gumowski, I. Masouy, D. Salomon, G. Siegenthaler, Topical retinaldehyde on human skin: biologic effects and tolerance, *J. Invest. Dermatol.*, **103**(6), 770 (1994).
5. J. Peter, J. Stanek and S. Gupta, Retinaldehyde cyclodextrin complex for topical skin therapy, *Glob. Dermatol.*, **2**(6), 232 (2015).
6. T. Loftsson and M. E. Brewster, Pharmaceutical applications of cyclodextrins: effects on drug permeation through biological membranes, *J. Pharm. Pharmacol.*, **63**(9), 1119 (2011).
7. J. Chen, W. L. Lu, W. Gu, S. S. Lu, Z. P. Chen, B. C.

- Cai, and X. X. Yang, Drug-in-cyclodextrin-in liposomes: a promising delivery system for hydrophobic drugs, *Expert. Opin. Drug. Deliv.*, **11**(4), 565 (2014).
8. B. McCormack and G. Gregoriadis, Drugs-in-cyclodextrins-in liposomes: a novel concept in drug delivery, *Int. J. Pharm.*, **112**(3), 249 (1994).
 9. M. C. Lira, M. S. Ferraz, D. G. da Silva, M. E. Cortes, K. I. Teixeira, N. P. Caetano, and N. S. Santos-Magalhes, Inclusion complex of usnic acid with β -cyclodextrin: characterization and nanoencapsulation into liposomes, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, **64**, 215 (2009).
 10. K. Cal and K. Centkowska, Use of cyclodextrins in topical formulations: practical aspects, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **68**(3), 467 (2008).
 11. F. Maestrlli, M. L. Gonzlez-Rodrguez, A. M. Rabasco, C. Ghelardini, and P. Mura, New drug-in cyclodextrin-in deformable liposomes formulations to improve the therapeutic efficacy of local anaesthetics, *Int. J. Pharm.*, **395**(1-2), 222 (2010).
 12. D. Chirio, R. Cavalli, F. Trotta, M. E. Carlotti, and M. Trotta, Deformable liposomes containing alkylcarbonates of γ -cyclodextrins for dermal applications, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, **57**, 645 (2007).
 13. N. Kaur, R. Puri, and S. K. Jain, Drug-cyclodextrin-vesicles dual carrier approach for skin targeting of anti-acne agent, *AAPS. Pharm. Sci. Tech.*, **11**(2), 528 (2010).
 14. G. M. E. Maghraby, A. C. Williams, and B. W. Barry, Oestradiol skin delivery from ultradeformable liposomes: refinement of surfactant concentration, *Int. J. Pharm.* **196**(1), 63 (2000).
 15. M. M. Elsayed, O. Y. Abdallah, V. F. Nagggar, and N. M. Khalafallah, Deformable liposomes and ethosomes: mechanism of enhanced skin delivery, *Int. J. Pharm.* **322**(1), 60 (2006).
 16. M. M. 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**(1-2), 1 (2007).
 17. E. H. Gokce, E. Korkmaz, E. Dellera, G. Sandri, M. C. Bonferoni, and O. Ozer, Resveratrol-loaded solid lipid nanoparticles versus nanostructured lipid carriers: evaluation of antioxidant potential for dermal applications, *Int. J. Nanomedicine.*, **7**, 1841 (2012).
 18. H. P. Singh, A. K. Tiwary, and S. Jain, Preparation and *in vitro*, *in vivo* characterization of elastic liposomes encapsulating cyclodextrin-colchicine complexes for topical delivery of colchicine, *Yakugaku Zasshi*, **130**(3), 397 (2010).
 20. M. S. Nagarsenker, L. Amin, and A. A. Date, Potential of cyclodextrin complexation and liposomes in topical delivery of ketorolac: *in vitro* and *in vivo* evaluation, *AaPs Pharm. Sci. Tech.*, **9**(4), 1165 (2008).
 21. J. Shaji and S. Iyer, Double-loaded liposomes encapsulating quercetin and quercetin beta-cyclodextrin complexes: preparation, characterization and evaluation, *Asian J. Pharm.*, **6**, 218 (2012).
 22. S. Muoz Botella, M. A. Martn, B. del Castillo, J. C. Menendez, L. Vzquez, and D. A. Lemer, Analytical applications of retinoid-cyclodextrin inclusion complexes. 1. Characterization of a retinal-beta-cyclodextrin complex, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **14**(8-10), 909 (1996).
 23. M. Zhang, J. Li, L. Zhang, and J. Chao, Preparation and spectral investigation of inclusion complex of caffeic acid with hydroxypropyl-beta-cyclodextrin, *Spectrochim Acta A. Mol. Biomol. Spectrosc.*, **71**(5), 1891 (2009).
 24. A. Delrivo, A. Zoppi, and M. R. Longhi, Interaction of sulfadiazine with cyclodextrins in aqueous solution and solid state, *Carbohydr. Polym.*, **87**(3), 1980 (2012).
 25. A. Gillet, F. Leconte, P. Hubert, E. Ducat, B. Evrard, and G. Piel, Skin penetration behaviour of liposomes as a function of their composition, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **79**(1), 43 (2011).
 26. Z. Hammoud, N. Khreich, L. Auezova, S. Fourmentin, A. Elaissari, and H. Greige-Gerges, Cyclodextrin-membrane interaction in drug delivery and membrane structure maintenance, *Int. J. Pharm.*, **564**, 59 (2019).