

## Edge Activator 에 따른 병풀추출물 함유 트렌스퍼좀의 물리화학적 특성과 피부흡수

이 은 희\* · 윤 경 섭\*\*†

\*제주대학교 화학·코스메틱스학과, 학생

\*\*제주대학교 화학·코스메틱스학과, 교수

(2023년 5월 18일 접수, 2023년 6월 19일 수정, 2023년 6월 28일 채택)

### Physicochemical Characteristics and Skin Absorption of Transfersomes Containing *Centella asiatica* Extract According to Edge Activators

Eun-hee Lee and Kyung-Sup Yoon<sup>†</sup>

Department of Chemistry and Cosmetics, College of Natural Sciences,  
Jeju National University, 102 Jejudaehak-ro, Jeju-si, Jeju-do 63243, Korea  
(Received May 18, 2023; Revised June 19, 2023; Accepted June 28, 2023)

**요 약:** 병풀추출물은 다양한 효능으로 인하여 화장품 원료로 많이 사용되지만, 분자량이 크고 용해도가 낮아 피부에의 흡수 효과를 기대하기 어렵다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 지질 기반 다양한 형태의 리포좀을 개발하여 피부흡수율을 높이고자 하였다. 이에 본 연구에서는 기존 리포좀에 edge activator로서 계면활성제를 사용하여 트렌스퍼좀을 제조함으로써 피부흡수율을 높이고자 하였다. 리포좀과 Span 80 및 Tween 20, 60, 80, 85를 각각 함유한 트렌스퍼좀을 high-pressure homogenizer를 이용하여 제조하였고, 입자크기, 다분산지수, 제타전위, 피부흡수율에 대하여 평가하였다. 그 결과, 25 °C에서 60 d까지 입자크기, 다분산지수 및 제타전위의 물성변화가 거의 없었으며, 45 °C에서는 60 d 경과 후에 Tween 20, 60, 80을 함유한 트렌스퍼좀의 입자크기가 증가하였다. Franz diffusion cell을 이용한 피부흡수율은 병풀추출물의 주요 성분 중 하나인 madecassoside를 지표 성분으로 사용하여 계산하였다. 그 결과, Tween 20을 함유한 제형에서 가장 흡수율이 높았으며, 반면에 Span 80을 함유한 제형에서 가장 적었다. 흡수계수(Kp) 값에 의하면 모든 제형에서 'very fast'로 나타났고, Span 80을 함유한 제형을 제외하고 리포좀보다 흡수 속도가 유사하거나 크게 나타났다. 이를 통하여 비이온성 계면활성제의 HLB 값이 클수록 트렌스퍼좀의 입자크기가 작았으며, 베시클 막의 유연성 향상으로 피부흡수율이 증가함을 확인하였다. 본 연구를 통해 edge activator로서 계면활성제를 사용한 트렌스퍼좀은 화장품 원료나 제품으로서뿐만 아니라 피부흡수율 증가로 피부의 국소적 문제 해결 가능성을 기대할 수 있다.

**Abstract:** *Centella asiatica* extract is widely used as a raw material for cosmetics due to its various effects, but it is difficult to expect penetration into the skin due to its high molecular weight and low solubility. In order to solve these problems, lipid-based liposomes of various types were developed to increase skin absorption. Therefore, in this study, we tried to increase the skin absorption rate by preparing transfersomes using surfactants as edge activators in existing liposomes. Liposome and transfersomes containing Span 80 and Tween 20, 60, 80, and 85, respectively, were prepared using a high-pressure homogenizer, and we evaluated the particle size, polydispersity index, zeta potential, and skin absorption rate. As a result, there was almost no change in the physical properties of particle size, polydispersity index and zeta

† 주 저자 (e-mail: ksyoonjh@jejunu.ac.kr)  
call: 064-754-3561

potential from 25 °C to 60 d, and the particle size of transfersomes containing Tween 20, 60, and 80 increased after 60 d at 45 °C. Madecassoside, main substances of the *Centella asiatica* extract was used as a standard and madecassoside was measured and calculated when measuring the skin absorption rate using Franz diffusion cells. As a result, formulations containing Tween 20 were the most, whereas formulations containing Span 80 were the least. According to the skin absorption coefficient (Kp) value, all formulations showed 'very fast', and the absorption rate was similar or greater than that of liposomes, except for formulations containing Span 80. Through this, it was confirmed that the larger the HLB value of the nonionic surfactant, the smaller the particle size of the transfersome, and the increased skin absorption rate due to the increased flexibility of the vesicle membrane. Through this study, transfersome using surfactant as an edge activator can be expected to solve local skin problems not only as a cosmetic raw material or product, but also by increasing skin absorption.

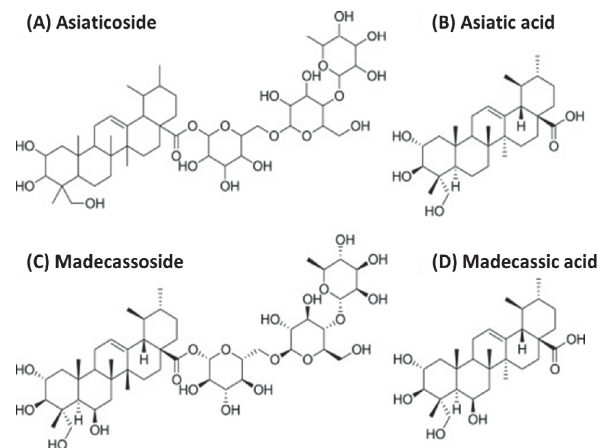
**Keywords:** *Centella asiatica*, edge activator, liposome, transfersome, skin absorption

## 1. 서 론

피부는 많은 외부 환경에 노출되어 있으며, 지속해서 자외선, 유해물질 등으로부터 자극받는다. 자외선은 신체 대사의 원동력이 되지만 지속적인 노출은 피부암, 광노화 및 염증 등 피부질환을 유발한다. 이러한 요인으로 인하여 피부의 진피층에 존재하는 섬유아세포의 작용이 감소하고 콜라겐, 엘라스틴 등의 구조 단백질의 합성량이 감소하며 피부의 수분이 손실된다[1]. 피부는 외부 환경으로부터 신체를 보호하고 수분의 손실을 막기 위한 역할을 하고 있으며, 각질층은 피부 최외각층에 존재하여 각질세포와 라멜라 막으로 구성된 지질이 풍부한 매트릭스로 구성되어 있어 피부장벽의 역할을 한다. 이는 외부 유해물질, 미생물 등에 의한 산화적 스트레스를 막아 우리 몸을 보호하지만, 분자량이 크고 난용성인 유용한 물질의 피부흡수는 기대하기 어렵다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 경피전달 시스템(transdermal delivery system)에 대한 연구가 이루어졌으며, 피부 구조와 유사한 지질 기반의 리포솜(liposome)에 관한 연구가 진행됐다. 리포솜은 인지질로 구성되어 지질 이중층을 형성하며 친수성과 소수성 물질을 동시에 담지할 수 있는 장점으로 인하여 의약품이나 화장품 산업에 많이 유용된다[2]. 그러나 베시클의 불안정성, 낮은 유화안정성 및 낮은 포집효율로 인하여 효과를 기대하기 어려운 경우가 많이 보고되고 있다[3,4]. 또한 효능성분이 피부에 깊게 침투하지 못하고 각질층의 위쪽 부분에만 존재하는 것으로 보고되고 있다[5]. 이러한 리포솜의 문제를 보완하기 위하여 1990년대 초 G. Ceve는 지질 이중층에 단일 사슬 계면활성제인 edge activator를 사용하여 베시클 막을 불안정하게 하여 막에 가변성을 형성하도록 하는 트랜스퍼솜(transfersome, TS)을 제안하였다[6]. 트랜스퍼솜은 인지

질과 edge activator로 나트륨콜레이트, 나트륨데옥시콜레이트, Tween 20, Tween 60, Tween 80, Span 60 또는 Span 80과 같은 양친매성으로 구성되어 소포체의 탄력성과 가변성을 가지게 된다[7-11]. 가변성을 가진 리포솜은 탄성을 가지게 되어 효능성분이 경표피 삼투압 기울기의 영향으로 각질층의 세포 간 지질 경로로 빠르게 침투할 수 있다고 보고되고 있다[10,12-14]. 이러한 트랜스퍼솜은 기존 리포솜에 비해 더 깊은 피부 침투를 기대할 수 있다고 보고된 바 있다[15,16].

본 연구에서 트랜스퍼솜 내 성분으로 사용한 미나리과 병풀속에 속하는 다년생 포복성 초본인 병풀(*Centella asiatica*)은 아프리카의 마다가스카르섬이 원산지로 알려져 있으며 남아시아와 인도네시아, 말레이시아와 함께 우리나라 제주도 및 남부 도서지방의 고온 다습한 환경에서도 자생하는 것으로 알려져 있다[17]. 병풀의 다양한 효능은 항산화[18,19], 항균[20], 항염증[21], 신경세포 보호[22], 주름



**Figure 1.** Main ingredients of *Centella asiatica*.

개선[23], 보습[24], 미백 및 자외선 차단[25], 피부각질 개선[26] 및 피부재생[27] 등 다양하게 밝혀져 있다. 병풀의 주요 효능성분인 madecassic acid, asiaticoside, asiatic acid, madecassoside는(Figure 1) 피부결합 조직인 섬유아세포와 glycosaminoglycans의 조절에 중요한 역할을 하며, 각화 세포를 유도하여 빠르고 건강한 피부로의 성장을 촉진해 준다고 보고되고 있다[17].

트랜스퍼솜에 사용되는 계면활성제는 고유 HLB (hydrophilic-lipophilic balance) 값을 가지며, W. C. Griffin에 의한 유화 실험을 통해 값을 구하였다[28,29]. 계면활성제는 한 분자 내에 친수기와 친유기를 동시에 가지고 있으며 이 비율, 화학적 구조 및 종류에 따라 계면활성제의 성질이 달라진다. 솔비탄 링에 고급지방산으로 에스터 반응시킨 sorbitan ester (Span) 계면활성제를 제조할 수 있고, HLB는 10 이하로 친수성이다. Sorbitan ester에 ethylene oxide를 부가시켜 제조한 PEGs sorbitan ester (Tween)은 HLB 10 이상으로 친수성 계면활성제이다[30]. Sorbitan ester 중 sorbitan monooleate (Span 80)은 알킬기 사슬 내 이중결합

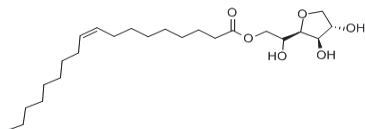
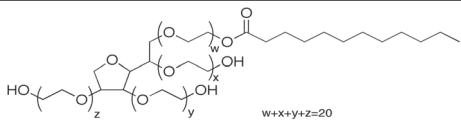
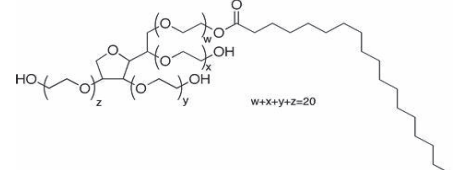
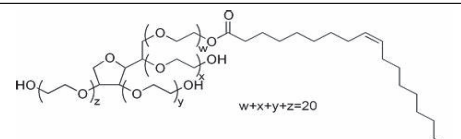
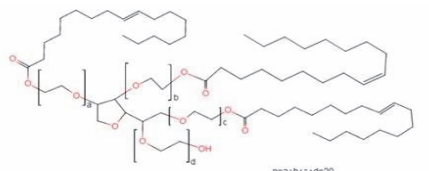
으로 존재하고, Tween 계열의 계면활성제 친수기는 에틸렌옥사이드 20 mol로 일정하며, 친유기의 탄소수에 따라 종류가 나뉘게 된다. Tween 20의 친유기에 평균 4개의 탄소가 증가하면 Tween 40이 되고, 다시 2개의 탄소가 증가하면 Tween 60이 된다. Tween 80은 Tween 60과 탄소수가 같으나 이중결합이 1개 존재하는 불포화 지방산인 oleic acid가 결합하고 있다. Tween 85의 경우 trans 형의 elaidic acid가 섞여 있는 구조이다(Table 1). 따라서 본 연구에서는 병풀추출물을 함유한 리포솜과 HLB 값이 다른 비이온성 계면활성제인 Span 80과 Tween 계열 4종을 edge activator로 하는 트랜스퍼솜을 제조하여 물성과 피부흡수율에 관한 연구를 진행하였다.

## 2. 재료 및 실험

### 2.1. 시약 및 기기

트랜스퍼솜을 만드는 데 사용한 인지질은 수소 첨가를 통해 불포화 성분이 없는 hydrogenated lecithin (Lipoid

**Table 1.** Structure and HLB Value of Edge Activator

No	Name	INCI	Structure	HLB value
1	Span 80	Sorbitan monooleate		4.3
2	Tween 20	Polysorbate 20		16.7
3	Tween 60	Polysorbate 60		14.9
4	Tween 80	Polysorbate 80		15.0
5	Tween 85	Polysorbate 85		11.0

S75-3, Lipoid, Germany)를 사용하였으며, edge activator로 계면활성제인 sorbitan monooleate (HLB 4.3, Span 80, Sigma, USA), polysorbate 20 (HLB 16.7, Rheodol TW-L 120V, Tween 20, Kao, Japan), polysorbate 60 (HLB 14.9, Rheodol TW-S120V, Tween 60, Kao, Japan), polysorbate 80 (HLB 15, Rheodol TW-O120V, Tween 80, Kao, Japan), polysorbate 85 (HLB 11, Tween 85, TCI, Japan)을 사용하였으며, 화학구조를 Table 1에 나타내었다. 병풀추출물의 주요 효능성분을 포함한 Centella quatro (Biospectrum, Korea)를 butylene glycol (1,3-Butylene glycol, Daicel, Japan)에 5%가 되도록 가온하여 녹인 후 사용하였고, 지표(효능)성분으로는 병풀의 주요 성분 중 madecassoside (Aladdin, China)를 사용하였다. Madecassoside는 Centella quatro에서 가장 많이 함유되어 있으며, 주요 성분 4종 중 가장 검출한계가 낮아[31] 지표 성분으로 선정하였다. 이외에 glycerin (Glycerin, Acid Chem Co., India)와 water (정제수)는 증류수 제조기(Pure RO 130, Human Co., Korea)에서 제조한 것을 ( $< 0.1 \mu\text{S/cm}$ ) 사용하였다. 언급되지 않은 다른 모든 화학 성분은 분석용 등급을 사용하였다.

## 2.2. 리포솜 & 트랜스퍼솜 제조

리포솜과 트랜스퍼솜을 제조하기 위하여 인지질인 Lipoid S75-3을 사용하였으며, 트랜스퍼솜에는 edge activator로 Span 80 및 Tween 20, 60, 80, 85를 인지질과 80:20의 비율로 구성된 된 유상(oil phase)과 5% Centella quatro로 구성된 수상(water phase)을 각각 70 °C까지 가온하여 용해한 후 유상에 수상을 천천히 넣고 homo-mixer (T.K. auto homomixer mark II 2.5, Tokushukika, Japan)을 사용하여 3,000 rpm의 속도로 5 min 동안 유평시켜 제조하

였다. 유평된 것을 S. J. Yang 등[32]의 방법을 참고하여 high-pressure homogenizer (nanodisperser, NLM1000, Ilshin autoclave, Korea)에 700 bar의 압력으로 2회 통과시켜 nano size의 리포솜과 트랜스퍼솜을 제조하였다(Table 2).

## 2.3. 온도별 제형 안정성 평가

제조된 리포솜과 트랜스퍼솜을 실온(25 °C), 항온(45 °C)에 보관하여 1, 30, 및 60 d (day) 동안 상분리, 색상 및 석출 여부에 대한 경시 변화를 관찰하였다. 제조된 리포솜과 트랜스퍼솜의 입자크기(particle size), 다분산지수(polydispersity index, PDI) 및 제타전위(zeta potential) 측정을 위해 dynamic light scattering 방식을 활용한 입도분석기(zetasizer nano ZS system, Malvern Instrument Ltd., UK)를 사용하였다. 측정은 리포솜과 트랜스퍼솜은 증류수에 10배 희석 후 진행하였으며, 온도는 25 °C로 일정하게 유지되도록 하였다.

## 2.4. Madecassoside의 HPLC 분석

병풀추출물의 지표 성분인 madecassoside의 함량을 C. Monton 등의 방법[33]을 변형하여 high performance liquid chromatography (HPLC, e2695, Waters, USA)로 분석하였다. 검출기는 PDA detector를 이용하여 202 nm로 측정하였으며, 유속 1.0 mL/min의 조건으로 분석하였다. 이동상으로 0.01% phosphate buffer와 acetonitrile을 이용하였고 gradient 로 이동상의 비율을 달리하여 분석을 진행하였다(Table 3).

## 2.5. *in vitro* 피부흡수 실험

병풀추출물을 함유한 리포솜과 트랜스퍼솜의 피부흡수율을 확인하기 위하여 T. I. Hyeon 등의 방법[34]을 변형하여 Franz diffusion cell system (HDC-6TD, Logan instruments,

**Table 2.** Preparation of Liposome & Transfersome (TS) Using Different Edge Activators (unit: wt %)

Part	Ingredient name	Liposome	TS-1	TS-2	TS-3	TS-4	TS-5
Oil phase	Lipoid S75-3	2.00	1.60	1.60	1.60	1.60	1.60
	Span 80	-	0.40	-	-	-	-
	Tween 20	-	-	0.40	-	-	-
	Tween 60	-	-	-	0.40	-	-
	Tween 80	-	-	-	-	0.40	-
	Tween 85	-	-	-	-	-	0.40
	Glycerin	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
Water phase	5% Centella quatro Stock sol.	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
	Water			up to 100			

USA)와 인공피부(Strat-M membrane 25 mm discs, Merck Millipore, USA)를 사용하였다. 각질층이 위로 향하도록 하여 적용칸(donor chamber)과 회수칸(receptor chamber) 사이에 고정하고 용매로 20% ethanol 수용액을 사용하였다. 실험이 진행되는 동안 온도를  $37 \pm 1$  °C로 유지하였으며 1, 2, 4, 8, 12 및 24 h 후 회수칸에서 용액을 채취하여, HPLC system을 이용하여 madecassoside의 함량을 분석하였다. 또한, 24 h 후 적용칸과 인공피부(membrane)에 흡수된 madecassoside 함량을 측정하기 위하여 methanol로 희석 후 분석하였다. 지표성분 고유의 흡수특성을 확인하기 위하여 피부 플럭스(Flux,  $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ )와 흡수계수( $K_p$ , cm/h)를 확인하였다. 흡수계수는 누적흡수량 그래프에서 정상상태(steady-state) 구간의 선형 회귀(linear region) 분석을 통해 계산하였으며, 피부 플럭스에서 지표성분의 초기 농도로

**Table 3.** HPLC Condition for Determination of Madecassoside

HPLC Condition			
Instrument	e2695 Waters, USA		
Column	Kromasil C18 column, 5 $\mu\text{m}$ , 4.6 $\times$ 250 mm (AkzoNobel, Netherlands)		
	Time (min)	Composition	
		0.01% Phosphate buffer (%)	Acetonitrile (%)
Mobile phase	5	80	20
	10	60	40
	12	40	60
	14	20	80
	20	80	20
Detector wavelength	UV 202 nm		
Injection volume	10 $\mu\text{L}$		
Flow rate	1 mL/min		
Column temperature	40 °C		
Run time	20 min		

**Table 4.** Penetrant Rating Chart for Permeability Coefficients

Absorption coefficient	Absorption rating
$K_p > 6 \times 10^{-3}$	Very fast
$6 \times 10^{-4} < K_p \leq 6 \times 10^{-3}$	Fast
$6 \times 10^{-5} < K_p \leq 6 \times 10^{-4}$	Moderate
$6 \times 10^{-6} < K_p \leq 6 \times 10^{-5}$	Slow
$K_p \leq 6 \times 10^{-6}$	Very slow

나누어 계산하였다. 흡수 정도는 F. N. Marzulli 등의 분류 기준에[35] 따라 확인하였다(Table 4).

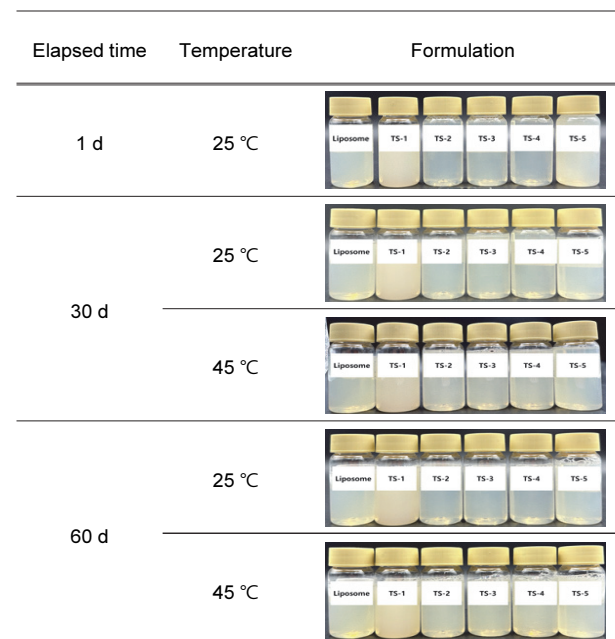
## 2.6. 통계적 검증

실험은 3회 반복 측정된 후 실험 결과를 평균값과 표준 편차로 나타내었다. 유의성은 student's *t*-test로 진행하였으며, 유의성에 따라 \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ 로 나타내었다.

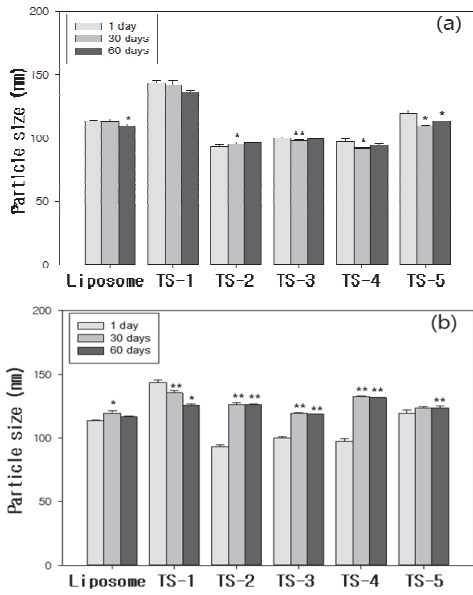
## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 온도별 관능평가 및 입자크기

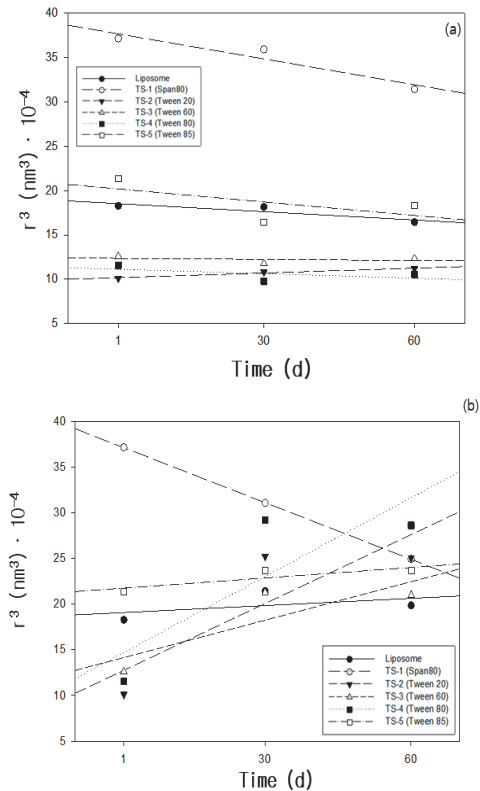
각각 제조된 리포솜과 트랜스퍼솜은 실온과 항온에 보관하여, 1, 30 및 60 d에 입자크기, 다분산지수, 제타전위 및 pH를 측정하며 경시변화를 관찰하였다. 실온에서 리포솜과 트랜스퍼솜의 입자크기는 초기 대비 60 d까지 큰 변화 없이 안정하였다. 친유성 계면활성제인 Span 80 (HLB 4.3)을 사용한 TS-1 (135 ~ 143 nm)와 Tween 85 (HLB 11)을 함유한 TS-5 (109 ~ 119 nm)는 Tween 20, 60, 80을 사용한 트랜스퍼솜(92 ~ 100 nm)보다 입자가 크게 나타났다. HLB 값이 작을수록 입자크기가 증가하는 경향을 나타내었다. 실온에서는 60 d 동안 크리밍(creaming), 응집(flocculation), 합일(coalescence)은 물론 오스트발트 라이프



**Figure 2.** Sensuality evaluation of liposome and transfersome after 1, 30, and 60 d at 25 °C and 45 °C.



**Figure 3.** Particle size data over time at (a) 25 °C and (b) 45 °C. The results were expressed as the mean ± SD (N = 3), \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 compared with each 1 d data.

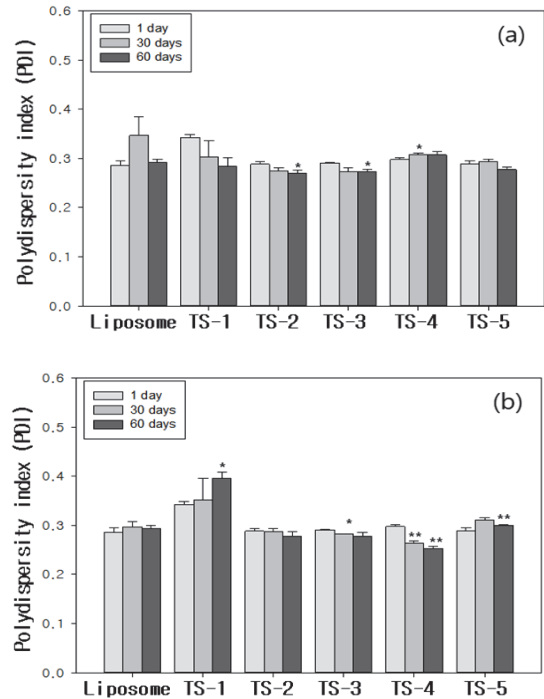


**Figure 4.** Plot of particle size ( $r^3$ ) versus elapsed time (day) at (a) 25 °C and (b) 45 °C.

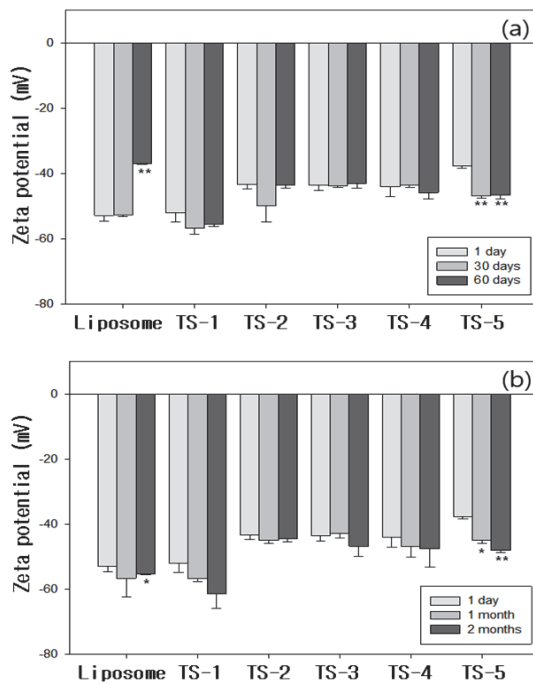
닝(Ostwald ripening) 현상에 견딜 수 있는 안정한 상태임을 알 수 있었다. 항온에서는 60 d 경과 후, 제형의 탁도가 증가한 것으로 관찰되었다(Figure 2).

Tween 계열의 계면활성제를 함유한 트랜스퍼졸(TS-2 ~ 5)은 유의하게 크기가 증가하였으며, Span 80을 함유한 트랜스퍼졸(TS-1)은 오히려 크기가 작아졌음을 확인하였다(Figure 3). 항온에서의 입자크기의 변화를 보면 리포솜과 TS-5는 큰 변화가 없었으며, TS-2 ~ 4는 시간이 지날수록 입자크기가 증가하는 경향을 보였다. 이는 비이온 계면활성제의 HLB 값이 큰 경우에, 작은 입자에서의 계면활성제가 매질에 좀 더 녹아들어 간 후 큰 입자에 흡착되어, 작은 입자는 더욱 작게, 큰 입자는 더욱 크게 커지는 오스트발트 라이프닝 현상에 의한 것으로 판단된다(Figure 4) [36-38].

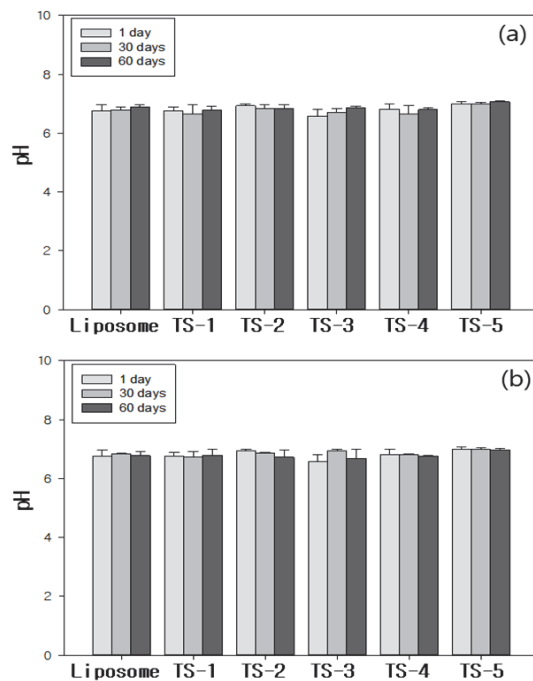
PDI 값은 0.25보다 큰 0.3 정도로 실온에서 60 d 동안 큰 변화가 없었으나, 항온에서는 60 d 경과 후에 Span 80을 함유한 TS-1의 값이 증가하는 것을 확인하였다(Figure 5). 이는 오스트발트 라이프닝 속도( $dr^3/dt$ , Figure 4)가 상대적으로 작아, 작은 입자와 큰 입자들이 공존하여 나타나는



**Figure 5.** PDI data over time at (a) 25 °C and (b) 45 °C. The results were expressed as the mean ± SD (N = 3), \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 compared with each 1 d data.



**Figure 6.** Zeta potential data over time at (a) 25 °C and (b) 45 °C. The results were expressed as the mean  $\pm$  SD (N = 3), \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  compared with each 1 d data.



**Figure 7.** pH data over time at (a) 25 °C and (b) 45 °C. The results were expressed as the mean  $\pm$  SD (N = 3).

현상으로 보인다. PDI의 값이 0.25 이하인 경우는 비교적 안정한 상태의 단분산에 가까운 입자 분포를 하는 것으로 알려져 있다[39].

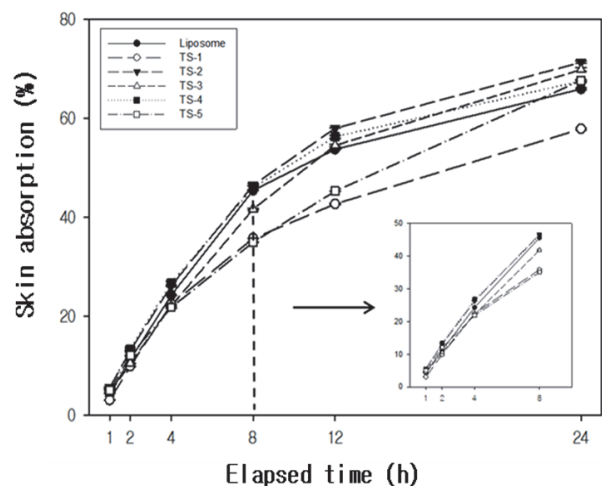
### 3.2. Zeta potential 및 pH

제타전위는 dynamic light scattering (DLS) 방식으로 측정하였으며, colloidal 계에서의 안정성은 입자 간의 Van der Waals force와 전기이중층에 의한 repulsive force로 결정된다. 모든 입자가 같은 전하를 띠고 있을 때, 서로 반발하는 경향을 보이며 서로 결합하려 하지 않아 응집현상이 잘 일어나지 않는다. 일반적으로  $\pm 30$  mV 이상일 때 안정하다고 판단한다[40]. 각각 제형에서 60 d 동안의 제타전위를 측정하는 결과, 실온에서 60 d 경과 후에 리포좀에서는 감소 경향을 보였으며, 트랜스퍼좀에서는 큰 변화가 나타나지 않았다. 항온에서는 60 d 경과 후에 값이 증가하는 경향을 보였지만 모두  $\pm 30$  mV 이상의 값으로 확인되어 정전기적으로 안정하다고 판단되었다(Figure 6).

리포좀과 트랜스퍼좀의 pH 결과에서는 60 d 동안 실온과 항온에서 변화가 없이 pH 6.64 ~ 7.06 정도로 측정되었다(Figure 7).

### 3.3. 피부흡수율(skin absorption rate) 및 피부흡수 플럭스(Flux)

병풀추출물을 함유한 리포좀과 트랜스퍼좀의 피부흡수율을 비교하기 위하여 Franz diffusion cells system을 이용하



**Figure 8.** Cumulative skin absorption rates of madecassoside. The results were expressed as the mean  $\pm$  SD (N = 3). The small graph on the right shows the cumulative absorption up to 8 h.

여 인공피부(Strat-M membrane)에 대한 피부흡수율을 비교 분석 하였다. 1, 2, 4, 8, 12, 24 h 경과 후 시간마다 회수간의 용액을 취하였으며, 실험 종료 후 인공피부와 적용칸도 함께 지표성분인 madecassoside의 함량을 HPLC system을 통해 분석하였다.

피부흡수율은 24 h 후 인공피부를 통과한 madecassoside의 누적흡수율로 나타내었다. 그 결과, Tween 20 계면활성제를 함유한 TS-2가 71.39%로 가장 높았으며, TS-3은 69.92%, TS-4는 67.6%, TS-5는 67.71%, 리포솜은 65.97%, TS-1은 57.95%의 순서로 나타났다. 사용된 계면활성제의 HLB 값이 클수록 누적 피부흡수율이 높았으며, 친유성 계면활성제인 Span 80을 사용한 트랜스퍼솜인 TS-1이 가장 낮은 누적 피부흡수율을 나타내었다(Figure 8).

누적 피부흡수율을 입자크기와 비교하였을 때, 입자크기가 제일 작은 트랜스퍼솜인 TS-2의 흡수율이 가장 높았고, Span 80을 함유로 입자크기가 가장 큰 TS-1의 흡수율이 가장 낮았음을 확인하였다. 특히 TS-1의 경우 흡수 8 h 전후 모두 다른 제형에 비해 피부흡수율이 낮음을 확인할

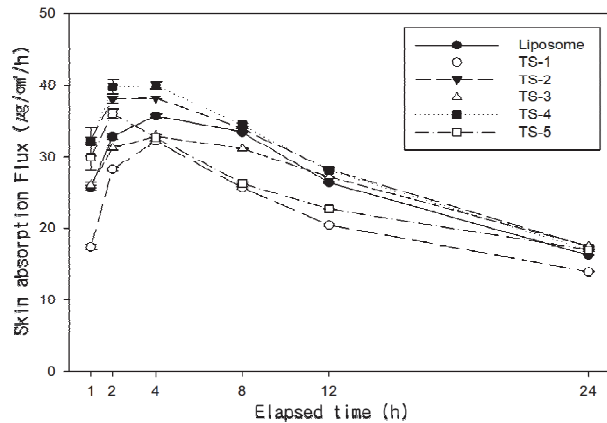


Figure 9. Skin absorption flux of madecassoside. The results were expressed as the mean  $\pm$  SD (N = 3).

수 있었다. 이는 HLB 값이 작은 계면활성제를 사용한 경우, 초기 입자크기는 상대적으로 크나 베시클 막이 상대적으로 유연하지 못함을 알 수 있다. 반면에 HLB 값이 큰 계면활성제를 사용하면 초기 입자크기는 작으나, 특히 항온에서 시간 경과 시 오스트발트 라이프닝 속도가 증가하는 것으로 보아 베시클 막이 상대적으로 유연하며, 이런 특성으로 인하여 피부흡수율이 증가한 것으로 보인다.

대조구인 리포솜과 비교하였을 때, Span 80을 사용한 TS-1을 제외하고는 모두 피부흡수율과 피부흡수 속도가 높았다. 친수성 계면활성제는 분자구조 상 별키한 분자로 트랜스퍼솜의 베시클 막을 유연하게 하여 효능성분의 피부흡수를 증진할 수 있음을 알 수 있었다[39,40].

또한, 피부흡수 플럭스( $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ )는, Flux = 흡수농도( $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ )  $\times$  흡수계수( $K_p$ )로서, 전체적으로 흡수 2 h 이후부터 증가하여 흡수 4 h 경과 시 가장 높았다. 흡수 1 h 이 지났을 때 TS-1이  $17.34 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ 로 다른 제형보다( $25.69 \sim 32.45 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ ) 플럭스가 작은 것으로 나타났다. TS-1의 경우 흡수 8 h 이후에는 TS-5의 제형과 비슷한 경향을 보였으며, 흡수 24 h에도 TS-1이  $13.86 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ 로 가장 낮은 피부흡수 플럭스를 보였다(Figure 9).

F. N. Marzulli 등[27]의 정의(Table 4)에 따라  $K_p$  정도를 판단하면 모두 'very fast'의 투과도를 나타내었고, Span 80을 함유한 TS-1을 제외하고 리포솜보다  $K_p$ 가 비슷하거나 큰 것을 알 수 있었다(Table 5).

#### 4. 결 론

본 연구에서는 리포솜과 다양한 계면활성제를 edge activator로 사용하는 트랜스퍼솜에 병폴추출물을 캡슐화한 제형을 제조하였으며, 물리화학적 특성과 피부흡수율에 대한 비교를 진행하였다. 리포솜과 트랜스퍼솜의 입자크기, 다분산지수, 제타전위, pH에 대하여 실온, 항온에서 60 d

Table 5. Mass Balance of Skin Absorption and Kinetic Parameters of Madecassoside Through the Strat-M Membrane

Formulation	Steady-state flux ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ )	$K_p$ (cm/h)	Absorption rating
Liposome	$28.40 \pm 0.21$	$0.024 \pm 0.00010$	Very fast
TS-1	$22.97 \pm 0.20$	$0.018 \pm 0.00004$	Very fast
TS-2	$31.39 \pm 0.20$	$0.027 \pm 0.00021$	Very fast
TS-3	$27.69 \pm 0.16$	$0.023 \pm 0.00004$	Very fast
TS-4	$31.88 \pm 0.66$	$0.027 \pm 0.00059$	Very fast
TS-5	$27.45 \pm 0.52$	$0.034 \pm 0.00455$	Very fast



동안 관찰하였다.

제조 60 d 경과 후, 실온에서 리포좀과 트랜스퍼좀의 입자크기는 큰 변화가 없었지만, 친유성 계면활성제인 Span 80 (HLB 4.3)을 사용한 TS-2 (135 ~ 143 nm)와 Tween 85 (HLB 11)을 함유한 TS-5 (109 ~ 119 nm)가 Tween 20, 60, 80을 사용한 트랜스퍼좀(92 ~ 100 nm)보다 크게 나타났다. 계면활성제 HLB 값이 작을수록 입자크기가 증가하는 경향을 나타내었다. 항온에서는 60 d 경과 후, Tween 계열의 계면활성제를 함유한 트랜스퍼좀은 유의하게 크기가 증가하였으며, Span 80을 함유한 트랜스퍼좀은 크기가 작아졌음을 확인하였다. 이는 비이온 계면활성제의 HLB 값이 큰 경우에, 작은 입자에서의 계면활성제가 매질에 좀 더 녹아들어 간 후 큰 입자에 흡착되어, 작은 입자는 더욱 작게, 큰 입자는 더욱 크게 커지는 오스트발트 라이프닝 현상에 의한 것으로 판단된다.

제타전위는 실온에서 리포좀은 감소하였지만, 트랜스퍼좀에서는 큰 변화가 나타나지 않았으며, 항온에서는 값이 증가하는 경향을 보였지만 모두  $\pm 30$  mV 이상의 값으로 확인되어 정전기적으로 안정하다고 판단하였다. pH는 60 d 동안 실온과 항온에서 큰 변화가 없음을 확인하였다.

Franz diffusion cell을 이용하여 피부흡수율 평가한 결과, Tween 20을 사용한 TS-2가 가장 높았으며, Tween 60 (TS-3)와 80 (TS-4)을 사용한 트랜스퍼좀은 유사한 피부흡수율로 대조구인 리포좀보다도 양호하였다. Span 80 (TS-1)을 사용한 트랜스퍼좀은 대조구인 리포좀보다도 피부흡수율이 낮았다. 피부흡수 플러스에서는 흡수 8 h 경과 후 TS-1과 TS-5의 시간당 흡수량이 가장 적었으며, 흡수 24 h 경과 후 TS-1이 가장 낮은 흡수량을 보였고, TS-1을 제외하고는 리포좀의 시간당 흡수량이 가장 적은 값으로 나타났다.

이 결과로 트랜스퍼좀에 사용된 계면활성제가 베시클막의 가변성을 가지게 하여 피부흡수율을 향상하고, 각질층 안에 존재하는 지질막의 계면장력 감소 및 피부장벽을 느슨하게 함으로써 피부 내부로 효능성분의 전달이 좀 더 효과적으로 이루어질 수 있을 것으로 판단된다[43-45].

피부흡수계수,  $K_p$  정도를 판단하면 모두 'very fast'의 투과도를 나타내었으며, Span 80을 함유한 TS-1을 제외하고 리포좀보다  $K_p$ 가 비슷하거나 큰 것을 알 수 있었다.

따라서 본 연구를 통해 리포좀과 edge activator로 HLB가 다른 계면활성제를 사용한 트랜스퍼좀에 대하여 물리화학적 특징과 피부흡수 실험을 통해 HLB가 높을수록 입

자크기가 가장 작고, 피부흡수율과 피부 플러스/피부흡수계수가 높은 것을 확인하였다. 다양한 HLB를 가지는 계면활성제를 포함한 트랜스퍼좀에 대한 실험에 통해 병폴추출물을 캡슐화한 트랜스퍼좀은 화장품 제형으로서의 이용 가능성이 있음을 확인하였고, 화장품 원료나 제품으로서뿐만 아니라 피부흡수율 증가로 피부의 국소적 문제 해결 가능성을 기대할 수 있다.

## References

1. E. F. Bernstein, Y. Q. Chen, K. Tamai, K. J. Shepley, K. S. Resnik, H. Zhang, R. Tuan, A. Mauviel, and J. Uitto, Enhanced elastin and fibrillin gene expression in chronically photodamaged skin, *J. Invest. Dermatol.*, **103**(2), 182 (1994).
2. T. I. Hyeon and K. S. Yoon, Skin absorption and physical property of ceramide-added ethosome, *J. Korean Applied Science and Technology*, **38**(3), 801 (2021).
3. M. M. A. Elsayed, O. Y. Abdallah, V. F. Nagggar, and N. M. Khalafallah, Deformable liposomes and ethosomes: mechanism of enhanced skin delivery, *Int. J. Pharm.*, **322**, 60 (2006).
4. E. Touitou, N. Datan, L. Bergelson, B. Godin, and M. Eliaz, Ethosomes - novel vesicular carriers for enhanced delivery: characterization and skin penetration properties, *J. Control. Release*, **65**, 403 (2000).
5. M. J. Choi and H. I. Maibach, Elastic vesicles as topical/transdermal drug delivery systems, *Int. J. Cosmet. Sci.*, **27**, 211 (2005).
6. 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**(3&4), 257 (1996).
7. B. Baroli, Penetration of nanoparticles and nanomaterials in the skin: fiction or reality?, *J. Pharm. Sci.*, **99**, 21 (2010).
8. H. AE Benson, Transfersomes for transdermal drug delivery, *Expert. Opin. Drug. Deliv.*, **3**(6), 727 (2006).
9. H. Chaudhary, K. Kohli and V. Kumar, Nano-transfersomes as a novel carrier for transdermal delivery, *Pharm. Nanotechnol.*, **454**, 367 (2013).

10. S. J. M. Pharm., P. Jain, M.S., R. B. U., M. Pharm, and N. K. Jain, Transfersomes - a novel vesicular carrier for enhanced transdermal delivery: development, characterization, and performance evaluation, *Drug. Dev. Ind. Pharm.*, **29**(9), 1013 (2003).
11. S. Mahor, A. Rawat, P. K. Dubey, P. N. Gupta, K. Khatri. A. K. Goyal, and S.P. Vyas, Cationic transfersomes based topical genetic vaccine against hepatitis B, *Int. J. Pharm.*, **340**, 13 (2007)
12. G. Cevc and G. Blume, Lipid vesicles penetrate into intact skin owing to the transdermal osmotic gradients and hydration force, *Biochim. Biophys. Acta*, **1104**, 266 (1992).
13. G. Cevc, D. Gebauer, J. Stieber, A. Schatzlein, and G. Blume, Ultraflexible vesicles, Transfersomes, have an extremely low pore penetration resistance and transport therapeutic amounts of insulin across the intact mammalian skin, *Biochim. Biophys. Acta*, **1368**, 201 (1998).
14. 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 (2007).
15. Y. S. R. Elnagggar, W. M. El-Refaeie, M. A. El-massik, and O. Y. Abdallah, Lecithin-based nanostructured gels for skin delivery: An update on state of art and recent applications, *J. Control. Release*, 180, 10 (2014).
16. M. M. A. Elsayed, O. Y. Abdallah, V. F. Nagggar, and N. M. Khalafallah, Deformable liposomes and ethosomes as carriers for skin delivery of ketotifen, *Pharmazie*, **62**, 133 (2007).
17. S. S. Jamil, Q. Nizami, and. M. Salam, *Centella asiatica* (Linn.), Urban a review, *Nat. Prod. Radiance*, **6**(2), 158 (2007).
18. F. Pittella, R. C. Dutra, D. D. Junior, M. T. P. Lopes, and N. R. Barbosa, Antioxidant and cytotoxic activities of *Centella asiatica* (L) Urb., *Int. J. Mol. Sci.*, **10**, 3713 (2009).
19. M. K. Zainol, A. Abd-Hamid, S. Yusof, and R. Muse, Antioxidative activity and total phenolic compounds of leaf, root and petiole of four accessions of *Centella asiatica* (L.) Urban, *Food Chem.*, **81**, 575 (2003).
20. M. R. S. Zaidan, N. Rain, A. R. Badrul, A. Adlin, A. Norazah, and I. Zakiah, *In vitro* screening of five local medicinal plants for antibacterial activity using disc diffusion method, *Trop. Biomed.*, **22**(2), 165 (2005).
21. C. H. Jo, S. Y. Kim, and I. S. An, The improving effect of *Centella asiatica* extracts on erythema on scalp of aged 20-50's women, *Kor. J. Aesthet. Cosmetol.*, **12**(6), 921 (2014).
22. I. E. Orhan, *Centella asiatica* (L.) Urban: from traditional medicine to modern medicine with neuroprotective potential, *J. Evid. Based Complementary Altern. Med.*, **2012**, 1 (2012).
23. W. Bylka, P. Znajdek-Awizen, E. Studzinska-Sroka, and M. Brzezinska, *Centella asiatica* in cosmetology, *Postepy Dermatol. Alergol.*, **30**(1), 46 (2013).
24. J. Lee, C. H. Myung, J. E. Lee, M. R. Jo, H. S. Kim, N. Y. Lee, H. Woo, J. You, H. Jo, and J. S. Hwang, Anti-inflammatory and moisturizing effect of *Centella* extracts fermented in Jeju lava water, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **45**(4), 363 (2019).
25. J. H. Ha, M. C. Kwon, Y. Kim, S. S. Jeong, M. H. Jeong, B. Hwang, and H. Y. Lee, Enhancement of immuno-modulatory of *Centella asiatica* L. Urban with edible polymer through nano-encapsulation process, *Korean J. Medicinal Crop. Sci.*, **17**(4), 257 (2009).
26. K. J. Kwon, S. J. Choi, and Y. Yoon, Improving effects of the cleanser containing *Centella asiatica* extracts and charcoal and pearl powder on the facial skin, *Kor. J. Aesthet. Cosmetol.*, **10**(3), 581 (2012).
27. O. T. Kim, M. Y. Kim, S. J. kim, Y. J. kim, K. S. Kim, J. C. Ahn, S. W. Kim, and B. Hwang, Seasonal variations of triterpene glycosides contents in the leaf of *Centella asiatica* (L.) Urban, *Korean J. Medicinal Crop. Sci.*, **10**(5), 375 (2002).
28. W. C. Griffin, Classification of surface-active agents by "HLB", *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 311 (1946).
29. W. C. Griffin, Calculation of HLB values of non-ionic surfactants, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 249 (1954).
30. K. S. Yoon, Cosmetology, G. B. Jo, 56, Kuhminsa, Seoul (2021).
31. E. Seong, H. Heo, S. Oh, D. Kim, K. I. Jang, and J.

- Lee, Optimization of ultrasound-assisted extraction for triterpene compounds from *Centella asiatica* using response surface methodology, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **50**(3), 294 (2021).
32. S. J. Yang, T. Y. Kim, C. M. Lee, K. S. Lee, and K. S. Yoon, Study on the stability of biotin-containing nano-liposome, *J. Soc. Cosmet. Sci.*, **46**(2), 133 (2020).
33. C. Monton, C. Luprasong, J. Suksaeree, and T. Songsak, Validated high performance liquid chromatography for simultaneous determination of stability of madecassoside and asiaticoside in film forming polymeric dispersions, *Rev. Bras. Farmacogn.*, **28**, 289 (2018).
34. T. I. Hyeon and K. S. Yoon, Ethosome containing ceramide as a skin carrier of active ingredients, *Curr. Drug Deliv.*, **20**(7), 927 (2023).
35. F. N. Marzulli, D. W. C. Brown, and H. I. Maibach, Techniques for studying skin penetration, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, Supplement(3), 76 (1969).
36. E. Casals, A. M. Galan, G. Escolar, M. Gallardo, and J. Estelrich, Physical stability of liposomes bearing hemostatic activity, *Chem. Phys. Lipids*, **125**, 139 (2003).
37. L. N. Ramana, S. Sethuraman, U. Ranga and U. M. Krishnan, Development of a liposomal nanodelivery system for nevirapine, *J. Biomed. Sci.*, **57**, 1 (2010).
38. J. Leng, S. U. Egelahaaf and M. E. Cates, Kinetic pathway of spontaneous vesicle formation, *EPL*, **59**(2), 311 (2002).
39. E. Yilmaz and H. H. Borchert, Design of a phytosphingosine-containing, positively-charged nanoemulsion as a colloidal carrier system for dermal application of ceramides, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **60**, 91 (2005).
40. A. Laouini, C. J. Maalej, I. L. Blouza, S. Sfar, C. Charcosset, and H. Fessi, Preparation, characterization and applications of liposomes: state of the art, *J. Colloid Sci. Biotechnol.*, **1**, 147 (2012).
41. M. Badran, K. Shalaby and A. Al-Omrani, Influence of the flexible liposomes on the skin deposition of a hydrophilic model drug, carboxyfluorescein: dependency on their composition, *Sci. World J.*, **2012**, 9 (2012).
42. M. A. Khan, J. Pandit, Y. Sultana, S. Sultan, A. Ali, M. Aqil and M. Chauhan, Novel carbopol-based transfersomal gel of 5-fluorouracil for skin cancer treatment: in vitro characterization and in vivo study, *Drug Deliv.*, **22**(6), 795 (2015).
43. C. K. Song, P. Balakrishnan, C. K. Shim, S. J. Chung, S. Chong, and D. D. Kim, A novel vesicular carrier, transethosome, for enhanced skin delivery of voriconazole: characterization and in vitro/in vivo evaluation, *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, **92**, 299 (2012).
44. R. Albash, A. A. Abdelbary, H. Refai, and M. A. El-Nabarawi, Use of transethosomes for enhancing the transdermal delivery of olmesartan medoxomil: in vitro, ex vivo, and in vivo evaluation, *Int. J. Nanomedicine*, **14**, 1953 (2019).
45. I. M. Abdulbaqi, Y. Darwis, R. A. Assi, and N. A. K. Khan, Transethosomal gels as carriers for the transdermal delivery of colchicine: statistical optimization, characterization, and ex vivo evaluation, *Drug. Des. Devel. Ther.*, **12**, 795 (2018).