Journal of the Korean Applied Science and Technology
Vol. 38, No. 6. December, 2021. 1687~1698
ISSN 1225-9098 (Print)
ISSN 2288-1069 (Online)
http://dx.doi.org/10.12925/jkocs.2021.38.6.1687

초임계 상태에서 리포좀의 생성 및 약물봉입

문용준[1] · 차주환[2] · 김인영[3]†

[1]바이오뷰텍, 주임연구원
[2]한국과학기술연구원, 선임연구원
[3]바이오뷰텍, 대표이사
(2021년 11월 30일 접수: 2021년 12월 24일 수정: 2021년 12월 29일 채택)

Liposome Formation and Active Ingredient Capsulation on the Supercritical Condition

Yong-Jun Mun[1*] · Joo-Hwan Cha[2] · In-Young Kim[3]†

[1,3]*Biobeautech Co., Ltd, Department of Research & Development Center of Biobeautech Co., Ltd, Gyeonggi-do 13207 Republic of Korea*
[2]*KIST, Center of Special Analysis of Korea Science & Technology Institute, Seoul Capital City 13207 Republic of Korea*
(Received November 30, 2021; Revised December 24, 2021; Accepted December 29, 2021)

요 약 : 이 연구는 열역학적으로 불안정한 활성성분을 안정하게 봉입하기위해 초임계 상태에서 다중층의 리포좀을 생성하고 유효성분을 봉입하는 것에 관한 것이다. 초임계 상태에서 원활하게 리포좀을 형성시키기 위하여 식물성유래의 하이드로제네이티드 포스파티딜콜린과 그 유도체, 하이드로제네이티드 수크로오스다이스테아레이트를 포함하는 혼합 계면활성제를 고순도로 합성하였다. 이것을 반응조에 이산화탄소를 주입하여 초임계상태를 만들고 교반함으로써 거대 리포좀을 생성시키고, 여기에 제니스테인(genistein)과 쿼세틴(quercetin)을 첨가하여 봉입하는 제조방법에 대하여 기술하였다. 혼합지질계면활성제(SC-Lipid Complex)의 HLB는 12.50이었으며, 아주 낮은 농도에서도 다중층의 리포좀 소포체가 형성되었다. 이 계면활성제의 외관은 엷은 황색의 페이스트로 특이취가 있었으며, 비중은 0.972이었고, 산가는 0.12로 고순도로 합성이 되었음을 알 수 있었다. SC-Lipid Complex를 사용하여 20 wt%의 카플릭/카프릭 트리글리세라이드와 트리에칠헥사노인을 사용한 유화력 실험결과 96.2 %의 유화력을 가지고 있음을 알 수 있었다. 제니스테인을 봉입한 초임계 리포좀에 대하여 투과전자현미경(Cryo-TEM)을 통해 다중층의 리포좀 소포체가 형성되었다는 것을 확인하였다. 제니스테인이 봉입된 1차 리포좀화한 입자 크기는 253.9 nm이었고, 2차 캡슐의 크기는 18.2 ㎛ 이었다. 제니스테인을 표준물질로 하여 초임계 상태 리포좀의 봉입효율은 99.5 %이었고, 일반적인 리포좀은 93.6 %의 효율을 가지는 것으로 나타났다. 또한 쿼세틴을 봉입한 항산화력 실험은 DPPH법으로 확인한 결과 초임계리포좀에서 유의성 있게 우수한 항산화력을 유지하고 있음을 알 수 있었다. 이러한 결과를 바탕으로 효과는 우수하나 열역학적으로 불안정한 원료를 유기용매를 사용하지 않고 초임계 상태에서 리포좀에 봉입하고, 고기능성의 스킨케어 화장품, 메이크업 화장품, 두피보호용 화장품 등 다양한 제형에 응용이 가능할 것으로 기대한다.

†Corresponding author
(E-mail: iykim200@naver.com)

주제어 : 초임계상태, 리포좀 봉입, 안정성, 항산화, 화장료

Abstract : This study is to produce multiple layers of liposomes in a supercritical state and encapsulates active ingredients in order to stably encapsulate thermodynamically unstable active ingredients. In order to form a liposome in a supercritical state, a mixed surfactant development including vegetable-derived hydrogenated phosphatidyl choline and their delivative, hydrogenated sucrose distearate was synthesized as high purity. It describes a manufacturing method of injecting liquid carbon dioxide into a reactor to create a supercritical state and stirring to produce a giant liposome, and adding and loading genistein and quercetin. The HLB of the mixed lipid complex (SC-Lipid Complex) was 12.50, and multiple layers of liposome vesicles were formed even at very low concentrations. This surfactant had a specific odor with a pale yellow flake, the specific gravity was 0.972, and the acid value was 0.12, indicating that it was synthesized with high purity. As a result of the emulsifying capacity experiment using 20 wt% capric/capric triglyceride and triethylhexanoin using SC-Lipid Complex, it was found to have 96.2% emulsifying power. SC LIPOSOME GENISTEIN was confirmed that a multi-layer liposome vesicle was formed through a transmission electron microscope (Cryo-TEM) for the supercritical liposome encapsulated with genistein. The primary liposome particle size in which genistein was encapsulated was 253.9 nm, and the secondary capsule size was 18.2 μm. Using genistein as the standard substance, the encapsulation efficiency of supercritical liposomes was 99.5%, and general liposomes were found to have an efficiency of 93.6%. In addition, the antioxidant activity experiment in which quercetin was sealed was confirmed by the DPPH method, and it was found that the supercritical liposome significantly maintained excellent antioxidant activity. In this study, thermodynamically unstable raw materials were sealed into liposomes without organic solvents in a supercritical state. Based on these results, it is expected that it can be applied to various forms such as highly functional skincare cosmetics, makeup cosmetics, and scalp protection cosmetics.

Keywords : Supercritical State, Liposome, Capsule, Stability, Anti-oxidation, Cosmetics

1. 서 론

화장품 산업분야에서 효능 물질이 세포 내로 효율적으로 이동시키려는 방법으로 약물 전달 시스템(DDS, drug delivery system)을 이용한 기술들을 연구하고 있다[1-2]. 피부개선에 도움을 주기위하여 약물이 피부 속으로 잘 전달되게 하기 위한 나노 기술과, 불안정한 성분을 제형에서 잘 유지되도록 안정화 기술이 절실하게 필요한 실정이다. 이것을 해결하기 위한 방법으로 활성성분을 최대로 봉입하고 안정하게 피부에 흡수시킬 수 있는 캡슐레이션 기술들이 많이 연구되고 있다[3]. 이 약물 전달 시스템으로 개발된 캡슐레이션 제형중 대표적으로 리포좀(liposome), 니오좀(niosome), 큐보좀(cubosome), 헥사좀(hexasome) 등이 있다. 리포좀(Liposome)은 생체막의 구성성분인 인지질을 사용하여 다중층의 리포좀 소포체를 생성하는 기술로 독극물에 속하는 유기용매를 사용하거나, 고온에서 스웰링 반응을 하여야 가능한 기술로 열에 약한 성분을 봉입할 경우에는 바람직한 방법이 아닐 수 있다 [2-4]. 니오좀(Niosome)은 인지질이 아닌 친수그룹에 두개의 알킬 사슬이 있는 비이온성 계면활성제를 사용하여 리포좀과 동일한 구조를 생성하는 방법을 말한다[5]. 이는 리포좀에 비하여 냄새가 없으며 안정하게 봉입할 수 있는 장점이 있다[5-8]. 큐보좀과 헥사좀은 양친매성의 극성 지질들이 물과 혼합되면 열역학적으로 안정한 지질을 사용할 경우 다중층의 자기조직체가 형성되어 3차원적으로 큐빅상, 헥사고날상의 입체구조를 형성하여 많은 량의 유효성분을 봉입할 수 있는 구조가 형성되어 제약이나 의약분야에서 많은 연구가 이루어지

고 있는 기술 중에 하나이다. 이 기술은 일정한 서방성 입체구조가 형성되어 경피흡수가 빠르고 즉각적 활성을 기대하거나 표적한 곳까지 약물을 전달하는 시스템으로 많이 응용되고 있는 기술이다[9-12]. 리포좀은 크기와 형태에 따라 이중막이 여러 겹으로 중첩되어 있는 다막리포좀(multilamellar vessiccles, MLV), 단일막으로 구성된 단막리포좀(unilamellar vesicle, ULV)으로 구분될 수 있다. 단막리포좀은 100 nm 기준으로 크기에 따라20~100 nm는 작은 단막리포좀(small unilamellar vesicles, SUV), 100~1000 nm는 큰 단막리포좀(large unilamellar vesicles, LUV) 등으로 나뉜다. 다막리포좀의 크기는 200~3500 nm 정도로 구분한다.[13,14]. 최근 일본에서는 초임계 유체를 이용한 리포좀을 형성하는 기술이 발표되고 있으나, 국내에서는 아직 찾아보기 힘들다. 이산화탄소 초임계 유체란 임계점 이상의 조건에서 유기용매 없이도 용해될 수 있으며, 변형이 쉽고 자유로이 액체상태로 되어 다양한 약물을 봉입하는 방법을 말한다 [15-17].

이 연구는 열역학적으로 불안정한 활성성분을 보다 안정하게 봉입하기 위하여 초임계 상태에서 리포좀을 형성하는 방법을 제시하였다. 이때 리포좀이 잘 형성될 수 있도록 고순도의 혼합계면활성제를 합성하였다. 이 계면활성제에 대하여 여러 가지 물성분석(산가, 비중, 유화력실험, HLB (hydrophilic lipophilic balance))을 평가하였다. 또한 이 계면활성제가 초임계 상태에서 용해가 쉽게 이루어져 다중층의 리포좀이 잘 형성하는가에 대하여 연구하였다. 활성성분인 제니스테인을 초임계 상태에서 리포좀을 형성시켜 봉입한 결과를 일반리포좀과 비교하여 기술의 우수성이 있는가를 비교 평가하였다. 리포좀의 구조분석은 Cryo-TEM을 사용하였으며, 최종 시료의 입자크기를 측정하고 리포좀화한 성분에대하여 HPLC 정량분석을 통하여 본입의 효율성을 평가하였다. 또한 쿼세틴을 리포좀화하여 ABTs법과 DPPH법을 이용한 항산화 효과에 대하여 실험한 결과를 보고한다.

2. 실 험

2.1 실험재료

이 연구에 사용된 시약은 다음과 같다. 이산화탄소 가스는 실험용으로 성남특수가스 공급업체(한국)를 통하여 공급받았으며, 초임계 상태에서 리포좀이 형성되는 혼합계면활성제를 고순도로 합성하기 위하여 hydrogenated phosphatidylcholine (바이오뷰텍, 한국), hydrogenated phosphatidylinositol (바이오뷰텍, 한국), hydrogenated sucrose distearate (바이오뷰텍, 한국)를 사용하였다. 보습제로 glycerin (LG화학, 한국), 오일로써 caprylic/capric triglyceride (미원캐미칼, 한국), triethylhexanoin (KCC, 한국), 유효성분으로 genistein (바이오뷰텍, 한국), quercetin (바이오뷰텍, 한국)을 사용하였다. 항산화 측정을 위하여 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH: 시그마알드리치, 한국), 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTs: 시그마알드리치, 한국)를 지시약으로 사용하였다. 그 밖에 본 연구에 사용된 원료는 화장품 등급의 시약으로 별도의 처리 없이 그대로 사용하였다.

2.2. 기기 및 장치

본 연구에 사용된 초임계장치는 한성엔지니어링사의 Supercritical Reator를 사용하였고, 호모믹서(HY-0001A, 한양기계, 한국)와 디스퍼믹서(한성기계, 한국), 아지테이터(AG1, 우원기계, 한국), 고압마이크로플루다이저 (Nanomizer MN-110, 마이크로녹스, 한국)를 사용하였다. 일반적으로 유화상태를 관찰하기 위하여 광학현미경(Olympus, 일본)을 사용하였다. 리포좀의 구조분석을 위해 투과전자현미경(Tecnai G2 Spirit Twin TEM, FEI, USA)과 입자 측정을 위하여 입도분석기(MICROTRAC3000, MICROTRAC, USA)을 사용하였고, 활성성분에 대한 정량분석은 고성능액체크로마토그래프 (spectra sysetem P1000, Thermo Separation Products, U.S.A.)를 사용하였다. 항산화 측정을 위하여 UV분광광도계(옵티젠 POP-S, 케이랩, 한국)를 사용하였다.

2.3. 실험 및 방법

2.3.1 리포좀 형성 혼합계면활성제 합성

초임계상태에서 낮은 농도에서도 리포좀이 잘 형성되는 혼합계면활성제(MIZOAN® SC-Lipid Complex)를 합성하는 방법을 Fig. 1에 도시하였다. 우선 hydrogenated phosphatidyl choline, hydrogenated phosphatidyl inositol, hydrogenated sucrose distearate를 반응조에 넣고 pH를 7.5~8.8의 알칼리성 상태로 조절하고, 180~220 ℃로 가온하여 30~60 mmHg의 진공상태에서 4

시간동안 교반하여 에스터 결합 반응을 시켰다. 이어서 반응이 잘 되었는가를 TLC (thin layer chromatography)로 확인하였다. 고순도 계면활성력을 가질 수 있도록 하기 위하여 200~250 ℃로 승온하여 30~60 mmHg의 진공상태에서 2시간동안 교반하여 미 반응물이 없도록 추가반응을 시키고, 여기에 수소가스를 첨가하여 환류시켜 수소첨가가 이루어질 수 있도록 하여 안정성을 높이고, 초임계 상태에서 리포좀이 잘 형성 될 수 있도록 혼합계면활성제를 합성할 수 있었다.

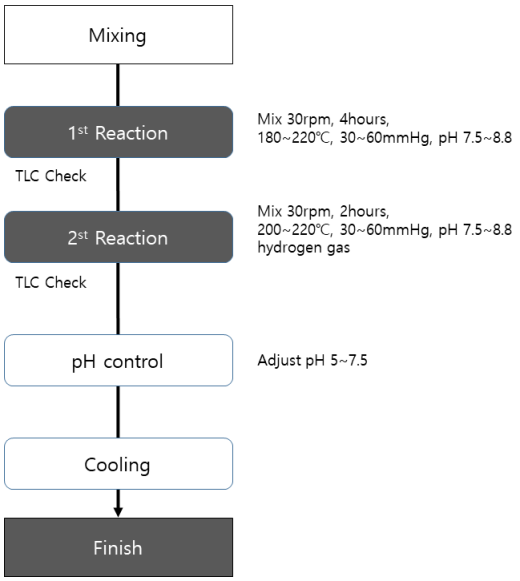

Fig. 1. Synthetic method of mixed surfactant with several surfactants such as hydrogenated phosphatidyl choline, hydrogenated phosphatidyl inositol and hydrogenated sucrose distearate.

2.3.2 초임계 상태에서의 활성성분의 리포좀 봉입방법

본 연구에서 사용된 리포좀 제조방법은 Table 1과 Fig. 2에 제조방법을 나타내었다. 우선 초임계 상태에서 리포좀이 잘 형성이 되는 MIZOAN® SC-Lipid Complex와 이산화탄소를 주입하여 150-250 Bar로 하여 분자 클러스터링 상태가 되도록 하였다. 여기에 유효성분을 넣고 교반하면 자발적으로 용해되어 다중층의 리포좀 상태가 이루어지도록 하였다. 여기서는 유효성분인 genistein과 quercetin을 넣어 봉입하였다. 여기에 정제수를 포함한 폴리올을 투입하여 활성성분이 물에 분산되도록 하여 거대 리포좀을 형성시켰다. 이것을 고압마이크로플루다이저에 5~10 ℃, 6,000~10,000 psi, 3~6회 통과하여 나노 크기의 리포좀 소포체를 만들 수 있었다.

2.3. 계면활성제의 유화력 시험방법

초임계 상태에서 리포좀이 잘 형성될 수 있는 SC-Lipid Complex의 유화력을 평가하기 위하여 Table 2에 나타낸 바와 같이, 계면활성제의 농도를 1 wt%로 고정하고, 카프릴릭/카프릭트리글리세라이드와 트리에칠헥사노인을 각각 20 wt%를 사용하여 나머지가 정제수를 100 wt%가 되도록 하였다. 이것을 80 ℃까지 가온하여 4,000 rpm에서 1분간 호모믹서로 교반하여 30 ℃까지 냉각한 시료를 가지고 유화력을 평가하였다.

2.4. 초임계 리포좀 구조 및 입도 분석방법

Table 1의 처방에 대하여 만들어진 시료가 리포좀이 형성되었는지 확인하기 위하여 한국과학기술연구원에 의뢰하여 극저온 투과전자현미경(Cryo-TEM)으로 구조를 관찰하였다. 측정방법으로 시료를 동결건조하여 순간적으로 커팅하여

Table 1. Composition of Supercritical Liposome Capsule containing Genistein 3 wt% and Quercetin 2 wt% Solution

Phase	INCI Name	Formulas	
		F-1(wt%)	F-2(wt%)
A	SC-Lipid Complex	5.000	5.000
B	Genistein	3.000	-
	Quercetin	-	2.000
C	Glycerin	20.000	20.000
	D. I. Water	72.000	73.000
Total sum		100.000	100.000

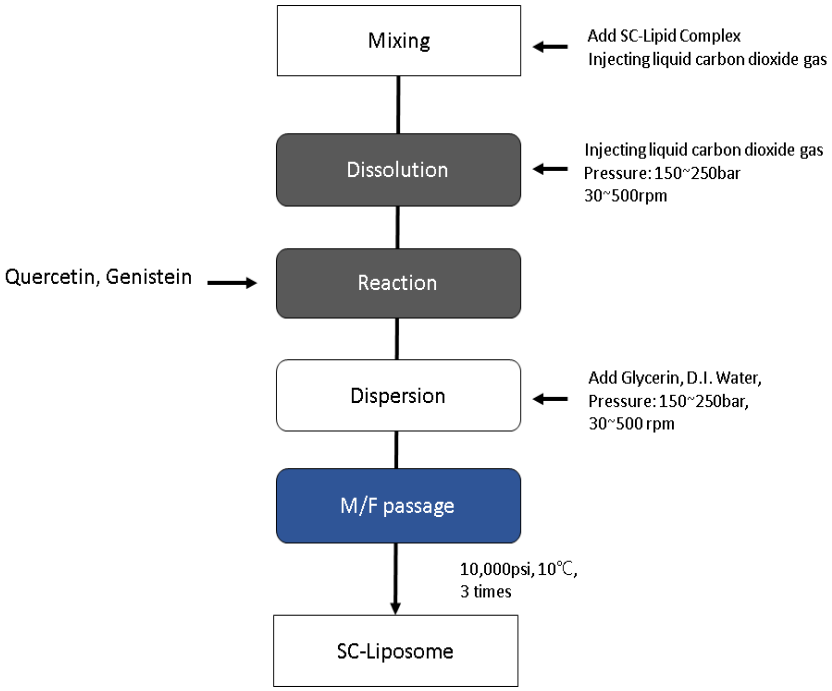

Fig. 2. Preparing method of multi-layer liposome structure on supercritical state with SC-Lipid Complex.

Table 2. Formulas of Emulsifying Activity with SC-Lipid Complex: Oil phase : 20 wt%, Water Phase : 79 wt%, Surfactant Phase: 1 wt%. Mixing condition : 4,000rpm Homo-mixing, 80 ℃, 1 minute

Phase	INCI Name	Formulas	
		T-1 (wt%)	T-2 (wt%)
A	Caprylic/capric triglyceride	20.00	-
	Triethylhexanoin	-	20.00
B	D.I. Water	79.00	79.00
C	SC-Lipid Complex	1.00	1.00
Total Sum		100.00	100.00
Emulsifying activity		99.7%	99.8%
Stability (after 1-month, 45 ℃)		Good	Good

그 표면을 관찰하여 형성된 구조를 관찰하는 것이다. 또한 초임계 상태에서 1차로 형성된 리포좀의 입자크기를 나노입자측정기인 Microtrac MS-3000을 사용하여 입자의 분포를 측정하였다.

2.5. Genistein을 봉입한 초임계 리포좀의 HPLC 정량분석

초임계 리포좀의 제조법으로 난용성 물질인 제니스테인을 봉입한 시료의 안정성을 측정하기 위하여 HPLC로 정량분석을 실시하였다. 시료를 4 ℃, 25 ℃, 45 ℃의 인큐베이터에 넣고 30일이 지난 후에 그 역가를 측정하였다. 정량분석은 HPLC spectra system P1000를 사용하였고, Column은 Phenomenex Co. (Torroance, CA, U.S.A)의 Spherex 5 C18 (250×4.60mm; 5μm)를 사용하였다. 이동상은 5 mM NaH_2PO_4용액

(pH 4.6)과 메탄올의 혼합액을 사용하였고, 유속은 1mL/min, 검출기의 흡광도는 260 nm에서 측정하였다. 대조군으로는 일반적인 공법을 사용한 리포좀으로 하여 안정성을 비교하였다.

2.6. DPPH법을 사용한 항산화효과 측정법

항산화 효과는 쿼세틴을 초임계 리포좀 봉입한 시료를 가지고 DPPH법으로 측정하였다. 쿼세틴의 전자공여능(electron donating ability, EDA)은 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거활성 실험으로 Blois의 방법을 변형하여 측정하였다.[18] 시료는 시료 : 버퍼 : 0.2 mM DPPH 용액을 1:1:1비율로 희석하여 측정하였으며 암실에서 30분간 반응 후 흡광도가 가장 높은 510 nm에서 측정하였다. 대조군으로는 일반적인 공법을 사용한 리포좀을 대조군으로 사용하였다. 각 시료의 라디칼 소거율이 50%가 되는 시료의 활성성분농도(ppm)를 검량선을 작성하여 추정하였으며 3회 측정하여 평균값으로 나타내었다.

2.7. ABTs를을 사용한 항산화효과 측정법

항산화 효과는 쿼세틴을 초임계 리포좀 봉입한 시료를 가지고 ABTs로 측정하였다. 쿼세틴의 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTs) 양이온 라디칼 소거활성 실험은 Re등의 방법[19]을 응용하였고 7.0mM ABTs와 2.45mM potassium persulfate를 혼합하여 상온, 암소에서 16시간동안 반응시켜 ABTs+ 라디칼을 형성시켰다. 이 용액은 732 nm에서 흡광도가 0.8±0.02가 되도록 희석하여 실험에 사용하였다. 시료 : ABTs용액의 비는 2:98로 혼합하였고 시료는 유효성분이 100 ppm이 되도록 희석하여 사용하였다. 이를 혼합하여 상온, 암소에서 10분간 반응 시킨 후 측정하였으며 ABTs 라디칼 소거능(%)=(1-시료첨가의 흡광도/시료 무첨가의 흡광도)×100로 계산하여 결과를 도출하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 리포좀 기술의 동향 및 초임계 리포좀 생성 메커니즘

일반적으로 화장품산업에서 사용되는 리포좀 기술은 리포좀 제조에는 여러 방법들이 있다. Bangham의 방법[20], 유기용매 주사법[21, 22]및 역상 탈수법[23]등이 보고되었다. 이 기술의 문제점은 고온에서 리포좀을 제조하거나 유기용매의 독성 때문에 친환경적이지 않고 약품전달매체로 사용되었을 때는 유기용매를 사용하면 이를 완전히 제거하지 않고 남아 있기 때문에 가능한 한 이를 피하는 것이 바람직하다. 또한 이 제조공법이 고온에서 진행되기 때문에 유효성분이 손상된 채로 봉입이 되는 기술적인 문제가 있었다. 하지만 초임계 공법은 이러한 문제점을 해결할 수 있다. 현재 국내에서 화장품에서 응용된 초임계공법은 액체이산화탄소를 이용하여 열을 가하지 않고 유효성분을 추출하는 기술로 사용되어 왔다. 그러나 초임계 상태에서 리포좀을 생성시켜 약물을 봉입하는 기술은 국내에서 처음으로 시도되는 기술이 아닌가 싶다. 이것을 메커니즘적으로 기술하면 Fig. 3과 같다.

Fig. 3에서 보는 바와 같이 반응조에 SC-Lipid Complex를 넣고 액체 이산화탄소를 주입하여 150~250 bar로 유지하여 교반하면 자연적으로 용해가 된다. 여기에 활성성분인 제니스테인과 쿼세틴을 넣어서 리포좀 소포체 내부에 봉입하고, 글리세린과 정제수를 넣어 리포좀을 분산시킴으로써 활성성분이 봉입된 거대 리포좀 베지클이 생성되는 것을 이 연구를 통하여 메커니즘적으로 완성시켰다. 반응조에 계면활성제를 넣고 액체이산화탄소를 주입하여 용해가능한 상태를 만들고, 여기에 제니스테인을 넣어서 분자 클러스터링 상태가 되어 자연적으로 다중층의 리포좀 소포체 내부에 패킹이 이루어질 수 있다고 고찰하였다. 이 시료는 교반이 완전하지 않기 때문에 거대 리포좀이 생성되는 것을 확인 하였고, 이것을 저온에서 고압 마이크로플루다이저에 통과시킴으로써 개량된 나노 입자의 리포좀 소포체를 만들 수 있었다.

3.2. 혼합 계면활성제의 물리적 특성

이 연구에서 제시한 합성 방법을 통하여 얻어진 SC-Lipid Complex를 Fig. 4에 나타내었다. 이 계면활성제의 외관은 엷은 황색의 플레이크, 냄새는 약간의 특이한 냄새가 있는 것으로 나타났다. 또한 산가는 0.12이었고, 비중은 0.972로 측정되었다. Griffin식을 이용한 HLB값을 측정한 결과 12.50로 우수한 친수성 유화력을 가지는 것을 알 수 있었다. HLB이론에 따르면 HLB가 낮은 0~3은 소포제의 기능, 3~7은 W/O 유화기능, 8~11은 분산제기능, 11~13은 O/W 유화기능, 14~20은 가용화기능을 가지는 것으로 분류

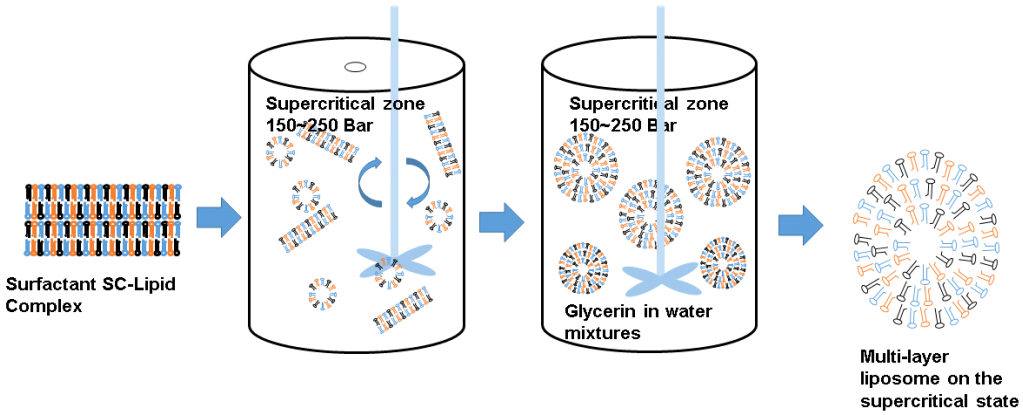

Fig. 3. Forming mechanism of multi-layer liposome vesicles on the supercritical state injecting liquid carbon dioxide.

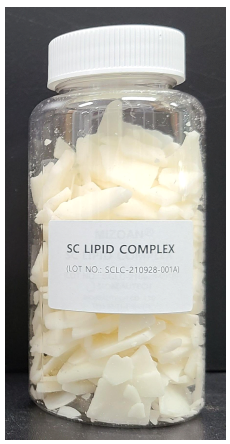

Fig. 4. Picture of surfactant of SC-Lipid Complex synthesized with hydrogenated phosphatidyl choline, hydrogenated phosphatidyl inositol, hydrogenated sucrose distearate.

하고 있어, 본 연구에서 합성한 SC-Lipid Complex는 O/W 유화제로써 충분한 효과를 가지는 것으로 고찰하였다. [24~26]

3.3. 계면활성제의 유화력 실험 결과

계면활성제인 SC-Lipid Complex를 1 wt%, 카프릴릭/카프릭트리글리세라이드와 트리에칠헥사노인을 각각 20 wt%, 정제수를 79 wt%를 사용하여 총 함량이 100 wt%가 되도록 하여 유화력 실험을 실시한 결과를 Fig. 5에 나타내었다. Fig. 5의 a는 카프릴릭/카프릭트리글리세라이드를 사용한 유화력을 실험한 사진이며, Fig. 5의 b는 트리에칠헥사노인을 사용한 유화력 실험결과이다. 카프릴릭/카프릭트리글리세라이드의 유화력은 97.3 %, 트리에칠헥사노인은 96.2 %의 유화력을 가지는 것으로 예측된다.

Fig. 5. Pictures of emulsifying activity using SC-Lipid Complex. a: 20 wt% caprylic/capric triglyceride, 1 wt% SC-Lipid Complex, 79 wt% water, b: 20 wt% triethylhexanoin, 1 wt% SC-Lipid Complex, 79 wt% water.

3.4. 초임계상태에서 활성성분의 리포좀 봉입

초임계상태에서 난용성물질인 genistein과 quercetin을 봉입한 결과를 Fig. 5에 나타내었다.

제니스테인은 대두콩으로부터 추출한 이소플라본 형태의 성분으로 항산화 작용 및 에스트로젠을 활성화하는데 도움을 주는 것으로 알려져 있는 물질이다. 이 성분을 초임계 상태에서 리포좀에 봉입한 결과를 Fig. 6의 a에 나타내었다. 쿼세틴은 연꽃잎에서 추출한 플라보노이드 계열의 항산화 성분으로 멜라닌 합성을 제어하거나 콜라겐 합성에 도움을 주는 것으로 알려져 있는 물질이다. 이 성분을 초임계 상태에서 리포좀에 봉입한 결과를 Fig. 6의 b에 나타내었다. 이 종류의 활성 성분을 초임계 상태에서 리포좀 소포체 내부에 패킹하여 봉입하는데 성공하였으며, HPLC 정량 분석과 항산화 효과 측정을 통하여 봉입효율을 일반 리포좀을 콘트롤로 하여 비교 평가한 연구를 수행하였다.

3.5. 1차 리포좀 입자 측정 및 Cryo-TEM을 이용한 구조분석

초임계 공법으로 개발된 제니스테인이 봉입된 1차 리포좀 베지클의 입자크기는 Fig. 7에 나타내었다. 그래프에서 보는 바와 같이 평균 입자는 253.9 nm, 중간 값은 192.6 nm인 것으로 나타났다. 또한 리포좀 소포체의 구조를 관찰하기 위하여 극저온 투과전자현미경(Cryo-TEM)을 이용하여 관찰한 결과를 Fig. 8에 나타내었다. 사진에서 보는 바와 같이 소포체의 외각 막 주변에 다중층의 라멜라 구조가 형성되었을 알 수 있었고, 전자 현미경에서 보여지는 소포체의 입경크기는 약 276.8 nm인 것으로 나타났다. 사진에서 보는 바와 같이 중심에 리포좀이 존재하며 그 주변을 다중층 라멜라구조를 띄고 있는 것을 확인할 수

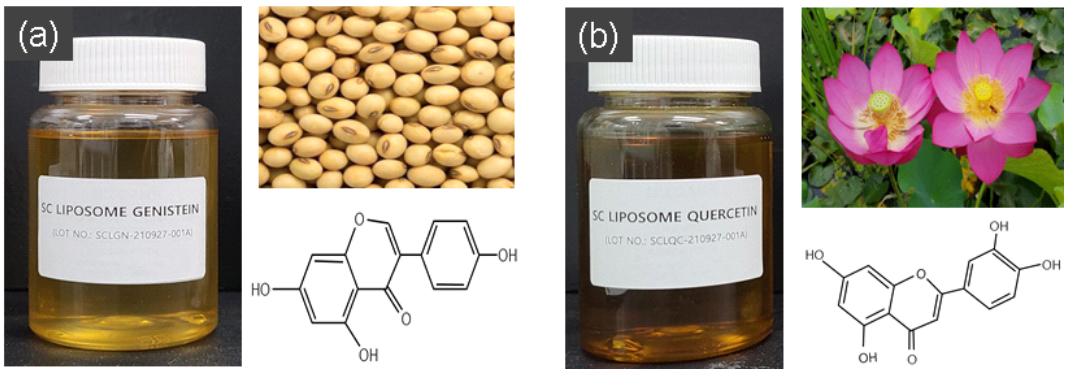

Fig. 6. Pictures of SC-Liposome genistein, SC-Liposome quercetin capsules with supercritical state. (a): 3 % genistein SC-liposome capsule, (b): 2 % SC-liposome quercetin capsule.

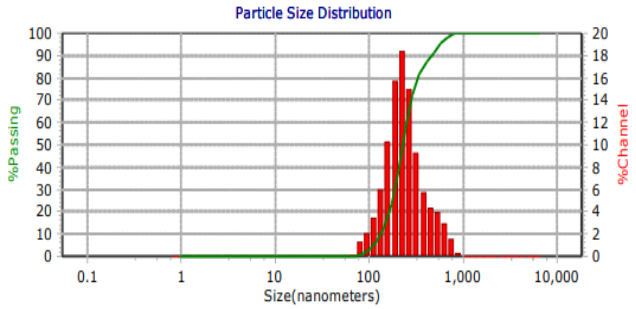

Fig. 7. Particle size distribution of SC-liposome genistein by preparing liposome on the supercritical state. (Mean diameter of the Volume distribution : 263 nm, Mean diameter of the Number distribution: 176.2 nm, Mean diameter of the Area distribution : 227.8 nm)

있었고, 또한 낮은 함량에서도 다중층의 라멜라 구조를 가지는 것으로 확인되었다. 이 다중층의 구조는 입자간의 합일을 막아주고, 다중층의 구조가 피부각질층구조와 유사하기 때문에 피부흡수가 빠르고, 높은 효능을 기대할 수 있을 것으로 고찰하였다.

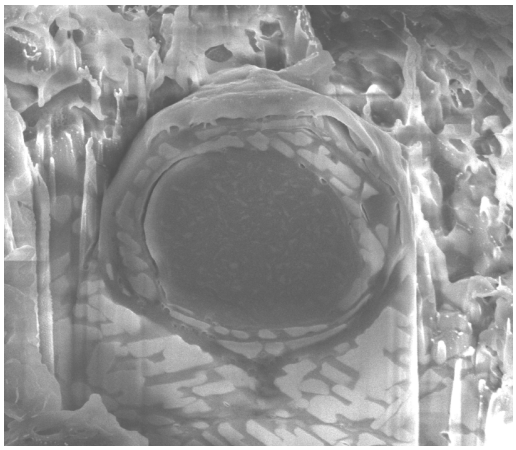

Fig. 8. Picture of SC-liposome genistein having multi-lamellar structures by observing the freezed fracture Cryo-TEM analysis.

3.5. 쿼세틴의 항산화력 측정을 통한 안정성 평가결과

인체에 유해한 활성산소 중에는 hydroxyl radical(·OH)과 같은 홀 전자를 갖는 자유라디칼이 포함되어있다. 이러한 ·OH와 같은 라디칼의 활성산소 종이 가진 자유전자는 구조적으로 불안정해 세포를 빠르게 손상시킨다. 항산화 효과는 이러한 홀 전자에 전자를 제공해 라디칼을 소거하는 능력인 환원력을 통하여 측정이 가능하다. 본 연구에서는 이 환원력을 DPPH와 ABTs를 통하여 측정하였다[27]. 이결과를 Fig. 9에 나타내었다. 초임계 공법을 이용하여 다중층의 리포좀에 난용성물질인 쿼세틴을 봉입한 후에 측정한 값과 4 ℃, 25 ℃, 45 ℃에서 1개월 동안 정치한 다음 항산화율을 관찰한 결과이다. 그래프에서 보는 바와 같이 45℃ 기준으로 초임계 리포좀에서는 SC_{50} 값이 7.28 ppm 소모된 반면, 일반 리포좀에서는 8.24 ppm이 소모되는 것으로 보아 초임계로 봉입한 리포좀 군에서 항산화 효율이 더 우수하다는 것을 확인할 수 있었다. 이를 통하여 초임계 리포좀이 일반 리포좀에 비하여 더 높은 항산화력이 우수한 것으로 보아 안정성 더 좋다는 것으로 고찰 할 수 있었다.

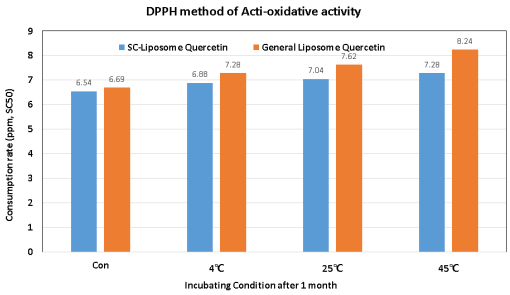

Fig. 9. Anti-oxidative activity of SC-liposome quercetin measured by DPPH method calculating consumption rate of SC50 value.

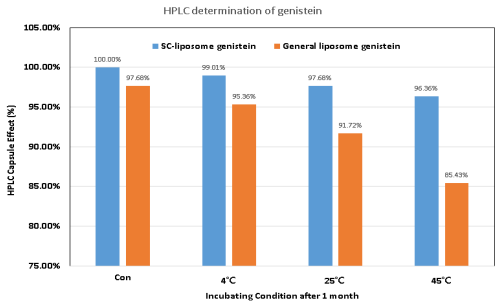

Fig. 10. Encapsulation effect of SC-liposome genistein measured by HPLC determination after incubation 1 month such as control, 4℃, 25℃, 45℃.

3.6. 제니스테인의 리포좀 봉입 및 HPLC 정량분석 결과

초임계공법을 통하여 멀티라멜라 리포좀에 난용성물질인 제니스테인을 봉입한 후에 4℃, 25℃, 45℃에 정치한 다음 1개월 후와 초기값의 역가를 관찰한 결과를 Fig. 10에 나타내었다. 대조군으로는 일반적인 리포좀 공법을 이용하여 제조한 시료를 기준으로 하여 비교 실험한 결과를 나타내었다. 그래프에서 보는 바와 같이 45℃ 기준으로 하여 1개월 후의 HPLC 정량 분석 결과를 보면 초임계 리포좀에서는 96.36%가 유지되고 있는 반면에 일반 리포좀에서는 85.43%가 유지되는

결과를 얻었다. 이것은 일반 리포좀 보다 초임계로 봉입한 리포좀이 12.8% 정도 우수하다는 것을 의미한다. 이 결과를 통하여 초임계 리포좀이 일반 리포좀에 비하여 더 높은 봉입효율을 보이고 있음을 알 수 있었다.

4. 결 론

본 연구는 초임계상태에서 리포좀을 생성하고 유효물질을 안정하게 봉입하여 화장품 산업에 응용할 수 있도록 새로운 기술과 소재를 개발하는 것으로 다음과 같은 결론을 내릴 수 있었다.

첫째; 초임계 상태에서 리포좀이 잘 형성 할 수 있는 SC-Lipid Complex의 계면활성제를 합성하였다.

둘째; 계면활성제인 SC-Lipid Complex의 외관은 엷은 황색의 프레이크, 미세한 고유 냄새를 가지고 있었고, 산가가 0.12 이었으며, HLB값은 12.5로 친수성 계면활성력을 가지고 있었다.

셋째; SC-Lipid Complex의 유화력 실험결과, 카프릴릭/카프릭트리글리세라이드는 97.3%, 트리에칠헥사노인은 96.2%의 유화력을 가지고 있음을 알 수 있었다.

넷째; SC-Lipid Complex를 사용하여 초임계 상태에서 genistein과 quercetin을 안정하게 봉입할 수 있었다.

다섯째; 이 리포좀을 1차 입자 크기는 253.9 nm이었으며, Cryo-TEM으로 관찰한 결과 다중층의 리포좀 소포체가 형성하였음을 알 수 있었다.

여섯째; quercetin의 항산화력을 DPPH법으로 측정한 결과 초임계 리포좀이 일반리포좀에 비하여 우수한 효과를 가지고 있음을 알 수 있었다.

일곱째; genistein의 안정성을 확인하기위해 HPLC로 정량분석을 통하여 잔존량을 분석한 결과 초임계 리포좀가 일반 리포좀에 비하여 12.8% 우수하다는 것을 알 수 있었다.

이러한 결과로 보아 초임계 공법을 통하여 리포좀을 형성할 수 있는 계면활성제 개발을 통하여 유기용매를 사용하지 않고 초임계상태에서 다양한 약물의 봉입이 가능하며, 높은 안정성을 기대하며 화장품의 새로운 소재개발은 물론 다양한 제형에 개발에 폭 넓게 응용이 확대될 것으로 기대한다.

감사의 글

이 연구는 중소벤처기업부 공고제2020-354호, 중소기업기술혁신개발사업(시장대응형) 과제로써 일부 정부 자금 지원을 받아서 수행한 결과임을 밝힙니다.

정부과제번호 : S2962535

References

1. J. Marcelino, J. L. F. C. Lima, S. Reis, and C. Matos, “Assessing the effects of surfactants on the physical properties of liposome membranes”, *Chem. Phys. Lipids*, Vol. 14, No.2 pp.94-103, (2007).
2. J. M. Yoo, S. Y. Kim, E. Cho, E. Cho, S. Choi, Y. Jeong, B. Ha, and H. J. Chae, “Stabilization of astaxanthin using nanoliposome”, *KSBB J.*, Vol. 25, No. 2 pp.130-136 (2010).
3. E. J. An, C. K. Kang, J. W. Kim, and B. S. Jin, “Lipid-based vesicles as transdermal delivery system”, *KIC News*, Vol 13, No 4 pp.24-34, (2010).
4. S. J. Kim, Y. J. Ju, I. Y. Kim, “Skin improvement effects and development of liposome capsule technology using centella asiatica extract powder”, *Journal of the Korean Applied Science and Technology*, Vol. 37, No.5 pp.1285-1297, (2020).
5. J.M.A Kemps, D.J.A Crommelin, “Hydrolyse van fosfolipiden in water ig milieu”, *Pharm. Weekbl.*, Vol.123, pp.355-363, (1988).
6. J.M.A Kemps, D.J.A. Crommelin, “Peroxidatie van fosfolipiden”, *Pharm. Weekbl.*, Vol.123, pp.457-469, (1988).
7. A. J. Baille, A. t. Florence, L. r. Hume, G. t. Murihead, A. Rogerson, “The preparation and properties of niosomes—non-ionic surfactant vesicles”, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, Vol. 37, No.12 pp.863-868, (1985).

8. Handjani-Vila, R. M., et al. "Dispersions of lamellar phases of non-ionic lipids in cosmetic products." *International Journal of Cosmetic Science,* Vol. 1, No.5 pp.303-314, (1979).
9. Norlen, Lars. "Stratum corneum keratin structure, function and formation-a comprehensive review." *International Jurnal of Cosmetic Science,* Vol.28, No.6 pp.397-425, (2006).
10. Norlén, Lars. "Skin barrier formation: the membrane folding model." *Journal of Investigative Dermatology,* Vol.117, No.4 pp.823-829, (2001).
11. I. Y. Kim, H. S. Choi, S. R. Lee, S.H. Choi, "Self assembly and formation of bi-continuous Cubic liquid crystalline phase". *Journal of the Korean Applied Science and Technology*, Vol. 31, No. 3 pp.478-485, (2014).
12. D. M. Anderson, H. Wennerstroem, "Self-diffusion in bicontinuous cubic phases, L3 phases, and microemulsions.", *Journal of physical chemistry*, Vol 94, No 24 pp.8683-8694, (1990).
13. A. Laouini, C. Jaafar-Maalej, I. Limayem-Blouza, S. Sfar, C. Charcosset, H. Fessi, "Preparation, characterization and applications of liposomes: state of the art", *Journal of Colloid Science and Biotechnology*, Vol.1 No. 2 pp.147-168, (2012).
14. Y.S. Jeun, E.J. Yang, "Studies on the using liposome cosmetics formulation technology", *J. of Make-up Design.*, Vol. 1, No. 2 pp.15-19, (2005).
15. S.D Yoon, H.S. Byun, "Application of separation technology and supercritical fluids process", *CLEAN TECHNOLOGY*, Vol. 18, No. 2 pp.123-143, (2012).
16. Y.G. Kim, J.Y. Imm, I.H. Kim, S.J. Kim, "Functional and emulsifying properties of balloonflower seeds oilextracted by supercritical carbon dioxide", *Journal of the Korean Applied Science and Technology,* Vol. 36, No. 1 pp.226-236, (2019).
17. M.J. Lee, N.H. Jeong, B.S. Jeang, "Preparation and properties of soybean lecithin liposome using supercritical reverse phase evaporation method", *J. of the Korean Oil Chemists' Soc.*, Vol. 27, No. 4 pp.391-398, (2010).
18. Blois MS. "Antioxidant determinations by the use of a stable free radical". *Nature* 181 pp.1199-1200, (1958).
19. R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. pannala, M. Yang, C. Rice-Evans, "Antixoidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay", *Free Radic Biol Med*, Vol.26, No.9 pp.1231-1237, (1999).
20. A. D. Banghan, M. M. Standish and T.C. Watkins, "Diffusion of Univalent lons across the Lamella of Swollen Phospholipids", *J. Mol. Biol.*, Vol 13, pp.238-252, (1965).
21. S. Batzry, E. D. Korn, "Single bioayer liposomes prepared without Sonication", *Biochim. et Biophys. Acta*, Vol.298, No.4 pp.1015-1019, (1973).
22. D. Deamer, A. D. Bangham, "Large volume liposomes by an ethervaporization method", *Biochim. et Biophys. Acta*, Vol.443, No.3 pp.629-634, (1976).
23. F. Szoka, D. Papahadjopoulos, "Procedure for preparation of liposomer with large internal agueous space and high capture by reverse-phase evaporetion", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of Amercia*, Vol.75, No.9 pp.4194-4198, (1978).
24. I. Matsaridou, P. Barmpalexis, A. Salis, I. Nikolakakis, "The influence of surfactant HLB and oil/surfactant ratio on the formation and properties of self emulsifying pellets and microemulsion reconstitution", *AAPS PharmSciTech*, Vol.13, No.4 pp.1319-1330, (2012).
25. H. J. Yang, S. N. Park, J. H. Kim, "The stability of emulsions formed by phase

inversion with variation of HLB of surfactant", *The Korea Society of Applied Science and Technology*, Vol.26, No.2 pp.117-123, (2009).
26. Y. H. Kim, "The effects of HLB value of the surfactants added in the silicon oil emulsion antifoamer on the antifoaming ability", *The Korea Society of Applied Science and Technology*, Vol.27, No.3 pp.223-232, (2010)
27. J. M. Hyun, Y. J. Jo, Y. B. Kim, S. M. Park, K. S. Yoon, N. H. Lee, "Anti-inflammatory and anti-oxidative activities of flavonoids extracted from dendranthema indicum flowers in Jeju island", *Journal of the Korean Applied Science and Technology*, Vol. 36, No. 4 pp.1259-1267, (2019).