

리포솜 내의 콜레스테롤 함량이 Ascorbic Acid의 안정성에 미치는 영향

임채환¹ · 이유원 · 이상천¹ · 이승철*

경남대학교 생명과학부, ¹정밀화학공학부

초 록 : 리포솜을 구성하는 지질 내의 콜레스테롤 함량이 포집된 ascorbic acid의 안정성에 미치는 영향을 조사하였다. 리포솜 내에서의 콜레스테롤 함량이 증가할수록 탈수화/재수화법으로 제조된 리포솜의 크기는 증가하였으며, 가해진 ascorbic acid의 포집률은 감소하였다. 또한, 콜레스테롤의 함량이 증가할수록 리포솜 내에 포집된 ascorbic acid의 안정성은 증대되었으며, 외부의 pH 영향을 크게 받지 않았다. 그러나, 4°C에서 저장한 경우에 비하여 37°C에서 저장한 경우에는 포집된 ascorbic acid의 산화가 빨리 진행되었다. 이러한 결과는 리포솜의 콜레스테롤 함량이 포집된 ascorbic acid의 안정성에 영향을 미침을 의미한다. (1999년 6월 14일 접수, 1999년 7월 30일 수리)

서 론

리포솜(liposome)은 인지질로 구성된 인위적인 막으로서,¹⁾ 액상 상태의 내부물질을 감싸는 미세캡슐로 이용될 수 있다. 리포솜에 대한 연구는 인위적인 세포막의 개념으로 세포의 성질을 규명하는 기초 연구를 비롯하여, 리포솜을 구성하는 인지질의 조성을 조절하여 리포솜 내부에 함유된 물질을 조절 방출시키는 특성을 발견하고 의약품에 이용하는 연구가 활발히 진행되어왔다.²⁾ 한편 식품에서는 lysozyme을 리포솜 내에 포집시켜 치즈 숙성 기간을 단축시켰으며,^{3,4)} 리포솜을 이용하여 단백질 가수분해 효소의 방출을 촉진하였고,⁵⁾ 산화되기 쉬운 불포화 지방산을 인지질과 같이 리포솜을 제조하였으며,⁶⁾ 리포솜을 이용하여 기능성 식품 소재의 이용성을 향상시킬 수 있다는 보고도 있다.^{7,8)}

Ascorbic acid(비타민 C)는 식품 내에 함유되거나 첨가되어 영양분이나 항산화제로 작용하는 기능성 식품소재로서, 체내에서 결핍되면 괴혈병을 야기시키며 상처의 치유를 방해하고, 치아의 상아질, 연골, 뼈의 단백질 등을 비롯하여 세포내 물질의 합성에도 필요하다.^{9,10)} 그러나 ascorbic acid는 빛과 습기 등 여러 외부 환경요인에 민감하여 쉽게 산화되는 경우가 많으며, 특히 고농도의 형태로 첨가될 때에는 색소 형성, 색조 변화, 단백질 변성, 향미 등의 변화가 유발된다.¹¹⁾ Ascorbic acid의 불안정성을 극복하기 위하여 리포솜을 이용한 결과,¹²⁾ 리포솜 내에 포집된 ascorbic acid는 수용액에서보다 안정성이 매우 증대되었으며, 리포솜은 ascorbic acid의 안정성을 향상시키는 보호 수단으로 이용될 수 있었다.

한편, 콜레스테롤은 스테로이드계의 지방으로서, 동물 세포의 세포막에 널리 존재한다. 콜레스테롤은 동맥경화를 유발하기도 하지만, 스테로이드 호르몬과 비타민 D₃의 전구체가 되거나 세포막의 유동성을 조절하는 작용을 하는 필수적 물질이

다. 콜레스테롤은 친수성 수산기와 소수성 고리를 가지고 있어, 반데르발스 결합으로 세포막 내의 포화 지방산의 사슬을 안정화시키는 작용을 하여 세포막의 유동성을 감소시키며 견고성을 부여하는 기능을 담당한다.¹³⁾

본 연구에서는 인위적 세포막인 리포솜의 막 안정성에 변화를 주기 위하여 리포솜 구성 인지질에 콜레스테롤을 첨가하였고, 리포솜 내에 포집된 ascorbic acid의 pH, 온도 등의 외부 변화에 따른 안정성에 대해 리포솜 내의 콜레스테롤이 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

재료 및 시약

실험에 사용한 L- α -phosphatidylcholine(L- α -lecithin), L-ascorbic acid, cholesterol, ascorbate oxidase, phenazine methosulfate(PMS), 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT)는 Sigma Chemical Co.(St Louis, Mo, U.S.A)에서 구입하였으며, 그 이외의 다른 시약들은 분석용 등급을 사용하였다.

리포솜의 조제

본 실험에서 이용한 리포솜은 구성 인지질을 soybean L- α -phosphatidylcholine(PC)과 콜레스테롤의 조성 비율 99 : 1, 95 : 5, 90 : 10, 80 : 20, 70 : 30, 60 : 40, 50 : 50(w/w)으로 변화시키면서 제조하였다. Ascorbic acid 함유 리포솜은 수화/재수화 방법에 의하여 제조하였다.^{14,15)} 상기 비율의 경우 각각 123.75 mg, 118.75 mg, 112.5 mg, 100 mg, 87.5 mg, 75 mg, 62.5 mg의 PC와 1.25 mg, 6.25 mg, 12.5 mg, 25 mg, 37.5 mg, 50 mg, 62.5 mg의 콜레스테롤을 50 ml 등근 플라스크에 넣은 후 5 ml의 chloroform:methanol(2 : 1, v/v)을 가하여 잘 녹이고, 플라스크의 벽면에 얇은 막이 형성될 때까지 회전 증발기를 이용하여 증발시켰다. 용매가 모두 제거된 이후에 잔여 용

찾는말 : 리포솜, 미세캡슐, 콜레스테롤, ascorbic acid
*연락처

매를 제거하기 위하여 질소가스를 15분 동안 불어넣은 후, 10 ml의 증류수를 가하여 0.5 g의 유리 구슬과 함께 벽면에 붙어 있는 막이 완전히 용해될 때까지 회전 증발기를 이용하여 회전시켜 multilamellar vesicle(MLV)을 조제하였다.

이 용액을 2시간 동안 상온에서 방치한 후 10,000 psi, 5 ml/min의 유속으로 French Press를 이용하여 small unilamellar vesicle(SUV)을 조제한 후 2,000×g에서 4°C, 10분 동안 원심분리시켜 침전물을 제거하였다. 원심상등액에 10 ml의 ascorbic acid 용액(20 mM/H₂O)을 첨가하여 동결건조시킨 후, 1 ml의 증류수를 가하여 수화시켜 dehydration/rehydration vesicle(DRV)을 생성하였다. 리포솜의 내부에 포집되지 않은 ascorbic acid를 제거하기 위하여 PCS buffer(0.134 M NaCl, 20 mM Na₂HPO₄, 10 mM citrate, pH 3.5) 8 ml를 가하여 희석한 후 12,000×g에서 4°C, 40분간 원심분리하여 침전물을 얻은 후, 다시 PCS buffer 10 ml를 가하여 원심분리하여 침전물을 얻었다.

포집된 ascorbic acid의 저장

Ascorbic acid 포집 리포솜을 제조한 후, 각각의 저장 조건에 따라 ascorbic acid 농도가 1 mM이 되도록 희석하여 2시간 동안 실온에서 방치하여 산소가 충분히 포화되도록 하였다. 저장에 이용한 용기는 20 ml 투명 유리병이며, 각 유리병에 4 ml의 리포솜 용액을 주입한 후 뚜껑을 막아 저장하였다.¹⁶⁾ 저장 기간은 총 40일로 하여 0, 1, 2, 4, 7, 10, 15, 20, 30, 40일 간격으로 ascorbic acid를 측정하였다. 이때 리포솜에 함유된 ascorbic acid의 안정성에 미치는 pH와 온도의 영향을 조사하기 위하여 50 mM acetate(pH 5.0)와 50 mM phosphate(pH 7.0) buffer에서 각각 저장하였고, 각각의 pH에서 4°C와 37°C로 나누어 저장을 하였으며, 저장하는 동안 모든 유리병은 알루미늄 호일을 이용하여 빛을 차단하였다.

리포솜의 크기 측정

Ascorbic acid가 포집된 리포솜의 크기를 측정하기 위하여 입도 분석기(LS230 Small Volume Module, Coulter Co.)를 이용하여 수행하였다.

Ascorbic acid의 측정

시료에 함유된 ascorbic acid는 ascorbate oxidase, PMS, MTT를 이용하여 측정하였다.¹⁷⁾ 시료에 존재하는 ascorbic acid는 MTT와 PMS에 의하여 산화가 이루어져서, 광학적으로 측정이 가능한 formazan이 형성된다. Ascorbic acid는 ascorbic acid oxidase에 의하여 특이적인 산화가 이루어지므로 두 가지 정량으로 형성되어진 formazan의 흡광도 측정에 의한 양의 차이에 의하여 ascorbic acid의 농도를 구하였다. 모든 결과는 3회 반복 실험하여 얻은 값의 평균치로 표시하였다.

리포솜 내의 콜레스테롤과 포집된 ascorbic acid 안정성과의 상관관계 측정

리포솜 내의 콜레스테롤 함량이 포집된 ascorbic acid의 안정성에 미치는 영향의 상관관계를 계산하기 위하여 회귀 직선

방정식¹⁸⁾을 이용하여 계산하였다.

결과 및 고찰

리포솜 내의 ascorbic acid 포집 효율

SUV 상태로 제조한 리포솜에 20 mM의 ascorbic acid를 가하여 탈수화/재수화법으로 미세캡슐화시킨 결과, 리포솜 내부에 26.4~42.8%의 ascorbic acid가 포집되었다(Table 1). 리포솜의 포집효율에는 리포솜의 제조 방법, 리포솜과 내부 물질의 비, 리포솜의 조성 등이 포집율에 영향을 미치며,⁴⁾ 본 실험에 이용한 탈수화/재수화법이 가장 효율이 높은 것으로 보고되어져 있다.¹⁵⁾ 한편, 동일한 방법으로 PC로만 구성된 리포솜의 경우 46.8%의 ascorbic acid가 포집되었으며,¹²⁾ Table 1의 결과와 비교해 보면 리포솜의 콜레스테롤 함량이 증가할수록 ascorbic acid의 포집 효율은 감소한 것을 알 수 있었다. 이는 콜레스테롤이 리포솜 막의 유동성을 감소시키고 안정성을 증가시켜 외부에서 가해지는 ascorbic acid의 포집을 감소시키는 것으로 추측된다.¹⁹⁾

리포솜 내의 콜레스테롤 함량이 리포솜의 크기에 미치는 영향

콜레스테롤 함량을 변화하면서 SUV 상태로 제조한 리포솜의 크기를 입도 분석기로 측정하였다(Table 2). 콜레스테롤 함량이 증가할수록 제조된 리포솜의 평균 크기는 증가하였으며, 이는 본 연구에서와 같이 MLV에 French Press를 이용하여 리포솜을 제조할 때 콜레스테롤 함량이 증가할수록 크기가 커진다는 결과와 일치하였다.²⁰⁾

리포솜 내에서 ascorbic acid의 산화안정성

PC와 콜레스테롤을 각각 일정한 비율로 제조한 리포솜에

Table 1. Efficiency of ascorbic acid encapsulation in different type of liposomes

Liposome composition (phosphatidylcholine : cholesterol)	Encapsulation efficiency of ascorbic acid (%)
99 : 1	41.6
95 : 5	42.8
90 : 10	40.5
80 : 20	37.2
70 : 30	35.7
60 : 40	29.1
50 : 50	26.4

Table 2. Effect of cholesterol content on the average size of ascorbic acid encapsulated liposomes prepared by dehydration/rehydration method

Liposome composition (phosphatidylcholine : cholesterol)	Average size of liposome (μm)
99 : 1	3.5
90 : 10	11.4
80 : 20	13.4
60 : 40	15.4
50 : 50	22.0

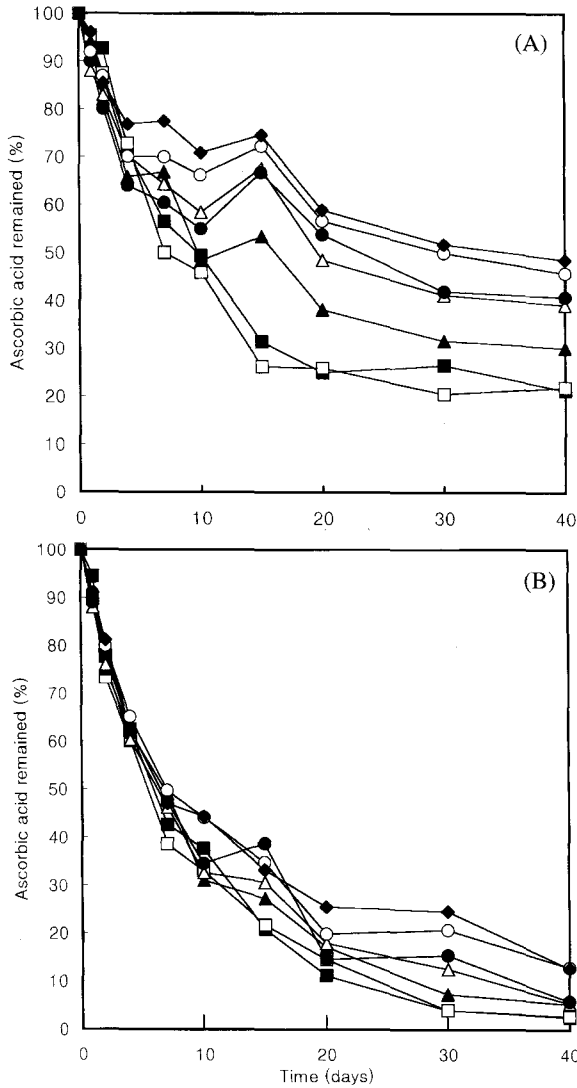


Fig. 1. Decomposition of ascorbic acid in liposomes during storage without light in 50 mM acetate buffer (pH 5.0) at 4°C(A) and at 37°C(B). Liposomes were composed of phosphatidylcholine and cholesterol with ratio(w/w) of 99:1(■), 95:5(□), 90:10(▲), 80:20(△), 70:30(●), 60:40(○), and 50:50(◆).

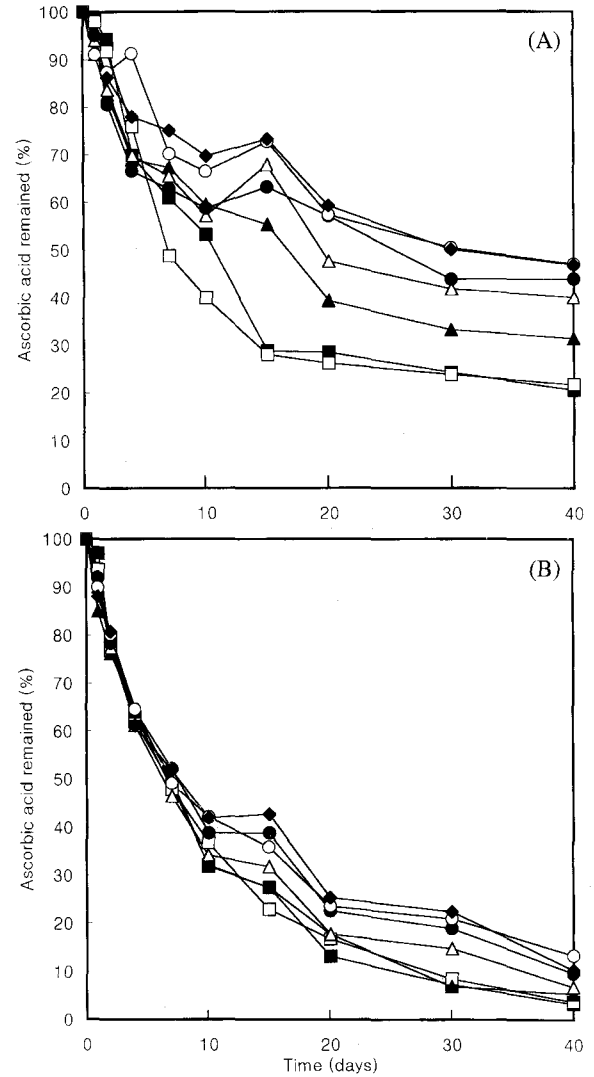


Fig. 2. Decomposition of ascorbic acid in liposomes during storage without light in 50 mM phosphate buffer (pH 7.0) at 4°C(A) and at 37°C(B). Liposomes were composed of phosphatidylcholine and cholesterol with ratio(w/w) of 99:1(■), 95:5(□), 90:10(▲), 80:20(△), 70:30(●), 60:40(○), and 50:50(◆).

ascorbic acid를 포집한 후 pH 및 온도를 인자로 하여 안정성을 측정하였다. Acetate buffer(pH 5.0), 4°C에서 일정한 비율로 제조된 리포솜에 함유된 ascorbic acid를 저장하면서 산화 안정성을 측정한 결과가 Fig. 1A에 나타나 있다. PC와 콜레스테롤을 50:50의 비율로 제조한 리포솜에 저장된 경우, 저장 2일 경과 후에는 포집된 ascorbic acid의 85.5%가 환원된 상태를 유지하였고, 10일이 경과하였을 경우에는 70.9%, 40일 경과 후에는 48.6%가 유지되었다. 또한 리포솜의 콜레스테롤의 함량이 감소할수록 리포솜에 포집된 ascorbic acid의 안정성도 감소되어 PC와 콜레스테롤의 비가 99:1인 경우에는 40일 경과 후 21.2%의 ascorbic acid가 환원된 상태를 유지하였다. 그러나, 동일 조건에서 리포솜에 포집되지 않은 ascorbic acid는 저장 기간 1일이 경과하였을 때 13.3%만이 환원형으로 검출된 것¹²⁾과 비교하였을 때 리포솜에서의 콜레스테롤의 효과는 매우 큰 것으로 밝혀졌다. 리포솜 막의 투과성과 내부물질에

대한 안정성은 막지질 조성에 의존하며, 콜레스테롤의 농도가 증가하여 막의 포화도가 높아지면 내부물질의 유출을 억제하여 매우 안정하다.¹⁾ 따라서, 본 연구의 결과와 같이 리포솜 내의 콜레스테롤은 포집된 ascorbic acid의 안정성을 증가시키는 주요 인자로 작용함을 알 수 있다.

한편, ascorbic acid를 리포솜에 포집하여 pH 5.0, 37°C에서 저장을 하였을 경우에는 상대적으로 산화속도가 증가하였다 (Fig. 1B). 4°C에 저장하였을 때, PC와 콜레스테롤의 비가 50:50인 경우 40일 경과 후에 48.6%의 ascorbic acid가 산화되지 않았으나, 37°C에서는 12.8%만이 산화되지 않았으며, 다른 경우도 유사한 경향을 나타내었다. 그러나, 리포솜에 포집되지 않은 경우에는 7일이 경과하였을 때 모든 ascorbic acid가 산화된 것¹²⁾과 비교하면, 온도가 상승한 경우에도 리포솜은 ascorbic acid의 산화를 억제하는 수단이 될 수 있음을 알 수 있다.

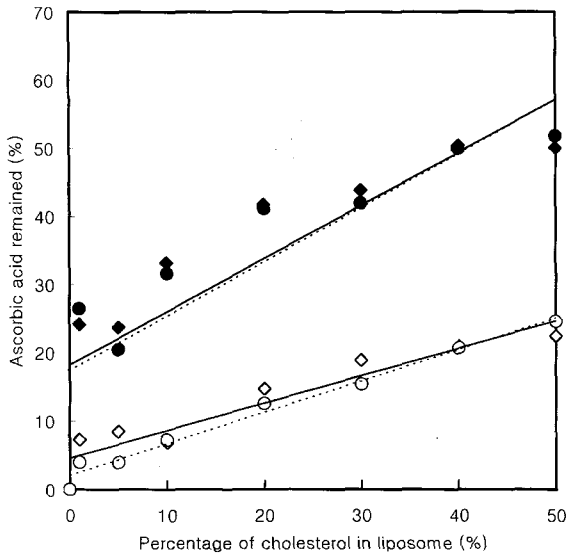


Fig. 3. Effect of cholesterol content in liposome on the stability of encapsulated ascorbic acid. Ascorbic acid encapsulated liposomes were stored for 40 days at pH 7.0, 4°C (◆, —); at pH 5.0, 4°C (●, ---); at pH 7.0, 37°C (◇, —); at pH 5.0, 37°C (○, ---).

중성 조건인 phosphate buffer(pH 7.0)에서 리포솜에 함유된 ascorbic acid의 안정성을 측정한 결과도 산성 조건에서의 결과와 유사하였다(Fig. 2). 즉, 4°C에서 40일간 저장하였을 때, PC와 콜레스테롤이 50:50인 리포솜에서는 포집된 ascorbic acid의 46.8%, 60:40의 경우에는 47.0%, 70:30의 경우에는 43.9%, 80:20에서는 39.9%, 90:10에서는 31.4%가 환원된 상태를 유지하였으며, 동일 조건에서 리포솜에 포집되지 않은 ascorbic acid는 20일째에 완전히 산화되었다.¹²⁾ 또한, 저장 온도가 상승할수록 산화되는 속도는 빨라져서, 40일 경과 후에 PC와 콜레스테롤이 50:50인 리포솜에서는 포집된 ascorbic acid의 10.3%, 60:40의 경우에는 13.3%, 70:30의 경우에는 9.6%, 80:20에서는 6.8%, 90:10에서는 5.4%만이 환원된 상태를 유지하였으며, 동일 조건에서 리포솜에 포집되지 않은 ascorbic acid는 10일째에 완전히 산화되었다.¹²⁾

리포솜 내의 콜레스테롤 함량과 포집된 ascorbic acid의 안정성 간의 상관관계

상기 결과로부터, 40일째의 결과를 이용하여 리포솜의 콜레스테롤 함량과 포집된 ascorbic acid의 안정성 간의 상관관계를 구하였다(Fig. 3). 4°C, pH 5의 저장조건에서는 Y절편이 23.7, 기울기가 0.62, $r=0.958295$, $p<0.001$ 이었으며 4°C, pH 7의 저장조건에서는 Y절편이 24.2, 기울기가 0.61, $r=0.957682$, $p<0.001$ 로 측정되어 매우 유사한 결과를 나타내었다. 또한, 37°C에 저장한 경우에도 pH 5에서는 Y절편이 4.0, 기울기가 0.40, $r=0.982262$, $p<0.001$ 이었으며, pH 7에서는 Y절편이 7.1, 기울기가 0.33, $r=0.961308$, $p<0.001$ 로 측정되어 매우 유사하였다. 이같은 사실은 리포솜 내의 콜레스테롤 함량은 포집된 ascorbic acid의 안정성을 증대시키는 중요한 인자이며, 외부의 pH와 관계없이 저장 온도에 매우 민감함을 의미한다.

외부환경에 민감한 식품소재인 ascorbic acid를 리포솜으로 미세캡슐화하여 안정성을 높일 경우, 리포솜의 지질 조성에서 콜레스테롤 함량이 증가할수록 포집된 ascorbic acid의 안정성은 증가하였으며, 특히 pH의 영향을 감소시키는 좋은 수단이 될 수 있음을 의미한다. 그러나 리포솜 내에 콜레스테롤을 첨가하였을 경우에도 ascorbic acid는 온도에 영향을 받고 있으며, 이는 리포솜이 온도의 변화에 민감함을 의미한다. 또한, 콜레스테롤 함량이 높을수록 리포솜의 크기가 증가하고 포집 효율은 낮게 관찰되었으며, 향후 리포솜을 식품소재에 응용하고자 할 때 그 구성 지질의 영향을 조사하는 것이 중요함을 의미한다.

감사의 글

본 연구는 1998년도 한국과학재단의 핵심전문연구 (과제번호: 981-0608-035-2)의 지원으로 수행된 연구결과의 일부로서 이에 감사드리며, 논문 작성에 많은 도움을 주신 이화여자대학교의 배운수교수님께도 깊이 감사드립니다.

참고문헌

- New, R. R. C. (1994) Preparation of liposomes. In *Liposomes, a practical approach*, New, R.R.C. (ED.), IRL Press, Oxford, England, p. 33-104.
- Lasic, D. D. (1998) Novel applications of liposomes. *Trends Biotechnol.* **16**, 307-321.
- Kirby, C. J., Brooker, B. E. and Law, B. A. (1987) Accelerated ripening of cheese using liposome-encapsulated enzyme. *Int. J. Food Sci. Technol.* **22**, 355-375.
- Kim, T. J., Kim, Y. S. and Pyun, Y. R. (1996) Liposome-microencapsulation of lysozyme and its stimulated release. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **28**, 399-404.
- Koide, J. and Karel, M. (1987) Encapsulation and stimulated release of enzymes using lecithin vesicles. *Int. J. Food Sci. Technol.* **22**, 707-723.
- Haynes, L. C. and Levin, H. (1991) Method and liposome composition for the stabilization of oxidizable substances. U.S. Patent 5,139,803.
- Kirby, C. J. (1984) Controlled delivery of functional food ingredients: Opportunities for liposomes in the food industry. In *Liposome Technology*, Gregoriadis, G. (Ed.), CRC Press, Vol. 2, p. 215-232.
- Kim, H. C. and Baianu, I. C. (1991) Novel liposome microencapsulation technique for food applications. *Trends Food Sci. Technol.* **2**, 55-61.
- Hodges, R. E., Hood, J., Canham, J. E., Sauberlich, H. E. and Baker, E. M. (1971) Clinical manifestations of ascorbic acid deficiency in man. *Am. J. Clin. Nutr.* **24**, 432-443.
- Hodges, R. E., Baker, E. M., Hood, J., Sauberlich, H. E. and March, S. C. (1969) Experimental scurvy in man. *Am. J. Clin. Nutr.* **22**, 533-548.
- Liao, M. L. and Seib, P. A. (1988) Chemistry of L-ascorbic acid related to foods. *Food Chem.* **30**, 313-317.
- Lee, Y. W., Hwang, Y. I. and Lee, S. C. (1999) Effect of lipo-

- some on the stabilization of ascorbic acid. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **31**, 280-284.
13. Campbell, M. K. (1995) Lipids and membranes. In *Biochemistry*, Campbell, M. K. (Ed.), Saunders College Publishing, p. 252-256.
 14. Kirby, C. J. and Gregoriadis, G. (1984) Dehydration-rehydration vesicles, a simple method for high yield drug entrapment in liposomes. *Biotechnol.* **2**, 979-984.
 15. Kirby, C. J. and Gregoriadis, G. (1984) A simple procedure for preparing liposomes capable of high encapsulation efficiency under mild conditions. In *Liposome Technol.*, Gregoriadis, G. (Ed.), CRC Press, Vol. 1, p. 18-27.
 16. Kirby, C. J., Whittle, C. J., Rigby, N., Coxon, D. T. and Law, B. A. (1991) Stabilization of ascorbic acid by microencapsulation in liposomes. *Int. J. Food Sci. Technol.* **26**, 437-449.
 17. Beutler, H. O. (1984) L-ascorbate and L-dehydroascorbate. *Methods in Enzymatic Analysis*. 3rd ed., Bermeyer, H. V. (Ed.), Verlag Chemie., Basel, Vol. 1, p. 376-385.
 18. McClave, J. T. and Dietrich, F. H. (1982) Simple linear regression. In *Statistics*, 2nd ed., Dellen Publishing Co., p. 528-584.
 19. Juliano, R. L. (1983) Interactions of proteins and drugs with liposomes. In *Liposomes*, Ostro, M. J. (Ed.), Marcel Dekker, Inc., p. 53-86.
 20. Lelkes, P. I. (1984) The use of French pressed vesicles for efficient incorporation of bioactive macromolecules and as drug carriers *in vitro* and *in vivo*. In *Liposome Technol.*, Gregoriadis, G. (Ed.), CRC Press, Vol. 1, p. 51-65.

Effect of Cholesterol in Liposome on the Stabilization of Encapsulated Ascorbic Acid

Chae-Hwan Rhim¹, Yu-Weon Lee, Sang-Chun Lee¹ and Seung-Cheol Lee* (*Division of Life Sciences, ¹Division of Fine Chemistry and Chemical Engineering, Kyungnam University, Masan, 631-701, Korea*)

Abstract : Cholesterol plays an important role in various physiological responses and membrane stability. To investigate the effect of cholesterol in liposome on the stability of encapsulated ascorbic acid, the physico-chemical experiments using various amounts of cholesterol-containing liposomes were performed. The encapsulation efficiency of ascorbic acid was decreased with increasing cholesterol content in liposome, whereas size of liposome was increased. Furthermore, the stability of encapsulated ascorbic acid was increased with increasing the content of cholesterol. The stability was not affected by pH. Encapsulated ascorbic acid in liposome stored at 37°C was rapidly oxidized compared to those stored at 4°C. These results suggest that cholesterol in liposome affects largely to the stability of encapsulated ascorbic acid.

Key words : liposome, microencapsulation, cholesterol, ascorbic acid

*Corresponding author