

## 염의 농도에 따른 DOPC 리포솜의 안정성에 관한 연구

원 두 현 · 김 선 영 · 임 규 남 · 박 수 남<sup>†</sup>

서울과학기술대학교 자연생명과학대학 정밀화학과  
(2011년 3월 14일 접수, 2011년 3월 18일 수정, 2011년 3월 20일 채택)

### A Study on the Stability of DOPC Liposome

Doo Hyun Won, Sun Young Kim, Gyu Nam Lim, and Soo Nam Park<sup>†</sup>

Department of Fine Chemistry, College of Nature and Life Science, Seoul National University of Science and Technology, 172, Gongneung 2-dong, Nowon-gu, Seoul 139-743, Korea

(Received March 14, 2011; Revised March 18, 2011; Accepted March 20, 2011)

**요약:** 본 연구에서는 DOPC 리포솜의 안정성에 대한 염의 영향을 알아보기 위하여 증류수, phosphate buffer, 그리고 phosphate buffered saline으로 리포솜을 제조하였다. 그리고 염의 추가에 따른 리포솜의 입자크기 및 제타전위 등 기본적인 물성 변화를 확인하였다. 그에 앞서 희석에 대한 영향을 알아보기 위하여 리포솜을 각각 제조시 용매로 40배와 80배로 희석하였고 그 결과 같은 용매로 희석시킬 경우 40배 희석까지는 안정한 것을 확인하였다. 증류수로 제조한 리포솜을 증류수, phosphate buffer, 그리고 phosphate buffered saline으로 희석하였고, phosphate buffer로 제조한 리포솜은 phosphate buffer, 그리고 phosphate buffered saline으로 희석하여 염 농도 증가에 따른 리포솜의 입자크기 및 제타전위 변화를 확인하였다. 그 결과 리포솜 분산액 내에 존재하는 염의 양이 증가할수록 리포솜의 입자크기가 약간씩 작아지는 경향을 나타내었고, 제타전위 또한 염의 양이 증가할수록 0에 가까워지는 경향을 나타내었다. 결론적으로, 리포솜의 입자크기와 제타전위는 리포솜의 안정성을 판단할 수 있는 좋은 요소이며 또한 리포솜 제조시의 용매와 다른 조건의 염 농도는 리포솜 입자의 안정성에 큰 영향을 줄 수 있다고 사료된다.

**Abstract:** In this study, DOPC liposomes were prepared with distilled water, phosphate buffer and phosphate buffered saline to evaluate the effects of salt on the stability of DOPC liposome. The changes in physical properties (like particle size and zeta potential) of liposome were measured after adding the salt. Liposomes were diluted 40 times and 80 times with hydration solvent to confirm the effect of dilution. Consequently, the stability of liposome was maintained up to 40 times dilution with hydration solvent. The liposome that prepared with distilled water was diluted with distilled water, phosphate buffer and phosphate buffered saline, and the liposome that prepared with phosphate buffer was diluted with phosphate buffer and phosphate buffered saline to evaluate the salt-induced changes in particle size and zeta potential. As results, the particle size increased slightly and zeta potential became closer to 0 when the salt concentration was increased. In conclusion, particle size and zeta potential of liposome could be reasonable factors to evaluate the stability of liposome. In addition, we suggest that salt concentration of hydration solvent has a significant effect on the stability of liposome.

**Keywords:** DOPC liposome, zeta potential, particle size, stability, phosphate buffered saline

<sup>†</sup> 주 저자 (e-mail: snpark@seoultech.ac.kr)

## 1. 서 론

신체를 둘러싸고 있는 피부의 상층부인 표피의 각질층은 유해 환경으로부터 신체를 보호하는 일차적 장벽기능을 수행한다. 또한 독성물질이나 미생물의 침입, 물리적 자극, 자외선 등에 대하여도 중요한 방어막이며, 피부를 통한 수분 손실을 억제함으로써 피부가 정상적인 생물학적 기능을 유지할 수 있도록 한다. 이러한 각질층의 두께는 0.05 ~ 0.1 mm 정도로 매우 얇은 층이지만 그 구조적 특성 때문에 장벽기능 및 보습기능을 수행할 수 있다. 각질층의 구조는 일반적으로 'bricks and mortar'로 설명된다. 각질층은 크게 각질세포와 각질세포간 지질로 구성되며, 각질세포간 지질은 주로 인지질, 세라마이드, 콜레스테롤 등으로 구성되며 세포막과 유사한 전형적인 이중막(Bilayer) 구조로 되어 있다. 이러한 이중막 구조의 피부지질은 생화학적·물리적 피부 방어 기능을 수행하는 일차 방어선으로 피부 건강을 좌우하게 된다[1-3]. 하지만 피부 장벽기능으로 인하여 외부에서 활성 물질을 피부 속으로 전달하는 것이 쉽지 않다. 따라서 피부에 손상을 주지 않고 활성 물질을 피부로 전달하기 위한 피부 전달시스템이 활발히 연구되고 있으며[4-9], 그 대표적인 예가 광범위한 분야에서 응용되고 있는 리포솜이다. 리포솜은 인지질이 수용액 상에서 자발적으로 형성하는 생체막과 유사한 지질 이중층의 소포체이며 그 내부 공간에는 친수성 물질들을 담지할 수 있으며, 이중막 사이에는 소수성 물질들을 담지할 수 있다는 특징이 있다. 또한 리포솜은 인지질로 이루어져 생체 내에서 분해가 가능하며 독성이 적고, 리포솜의 지질, 표면전하, 콜레스테롤의 함량 등에 따라 크기 및 형태 등을 다양하게 할 수 있고 쉽게 제조가 가능하다는 장점이 있다. 이러한 장점 때문에 리포솜은 다양한 분야에서 활발하게 연구되어 왔다[10-13]. 또한 리포솜의 안정성에 대하여 온도, pH 그리고 콜레스테롤 농도 등이 미치는 영향에 대하여도 보고된 바가 있다[14,15]. 하지만 리포솜이 실제 생체 내 시스템에서 안정하게 유지되는지, 불안정하다면 그에 대한 요인은 무엇인지에 대한 연구는 아직 미미한 실정이다. 따라서 본 저자들은 염이 리포솜의 안정성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 리포솜을 증류수, phosphate buffer, 그리고 phosphate buffered saline으로 제조 및 희석하여 리포솜의 입자크기 및 제타전위 등 기본적인 물성에 변화 있는지를 확인하였다.

## 2. 재료 및 실험

### 2.1. 기기 및 시약

리포솜 제조를 위한 1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine (DOPC)과 cholesterol은 각각 Avanti Polar Lipids (USA)사, Sigma (USA)사의 제품을 사용하였다. Rotary evaporator (BUCHI, Switzerland)와 초음파 파쇄기(BRANSON, USA)를 리포솜 제조시 이용하였고, 리포솜의 입자크기와 제타전위를 측정하기 위해 ELS-Z (OTSUKA, Japan)를 사용하였다. 지질을 녹일 용매로 사용한 chloroform은 특급시약을 사용하였고, phosphate buffered saline과 phosphate buffer 제조에 사용한  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 은 sigma사의 제품을 사용하였다.

### 2.1. Liposome 제조

#### 2.1.1. Phosphate Buffer 및 Phosphate Buffered Saline의 제조

리포솜을 수화시키기 위한 phosphate buffer와 phosphate buffered saline은 다음과 같은 방법으로 제조하였다. Phosphate buffer는 1.6 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  용액과 9.6 mM의  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  용액을 각각 준비한 후  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  용액에  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  용액을 조금씩 넣어가며 교반한 후 pH 7.4로 맞추었다. 또한 0.14 M phosphate buffered saline은 sigma사에서 구입한 건조된 파우더를 1 L의 증류수에 완전히 녹인 후 사용하였다.

#### 2.1.2. Liposome의 제조

DOPC와 cholesterol을 4 : 1 몰 비율로 고정하여 리포솜을 제조하였다. 건조된 둥근 플라스크에 DOPC 0.05 g, 그리고 cholesterol 0.012 g을 넣고 chloroform 15 mL로 완전히 용해시킨 후 rotary evaporator로 용매를 제거하여 둥근 플라스크 벽면에 thin film을 형성시킨다. Lipid film을 세 가지 용매(증류수, phosphate buffer, 그리고 phosphate buffered saline) 10 mL로 수화시킨다. 수용액에서 자발적으로 형성된 리포솜의 지질의 최종 농도는 0.5 % (w/v)이며 초음파 파쇄기를 사용(160 Watt, 30 min)하여 입자 크기를 작고 균일하게 조절하였다.

### 2.2. 시간에 따른 liposome의 안정성 확인

증류수, phosphate buffer, 그리고 phosphate buffered saline으로 제조한 리포솜의 시간에 따른 안정성을 입자

크기 변화로서 확인하였다. 각각의 리포솜을 4 °C에 보관하면서 3주 동안 입자크기의 변화를 ELS-Z로 측정하여 확인하였다.

### 2.3. 희석에 의한 liposome의 안정성 확인

희석에 의한 리포솜의 안정성을 확인하고자 증류수, phosphate buffer, 그리고 phosphate buffered saline으로 수화시킨 리포솜 분산액을 일정량 취하여 phosphate buffered saline으로 40배, 80배로 각각 희석한 후 입자크기와 제타전위를 ELS-Z로 측정하였다.

### 2.5. 염에 의한 liposome의 안정성 확인

리포솜 분산액에 염이 추가 되었을 경우 리포솜의 안정성에 어떠한 변화가 일어나는지를 다음과 같이 확인하였다.

#### 2.3.1. 증류수로 제조한 Liposome

증류로 수화하여 제조한 리포솜 분산액을 일정량 취하여 증류수, phosphate buffer, 그리고 phosphate buffered saline으로 각각 40배 희석한 후 입자크기와 제타전위를 ELS-Z로 측정하였다.

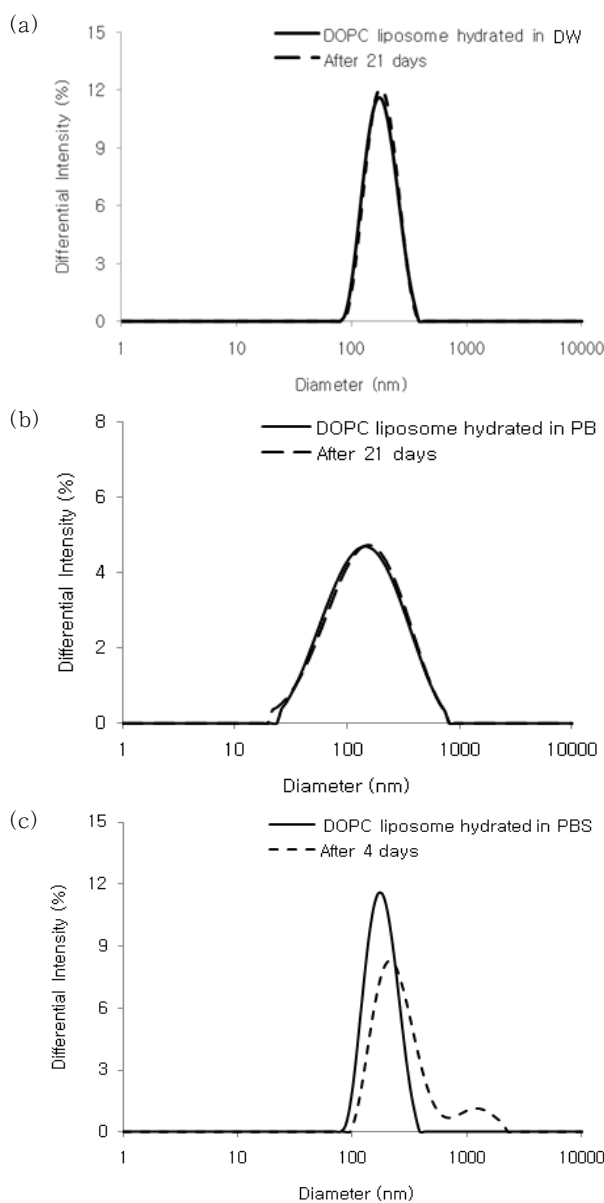
#### 2.3.2. Phosphate Buffer로 제조한 Liposome

Phosphate buffer로 수화하여 제조한 리포솜 분산액을 일정량 취하여 phosphate buffer로 40배, phosphate buffered saline으로 40배 희석한 후 입자크기와 제타전위를 ELS-Z로 측정하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 시간에 따른 liposome의 안정성

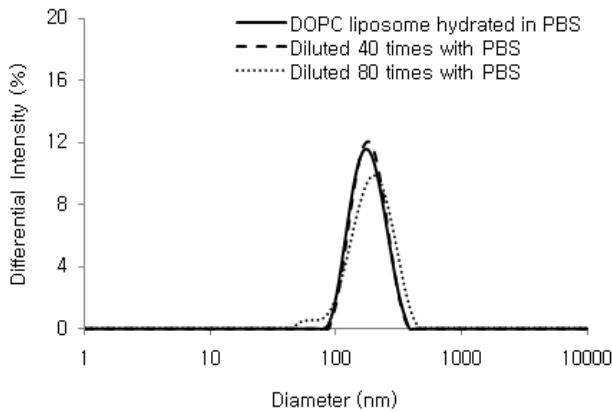
시간에 따른 리포솜의 안정성을 입자크기 변화로서 확인하였다. 증류수, phosphate buffer, 그리고 phosphate buffered saline으로 제조한 리포솜을 각각 4 °C에 보관하면서 입자크기 및 제타전위를 측정된 결과를 Figure 1에 나타내었다. 증류수와 phosphate buffer로 수화시킨 리포솜의 경우 21일이 지난 후에도 초기의 입자크기를 유지하였다. 반면에 phosphate buffered saline으로 수화시킨 리포솜은 제조 4일 후에 입자크기의 변화가 일어남을 확인하였다. 따라서 같은 보관 조건에서 증류수 및 phosphate buffer로 제조한 liposome이 phosphate buffered saline으로 제조한 리포솜보다 상대적으로 안정성이 우수함을 알 수 있다.



**Figure 1.** Stability of 0.5 % DOPC liposome (size distributions of liposome prepared with distilled water (a), phosphate buffer (b) and phosphate buffered saline (c)).

### 3.2. 희석에 의한 liposome의 안정성

리포솜 분산액을 희석함으로써 발생하는 입자크기 및 제타전위 등의 변화를 통하여 리포솜의 안정성을 판단하고자 하였다. 증류수, phosphate buffer, 그리고 phosphate buffered saline으로 제조한 리포솜을 각각 40배, 80배 희석한 후 입자크기를 측정하였다. PBS로 40배 희석한 경우에는 희석하기 전과 같은 입자크기를 확인할 수 있었으나 80배로 희석한 경우에는 입자크기의 분포도



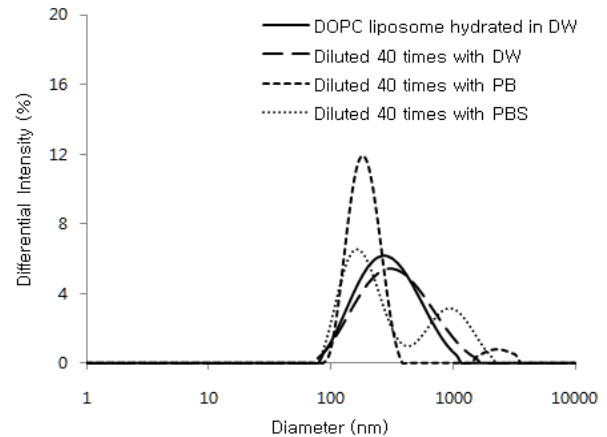
**Figure 2.** Stability of diluted DOPC liposome (size distributions of liposome prepared with phosphate buffered saline).

가 달라졌음을 확인할 수 있었고(Figure 2), 이것은 ELS-Z에서 검출할 수 있는 검출 한계에 가까워진 농도이다. 따라서 80배로 희석한 경우는 그 데이터를 확신할 수 없고 염에 의한 안정성을 평가하는 실험에서는 40배 이상 희석하지 않았다. 이후 실험이 진행됨에 따라 증류수와 phosphate buffer로 수화시킨 리포솜 역시 40배 희석까지는 희석에 의하여 입자크기가 변화하지 않음이 확인되었다.

### 3.3. 염에 의한 Liposome의 안정성 확인

#### 3.3.1. 증류수로 제조한 Liposome

리포솜에 대한 염의 영향을 확인하기 위하여 증류수로 수화하여 제조한 리포솜을 증류수로 40배, phosphate buffer로 40배, 그리고 phosphate buffered saline으로 40배 희석하여 입자크기와 제타전위 변화를 확인하였으며 염에 의한 영향만을 보기 위하여 40배 이하로만 희석하였다. 세 가지 용매로 희석한 리포솜의 입자크기를 측정하였을 때, 증류수로 40배 희석한 것을 제외하고는 phosphate buffer와 phosphate buffered saline으로 희석한 리포솜은 모두 초기 입자크기 분포와 일치하지 않으며, 입자가 불안정하여 그 크기가 작아지거나 혹은 커졌음을 알 수 있다(Figure 3). 또한 이때의 제타전위의 변화를 살펴보았다(Table 1). 증류수, phosphate buffer, 그리고 phosphate buffered saline의 순서로 제타전위가 0에 가까운 수치로 변화함을 확인하였고 이는 phosphate buffered saline 내의 염에 의하여 리포솜 입자 사이의 반발력이 감소하여 입자들끼리의 응집현상이 일어날 수 있고 따라서 입자크기 분포도가 변화하였음을 알 수 있으며



**Figure 3.** Stability of diluted DOPC liposome prepared with distilled water (size distributions of liposome diluted 40 times with distilled water, phosphate buffer and phosphate buffered saline).

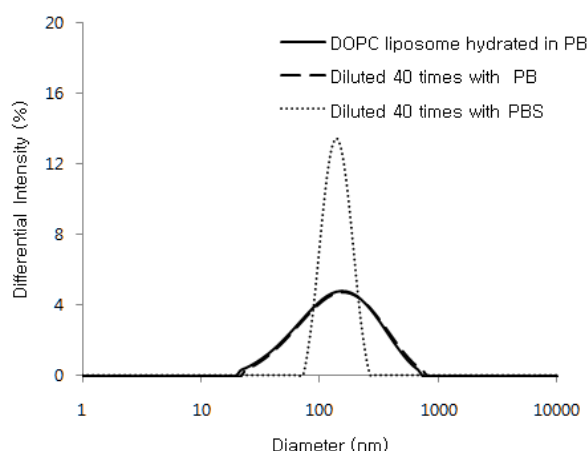
**Table 1.** Effect of Salt to Zeta Potential of DOPC Liposome Prepared with Distilled Water

Liposome	Zeta potential (mV)
Liposome diluted 40 times with DW	-28.01
Liposome diluted 40 times with PB	-20.43
Liposome diluted 40 times with PBS	-4.20

이것은, 증류수가 pH 변화에 완충작용을 하지 못하기 때문에 저농도의 염에 의해서도 크게 영향을 받기 때문인 것으로 사료된다. 따라서 리포솜 안정성에 염 농도가 큰 영향을 준다고 판단할 수 있다.

#### 3.3.2. Phosphate Buffer로 제조한 Liposome

Phosphate buffer로 제조한 리포솜에 대하여 안정성에 미치는 염의 영향을 확인하기 위하여 phosphate buffer로 40배, 그리고 phosphate buffered saline으로 40배 희석하여 입자크기(Figure 4)와 제타전위 변화(Table 2)를 확인하였다. Phosphate buffer와 상대적으로 염 농도가 더 진한 phosphate buffered saline으로 희석한 리포솜의 입자크기를 측정하였을 때 리포솜의 입자크기는 크게 변하지 않았으나 phosphate buffered saline에서 약간 입자크기가 감소하였다. 이는 염이 리포솜을 구성하고 있는 인지질의 친수성 부분의 전하를 상쇄시켜 표면 전위를 감소시켰으며, 반발력으로 인한 공간을 줄어든다고 하고 이로 인해 인지질 사이가 조밀해졌다고 추측할 수 있다. 또한 제타전위는 증류수로 제조한 리포솜과 마찬가지로



**Figure 4.** Stability of diluted DOPC liposome prepared with phosphate buffer (size distributions of liposome diluted 40 times with phosphate buffer and phosphate buffered saline).

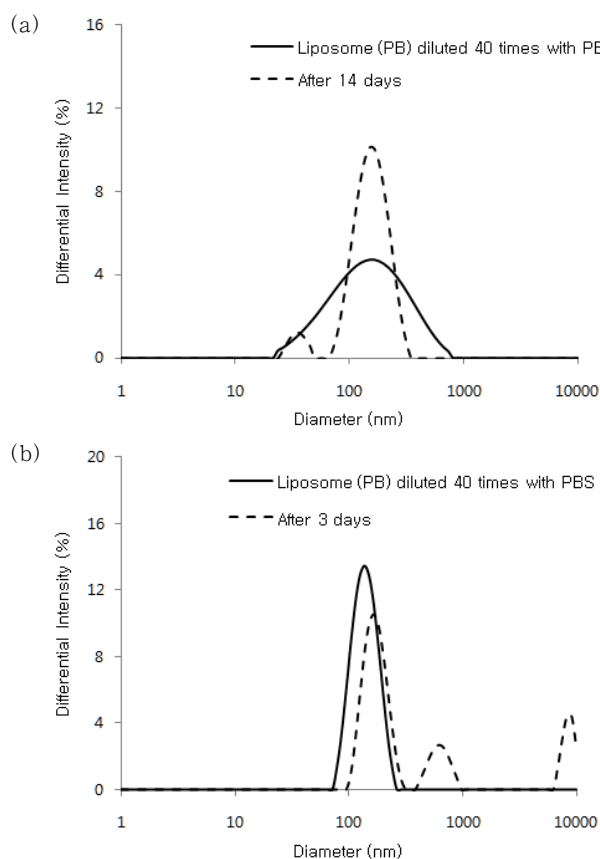
**Table 2.** Effect of Salt to Zeta Potential of DOPC Liposome Prepared with Phosphate Buffer

Liposome	Zeta potential (mV)
Liposome hydrated in PB	40.48
Liposome diluted 40 times with PB	32.76
Liposome diluted 40 times with PBS	-0.35

가지로 phosphate buffered saline의 경우에 0에 가까워짐을 확인할 수 있었다. 이것은 염에 의하여 리포솜 입자 사이의 반발력이 감소하여 발생하는 입자들끼리의 응집 현상으로 인한 것이며 제타전위의 절대값이 작을수록 불안정하므로 시간에 따른 입자크기 변화를 재확인하였다 (Figure 5). 그 결과, phosphate buffered saline으로 40배 희석한 리포솜은 3일 후에 입자크기가 크게 변화하였고 이것은 추가된 염에 의하여 리포솜이 불안정해졌음을 나타내며 이로써 염이라는 주변 환경의 변화가 리포솜의 안정성에 큰 영향을 줄 수 있음을 알 수 있다.

#### 4. 결 론

1) Phosphate buffer로 제조한 0.5 % DOPC 리포솜은 제조시의 입자크기가 21일 동안 변화하지 않음을 알 수 있었고 반면에 phosphate buffered saline으로 제조한 같은 조건의 리포솜은 4일 만에 그 크기가 변화하였고 제타전위 또한 0에 가까운 수치를 나타내었다.



**Figure 5.** Stability with time of diluted DOPC liposome prepared with phosphate buffer (size distributions of liposome diluted 40 times with phosphate buffer and phosphate buffered saline).

2) 증류수, phosphate buffer, 그리고 phosphate buffered saline으로 제조한 리포솜을 각각 제조시 용매로 40배 희석하였을 경우, 80배 희석하였을 경우에 비하여 비교적 입자크기 잘 유지되었다.

3) 증류수로 제조한 리포솜을 phosphate buffer와 phosphate buffered saline으로 40배 희석한 경우에는 입자크기가 크게 변화하였고, 제타전위는 추가된 염 농도에 따라 큰 차이를 나타내었으며 염 농도가 진한 phosphate buffered saline으로 희석한 경우 0에 가까운 수치를 나타내었다.

4) Phosphate buffer로 제조한 리포솜을 phosphate buffer로 40배, 그리고 phosphate buffered saline으로 40배로 희석하였다. 리포솜 분산액 내에 존재하는 염이 양이 증가할수록 리포솜의 입자크기가 약간씩 작아지는 경향을 나타내었고, 제타전위 또한 염의 양이 증가할수록 0에 가까워지는 경향을 나타내었다. 또한, phosphate

buffered saline으로 40배 희석한 리포솜은 3일 후 그 입자 크기가 크게 변화하였다.

5) 위의 결과들을 종합해보면, 리포솜의 입자크기와 제타전위는 리포솜의 안정성을 판단할 수 있는 좋은 요소이며 또한 리포솜 제조시의 용매와 다른 조건의 염 농도는 리포솜 입자의 안정성에 큰 영향을 줄 수 있다고 사료된다.

## 참 고 문 헌

1. M. J. Cork, The importance of skin barrier function, *J. Dermatol. Treat.*, **8**, S7 (1997).
2. M. Matsumoto, H. Sugiura and M. Uehara, Skin barrier function in patients with completely healed atopic dermatitis, *J. Dermatol. Science*, **23**(3), 178, (2000).
3. H. Clive, The stratum corneum: structure and function in health and disease, *Dermatologic Therapy*, **17**, 6 (2004).
4. Skin delivery systems: transdermals, dermatologicals, and cosmetic actives, Wiley-blackwell, United states, New Jersey (2006).
5. N. Aarti, N. K. Yogeshvar, and H. G. Richard, Transdermal drug delivery: overcoming the skin's barrier function, *Pharmaceutical Science & Technology Today*, **3**(9), 318 (2000).
6. C. S. Amnon and B. Shafir, Transdermal drug delivery using microemulsion and aqueous systems: Influence of skin storage conditions on the *in vitro* permeability of diclofenac from aqueous vehicle systems, *International Journal of Pharmaceutics*, **311**(1), 55 (2006).
7. M. A. E. Mustafa, Y. A. Ossama, F. N. Viviane, and M. K. Nawal, Deformable liposomes and ethosomes: Mechanism of enhanced skin delivery, *International Journal of Pharmaceutics*, **322**(1), 60 (2006).
8. M. A. E. Mustafa, Y. A. Ossama, F. N. Viviane, and M. K. Nawal, Lipid vesicles for skin delivery of drugs: Reviewing three decades of research, *International Journal of Pharmaceutics*, **332**(1), 1 (2007).
9. B. Godin and E. Touitou, Transdermal skin delivery: Predictions for humans from *in vivo*, *ex vivo* and animal models, *Advanced drug delivery reviews*, **59**(11), 1152 (2007).
10. D. Meisner and M. Mezei, Liposome ocular delivery systems, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **16**(1), 75 (1995).
11. A. A. Gabizon, Liposome circulation time and tumor targeting: implications for cancer chemotherapy, *Advanced drug delivery reviews*, **16**(2), 285 (1995).
12. H. Y. Yu and H. M. Liao, Triamcinolone permeation from different liposome formulations through rat skin *in vitro*, *International Journal of Pharmaceutics*, **127**(1), 1 (1996).
13. Y. Maitani, Y. Aso, A. Yamada, and S. Yoshioka, Effect of sugars on storage stability of lyophilized liposome/DNA complexes with high transfection efficiency, *International Journal of Pharmaceutics*, **356**(1), 69 (2008).
14. F. Nacka, M. Cansell, and B. Entressangles, *In vitro* behavior of marine lipid-based liposomes. Influence of pH, temperature, bile salts, and phospholipase A2, *Lipids*, **36**(1), 35 (2001).
15. W. W. Sulkowski, D. Pentak, K. Nowak, and A. Sulkowska, The influence of temperature, cholesterol content and pH on liposome stability, *Journal of Molecular Structure*, **744**(3), 737 (2005).