

수침 포스파티딜콜린을 이용한 콜라겐 리포솜의 제조 및 특성

최영원 · 장부식 · 정노희[†]

[†]충북대학교 공과대학 공업화학과
(2012년 6월 1일 접수 ; 2012년 6월 25일 수정 ; 2012년 6월 26일 채택)

Preparation and Properties of Collagen-Liposome using Hydrogenated Phosphatidylcholine

Young-Won Choi · Boo-Sik Jang · Noh-Hee Jeong[†]

[†]Department of Engineering Chemistry, College of Engineering
Chungbuk National University Cheong-ju 361-763, Korea
(Received June 1, 2012 ; Revised June 25, 2012 ; Accepted June 26, 2012)

요약 : 콜라겐 성분을 최대로 보호하면서 안정하게 체내로 흡수 될 수 있도록 고순도 수침 포스파티딜콜린과 용매사출방법을 이용하여 콜라겐 리포솜을 제조하였다. 리포솜 막의 안정성을 높이기 위해 포스파티딜콜린에 콜레스테롤을 혼합하여, 에탄올과 프로필렌글리콜 혼합용매에 용해하였으며, 이온의 안정화를 위하여 PBS Buffer를 사용하였다. 다양한 변수에 의해 제조된 콜라겐 리포솜의 특성은 동적광산란광도계(DLS), 주사현미경(SEM), 편광현미경(POM)로 분석하였다.

주제어 : 피부, 콜라겐, 리포솜, 포스파티딜콜린, 용매사출방법.

Abstract : The collagen-liposomes were prepared with hydrogenated phosphatidylcholine and by solvent injection method for maximum protection and stable absorption of collagen into the body. Cholesterol was added to phosphatidylcholine to increase the stability of liposome membrane. The mixture was dissolved in ethanol and propylene glycol and PBS Buffer was used to Stabilize ions. The properties collagen-liposome were analyzed by DLS, SEM and POM.

Keywords : Skin, Collagen, Liposome, Phosphatidylcholine, Solvent injection method.

1. 서론

최근 피부미용에 대한 효과가 있는 미용기능
품에 대한 관심이 높아지면서 단백질 소재로

가장 중요한 생물재료의 하나인 콜라겐이 의약
품, 식품, 화장품 분야에서 광범위하게 이용되
어지고 있다[1]. 하지만 육상동물에서 추출한
콜라겐은 현대에 들어 콜레라, 광우병 등으로
인해 안전한 콜라겐을 제조하지 못하고 있다.
때문에 콜레라, 광우병등과 같은 질병으로부터
벗어나기 위해 육상동물이 아닌 수상 동물에서

[†]교신저자 (E-mail : nhjeong@chungbuk.ac.kr)

추출한 콜라겐을 이용하는데 관심이 높아지고 있다[2-3].

생선 비늘에서 추출한 콜라겐은 안전할 뿐만 아니라 주름개선, 보습증진, 탄력증가와 특정 피부 효능을 나타낼 수 있는 잠재적인 소재로 활용되고 있다. 이러한 콜라겐을 최대한 보호하면서 체내 흡수율을 증가시키기 위해 리포솜 기술을 접목 시켰다.

리포솜은 생체막의 주요성분인 인지질로 만들어지기 때문에 피부투과가 우수하여 리포솜에 포집된 물질을 체내로 흡수시키며, 의약품이나 화장품 등에 가장 적합하게 응용될 수 있는 제형이다. 리포솜은 친수성과 소수성 약물 모두 수용 가능하고, 좋은 호환성, 낮은 독성, 면역계 활성화, 표적화 등 많은 장점을 갖고 있어 화합물 운반 시스템으로 폭 넓게 연구 되어 지고 있다. 또한, 리포솜은 자연적으로 생성하는 물질이기 때문에 무독성이고 생분해성이다[4-5].

리포솜 제조에는 여러 방법들이 있다. 초임계 역상 증발법[6], Bangham의 방법, 유기용매 주사법, Detergent 제거 방법, 용매사출(Solvent Injection) 방법, 역상증발(Reverse-Phase Evaporation) 방법, 기계적인 방법[7] 등 다양하다[8].

용매사출방법은 유기용매를 사용하여 인지질을 용해 시켜 리포솜을 만드는 기술로 용매로 에탄올을 사용시에 작은 크기를 갖는 SUV(Small Unilamellar Liposome)를 형성할 수 있다. 또한, 리포솜은 pH, 온도, 용매, 지질 조성, 제조방법, 포집물질의 함량등의 따라 크기, 포집효율과 안정성이 달라진다[9]. 그래서 리포솜 제조시 막의 안정성을 높이기 위해 포스파티딜콜린에 콜레스테롤을 혼합하여 안정하고 작은 단일 라멜라 리포솜을 생성할 수 있고, 장기간 안정한 상태를 유지할 수 있다. 더불어 물과 상용성이 좋은 에탄올과 프로필렌글리콜을 용매로 사용하면 최적의 리포솜을 제조할 수 있다[10].

본 연구에서는 콜라겐을 리포솜 기술에 접목시켜 콜라겐의 이점을 극대화 시키고, 피부침투에 대한 효율을 높이기 위해 100~300 nm의 크기를 갖는 최적의 고순도 콜라겐 리포솜을 제조하고자 하였다. 교반속도, 콜라겐의 함량, 용매의 조성을 변화시켜 최적의 조건을 찾아 고순도 콜라겐 리포솜을 제조하고, 리포솜의 크기, 형성과 형태를 확인하였다.

2. 실험 및 방법

2.1. 재료 및 장치

본 연구에서 콜라겐 리포솜 제조에는 포스파티딜콜린이 95 % 이상 함유된 레시틴(Sigma Aldrich chemical Co., USA)을 사용하였고[11], 막 안정화제로 콜레스테롤(94 %, Sigma Aldrich chemical Co., USA)을 사용하였다. 용매로는 에탄올 (99.9 %, JIN chemical)과 프로필렌글리콜(99 %, SAMCHUN chemical)을 사용하였으며, 리포솜 포집 물질에는 생선 비늘에서 추출한 콜라겐SP (CNABIOTHECH Co., Ltd)을 사용하였다. 용해된 레시틴을 분산시키기 위해 PBS 완충용액을 직접제조하여 사용하였다.

리포솜 제조를 위한 장치는 Fig. 1에 도시한 바와 같이 유리 재질의 용량이 500 ml인 반응기, 냉각기, 마이크로튜브펌프, 교반기, 온도계, 항온조 등으로 구성되어 있다.

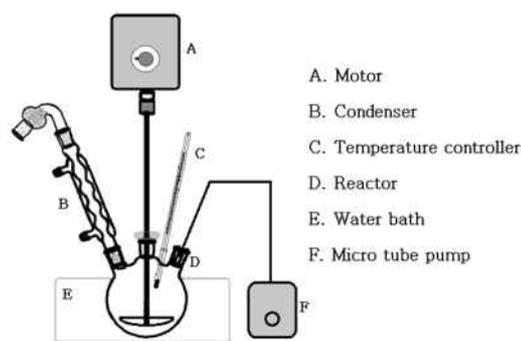
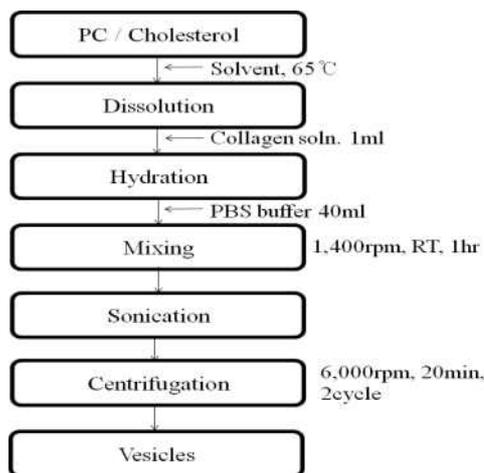


Fig. 1. Preparation of Liposome.

2.2. 콜라겐 리포솜의 제조

본 연구에서는 에탄올과 프로필렌글리콜을 이용한 용매 사출 방법(Scheme 1)과 비교 실험으로 호모게나이저를 사용한 기계적 방법으로 리포솜을 제조하였다[12].

먼저 냉각기가 연결된 플라스크에 레시틴과 콜레스테롤을 섞은 인지질 1 g과 용매 1~2 ml를 넣고, 65 °C가 유지되는 항온조에서 교반기를 이용하여 혼합시킨다. 레시틴이 용매에 용해되어 투명한 상태의 지질 용액이 되면 콜라겐 수용액 1 ml를 넣고 5 min 이상 교반 시키면 수화액정이 형성된다. 그 다음 교반기 속도를 1,200 rpm으로 유지시킨 상태에서 마이크로튜브펌프를 이용하여 PBS 완충용액 40 ml를 5



Scheme 1. Preparation process of liposome using a solvent injection method.

ml/min의 속도로 한 방울씩 서서히 첨가하면서 수화액을 분산시킨다. 65 °C 항온조에서 약 10 min 정도 교반 시킨 후 상온에서 1,400 rpm

에서 다시 1 h 정도 교반 시키면서 서서히 냉각시킨다. 액정 분산 용액을 약 10 min 동안 초음파 처리를 한 다음, 6000 rpm에서 20 min 동안 원심분리를 통해 리포솜에 포집되지 않은 콜라겐을 제거한다[13].

최적의 리포솜 조건을 위해 제조방법, 용매의 종류 및 함량, 교반 속도 등의 조건을 조절하여 최적의 리포솜을 만들고자 하였다.

2.3. 기기분석

2.3.1. 동적광산란광도계(DLS) 측정

제조된 콜라겐 리포솜의 평균 입자크기를 확인하기 위해 동적광산란광도계를 사용하였다. 제조된 콜라겐 리포솜 시료와 PBS 완충용액을 사용하여 샘플을 제작하였고, 25 °C에서 3회 측정하여 평균값으로 얻었다[14]. Malvern, U.K.사의 MPT-2 모델을 사용하였다.

2.3.2. 편광현미경 측정

인지질은 용매나 가해준 액체에 의해서 액정이 형성되는 유방성 액정(lyotropic liquid

Table 2. Formula for Preparation of Liposome

No.	Method	Speed (rpm)	Temperature (°C)	Lipid Composition	Solvent Composition	Collagen Composition (%)
YW-1	Injection	1,100	65	PC 9 : Chd 1	PG 1 + E 1	0.001
YW-2					E1	
YW-3					E2	
YW-4					PG1	
YW-5					PG2	
YW-6	Injection	1,400	65	PC 9 : Chd 1	PG 1 + E 1	0.001
YW-7					E1	
YW-8					E2	
YW-9					PG1	
YW-10					PG2	
YW-11	Homogenizer	2,500	65	PC 9 : Chd 1	PG 1 + E 1	0.001
YW-12					E1	
YW-13					E2	
YW-14					PG1	
YW-15					PG2	
YW-16	Injection	1,400	65	PC 9 : Chd 1	PG 1 + E 1	0.01
YW-17					PG 1 + E 1	0.001
YW-18						0.0001

crystal) 특성을 지니고 있다. 시료를 슬라이드에 한 방울 떨어뜨려 액정상을 확인하였다. LEICA Microsystem Mettler Toledo사의 LEICA DMRXP 모델을 사용하였으며, 25 °C에서 현미경 배율을 100배로 하여 측정하였다.

2.3.3. 주사전자현미경 측정

최적의 조건으로 제조한 리포솜의 정확한 평균입자크기와 형태, 분산성 등을 확인하기 위하여 주사전자현미경(Scanning Elcetron Microscope, S-2500C, Hitachi Co.)을 측정하였다. 시료는 동결 건조기를 사용하여 -60 °C에서 건조하였으며, 건조된 파우더 형태의 시료를 지르코늄 막자사발로 분쇄하였다. 시료를 얇게 펴 바르고 백금 촉매로 2회 코팅하여 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 고순도 콜라겐 리포솜 제조

용매 사출방법으로 고순도 콜라겐 리포솜을 제조하였고, 제조방법, 교반속도, 용매의 종류 및 함량, 콜라겐의 농도 등의 조건을 조절하여 최적의 콜라겐 리포솜을 제조하였다. 변화에 따라 입자크기와 제타포텐셜, 포집효율이 변화되었다. 분산용액인 PBS 완충용액은 pH 7.24로 제조하여 사용하였다.

3.2. 분석 결과

3.2.1. 동적광산란광도계 측정

3.2.1.1. 교반속도에 따른 결과

Fig. 2에서 보는 것과 같이 교반속도가 1,400 rpm에서 제조된 콜라겐 리포솜은 1,100 rpm에서 제조된 콜라겐 리포솜 보다 평균 입자크기가 비교적 작은 것을 확인하였다. 1,400 rpm에서 제조된 콜라겐 리포솜 중 YW-9의 평균입자크기가 247 nm로 가장 작은 것으로 나타났다.

3.2.1.2. 기계적 방법으로 제조한 콜라겐 리포솜

호모게나이저를 이용하여 2,500 rpm에서 제조한 콜라겐 리포솜의 평균입자크기를 측정하

였다. 용매 사출방법과는 다르게 콜라겐 리포솜의 평균입자크기는 불균일 했으며, 혼합용매를 사용하여 제조한 콜라겐 리포솜의 평균입자크기가 가장 작았다. 또한, 기계적인 방법으로 제조한 콜라겐 리포솜 보다 용매 사출방법의 평균입자크기가 더 작은 것을 확인했다.

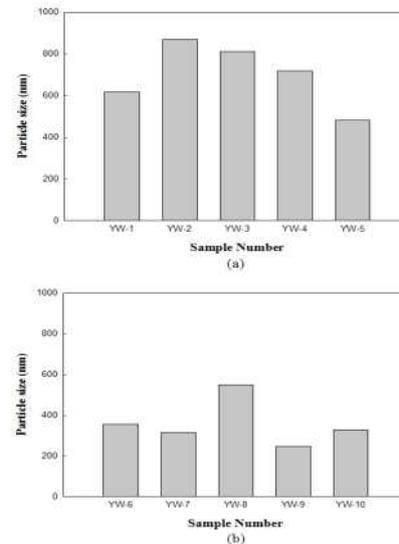


Fig. 2. Effect of changed velocity on the particle size of liposome prepared by injection method. (a) 1,100rpm (b) 1,400rpm

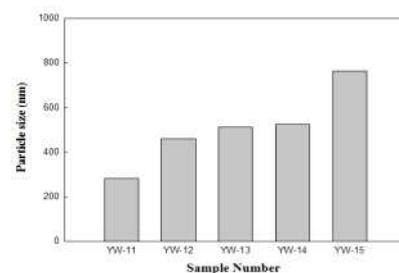


Fig. 3. Particle size of liposome prepared by homogenizer.

3.2.1.3. 콜라겐 농도에 따른 변화

콜라겐의 농도가 0.01 %일 때 평균입자크기가 600 nm 이상으로 커지고 0.001 %일 때 비교적 작은 크기의 콜라겐 리포솜을 형성하는 것을 확인 하였다. 따라서, 콜라겐 함량은 리포솜 크기에 영향을 미치고, 0.001 %가 가장 적

합하다는 것을 Fig. 4에서 확인하였다.

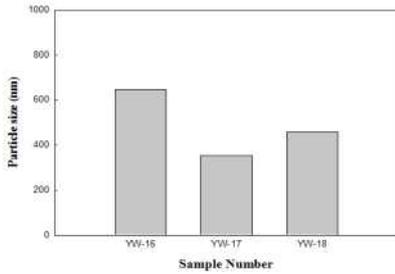


Fig. 4. Effect of collagen composition on the particle size of liposome.

3.2.2. 편광현미경 측정

용매에 따라 제대로 리포솜이 액정이 형성되었는지의 여부는 편광현미경으로 확인하였다 [15]. Fig. 5 (a)는 에탄올과 프로필렌글리콜의 혼합용매로 액정이 형성되었고, 리포솜의 분포가 넓은 것을 확인하였다. (b)와 (c)는 에탄올로

몰타 십자의 분포를 보아 리포솜의 분포가 비교적 조밀하나, 몰타십자가 희미한 것을 관찰할 수 있다. (d)와 (e)는 프로필렌글리콜로 몰타십자가 선명하여 액정상이 형성되어진 것으로 보인다. 결과적으로, 프로필렌글리콜이 액정상을 잘 형성한다는 것을 확인하였다.

3.2.3. 주사현미경 측정

최적의 조건으로 제조한 콜라겐 리포솜의 형태와 정확한 사이즈를 분석하기 위하여 주사현미경으로 확인하였다. YW-1, YW-6, YW-9를 확인한 결과 YW-1은 평균입자사이즈는 크나 구형의 형태로 조밀하게 분포 되어있는 것을 확인하였고, YW-6도 조밀하게 분포된 리포솜 사이에 구형을 띄고 있는 리포솜을 확인하였다. YW-9는 200~300 nm를 갖는 리포솜을 확인하였다. 기계적 방법으로 제조한 콜라겐 리포솜은 구형의 형태를 띄나 높은 전단력으로 인해 파괴된 부분이 많은 것을 확인 할 수 있었다.

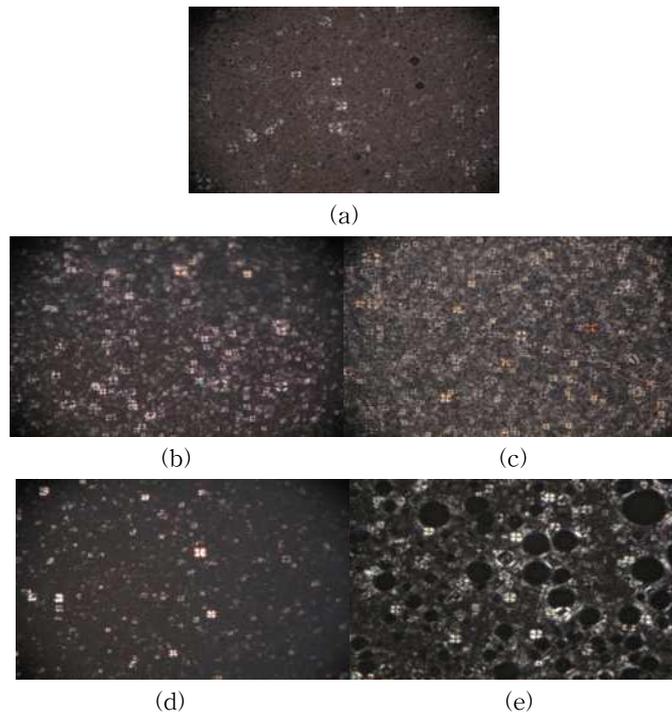


Fig. 5. Polarized optical micrograph of liposome for liquid crystalline phase. (×100)
 (a) YW-6 (b) YW-7 (c) YW-8 (d) YW-9 (e) YW-10

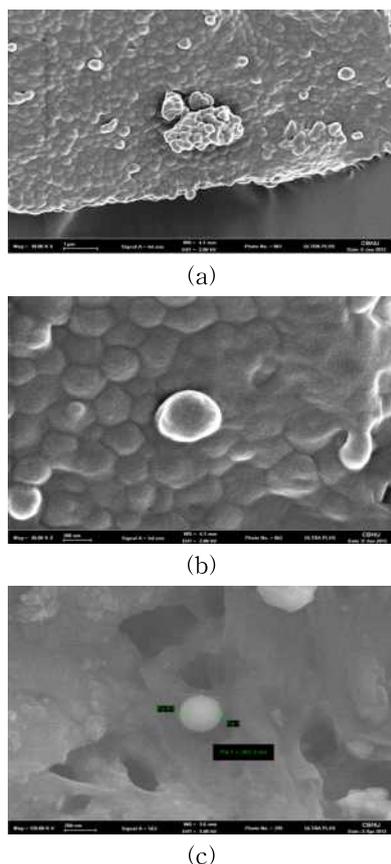


Fig. 6. SEM photograph of liposome droplet.
(a) YW-1 (b) YW-6 (c) YW-9

4. 결론

본 연구에서는 고순도 콜라겐 리포솜을 제조하였고, 다양한 조건에서 최적의 콜라겐 리포솜 제조 방법을 확립하였다. 제조한 고순도 콜라겐 리포솜을 DLS, SEM, 편광현미경으로 특성을 확인한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 다양한 변수를 통한 최적의 콜라겐 리포솜 제조 조건은 포스파티딜 콜린 90%와 콜레스테롤 10%의 혼합 인지질, 온도 65 °C, 용매 조성 프로필렌글리콜 1ml, 콜라겐함량 0.001%, 교반속도 1,400 rpm으로 용매사출방법을 이용하여 만들 수 있었다.
2. 콜라겐 리포솜의 평균입자크기는 용매의 조성과 콜라겐 함량에 따라 영향을 받는 것을 확인하였으며, 최적의 콜라겐 리포솜의 크기

는 247 nm 이며, SEM 분석으로 구형의 리포솜을 확인 하였다.

3. 편광현미경 관찰 결과, 에탄올을 용매로 사용한 경우 조밀한 분포를 갖는 리포솜을 확인할 수 있었고, 프로필렌글리콜을 용매로 사용한 경우 선명하고 넓은 분포를 갖는 리포솜을 확인하였다.
4. 기계적인 방법인 호모게나이저를 사용하여 제조한 콜라겐 리포솜은 입자크기의 분포가 넓어 일정한 입자크기를 갖지 못하고, 강한 전단력으로 인하여 리포솜의 파괴가 심한 것을 확인 하였다.

감사의 글

이 논문은 2011년도 중소기업청의 재원으로 산학연 공동기술개발 컨소시엄 사업의 지원을 받아 수행된 연구임(20110640).

참고문헌

1. S. J. Ahn, Y. S. Kim and H. Suh, "Crosslinking Ratio Analysis of Type I Atelocollagen", *J. of KOSOMBE*, **17**, 479(1996).
2. S. J. Yoo, S. M. Cho, J. W. Woo, S. H. Kim and Y. N. Han, "Processing and Physicochemical Properties of Collagen from Yellowfin Tuna (*Thunnus albacares*) Abdominal Skin", *J. Kor. Fish*, **41(6)**, 427 (2008).
3. J. H. Shon and J. B. Eun, "Physicochemical and Functional Properties of Collagen Powder from Skate (*Raja Kenojei*) Skins", *J. Food Preserv.*, **17**, 435 (2010).
4. Carlos Spuch and Carmen Navarro, "Liposomes for Targeted Delivery of Active Agents Against Neurodegenerative Diseases (Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease)", *Journal of Drug Delivery*, **2011**, 12 (2011).
5. A. R. Patel and K. P. Velikov, "Colloidal Delivery System in Foods: A general

- Comparison with Oral Drug Delivery”, *Food Science and Technology*, **44**, 1958 (2011).
6. 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.*, **27**, 391(2010).
 7. K. C. Kang, H. B. Pyo, J. D. Lee and N. H. Jeong, “Properties of Nanoemulsions Containing Lecithin in Cosmetics”, *J. Ind. Eng. Chem.*, **10**, 564 (2004).
 8. J. H. Kim and H. M. Kim, “Liposome”, *Biochemistry Chongseoljip*, 237 (1988).
 9. B. S. Jin, S. M. Lee and K. H. Lee, “A Study on the Factors Affecting Entrapment Efficiency and Particle Size of Ehosomes”, *J. Korean Ind. Eng. Chem.*, **17**, 138(2006).
 10. K. C. Kang, H. B. Pyo, C. I. Lee, S. H. Wang, J. M. Seo and N. H. Jeong, “The Study of Liposomal Encapsulation Efficiency for Hydrophilic Actives”, *Applied Chemistry*, **9**, 129(2005).
 11. K. C. Kang, H. B. Pyo and N. H. Jeong, “Preparation and Properties of Nanoemulsion Using Amphoteric Surfactant”, *Applied Chemistry*, **6**, 795 (2002).
 12. S. M. Lee, M. J. Choi, Y. M. Lee and B. S. Jin, “Preparation and Characterization of Ethosome Containing Hydrophobic Flavonoid Luteolin”, *Appl. Chem Eng.*, **21**, 40 (2010).
 13. C. H. Lee, G. P. Lim, H. S. Back, G. Y. Jeong and M. E. Choi, “Comparative Study of Various Phospholipid Vesicles for Development of Drug - delivery System”, *Korean Biochem. J.*, **19**, 403 (1986).
 14. “Using Dynamic Light Scattering Characterization of Colloidal gold”, Malvern Instruments Ltd.
 15. Polarized Optical Microscopes, Chemical Engineering Research Information Center.