J. Soc. Cosmet. Scientists Korea
Vol. 38, No. 2, June 2012, 147-154

루틴의 피부 흡수 증진을 위한 탄성 리포좀 제형 연구

임 명 선 · 한 샛 별 · 권 순 식 · 박 민 아 · 박 수 남†

서울과학기술대학교 정밀화학과, 나노바이오화장품 연구실 화장품종합기술연구소
(2012년 3월 15일 접수, 2012년 5월 15일 수정, 2012년 6월 11일 채택)

Elastic Liposome Formulation for Transdermal Delivery of Rutin

Myoung Sun Lim, Seat Byeol Han, Soon Sik Kwon, Min A Park, and Soo Nam Park†

Department of Fine Chemistry, Nanobiocosmetic laboratory, and Cosmetic R&D Center, Seoul National University of Science and Technology, 232 Gongreung-ro, Nowon-gu, Seoul 139-743, Korea
(Received March 15, 2012; Revised May 15, 2012; Accepted June 11, 2012)

요 약: 본 연구에서는 항산화 활성이 우수한 루틴을 담지한 탄성 리포좀을 제조하여, 이 제형의 물리적 특성과 증진된 피부 투과 효과를 평가하였다. 탄성 리포좀은 인지질과 계면활성제의 비율을 달리하여 제조하였다. 루틴을 담지한 탄성 리포좀의 평균 입자 크기는 205.7 ~ 298.0 nm, 가변형성은 20.9 ~ 42.5, 포집효율은 52.0 ~ 71.0 %로 측정되었다. 0.1 % 루틴을 담지한 탄성 리포좀 중에서 인지질과 계면활성제 비율이 85 : 15 인 경우가 가장 높은 포집효율(71.0 %)과 가변형성 지수(42.5)를 나타내었다. 이 제형을 대상으로 피부 투과 실험을 진행하였다. 그 결과 대조군으로 사용된 일반 리포좀(98.0 $\mu g/cm^2$)과 1,3-butylene glycol (76.3 $\mu g/cm^2$) 용액보다 탄성 리포좀의 피부 투과능(129.9 $\mu g/cm^2$)이 훨씬 더 크게 나타났다. 이러한 결과들로 미루어 보아 Tego® care 450을 이용한 탄성 리포좀이 피부를 통한 유효성분 전달에 유용하게 이용될 수 있음을 확인하였다.

Abstract: In this study, we prepared elastic liposome containing rutin, known as antioxidants, and evaluated the physical characterization and enhanced skin permeation effect. The elastic liposome was prepared using the different ratios of egg phospholipids and Tego® care 450. The mean diameter of rutin loaded elastic liposomes formulations ranged between 205.7 ~ 298.0 nm and deforability 20.9 ~ 42.5, The loading efficiency was observed to be 52.0 ~ 71.0 %. The highest loading efficiency (71.0 %) and deformability (42.5) were observed at the optimal ratio of 85 : 15 (egg phospholipids : Tego® care 450) in the 0.1 % rutin loaded elastic liposome formulations. The elastic liposome formulation was selected for further transdermal permeation study. The elastic liposome(129.9 $\mu g/cm^2$) exhibited a significantly higher skin permeation compared with general liposome (98.0 $\mu g/cm^2$) and 1,3-butylene glycol (76.3 $\mu g/cm^2$) solution. These results suggest that the elastic liposome formulation using Tego® care 450 as a major edge activator could be useful for the delivery of active ingredient through the skin barrier.

Keywords: *rutin, elastic liposome, in vitro skin permeation, deformability, transdermal delivery systems*

1. 서 론

피부는 대략 우리 몸 표면의 1.8 m^2를 덮고 있으며 외부 환경의 여러 자극으로부터 신체를 보호하는 역할을 한다[1]. 자외선, 환경오염과 같은 외부 스트레스나 잘못된 식습관은 신체 내에 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)을 생성시키고, 이는 피부에 산화적 스트레스를 유발한다. 우리 몸은 이런 활성 산소를 제거하기 위해 superoxide dismutase (SOD), gluththione peroxidase (GSHPx), glutathione reductase (GR) 등의 항산화 효소를 갖고 있고, 그 외에도 식물에서 얻은 α-tocopherol, ascorbic acid, uric acid, carotenoids와 같은 비효소적 항산

† 주 저자 (e-mail: snpark@seoultech.ac.kr)

화제들로 항산화 방어망을 구축하고 있다[2,3]. 하지만 과도한 산화적 스트레스에 노출될 경우 항산화 방어망이 붕괴되어 각종 질병이나 노화를 가속화시킨다. 피부노화를 지연시키고 억제시키기 위해서는 활성 산소를 제거하고 활성산소로부터 세포 및 조직을 보호할 수 있는 항산화 방어망 구축을 위해 플라보노이드와 같은 천연 항산화제의 개발에 관심이 모아지고 있다[4].

플라보노이드는 페놀성 화합물로서 주로 배당체의 형태로 식물계에 널리 존재한다. 플라보노이드는 활성산소의 직접적인 소거, 금속이온 킬레이트 작용, 지질 과산화 반응 종결 및 생체 내 산화효소의 작용 저해 등의 다양한 항산화 작용을 나타낸다. 항산화 및 항노화 효능이 우수한 루틴(quercetin-3-O-rutinoside)은 퀴세틴에 rutinose가 결합한 배당체 구조로써 메밀과 식물의 주성분으로 알려져 있다. 루틴은 여러 항산화능 측정 실험에서 보고된 것처럼 높은 free radical 소거능을 갖고 있으며[5], 이외에도 염증, 당뇨병 등의 치료약으로 이용되고 있다[6-8]. 루틴은 rutinose가 결합한 배당체 구조 때문에 피부 흡수가 낮고, 물에 난용성으로 화장품에 응용이 어렵다.

피부는 외부로부터의 보호막 역할을 하지만, 효능 물질 투과에 대해 장벽으로 작용한다. 이 때문에 효능 물질을 안정화시키고 경피 투과 효율을 높이기 위한 경피 전달 시스템(transdermal delivery systems, TDS)이 많이 이용되고 있다. TDS는 효능 물질을 높은 농도로 활성 자리에 전달 할 수 있다는 점과 경구 투여 했을 때 나타날 수 있는 부작용을 감소시킬 수 있는 장점이 있다. 이러한 TDS 중에서도 리포좀은 인지질과 콜레스테롤로 구성된 소포체로서 생체막과 유사한 성분으로 이루어져 있기 때문에 피부에 대한 흡수성이 좋고 안정성 또한 높다고 알려져 있다. 하지만 콜레스테롤로 인해 지질 막이 견고해지면서 피부 투과율이 낮아지고 활성 물질의 방출이 어렵다는 단점이 확인되었다[1,9]. 최근까지 이러한 리포좀의 단점을 보완한 여러 형태의 제형이 개발되었으며, 리포좀의 비교적 낮은 피부 투과율을 보완한 제형인 탄성 리포좀이 연구되어 왔다[10].

탄성 리포좀은 인지질에 edge activator라고 알려진 단일 사슬 계면활성제를 첨가한 소포체이다. Edge activator는 인지질과 다른 곡률반경을 갖기 때문에 소포체의 지질 이중층 막을 약화시켜 쉽게 변형이 일어나게 한다. 탄성 리포좀은 외부 스트레스에 의한 지질막 변형에 필요한 에너지가 낮기 때문에 edge activator의 첨가로 입자 크기가 증가함에도 불구하고 쉽게 좁은 각질층 사이를 통과할 수 있다. 그리고 탄성 리포좀은 지질 이중층의 주수성에 따라서 수분 함량이 적은 피부 표면보다 상대적으로 수분 함량이 많은 피부 내부로 쉽게 들어갈 수 있다[9,11,12]. 지금까지 탄성 리포좀에 관한 연구에서 sodium cholate, Tween 80, Span 80, dipotassium glycyrrhizinate 등의 계면활성제가 일반적으로 사용되었다[13,14]. 화장품 제형에 널리 사용되는 polyethylene glycols (PEG)는 보습 상태를 유지하는 무독성 수용성 고분자 물질로써 자체는 독성이 없지만 화장품 제조 공정에서 1,4-dioxane이 부산물로 생성될 수 있다는 보고와 손상된 피부에서 전신성 독성과 민감성 피부 반응이 보고되었기[15] 때문에 최근에 PEG가 함유되지 않은 PEG-free 계면활성제의 사용이 증가하는 추세에 있다. 이러한 계면활성제의 예로 Tego® care 450 (polyglyceryl-3 methylglucose distearate) 등이 있으며, 저자들은 이미 Tego® care 450을 이용한 탄성 리포좀을 제조하고 이들의 물리화학적 특성에 관하여 보고한 바 있다[16].

따라서 본 연구에서는 루틴을 피부에 효과적으로 전달하기 위한 전달시스템으로 사용하기 위하여 PEG-free 계면활성제인 Tego® care 450를 이용하여 탄성 리포좀을 제조하였으며, 탄성 리포좀의 물리적 특징을 평가하고, 이러한 시스템이 루틴의 피부 전달에 어떠한 효과를 나타내는지를 확인함으로써 루틴을 담지한 탄성 리포좀의 화장품 원료로서의 사용 가능성을 평가하였다.

2. 재료 및 실험

2.1. 기기 및 시약

실험에 사용된 인지질인 L-α-phosphatidylcholine from egg yolk (egg PC, ~ 60 %)은 sigma (USA)사의 제품을 사용하였고, 비이온계면활성제인 polyglyceryl-3 methylglucose distearate (Tego® care 450)은 (주)사임당 화장품으로부터 얻었다. 에탄올과 클로로포름 등의 용매는 시판 특급시약을 사용하였다. 리포좀 제형 제조 시에는 회전 증발기(BUCHI, Switzerland)와 초음파 파쇄기(BRANSON, USA)를 사용하였고, 제형의 입자 크기는 ELS-Z (OTSUKA, Japan)를 사용하여 측정하였다. 리포좀의 가변형성 측정은 Mini Extruder (Avanti® Polar Lipids)와 Syringe pump (KDS330 Revodix, Korea)을 사용하여 수행하였다. 피부 투과 실험에서는 Permegear (USA)사의 9 mm Franz diffusion cell (receptor volume 5 mL)과 V6A Stirrer 모델을 사용하였다. 루틴을 분석하기 위하여 UV detector와 computer intergrating apparatus를 갖춘 HPLC (Shimadzu, Japan)를 사용하였

Table 1. Composition of Elastic Liposomal Formulations

Formulation code	PC[a] : S[b] (%w/w)	Rutin (mg)
ELR-1	100 : 0	10.0
ELR-2	95 : 5	10.0
ELR-3	90 : 10	10.0
ELR-4	85 : 15	10.0
ELR-5	80 : 20	10.0

PC[a] : Egg phosphatidylcholine, S[b] : Tego® care 450, ELR : Rutin loaded elastic liposomal formulation

고, 컬럼은 Shim-pack VP-ODS C18 (250 mm × 4.6 mm)를 사용하였다.

2.2. 탄성 리포좀 제조

탄성 리포좀의 구성 성분과 조성은 Table 1에 나타내었고, 리포좀은 얇은 막 수화법으로 제조하였다. 50 mL round bottom flask에 루틴 0.1 %를 넣은 후, Egg PC와 Tego®care 450을 각기 다른 비율(100 : 0, 95 : 5, 90 : 10, 85 : 15, 80 : 20)로 하여 클로로포름과 메탄올 2 : 1 (v/v)에 용해시킨다. 유기용매는 회전 증발기를 이용하여 제거하고, 이때 flask 벽면에 얇은 지질막이 형성된다. 생성된 얇은 지질막을 phosphate buffer (1.6 mM $NaH_2PO_4 \cdot 2H_20$과 9.6 mM $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, pH 7.4) 10 mL로 수화하여 탄성 리포좀을 형성시킨다. 이렇게 얻어진 탄성 리포좀의 입자 크기를 균일하게 하기 위하여 glass beads를 넣고 30 min 동안 초음파 파쇄기를 가해 주었다. 탄성 리포좀 제형의 최종 지질 농도는 0.5 % (w/v)이고, 루틴의 농도는 0.1 % (w/v)이다.

2.3. 입자 크기 측정

탄성 리포좀의 입자크기와 입도 분포는 빛의 산란을 이용하여 입자 크기를 분석하는 Otsuka ELS-Z series를 이용하여 측정하였다. He-Ne laser를 이용하여 측정하였으며 입자크기는 누적분석법을 이용하였다. 또한 입경분포 해석방법은 Contin을 이용하여 입경분포를 구하였다.

2.4. 포집효율 측정

완성된 탄성 리포좀 현탁액의 일정량을 취하고 1.2 μm syringe filter (Minisart CA 26 mm)를 이용하여 탄성 리포좀 내 포집되지 않은 루틴을 제거한다. 그 후 에탄올을 이용하여 탄성 리포좀의 막을 파괴시킨 다음 에탄올은 회전 증발기를 이용하여 증발시키고 다시 1 mL의 에탄올을 넣어준다. HPLC를 이용해 탄성 리포좀에 포집된 루틴을 정량하였다.

그리고 농도별 루틴의 검량선을 작성한 후 루틴의 농도를 산출하였고, 탄성 리포좀의 포집효율은 다음에 나타난 식 (1)에 의해 계산하였다.

$$\text{Loading efficiency } (\%) = \{(T - P) / T\} \times 100 \quad (1)$$

T : 처음 넣어준 루틴 농도
P : 1.2 μm syringe filter를 통과하지 못한 루틴 농도

2.5. 탄성 리포좀의 가변형성 측

제조된 탄성 리포좀 막의 가변형성을 평가하기 위해 mini extruder를 사용하여 탄성 리포좀이 인공 투과장벽을 통과하는 정도를 측정하였다. 탄성 리포좀 제형은 0.2 MPa의 압력을 1 min 간 가했을 때 0.08 μm 크기의 기공을 갖는 polycarbocate membrane을 통과하여 나온 리포좀 현탁액의 양을 측정하였고 membrane을 통과한 리포좀의 입자크기를 측정하였다.

탄성 리포좀 막의 가변형성은 다음 식에 비례한다: $J_{flux} \times (r_v/r_p)^2$ [17,18].

$$\text{Deformability Index} = J_{flux} \times (r_v/r_p)^2$$

J_{flux} = 1분 동안 extrusion된 리포좀 현탁액의 양;
r_v = extrusion 후의 리포좀 크기
r_p = filter membrane의 pore size

2.6. *In Vitro* 피부 투과 실험(Franz Diffusion Cell)

루틴을 담지한 탄성 리포좀이 피부 투과 증진에 어떠한 효과를 주는지 확인하기 위해 Franz diffusion cell을 이용하여 피부 투과 실험을 진행하였다. 피부 투과 실험에 사용한 쥐의 피부는 경추탈골로 치사시킨 ICR mice (8주령, 암컷)의 등에서 적출하여 사용하였다. 적출한 피부는 피하지방과 조직을 제거한 후 사용하였다. Receptor chamber에 receptor phase (HCO-60 : Ethanol : PBS = 2 : 20 : 78 (w/v/v %)) 5 mL를 채운 후 각질층이 위로 향하도록 donor와 receptor phase 사이에 피부를 고정시켰다. 실험이 진행되는 동안 항온수조를 이용해 온도를 37 ± 1 ℃로 유지하였다. 각 샘플 0.5 mL를 donor를 통하여 피부 표면에 가한 후 일정 시간 간격으로 매 회 0.5 mL의 receptor phase를 sampling port를 통하여 채취하였다. 채취 직후 동량의 receptor phase를 receptor chamber에 보충하였다. 채취한 시료 속 루틴의

Table 2. Size of Elastic Liposomal Formulation Before and After Extrusion through Polycarbonate Membrane with a Pore Size of 80 nm

Formulation code	Size before extrusion (nm)	Size after extrusion (nm)
ELR-1	275.0 ± 7.0	280.1 ± 0.6
ELR-2	205.7 ± 2.7	207.5 ± 3.2
ELR-3	240.9 ± 1.1	242.4 ± 5.6
ELR-4	281.4 ± 2.0	281.6 ± 3.9
ELR-5	298.0 ± 6.2	273.5 ± 3.1

양은 HPLC를 이용하여 측정하였다.

24 h 후 각질층과 피부에 남아있는 루틴의 양을 측정하기 위해 쥐의 피부를 PBS로 3회에 걸쳐 세척하였다. 세척 후 receptor phase와 닿지 않은 부분의 피부를 잘라내고 남은 부분에 대해 tape striping 법을 이용해 각질층에 남아있는 루틴의 양을 따로 측정하였다[19]. 각질층에 남아있는 루틴의 양을 측정하기 위해 테이프를 이용하여 피부의 각질층 부분을 3회 벗겨내었으며 이렇게 얻어진 테이프에 10 mL의 에탄올을 넣고 1 h 동안 초음파 세척기를 이용하여 루틴을 추출하였다. 그 후 회전증발기를 이용하여 에탄올을 증발시키고 추출된 루틴을 0.5 mL의 receptor phase에 녹여내었다. Tape striping법을 거친 후 각질층이 제거된 피부는 수술용 가위를 이용해 세절하였고 세절한 피부의 처리는 Tape striping 법과 동일하게 진행하였다. 이렇게 얻어진 시료 속 루틴의 양은 HPLC를 이용하여 측정하였다.

2.7. 통계처리

평균값의 유의적 차이는 the Student's unpaired *t*-test를 통해 평가되었다. 0.05 이하의 p 값이 유의적이라고 간주되었다.

3. 결 과

3.1. 탄성 리포좀의 입자 크기

루틴이 함유된 탄성 리포좀은 mini extruder를 이용하여 extrusion 전과 후의 평균 입자크기를 Table 2에 나타내었다.

모든 탄성 리포좀 제형의 평균 입자 크기는 205.7 ~ 298.0 nm로 측정되었고, 단분산 형태의 균일한 입자 분포를 나타내었다. Tego® care 450의 농도가 5 ~ 20 %로 증가될 때, 그 차이는 작지만 탄성 리포좀의 평균 입자 크기는 207.5 ~ 273.5 nm로 증가하는 경향을 나타내었다. 계면활성제의 비율이 가장 큰 ELR-5가 extrision 전후의 입자 크기 변화가 가장 큰 것을 확인하였다. 또한 계면활성제의 함량이 증가할수록 탄성 리포좀 제형의 입자크기 또한 증가하는 결과가 나타났으나, 이는 리포좀의 친수성 부분에 루틴을 담지할 수 있는 영역도 커지게 하여 더 많은 루틴을 리포좀 내에 포집할 수 있을 것으로 사료된다.

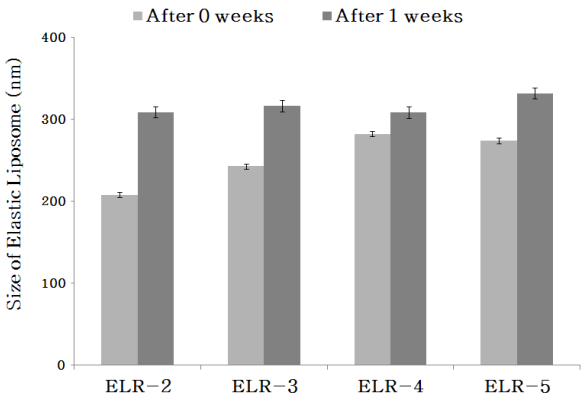


Figure 1. Changes in size of elastic liposomal formulation containing rutin during 1 week.

탄성 리포좀을 4℃에서 보관하면서, 제조 후 1주일이 경과한 탄성 리포좀의 입자크기를 측정하였다. 이 기간 동안, 입자 크기는 110 ~ 150 %로 증가하였다(Figure. 1). 특히 계면활성제가 포함되지 않은 ELR-1의 경우 일주일 후에 입자크기가 다분산 형태로 나타났다(data not shown). 루틴을 함유하는 탄성 리포좀은 제조 후 시간이 지남에 따라 서로 응집 및 침전되어 그 크기가 증가하지만 일주일 후까지는 크기 변화가 작은 것을 알 수 있다.

3.2. 탄성 리포좀의 가변형성

Edge activator가 없는 일반적인 리포좀은 효과적으로 피부를 투과하는데 한계가 있다고 알려져 왔다[20]. Edge activator는 탄성 리포좀의 지질 이중층을 불안정하게 만들어 가변형성을 증가시킨다[1]. 이러한 이유로 탄성 리포좀은 기존 리포좀 보다 각질층 사이를 더 쉽게 통과할 수 있다고 알려져 있다.

탄성 리포좀의 다양한 비율의 가변형성을 Table 3에 나타내었다. 결과적으로 탄성 리포좀의 가변형성은 Tego® care 450의 농도에 의존한다는 것을 나타내었다. Tego® care 450이 포함되지 않은 ELR-1(인지질 : Tego® care

Table 3. Deformability Index Value of Elastic Liposomal Formulations

Formulation code	Deformability index
ELR-1	39.4 ± 0.1
ELR-2	20.9 ± 0.6
ELR-3	28.5 ± 1.3
ELR-4	42.5 ± 0.8
ELR-5	34.1 ± 0.6

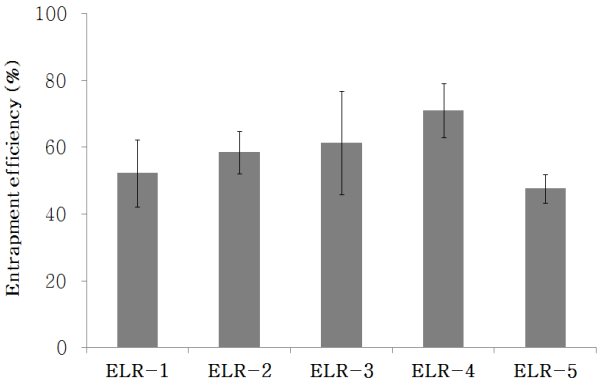


Figure 2. Entrapment efficiency of rutin loaded elastic liposomal formualtions. Mean ± SD (n = 3).

450, 100 : 0)은 가변형성 지수가 39.4를 나타내었고, ELR-2과 ELR-4의 경우 Tego® care 450의 농도가 5 %에서 15 %로 증가하자, 가변형성 지수는 20.9에서 42.5로 증가되었다. 하지만 Tego® care 450의 농도가 더 증가하게 되면(ELR-5), 리포좀 막의 가변형성 지수는 상당히 감소하였다(가변형성 지수 34.1). 이러한 경향은 계면활성제의 농도가 높은 경우에는 혼합된 마이셀을 형성하기 때문이다. 이러한 혼합된 마이셀은 덜 가변형적이고 탄성 리포좀과 비교했을 때 더 낮은 피부 투과능을 갖는다는 이전 보고와 일치함을 알 수 있었다[21,22].

따라서 루틴을 담지한 탄성 리포좀의 가변형성 지수가 계면활성제의 농도에 의해 영향을 받는다는 것을 확인하였다.

3.3. 탄성 리포좀의 포집효율

탄성 리포좀의 포집효율은 HPLC를 이용하여 탄성 리포좀에 포집된 총 루틴의 양을 정량하였다. Figure 2는 각각의 탄성 리포좀에 포집된 루틴의 포집 효율을 나타내었다. Tego®care 450이 포함되지 않은 ELR-1은 52.0 %의 포집 효율을 나타내었고, Tego® care 450의 농도가 5에서 15 %로 증가될 때, ELR-2와 ELR-4의 포집 효율은 각각 58.5에서 71.0 %로 증가하였다. 하지만 Tego® care 450의 비율이 15 % w/w이상일 때 포집 효율은 감소하였다. 이러한 결과는 계면활성제의 비율이 15 % w/w이상으로 증가하게 되면, 혼합된 마이셀과 리포좀이 공존하게 되는데, 이때 혼합된 마이셀로 인해 포집효율이 감소하게 되는 결과로써 이전 보고와도 일치함을 알 수 있었다[23].

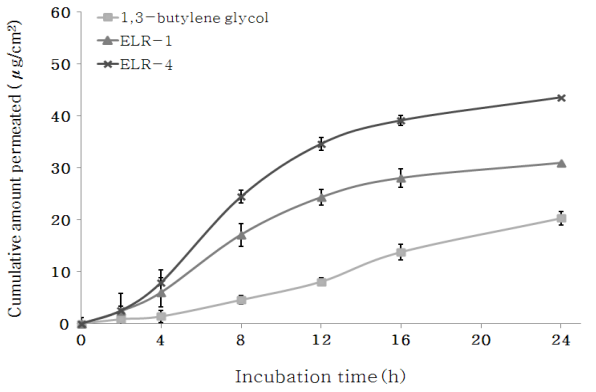
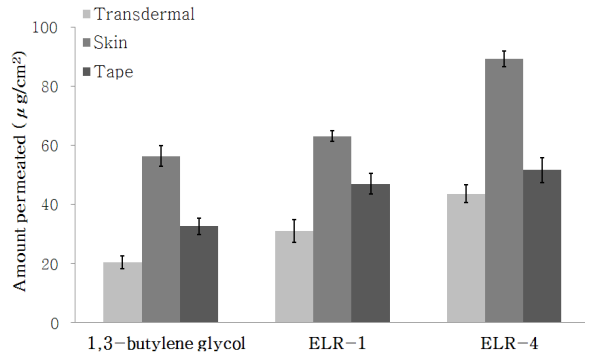


Figure 3. *In vitro* skin permeation profiles of 1,3-butylene glycol solution and ELR-1, ELR-4 loaded rutin though ICR albino mouse skin.

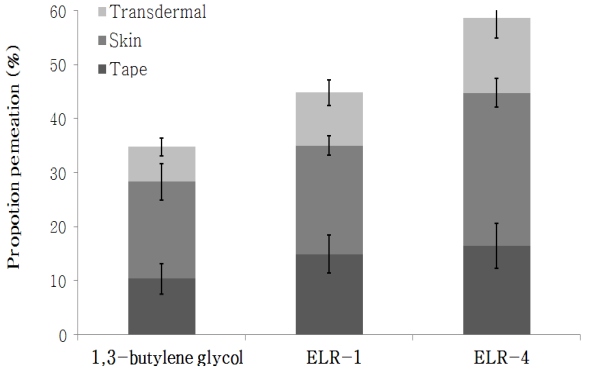
3.4. 탄성 리포좀의 *In Vitro* 피부 투과 실험(Franz Diffusion Cell)

루틴을 함유한 탄성 리포좀의 피부 투과 능력을 평가하기 위하여 ICR mice의 등 피부를 적출하여 Franz diffusion cell을 이용한 피부 투과 실험을 진행하였다. 실험에서는 높은 가변형성과 포집효율을 갖는 최적화된 비율의 제형인 ELR-4와 비교 시스템으로 계면활성제가 포함되지 않은 일반 리포좀인 ELR-1, 그리고 보습 효과가 우수하며 피부 자극이 거의 없는 1,3-butylene glycol을 사용하였다. 피부 내부로 투과된 루틴의 함량은 HPLC로 분석하였다. 24 h 동안 일정 피부 면적(0.6362 cm^2)에 대한 시간별 루틴의 투과량을 Figure. 3에 나타내었다. 최적화된 비율의 탄성 리포좀인 ELR-4은 대조군에 비하여 시간별 루틴의 투과량이 더 크게 나타났다. 24 h 후 루틴의 누적 투과량(Transdermal)은 1,3-butylene glycol 용액의 경우 24.4 $\mu g/cm^2$이었고, ELR-1의 경우 29.0 $\mu g/cm^2$, ELR-4는 43.6 $\mu g/cm^2$으로 나타났으며, 이는 초기 적하량인 314.4 $\mu g/cm^2$에 대하여 각각 7.8, 9.2 및 13.9 %의 투과율을 나타낸 것이다(Figure 3).

실험 24 h 후, 각질층에 존재하는 루틴(Tape), 각질층을 제외한 표피와 진피에 존재하는 루틴(Skin) 그리고



(a)



(b)

Figure 4. Proportions of permeated amount of quercetin in stock solution(1,3-butylene glycol) and ELR-1, ELR-4 containing rutin through ICR albino mouse skin after 24 h incubation (Tape : stratum corneum, Skin : epidermis without stratum corneum plus dermis, Transdermal : receptor chamber).

피부를 통과하여 receptor chamber에 존재하는 루틴(Transdermal)의 함량 및 초기 적하량 대비 투과율을 각각 Figures 4(a), 4(b)에 나타내었다.

각질층에 존재하는 루틴의 함량(Tape)은 1,3-butylene glycol 용액의 경우는 0.1%였고, ELR-1은 1.2 % 그리고 ELR-4은 2.0 %로 탄성 리포좀 제형이 각질층에 약간 더 존재하는 것으로 나타났다. 각질층을 제외한 피부(표피와 진피)로 침투된 루틴의 함량(Skin)은 1,3-butylene glycol과 ELR-1, ELR-4에서 각각 51.5, 65.3, 80.1 $\mu g/cm^2$ (Figure 4(a))으로 초기 적하량에 대한 루틴의 투과율로 환산할 경우 각각 16.4, 20.8, 25.5 %로 표피와 진피에 존재하는 ELR-4의 루틴의 양이 훨씬 많은 것으로 나타났다. 피부를 통과하여 receptor phase에 존재하는 루틴(Transdermal)의 함량 비율은 1,3-butylene glycol과 ELR-1, ELR-4이 각각 7.8, 9.2 및 13.9 %로 마찬가지로 ELR-4의 투과량이 가장 크게 나타났음을 보여주고 있다(Figure 4).

초기 적하량인 314.4 $\mu g/cm^2$에 대하여 피부에 침투된 루틴의 총 함량은 1,3-butylene glycol과 ELR-1, ELR-4에서 각각 76.3, 98.0, 129.9 $\mu g/cm^2$으로 측정되었다. 이를 초기 적하량에 대한 루틴의 피부 투과율로 환산하면 각각 24.3, 31.2, 41.3 %이며, 이는 탄성 리포좀 제형을 이용할 경우 더 많은 양의 루틴이 피부로 전달됨을 나타낸 결과를 보여주었다. 탄성 리포좀이 일반 리포좀과 비교하였을 때 계면활성제에 의하여 리포좀 막이 약화되어 리포좀 막의 유연성이 증가하기 때문에, 각질층을 통한 피부 침투가 용이하다는 견해와 일치한다[23]. 따라서 플라보노이드 배당체의 구조적인 특성과 높은 극성 때문에 피부로 전달이 어려운 단점을 극복할 수 있는 피부 전달 시스템으로의 사용 가능성을 확인하였다.

4. 결 론

본 연구에서는 높은 항산화 활성을 가지고 있고 천연물에 널리 존재하는 물질인 루틴을 효과적으로 피부에 전달하기 위해 루틴을 담지한 탄성 리포좀을 제조하고 탄성 리포좀의 물리 · 화학적 특성 및 피부 투과 능력을 평가하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1) 0.1 % 루틴을 담지한 탄성 리포좀(ELR-)은 205.7 ~ 298.0 nm의 크기로 단분산 형태의 일정한 입도분포를 보여주었다. 탄성 리포좀의 입자 크기는 계면활성제의 비율이 증가할수록 리포좀의 입자 크기가 증가하였지만 일정 농도 이상에서는 입자 크기가 다시 감소하는 경향을 보였다. 또한 루틴을 포집한 탄성 리포좀 제형은 시간이 지남에 따라 입자 크기가 증가하지만 일주일까지는 안정한 것으로 나타났다.

2) 탄성 리포좀 막의 가변형성은 계면활성제의 농도가 5에서 15 %로 증가할수록, 가변형성 지수는 20.9에서 42.5로 증가되었다. ELR-4은 가장 우수한 가변형성 지수를 보여주었으며, 가변형성 지수는 계면활성제의 농도에 의존하는 것을 나타내었다.

3) 탄성 리포좀에 포집된 루틴의 포집효율은 계면활성제를 포함하지 않는 제형인 ELR-1의 경우 52.0 %의 포집효율을 나타내었고, 계면활성제가 포함된 탄성 리포좀의 경우 ELR-2 58.5 %, ELR-3 61.4 %, ELR-4 71.0 %, ELR-5 47.6 %의 포집효율로 나타났다.

4) 루틴을 포집한 탄성 리포좀은 인지질(egg phos-

pholipids)와 계면활성제(Tego® care 450) 비율이 85 : 15 (ELR-4)일 때 가장 우수한 제형인 것으로 나타났다.

5) 루틴을 담지한 탄성 리포좀(ELR-4)은 일반리포좀(ELR-1), 1,3-butylene glycol보다도 루틴의 높은 피부 투과 능력을 나타내었다. 피부 투과 능력은 초기 적하량 314.4 $\mu g/cm^2$에 비해 ELR-4(129.9 $\mu g/cm^2$) 〉 ELR-1 (98.0 $\mu g/cm^2$) 〉 1,3-butylene glycol (76.3 $\mu g/cm^2$) 순으로 나타났다. 이는 탄성 리포좀을 이용할 경우 계면활성제에 의하여 더 많은 양의 루틴을 피부로 전달되었음을 확인할 수 있었다.

이상의 결과들을 통해 PEG-free 계면활성제인 Tego® care 450을 사용한 탄성 리포좀은 자외선으로 유도된 산화적 손상으로부터 피부 장벽기능을 복원하고 피부노화를 억제하기 위한 항산화 방어시스템 구축에 적합한 효율적인 피부 흡수 전달시스템으로 판단된다. 또한 루틴과 같은 항산화제를 효과적으로 피부에 전달하기 위한 적합한 피부 흡수 전달시스템이 될 수 있음을 시사한다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 보건의료연구개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것임(과제고유번호 : A103017).

참 고 문 헌

1. P. L. Honeywell-Nguyen and Joke A. Bouwstra, Vesicles as a tool for transdermal and dermal delivery, *Drug Discovery Today: Technologies.*, **2**(1), 67 (2005).
2. G. E. Rhie, M. H. Shin, J. Y. Seo, W. W. Choi, K. H. Cho, K. H. Kim, K. C. Park, H. C. Eun, and J. H. Chung, Aging- and photoaging-dependent changes of enzymic and nonenzymic antioxidants in the epidermis and dermis of human skin *in vivo*, *J. Invest. Dermatol.*, **118**(4), 741 (2002).
3. S. N. Park, Skin aging and antioxidants, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea.*, **23**(1), 75 (1997).
4. S. Y. Kim, S. R. Kim, H. Y. Kim, M. Kong, J. H. Lee, H. J. Lee, M. Y. Lim, N. R. Jo, and S. N. Park, Antioxidant activity and whitening effect of Cedrela sinensis A. Juss Shoots extracts, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea.*, **36**(3), 175 (2010).
5. N. Kamalakkannan and P. S. M. Prince, Antihyperglycaemic and antioxidant effect of rutin, a polyphenolic flavonoid, in streptozotocin-induced diabetic Wistar rats, *Basic & Clin Pharmacol Toxicol.*, **98**(1), 97 (2006).
6. T. Guardia, A. E. Rotelli, A. O. Juarez, and L. E. Pelzer, Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat, *Il Farmaco.*, **56**(9), 683 (2001).
7. K. Sattanathan, C. K. Dhanapal, R. Umarani, and R. Manavalan, Beneficial health effects of rutin supplementation in patients with diabetes mellitus, *JAPS.*, **1**(8), 227 (2011).
8. A. A. Fernandesa, E. L. Novellia, K. Okoshi, M. P. Okoshib, B. P. Di Muzioa, J. F. Guimarães, and A. Fernandes Junior, Influence of rutin treatment on biochemical alterations in experimental diabetes, *Bidmedicine & Pharmacotherapy.*, **64**(3), 214 (2010).
9. E. J. An, C. K. Kang, J. W. Kim, and B. S. Jin, Lipid-based vesicles as transdermal delivery system. *KIC News.*, **13**(4) (2010).
10. G. Cevc and G. Blume, Lipid vesicles penetrate into intact skin owing to the transdermal osmotic gradients and hydration force, *BBA - Biomembranes.*, **1104**(1), 226 (1992).
11. P. L. Honeywell-Nguyen, H. W. Wouter Groenink, A. M. de Graaff, and J. A. Bouwstra, The *in vivo* transport of elastic vesicles into human skin: effects of occlusion, volume and duration of application. *JCR.*, **90**(2), 243 (2003).
12. G. Cevc and G. Blume, New highly efficient formulation of diclofenac for the topical, transdermal administration in ultradeformable drug carriers, Transfersomes, *BBA-Biomembranes.*, **1514**(2), 191 (2001).
13. M. A. Elsayed, Y. Abdallah, F. Naggar, and M. Khalafallak, Lipid vesicles for skin delivery of drugs: Reviewing three decades of research, *Int. J. Pharm.*, **332**(1), 1 (2007).
14. G. Ceve, A. Schatzlein, and H. Richardsen, Ultradeformable lipid vesicles can penetrate the skin and other semipermeable barriers unfragmented. Evidence from double lable CLSM experiments and di-

rect size measurements, *Biochim. Biophys. Acta*., **1546**, 21 (2002).
15. W. Johnson, Final report on the safety sssessment of PEG-25 propylene glycol stearate, PEG-75 propylene glycol stearate, PEG-120 propylene glycol stearate, PEG-10 propylene glycol, PEG-8 propylene glycol cocoate, and PEG-55 propylene glycol oleate, *Int. J. Toxicology*., **20**, 13 (2001).
16. J. E. Kim, H. J. Lee, M. S. Lim, M. A. Park, and S. N. Park, Cellular protective effect and liposome formulation for enhanced transdermal delivery of *Phersicaria hydropiper* L. extract, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*., **38**(1), 15 (2012).
17. G. Cevc, A. Schatzlein, and G. Blume, Transdermal drug carriers: Basic properties, optimization and transfer efficiency in the case of epicutaneously applied peptides, *J. Control. Release*., **36**, 3 (1995).
18. G. Cevc, D. Gebauer, J. Stieber, A. Schatzlein, and G. Blume, Ultraflexible vesicles, transfersomes, have an extremely low pore penetration resistanceand transport therapeutic amounts of insulin across the intact mammalian skin, *Biochim. Biophys. Acta*, **1368**, 201 (1998).
19. W. G. Cho, Comparison of drug delivery using hairless mouse and pig skin, *J. Kor. Oil. Chemists'Soc*., **24**, 410 (2007).
20. G. M. Maghraby, A. C. Williams, and B. W. Barry, Skin delivery of oestradiol from deformable and traditional liposome: mechanistic studies, *J. Pharm. Pharmacol*., **51**, 1123 (1999).
21. D. Lichtenberg, R. J. Robson, and E. A. Dennis., Solubilization of phospholipids by detergents. Structural and kinetic aspects, *Biochim. Biophys. Acta*., **737**(2), 285 (1983).
22. J. Lasch, J. Hoffman, W. G. Amelyaneenka, A. A. Klibanov, V. P. Torchilin, and H. Binder, Interaction of triton X-100 and octyl glycoside with liposomal membranes at sublytic and lytic concentration: Spectroscopic studies, *Biochim. Biophys. Acta*., **1022**, 171 (1990).
23. S. Jain, N. Jain, D. Bhadra, A. K. Tiwar, and N. K. Jain, Transdermal delivery of an analgesic agent using elastic liposomes: Preparation, characterization and performance evaluation, *Current Drug Delivery*., **2**, 223 (2005).