

## 레스베라트롤을 함유한 나노 에토솜 제조에 관한 연구

서 동 환\* · 윤 종 혁\* · 김 연 준\* · 변 상 요†

코스맥스 R&I center\*, 아주대학교 대학원 응용생명공학과 화장품과학전공†  
(2015년 6월 4일 접수, 2015년 6월 19일 수정, 2015년 6월 23일 채택)

### A Study for Preparation of Nano Ethosome Loaded with Resveratrol

Dong Hoan Seo\*, Jong Hyuk Yoon\*, Youn Joon Kim\*, and Sang Yo Byun†

\*Cosmax R&I Center, Pangyo innovalley E 601, 255, Pangyo-ro, Bundang-gu, Seongnam-si, Gyeonggi-do, Korea

†Cosmetic Science Major, Applied Biotechnology Department, Graduate School, Ajou University, Suwon 443-749, Korea

(Received June 4, 2015; Revised June 19, 2015; Accepted June 23, 2015)

**요약:** 레스베라트롤(Resveratrol)은 천연 폴리페놀이며 피부 손상, 자외선 및 병원성의 공격으로부터 피부를 보호한다. 본 연구에서는 레스베라트롤을 함유한 에토솜의 최적의 제조 조건을 찾기 위해 시도하였다. 에토솜은 수화액정법을 응용하여 제조하였다. 에토솜의 봉입효율 및 입자 크기에 영향을 미치는 요인에 대하여 조사하였다. 에토솜의 입자 사이즈는 입도분석기를 이용하였다. 봉입효율은 HPLC를 이용하여 측정하였다. 에토솜 입자의 크기는 111.2 ~ 112.8 nm이고, 봉입효율은 81.25 ~ 88.75%임을 확인하였다. 최적의 제조 조건으로는 레시틴 : 레스베라트롤 : 콜레스테롤 : 에탄올 = 2.0 : 0.08 : 0.05 : 20.0% (w/w)의 비율로 제조된 경우임을 확인하였다.

**Abstract:** Resveratrol is a natural polyphenol. It protects skin from skin injury, ultraviolet radiation and pathogenic attack. This study is to find the optimum condition for the preparation of ethosome loading amount of resveratrol in ethosome. Ethosomes were prepared by modified hydrated liquid crystal method. Investigation of factors affecting the entrapment efficiency and particle size of ethosomes was carried out. The particle size of ethosome were measured by particle analyzer. The loading efficiency of resveratrol in ethosome was measured by HPLC. The particle sizes were 111.2 ~ 112.8 nm and the loading efficiency of resveratrol was 81.25 ~ 88.75%. The optimum conditions for the preparation of ethosome was obtained from of lecithin : resveratrol : cholesterol : ethanol at a weight ratio of 2.0 : 0.08 : 0.05 : 20.0.

**Keywords:** ethosome, lecithin, resveratrol, cholesterol, ethanol

## 1. 서 론

리포솜은 인지질로 이루어져 있는 이중층구조의 베지클로 유효성분을 봉입하여 안정화시키고 피부침투 효과를 높이하고자 하는 연구가 활발히 진행 중에 있다. 리포솜의 인지질은 생체막의 주요 구성성분으로 생체 친화적이며 생체 내 분해가 가능하고 독성이 없다. 양

친매성 분자로 수용성과 유용성 모두 포집할 수 있고, 제조 방법에 따라 다양한 성질의 리포솜을 만들 수 있다. 그러나 막자체의 물리-화학적 불안정성, 낮은 봉입 효율 및 유기용매를 제거해야 되는 어려움이 있다. 또한 피부 침투효과가 기대 이상으로 높지 않은 부분으로 인해 적극적으로 활용되지 못하는 경우가 많았다[1].

리포솜의 물리화학적인 개선을 위해 수소첨가 포화 지질을 사용하거나 콜레스테롤 적용으로 인지질막의 안정성을 높이고 있으며, dehydration-rehydration 방법,

† 주 저자 (e-mail: sybyun@ajou.ac.kr)  
call: 031)219-2451

freeze-thawing 방법으로 봉입효율을 높이거나 유기용매의 문제점들을 해결하고자 노력하고 있다[2-4]. 리포솜의 피부 침투효율을 높이기 위한 방법으로 유연성이 높아 탄력적으로 변형이 가능한 베지클의 연구가 이루어지고 있다. 이러한 특성의 베지클들은 transfersome, deformable liposome, ethosome 등으로 불리며, 유연성 높은 변형리포솜은 수십 나노미터에 불과한 각질세포의 간격을 통과하는데 있어 일반적인 리포솜 보다 침투효과가 매우 우수하다는 연구결과가 보고되었다[5].

에토솜은 에탄올에 인지질과 약물을 용해시키고 물에 분산시켜 베지클을 만드는 방법이며 에탄올은 예전부터 피부투과 증진제로 많이 알려져 있으며 에탄올을 지질과 함께 사용하여 베지클을 만들면 지질, 에탄올, 피부지질층 간의 상호작용으로 인하여 약물의 투과 시 시너지 효과를 얻을 수 있게 된다. 피부 각질세포 사이의 정돈된 지질층에 에탄올이 접근하면 지질분자의 극성머리 부분과 작용하여 각질층 지질의 전이온도(Transition temperature)를 낮추고 피부 지질층의 유동성을 증대시켜 지질구조를 느슨하게 만들어 투과성이 높아질 수 있도록 구조적 변형이 발생하며 유연한 막을 가진 에토솜은 구조적 변형이 쉽게 이루어져 피부 침투가 용이해진다. 또한 에토솜의 지질막은 피부의 지질층에서 쉽게 용해되어 약물전달에 있어 효과적이고 기존의 리포솜 보다 피부 깊숙이 전달하는 것으로 알려져 있다[6].

레스베라트롤은 포도껍질과 포도씨, 땅콩 등에 존재하는 폴리페놀계 성분이며, 곰팡이나 해충 등의 다양한 외부 환경의 변화로부터 식물 스스로 자신을 보호하기 위해 만들어내는 phytoalexin으로 알려져 있다[7]. 레스베라트롤은 강력한 항산화 활성을 비롯하여 혈청 콜레스테롤 저하, 항바이러스, 항비만, 신경보호 작용, 항염증작용 및 항노화 등 다양한 생리활성을 나타내어 의약품과 식품산업에서 매우 각광을 받고 있다. Gulcin은 레스베라트롤의 항산화능을 ABTS법과 DMPD 법으로 알아본 결과 50% effective concentration 값이 각각 6.96  $\mu\text{g/mL}$  및 9.5  $\mu\text{g/mL}$ 인 것으로 보고하였다[8]. 또한 미백작용, 항염증, 항자극에 효과가 있어 화장품에서의 사용가치가 매우 높으나 난용성물질로서 화장품산업에서 널리 사용되기에는 한계가 있다[9-11].

본 실험에서는 지질을 에탄올에 용해시킨 후 약물

수용액을 첨가하고 교반하여 수화액정(hydrated liquid crystal)을 형성시키고 여기에 증류수를 첨가하여 에토솜을 얻는 방법을 응용하여 100 nm 크기의 에토솜을 제조하고자 하였다[12]. 또한 에토솜의 구성성분인 레시틴, 레스베라트롤, 콜레스테롤 및 에탄올의 비율을 변화시켜 최적의 제조 조건과 레스베라트롤의 봉입효율을 최대로 향상 시킬 수 있는 제조 조건을 확인하고자 하였다.

## 2. 재료 및 실험

### 2.1. 기기 및 시약

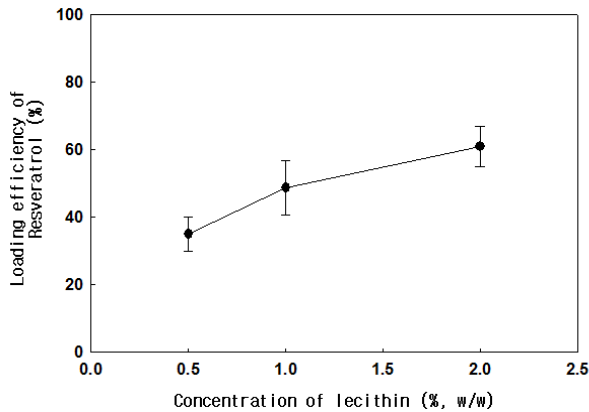
에토솜을 제조하기 위하여 사용된 레시틴은 포스파티딜콜린이 75% 이상 함유되어 있는 LIPOID S 75-3 (LIPOID, Switzerland)를 사용하였고, 주성분인 Resveratrol (Chang dan yang biotechnology, China), 에토솜의 안정도 향상을 위해 Cholesterol (Solvay pharmaceuticals, Singapore), 용매로는 etanol (Korea alcohol industrial, Korea)을 사용하였다. 에토솜에 포집된 레스베라트롤의 함량을 구하기 위해 Methanol, Acetonitrile (Burdick & Jackson, USA)을 사용하였다. 봉입되지 못한 free 레스베라트롤을 제거하기 위해 Sephadex G-50 (Sigma, USA)을 사용하였다. 에탄올 용액과 수용액을 교반하기 위해 Agimixer (PL-S10, Korea)를 사용하였고, 에토솜 입자를 작고 균일하게 만들기 위해 강한 전단력을 가하는 장치로 Microfluidizer (Microfluidics, USA)를 사용하였다. 입자의 크기는 Zetasizer Nano S (Malvern, United Kingdom)를 사용하여 측정하였고, 레스베라트롤의 정량분석을 위해 High-performance liquid chromatography (HPLC) (Agilent 1260, USA)를 사용하였다.

### 2.2. 에토솜의 제조

레스베라트롤을 함유한 에토솜의 제조 방법은 수화액정법을 응용하여 다음과 같은 방법으로 제조하였다[12]. 레시틴, 레스베라트롤, 콜레스테롤 및 에탄올을 각 무게비율별로 혼합 후 레시틴의 상전이온도(55  $^{\circ}\text{C}$ ) 이상인 60  $^{\circ}\text{C}$ 까지 가열하여 완전 용해시킨다. 에탄올 혼합액을 60  $^{\circ}\text{C}$ 의 정제수에 천천히 투입하며 아지믹서를 이용하여 5 분간 교반 후 30  $^{\circ}\text{C}$ 까지 급냉 시켜준다. 에토솜을 작고 균일하게 얻기 위하여 마이크로플루다이저를 3회 통과 시켜준다. 에토솜 분산액은 Sephadex

**Table 1.** The stability of ethosomes

Lecithin composition (% , w/w)	Stability
0.5	Precipitation after one hour
1.0	Precipitation after one day
2.0	Precipitation after three days
3.0	Gelling



**Figure 1.** Loading efficiency of resveratrol in ethosome depending on a variety of concentration of lecithin. The ethosome was composed of resveratrol : ethanol at a weight ratio of 0.1 : 20.0. The data is shown as mean  $\pm$  S.D. (n = 3).

G-50 column에 통과시켜 에토솜에 포집되지 못한 free 레스베라트롤을 제거 후 에토솜 입자를 최종적으로 얻었으며 상기 제조과정은 최적의 에토솜을 만들기 위한 조건이며, 실험 내용에 따라 레시틴, 레스베라트롤, 콜레스테롤 및 에탄올의 조성비를 달리하여 에토솜의 크기 및 봉입효율의 특성을 비교하였고 마이크로 플루다이저의 통과 횟수에 따른 크기 또한 확인하였다.

### 2.3. 에토솜 입자의 크기 측정

에토솜 입자의 크기 측정은 에토솜 용액 1 mL를 증류수로 10배 희석하여 Zetasizer Nano S로 각각 제조되어진 샘플을 3회씩 측정하여 입자의 평균 크기를 관찰하였다.

### 2.4. 레스베라트롤의 봉입효율

제조된 에토솜의 레스베라트롤 봉입효율 측정은 HPLC를 이용하였고, 완성된 에토솜액에서 1 mL을 취하고 메탄올 9 mL을 혼합 후 초음파를 10 분간 조사

해주었다. 이 혼합액을 0.45  $\mu$ m 멤브레인 필터로 여과한 후 1 mL을 취해서 레스베라트롤의 최대 흡수 파장인 310 nm에서 측정하였으며 봉입효율은 식 (1)에 의해 계산하였다.

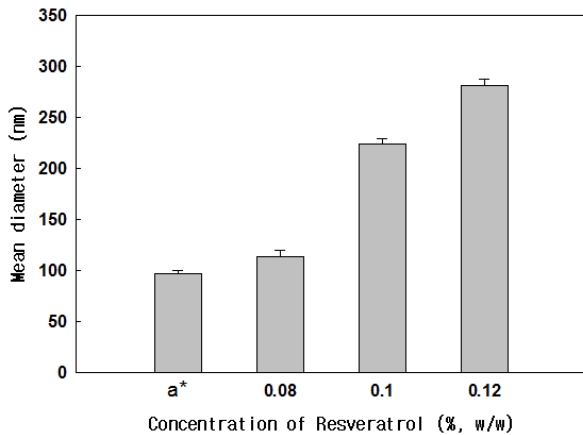
$$\text{봉입효율(\%)} = \frac{\text{에토솜에 봉입된 레스베라트롤의 양}}{\text{초기에 사용된 레스베라트롤의 양}} \times 100(\%)$$

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 레시틴의 비율 변화에 따른 입자 크기 확인 및 봉입 효율

레시틴의 비율 변화에 따른 입자의 크기 및 레스베라트롤의 봉입효율을 확인하였다. Table 1은 레스베라트롤 : 에탄올의 비율을 0.1 : 20.0% (w/w)로 고정하고 레시틴의 함량을 0.5 ~ 3.0% (w/w)로 첨가 후 제조하였고 에토솜에 봉입되지 못한 레스베라트롤의 안정도에 미치는 영향을 보기 위해 Sephadex 컬럼을 통과하기 전 free 레스베라트롤이 제거되지 않은 상태의 안정도 관찰 결과이다. 0.5 및 1.0% (w/w)은 에토솜 입자에 포집되지 못한 레스베라트롤이 재결정을 형성하여 제조 직후 및 안정도 관찰 1일 만에 침전현상이 발생하는 것을 확인하였다. 2.0% (w/w)의 경우 3일 후에 침전현상이 약간 발생하였으나, 3.0% (w/w)에서는 제조 직후 겔링현상이 일어나는 것을 확인할 수 있었다. 침전현상의 발생 이유로는 레스베라트롤을 함유하여 입자를 형성하는데 있어 레시틴의 양이 부족하여 결국 Critical Micelle Concentration에 도달하지 못하였고 에토솜을 형성하는데 있어 한계가 있음을 확인하였다 [12,13].

Figure 1은 에토솜 입자에 포집되지 못하고 재결정을 형성한 free 레스베라트롤을 Sephadex 컬럼을 이용하여 제거한 후 봉입효율을 측정된 결과이다. 레시틴의

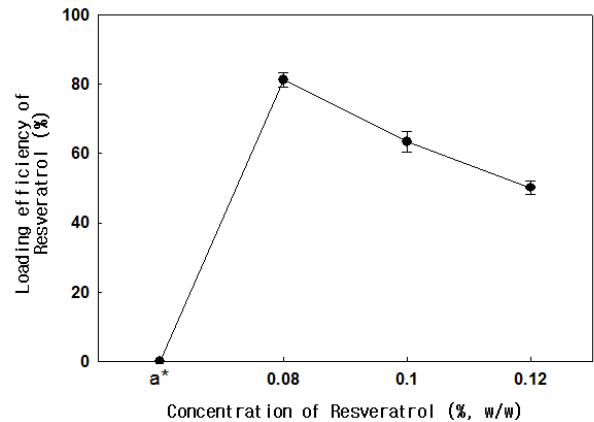


**Figure 2.** Mean particle size of ethosome depending on a variety of concentration of resveratrol. The ethosome was composed of lecithin : ethanol at a weight ratio of 2.0 : 20.0. The data is shown as mean  $\pm$  S.D. (n = 3) (a\* : without resveratrol).

함량이 0.5% (w/w)의 경우 35.0%, 1.0% (w/w)은 48.7% 및 2.0% (w/w)은 61.2%가 포집된 것을 알 수 있었으며, 3.0% (w/w)의 경우 젤링현상으로 포집률은 측정할 수 없었다. 레스베라트롤 : 에탄올의 비율이 0.1 : 20.0% (w/w)일 때 최적의 제조 조건으로 레시틴의 양은 2.0% (w/w)임을 확인할 수 있었다.

### 3.2. 레스베라트롤의 비율 변화에 따른 입자 크기 확인 및 봉입효율

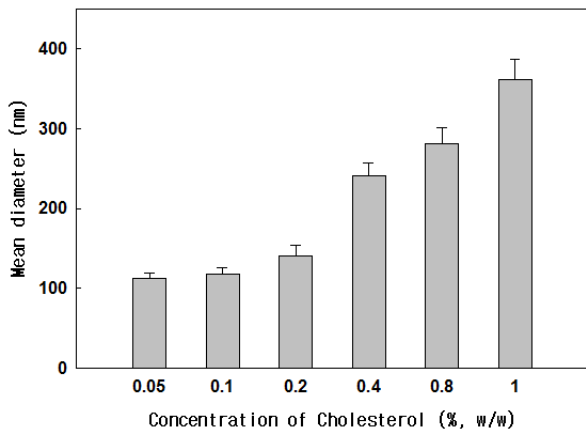
Figure 2는 레스베라트롤의 함량 변화에 따른 입자의 크기 변화를 나타내었다. 레시틴 : 에탄올의 비율을 2.0 : 20.0% (w/w)로 고정하고 레스베라트롤의 함량을 0.00 ~ 0.12% (w/w)로 첨가하여 에토솜을 제조하였다. 레스베라트롤이 함유되어있지 않은 에토솜의 평균 입자크기는 약 97.0 nm이었으며, 0.08% (w/w)를 적용한 경우 113.9 nm, 0.10% (w/w)은 223.9 nm이었고 0.12% (w/w)은 281.0 nm임을 확인할 수 있었다. 또한 입자의 크기가 97.0 nm에서 113.9 nm로 증가된 것은 레스베라트롤이 에토솜에 포집된 것을 보여주고 있다. 레스베라트롤의 양이 증가함에 따라 입자의 크기 또한 증가하는 것을 확인할 수 있었고 이는 에토솜 내에 레스베라트롤이 포집되었음을 알 수 있다. 0.1 ~ 0.12% (w/w)의 경우 입자들의 크기가 급격하게 커진 이유는 레시틴의 양이 증가할수록 안정한 입자를 형성할 수 있으나[14-16] 레스베라트롤의 양이 증가함에 따라 레



**Figure 3.** Loading efficiency of resveratrol in ethosome depending on a variety of concentration of resveratrol. The ethosome was composed of lecithin : ethanol at a weight ratio of 2.0 : 20.0. The data is shown as mean  $\pm$  S.D. (n = 3) (a\* : without resveratrol).

시틴의 양이 상대적으로 줄어들었고, 안정한 입자를 형성하는데 있어 한계점을 보여주는 결과이다[12,13]. 레시틴 : 에탄올 : 레스베라트롤의 비율을 2.0 : 20.0 : 0.08% (w/w)로 에토솜을 제조하였을 때 평균입자의 크기가 약 113.9 nm로 제조됨을 확인하였다.

Figure 3은 레스베라트롤의 함량 변화에 따른 레스베라트롤의 봉입효율을 나타낸 것이다. 봉입효율은 식1)에 의해 계산하였으며 0.08% (w/w)일 때 81.25%로 가장 높았고 0.1% (w/w)일 때는 봉입효율이 감소하여 63.42%였고 0.12% (w/w)일 때 50.12%를 나타내었다. 결과적으로 레스베라트롤의 함량이 높아짐에 따라 봉입효율이 감소하는 것을 관찰할 수 있었고, 레스베라트롤의 양이 증가함에 따라 용해되지 못한 레스베라트롤의 응집현상으로 인하여 침전이 관찰되었으며 입자의 크기 또한 증가하였다. 봉입효율이 감소하는 것은 소수성 물질인 레스베라트롤이 에탄올에 용해된 후 비용매성인 수용액과 혼합되면서 용해도의 한계점에 가까워졌기 때문이다. 레스베라트롤을 포화농도 이상으로 첨가하였을 경우 입자의 크기는 증가하고 봉입효율은 감소함을 확인하였다. 레시틴/에탄올 용액에 과잉 공급된 레스베라트롤은 뭉침현상이 발생하여 분산용액 내에 다량의 침전이 발생하였고 침전물을 여과하는 과정에서 입자에 봉입되지 못한 레스베라트롤이 제거됨으로써 봉입효율이 감소되었다. 따라서 2.0% (w/w)의 레시틴, 20.0% (w/w)의 에탄



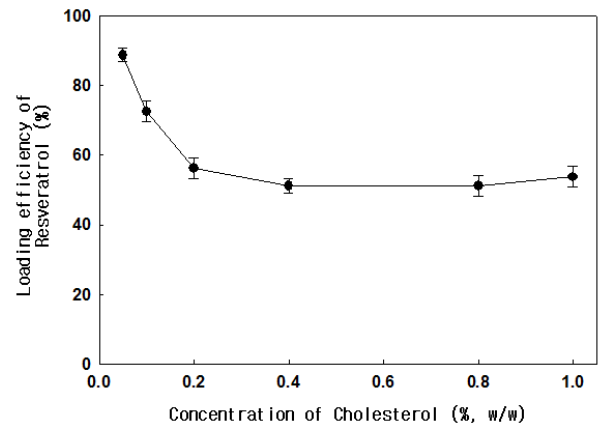
**Figure 4.** Mean particle size of ethosome depending on a variety of concentration of cholesterol. The ethosome was composed of lecithin : resveratrol : ethanol at a weight ratio of 2.0 : 0.08 : 20.0. The data is shown as mean  $\pm$  S.D. (n = 3).

을 및 0.08% (w/w)의 레스베라트롤 농도로 에토솜을 제조하였을 경우 레스베라트롤의 봉입효율이 81.25%로 최대가 되는 것을 관찰할 수 있었다.

### 3.3. 콜레스테롤의 비율 변화에 따른 입자 크기 확인 및 봉입효율

Figure 4는 콜레스테롤의 함량에 따른 입자의 크기 변화를 나타내고 있다. 레시틴 : 에탄올 : 레스베라트롤의 비율을 2.0 : 20.0 : 0.08% (w/w)로 고정하고 콜레스테롤의 함량을 0.05 ~ 1.00% (w/w)로 증가시키며 제조한 결과 0.05 ~ 0.10% (w/w)의 경우 입자의 크기는 112.8 ~ 127.8 nm를 형성하였고 0.2 ~ 1.0% (w/w)는 입자의 크기가 140.2 ~ 362.0 nm까지 커짐을 확인할 수 있었다. 콜레스테롤은 소수성물질로서 리포솜이나 에토솜 입자 형성 시 레시틴의 소수성부분에 결합하여 입자를 좀 더 단단한 구조로 만들어주는 물질로 알려져 있다[17]. 콜레스테롤의 함량이 증가함에 따라 입자의 크기 또한 증가하는 것은 Figure 2와 같은 이유로 콜레스테롤을 용해시키기에 한계점이 있으며 함량이 증가할수록 콜레스테롤의 뭉침 현상으로 인해 침전되는 것을 확인할 수 있었다. 결국 콜레스테롤이 0.05% (w/w)일 때 112.8 nm로 제조됨을 확인할 수 있었다.

Figure 5는 콜레스테롤의 함량에 따른 레스베라트롤의 봉입효율을 나타내고 있다. 콜레스테롤의 함량이

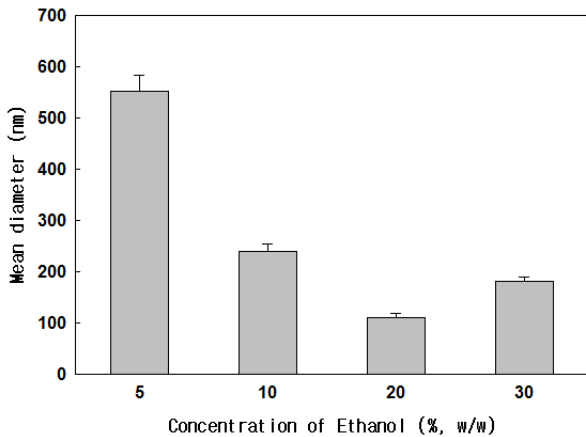


**Figure 5.** Loading efficiency of resveratrol in ethosome depending on a variety of concentration of cholesterol. The ethosome was composed of lecithin : resveratrol : ethanol at a weight ratio of 2.0 : 0.08 : 20.0. The data is shown as mean  $\pm$  S.D. (n = 3).

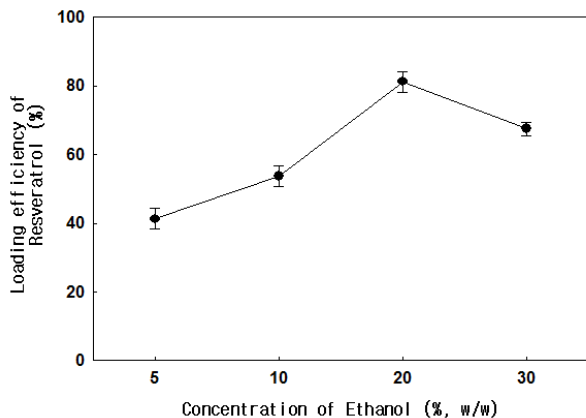
증가할수록 봉입효율 또한 떨어지는 것을 확인할 수 있었다. 이는 콜레스테롤은 레시틴의 소수성부분 꼬리부분과 상용성이 좋고 배열층 사이에 위치하여 서로 얽혀진 이중층을 형성하여 입자의 안정성 및 포집률을 높이는 것으로 알려져 있다[18]. 그러나 0.1% (w/w) 이상에서는 포집률이 떨어지는 것을 확인할 수 있었으며 이는 본 실험의 에토솜 시스템에서 0.1% (w/w)를 넘는 콜레스테롤은 입자의 형성에 방해가 되며 뭉침현상으로 침전된 것을 확인하였다. 0.4% (w/w) 이상의 농도에서 봉입효율이 일정하게 유지되는 것은 침전된 콜레스테롤 등이 제거되고 안정적으로 에토솜을 형성한 입자의 봉입효율을 측정된 결과로 사료된다. 결론적으로 에토솜을 형성하는데 있어 콜레스테롤의 최적의 함량은 0.05% (w/w)임을 확인할 수 있었다.

### 3.4. 에탄올의 비율 변화에 따른 입자 크기 확인 및 봉입효율

Figure 6은 에탄올의 함량에 따른 입자의 크기를 나타내고 있다. 레시틴 : 레스베라트롤 : 콜레스테롤의 비율을 2.0 : 0.08 : 0.05% (w/w)로 고정하고 에탄올의 함량을 5.0~30.0% (w/w)으로 증가시키며 제조한 결과 5.0% (w/w)일 때 553 nm로 가장 컸으며 20.0% (w/w)일 때 111.2 nm로 가장 작게 형성되었다. 5.0 ~ 10.0% (w/w)경우 용매 역할을 하는 에탄올이 부족하여 비용매성인 수용액과 혼합 시 입자형성에 있어 매우 불리



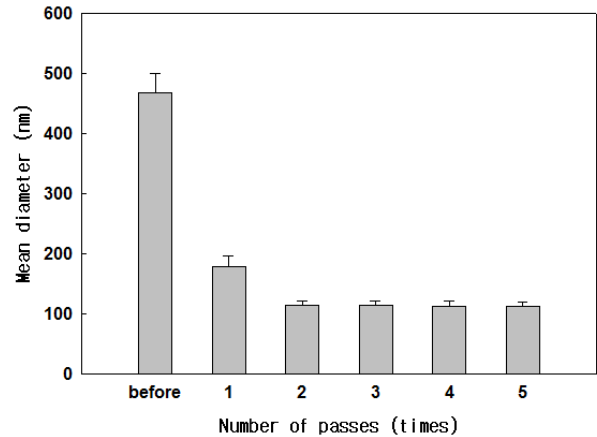
**Figure 6.** Mean particle size of ethosome depending on a variety of concentration of ethanol. The ethosome was composed of lecithin : resveratrol : cholesterol at a weight ratio of 2.0 : 0.08 : 0.05. The data is shown as mean  $\pm$  S.D. (n = 3).



**Figure 7.** Loading efficiency of resveratrol in ethosome depending on a variety of concentration of ethanol. The ethosome was composed of lecithin : resveratrol : cholesterol at a weight ratio of 2.0 : 0.08 : 0.05. The data is shown as mean  $\pm$  S.D. (n = 3).

한 조건으로 침전현상이 발생하였다. 30.0% (w/w)의 경우 입자의 크기는 181.0 nm로 약간 커졌으며 이는 에탄올과 레시틴이 서로 맞물리는 구조를 형성하여 에탄올의 함량이 많아질수록 이중층막 구조체계의 견고성이 약화되는 경향의 결과로 생각된다[12]. 에탄올의 함량이 20.0% (w/w)일 때 최적의 제조 조건임을 확인하였다.

Figure 7은 에탄올의 함량에 따른 레스베라트롤의 봉입효율을 나타내고 있으며 Figure 6에 의한 결과로



**Figure 8.** Mean particle size of ethosome depending on a variety of micro fluidizer of passes. The ethosome was composed of lecithin : resveratrol : cholesterol : ethanol at a weight ratio of 2.0 : 0.08 : 0.05 : 20.0. The data is shown as mean  $\pm$  S.D. (n = 3).

용매인 에탄올이 부족한 경우 용해도가 저하되어 봉입 효율이 41.2 ~ 53.75%로 낮음을 확인하였고, 에탄올이 과량인 경우 느슨하게 형성된 이중층의 구조로 인해 봉입효율이 67.5%정도였다[12,19]. 에탄올의 함량이 20.0% (w/w)일 때 봉입효율이 81.25%로 최적의 제조 조건임을 확인하였다.

### 3.5. 마이크로플루다이저 통과 횟수에 따른 입자 크기 확인

Figure 8은 마이크로플루다이저의 통과 횟수에 따른 입자의 크기를 나타내고 있다. 마이크로플루다이저를 통과하기 전 입자의 크기는 468.0 nm였으나 1회 통과 시 178.2 nm 2회 통과 시 115.3 nm였고, 이후 통과된 횟수에 관계없이 113.9 nm 정도였음을 확인하였다. 마이크로플루다이저를 통과하기 전의 상태는 Agimixer에 의한 교반으로 혼합이나 입자 분산 시 전단응력이 크지 않아 작고 균일한 입자를 얻기 어려웠으나 강한 전단응력을 가할 수 있는 장치인 마이크로플루다이저를 통과함으로써 작고 균일한 입자를 얻을 수 있었다. 3회 통과 이후 입자의 크기에 변화가 없는 것을 확인하였으며 최적의 조건임을 확인하였다.

## 4. 결 론

본 연구에서는 에토솜 제조 방법 중 수화액정 방법을

응용하여 평균 입자의 크기가 100 nm 내외이며 레스베라트롤의 최대 봉입효율을 만족하는 에토솜의 제조 조건을 관찰하였다. 레시틴, 레스베라트롤, 콜레스테롤 및 에탄올의 비율을 변화시켜 입자를 제조한 결과 레스베라트롤의 함량이 일정할 때 레시틴의 농도가 높아질수록 봉입효율은 증가하였으나 침전되거나 겔화되는 현상이 발생하였다. 레시틴의 함량이 일정할 때 레스베라트롤의 함량이 증가할수록 입자의 크기는 커졌으며 최대한의 봉입효율은 레스베라트롤이 0.08% (w/w)일 때 81.25 ~ 88.75%를 나타내었다. 레시틴 및 레스베라트롤의 함량이 일정할 때 콜레스테롤의 증가할수록 입자의 크기는 증가하였고 봉입효율은 감소하였다. 에탄올의 비율을 변화시키며 제조한 결과 함량이 증가할수록 입자의 크기는 작아지며 봉입효율은 높아지는 것을 확인하였으며 마이크로플루다이저의 경우 3회 이상 통과 시 입자의 크기에는 상관이 없이 일정하였다. 본 결과로서 에토솜 입자 제조 시 100 nm 내외의 입자 크기를 만족하며 봉입효율이 가장 우수한 조건은 레시틴 : 레스베라트롤 : 콜레스테롤 : 에탄올 = 2.0 : 0.08 : 0.05 : 20.0% (w/w)의 비율로 제조된 경우임을 확인하였다.

## Reference

1. O. Braun-Falco, H. C. Korting, and H. I. Mailbach, *Liposome Dermatics*, Spinger-Verlag, 70 (1992).
2. C. Kirby and G. Gregoriadis, Dehydration-Rehydration Vesicles: A Simple Method for High Yield Drug Entrapment in Liposomes, *Nature Biotechnology*, **2**, 979 (1984).
3. R. R. C. New, *Liposomes: A Practical Approach*, Oxford University Press, Oxford (1990).
4. G. Gregoriadis, *Liposome Technology* 2nd, CRC Press, Florida (1993).
5. J. M. Lopez-Pinto, M. L. Gonzalez-Rodriguez, and A. M. Rabasco, Effect of cholesterol and ethanol on dermal delivery from DPPC liposomes, *Int. J. Pharm*, **298**(1), 1 (2005).
6. E. Touitou, N. Dayana, L. Bergelsonb, B. Godina, and M. Eliazza, Ethosomes – novel vesicular carriers for enhanced delivery: characterization and skin penetration properties, *J. Control. Release*, **65**(3), 403 (2000).
7. Y. A. Kim, S. H. Rhee, W. H. Lee, K. Y. Park, and Y. H. Choi, Molecular Biological Mechanisms of Resveratrol for Cancer Chemoprevention, *J. Cancer Prev.*, **9**, 19 (2004).
8. I. Gulcin, Antioxidant properties of resveratrol: A structure – activity insight, *innov. food sci. emerg. technol*, **11**, 210 (2010).
9. N. R. Jo, S. A. Park, S. H. Jeon, J. H. Ha, and S. N. Park, Cellular protective effects and antioxidative activity of resveratrol, *Appl. Chem. Eng.*, **24**(5), 483 (2013).
10. P. Bernard and J. Y. Berthon, Resveratrol: an original mechanism on tyrosinase inhibition, *Int. J. Cosmet. Sci.*, **22**(3), 219 (2000).
11. K. Subbaramaiah, W. J. Chung, P. Michaluart, N. Telang, T. Tanabe, H. Inoue, M. Jang, J. M. Pezzuto, and A. J. Dannenberg, Resveratrol inhibits cyclooxygenase-2 transcription and activity in phorbol ester-treated human mammary epithelial cells, *J. Biol. Chem.*, **273**, 21875 (1998).
12. B. S. Jin, S. M. Lee, and K. H. Lee, A study on the factors affecting entrapment efficiency and particle size of ethosomes, *J. Korean. Ind. Eng. Chem.*, **17**(2), 138 (2006).
13. H. Y. Kwon, J. Y. Lee, S. W. Choi, Y. S. Jang, and J. H. Kim, Preparation of PLGA nanoparticles containing estrogen by emulsification–diffusion method, *Colloids Surf., A*, **182**(1-3), 123 (2001).
14. P. Kan, Z. B. Chen, R. Y. Kung, C. J. Lee, and I. M. Chu, Study on the formulation of o/w emulsion as carriers for lipophilic drugs, *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **15**(2), 117 (1999).
15. M. Jumaa and B. W. Muller, Parenteral emulsions stabilized with a mixture of phospholipids and PEG-660-12-hydroxy-stearate: evaluation of accelerated and long-term stability, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **54**(2), 207 (2002).
16. B. S. Jin, Y. M. Han, K. H. Lee, and M. J. Choi,

- Preparation and characterization of Calcein entrapped ethosome, *J. Korean Ind. Eng. Chem.*, **15**(2), 205 (2004).
17. J. J. Collins and M. C. Phillips The stability and structure of cholesterol-rich codispersions of cholesterol and phosphatidylcholine, *J. Lipid Res.*, **23**, 291 (1982).
  18. L. P. Tseng, H. J. Liang, T. W. Chung, Y. Y. Huang, and D. Z. Liu, Liposomes incorporated with cholesterol for drug release triggered by magnetic field, *J. Med. Biol. Eng.*, **27**(1), 29 (2007).
  19. H. J. Gwak and B. S. Jin, Preparation and characterization of EGCG entrapped ethosome, *J. Korean Ind. Eng. Chem.*, **18**(2), 130 (2007).