**Appl. Chem. Eng.,** Vol. 28, No. 2, April 2017, 177-185
https://doi.org/10.14478/ace.2016.1124

Article

# 지방산 첨가가 리포좀 유동성에 미치는 영향에 관한 연구

**이진선 · 지경엽* · 임종주†**

동국대학교-서울 공과대학 화공생물공학과, *대구한의대학교 한방산업대학 바이오산업융합학부
(2016년 12월 19일 접수, 2017년 2월 1일 심사, 2017년 2월 9일 채택)

# Effect of Fatty Acid on the Membrane Fluidity of Liposomes

**JinSun Lee, Gyeong-Yup Chi*, and JongChoo Lim†**

*Dept. of Chemical and Biochemical Eng., Dongguk Univ.-Seoul, Seoul, 04620, Korea*
**Daegu Hanny University, 285-10 Eobongji-gil, Gyeongsangbuk-do, Korea*
*(Received December 19, 2016; Revised February 1, 2017; Accepted February 9, 2017)*

초 록

본 연구에서는 스테아르산(SA), 올레산(OA), 리놀레산(LA) 등의 지방산이 지질 소포체 막과의 상호 작용에 미치는 영향에 관하여 살펴보았다. 이를 위하여 지방산 종류 및 농도 변화에 따른 리포좀 평균 입자 크기 및 제타 전위, 리포좀 막의 deformability, fluorescence anisotropy ratio 등을 측정하고 TEM 관찰을 통하여 지방산 첨가가 리포좀 막의 유동성 변화에 미치는 역할에 관하여 살펴보았다. 기본적으로 SA, OA, LA 등의 지방산 첨가는 동일한 경향을 나타내었다. 즉, 지방산을 첨가함에 따라 리포좀이 보다 치밀한 패킹을 갖게 되어서 리포좀의 크기는 감소하고 제타 전위 값은 증가하였으나, 지방산의 과도한 첨가는 리포좀에서 다형(polymorphic) 구조를 가지는 지질 입자 응집체로의 전이를 일으켰다. SA, OA 및 LA 지방산 시스템에서의 최소 리포좀 크기와 가장 치밀한 리포좀 패킹은 레시틴 대비 지방산의 몰 비율이 각각 0.70, 0.50, 0.25인 조건에서 관찰되었으며, 리포좀 막의 deformability와 fluorescence anisotropy ratio 측정에 의한 리포좀 막의 유동성 측정 결과는 TEM 및 입자 크기 측정 결과와 일치함을 알 수 있었다.

**Abstract**

In the present work, the interaction of fatty acid with vesicle membrane of phospholipids was investigated using 3 different kinds of fatty acids such as stearic acid (SA), oleic acid (OA) and linoleic acid (LA). Basically, the same trend has been found in 3 fatty acid systems. The addition of fatty acid produced a close packing of liposome due to the penetration of fatty acid molecules into liposome vesicles, which resulted in a decrease in size and an increase in zeta potential of liposome. However, excessive addition of fatty acid produced a transition from liposomes to aggregates of lipid particles having polymorphic structure. The membrane fluidity, characterized by measuring membrane deformability and fluorescence anisotropy ratio of liposomes, was in good agreement with measurement results of transmission electron microscopy (TEM) and particle size. The minimum size and closest packing of liposome with SA, OA and LA were found when the molar ratios of fatty acid to lecithin were 0.70, 0.50, and 0.25 respectively.

***Keywords:*** *liposome, fatty acid, packing, fluidity*

## 1. 서 론

리포좀(liposome)은 주로 인지질(phospholipids)로 이루어진 인공적인 미세 형태의 베시클(vesicle)로서 생체막(biological membrane)의 세포막 같은 구조와 유사하기 때문에 유용한 세포 모델로 사용되고 있다. 리포좀은 질병 치료를 위한 약물이나 백신의 전달체(delivery system)에 사용될 수 있고, 또한 화장품에서 활성 성분, 섬유에서 염료, 식물에서 살충제, 식품에서 효소, 영양 보충제 및 기타 물질 등의 담지 및 투여(administration)를 위한 부형제(vehicle)로서 적용되고 있다[1].

크기가 작은 리간드 분자는 인지질 소포체 막과 상호 작용하여 소포체 막의 유동성(fluidity) 및 겔-액정(gel-to-liquid-crystalline) 상전이(phase transition) 등과 같은 막의 특성에 영향을 끼치며, 이러한 작은 분자와 생체막 사이의 상호 작용은 약물 전달(drug delivery) 작용 메커니즘을 이해하는 데 중요하다고 알려져 있다[2,3]. 지방산(fatty acid)은 트리글리세리드(triglyceride), 인지질, 당지질(glycolipid) 등의 각종 지질 복합체의 구성 성분으로서 생체 내에 널리 분포하며[4], 신체 조직 및 체액에서의 유리산(free acid)의 농도는 비교적 낮지만, 생체막의 생리 기능(physiological function)에 다양한 영향을 미치며[5], 이러한 영향은 생체막 물성 변화에 기인하는 것으로 알려져 있다[6-10]. 따라서 시차열분석(differential thermal analysis, DTA)[4], 시차주사 열량법(differential scanning calorimetry, DSC)[5,6], vibrational spectro-

† Corresponding Author: Dongguk Univ.-Seoul,
Dept. of Chemical and Biochemical Eng., Seoul, 04620, Korea
Tel: +82-2-2260-3707 e-mail: jongchoo@dongguk.edu

pISSN: 1225-0112 eISSN: 2288-4505 @ 2017 The Korean Society of Industrial and Engineering Chemistry. All rights reserved.

scopy[7], 형광분광법(fluorescence spectroscopy)[8], X-선 회절(X-ray diffraction) 측정[9], 핵자기 공명(nuclear magnetic resonance, NMR) 분석[10] 등을 이용하여 지방산이 이중층(double layer)으로 이루어진 인지질 막의 물성에 미치는 영향에 관하여 많은 연구가 진행되어 왔다.

유리 지방산 분자의 수용액상과 지질 이중층상 내부로의 배분(partitioning) 정도는 지방산이 지질 세포막의 기능에 영향을 끼치는 많은 생물학 및 생물공학 공정에서 매우 중요하다[11]. 예를 들어, 지방산 분자의 리포좀 막으로의 혼입(incorporation)은 지질막 안정성(stability) 및 굽힘 강성(bending rigidity)의 변화뿐만 아니라 막과 관련된 효소, 펩티드 및 단백질의 기능에도 영향을 미친다[11]. 또한 유리 지방산이 지질 막 내부에 혼입되어 지질막에 어떻게 분포하는지는 약물 전달 효율 측면에서도 매우 중요하다고 알려져 있다[11,12].

지방산을 리포좀에 첨가하는 경우, 리포좀 막의 물리적 특성은 리포좀 막의 내부에 존재하는 지방산 조성에 의하여 결정되므로, 지방산 및 지질 성분 사이의 분자 상호작용(interaction)을 조절하여, 리포좀 시스템의 안정성을 향상시키거나 리포좀 막의 강도 및 투과성(permeability)을 조절할 수 있다[12]. 따라서 지방산 첨가가 리포좀 막의 패킹(packing) 특성 변화에 미치는 결과를 이해하는 것은 리포좀 성능 및 적용 관점에서 매우 중요하다. 지방산과 lysolipids 등과 같은 양친매성 첨가제가 리포좀 시스템에 미치는 영향에 대하서는 많은 연구들이 진행되었지만, 지방산 구조가 리포좀 막의 유동성에 미치는 영향에 관해서는 체계적인 연구가 수행되지 않았다. 따라서 본 연구에서는 지방산의 분자 구조가 지질 리포좀 막과 지방산의 상호 작용에 미치는 효과에 관하여 살펴보았다. 이를 위하여 지방산 종류 및 농도 변화에 따른 리포좀 평균 입자 크기 및 제타 전위(zeta potential), 리포좀 막의 deformability, fluorescence anisotropy ratio 등을 측정하고 투과형 전자 현미경(transmission electron microscope, TEM) 관찰을 통하여 지방산 첨가가 리포좀 막의 유동성 변화에 미치는 역할에 관하여 살펴보았다.

## 2. 실 험

### 2.1. 실험재료

본 실험에서는 대두유에서 추출한 S100, S100-3, S75, S75-3 레시틴을 Lipoid (독일)로부터 구입하여 별다른 정제과정 없이 리포좀 제조에 사용하였다. 여기서, S100은 100% 불포화 포스파티딜콜린(phosphatidylcholine, PC), S100-3은 100% 포화 PC, S75는 불포화 PC 75%와 포스파티딕 엑시드(phosphatidic acid, PA)/포스파티딜이노시톨(phosphatidylinositol, PI) 혼합물 25%, S75-3은 포화 PC 75%와 PA/PI 혼합물 25%로 각각 구성되어 있는 레시틴 제품이다. 본 실험에서 사용한 스테아르산(stearic acid, octadecanoic acid, SA), 올레산(oleic acid, cis-9-octadecenoic acid, OA), 리놀레산(linoleic acid, cis-9,cis-12-octadecadienoic acid, LA) 등의 순도 99% 이상 지방산은 시그마 알드리치(Sigma-Aldrich)로부터 구입하여 별다른 정제과정 없이 실험에 사용하였다. 또한 용매로 사용한 순도 99.9% 이상의 테트라하이드로퓨란(tetrahydrofuran, THF)과 순도 99.5% 이상의 에탄올, 그리고 세포막 유동성을 관찰하기 위하여 사용한 순도 98% 이상의 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) 형광 프로브(probe) 등도 시그마 알드리치로부터 구입하여 사용하였다. 시료 제조를 위하여 사용한 물은 이온 교환 시스템과 증류를 거친 3차 증류수를 사용하였다.

### 2.2. 실험 방법

#### 2.2.1. 리포좀 제조

지방산 첨가 없이 레시틴만을 사용하여 제조한 리포좀은 S100, S100-3, S75 및 S75-3 등의 4가지 종류 레시틴을 각각 사용하여 제조하였다. 우선 적당량의 레시틴을 60 ℃ 증류수에 첨가하여 0.25, 0.5, 1, 2 wt%의 레시틴 수용액을 각각 제조한 후 볼텍스 믹서(vortex mixer)를 사용하여 5 min 동안 혼합하였다. 이후 수용액을 다시 초음파 파쇄기(ultra-sonicator (Vibracell VCX400, Sonics, USA))를 사용하여 리포좀을 제조하였다. 이때 초음파 처리 시간을 2, 3, 5, 10, 15, 20 min으로 각각 변화시키면서 리포좀을 제조한 후 레시틴 농도와 초음파 처리 시간 변화에 따른 리포좀 입자의 평균 크기 및 분포도를 입도 분석기(SOS1, K-ONE Ltd, Korea)를 사용하여 측정하였다. 제조한 리포좀은 20 ℃ 항온기(BOD Incubator DF-95B, 두리과학)에 60일 동안 보관하면서 시간에 따른 리포좀 입자의 평균 크기 및 분포도 변화를 관찰함으로써 리포좀 입자의 안정성을 평가하였다.

레시틴에 지방산을 첨가하여 제조한 리포좀은 rotary evaporation 방법을 사용하여 제조하였다. 이를 위하여 S75-3 50 mg과 적당량의 지방산을 60 ℃ 온도 조건의 에탄올 10 mL에 용해시킨 후 볼텍스 믹서를 사용하여 10 min 동안 교반하였다. 이후 회전 농축기(rotary evaporator)를 사용하여 40 ℃에서 에탄올을 증발시켜 플라스크 내부 벽에 얇은 지질 필름을 형성한 후 질소 분위기 하에서 진공 데시케이터(vacuum desiccator)에 밤새 보관하여 지질 필름에 남아있는 여분의 용제를 완전히 제거하였다. 지질 필름을 70 ℃ 온도 조건의 물 100 mL에 첨가한 후 볼텍스 믹서를 사용하여 10 min 동안 수화(hydration)시켰으며, 수화된 리포좀을 다시 초음파 처리하여 최종 리포좀 입자를 제조하였다. 지방산 종류 및 농도 변화에 따른 리포좀 입자의 평균 크기 및 분포도를 입도 분석기를 사용하여 측정하였으며, 또한 20℃ 항온기에 보관한 리포좀의 시간에 따른 입자의 평균 크기 및 분포도 변화를 관찰함으로써 리포좀 입자의 안정성을 평가하였다.

#### 2.2.2. 리포좀 평균 입자 크기 및 제타 전위 측정

제조한 리포좀의 평균 입자 크기 및 분포는 해당 시료를 증류수로 희석한 후 일본 Otsuka사의 ELS-8000을 사용하여 측정하였다. 입자 분포는 다분산 지수(polydispersity index, PDI)를 사용하여 나타내었는데, PDI 값이 0.25 보다 작은 경우, 안정한 상태의 단분산에 가까운 입자 분포를 갖는 것으로 알려져 있다[13]. 또한 리포좀 입자의 제타 전위는 ELS-8000을 사용하여 전기영동 속도(electrophoretic mobility)를 측정한 후 Smoluchowski 식을 사용하여 구하였다[14]. 동일 시료에 대하여 각각 2회씩 측정한 후 그 평균값을 구하여 해당 시료에 대한 제타 전위 값으로 결정하였다.

#### 2.2.3. 리포좀 막의 deformability 측정

지방산 첨가가 리포좀 막의 유동성에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 extrusion법을 이용하여 deformability $D$를 측정하였다. Extrusion 실험은 Amicon stirred cell (Millipore model 8050, USA)을 이용하여 4.5 bar의 동일한 압력을 가하면서 실험을 진행하였다. 본 실험 조건에서 제조된 리포좀 크기보다 기공 크기가 작은 80 nm 폴리카보네이트(polycarbonate) 필터 페이퍼(Whatman Neclepore track-etched membranes, UK)를 사용하였고, 일정 시간 동안 막 필터를 통과한 리포좀 용액의 부피를 측정한 후 다음의 식 (1)을 이용하여 deformability $D$ (mL/min)를 구하였다[15].

**Table 1. Characteristics of Liposomes Prepared with Lecithin S100**

| Concentration (wt%) | Sonication Time (min) | Initial | | |
|---|---|---|---|---|
| | | Particle Size (nm) | PDI | Zeta Potential (mV) |
| 0.25 | 2 | 187.7 ± 0.1 | 0.300 | -14.83 ± 0.50 |
| | 3 | 209.7 ± 12.2 | 0.320 | -12.22 ± 0.13 |
| | 5 | 190.6 ± 10.8 | 0.308 | -10.42 ± 0.04 |
| | 10 | 141.2 ± 0.9 | 0.277 | -10.10 ± 1.77 |
| | 15 | 111.6 ± 5.4 | 0.262 | -8.81 ± 0.56 |
| | 20 | 98.1 ± 2.8 | 0.262 | -8.97 ± 0.12 |
| 0.5 | 2 | 418.2 ± 8.3 | 0.183 | -11.40 ± 0.52 |
| | 3 | 297.4 ± 45.3 | 0.163 | -11.58 ± 4.46 |
| | 5 | 226.5 ± 14.1 | 0.270 | -8.47 ± 0.64 |
| | 10 | 143.4 ± 1.8 | 0.276 | -12.61 ± 0.13 |
| | 15 | 114.1 ± 5.3 | 0.254 | -2.75 ± 2.79 |
| | 20 | 97.8 ± 1.9 | 0.261 | -0.76 ± 1.00 |
| 1 | 2 | 155.0 ± 0.1 | 0.204 | -10.12 ± 0.73 |
| | 3 | 150.8 ± 0.4 | 0.192 | -12.98 ± 0.45 |
| | 5 | 143.3 ± 2.5 | 0.215 | -6.71 ± 0.38 |
| | 10 | 130.9 ± 1.3 | 0.248 | -6.20 ± 0.95 |
| | 15 | 118.0 ± 6.9 | 0.258 | -2.89 ± 2.44 |
| | 20 | 96.4 ± 2.3 | 0.257 | -17.16 ± 3.90 |

$$D = j \times (\frac{r_v}{r_p})^2 \quad (1)$$

여기서, $j$는 일정 시간 동안 투과성 막을 통과한 리포좀의 양(mL/min), $r_v$는 필터를 통과한 리포좀의 크기(nm), 그리고 $r_p$는 실험에 사용한 막의 기공 크기(nm)이다.

2.2.4. Fluorescence anisotropy 측정

이중층 내에서의 소수기 알킬 사슬의 배열(ordering)과 역동성(dynamics)을 이해하기 위하여 fluorescence anisotropy 측정을 통하여 막의 유동성을 관찰하였다[16]. DPH를 소수성(hydrophobic) 프로브(probe)로 사용하여 fluorescence anisotropy 측정을 수행하였으며, DPH를 THF에 넣어 1.37 g/L의 농도로 제조한 후 상온에서 이 용액 50 μL와 리포좀 현탁액(suspension) 3 mL를 함께 섞어 2 h 동안 교반한 다음 분광 광도계(luminescence spectrometer) LS 50B (PerkinElmer, USA)를 이용하여 430 nm의 방출(emission) 파장에서 측정하였다.

리포좀의 micro-fluidity를 나타내는 비등방성 비율(anisotropy ratio) r 값은 다음 식 (2)를 이용하여 구하였다.

$$r = (I_{VV} - I_{HV})/(I_{VV} + 2I_{HV}) \quad (2)$$

여기서 $I_{VV}$는 가진(excitation) 방향에 평행한 방향으로 편광판(polarizer)을 통과하여 검출된 빛의 형광 강도(fluorescence intensities)이며, $I_{HV}$는 수직인 방향으로 통과하여 검출된 빛의 형광 강도를 나타낸다[17,18].

2.2.5. EF-TEM을 이용한 리포좀 관찰

EF-TEM (LIBRA 120, Carl Zeiss, Germany)을 사용하여 다양한 조건에서 제조된 리포좀의 크기 및 형태를 관찰하였다. 이를 위하여 리포좀 시료와 2% uranyl acetate ($UO_2(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$) 수용액을 같은 부피만큼 혼합한 용액 1방울을 400 mesh copper specimen grid (Ted Pella, Inc, Redding, CA, USA)에 적하한 다음 완전히 마를 때까지 건조한 후 관찰하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 레시틴 시스템에서의 리포좀 특성

리포좀 크기는 제약, 화장품, 섬유, 농약, 식품 산업 등 리포좀 적용 관련 산업 분야에서 고려해야 할 중요한 인자 중의 하나이다[18]. 특히 약물이나 백신의 전달체 및 화장품 산업에서의 활성 성분 담지를 위한 부형제로 적용될 때 가장 적당한 크기는 약 100 nm인 것으로 알려져 있다[18-20]. 본 연구에서는 S100, S100-3, S75, S75-3 등의 4가지 종류의 레시틴을 사용하여 리포좀을 제조한 후 리포좀 종류에 따른 생성된 리포좀의 평균 입자 크기 및 분포도와 제타 전위 값을 측정하였다. 이를 위하여 레시틴 농도는 0.25~1.0 wt%, 초음파 처리 시간은 2~20 min 등으로 각각 변화시키면서 리포좀 평균 입자 크기 및 분포도와 제타 전위 값을 측정하였다. 또한 장기 안정성을 측정하기 위하여 리포좀 제조 후 60일 동안 일정한 시간 간격으로 리포좀 평균 입자 크기 및 분포도와 제타 전위 값을 측정하였다. 특히 본 연구에서는 60일 동안 안정한 상태를 유지하는 80~90 nm 크기의 리포좀을 제조할 수 있는 레시틴 종류, 농도 및 초음파 처리 시간 등의 최적 조건을 확립하고자 하였다.

Tables 1-4에 나타낸 결과에서 볼 수 있듯이 모든 레시틴 시스템에서 초음파 처리 시간을 증가시킴에 따라 리포좀 크기는 감소하였는데, 이는 첨가하는 에너지를 증가시킴에 따라 생성되는 리포좀의 표면적이 증가하기 때문이다. 예를 들어, 0.5 wt% S75-3 레시틴 시스템에서

**Table 2. Characteristics of Liposomes Prepared with Lecithin S100-3**

| Concentration (wt%) | Sonication Time (min) | Initial | | |
|---|---|---|---|---|
| | | Particle Size (nm) | PDI | Zeta Potential (mV) |
| 0.25 | 2 | 4484.8 ± 1076.2 | 0.354 | -18.97 ± 0.58 |
| | 3 | 3612.6 ± 293.7 | 0.349 | -11.07 ± 1.62 |
| | 5 | 1754.8 ± 110.5 | 0.353 | -18.65 ± 1.79 |
| | 10 | 231.3 ± 14.2 | 0.388 | -10.70 ± 1.72 |
| | 15 | 112.1 ± 2.1 | 0.293 | -6.14 ± 0.11 |
| | 20 | 90.6 ± 1.3 | 0.255 | -8.71 ± 1.07 |
| 0.5 | 2 | 2907.4 ± 37.5 | 0.355 | -16.69 ± 0.00 |
| | 3 | 2760.1 ± 777.6 | 0.342 | -18.14 ± 0.52 |
| | 5 | 1393.2 ± 25.5 | 0.527 | -11.85 ± 0.53 |
| | 10 | 140.7 ± 4.0 | 0.362 | -12.39 ± 1.80 |
| | 15 | 94.5 ± 4.2 | 0.265 | -7.97 ± 0.66 |
| | 20 | 81.3 ± 1.5 | 0.262 | -7.09 ± 1.54 |
| 1 | 2 | 1419.3 ± 110.5 | 0.409 | -17.75 ± 0.74 |
| | 3 | 438.9 ± 64.8 | 0.089 | -13.93 ± 0.03 |
| | 5 | 317.0 ± 5.6 | 0.193 | -14.15 ± 0.32 |
| | 10 | 112.0 ± 3.7 | 0.301 | -10.21 ± 0.13 |
| | 15 | 85.3 ± 4.8 | 0.264 | -10.82 ± 1.01 |
| | 20 | 72.1 ± 3.0 | 0.238 | -6.97 ± 0.30 |

**Table 3. Characteristics of Liposomes Prepared with Lecithin S75**

| Concentration (wt%) | Sonication Time (min) | Initial | | |
|---|---|---|---|---|
| | | Particle Size (nm) | PDI | Zeta Potential (mV) |
| 0.25 | 2 | 140.1 ± 1.3 | 0.199 | -54.15 ± 2.13 |
| | 3 | 127.0 ± 3.5 | 0.187 | -50.22 ± 4.43 |
| | 5 | 113.8 ± 0.8 | 0.201 | -70.11 ± 4.74 |
| | 10 | 93.2 ± 1.8 | 0.242 | -67.32 ± 0.95 |
| | 15 | 77.4 ± 3.5 | 0.251 | -30.56 ± 0.46 |
| | 20 | 81.1 ± 1.0 | 0.246 | -23.39 ± 1.37 |
| 0.5 | 2 | 152.3 ± 0.9 | 0.209 | -46.33 ± 1.87 |
| | 3 | 136.7 ± 2.4 | 0.196 | -51.66 ± 1.27 |
| | 5 | 115.7 ± 1.6 | 0.184 | -51.67 ± 0.77 |
| | 10 | 91.1 ± 0.7 | 0.210 | -53.05 ± 3.39 |
| | 15 | 81.4 ± 0.1 | 0.220 | -16.69 ± 5.08 |
| | 20 | 78.6 ± 2.3 | 0.238 | -26.60 ± 1.76 |
| 1 | 2 | 161.2 ± 6.2 | 0.187 | -42.84 ± 2.60 |
| | 3 | 141.1 ± 5.0 | 0.203 | -52.42 ± 1.45 |
| | 5 | 122.5 ± 2.1 | 0.210 | -53.51 ± 2.16 |
| | 10 | 96.3 ± 2.1 | 0.202 | -51.83 ± 2.06 |
| | 15 | 83.3 ± 1.7 | 0.223 | -59.95 ± 3.49 |
| | 20 | 79.4 ± 1.4 | 0.216 | -58.35 ± 5.99 |

초음파 처리 시간을 2 min에서 20 min로 증가시킴에 따라 리포좀 크기는 218.8 ± 0.4 nm에서 78.0 ± 2.2 nm로 감소하였다. 또한 1.0 wt% 레시틴 농도 조건에서 초음파 처리 시간을 15 min 이하를 사용하면 모든 레시틴 시스템에서 90 nm보다 큰 크기의 리포좀이 생성되었다. 예를 들어, 각각 1.0 wt%의 S100, S100-3, S75, S75-3 레시틴 시스템에서 초음파 처리 시간을 10 min 사용한 경우, 제조된 리포좀 크기는 각각 130.9 ± 1.3 nm, 112.0.0 ± 3.7 nm, 96.3 ± 2.1 nm, 101.0 ± 2.1 nm로 나타났다. 따라서 80~90 nm 크기의 리포좀을 제조할 수 있는

**Table 4. Characteristics of Liposomes Prepared with Lecithin S75-3**

| Concentration (wt%) | Sonication Time (min) | Initial | | | After Two Months | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Particle Size(nm) | PDI | Zeta Potential (mV) | Particle Size(nm) | PDI | Zeta Potential (mV) |
| 0.25 | 2 | 200.9 ± 0.7 | 0.210 | -41.44 ± 1.51 | 202.3 ± 4.2 | 0.195 | -55.47 ± 1.94 |
| | 3 | 179.6 ± 0.3 | 0.200 | -46.60 ± 1.07 | 182.3 ± 6.9 | 0.184 | -55.93 ± 0.11 |
| | 5 | 165.1 ± 2.3 | 0.186 | -50.89 ± 0.79 | 166.4 ± 2.1 | 0.186 | -54.05 ± 0.83 |
| | 10 | 98.0 ± 0.8 | 0.223 | -49.43 ± 1.21 | 104.6 ± 6.2 | 0.286 | -47.59 ± 0.78 |
| | 15 | 83.8 ± 1.8 | 0.219 | -55.76 ± 3.93 | 86.5 ± 3.7 | 0.220 | -50.74 ± 1.94 |
| | 20 | 78.4 ± 0.9 | 0.230 | -58.82 ± 3.30 | 75.9 ± 0.3 | 0.236 | -49.85 ± 0.95 |
| 0.5 | 2 | 218.8 ± 0.4 | 0.222 | -40.74 ± 1.12 | 224.5 ± 3.3 | 0.311 | -48.04 ± 0.35 |
| | 3 | 192.4 ± 2.4 | 0.208 | -44.54 ± 0.88 | 206.7 ± 4.0 | 0.242 | -46.55 ± 2.06 |
| | 5 | 170.4 ± 1.1 | 0.198 | -44.94 ± 0.87 | 175.2 ± 18.3 | 0.273 | -47.79 ± 0.44 |
| | 10 | 96.8 ± 0.4 | 0.223 | -52.68 ± 0.51 | 100.3 ± 2.6 | 0.227 | -51.06 ± 1.80 |
| | 15 | 84.6 ± 0.6 | 0.213 | -50.21 ± 0.56 | 87.4 ± 2.4 | 0.251 | -46.39 ± 1.30 |
| | 20 | 78.0 ± 2.2 | 0.216 | -56.22 ± 0.04 | 78.0 ± 0.9 | 0.203 | -51.56 ± 0.83 |
| 1 | 2 | 208.8 ± 5.1 | 0.227 | -46.53 ± 2.33 | 211.1 ± 5.0 | 0.246 | -48.66 ± 1.29 |
| | 3 | 186.4 ± 6.0 | 0.225 | -49.69 ± 0.74 | 182.3 ± 2.3 | 0.244 | -51.53 ± 0.87 |
| | 5 | 169.8 ± 4.0 | 0.218 | -50.25 ± 1.53 | 168.9 ± 5.4 | 0.235 | -51.68 ± 0.52 |
| | 10 | 101.0 ± 2.1 | 0.227 | -53.73 ± 0.57 | 103.4 ± 3.8 | 0.244 | -50.76 ± 0.92 |
| | 15 | 88.2 ± 1.8 | 0.221 | -59.34 ± 0.53 | 92.9 ± 3.3 | 0.233 | -48.64 ± 4.14 |
| | 20 | 81.0 ± 0.6 | 0.221 | -46.77 ± 4.86 | 81.5 ± 1.0 | 0.231 | -43.68 ± 4.23 |

최적의 초음파 처리 시간을 15 min로 결정하였다.

레시틴 농도 증가에 따라 일반적으로 리포좀 크기는 증가하나 그 영향은 초음파 처리 시간과 비교하여 덜 현저함을 알 수 있었다. 예를 들면, 초음파 처리 시간을 15 min 사용한 S75-3 레시틴 시스템에서 레시틴 농도가 0.25 wt%에서 0.5 wt%로 증가함에 따라 리포좀 크기는 83.8 ± 1.8 nm에서 88.2 ± 1.8 nm로 약간 증가하였다. 또한 레시틴 농도와 초음파 처리 시간을 0.5 wt%와 15 min로 동일하게 한 조건 하에서 S100, S100-3, S75, S75-3을 각각 사용하여 제조한 리포좀 크기는 각각 114.1 ± 5.3 nm, 94.5 ± 4.2 nm, 81.4 ± 0.1 nm, 84.6 ± 0.6 nm로 나타났다. 특히, S75-3 시스템에서 레시틴 농도가 각각 0.25, 0.5, 1.0 wt%인 조건에서 리포좀 크기는 각각 83.8 ± 1.8 nm, 84.6 ± 0.6 nm, 88.2 ± 1.8 nm로서 레시틴 농도에 따라 크게 영향을 받지 않았다.

초음파 처리 시간을 15 min로 고정한 상태에서 S100, S100-3, S75, S75-3의 레시틴 농도를 0.25 wt%에서 1.0 wt%로 각각 변화시키면서 제조한 리포좀의 제타 전위를 측정한 결과를 Tables 1-4에 나타내었다. 결과에서 볼 수 있듯이 S100과 S100-3 레시틴을 사용하여 각각 제조한 리포좀의 제타 전위 값은 -2 mV에서 -11 mV의 범위에 있으며, 반면에 S75과 S75-3 레시틴을 사용하여 각각 제조한 리포좀의 제타 전위 값은 -12 mV에서 -60 mV의 범위에 있음을 알 수 있다. Table 4에서 볼 수 있듯이 0.5 wt%의 S75-3 레시틴 시스템의 초기 리포좀 크기 및 제타 전위 값은 각각 84.6 ± 0.6 nm (PDI; 0.213)과 -50.21 ± 0.56 mV이며, 60일이 경과한 후 관찰한 리포좀의 크기 및 제타 전위 값은 각각 87.4 ± 2.4 nm (PDI; 0.251)와 -46.39 ± 1.30 mV임을 알 수 있다. 이러한 결과는 0.5 wt%의 S75-3 레시틴 시스템이 60일 동안 오스트발트 라이프닝(Ostwald ripening), 응집(flocculation), 크리밍(creaming), 합일(coalescence) 등에 견딜 수 있는 안정한 상태를 유지하는 80~90 nm 크기의 리포좀을 제조할 수 있음을 의미한다. 따라서 본 연구에서는 60일 동안 안정한 상태를 유지하는 80~90 nm 크기의 리포좀을 제조할 수 있는 최적 조건으로 초음파 처리 시간 15 min, 0.5 wt%의 S75-3 레시틴 시스템을 결정하여 지방산 첨가 실험에 사용하였다.

### 3.2. 리포좀-지방산 시스템에서의 리포좀 특성

지방산 첨가가 리포좀 크기와 제타 전위 값에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 SA, OA, LA 등의 지방산을 0.5 wt%의 S75-3 레시틴 시스템에 첨가한 후 15 min 동안 초음파를 적용하여 리포좀을 제조하였다. Tables 5-7에 나타낸 결과에서 볼 수 있듯이 SA, OA, LA 등의 지방산 첨가는 동일한 경향을 나타내었다. 즉, 지방산 첨가에 따라 리포좀의 크기는 감소하여 최소 크기를 갖다가 이후 추가적인 지방산 첨가에 따라 리포좀 크기는 증가하였다. 예를 들면, SA 첨가에 따라 리포좀 크기는 감소하다가 SA와 레시틴의 몰 비율이 0.70인 조건에서 최소 크기를 가지며, 이후 추가로 SA를 첨가함에 따라 리포좀 크기는 증가하였다. 또한 Tables 5-7에서 알 수 있듯이 SA, OA 및 LA 지방산 시스템에서의 최소 리포좀 크기는 레시틴 대비 지방산의 몰 비율이 각각 0.70, 0.50, 0.25인 조건에서 관찰되었다. 이러한 경향은 달걀노른자로부터 추출한 포스파티딜콜린(egg phosphatidylcholine, EPC)을 이용하여 제조한 리포좀에 음이온 계면활성제 sodium dodecylbenzenesulphonate (SDBS)를 첨가한 경우에도 나타나는 것으로 발표되었다[21]. 즉, EPC에 SDBS를 첨가함에 따라 리포좀의 수력학적 지름(hydrodynamic diameter)은 감소하여 SDBS/EPC 몰 비가 0.18인 조건에서 최소 크기를 가지며, SDBS/EPC 몰 비가 0.18 이상 SDBS를 첨가하면 리포좀 크기는 증가하는 것으로 밝혀졌다[21]. 한편, EPC 리포좀 시스템에 비이온 계면활성제 Triton X-100을 첨가하는 경우에는 계면활성제 첨가에 따라 리포좀 크기는 증가하는 것으로 발표되었다[21]. 이는 소수성(hydrophobic) 꼬리(tail)보다 친수성(hydrophilic) 머

**Table 5. Effect of Stearic Acid on Particle Size and Zeta Potential of Liposomes Prepared with 0.5 wt% of Lecithin S75-3**

| Stearic Acid / Lecithin (Molar Ratio) | Particle Size (nm) | Polydispersity | Zeta Potential (mV) |
|---|---|---|---|
| 0 | 104.7 ± 0.6 | 0.209 | -49.69 ± 2.03 |
| 0.10 | 99.9 ± 1.9 | 0.223 | -55.52 ± 3.70 |
| 0.25 | 98.9 ± 2.3 | 0.230 | -62.33 ± 2.40 |
| 0.50 | 98.5 ± 0.2 | 0.201 | -64.98 ± 0.62 |
| 0.70 | 97.5 ± 0.6 | 0.210 | -71.76 ± 6.24 |
| 1.00 | 110.3 ± 0.4 | 0.199 | -64.53 ± 1.41 |
| 1.25 | 112.9 ± 0.6 | 0.201 | -64.26 ± 4.40 |

**Table 6. Effect of Oleic Acid on Particle Size and Zeta Potential of Liposomes Prepared with 0.5 wt% of Lecithin S75-3**

| Oleic Acid / Lecithin (Molar Ratio) | Particle Size (nm) | Polydispersity | Zeta Potential (mV) |
|---|---|---|---|
| 0 | 104.7 ± 0.6 | 0.209 | -49.69 ± 2.03 |
| 0.10 | 101.7 ± 1.2 | 0.222 | -52.41 ± 0.57 |
| 0.25 | 100.2 ± 0.1 | 0.182 | -55.04 ± 0.55 |
| 0.50 | 95.6 ± 1.3 | 0.201 | -55.73 ± 1.05 |
| 0.70 | 98.0 ± 1.3 | 0.193 | -53.00 ± 0.42 |
| 1.00 | 131.2 ± 0.7 | 0.215 | -51.19 ± 0.45 |
| 1.25 | 153.4 ± 0.8 | 0.253 | -50.94 ± 0.57 |

**Table 7. Effect of Linoleic Acid on Particle Size and Zeta Potential of Liposomes Prepared with 0.5 wt% of Lecithin S75-3**

| Linoleic Acid / Lecithin (Molar Ratio) | Particle Size (nm) | Polydispersity | Zeta Potential (mV) |
|---|---|---|---|
| 0 | 104.7 ± 0.6 | 0.209 | -49.69 ± 2.03 |
| 0.10 | 97.6 ± 0.1 | 0.197 | -57.07 ± 2.03 |
| 0.25 | 91.8 ± 0.1 | 0.217 | -59.71 ± 0.81 |
| 0.50 | 97.3 ± 0.6 | 0.217 | -54.77 ± 1.60 |
| 0.70 | 107.2 ± 0.1 | 0.164 | -50.97 ± 1.42 |
| 1.00 | 156.5 ± 0.3 | 0.164 | -50.04 ± 0.45 |
| 1.25 | 168.1 ± 0.1 | 0.197 | -46.72 ± 0.49 |

리(head) 부분의 표면적이 큰 비이온 계면활성제가 베시클 이중층에 혼입됨에 따라 리포좀의 표면적이 증가하기 때문이다.

지방산 첨가에 따른 리포좀 입자 크기 측정 결과는 지방산 분자가 리포좀 베시클 내로 침투(penetration)하여 리포좀 막의 패킹을 변화시킨다는 것을 의미한다. 소량의 지방산이 리포좀 막에 첨가되는 경우, 벌크(bulk) 용액으로부터 리포좀 막으로의 혼입은 주로 소수성 꼬리 사이의 소수성 상호 작용(hydrophobic interaction)에 의해 일어나며, 이는 리포좀 막의 패킹을 보다 치밀하게 만들어 리포좀의 크기를 감소시킨다. 한편 과량의 지방산이 리포좀 막에 첨가되는 경우, 친수성 머리 사이의 전기적 반발 에너지(electrostatic repulsive energy)가 소수성 꼬리 사이의 소수성 상호 에너지(hydrophobic interaction energy)보다 우세하게 작용하여 리포좀 크기는 증가하게 된다. 따라서 리포좀의 크기 및 패킹 밀도(packing density)는 친수성 머리 부분 사이의 전기적 반발력과 소수성 꼬리 사이에 작용하는 반 데르 발스(van der Waals) 인력의 상대적인 크기에 의해 주로 결정된다. 여기서 리포좀의 표면적이 감소함에 따라 친수성 머리 부분의 전기적 반발 에너지는 증가하고 반면에 소수성 꼬리 부분의 반 데르 발스 인력은 감소한다.

SA, OA 및 LA 지방산 시스템에서 레시틴 대비 지방산의 몰 비율이 각각 0.70, 0.50, 0.25인 조건에서 최소 리포좀 크기가 관찰된 결과는 이전에 수행된 연구 결과와 일치하였다[22-24]. 예를 들면, 시차 주사 열량계법을 사용한 상거동(phase behavior) 연구 결과에 의하면 디팔미토일포스파티딜콜린(dipalmitoylphosphatidylcholine, DPPC) 시스템에 지방산을 첨가함에 따라 베시클 이중층의 겔-액정 상전이 온도는 증가하며, 겔상 이중층의 패킹이 보다 치밀해짐이 발표되었다[23]. 또한 트랜스형(*trans*) 지방산은 시스형(*cis*) 이중 결합을 갖는 지방산에 비하여 포화된 지방산 특성과 유사하며[23-26], 시스형 이중 결합을 갖는 OA 및 LA와 같은 지방산 첨가는 리포좀 막의 섭동(perturbation)을 유도하여 리포좀에서의 지질 분자 패킹 밀도 증가 효과는 포화 지방산과 비교하여 상대적으로 감소한다[27]. 따라서 동일한 지방산을 리포좀 시스템에 첨가할 경우, OA 및 LA에 비하여 SA 첨가가 보다 치밀한 패킹을 갖는 리포좀 막을 형성하게 된다. 이러한 결과는 SA/DPPC 및 OA/DPPC 시스템에서 겔상으로부터 액정 상으로의 최대 전이 온도가 지방산/DPPC 몰 비율이 각각 0.67과 0.50인 조건에서 관찰된 것과 잘 일치함을 알 수 있다[23].

Tables 5-7에 나타낸 결과에서 볼 수 있듯이 지방산 첨가에 따른 제타 전위 측정 결과는 리포좀 입자 크기 측정 결과와 정반대 경향을

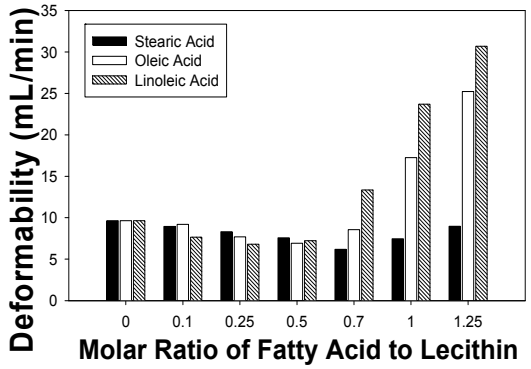



**Figure 1. Effect of fatty acid on deformability of liposomal membranes prepared with 0.5 wt% of lecithin S75-3.**

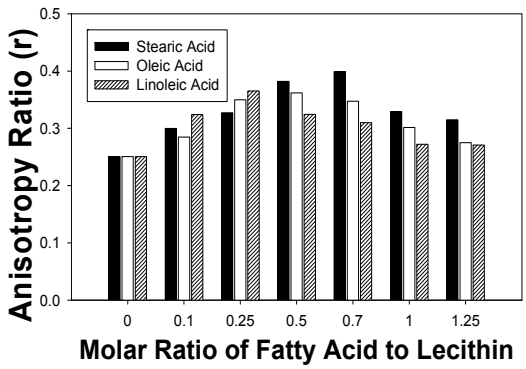



**Figure 2. Effect of fatty acid on fluorescence anisotropy ratio of liposomes prepared with 0.5 wt% of lecithin S75-3.**

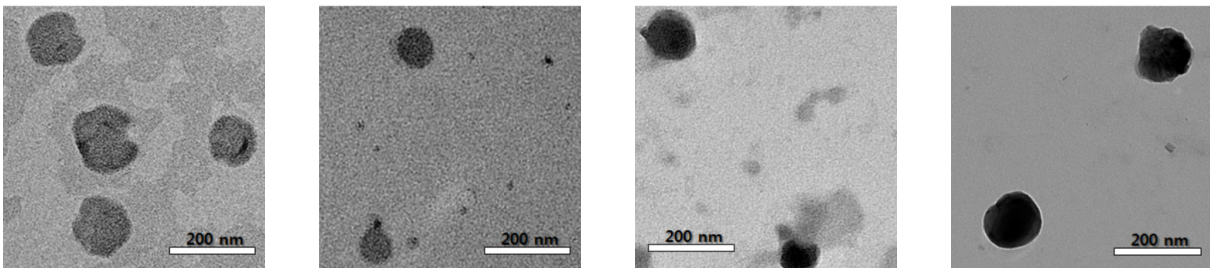
나타내었다. 즉, 지방산 첨가에 따라 리포좀의 제타 전위 값은 증가하여 최대값을 나타낸 후 이후 지방산을 추가로 첨가함에 따라 감소하였다. 예를 들면, SA 첨가에 따라 제타 전위 값은 증가하다가 SA와 레시틴의 몰 비율이 0.70인 조건에서 최대값을 가지며, 이후 추가로 SA를 첨가함에 따라 감소하였다. Tables 5-7에서 알 수 있듯이 SA, OA 및 LA 지방산 시스템에서의 최대 제타 전위 값은 레시틴 대비 지방산의 몰 비율이 각각 0.70, 0.50, 0.25인 조건에서 관찰되었으며, 이는 SA, OA 및 LA 지방산 시스템에서의 최소 리포좀 크기가 관찰된 조건과 동일함을 알 수 있다. 또한 Tables 5-7의 결과에서 볼 수 있듯이 과량의 지방산을 첨가한 경우, 음의 값을 갖는 제타 전위 절대값이 감소함을 알 수 있다. 예를 들어, SA/레시틴 몰 비가 0.70에서 1.00로 증가함에 따라 리포좀의 제타 전위 값은 -71.76 ± 6.24 mV에서 -64.53 ± 1.41 mV로 감소하였다. 이러한 결과는 TEM 측정 결과에서 나중에 서술하는 바와 같이, 리포좀에서 다형(polymorphic) 구조를 가지는 지질 입자 응집체로의 전이에 의한 것이다.

유리 지방산의 pKa 값은 5 근처이므로 중성 pH 조건에서 유리 지방산의 카르복실기는 $H^+$를 방출하여 음전하를 띠게 된다[18]. 따라서 음전하를 가진 지방산 분자가 리포좀 막에 유입됨에 따라 음전하의 제타 전위 절대값은 증가하게 되며, 이러한 경향은 포화 EPC와 콜레스테롤(cholesterol)을 사용하여 제조한 리포좀 시스템에 라우르산(lauric acid)을 첨가한 다른 연구에서도 밝혀진 바 있으며[18], 리포좀 시스템에 음이온 계면활성제 SDBS를 첨가한 경우에도 리포좀의 제타 전위가 증가한다는 것이 발표되었다[21]. 한편, 양전하를 띤 양이온성 계면활성제의 첨가는 리포좀 표면 전하 중화(surface charge neutralization)에 의해 제타 전위 값을 감소시키며, 과량의 양이온 계면활성제를 첨가하는 경우에는 전하 역전(charge reversal) 현상에 의해 제타 전위 값이 음에서 양으로 반전되면서 다시 증가하게 된다.

지방산 첨가가 리포좀 막의 유동성에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 SA, OA, LA 등의 지방산을 0.5 wt%의 S75-3 레시틴 시스템에 첨가한 후 15 min 동안 초음파를 적용하여 리포좀을 제조한 후 extrusion법을 이용하여 deformability *D*를 측정하였다. Figure 1에 나타낸 결과에서 볼 수 있듯이 SA, OA, LA 등의 지방산 첨가에 따른 deformability 측정 결과는 동일한 경향을 나타내었다. 즉, 지방산 첨가에 따라 deformability는 감소하여 최소값을 갖고 이후 추가적인 지방산 첨가에 따라 deformability는 증가하였다. 예를 들면, SA 첨가에 따라 deformability는 감소하다가 SA와 레시틴의 몰 비율이 0.70인 조건에서 최소값을 가지며, 이후 추가로 SA를 첨가함에 따라 deformability는 증가하였다. 또한 Figure 1에서 알 수 있듯이 SA, OA 및 LA 지방산 시스템에서의 최소 deformability는 레시틴 대비 지방산의 몰 비율이 각각 0.70, 0.50, 0.25인 조건에서 관찰되었다.

이러한 결과는 앞서 서술한 SA, OA 및 LA 지방산 시스템에서의 최소 리포좀 크기가 레시틴 대비 지방산의 몰 비율이 각각 0.70, 0.50, 0.25인 조건에서 관찰된 것과 일치하는 경향이다. 즉, 지방산 첨가에 따라 리포좀 막의 패킹은 보다 치밀하게 되어 리포좀의 deformability는 감소하다가 SA, OA와 LA는 레시틴 대비 지방산의 몰 비율이 각각 0.70, 0.50, 0.25 되는 조건에서 최소값을 갖는데, 지방산을 첨가할수록 리포좀의 패킹 밀도가 증가하여 보다 rigid한 리포좀 막을 형성하기 때문이다. 이러한 지방산 첨가에 따른 리포좀 막의 rigidity 증가는 지방산의 카르복실기와 레시틴의 포스포릴(phosphoryl) 산소 사이의 수소결합에 기인한다고 알려져 있다[5]. 또한 리포좀 막의 deformability가 최소값을 갖는 조건 이후의 추가적인 지방산 첨가는 리포좀 구조로부터 다형체의 구조나 고체 지질 나노입자(solid lipid nanoparticle, SLN)과 같은 다른 형태의 회합체를 유발하며, OA와 LA 지방산은 시스 형태의 이중 결합으로 인한 비등방성(anisotropic) 구조에 기인하여 deformability가 SA보다 상대적으로 크게 증가한다. 또한 LA 지방산 시스템이 OA 지방산과 비교하여 레시틴 대비 지방산의 몰 비율이 더 낮은 조건에서 리포좀 막의 유동도가 가장 작은 결과를 나타낸 것은 OA가 시스 형태의 이중 결합을 1개 갖고 있는 것에 반하여 LA는 시스 형태의 이중 결합을 2개 갖고 있기 때문으로 생각되며, 이러한 경향은 이전의 결과와 잘 일치함을 알 수 있다[27].

지방산 첨가가 리포좀 이중층 내에서의 소수기 알킬 사슬의 배열에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 DPH를 소수성 프로브로 사용하여 비등방성 비율(anisotropy ratio) r 값을 측정하였다. Fluorescence anisotropy 측정은 사슬의 배열에 관한 정보 뿐 아니라 리포좀 막 내부의 유동도에 관한 정보를 제공하는데 이는 비등방성 비율 r 값이 사슬의 움직임과 입체적 장애에 영향을 받기 때문이다. Figure 2에 나타낸 결과에서 볼 수 있듯이 SA, OA, LA 등의 지방산 첨가에 따른 비등방성 비율 r 측정 결과는 동일한 경향을 나타내었다. 즉, 지방산 첨가에 따라 r은 증가하여 최대값을 갖고 이후 추가적인 지방산 첨가에 따라 r은 감소하였다. 예를 들면, SA 첨가에 따라 r은 증가하다가 SA와 레시틴의 몰 비율이 0.70인 조건에서 최대값을 가지며, 이후 추가로 SA를 첨가함에 따라 r은 감소하였다. 또한 Figure 2에서 알 수 있듯이 SA, OA 및 LA 지방산 시스템에서의 비등방성 비율 r 최대값은 레시틴 대비 지방산의 몰 비율이 각각 0.70, 0.50, 0.25인 조건에서 관찰되었다. 이는 SA, OA 및 LA 지방산 시스템에서 레시틴 대비 지방산의 몰 비율이 각각 0.70, 0.50, 0.25인 조건에서 리포좀 막의 유동도가 가장 작다




(a) (b) (b) (d)

**Figure 3. Electron micrographs of liposome vesicles prepared with 0.5 wt% of lecithin S75-3 : (a) no fatty acid added, (b) when the molar ratio of stearic acid to lecithin is 0.7, (c) when the molar ratio of oleic acid to lecithin is 1.0, and (d) when the molar ratio of stearic acid to lecithin is 1.0.**

는 것을 의미하며. 이는 앞서 언급한 지방산 첨가에 따른 리포좀 크기 및 deformability 측정 결과와도 일치함을 알 수 있다.

EF-TEM을 사용하여 다양한 조건에서 제조된 리포좀의 크기 및 형태를 관찰하였으며, 일부 결과를 Figure 3에 나타내었다 Figure 3(a)는 레시틴만 사용하여 제조한 80~150 nm 크기의 리포좀이며, (b)는 지방산 첨가 시 최소 크기를 나타낸 조건에서의 리포좀을 나타낸 것이다. 반면에 Figure 3(c)와 (d)는 다형체 구조로 전이되거나 리포좀이 아닌 고체 지질 나노 입자(SLN)와 같은 130~140 nm 크기의 인지질 회합체를 나타낸 것이다. Figure 3의 결과로부터 지방산 첨가에 따라 인지질의 이중층 막의 곡률을 크게 하여 크기가 작아지나 과량의 지방산을 첨가하는 경우에는 리포좀의 형태가 아닌 다른 인지질 회합체로 전이를 유발하는 것을 알 수 있다.

## 4. 결 론

본 연구에서는 스테아르산(SA), 올레산(OA), 리놀레산(LA) 등의 지방산이 지질 소포체 막과의 상호 작용에 미치는 영향에 관하여 살펴보았다. 이를 위하여 지방산 종류 및 농도 변화에 따른 리포좀 평균 입자 크기 및 제타 전위, 리포좀 막의 deformability, fluorescence anisotropy ratio 등을 측정하고 TEM 관찰을 통하여 지방산 첨가가 리포좀 막의 유동성 변화에 미치는 역할에 관하여 살펴보았다. 기본적으로 SA, OA, LA 등의 지방산 첨가는 동일한 경향을 나타내었다. 즉, 지방산을 첨가함에 따라 리포좀이 보다 치밀한 패킹을 갖게 되어서 리포좀의 크기는 감소하고 제타 전위 값은 증가하였으나, 지방산의 과도한 첨가는 리포좀에서 다형(polymorphic) 구조를 가지는 지질 입자 응집체로 전이를 일으켰다. SA, OA 및 LA 지방산 시스템에서의 최소 리포좀 크기와 가장 치밀한 리포좀 패킹은 레시틴 대비 지방산의 몰 비율이 각각 0.70, 0.50, 0.25인 조건에서 관찰되었으며, 리포좀 막의 deformability와 fluorescence anisotropy ratio 측정에 의한 리포좀 막의 유동성 측정 결과는 TEM 및 입자 크기 측정 결과와 일치함을 알 수 있었다. 따라서 본 연구에서 사용한 지방산들은 리포좀 시스템의 구조에 상당한 변화를 일으킬 수 있으며, 이러한 결과들은 지방산과 생체막 사이의 상호 작용 원리를 이해하고 조절하는 용도로 활용될 수 있다.

## 감 사

이 논문은 2010년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(No. 2010-0021117).

## References

1. J. Marcelino, J. L. F. C. Lima, S. Reis, and C. Matos, Assessing the effects of surfactants on the physical properties of liposome membranes, *Chem. Phys. Lipids*, **146**, 94-103 (2007).
2. T. Inoue, K. Miyakawa, and R. Shimozawa, Interaction of surfactants with vesicle membrane of dipalmitoylphosphatidylcholine. Effect on gel-to-liquid-crystalline phase transition of lipid bilayer, *Chem. Phys. Lipids*, **42**, 261-270 (1986).
3. T. Inoue, T. Iwanaga, K. Fukushima, R. Shimozawa, and Y. Suezaki, Interaction of surfactants with bilayer of negatively charged lipid: Effect on gel-to-liquid crystalline phase transition of dilauroylphosphatidic acid vesicle membrane, *Chem. Phys. Lipids*, **48**, 189-196 (1988).
4. S. E. Schullery, T. A. Seder, D. A. Weinstein, and D. A. Bryant, Differential thermal analysis of dipalmitoylphosphatidylcholine-fatty acid mixtures, *Biochemistry*, **20**, 6818-6824 (1981).
5. S. Mabrey and J. M. Sturtevant, Investigation of phase transitions of lipids and lipid mixtures by sensitivity differential scanning calorimetry, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 3862-3866 (1976).
6. Z. Huang and R. M. Epand, Study of the phase behaviour of fully hydrated saturated diacyl phosphatidylserine/fatty acid mixtures with $^{31}$P-NMR and calorimetry, *Chem. Phys. Lipids*, **86**, 161-169 (1997).
7. S. P. Verma, D. F. H. Wallach, and D. Sakura, Raman analysis of the thermotropic behavior of lecithin-fatty acid systems and of their interaction with proteolipid apoprotein, *Biochemistry*, **19**, 574-579 (1980).
8. J. R. Usher, R. M. Epand, and D. Papahadjopoulos, The effect of free fatty acids on the thermotropic phase transition of dimyristoyl glycerophosphocholine, *Chem. Phys. Lipids*, **22**, 245-253 (1978).
9. J. M. Seddon, R. H. Templer, A. A. Warrender, Z. Huang, G. Cevc, and D. Marsh, Phosphatidylcholinefatty acid membranes: effects of headgroup hydration on the phase behaviour and structural parameters of the gel and inverse hexagonal ($H_{II}$) phases, *Biochim. Biophys. Acta* **1327**, 131-147 (1997).
10. Y. V. S. Rama Krishna, D. Marsh, Spin label ESR and $^{31}$P-NMR studies of the cubic and inverted hexagonal phases of dimyristoylphosphatidylcholine/myristic acid (1:2, mol/mol) mixtures, *Biochim. Biophys. Acta*, **1024**, 89-94 (1990).
11. P. Hoyrup, J. Davidsen, and K. Jrgensen, Lipid membrane partitioning of lysolipids and fatty acids: Effects of membrane phase structure and detergent chain length, *J. Phys. Chem. B*, **105**,

2649-2657 (2001).
12. D. Needham, G. Anyarambhatla, G. Kong, and M. W. Dewhirst, A new temperature-sensitive liposome for use with mild hyperthermia: Characterization and testing in a human tumor xenograft model, *Cancer Res*., **60**, 1197-1201 (2000).
13. E. Yilmaz and H. H. Borchert, Design of a phytosphingosine-containing, positively-charged nanoemulsion as a colloidal carrier system for dermal application of ceramides, *Eur. J. Pharm. Biopharm*., **60**, 91-98 (2005).
14. A. Garg and S. Singh, Enhancement in antifungal activity of eugenol in immunosuppressed rats through lipid nanocarriers, *Colloid Surf. B*, **87**, 280-288 (2011).
15. B. A. I. van den Bergh, P. W. Wertz, H. E. Junginer, and J. A. Bouwstra, Elasticity of vesicles assessed by electron spin resonance, electron microscopy and extrusion measurements, *Int. J. Pharm*., **217**, 13-24 (2001).
16. J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed., Springer, NewYork (2006).
17. S. H. Park, S. G. Oh, K. D. Suh. Han, D. J. Chung, J. Y. Mun, S. S. Han, and J. W. Kim, Control over micro-fluidity of liposomal membranes by hybridizing metal nanoparticles, *Colloids Surf. B*, **70**, 108-113 (2009).
18. D. Yang, D. Pornpattananangkul, T. Nakatsuji, M. Chan, D. Carson, C. M. Huang, and L. Zhang, The antimicrobial activity of liposomal lauric acids against *Propionibacterium acnes*, *Biomaterials*, **30**, 6035-6040 (2009).
19. C. K. Haluska, K. A. Riske, V. Marchi-Artzner, J. M. Lehn, R. Lipowsky, and R. Dimova, Time scales of membrane fusion revealed by direct imaging of vesicle fusion with high temporal resolution, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 15841-15486 (2006).
20. L. Zhang and S. Granick, How to stabilize phospholipid liposomes (using nanoparticles), *Nano Lett.*, **6**, 694-698 (2006).
21. J. Marcelino, J. L. F. C. Lima, S. Reis, and C. Matos, Assessing the effects of surfactants on the physical properties of liposome membranes, *Chem. Phys. Lipids*, **146**, 94-103 (2007).
22. Y. F. Hsieu, T. L. Chen, Y. T. Wang, J. H. Chang, and H. M. Chang, Properties of liposomes prepared with various lipids, *J. Food Sci.*, **67**, 2808-2813 (2001).
23. T. Inoue, S. I. Yanigihara, Y. Misono, and M. Suzuki, Effect of fatty acids on phase behavior of hydrated dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer: Saturated versus unsaturated fatty acids, *Chem. Phys. Lipids*, **109**, 117-133 (2001).
24. D. M. Small, Potpourri: Effects of unsaturation on lipid structure; plasma cholesterol ester and lipid-transfer proteins; and cholesterol-sensing proteins and cellular cholesterol movement, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **8**, 413-416 (1998).
25. K. Murzyn, T. Rog, G. Jezierski, Y. Takaoka, and M. Pasenkiewicz-Gierula, Effects of phospholipid unsaturation on the membrane/water interface: A molecular simulation study, *Biophys. J*., **81**, 170-183 (2001).
26. T. Rog, K. Murzyn, R. Gurbiel, Y. Takaoka, A. Kusumi, and M. Pasenkiewicz-Gierula, Effects of phospholipid unsaturation on the bilayer nonpolar region: A molecular simulation study, *J. Lipid Res*., **45**, 326-336 (2004).
27. C. Roach, S. E. Feller, J. A. Ward, and S. R. Shaikh, Comparison of *cis* and *trans* fatty acid containing phosphatidylcholines on membrane properties, *Biochemistry*, **43**, 6344-6351 (2004).