

연구노트

## 리포솜 이중층의 stigmasterol이 포집된 ascorbic acid의 안정성에 미치는 영향

이동욱<sup>1</sup> · 박혜원<sup>1</sup> · 이승철<sup>1,\*</sup>  
<sup>1</sup>경남대학교 바이오융합학부

### Effect of stigmasterol in liposome bilayer on the stabilization of encapsulated ascorbic acid

Dong-Uk Lee<sup>1</sup>, Hye-Won Park<sup>1</sup>, and Seung-Cheol Lee<sup>1,\*</sup>  
<sup>1</sup>School of Bioconvergence, Kyungnam University

**Abstract** The effect of stigmasterol (SS), a phytosterol, in the liposome bilayer on the stability of encapsulated ascorbic acid (ASA) was evaluated. Liposomes, consisting of phosphatidylcholine (PC) and SS, and ASA were encapsulated by the dehydration/rehydration method. The average particle size of the liposome increased with increasing SS content. SS significantly increased the stability of encapsulated ASA. For example, ASA remaining in the liposomes of 100:0, 90:10, and 70:30 (PC:SS, w/w) ratios was 34.12%, 49.88%, and 58.58%, respectively, after storage for 8 days at 4°C, while only 7.66% ASA remained in the buffer under the same conditions. These results indicated that SS in liposomes increased the stability of encapsulated ASA.

**Keywords:** liposome, ascorbic acid, stigmasterol, stability

## 서론

리포솜은 단일 또는 다중의 인지질 이중층으로 구성된 구형의 구조물을 지칭하며, 인위적 세포막으로 인식되어 막의 특성에 많이 이용되어왔다. 또한 리포솜의 표면에 표적 단백질을 붙여 원하는 조직(또는 세포)에 도달할 수 있어 의약품의 전달(drug delivery system)에 널리 응용되었다. 리포솜을 구성하는 인지질은 세포의 구성 성분으로 인체에 유해하지 않으며 다양한 첨가물로 특성을 조절할 수 있는 장점이 있다. 한편, 리포솜은 내부의 공간에 친수성 물질을, 인지질 이중층 사이에는 소수성 물질을 포집할 수 있어 화장품 산업과 식품 산업에도 활용되고 있다(Akbarzadeh 등, 2013; Daraee 등, 2016). 특히, 외부 영향에 민감한 유용 식품소재를 리포솜에 포집하면 안정성을 향상시킬 수 있다(Emami 등, 2016; Lee 등, 2002). 또한 리포솜을 구성하는 인지질에 콜레스테롤을 첨가하면 막이 안정화되어 포집된 물질의 안정성을 향상시킨다(Lee 등, 2005; Rhim 등, 1999). 그러나, 인체에서 과도한 콜레스테롤은 동맥경화를 유발하며 심근 경색, 뇌졸중 등의 각종 질환을 유발하는 나쁜 물질로 인식되어 그 사용에 한계가 있다(Kratz, 2005).

SS는 식물의 세포벽 물성과 구조 유지에 관여하는 식물성 스테롤(phytosterol)의 일종이며 영국과 유럽연합에서는 식품첨가물로 인정되어 있다. SS는 콜레스테롤과 스테로이드 고리 부분은

일치하지만 결사슬에서 차이를 보인다(Fig. 1). SS는 체내에서 LDL 콜레스테롤 함량을 낮추는 효과가 있으며 여성 호르몬인 프로게스테론과 비타민 D의 전구체로 알려져 있다(Cabral과 Klein, 2017). 한편, ASA는 비타민 C로 잘 알려진 필수영양소로서 인체에서 항산화와 콜라겐 합성 효소 보조인자 등의 여러 생리 기능을 하는 것으로 보고되었다(Arrigoni와 De Tulino, 2002). 그러나 ASA는 외부 환경요인에 민감하여 저장이나 가공 중에 산화되는 경우가 많다(Herbig와 Renard, 2017). ASA와 같은 항산화제는 식품과 화장품 산업에서 매우 중요한 소재이며 이를 안정하게 보호하기 위한 수단으로 리포솜이 추천되고 있다(Tran 등, 2019). 따라서 본 연구에서는 콜레스테롤과 비슷한 구조이지만 인체에 유익한 기능을 가진 SS를 리포솜 인지질층에 함유시켜 포집된 ASA의 안정성에 미치는 영향을 분석하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 시약

본 연구에 사용된 L-ASA, ascorbate oxidase (AAO), 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), egg yolk L- $\alpha$ -phosphatidyl choline (PC, 60% pure), phenazine methosulfate (PMS), SS는 Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, 그 이외의 다른 시약들은 분석용 특급을 사용하였다.

### 리포솜의 조제

ASA를 포집한 리포솜은 탈수/재수화 방법에 의하여 제조하였다(Kirby와 Gregoriadis, 1984; Lee 등, 1999). 즉, PC와 SS를 100:0, 90:10 및 70:30 (w/w)의 비율로 250 mg이 되도록 하여 50 mL 등근 플라스크에 넣은 후 10 mL의 chloroform:methanol (2:1,

\*Corresponding author: Seung-Cheol Lee, School of Bioconvergence, Kyungnam University, Changwon 51763, Korea  
Tel: +82-55-249-2684  
Fax: +82-505-999-2171  
E-mail: sclee@kyungnam.ac.kr  
Received February 27, 2020; revised March 30, 2020; accepted April 2, 2020

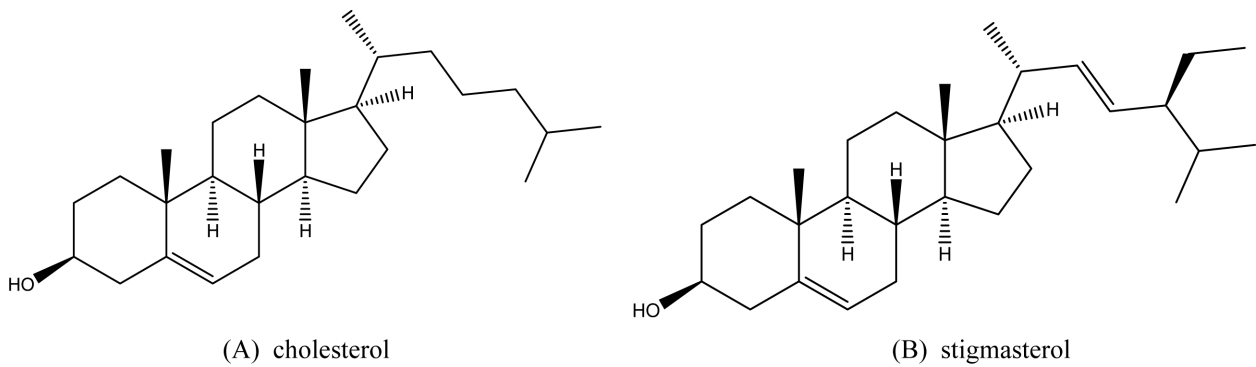


Fig. 1. Structure of (A) cholesterol and (B) stigmasterol.

v/v)을 가하여 잘 녹여 주었다. 이 용액을 30°C에서 회전 증발기를 이용하여 플라스크 벽면에 얇은 막을 형성시킨 후, 잔여 용매를 제거하기 위하여 질소가스를 5분 동안 불어넣었다. 이후, 20 mL의 증류수를 가하여 1.0 g의 유리 구슬과 함께 벽면에 묻어 있는 막이 완전히 용해될 때까지 회전증발기로 회전시켜 multilamellar vesicle (MLV)을 만들었다. 이 용액을 6,000 psi 압력에서 5 mL/min의 유속으로 French® Pressure Cell Press (FA-078, SLM Aminco, Urbana, IL, USA)에 2회 통과시킨 후, 20 mL의 ASA 용액(20 mM/H<sub>2</sub>O)을 첨가하여 동결건조 하였다. 이후 2 mL의 증류수를 가하여 수화시켜 탈수/재수화 vesicle 형태의 리포솜을 제조하였다. 리포솜의 내부에 포집되지 않은 ASA를 제거하기 위해 PCS buffer (0.134 M NaCl, 20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 mM citrate, pH 3.5) 18 mL를 가하여 희석한 후 4°C에서 12,000×g로 40 분간 원심 분리하여 침전물을 얻은 후, 다시 PCS buffer 20 mL를 가하여 같은 조건에서 원심 분리하여 침전물을 얻었다. 이 침전물을 PCS buffer에 분산시켜 시료로 이용하였다.

**리포솜의 크기 측정**

ASA가 포집된 리포솜 입자의 크기는 입도분석기(LS230, Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA)를 이용하여 측정하였다.

**ASA 포집 리포솜의 저장**

ASA 함유 리포솜의 ASA 농도가 1 mM이 되도록 희석하여 2 시간 동안 실온에 방치하여 산소가 충분히 포화되도록 하였다. 알루미늄 호일로 감싸 빛을 차단한 8 mL 유리병에 2 mL의 리포솜 용액을 주입한 후 뚜껑을 막아 4°C와 25°C에서 저장하였다. 저장기간은 총 30일로 하여 저장 0, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 30일 시기에 ASA를 측정하였다. 수용액에서의 ASA의 안정성은 동일한 방법으로 PCS buffer에 1 mM 농도로 녹여 저장실험을 하였다.

**ASA의 측정**

시료에 함유된 ASA의 환원된 형태만을 측정하기 위하여 AAO (EC 1.10.3.3)를 이용하여 Beutler의 방법(1984)에 따라 실시하였다. 이때 리포솜에 포집된 ASA를 노출시키기 위하여 Triton X-100 (0.03 g/mL)을 함유한 MTT/buffer (MTT, 7.5 mM; phosphate, 0.2 mM; citric acid, 0.2 M; EDTA, 2.0 mM, pH 3.5)을 처리하였다. ASA 분석은 3회 반복으로 이루어졌으며, 그 평균값을 그래프로 표시하고 오차 범위를 나타내었다.

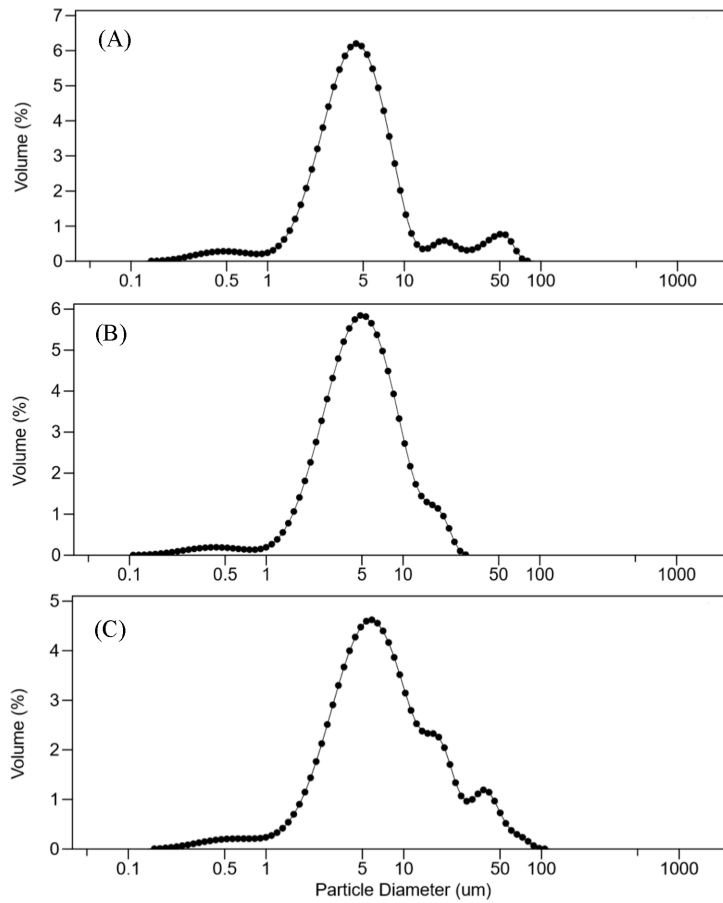
**결과 및 고찰**

**리포솜 크기**

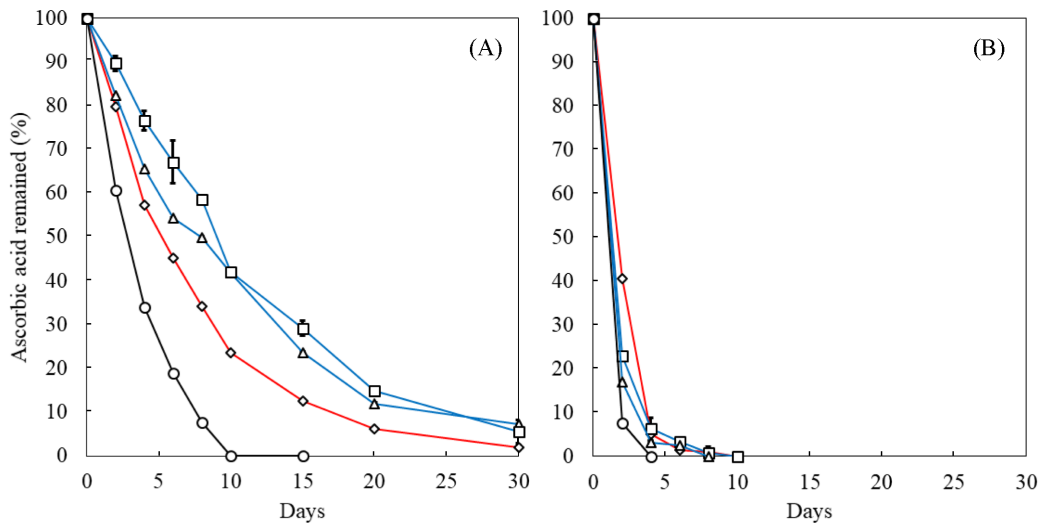
본 연구에서 제조한 리포솜의 크기를 레이저 회절 방식을 이용한 입도분석기로 측정하여 그 결과를 Fig. 2에 나타내었다. PC, PC:SS (90:10), PC:SS (90:10) 리포솜의 평균값(mean)은 각각 7.28, 6.00, 10.86 μm이었다. 편차가 큰 분포에서 집단의 대표값으로 더 적절히 사용되는 중간값(median)으로 확인하였을 때, PC 리포솜은 4.42 μm이며 전체의 75%가 6.65 μm 이내에 분포하였다. SS가 함유된 리포솜의 경우, PC:SS (90:10)의 중간값은 4.90 μm이며 전체의 75%가 7.50 μm 이내에 분포하였고, PC:SS (70:30)의 중간값은 6.58 μm이며 전체의 75%가 12.6 μm 이내에 분포하였다. 즉, SS 함량이 증가할수록 중간값이 증가하였고 그림에서 확인할 수 있듯이 전체적으로 분포도도 넓어진 양상을 보였다. Rhim 등(1999)과 Lee 등(2005)은 리포솜의 인지질 조성에서 콜레스테롤 함량이 증가할수록 크기가 증가하였다고 보고하였으며, Johnson(1973)은 인지질 조성의 10%의 콜레스테롤 함량은 리포솜 표면적을 30% 증가시킨다고 보고하였다. 인지질 이중층 내에서 콜레스테롤은 견고성과 정돈된 상태를 향상시키며 반데르발스 작용에 의해 지방산 사슬을 안정화시킨다(de Meyer와 Smit, 2009). SS은 콜레스테롤과 전체적으로 구조가 유사하며 단지 결사슬에서의 탄소수와 이중결합 유무에서만 차이가 난다. 따라서 SS은 인지질 이중층의 소수성 부분에서 콜레스테롤과 유사한 영향으로 리포솜의 크기를 증가시킨 것으로 유추된다.

**리포솜 내에 포집된 ASA의 안정성**

수용액 상에서 ASA의 안정성은 급속히 떨어진다. Fig. 3에 나타난 바와 같이 4°C에 존재할 때 ASA는 저장 8일째에 7.66%만이 잔존하였고, 10일째에 모두 산화되었다. 25°C에서는 더욱 급속히 산화되어 수용액에서 4일째에 이미 환원 형태의 ASA는 존재하지 않았다. 리포솜은 내부에 포집된 ASA의 안정성을 향상시켰다. 4°C에 저장한 경우, PC로만 구성된 리포솜에 포집된 ASA는 저장 8일째에 측정하였을 때 34.12%가 산화되지 않았으며, 저장 20일째에 6.23%가 잔존하였다. SS을 함유한 리포솜에 포집된 ASA의 안정성은 더욱 증가하였다. PC:SS (90:10)의 경우, 저장 8일째에 49.88%가 잔존하였고, 20일째에는 11.89%가 잔존하였다. PC:SS (70:30) 리포솜에서는 포집된 ASA의 안정성이 대체로 향상된 경향을 보였으며, 저장 20일째에 14.89%가 잔존하였다. 25°C



**Fig. 2.** Size distribution of ASA encapsulated liposome composed of (A) PC, (B) PC:SS (90:10, w/w), and (C) PC:SS (70:30, w/w). PC, phosphatidylcholine; SS, stigmasterol.



**Fig. 3.** Stability of ASA in PCS buffer (pH 3.5) during storage at (A) 4°C and (B) 25°C. (O) naked ASA. ASA encapsulated in liposome composed with (◇) PC; (△) PC:SS (90:10); and (□) PC:SS (70:30).

에 저장한 경우에는 저장 2일째에는 리포솜이 포집된 ASA의 안정성을 증가시켰으나, 이후 포집된 ASA도 급속히 산화되어 저장 4일 후에 모든 리포솜에서 5% 내외의 ASA만 잔존하였다.

이상의 결과에서 4°C에 저장하였을 때 리포솜은 포집된 ASA의 안정성을 크게 향상시켰고 리포솜을 구성하는 인지질에 SS를

첨가하면 더욱 ASA의 안정성이 증가하는 것을 확인하였다. Rhim 등(1999)은 리포솜의 콜레스테롤 함량이 증가할수록 포집된 ASA의 안정성이 향상된다고 보고하였으며, 이는 콜레스테롤이 막의 포화도를 증가시키고 이로 인해 내부물질의 유출을 억제하여 포집된 물질의 안정성 향상을 유도한다고 설명하였으며, Coderch

등(2000)도 콜레스테롤은 리포솜의 유동성을 감소시킨다고 보고 하였다. SS도 콜레스테롤과 구조가 같은 스테로이드 핵을 가지고 있으며 이는 막의 안정성에 크게 기여한 것으로 생각된다. 본 실험과 다소 차이는 있지만 pH 5.0, 4°C, 빛을 차단한 조건에서 콜레스테롤이 10% 함유되었을 때 포집된 ASA의 약 50% 내외가 잔존하였다(Rhim 등, 1999).

그러나 25°C에서는 리포솜이 ASA의 안정성에 크게 기여하지 못하였고 SS도 큰 역할을 하지 못함을 알 수 있었다. 인지질은 온도에 따라 비교적 단단한 구조인 gel state와 느슨한 구조의 liquid crystalline state의 상전이(phase transition)가 일어난다. 본 실험에 사용한 것과 같은 egg yolk PC의 상전이 온도는  $-5.8 \pm 6.5^\circ\text{C}$ 이며(Koynova와 Caffrey, 1998), 25°C에서는 느슨한 구조가 형성된다. 리포솜에 함유된 콜레스테롤은 PC의 상전이에 큰 영향을 주지 못하여 고온에서는 포집된 ASA의 안정성에 크게 기여하지 못하였다(Rhim 등, 1999). 본 연구에 사용한 SS도 콜레스테롤과 유사하게 PC의 상전이 온도보다 훨씬 높은 25°C에서는 포집된 ASA에 대하여 큰 보호 효과를 나타내지 못하였다.

## 요 약

SS는 식물성 스테롤로서 인체에 유익한 생리활성을 나타낸다. 리포솜 인지질을 PC와 SS로 구성하고, ASA를 탈수/재수화 방법에 의해 포집시킨 후, ASA의 안정성을 분석하였다. 리포솜의 평균 크기는 SS 함량이 증가할수록 증가하였으며, SS는 포집된 ASA의 안정성을 향상시켰다. 예를 들어, 완충용액에 존재하는 ASA는 4°C에서 8일간 저장하면 7.66%가 잔존하지만, 100:0, 90:10, 70:30 (PC/SS)로 조성된 리포솜에 포집된 ASA는 같은 조건에서 각각 34.12, 49.88, 58.58%가 잔존하였다. 이러한 결과는 리포솜에서 SS가 포집된 ASA의 안정성을 향상시킴을 의미한다.

## 감사의 글

본 연구는 한국연구재단 이공분야기초연구사업(NRF-2018 RID1A1B07041141)의 지원에 의해 수행되었습니다.

## References

Akbarzadeh A, Rezaei-Sadabady R, Davaran S, Joo SW, Zarghami N, Hanifehpour Y, Samiei M, Kouhi M, Nejati-Koshki K. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res.*

- Lett.* 8: 102 (2013)
- Arrigoni O, De Tullio MC. Ascorbic acid: much more than just an antioxidant, *Biochim. Biophys. Acta* 1569: 1-9 (2002)
- Beutler HO. L-ascorbate and L-dehydroascorbate. Vol. 1, pp. 376-385. In: *Methods in Enzymatic Analysis*. 3rd ed., Bergmeyer HV (ed). Verlag Chemie., Basel, Switzerland (1984)
- Cabral CE, Klein MR. Phytosterols in the treatment of hypercholesterolemia and prevention of cardiovascular diseases. *Arq. Bras. Cardiol.* 109: 475 - 482 (2017)
- Coderch L, Fonollosa J, De Pera M, Estelrich J, De La Maza A, Parra JL. Influence of cholesterol on liposome fluidity by EPR. Relationship with percutaneous absorption. *J. Control Release* 68: 85-95 (2000)
- Daraee H, Etemadi A, Kouhi M, Alimirzalu S, Akbarzadeh A. Application of liposomes in medicine and drug delivery. *Artif. Cell Nanomed. B.* 44: 381-391 (2016)
- de Meyer F, Smit B. Effect of cholesterol on the structure of a phospholipid bilayer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 106: 3654-3658 (2009)
- Emami S, Azadmard-Damirchi S, Peighambaroust SH, Valizadeh H, Hesari J. Liposomes as carrier vehicles for functional compounds in food sector. *J. Exp. Nanosci.* 11: 737-759 (2016)
- Herbig AL, Renard CMGC. Factors that impact the stability of vitamin C at intermediate temperature in a food matrix. *Food Chem.* 220: 444-451 (2017)
- Johnson SM. The effect of charge and cholesterol on the size and thickness of sonicated phospholipid vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 307: 27-41 (1973)
- Kirby CJ, Gregoriadis G. Dehydration-rehydration vesicles, a simple method for high yield drug entrapment in liposome. *Biotechnology* 2: 979-984 (1984)
- Koynova R, Caffrey M. Phases and phase transitions of the phosphatidylcholines. *Biochim. Biophys. Acta* 1376: 91-145 (1998)
- Kratz M. Dietary cholesterol, atherosclerosis and coronary heart disease. *Handb. Exp. Pharmacol.* 170: 195-213 (2005)
- Lee SC, Lee KE, Kim JJ, Lim SH. 2005. The effect of cholesterol in the liposome bilayer on the stabilization of incorporated retinol. *J. Liposome Res.* 15: 157-166 (2005)
- Lee SC, Yuk HG, Lee DH, Lee KE, Hwang YI, Ledescher RD. Stabilization of retinol through incorporation into liposome. *J. Biochem. Mol. Biol.* 35: 358-363 (2002)
- Lee YW, Hwang YI, Lee SC. Effect of liposome on the stabilization of ascorbic acid. *Korean J. Food Sci. Technol.* 31: 280-284 (1999)
- Rhim CH, Lee YW, Lee SC, Lee SC. Effect of cholesterol in liposome on the stabilization of encapsulated ascorbic acid. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* 42: 205-209 (1999)
- Tran VV, Moon JY, Lee YC. Liposomes for delivery of antioxidants in cosmeceuticals: Challenges and development strategies. *J. Control Release* 300: 114-140 (2019)