

인지질/세라마이드 혼합물의 상호적 자기회합 특성을 활용한 수화 액정형 베시클 제조

박민선 · 최정원 · 이설훈 · 진병석[†]

동덕여자대학교 화학 · 화장품학부
(2020년 8월 14일 접수, 2020년 9월 9일 수정, 2020년 9월 10일 채택)

Preparation of Hydrated Liquid Crystalline Vesicle Using Mutual Self-Association between Ceramide and Phospholipid

Min Seon Park, Jeong Won Choi, Seol-Hoon Lee, and Byung Suk Jin[†]

Division of chemistry and cosmetics, Dongduk Women's University, Seoul 02748, Korea
(Received August 14, 2020; Revised September 9, 2020; Accepted September 10, 2020)

초 록

인지질과 세라마이드 간 상호적 자기회합 특성을 활용하여 수화 액정형 베시클 제조를 시도하였다. 인지질과 세라마이드의 혼합지질에 에지 액티베이터를 첨가하면 난용성의 세라마이드를 고 함량으로 함유하는 베시클 제조가 가능하였다. 본 연구에서는 인지질, 세라마이드, 에지 액티베이터의 혼합 조성에 따른 수화 액정상의 구조적, 열적 특성 등의 변화를 관측하고, 혼합 조성을 달리하여 만든 베시클의 입자크기 및 베시클 분산액의 안정성을 비교하였다. 실험 결과, 인지질과 세라마이드 간 혼합에서 세라마이드 비율을 최대 70%까지 늘려서, 베시클 분산액 전체 대비 세라마이드를 3.5 wt% 함유되는 제형을 제조할 수 있었다.

Abstract

An attempt was made to prepare hydrated liquid crystalline vesicles by utilizing a mutual self-assembly between phospholipid and ceramide. When an edge activator was added to the mixture of phospholipid and ceramide, it was possible to prepare a vesicle containing a high content of poorly soluble ceramide. In this study, we investigated changes in structural and thermal behaviors of the hydrated liquid crystalline phase according to the mixed composition between phospholipid, ceramide, and sodium deoxycholate. Also, both the droplet size of the vesicles with different composition and stability of the vesicle dispersion solution were observed. From results of the experiments, by increasing the ratio of ceramide up to 70% in the mixture between phospholipid and ceramide, a formulation containing 3.5 wt% of ceramide in the vesicle dispersion solution could be obtained.

Keywords: Ceramide, Phospholipid, Sodium deoxycholate, Vesicle, Stability

1. 서 론

피부 표피의 최외각에 위치한 각질층은 각질세포와 각질세포 간 지질로 이루어져 있으며 세포 간 지질은 주로 세라마이드, 지방산, 콜레스테롤 및 중성지질 등으로 구성되어있다. 세포 간 지질 중에서 세라마이드는 40~60%의 비중을 차지하며 라멜라 구조를 형성하여 각질 세포 간의 공간을 지지함으로써 피부 장벽기능 및 피부 보습에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 피부 내에 세라마이드의 양이 감소하면 피부 장벽기능이 약화되면서 외부 자극에 노출되어 각질 세포의 박리현상, 아토피, 건선 등 여러 피부 질병이 나타나는 것으로

보고되고 있다[1-3]. 이러한 증상들은 피부 속에 세라마이드를 충분히 공급함으로써 증상을 개선할 수 있으나, 세라마이드는 물이나 오일에 용해가 어려운 난용성 물질로 일반적인 제형에 세라마이드를 충분한 양을 넣어 만들기가 어렵다.

세라마이드는 스펅고신(sphingosine)에 지방산이 연결된 구조의 스펅고지질(sphingolipid)로, 비극성 지방분자 간 작용하는 반데르발스 인력과 아미노카르보닐기(amido-carbonyl group), 하이드록시기(hydroxyl group)의 극성분자 간 수소결합이 작용한다[4,5]. 이러한 구조적 특이성으로 인해 제형에 세라마이드가 함유되면 세라마이드 결정화가 진행되면서 석출, 겔화(gelling) 등이 발생하여 제형의 안정성이 떨어진다. 따라서 세라마이드를 함유한 대부분의 제형에서 세라마이드는 1% 이하의 함량으로 사용되고 있다[6-8].

세라마이드 함량을 높이면 제형의 안정화를 해결하기 위한 시도로, 먼저 세라마이드를 포함한 고흡의 라멜라 과립이나 코어-셸(core-shell) 구조의 캡슐을 만들고 나서, 이를 제형에 분산시키는 방법이 적용되

[†] Corresponding Author: Dongduk Women's University,
Division of chemistry and cosmetics, Seoul 02748, Korea
Tel: +82-2-940-4513 e-mail: bsjin@dongduk.ac.kr

고 있다[9-11]. 그러나 이러한 방법들은 세라마이드가 고형의 과립이나 마이크로 크기의 캡슐에 내포되어 있기 때문에 세라마이드가 피부 각질층 내부로 침투가 어렵다. 따라서 세라마이드를 피부 내부에 효과적으로 전달하기 위해서 세라마이드를 나노 에멀전, 마이크로 에멀전, 나노파티클 등과 같은 작은 분산입자 형태로 제조하거나, 세라마이드를 리포솜에 포집시켜 침투시키는 등의 방법 등[12-15]이 적용되고 있지만, 이들 방법은 세라마이드 함량이 낮거나 제조 과정이 단순하지 않은 등의 한계를 지니고 있다.

이러한 문제 해결을 위해 본 연구에서는 인지질과 세라마이드 혼합 지질의 상호적 자가회합 특성을 활용하여 세라마이드를 고함량으로 함유하는 수화액정형 베시클을 제조하였다. 베시클 제조 시 인지질과 세라마이드 혼합물에 에지 액티베이터(edge activator) 기능성분을 첨가하여 베시클에 세라마이드 함량을 높이는 방안을 시도하였다. 인지질, 세라마이드, 에지 액티베이터 간 혼합 조성을 달리하여 만든 베시클의 입자크기와 이들 베시클 분산액의 안정성을 비교하여 베시클 구성 조합을 최적화하고, 또한 혼합 조성에 따른 수화 액정상의 구조적, 열적 특성의 변화 등을 관측하여 에지 액티베이터가 인지질과 세라마이드의 상 구조에 미치는 영향을 분석하였다. 마지막으로 sodium dodecyl sulfate 처리로 손상된 porcine 피부 모델에 세라마이드 고 함량의 수화 액정형 베시클을 적용했을 때 피부 장벽구조의 회복 기능을 분석하였다.

2. 실험

2.1. 사용 재료

본 실험에서 사용된 인지질은 soybean에서 추출한 지질을 수소첨가 반응시켜 불포화 성분을 제거한 레시틴으로 phosphatidyl choline (PC) 성분이 95% 이상인 Emulmetik 930 (Lucas Meyer, USA)을 사용하였고, 이후로는 편의상 인지질의 명칭을 HPC (hydrogenated phosphatidyl choline)로 표기하였다. 세라마이드는 ceramide NP 성분인 DS-Ceramide Y30 (두산 솔루스, 한국)제품을 사용하였다. 이 밖에 sodium deoxycholate (이후 SDOC로 표기), cholesterol, polysorbate 80, sodium chloride, sodium dodecyl sulfate (이후 SDS로 표기)은 모두 Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) 제품을 사용하였고, lysolecithin은 LPC-50H (뉴로피드, 한국)를 사용하였다. 에탄올은 (주)대정화금(한국)의 순도 99.5% 제품을 사용하였다. Porcine skin은 메디키네틱스(한국)사의 1 mm 두께의 제품을 사용하였다.

2.2. 사용기기

수화 액정형 베시클 제조 시 사용하는 초음파 분쇄기는 프로브 타입의 Sonic & Materials Inc.의 VC505 모델을 사용하였고, 베시클 입자 크기와 표면전하는 레이저 광산란 측정장치인 Otsuka사의 Zeta-Potential & Particle Size Analyzer ELSZ-2000 모델을 사용하여 측정하였다. 액정상 구조관찰을 위해 편광 현미경은 Nikon사의 ECLIPSE E400 POL 모델을 사용하였고 WAXD (wide angle X-ray diffraction) 측정은 Bruker사의 D8 Advance 모델을 사용하였다. 수화 액정의 열적 특성은 TA의 시차주사 열량계(DSC) Q-10 모델을 사용하여 질소가스 주입속도 50 mL/min 승온 속도 10 °C/min로 설정하고 측정하였다. FT-IR을 이용한 피부 내 지질 패킹의 변화는 JASCO 사의 4200 모델을 사용하였다. 그래프에서 나타낸 특성 값은 측정된 결과들의 평균값 ± S.D.이고 통계분석은 5% 유의수준에서 student's *t*-test를 실시하였다.

2.3. 수화 액정형 베시클 제조

HPC, 세라마이드, 에지 액티베이터의 조성을 달리하여 다양한 수화 액정형 베시클 제조를 시도하였고 각각의 조성은 Table 1과 같다. 수화 액정형 베시클은 수화과정을 통해 lyotropic 라멜라 액정 배열을 유도한 후, 액정을 rotational isomerization 상태에서 물속에 분산시키는 비교적 간단한 2단계 공정으로 만들어진다[16]. HPC와 세라마이드 두 지질을 비율별로 혼합하여 전체 지질 중량을 1 g으로 고정하고, 에지 액티베이터 0.1~0.2 g, 에탄올 0.8 g, 이외에 나머지는 증류수로 전체 용액 중량을 20 g으로 만들었다. 제조 과정은 다음과 같다. HPC, 세라마이드, 에지 액티베이터를 각각 조성별로 정량하여 250 mL 둥근 바닥 플라스크에 넣고 에탄올을 첨가하였다. 플라스크 입구를 마개로 밀봉한 후 65 °C의 항온조에서 두 지질과 에지 액티베이터를 에탄올에 완전히 용해시켜 투명한 졸(sol) 상태의 용액을 만들었다. 교반기를 가동하여 전단력이 가해지는 상태에서 먼저 증류수 2 mL를 천천히 넣어주면, 투명하였던 졸 용액은 유백색의 수화 액정상(liquid crystalline phase)이 형성되면서 겔(gel)과 같은 점성을 갖게 된다. 이러한 액정상에 정량용액 펌프를 이용하여 나머지 증류수를 서서히 첨가하면서 전단력을 가하면, 수화 액정상이 구형의 베시클 입자 형태로 물속에 분산되면서 콜로이드 용액이 만들어진다. 베시클 입자를 더 작고 균일한 사이즈로 만들기 위하여 베시클 분산용액을 비이커에 옮겨 담은 후, 2 min 동안 초음파를 가하고 이를 상온에서 서서히 식혀 HPC/세라마이드의 수화 액정형 베시클을 최종적으로 제조하였다.

2.4. 피부 지질 장벽 패킹(packng) 실험

Porcine skin 장벽 지질 구조를 교란시키기 위해서 Franz cell (직경 1 cm)의 receiver chamber에 식염수(NaCl 0.9%)를 채우고 donor chamber 사이에 porcine skin을 위치시켰다. 이후 donor chamber에 SDS를 식염수(NaCl 0.9%)에 5%로 용해한 것을 16 h 동안 처리하였다. 이후 porcine skin의 표면을 증류수로 세척한 이후 SDS를 처리한 부분에 측정하고자 하는 제형 20 uL를 도포하고 3 h 배양하였다. 이후 SDS 0.01% 용액과 증류수로 순차적으로 세척하였다. 이 표면을 FT-IR을 통해서 1460~1480 cm⁻¹의 영역을 5회 반복 측정하였다. 이후 이 데이터의 2차 미분값 그래프를 생성하고 이를 바탕으로 2개의 peak (1475/1463)의 local height를 계산하여 상대적인 비율을 수치화 하였다[29].

3. 결과 및 고찰

에탄올에 용해된 인지질 HPC에 일정 비율의 물을 가하면, 에탄올/물 간의 용해력(solvation) 차이에 의해 HPC 분자의 자가회합이 일어나면서 액정이 유도된다. 이 액정은 지질 이중층(lipid bilayer)과 물 층이 교대로 배열되는 라멜라 구조로, 이 액정을 구형의 입자 형태로 과량의 물에 분산시키면 수화 액정형 베시클이 완성된다. HPC와 세라마이드를 9 : 1의 (중량)비율로 HPC에 세라마이드를 10% 소량 혼합하여도 두 물질 상호 간 자가 회합으로 액정이 형성되면서 베시클이 만들어진다. 하지만 세라마이드의 비율을 20%로 높이면(HPC : 세라마이드 = 8 : 2), 베시클은 만들어지지만 시간이 지나면서 베시클 분산액이 겔 상태로 굳어지는 되는 현상이 나타난다. 따라서 HPC에 세라마이드를 혼합할 수 있는 비율은 10% 내외에 불과하고, 이를 전체 분산액 중량 대비로 환산하면 세라마이드 비율은 0.5%에 불과하다.

세라마이드의 함량을 더 높이기 위해 에지 액티베이터 역할을 하는 SDOC를 HPC와 세라마이드 혼합 지질에 첨가하였는데, Figure 1에서 보듯이 SDOC를 첨가함으로써 베시클 분산액이 외관상 확연히 달라

Table 1. Formulation of HPC/Ceramide Hydrated Liquid Crystalline Vesicles

Sample	H	HC1	HC2	HC2C1	HC2P1	HC2L1	HC2S1
HPC	1	0.9	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
Ceramide	-	0.1	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Cholesterol				0.1			
Polysorbate					0.1		
Lysolecithin						0.1	
Sodium deoxycholate							0.1
Ethanol				0.8			
D.W.				up to 20			
Sample	HC3S1	HC4S1	HC5S1	HC6S1	HC6S1.3	HC6S1.5	HC6S1.7
HPC	0.7	0.6	0.5	0.4	0.4	0.4	0.4
Ceramide	0.3	0.4	0.5	0.6	0.6	0.6	0.6
Sodium deoxycholate	0.1	0.1	0.1	0.1	0.13	0.15	0.17
Ethanol				0.8			
D.W.				up to 20			
Sample	HC6S2	HC7S1	HC7S1.5	HC7S1.7	HC7S2	HC8S2	
HPC	0.4	0.3	0.3	0.3	0.3	0.2	
Ceramide	0.6	0.7	0.7	0.7	0.7	0.8	
Sodium deoxycholate	2	0.1	0.15	0.17	0.2	0.2	
Ethanol				0.8			
D.W.				up to 20			

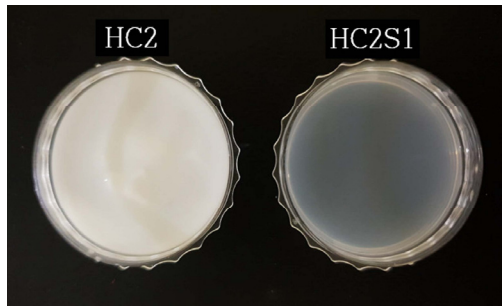


Figure 1. Change in the appearance of Ceramide/HPC vesicle dispersion solution due to the addition of sodium deoxycholate.

짐을 볼 수 있었다. 세라미드 20% 비율인 HC2 베시클 분산액은 유백색의 크림과 같은 형태를 보이지만, SDOC가 첨가된 HC2S1 베시클 분산액은 푸르스름한(bluish) 반투명의 콜로이드 용액이 되었다. HC2S1 베시클 분산액은 오랜 시간이 지나도 겔화가 진행되지 않고, 제형의 안정성을 그대로 유지하였다.

HPC와 세라미드(8 : 2) 혼합지질에 에지 액티베이터의 종류를 달리하여 첨가하였을 때, 베시클이 형성되는지 여부를 살펴보고, Figure 2에 이들 제형의 외관을 비교하였다. Cholesterol을 첨가한 HC2C1 제형은 수화 액정형 베시클이 형성되지만, 시간이 경과하면서 분산액에서 상분리가 일어나며 베시클이 분산액 아래로 침전되는 현상이 나타났다. Polysorbate 80을 첨가한 HC2P1 제형은 제조 직후 바로 분산액이 반투명 상태의 겔로 굳어지는 현상이 나타나고, lysolecithin을 첨가한 HC2L1 제형도 시간이 경과하면서 겔 덩어리가 서서히 생기면서 분산액이 굳어지는 결과가 나타났다. 결론적으로 HPC 세라미드 혼

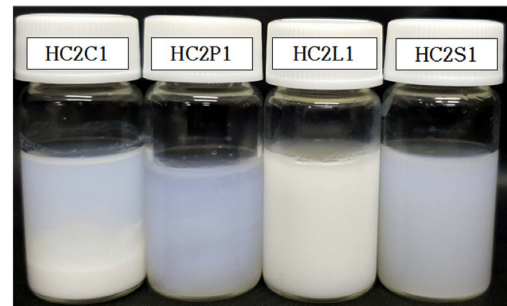


Figure 2. Change in the appearance of HPC/Ceramide vesicle dispersion solutions with different edge activators.

합지질에 cholesterol과 SDOC를 각각 에지 액티베이터로 사용했을 때 수화 액정형 베시클이 잘 형성되지만, 베시클 분산액이 상분리 없이 균일한 콜로이드 용액을 유지하는 점을 고려한다면 SDOC가 HPC/세라미드 수화 액정형 베시클 제조에 가장 적합한 것으로 나타났다.

Figure 3은 편광현미경으로 분산된 베시클의 형태를 관찰하여 비교한 것이다. (a)는 에지 액티베이터가 없는 HPC/세라미드 베시클 제형(HC2)으로 20%의 세라미드 함량에서도 아주 미세한 입자들이 뭉쳐서 분산되어 있는 모습을 볼 수 있다. (b)는 SDOC가 첨가된 베시클 제형(HC6S2)으로 60%의 높은 세라미드 함량에도 불구하고 베시클이 균일하게 잘 분산되어 있는 모습으로 나타났다. 하지만 세라미드를 80% 비율로 더 높은 HC8S2 제형(c)은 전체적으로 분산액에 결정이 석출되어 유동성이 없는 상태로 베시클을 찾아보기가 힘들다.

HPC에 세라미드와 SDOC이 혼합되었을 때 수화액정의 상(phase) 변화를 살펴보고, 수화액정은 지질혼합물을 65 °C에서 에탄올 0.8

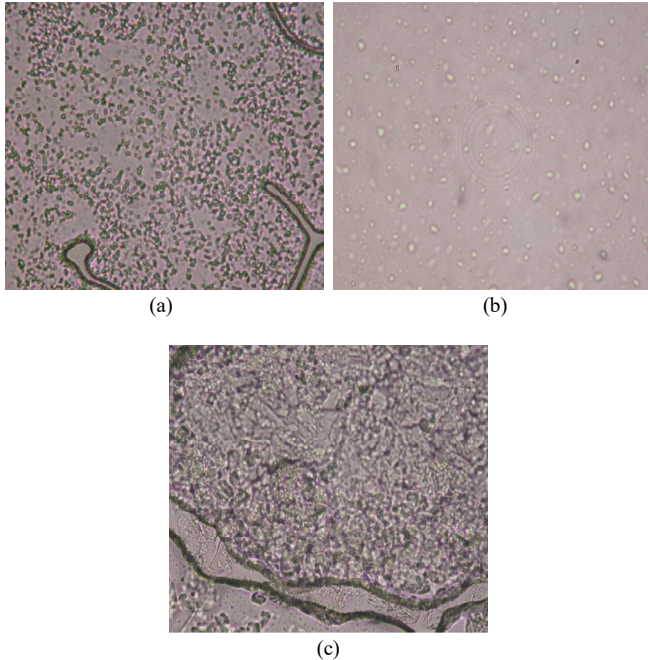


Figure 3. Polarized microscope image ($\times 400$) of (a) HC2, (b) HC6S2, (c) HC8S2.

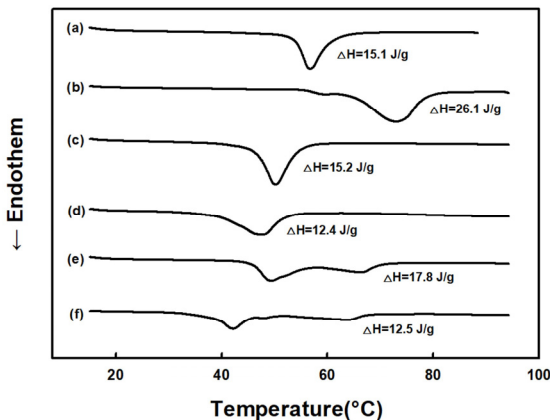


Figure 4. DSC thermogram of hydrated liquid crystalline phase of (a) HPC, (b) ceramide, (c) HPC/ceramide (8/2), (d) HPC/ceramide/SDOC (8/2/1), (e) HPC/ceramide (4/6), (f) HPC/ceramide/SDOC (4/6/1.5).

g에 용해시키고 나서 증류수 2 g을 넣어 혼합한 후, 실온까지 냉각시켜 만들었다. 먼저 수화액정의 열적 특성 및 결정성 변화를 살펴보기 위하여 시차주사 열량계(DSC)를 사용하였고, Figure 4에 각 시료의 열차트(thermogram)를 나타내었다. 열차트에서의 피크 온도는 수화액정의 gel-fluid 상전이(phase transition) 온도를 나타내는데, 분자적으로 질서 이중층(lipid bilayer)에서 acyl chain의 탄화수소 분자들이 trans-configuration 형태로 질서 정연한 겔(well-ordered gel) 상태를 유지하다가 이 피크 온도 이상에서는 trans-gauche rotational isomerization 형태로 무질서한 유체(disorder fluid) 상태로 변하게 된다[17]. 상전이 피크의 면적 크기는 상전이에 필요한 g당 엔탈피(ΔH) 값으로, 이 값의 크기로부터 액정의 결정성(degree of crystallinity)을 비교할 수 있다.

열차트를 보면 HPC(a)의 상전이 온도는 56.3 °C로 나타나고, 세라마이드(b)는 59 °C 근처에서 작은 pretransition 피크가 나타나지만, 주

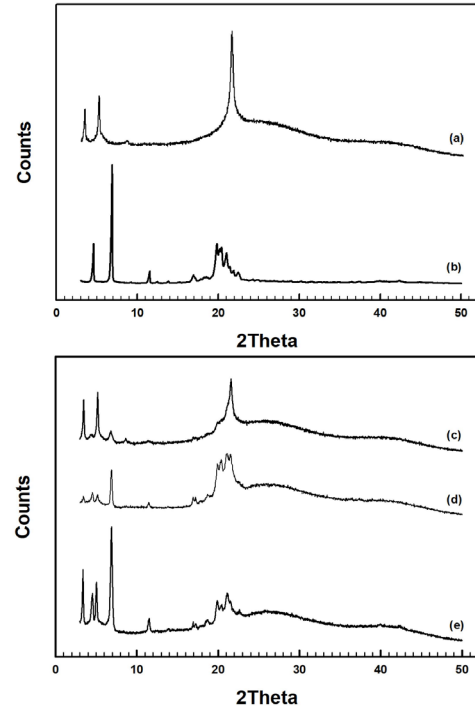


Figure 5. WAXS patterns of hydrated liquid crystalline phase with different composition (a) HPC, (b) ceramide, (c) HPC/ceramide (8/2), (d) HPC/ceramide (4/6), (e) HPC/ceramide/SDOC (4/6/1.5).

요 상전이 온도는 73 °C에서 나타났다. 세라마이드의 상전이 엔탈피 값은 26.1 J/g로 HPC에 비해 결정성이 매우 높음을 알 수 있다. HPC에 세라마이드를 20% 비율로 혼합(c)하면 HPC보다 낮은 온도에서 상전이 단일 피크가 나타나고, 여기에 SDOC가 더 첨가된 수화액정(d)은 더 낮은 온도에서 전이가 일어나고 단일 피크 폭이 완만한 모습으로 나타났다. HPC 단독일 때는 HPC acyl chain의 탄화수소 분자들만의 배열이 조밀하게 패킹(tight packing)이 가능하지만, 세라마이드가 혼합되면 HPC와 세라마이드 분자들 간 서로 얽혀진 이중층(interdigitated bilayer)이 형성되고, SDOC가 첨가되면 이중층 내에 자유부피(free volume)가 생기게 된다. 서로 얽혀진 이중층이나 이중층 내 자유부피 형성으로 탄화수소 사슬 분자 간 배열이 느슨해지면 사슬 분자 간 작용하는 소수성 인력(hydrophobic interaction)이 약해지고 이로 인해 결정성이 낮아지면서 더 낮은 온도에서 상전이가 일어나고 상전이가 일어나는 온도의 분포도 넓어지게 된다[18].

세라마이드를 60% 비율로 높이면(e), 단일 피크가 아닌 이중 피크의 모습이 나타났다. 세라마이드가 20% 비율이었을 때는 HPC와 세라마이드 분자가 함께 라멜라 액정 배열을 균일하게 잘 형성하여 상전이가 단일 피크로 나타났지만, 60% 비율일 때는 액정의 배열이 균일하지 않고 액정의 상분리가 일어나 각각 다른 영역에서 피크가 존재함을 알 수 있다. SDOC를 첨가해도(f), 여전히 이중 피크가 나타나지만 상전이 엔탈피 값은 낮아졌다. 이는 SDOC가 HPC와 세라마이드 간 상용성(compatibility)을 높이는데 기여하지 않지만 분자의 액정 배열에 영향을 주어 세라마이드의 결정성을 낮추는 어떤 역할을 하는 것으로 추측된다.

수화 액정의 상구조 변화를 WAXS 패턴으로 살펴본 결과를 Figure 5에 나타내었다. HPC(a)는 $2\theta = 3.4, 5.2, 21.5^\circ$ 에서 특징적 피크가 나타나는데, 21.5° 에서 나타나는 가장 강한 피크는 d-spacing으로 환산하

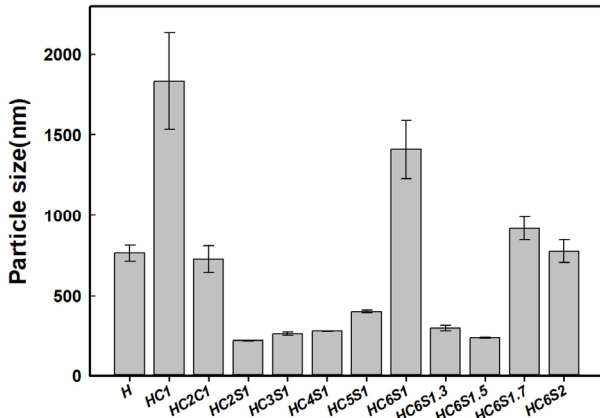


Figure 6. Change in the particle size of HPC/ceramide vesicle with various mixing ratio between the constituent components ($P < 0.05$).

면 4.1이 되는데, 이는 인지질 분자가 hexagonal packing으로 배열할 때 이웃 분자와의 격자 간격(lattice spacing)에 해당하는 거리이다[19,20]. HPC와 달리 세라마이드(b)는 $2\theta = 4.5, 6.8, 11.5, 16.9, 19.8, 20.4, 21.0, 22.4$ 등에서 여러 피크의 특성이 나타나는데, 앞서 다른 연구진이 글리세린에 수화된 세라마이드를 측정된 결과와 거의 유사하게 나타났다[21]. 세라마이드가 20% 비율로 혼합된 수화액정(c)에서는 HPC의 특성 피크가 주로 나타나고 세라마이드는 6.8° 에서 약한 피크 외에는 거의 나타나지 않았다. 이는 세라마이드가 HPC와 함께 액정 배열을 잘 이루어 배향되어 있음을 의미한다. 이와 달리 세라마이드가 60% 비율로 혼합된 수화액정(d), (e)에서는 HPC와 세라마이드의 각각의 특성 피크 대부분이 혼재해서 나타나고 $19.8\sim 22.4^\circ$ 사이에서는 중첩된 복합피크가 나타났다. 이는 DSC 결과와 마찬가지로 HPC와 세라마이드가 균일한 액정배열을 이루지 않고 분리된 상이 형성됨을 뒷받침하는 것이다.

HPC와 세라마이드의 혼합비율, 에지 액티베이터의 종류 및 첨가량 등을 달리하면서 Table 1에서와 같은 다양한 조성의 수화 액정형 베시클 제조를 시도하였고, 조성 비율을 달리해 만든 여러 베시클의 입자 크기의 변화를 Figure 6에 비교하여 나타내었다. 먼저 HPC 단독(H)이거나 세라마이드의 비율을 10%로 혼합(HC1)하였을 때, 수화 액정형 베시클은 형성되지만 베시클 분산액은 시간이 경과하면서 베시클이 분산액 아래로 가라앉는 상분리 현상이 나타났다. 세라마이드의 비율을 20%로 높이면 앞서 언급한대로 베시클은 형성되지만 시간이 경과하면서 베시클 분산액이 겔 상태로 굳어지는 현상이 나타났다. 에지 액티베이터로 SDOC를 0.1 g (혼합지질의 10% 비율) 첨가하면, 베시클 분산액이 상분리되거나 겔로 굳어지는 현상이 없이 세라마이드 비율을 50%까지 높여서 베시클을 제조할 수 있었다. 이 때 베시클 입자는 세라마이드 비율을 높일수록 입자크기가 점점 증가하지만 모두 수백 나노미터의 크기로 작게 형성되었다.

세라마이드 비율을 60%로 높여 만든 HC6S1 베시클은 입자가 마이크로 사이즈로 크게 증가하고 오랜 시간이 지나면 분산액에서 약간의 결정이 석출되는 현상이 나타났다. SDOC 함량을 좀 더 늘려 첨가한 HC6S1.3, HC6S1.5 제형에서는 베시클이 다시 수백 나노 사이즈로 작아지고 분산액이 안정한 상태를 그대로 유지하였다. 세라마이드 비율을 70%로 크게 높일 경우 SDOC를 0.2 g (혼합지질의 20% 비율) 첨가한 HC7S2에서만 베시클이 형성되고 이보다 적은 비율로 SDOC를 첨가한 경우에는 베시클이 오랜 시간 안정한 상태를 유지하지 못하였

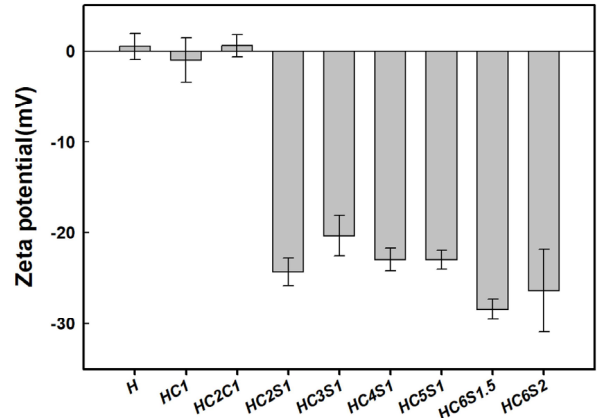


Figure 7. Change in the Zeta potential of various ceramide/HPC vesicle with various mixing ratio between the constituent components ($P < 0.05$).

다. HC7S2 베시클은 그림에 나타나지는 않았지만 3 마이크로미터가 넘는 매우 큰 입자 크기로 나타났고 세라마이드 비율을 80% (HC8S2)로 높은 경우에는 베시클이 제대로 형성되지 않았다. 이상의 결과들에서 SDOC가 HPC와 세라마이드에 적절한 양으로 첨가된 경우 베시클이 잘 형성되고 입자크기가 수백 나노사이즈로 작아지는 것을 알 수 있다. 이는 packing parameter 값이 1에 가까운 지질에 비해 0.5~1.0 사이의 작은 값을 갖는 SDOC가 지질의 이중막 배열에 위치하면서 배열의 변형성(deformability)과 곡률반경을 높여 베시클이 작게 잘 형성될 수 있도록 역할을 하기 때문이다[16,22]. 리포솜과 같은 베시클의 입자크기는 피부 각질층 투과에 매우 중요하며, 일반적으로 1 마이크로미터 이상의 베시클 크기는 피부 각질층에 남지만 이보다 작은 수백나노 사이즈의 베시클은 피부 각질층침투가 가능한 것으로 알려지고 있다[23,24].

베시클 입자의 표면 전하는 분산액의 안정성에 영향을 주는 중요한 변수가 되는데, 지질 혼합물 비율 변화와 SDOC 첨가 등이 베시클의 표면전하에 미치는 영향을 살펴보기 위해 제타전위를 측정하였다. Figure 7을 살펴보면 SDOC를 첨가하였을 때 제타전위 값이 대략 -20 mV 이상의 큰 음전하 값으로 나타나고, SDOC를 첨가하지 않았을 때 (H, HC1)와 cholesterol을 첨가했을 때(HC2C1)는 제타전위 값이 0 근처의 값으로 나타났다. HPC의 극성머리 부분은 phosphatidyl기와 choline기에 의해 -와+ 전하 모두 지니고 있어 HPC 단독으로는 제타전위 값이 0에 가까운 값으로 나타나지만, 음전하를 갖는 SDOC가 베시클에 첨가되면 베시클 입자는 더욱 큰 음의 표면 전하를 띠게 되어 입자끼리의 반발력이 더욱 크게 작용하고 응집현상을 방지해 분산액의 안정성이 높아지게 된다[25,26].

손상된 피부에 세라마이드 고 함량의 베시클을 적용했을 때 각질층 내 지질 장벽의 packing 상태를 회복하는 것을 FT-IR을 이용한 $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ scissoring band의 변화를 측정하여 확인하였다[27]. 건강한 피부 상태를 대변하는 orthorhombic packing 상태에서는 2개(1475 and 1463 cm^{-1})의 피크를 관찰할 수 있고, 세라마이드 부족이나 외부 계면활성제 처리 등에 의해서 약화된 피부에서는 이들이 hexagonal로 변함에 따라 한 개의 피크(1468 cm^{-1})로 변하게 된다[28]. 건강한 피부를 SDS로 처리하면 피부장벽 지질의 orthorhombic packing 상태가 약화되고 손상된 지질 구조에 시료를 처리 후 지질 패킹상태가 회복된다면, FT-IR로 측정 시 $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ scissoring의 2nd derivatives band가 변화하게 된다 (Figure 8. a). 이를 수치화하기 위해서 피크(1475/1463)의 local height

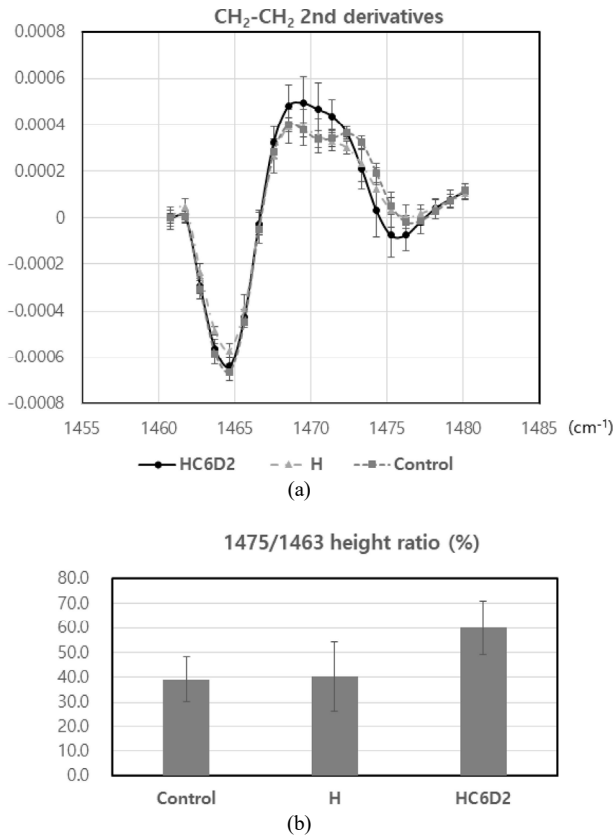


Figure 8. Verification of improvement of damaged lipid structure by HPC/ceramide vesicle using FT-IR ($P < 0.05$).

비율을 계산하였다[29]. SDS에 의하여 손상된 이후 증류수를 처리한 control 군은 $39.2 \pm 9\%$ 를 나타내고 H 처리군은 $40.2 \pm 14\%$ 를 나타내어 control 대비 장벽 패킹상태를 개선하지 못하였다. 그러나 HC6D2군을 처리하였을 때는 $60.2 \pm 11\%$ 로 packing 상태가 control 대비 유의미하게 개선되었다(Figure 8. b).

4. 결 론

인지질과 세라마이드 지질 혼합물에 SDOC를 첨가하여 세라마이드 고함량의 수화 액정형 베시클을 제조할 수 있었다. 베시클 막을 구성하는 지질 혼합물 중 세라마이드 비율을 최대 70%까지 높일 수 있는데, 이를 전체 분산액 중량의 비율로 환산한다면 3.5 wt%의 세라마이드를 함유한 베시클 분산액으로 제조할 수 있었다. 적절한 비율로 SDOC를 첨가하면 세라마이드의 결정성이 낮아지기도 하지만, SDOC가 planar bilayer을 형성하는 지질 액정배열에 변형성과 곡률을 유도하기 때문에 베시클이 수백 나노 사이즈로 안정하게 잘 형성되어진다. 세라마이드 고 함량 베시클을 SDS에 의해서 손상된 피부에 적용했을 때 피부 지질의 패킹구조를 효율적으로 개선하였다.

감 사

본 연구는 2019년 동덕여자 대학교 학술 연구비 지원에 의해 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

References

1. A. W. Fulmer and G. J. Kramer, Stratum corneum lipid abnormalities in surfactant induced dry scaly skin, *J. Invest. Derm.*, **86**, 598-602 (1986)
2. R. A. Tupker, J. Pinnagoda, P. J. Coenraads, and J. P. Nater, Susceptibility to irritants: Role of barrier function, skin dryness and history of atopic dermatitis, *Brit. J. Derm.*, **123**, 199-205 (1990)
3. E. Kahraman, M. Kaykın, H. Şahin Bektay, and S. Güngör, Recent advances on topical application of ceramides to restore barrier function of skin, *Cosmetics*, **6**, 52-63 (2019).
4. A. Nakaune-Iijima, A. Sugishima, G. Omura, Kitaoka, H. T. Tashiro, S. Kageyama, and I. Hatta, Topical treatments with acylceramide dispersions restored stratum corneum lipid lamellar structures in a reconstructed human epidermis model, *Chem. Phys. Lipids*, **215**, 56-62 (2018).
5. Z. Nemes and P. M. Steinert, Bricks and mortar of the epidermal barrier, *Exp. Mol. Med.*, **31**, 5-19 (1999).
6. W. G. Cho, K. A. Kim, S. I. Jang, and B. O. Cho, Behaviour of nanoemulsions containing ceramide IIIB and stratum corneum lipids, *J. Soc. Cosmet. Sci. Kor.*, **44**(1), 31-37 (2018).
7. R. Su, L. Yang, Y. Wang, S. Yu, Y. Guo, J. Deng, Q. Zhao, and X. Jin, Formulation, development, and optimization of a novel octyldodecanol-based nanoemulsion for transdermal delivery of ceramide IIIB, *Int. J. Nanomedicine*, **12**, 5203-5221 (2017).
8. M. Ok and S. D. Cho, Natural liposome comprising ceramide, process for the preparation thereof, and cosmetic composition comprising the same, *KR patent* 10-1727974 (2017).
9. J. H. Lee, J. B. Lee, and M. S. Park, A cosmetic composition comprising a ceramide containing capsule, *KR patent* 10-2070557 (2020).
10. J. H. Hong and E. J. Kim, Macro-capsule containing ceramide and cosmetic composition comprising the same for moisturizing, *KR patent* 10-1826699 (2018).
11. Y. J. Kim, J. W. Shim, E. J. An, M. J. Kim, and J. W. Kim, Multi-layered lamellar granule and skin external application composition containing same, *KR patent* 10-1527580 (2015).
12. 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**(1), 91-98 (2005).
13. Y. Tokudome, Y. Saito, F. Sato, M. Kikuchi, T. Hinokitani, and K. Goto, Preparation and characterization of ceramide-based liposomes with high fusion activity and high membrane fluidity, *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **73**, 92-96 (2009).
14. K. Vavrova, A. Kovacic, and L. Opalka, Ceramides in the skin barrier, *Eur. Pharm. J.*, **64**, 1-8 (2017).
15. Q. Zhang, C. R. Flach, R. Mendelsohn, G. Mao, A. Pappas, M. C. Mack, R. M. Walters, and M. D. Southall, Topically applied ceramide accumulates in skin glyphs, *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.*, **8**, 329-337 (2015).
16. S. Y. Lee, Y. M. Lim, and B. S. Jin, Effects of edge activator on the droplet size and skin permeation of hydrated liquid crystalline vesicles, *Appl. Chem. Eng.*, **28**(6), 679-684 (2017).
17. G. M. M. El Maghraby, A. C. Williams, and B. W. Barry, Interactions of surfactants (edge activators) and skin penetration enhancers with liposomes, *Int. J. Pharm.*, **276**, 143-161 (2004).

18. J. M. Holopainen, J. Y. A. Lehtonen, and P. K. J. Kinnunen, Lipid microdomains in dimyristoylphosphatidylcholine-ceramide liposomes, *Chem. Phys. Lipids*, **88**, 1-13 (1997).
19. D. Marsh, Lateral order in gel, subgel and crystalline phases of lipid membranes: Wide-angle X-ray scattering, *Chem. Phys. Lipids*, **165**(1), 59-76 (2012).
20. G. S. K. Pilgram, D. C. J. Vissers, H. der Meulen, Henk K. Koerten, S. Pavel, S. P. M. Lavrijsen, and J. A. Bouwstra, Atopic dermatitis and lamellar ichthyosis, *J. Invest. Dermatol.*, **117**(3), 710-717 (2001).
21. K. Y. Jeong and D. K. Lee, Influence of ceramide III on the structure of a phospholipid lamellar liquid crystalline phase hydrated in glycerin: Structural and thermal behaviors, *Appl. Chem. Eng.*, **21**(6), 603-609 (2010).
22. A. Hussain, S. Singh, D. Sharma, T. J. Webster, K. Shafaat, and A. Faruk, Elastic liposomes as novel carriers: recent advances in drug delivery, *Int. J. Nanomedicine*, **17**, 5087-5108 (2017).
23. G. M. El Maghraby, B. W. Barry, and A. C. Williams, Liposomes and skin: From drug delivery to model membranes, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **34**, 203-222 (2008).
24. E. Christophers and A. M. Kligman, Visualization of the cell layers of the stratum corneum, *J. Invest. Dermatol.*, **42**, 407-409 (1964).
25. M. N. Jones, The surface properties of phospholipid liposome systems and their characterization, *Adv. Colloid Interface Sci.*, **54**, 93-128 (1995).
26. E. H. Lee, A. Kim, Y. K. Oh, and C. K. Kim, Effect of edge activators on the formation and transfection efficiency of ultradeformable liposomes, *Biomaterials*, **26**(2), 205-210 (2005).
27. M. Boncheva, F. Damien, and V. Normand, Molecular organization of the lipid matrix in intact Stratum corneum using ATR-FTIR spectroscopy, *Biochim. Biophys. Acta*, **1778**, 1344-1355 (2008).
28. F. Damien and M. Boncheva, The extent of orthorhombic lipid phases in the stratum corneum determines the barrier efficiency of human skin *in vivo*, *J. Invest Dermatol.*, **130**, 611-614 (2010).
29. L. Rieppo, S. Saarakkala, T. Närhi, H. J. Helminen, J. S. Jurvelin, and J. Rieppo, Application of second derivative spectroscopy for increasing molecular specificity of fourier transform infrared spectroscopic imaging of articular cartilage, *Osteoarthr. Cartil.*, **20**, 451-459 (2012).

Authors

Min Seon Park; B.Sc., Graduate Student, Division of chemistry and cosmetics, Dongduk Women's University Seoul 02748, Korea; 20204010@dongduk.ac.kr

Jeong Won Choi; Undergraduate Student, Division of chemistry and cosmetics, Dongduk Women's University Seoul 02748, Korea; 20161751@dongduk.ac.kr

Seol-Hoon Lee; Ph.D., Professor, Division of chemistry and cosmetics, Dongduk Women's University Seoul 02748, Korea; slashv@dongduk.ac.kr

Byung Suk Jin; Ph.D., Professor, Division of chemistry and cosmetics, Dongduk Women's University Seoul 02748, Korea; bsjin@dongduk.ac.kr