

지용성 비타민 C 유도체 및 갈릭산을 함유한 지질나노입자 제조 및 특성

유 지 수^{*,†} · 김 자 인^{*,†} · 서 재 용^{*,***} · 박 영 아^{*,****} ·
강 유 진^{*,**} · 한 지 수^{*,**} · 김 진 웅^{*,**}

* (주)코스메카코리아 기술연구원

** 성균관대학교 바이오코스메틱스학과, 박사과정

*** 성신여자대학교 뷰티산업학과, 박사과정

**** 건국대학교 화장품공학과, 박사과정

***** H&A 파마켄 연구소

***** 성신여자대학교 뷰티산업학과, 교수

***** 성균관대학교 바이오코스메틱스학과, 교수

(2024년 3월 20일 접수, 2024년 5월 13일 수정, 2024년 5월 23일 채택)

Preparation and Characterization of Lipid Nanoparticles Containing Fat-Soluble Vitamin C Derivatives and Gallic Acid

Ji Soo Ryu^{1,2,†}, Ja In Kim^{1,3,†}, Jae Yong Seo^{1,4}, Young-Ah Park⁵,
Yu-Jin Kang⁵, Ji Soo Han^{3,††}, and Jin Woong Kim^{2,††}

¹CIR Center, COSMECCA KOREA, 6F, 323 Pangyo-ro, Bundang-gu, Seongnam-si, Gyeonggi-do 13488, Korea

²Department of Biocosmetics, Sungkyunkwan University

³Department of Beauty industry, Sungshin Women's University

⁴Department of Cosmetics Engineering, Konkuk University

⁵H&A Pharmachem, R&D center

(Received March 20, 2024; Revised May 13, 2024; Accepted May 23, 2024)

요약: 지질나노입자(lipid nanoparticles, LNPs)란, 세포 불투과성인 치료용 핵산, 단백질 및 펩타이드와 같은 생물학적 활성 화합물을 미세한 환경 변화에 의한 분해로부터 보호해 안정적인면서 효과적인 약물전달시스템이다. 본 연구에서는 지용성 비타민 C 유도체인 테트라헥실데실아스코르베이트(tetrahexyldecyl ascorbate, THDC)의 생체 내 반감기를 효과적으로 연장시키기 위해 산화방지제인 갈릭산(gallic acid, GA)을 함유하는 지질나노입자를 개발하였다. 마이크로플루이딕스칩(microfluidics chip)을 통해 상온 및 상압 조건 하에서 작고 균일한 크기로 제작하였다. 기존 마이크로플루다이지(microfluidizer)를 통해 고압 및 고온 조건 하에 제작된 리포솜과 비교하였을 때, 마이크로플루이딕스칩(microfluidics chip)을 통해 제작된 LNPs인 경우, 분산 및 온도에 따른 안정성이 우수하였으며, 지용성 비타민 C 유도체의 산화 안정성을 향상시켰을 뿐 아니라 피부 흡수율도 개선된 것을 확인하였다. 향후 연구에서는 이러한 결과를 더욱 입증하기 위해 피부 개선 효과를 연구하기 위한 생체 외 및 생체 내 평가에 중점을 둘 것이다.

† 주 저자 (e-mail: jsryu@cosmecca.com)
call: 031-784-6400
(e-mail: kimjain21@cosmecca.com)
call: 031-784-6400

†† 교신저자 (e-mail: jisupretty@sungshin.ac.kr)
call: 02-920-7847
(e-mail: jinwoongkim@skku.edu)
call: 031-290-7346

Abstract: Lipid nanoparticles (LNPs) are a stable and an effective system that protects cell-impermeable biologically active compounds such as nucleic acids, proteins, and peptides against degradation caused by subtle environmental changes. This study focuses on developing LNPs encapsulating gallic acid (GA), an antioxidant, to effectively prolong the half-life of tetrahexyldecyl ascorbate (THDC), a oil-soluble vitamin C derivative. These LNPs were synthesized in small, uniform sizes at room temperature and pressure conditions using a microfluidics chip. Compared to liposomes manufactured under high pressure and high temperature conditions through conventional microfluidizers, LNPs manufactured through microfluidics chips had excellent dispersion and temperature stability, and improved skin absorption as well as improved oxidative stability of fat-soluble vitamin C derivatives. Future studies will focus on *ex vivo* and *in vivo* evaluations to study skin improvement to further validate these results.

Keywords: tetrahexyldecyl ascorbate, lipid nanoparticle, gallic acid, microfluidics, skin absorption efficacy

1. 서 론

최근 화장품 소비자들은 피부에 대한 자극이 적으면서 효능·효과가 높은 제품을 요구하고 있다. 하지만 효능·효과가 우수한 유효성분이라고 할지라도 피부에 적용하였을 때 각질층의 피부 보호 작용으로 유효성분의 피부 흡수량은 적다. 따라서 유효성분을 효과적으로 흡수하기 위해서는 효과적인 피부 전달 시스템 개발이 요구된다[1]. 약물 전달 효율에 대한 나노캐리어 크기의 영향이 나노 약물의 생체 내 동역학적에 대한 이해를 증가시키는 것으로 보고되고 있다[1,2].

약물전달시스템의 핵심 기술 중의 하나인 유효성분의 흡수 촉진 기술에 속하는 리포솜(liposome) 기술이 많이 활용되고 있다. Liposome은 인지질로 구성되어 친수 및 친유성 성분을 동시에 포집할 수 있는 구형의 이중막 소포체(vesicle)로, 그 소포 공간 내에 수상의 유효성분을 포함한다[2]. 대규모 생산 시 마이크로플루다이저(microfluidizer)를 통해 고압 및 고온 조건에서 제조되는 한계가 있다.

나노에멀전은 liposome과 달리, 단일막 구조로 되어있는 것이 특징이다. 나노에멀전은 외부의 수상과 삼투 작용에 의해 포집된 유상성분이 파괴될 수 있다. 이를 방지하기 위하여 액체의 유상성분을 고체의 지질(lipid)로 만든 것이 고체 지질 나노입자(solid lipid nanoparticle, SLN)인데, 이러한 SLN은 외부와 삼투작용이 적어 유효성분이 잘 보존되지만 유상성분을 고체 지질로 하기 때문에 시간이 경과함에 따라 나노에멀전이 굳는 현상이 발생한다[3].

지질나노입자(lipid nanoparticles, LNPs)란, 세포 불투과성인 치료용 핵산, 단백질 및 펩타이드와 같은 생물학적 활성 화합물에 대한 효과적인 약물전달시스템이다. mRNA 기반의 백신 및 치료제 개발에 있어 핵심 요소는 mRNA가 분해되지 않고 효율적으로 세포 내로 전달하는 기술이며,

mRNA 전달을 하는 기술로 지질나노입자를 사용하여 코로나바이러스에 대한 백신이 많이 개발되고 있다[4]. 지질나노입자는 역마이셀로 구성된 내부 코어를 둘러싸는 지질 껍질을 특징으로 하며, 핵산이 적재된 구조로(약 100 nm), 이온화 가능한 양이온성 지질, 콜레스테롤, 인지질 및 폴리 지질로 구성된다(Figure 1)[4-7]. 지질나노입자는 에탄올에 용해된 지질 용액을 핵산 용액과 혼합하여 자가 조립을 통해 여러 가지 방법으로 제형화 할 수 있다[8].

마이크로플루딕스(microfluidics)로 지질나노입자를 제조하였을 때 지질나노입자 크기 제어, 높은 재현성, 연속 생성 공정 등 많은 이점을 제공할 수 있다[8]. 뿐만 아니라 마이크로플루딕스를 통해 상온 및 상압 조건에서 작고 균일한 전달체를 제조하기 때문에 대규모 생산 시 마이크로플루다이저를 통해 고압 및 고온 조건에서 제조되는 liposome의 한계를 극복하기 위한 대안으로 개발되고 있지만, 화장품 업계에서 지질나노입자를 적용한 연구가 아직 미미한 편이다.

비타민 C는 비타민 A(레티놀)와 더불어 신체 노화와 광노화 손상 피부결, 톤, 탄력, 주름을 복원할 수 있는 가장 강력한 솔루션으로 평가되고 있다. 그 중에서 테트라핵실데실아

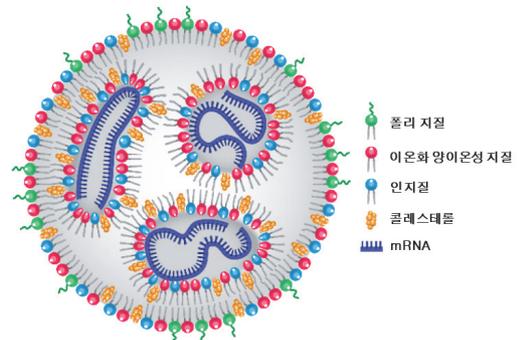


Figure 1. Structure of lipid nanoparticles (LNPs)[7].

Table 1. Information of Ingredients

Ingredients	Trade name	Manufacturer	Nation
Glycerin	Glycerin	Apical	Indonesia
Hydrogenated lecithin	Lipoid S75-3	Lipoid	Germany
Lecithin	Lipoid S75	Lipoid	Germany
1,2-hexanediol	1,2-hexanediol	PhilChem	USA
Sodium dilauramidoglutamide lysine	Pellicer™ L-30	Pellicer	Japan
Cholesterol	Cholesterol	Active Concepts LLC	USA
Phosphatidylcholine	Lipoid S 75	Lipoid	Germany
Alcohol denat.	Denatured anhydrous ethyl alcohol	Kai	Korea
Gallic acid	Gallic acid	Jiurui Biology & Chemistry	China
Tetrahexyldecyl ascorbate	VitaSynol® C	Sytheon	India

스코베이트(tetrahexyldecyl ascorbate, THDC)란, L-아스코빅 에씨드(L-ascorbic acid, AA)를 2-헥실데카노산(2-hexyldecanoic acid)으로 에스테르화한 지용성 비타민 C 유도체로, 순수 비타민 C의 불안정하고 쉽게 산화되는 단점이 보완되어 안정적인 피부 흡수가 가능하다(Figure 2)[9]. 또한 표피에 작용하여 항산화 활성을 발휘하는 비타민 C와 달리, 보다 깊은 피부 침투가 가능한 분자구조를 지녀 진피층까지 도달할 수 있으며, 세포 내에서 AA로 전환 및 방출되어 피부에 이점을 준다[7]. 그러나 활성산소종의 존재 하에서 THDC의 안정성은 완전히 입증되지 않았으며, THDC의 생체 내 반감기를 효과적으로 연장시키기 위해 산화방지제가 필요하다. 또한 여전히 THDC의 산화 안정성이 낮기 때문에 피부 흡수율이 적은 문제점이 있어, 비타민 C 유도체의 피부 흡수율 및 산화 안정성을 극대화하는 연구 또한 필요한 시점이다.

본 연구에서는 THDC를 liposome 및 LNP 시스템에 담지시켜 안정화 하고자하는 목적에서 수행되었으며, 제조된 liposome과 LNP 시스템의 안정도 비교 실험을 하였고 경피 흡수 실험을 통해 liposome과 지질나노입자의 피부 흡수율을 비교 검토하고자 수행하였다.

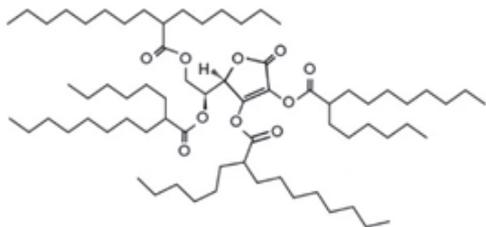


Figure 2. Structure of tetrahexyldecyl ascorbate (THDC).

2. 재료 및 방법

2.1. 실험 재료

본 실험에서 사용된 시약 및 재료는 Table 1에 표기하였다.

2.2. LNP 시스템 제조

LNP는 Microfluidic chip (LLS20010)을 이용하여 제조할 수 있다. 미세 칩 내에 용액을 흘려주게 되면, 마이크로 채널 내에서 유체의 흐름은 기본적으로 층류(laminar flow) 형태를 띠게 된다. 이 때, 용액의 유체 속도를 조절하여 자가 조립된 지질나노입자인 LNP 시스템을 얻을 수 있다. 지질 용액과 수용액을 Table 2과 같이 준비하여 각각 투명하게 용해하여 준비한 뒤, 마이크로 채널로 이루어진 미세유체칩 내에, 각

Table 2. Ingredients of LNP System, (A): Blank THDC LNP, (B): THDC LNP

Phase	Ingredient	% by weight	
		(A)	(B)
Lipid solution	Sodium dilauramidoglutamide lysine	0.5	0.5
	Cholesterol	1.0	1.0
	Phosphatidylcholine	0.5	0.5
	Hydrogenated lecithin	1.0	1.0
	Tetrahexyldecyl ascorbate	1.0	1.0
Aqueous solution	Alcohol	1.0	1.0
	Water	88.0	87.5
	Gallic acid	-	0.5
	1,2-hexanediol	2.0	2.0
	Glycerin	5.0	5.0

채널로 지질 용액과 수용액의 유체속도를 조정하여 Table 2 과 같은 비율이 되도록 용액을 흘려주어 마이크로 채널 내에서 자가조립에 의해 형성된 LNP 시스템을 제조하였다.

2.3. Liposome 제조

Table 3과 같이 A상과 B상을 준비한다. B상을 75 ~ 80 °C에서 가열하여 녹여준다. A상은 75 °C 이상에서 가열하여 녹여준 후 B상을 천천히 넣어주며 호모 믹서(T.K Auto Homomixer Mark II, Tokushukikakogyo, Japan)를 사용하여 3,000 rpm 속도로 5 min 동안 유회시켜 준다. 유회된 에멀전을 microfluidizer (LM20-30, Microfluidics, USA)로 고압유회를 1,000 bar에서 3 회 실행하여 나노 스케일의 liposome 을 제조하였다.

2.4. 입자 크기와 제타포텐셜(Zeta Potential) 측정

제조된 시료를 정제수로 10% 용액으로 희석시킨 후, 입도분석기(Photal ELS-Z, Otsuka Electronics Co., Japan)를 이용하여 입자크기와 제타포텐셜 측정하였다. 입자크기는 동적광산란법(dynamic light scattering, DLS)의 원리로 분산상태의 크기를 측정하였으며, 전기영동광산란(electrophoretic light scattering)의 원리로 분산 상태에 있는 콜로이드 입자 표면의 전위를 측정하였다(N = 3).

2.5. LNPs 및 Liposome 형상 관찰

LNPs 및 liposome의 형상을 관찰하기 위해 성균관대학교(Sungkyunkwan University, SKKU)에 의뢰하였다. 기기는 200 kV 초저온투과전자현미경(Cryo-TEM, Crogenic transmission electron microscope, Thermo Fisher Scientific, USA)을 사용하였다.

Table 3. Ingredients of Liposome, (A): Blank THDC Liposome, (B): THDC Liposome

Phase	Ingredient	% by weight	
		(A)	(B)
A	Lecithin	0.5	0.5
	Hydrogenated lecithin	1.0	1.0
	Tetrahexyldecyl ascorbate	1.0	1.0
	Alcohol	1.0	1.0
B	Water	89.5	89.0
	Gallic acid	-	0.5
	1,2-hexanediol	2.0	2.0
	Glycerin	5.0	5.0

2.6. 온도에 따른 장기 안정성 측정

장기적 안정성을 측정하기 위해 고속액체크로마토그래피(high performance liquid chromatography, HPLC) (Model. 510, Watters, USA)로 THDC 함량을 분석하였다[10]. THDC의 분석 조건은 다음과 같으며(Table 4), 25 °C, 4 °C 및 45 °C에서 4 주 동안 역가 분석을 진행하였다.

2.7. 분산 안정성 측정

일반적으로 분산된 형태들은 운동학적으로 안정한 상태이지만 열역학적으로는 불안정한 상태이다. 이 때, 크게 2 가지 현상으로 분리가 일어날 수 있는데, 하나는 입자의 이동 현상에 의한 크리밍/침강 현상이고, 다른 하나는 입자 크기 증가에 따른 응집/합일 현상이다. 크리밍 현상은 분산된 상이 연속상에 비해 비중이 작을 때 일어나는 현상이다. 응집은 졸(sol) 중의 콜로이드 입자가 집합해서 보다 큰 입자를 형성하는 현상이다. 응집은 가역적으로 일어나는 반응이지만 합일은 비가역적 반응이다. 형성된 liposome 및 LNPs는 모두 백색을 띠고 있기 때문에 후방산란 데이터로 해석하였다. 제조된 시료를 터비스칸(Turbiscan) (TurbiscanLAB, Formulacion, France)을 이용하여 장기 안정성을 측정하였다. Turbiscan의 다중광산란법(multiple light scattering)을 이용하여 40 °C 온도에서 4 h 동안 분산 안정성 변화를 수치적으로 평가하였다.

2.8. 활성산소 제거능 평가(DCA-DA Assay)

96 well immunoplate에 1.5×10^4 cells/well의 HaCaT 세포를 분주한 후, 세포 배양조건(37 °C, 5% CO₂)에서 배양하였다. 24 h 후, 배지를 버리고 PBS (phosphate-buffered saline)로 세척한 다음 시료 또는 양성 대조군으로 처리한 후 인큐베이터에서 24 h 배양하였다. 차광조건에서 well 내 배양액을 모두 제거한 후 37 °C의 PBS 용액으로 세척하였다. PBS 용액을 제거하고 새로운 PBS와 함께 20 μM DCF-DA 용액을 처리한 후 호일로 싸서 인큐베이터에서 45 min 동안 배양하였다. 차광조건에서 well 안의 배양액을 모

Table 4. HPLC Conditions for Quantitative Analysis

System	Conditions of HPLC analysis
Column	CAPCELL PAK C ₁₈ (4.6 × 150 mm, 5 μm)
Mobile phase	Isopropyl alcohol : Methanol = 75 : 25
Flow rate	1.0 mL/min gradient
Detector	222 nm

두 제거한 후 37 °C의 PBS로 1 회 세척하였다. 산화스트레스 유발물질인 H₂O₂를 PBS (1% FBS 함유)에 200 μM 농도가 되도록 희석하여 각 well에 200 μL씩 처리한 후 호일로 싸서 인큐베이터에서 30 min 동안 배양한 후, 여기(excitation) 485 nm, 방출(emission) 535 nm에서 형광을 측정하였다. 세포독성이 나타나지 않는 농도 내에서 실험하였다.

2.9. 피부 흡수율 측정

경피 흡수실험은 유효면적이 25 mm, 수용상의 부피가 5 mL인 Franz diffusion cell (FDC-6T, LOGAN Instruments, USA)을 사용하여 싱크 조건(sink condition) 하에서 실험하였다[11,12]. 사용된 경피 재료는 연구용 인공피부인 Strat-M[®] membrane (Merck Millipore Ltd., USA)을 사용하였으며, 수용상은 pH 7.4의 인산완충생리식염수(phosphate-buffered saline, PBS, Thermo Fisher Scientific, USA)를 사용하였다. Franz diffusion cell에 연구용 인공피부를 올려놓은 후 수용액을 채우고 37 ± 0.2 °C로 유지하였다. 경피에 시료를 1 g씩 도포하고 실험이 진행되는 동안 자석 교반기를 이용하여 600 rpm으로 수용상을 교반하여 투과 실험을 실시하였다. 경피 흡수량을 정량하기 위하여 일정 시간이 경과된 시점에서 수용액 5 mL를 취한 후 HPLC를 이용하여 피부 흡수율 및 THDC의 투과량을 정량분석하였다.

2.10. 통계처리방법

본 실험에서 얻은 결과는 모두 3 회 반복 측정하여 평균값(mean)과 표준편차(standard deviation, SD)로 나타내었다. 대조군과 실험군 사이의 통계학적 유의성 검정은 student's *t*-test로 비교하였으며 *p*-value 값이 0.05 미만일 경우 통계적으로 유의한 것으로 평가하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 입자 크기 분석

입자 크기를 확인하기 위하여 blank THDC LNP 및 blank THDC liposome을 정제수로 10% 용액으로 희석시킨 후 입도 및 입도 분포 분석기를 이용하여 동적광산란법으로 분산 상태의 크기를 측정하였다. 입도분석기로 측정한 결과, THDC LNP의 입자 크기는 130.5 ± 0.52 nm이며 THDC liposome의 입자 크기는 135.9 ± 0.43 nm로 THDC LNP의 입자 크기가 THDC liposome의 입자 크기와 유사한 것을 확인하였다(Table 5). 또한 초저온투과전자현미경을 사용하

Table 5. Particle Size of Blank THDC Liposome, THDC Liposome, Blank THDC LNP, and THDC LNP

	Test material	Particle size (nm)
Liposome	Blank THDC liposome	137.1 ± 0.42
	THDC liposome	135.9 ± 0.43
LNP	Blank THDC LNP	134.4 ± 0.33
	THDC LNP	128.9 ± 0.52

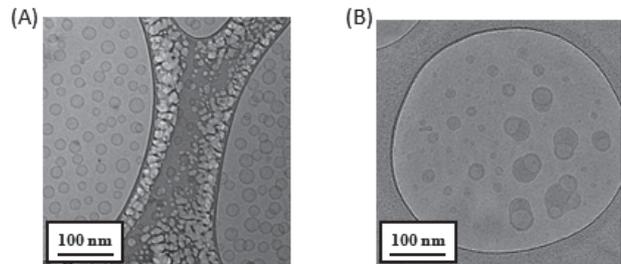


Figure 3. Cryo-TEM image of (A) THDC LNP and (B) THDC liposome.

여 입자의 형태가 구형이며 입자 크기가 100 ~ 200 nm인 작은 입자들이 분포되어 있음을 확인할 수 있었다(Figure 3). 일반적으로 화장품에서 사용하는 약물전달체의 입자 크기는 100 ~ 300 nm 정도로 알려져 있다. 따라서 본 연구에서 측정한 LNP와 liposome의 입자 크기는 100 ~ 200 nm로 화장품 유효성분의 피부침투 효율성을 높이기 위한 약물전달체 소재로 적합하다고 사료된다.

3.2. 제타포텐셜(Zeta Potential)

제타포텐셜은 입자의 분산안정성 및 응집을 알아보기 위해 예멸전에 전기장을 주는 전위 측정 분석 방법이다. LNP와 liposome의 제타포텐셜을 확인하기 위하여 LNP와 liposome을 정제수로 10% 용액으로 희석시킨 후 입도 및 입도 분포 분석기를 이용하여 전기영동광산란(electrophoretic light scattering)의 원리로 분산상태에 있는 콜로이드 입자 표면의 전위를 측정하였다. 분석 결과, 시료 모두 -40 mV 이하로 안정한 상태를 보인 것을 확인하였다(Table 6).

3.3. 분산 안정성 평가

분산 안정성 변화를 수치적으로 평가하기 위해 터비스칸을 사용해서 40 °C 온도에서 약 4 h 동안 분석하였다. 분산 안정성 지수(Turbiscan Stability Index, TSI) 값이 클수록 안정성이 더 불안정한 것으로, 안정성이 저하되는 현상을 정량

Table 6. Zeta Potential of Blank THDC Liposome, THDC Liposome, Blank THDC LNP, and THDC LNP

Test material		Zeta potential (mV)
Liposome	Blank THDC liposome	-47.12 ± 0.13
	THDC liposome	-51.29 ± 0.47
LNP	Blank THDC LNP	-48.37 ± 0.28
	THDC LNP	-54.97 ± 0.24

Table 7. Turbiscan Stability Index of Blank THDC Liposome, THDC Liposome, Blank THDC LNP, and THDC LNP

Test material	Time (h)	Turbiscan stability index (TSI)
Blank THDC liposome	4	6.54 ± 0.31 (C)
THDC liposome	4	5.61 ± 0.19 (C)
Blank THDC LNP	4	3.18 ± 0.22 (C)
THDC LNP	4	0.84 ± 0.14 (A)

적으로 도출할 수 있다. 최대 4 h 일 때의 터비스칸 안정성 지수를 분석하였고, 이를 Table 6에 나타내었다. 즉, TSI값이 0 ~ 0.5 인 경우 A+로 안정성이 좋은 상태이며, TSI 값이 0.5 ~ 1.0 인 경우 A로 약간의 안정성의 변화는 있지만 안정성이 좋다고 할 수 있는 상태다. 또한 TSI 값이 1.0 ~ 3.0인 경우 B로 육안으로 안 보이지만 어느 정도 시료의 안정성 변화가 있는 상태이며, TSI 값이 3.0 ~ 10.0인 경우 C로 육안으로도 변화가 보이기 시작하는 상태이고, TSI 값이 10.0 이상인 경우 D로 상분리가 확연히 나타나는 상태를 말한다.

분석 결과, Blank THDC LNP (TSI 값 : 3.18 ± 0.22 (C)) 이 THDC liposome (TSI 값 : 6.54 ± 0.31 (C))보다 TSI값이 낮으므로 분산 안정성이 우수한 것을 확인하였고, GA가 함유된 THDC LNP (TSI 값 : 0.84 ± 0.14 (A))의 분산 안정성이 가장 안정한 것을 확인하였다(Table 7). 이러한 결과를 바탕으로 Blank THDC LNP과 THDC LNP의 입자 크기 및 제타포텐셜 차이 값이 Blank THDC liposome 및 THDC liposome 보다 크기 때문에 Blank THDC LNP 및 THDC LNP의 TSI 값이 낮게 나왔으며, 특히 THDC LNP의 TSI 값이 가장 낮게 나온 것으로 예상된다.

3.4. 온도에 따른 장기 안정성 평가

화장품은 품질의 변화가 생길 경우, 물리적 및 화학적 변화가 관찰되며, 이러한 현상은 품질 열화의 원인이 되므로 품질 수명을 보증하기 위한 안정성 검토가 필요하다. 따라서 THDC LNP 및 THDC liposome을 14 일 동안 온도별로 역

Table 8. HPLC Analysis of (A) THDC Liposome and (B) THDC LNP

		Temperature		
		4 °C	25 °C	45 °C
(A)	0 Day	-	1.000	-
	7 Day	0.790	0.780	0.760
	14 Day	0.710	0.720	0.630
(B)	0 Day	-	1.000	-
	7 Day	0.970	0.990	0.960
	14 Day	0.940	0.960	0.930

Table 9. DCF-DA Assay of (A) THDC Liposome and (B) THDC LNP

Test material	Concentration (%)	DCF Fluorescence intensity (% of control)
Control		100.0 ± 0.4
H ₂ O ₂	200	200.5 ± 0.8
L-ascorbic acid (μg/mL)	400	120.3 ± 0.6
THDC liposome	10	130.5 ± 1.4
	5	174.1 ± 2.8
	2	192.4 ± 0.6
THDC LNP	1	200.0 ± 1.3
	10	124.0 ± 0.8
	5	152.3 ± 0.7
	2	174.1 ± 1.9
	1	181.7 ± 2.1

가 안정도 분석을 실시하였다. Liposome의 경우 온도별로 LNP보다 THDC 함량 역가 유지하는 정도가 떨어지는 것을 볼 수 있는 반면에 LNP의 경우 liposome 보다 온도별 THDC 함량 역가 유지도가 높을 것을 볼 수 있다(Table 8).

3.5. 활성산소 제거능 평가

THDC liposome 및 THDC LNP에 의한 활성산소 제거능을 통한 항산화 효능을 평가하였다. 시험물질의 농도는 최소 0.125 μg/mL 부터 최고 5 μg/mL 까지의 농도로 하여 시험을 진행하였다. 실험 결과, 음성대조군에서 100.4% 증가한 세포 내 ROS 생성이 THDC liposome 및 THDC LNP에 의해 농도 의존적으로 감소하였고, THDC liposome 보다 THDC LNP의 활성산소 제거능이 더욱 우수한 것을 확인하였다(Table 9).

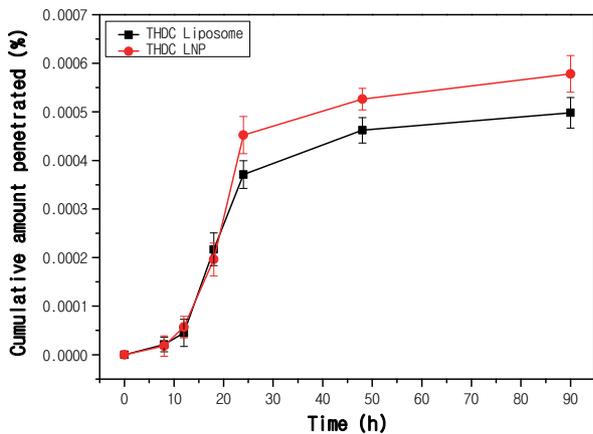


Figure 4. Cumulative amount of THDC penetrated through the Strat-M[®] membrane. Comparison of the THDC penetration kinetics through Strat-M[®] membrane in liposome (black) and LNP (red) systems.

3.6. 피부 투과율

Franz diffusion cell을 사용하여 THDC LNP의 피부 투과율을 평가하였다. 이때 THDC liposome은 대조군으로 사용하였다. 또한 두 가지 샘플의 피부 투과는 수분 기울기 (hydration gradient)에 의해 피부에 침투되어 약물을 피부로 전달하므로 샘플 투여부위를 밀폐하지 않은 상태(non-occluded condition)의 조건에서 실시하였다. 피부 투과율은 90 h 동안 Franz diffusion cell을 투과한 receptor 내의 용액의 시간 별 THDC의 투과량을 HPLC를 이용하여 측정하였다.

일정 피부 면적(3.14 cm²)에 대한 시간별 THDC의 투과량을 Figure 4에 나타내었다. THDC liposome 및 THDC LNP 두 시료 모두 시간별 THDC의 투과량이 24 h을 기점으로 차이가 났으며, THDC liposome 대비 THDC LNP는 점차적으로 투과율이 증가하는 것으로 나타났다. 초기 적하량에 대하여 90 h의 누적 피부 투과량은 각각 0.000498%, 0.000578%로 THDC LNP가 약 1.16 배 더 우수한 피부투과율을 나타내었다(Figure 4). 이러한 결과들을 통해 LNP 시스템을 이용할 경우 시간이 지남에 따라 더 많은 양의 THDC이 피부로 전달 가능하며, THDC LNP는 LNP 내 함유된 sodium dilauramidoglutamate lysine로 인해 피부 투과율이 증가한 것으로 예상된다.

4. 결론

본 연구에서는 지용성 비타민 C 유도체인 THDC의 생

체 내 반감기를 효과적으로 연장시키기 위해 산화방지제인 갈릭산을 함유하는 LNPs를 개발하였다. 마이크로플루이딕스칩을 통해 상온 및 상압 조건에서 작고 균일한 크기로 제작하였다. 기존 마이크로플루이디저를 통해 고압 및 고온 조건 하에 제작된 리포솜과 비교하였을 때, 마이크로플루이딕스칩을 통해 제작된 LNPs인 경우, 특히 갈릭산을 첨가하였을 때 HPLC로 고온, 상온 및 저온 조건에서 모두 함량이 유지되어 온도에 따른 안정성이 향상되었고, THDC LNP의 TSI 값이 가장 낮은 것으로 보아 분산 안정성이 더욱 우수하였다. 또한 활성산소 제거능을 통한 항산화 효능을 평가했을 시, THDC liposome 대비 THDC LNP의 산화 안정성이 향상되었을 뿐 아니라 피부 흡수율도 약 1.16 배 개선된 것을 확인하였다. 따라서 THDC LNP는 유효성분의 안정화 및 유효성분의 피부 전달에 있어서 적합한 피부 흡수 전달시스템이 될 수 있으며, 이를 통해 화장품 소재로 활용가치가 높을 것으로 판단된다.

References

1. Y. J. Kang, J. I. Kim, S. Y. Son, Y. A. Park, and H. G. Ji, The formation and stabilization of niosome with various surfactants, *J. Korean Soc. Cosmetol.*, **9**(1), 97 (2019).
2. M. Maeki, N. Kimura, Y. Sato, H. Harashima, and M. Tokeshi, Advances in microfluidics for lipid nanoparticles and extracellular vesicles and applications in drug delivery systems, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **128**, 84 (2018).
3. R. Tenchov, R. Bird, A. E. Curtze, and Q. Zhou, Lipid nanoparticles— from liposomes to mRNA vaccine delivery, a landscape of research diversity and advancement, *ACS Nano*, **15**(11), 16982 (2021).
4. V. J. Lingayat, N. S. Zarekar, and R. S. Shendge, Solid lipid nanoparticles: A review, *Nanosci. Nanotechnol. Res.*, **4**(2), 67 (2017).
5. C. B. Roces, G. Lou, N. Jain, S. Abraham, A. Thomas, G. W. Halbert, and Y. Perrie, Manufacturing considerations for the development of lipid nanoparticles using microfluidics, *Pharmaceutics*, **12**(11), 1095 (2020).
6. S. Kim, B. Choi B, Y. Kim, and G. Shim, Immune-modulating lipid nanomaterials for the delivery of biopharmaceuticals, *Pharmaceutics*, **15**(6), 1760 (2023).

7. R. N. Kularatne, R. M. Crist, and S. T. Stern, The future of tissue-targeted lipid nanoparticle-mediated nucleic acid delivery, *Pharmaceuticals*, **15**(7), 897 (2022).
8. J. A. Kulkarni, D. Witzigmann, S. Chen, P. R. Cullis, and R. van der Meel, Lipid nanoparticle technology for clinical translation of siRNA therapeutics, *Acc. Chem. Res.*, **52**(9), 2435 (2019).
9. S. J. Shepherd, C. C. Warzecha, S. Yadavali, R. El-Mayta, M. G. Alameh, L. Wang, and M. J. Mitchell, Scalable mRNA and siRNA lipid nanoparticle production using a parallelized microfluidic device, *Nano letters*, **21**(13), 5671 (2021).
10. M. M. Almeida, J. M. Alves, D. C. Patto, C. R. Lima, J. S. Quenca-Guillen, M. I. Santoro, and E. R. Kedor-Hackmann, Determination of tocopheryl acetate and ascorbyl tetraisopalmitate in cosmetic formulations by HPLC, *Int. J. Cosmet. Sci.*, **31**(6), 445 (2009).
11. H. Zhang, X. Zhu, J. Shen, H. Xu, M. Ma, W. Gu, Q. Jiang, J. Chen, and J. Duan, Characterization of a liposome-based artificial skin membrane for *in vitro* permeation studies using Franz diffusion cell device, *J. Liposome Res.*, **27**(4), 302 (2017).
12. S. O. Jeon, H. J. Hwang, D. H. Oh, J. E. Seo, K. H. Chun, S. M. Hong, M. J. Kim, W. C. Kim, M. S. Park, C. H. Yoon, K. H. Min, C. W. Suh, and S. Lee, Enhanced percutaneous delivery of recombinant human epidermal growth factor employing nano-liposome system, *J. Microencapsul.*, **29**(3), 234 (2012).