

## 노르빅신 탄성 리포솜의 물리화학적 특성 및 시험관 내 피부 투과성 평가

이서영<sup>\*†</sup> · 정지원<sup>\*</sup> · 오초희<sup>\*</sup> · 이재현<sup>\*\*</sup> · 홍정일<sup>\*\*\*††</sup> · 박수남<sup>\*\*\*\*††</sup>

\*서울여자대학교 과학기술융합대학 바이오헬스공학과 화장품공학전공, 석사졸업생

\*\*서울여자대학교 과학기술융합대학 바이오헬스공학과 화장품공학전공, 박사과정생

\*\*\*서울여자대학교 과학기술융합대학 식품공학과, 교수

\*\*\*\*서울여자대학교 과학기술융합대학 바이오헬스공학과 화장품공학전공, 석좌교수

(2024년 6월 13일 접수, 2024년 7월 16일 수정, 2024년 7월 26일 채택)

### Physicochemical Characterization of Norbixin Elastic Liposomes and Evaluation of their *In Vitro* Skin Permeability

Seo Young Lee<sup>1,†</sup>, Jiwon Jeong<sup>1</sup>, Cho Hee Oh<sup>1</sup>, Chae Hyun Lee<sup>1</sup>, Jungil Hong<sup>2,††</sup>, and Soo Nam Park<sup>1,††</sup>

<sup>1</sup>Department of Bio-health Engineering, Cosmetic Engineering, College of Science and Convergence Technology, Seoul Women's University, Hwarang-ro 621, Nowon-gu, Seoul 01797, Korea

<sup>2</sup>Department of Food Science and Technology, College of Science and Convergence Technology, Seoul Women's University

(Received June 13, 2024; Revised July 16, 2024; Accepted July 26, 2024)

**요약:** 본 연구에서는 계면활성제인 수크로스테아레이트(sucrose stearate, SS)의 비율(0.25 ~ 1 mg/mL)을 변화시켜 노르빅신을 함유한 탄성 리포솜(norbixin loaded elastic liposomes, NELs)을 제조하여 물리적 특성, 피부 투과성, 광안정성 및 항산화 활성 변화를 평가하였다. NELs의 평균 직경은 80.6 ~ 113.8 nm, 제타 전위 -22.2 ~ -33.9 mV, 가변형성 7.3 ~ 16.1 및 포집 효율 40.5 ~ 58.6%로 측정되었다. 0.05% 노르빅신이 함유된 NEL은 1 mg/mL의 SS (NEL-5)가 존재할 때 가장 높은 포집 효율, 제타 전위 및 가변형성이 관찰되었으며, 이후 경피 투과에 사용하였다. Blue LED (10 W/m<sup>2</sup>) 조사 하에서 NEL은 담지되지 않은 노르빅신에 비해 높은 광안정성과 항산화 활성이 측정되었다. NEL-5는 일반 리포솜 및 부틸렌글라이콜 용액보다 피부 각질층에 더 많이 유지되었다. 이러한 결과는 계면활성제로서 SS를 이용하면 NEL의 물리화학적 특성을 안정화시키고 활성 성분의 각질층 전달을 효율적으로 할 수 있음을 확인하였다.

**Abstract:** In this study, norbixin loaded elastic liposomes (NELs) containing norbixin were prepared by changing the ratio (0.25 to 1 mg/mL) of sucrose stearate (SS), a surfactant, to evaluate changes in physical properties, skin permeability, light stability, and antioxidant activity. The average diameter of the NELs ranged from 80.6 to 113.8 nm, with zeta potential from 22.2 to 33.9 mV, deformability from 7.3 to 16.1, and loading efficiency from 40.5 to 58.6%. In the 0.05% norbixin-loaded elastic liposome, the highest loading efficiency, zeta potential, and deformability were observed in 1 mg/mL of SS (NEL-5). Under blue LED (10 W/m<sup>2</sup>), NEL showed higher photostability and antioxidant activity compared to unencapsulated norbixin. Due to its high stability and encapsulation efficiency, NEL-5 formulation was subsequently

†주 저자 (e-mail: qufsla1010@swu.ac.kr)  
call: 02-970-7726)

†† 교신저자 (e-mail: hjil@swu.ac.kr)  
call: 02-970-5639)  
(e-mail: snpark@swu.ac.kr)  
call: 02-970-7591)

used for transdermal permeation. Furthermore, the NEL-5 has been shown to retain more in the stratum corneum of the skin than general liposome and 1,3-butylene glycol solution. These results confirm that the use of SS as a surfactant can stabilize the physicochemical properties of NELs and efficiently deliver active ingredients to the stratum corneum.

**Keywords:** *norbixin, elastic liposome, antioxidant activity, photostability, LED*

## 1. 서 론

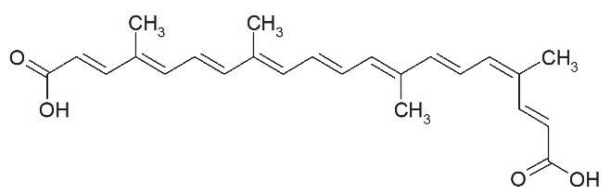
피부는 크게 표피층, 진피층 및 피하지방층으로 구성되며, 그중 표피층은 최외각 층인 각질층부터 과립층, 유극층과 기저층으로 이루어져 있다[1]. 각질층은 기저층에서 형성된 각질 형성 세포(keratinocyte)로부터 분화된 각질 세포(corneocyte)가 층으로 쌓인 형태이며 그 사이는 지질 성분으로 구성된다[2,3]. 이러한 구조로 인하여 각질층은 외부 환경으로부터 물리적 및 화학적 손상으로부터 피부를 보호하는 역할을 하는 반면, 유효 성분의 피부 흡수에 있어서는 투과 장벽으로 작용한다. 이로 인해 유효 성분의 안정화와 피부 투과 효율을 높이기 위한 경피 전달 시스템(transdermal delivery systems)이 요구된다. 대표적인 전달 시스템으로써 인지질로 구성되어 친수성과 친유성 성분을 동시에 포집할 수 있는 리포솜(liposome)이 있다[4]. 리포솜은 생체막과 유사한 지질 이중층 구조로 구성되어 우수한 친화성과 안정성을 가지고 있어 화장품 및 제약 산업에서 효과적인 약물 전달체로 응용되고 있다. 그러나 지질 이중층의 물리적 불안정성, 낮은 포집 효율 및 피부 침투의 한계 등이 있다[5]. 이러한 단점을 보완하기 위해 여러 형태의 제형이 개발되었으며, 리포솜의 낮은 피부 투과율을 보완한 제형인 탄성 리포솜(elastic liposome)이 연구되어 왔다[6,7]. 탄성 리포솜은 인지질과 계면활성제(surfactant)로 구성되며, 단일 사슬 계면활성제의 높은 곡률 반경으로 인해 지질 이중층 막이 불안정하게 되어 소포체 막의 가변형성을 증가시킨다. 이로 인하여 탄성 리포솜은 일반 리포솜에 비해 활성 성분의 피부 흡수 효율을 증가시킬 수 있다.

비이온성 계면활성제(non-ionic surfactants)는 이온을 생성하지 않고 물과 잘 혼합되는 특성을 가지며, 물과 오일간의 혼합을 유도하여 안정화를 증가시킨다. 이러한 성질로 인하여 화장품, 의약품, 세제 및 식품 등의 다양한 산업에서 응용되고 있다[8,9]. 본 실험에서는 수크로오스(sucrose)와 스테아릭애씨드(stearic acid)가 에스터 결합(ester bond)으로 연결된 glycoside인 수크로오스스테아릭애씨드(sucrose stearate, SS)를 비이온성 계면활성제로 사용하였다. SS는

저자극적인 성분으로 높은 피부 친화성, 수분 공급과 유지 및 미생물 성장을 억제하는 효과가 있다고 보고되었다[10,11]. 이러한 특징을 가진 SS는 계면활성제와 안정제로서 제품의 제형 개선, 안정성 및 피부 흡수 향상 등의 효과를 가진다[12,13].

피부는 외상으로부터 체내 근육과 기관을 보호하거나 체온 조절, 수분 증발 방지 및 비타민 D 합성 등 중요한 역할을 한다[14]. 노화는 시간에 따라 필연적으로 나타나는 자연 현상이지만, 특히 피부의 노화 진행 속도는 직접적으로 노출되는 외부 환경에 많은 영향을 받는다. 자외선은 피부 노화의 대표적인 원인 중 하나로 체내에서 singlet oxygen ( $^1O_2$ ), superoxide anion radical ( $O_2^{\bullet-}$ ), hydroxyl radical ( $\cdot OH$ ) 및 hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ )와 같은 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)을 생성시켜 피부 세포 및 조직 손상을 유도하여 피부 노화를 촉진한다[15,16]. 피부에는 이렇게 생성된 ROS에 의한 산화적 스트레스에 대항할 수 있는 슈퍼옥사이드 디스무타제(superoxide dismutase), 카탈레이스(catalase) 및 글루타치온 퍼옥시데이스(glutathione peroxidase) 등의 효소적 항산화제와 비타민C 및 E, 유비퀴놀(ubiquinol) 및 카로티노이드(carotenoid)와 같은 비효소적 항산화제가 존재한다. 하지만 자외선과 같은 외부 환경 요인들로 생성된 과도한 ROS로 인한 지속적인 공격은 피부의 항산화 방어막을 붕괴시켜 각종 질병이나 피부 노화를 가속시킨다[17]. 생체 내에서 생성된 ROS를 효과적으로 제거하여 피부 노화를 지연시키기 위해서는 항산화 활성이 있는 물질을 피부에 효율적으로 침투시켜야 한다.

카로티노이드는 빨간색과 주황색 계열의 색을 나타내는 천연 색소이며, 40 개의 탄소로 이루어져 분자 중앙에 공액이중결합 구조가 발색단으로 작용하여 400 ~ 500 nm의 빛을 흡수한다. 또한 체내에서 시력 유지, 세포 보호 및 면역력 증진 역할을 하는 비타민 A로 전환되거나, 항산화 활성을 통해 노화 지연, 색소 침착 억제 및 수분 유지에 도움이 된다[18,19]. 이러한 카로티노이드는 인체 내에서 직접 합성이 불가능하여 섭취 및 피부 도포 등의 방법으로 보충해야 한다. 안나토(annatto)는 *Bixa orellana* Linné 종자



**Figure 1.** Structure of norbixin, a major constituent of the present annatto pigment.

에서 추출한 카로티노이드 계열의 주황 색소이다. 안나토는 립스틱, 블러셔 및 비누 등 다양한 화장품 색소뿐만 아니라[20,21], 치즈, 요구르트 및 아이스크림 등 식품 착색제로도 널리 이용되고 있다[22,23]. 안나토는 빅신(bixin)과 노르빅신(norbixin)의 혼합물로 구성되며, 상대적으로 친수성인 노르빅신이 다양한 산업에서 활용 범위가 넓다(Figure 1). 노르빅신은 활성산소종 억제, 지질의 산화 억제, B16 흑색종 세포에 세포독성을 유발한다고 보고되었다[24-26]. 그러나 노르빅신은 빛에 의해 불안정하다고 보고된 바 있으며, 리포솜에 담지된 제형일 때 빛에 대한 안정성과 화학적 변화를 평가한 연구는 매우 제한적이다[27,28]. 따라서 본 연구에서는 노르빅신이 탄성 리포솜에 담지되었을 때, 피부에 효과적으로 전달하기 위하여 비이온성 계면활성제인 SS를 이용하여 탄성 리포솜을 제조하였으며, 형광등과 다양한 LED 광원 하에서 탄성 리포솜의 화학 안정성 및 항산화 활성 변화를 분석하였다. 이러한 시스템이 노르빅신의 피부 전달에 어떠한 효과를 나타내는지를 확인함으로써 노르빅신을 담지한 탄성 리포솜의 화장품 원료로서의 사용 가능성을 평가하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 실험재료 및 기기

본 연구에서 사용된 안나토 색소(annatto 30, E ≥ 4000)는 ES 식품원료(Gunpo, Korea)에서 구입하였으며, 빅신을 포함하지 않은 덱스트린(dextrin)과 노르빅신(30%, w/w)의 혼합물로 조성되었다. 세라마이드, 콜레스테롤, 인지질인 수소화 대두 레시틴 및 계면활성제인 SS는 Sigma-Aldrich (USA)에서 구입하였다. 에탄올, 메탄올 및 클로로포름 등의 용매는 시판 특급 시약을 사용하였다. HPLC 분석용 용매 아세트니트릴은 J.T.Baker Co. (USA)에서 구입 후 사용하였다. 피이자-60하이드로제네이티드캐스터오일(PEG-60 hydrogenated castor oil, HCO-60)은 Nikko (Japan)에서 구입하였다. 합성

**Table 1.** Compositions of Norbixin Loaded Elastic Liposomes

Formulation code	Norbixin (mg/mL)	Ceramide (mg/mL)	Cholesterol (mg/mL)	Hydrogenated lecithin (mg/mL)	Sucrose stearate (mg/mL)
EL <sup>1)</sup> -1	0	0.05	2	5	0
EL-2	0	0.05	2	5	0.25
EL-3	0	0.05	2	5	0.5
EL-4	0	0.05	2	5	0.75
EL-5	0	0.05	2	5	1
EL-6	0	0.05	2	5	1.5
EL-7	0	0.05	2	5	2.5
NEL <sup>2)</sup> -1	0.15	0.05	2	5	0
NEL-2	0.15	0.05	2	5	0.25
NEL-3	0.15	0.05	2	5	0.5
NEL-4	0.15	0.05	2	5	0.75
NEL-5	0.15	0.05	2	5	1

<sup>1)</sup> Elastic liposome

<sup>2)</sup> Norbixin loaded elastic liposome

피부막 Strat-M<sup>®</sup> membrane transdermal diffusion test model (Merck Millipore Ltd., Ireland, 25 mm)와 이외의 모든 시약은 Sigma-Aldrich에서 구입하였다. NEL 제조 시, 회전 증발기 (Rotavapor; BUCHI, Switzerland)와 초음파 파쇄기 (Branson 450 digital sonifier; BRANSON, USA)를 사용하였고, 제형의 입자 크기, 다분산 지수(polydispersity index, PDI) 및 제타 전위(zeta potential)는 zetasizer nano ZS analyzer (Malvern Instruments Ltd., UK)를 사용하여 측정하였다. 리포솜의 가변형성 측정은 mini extruder (Avanti<sup>®</sup> Polar Lipids, USA)를 사용하여 수행하였다.

### 2.2. 탄성 리포솜 제조

모든 탄성 리포솜 처리구는 50 mL 둥근 바닥 플라스크에 공통으로 노르빅신(0.15 mg/mL), 세라마이드(0.05 mg/mL), 콜레스테롤(2 mg/mL) 및 수소화 대두 레시틴(5 mg/mL)을 첨가하였다. 계면활성제인 SS를 각각 다른 농도(0.25 ~ 2.5 mg/mL)로 하여 메탄올과 클로로포름(1 : 2, v/v)에 용해하여 제조하였다(Table 1). 이를 회전 증발기를 이용하여 유기 용매를 제거 후, 플라스크 벽면에 생성된 얇은 지질 막은 증류수 10 mL로 수화하여 탄성 리포솜을 형성하였다. 균일한 탄성 리포솜 입자 크기를 위해 glass beads를 넣고 20 min 동안 초음파를 가해주었다. 탄성 리포솜 내의 포집 되지 않은 노르빅신을 0.45 μm syringe filter

(polyvinylidene fluoride, PVDF, 25 mm)로 제거하였다.

### 2.3. 안정성 평가 및 포집 효율 측정

탄성 리포솜의 안정성을 평가하기 위해 입자 크기, PDI 값 및 제타 전위를 측정하였다. 큐벳(DTS1070, Malvern Instruments Ltd, UK)에 각각의 시료 750  $\mu\text{L}$ 씩 분주하여 zetasizer nano ZS analyzer를 이용하여 3 회 반복 측정하였다. 입자 크기와 PDI는 동적 광산란(dynamic light scattering, DLS)으로, 제타 전위는 전기 영동 광산란(electrophoretic light scattering, ELS)을 이용하여 분석하였다. 탄성 리포솜은 4  $^{\circ}\text{C}$ 에 4 주 동안 저장하면서 안정성을 측정하였다. NEL에 에탄올을 분주하여 탄성 리포솜의 막을 파괴 시킨 후, 5,000 RCF (relative centrifugal force)의 조건으로 10 min 동안 원심분리(Mini; Gyrozen Co., Ltd., Korea)하여 상등액을 회수하여 포집 효율을 측정하였다. 각 시료의 포집 효율은 마이크로 플레이트 판독기(Spectra Max M2; Molecular Device, USA)로 노르빅신의 최대 흡광 피이크(peak) 450 nm에서 흡광도 변화를 이용하여 분석하였다. 탄성 리포솜 내의 노르빅신 함량은 농도 별 노르빅신에 대해 동일한 방법으로 측정된 검량 곡선을 이용하여 환산하였다.

### 2.4. 가변형성 측정

탄성 리포솜의 가변형성 평가를 위해 mini extruder를 이용하여 인공 투과 장벽 통과 정도를 측정하였다. NEL-1 ~ 5를 PC membrane (50 nm, 19 mm, polycarbonate membrane; Avanti<sup>®</sup> Polar Lipids, Germany)을 통과시켰으며, 이때 동일한 압력을 1 min 동안 가해주었다. Membrane을 통과한 탄성 리포솜의 양과 통과 후 입자 크기를 측정하여 다음 식 (1)을 이용하여 가변형성을 평가하였다.

$$\text{Elasticity} = J_{flux} \times (r_v / r_p)^2 \quad (1)$$

$J_{flux}$  : membrane을 통과한 탄성 리포솜의 양

$r_v$  : extrusion 후 리포솜 입자 크기

$r_p$  : membrane의 기공 크기

### 2.5. 광안정성 평가

빛에 의한 탄성 리포솜 내 담지된 노르빅신 색도 안정성 평가를 위해 조성이 다른 NEL을 96 well plate 각 well 당 100  $\mu\text{L}$ 씩 분주 후, 암소 조건 또는 10  $\text{W}/\text{m}^2$ 의 blue LED 조사 조건에서 최대 8 h 동안 반응시켰다. 각 반응 시간별 노르빅신 색도 변화는 마이크로 플레이트 판독기

를 이용하여 350 ~ 600 nm에서 흡수 spectrum과 최대 흡광 피이크 450 nm에서 흡광도 변화를 분석하였다. 한편, 노르빅신이 탄성 리포솜 내에 담지된 위치를 평가하기 위해 노르빅신 단독과 NEL-5를 blue LED (10  $\text{W}/\text{m}^2$ )보다 파장이 짧은 ultraviolet (UV, 0.2  $\text{W}/\text{m}^2$ )에서 2 h 동안 시간별 흡광도 변화를 450 nm에서 분석하였다.

### 2.6. 항산화 활성 평가

탄성 리포솜에 담지된 노르빅신의 항산화 활성이 시간이 지남에 따라 미치는 영향을 ABTS 라디칼 소거 활성을 이용하여 평가하였다. 96 well plate에 각 리포솜의 포집 효율을 고려하여 최종 농도를 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 희석한 시료 50  $\mu\text{L}$ 와 ABTS 라디칼 용액 150  $\mu\text{L}$ 씩 분주 후, 상온, 암소 조건으로 최대 4 h 동안 반응시키고, 시간별로 시료의 항산화 활성은 734 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 2.7. In Vitro 피부 투과 실험

탄성 리포솜이 노르빅신의 피부 투과에 미치는 영향을 확인하기 위해 Franz diffusion cell을 이용하여 평가하였다. 피부 투과는 동물 실험을 대체할 수 있는 비동물 기반 모델인 합성 피부막(Strat-M<sup>®</sup> membrane)을 사용하였다. 합성 피부막의 최상층은 각질층과 유사하며 폴리테트라설피온(polyethersulfone)으로 구성되며 나머지 부분은 폴리올레핀(polyolefin)으로 구성된다. Receptor phase를 에탄올, 인산염 완충 식염수(phosphate-buffered saline, PBS) 및 HCO-60을 각각 2 : 20 : 78 (w/w/w)로 제조하여 chamber에 15 mL을 기포가 생기지 않도록 채운 후 자석과 함께 합성 피부막의 최상층이 위로 향하도록 donor와 receptor phase 사이에 고정시켰다. 각 시료 1 mL을 피부 표면에 분주한 후, 600 rpm 및 37  $^{\circ}\text{C}$  조건에서 12 h 동안 진행하였다. 합성 피부막을 통과하여 피부에 남아있는 노르빅신의 양을 측정하기 위해 PBS로 3 회 세척하여 건조 후, receptor phase에 닿지 않은 부분은 잘라냈다. 최상층에 존재하는 노르빅신의 양을 측정하기 위해 tape stripping 법을 이용해 테이프를 합성 피부막의 최상층을 3 회 벗겨냈다. 최상층이 벗겨진 합성 피부막과 테이프는 각각 10 mL의 에탄올을 넣고 2 h 동안 초음파 처리하여 노르빅신을 추출하였다. 추출된 노르빅신의 양은 HPLC (Agilent 1100 Series; Agilent Technologies, Germany)를 이용하여 측정하였다. HPLC 이동상으로 증류수에 녹인 1% 아세트애씨드(A)와 100% 아세트니트릴(B)을 사용하였다. 용매는 A : B = 50 : 50 (v/v)의 비율로 시

작하여 15 min까지 5 : 95 (v/v)로 변화시키고 5 min 동안 유지 후, 25 min에 다시 초기 상태로 돌아오도록 조건을 설정하였다. 노르빅신은 시료 주입량 50  $\mu$ L, 유속 0.5 mL/min, 28  $^{\circ}$ C의 컬럼 온도 조건으로 458 nm의 검출 파장에서 분석하였다. 분석 컬럼으로 HPLC packed column C<sub>18</sub> (4.6 mm ID  $\times$  150 mm  $\times$  5  $\mu$ M, Shiseido, Japan)을 사용하였다.

### 2.8. 통계처리

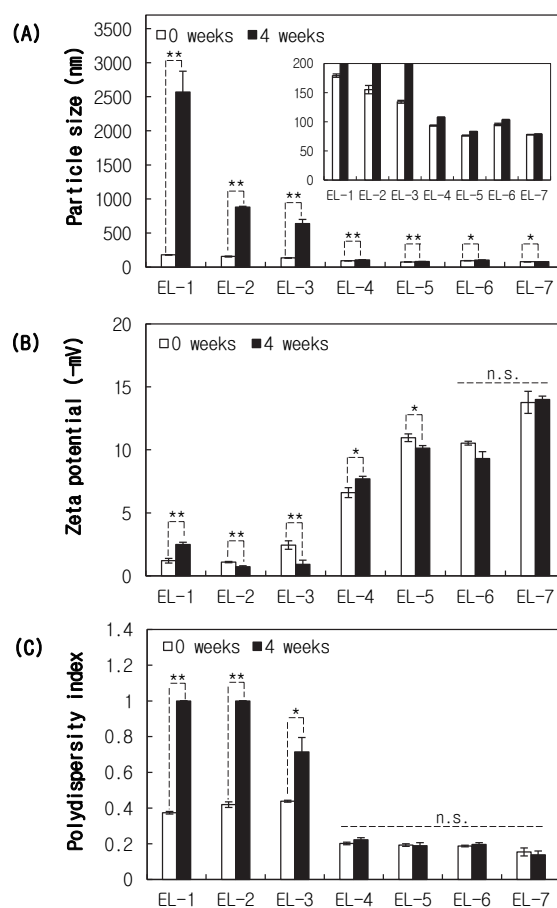
모든 실험 결과는 3 회 이상 분석하였으며 평균  $\pm$  표준편차로 나타냈다. 각 실험군의 유의차는 student's *t*-test로 95% 유의수준에서 검정하였고, 세 군 이상의 다중 비교는 일원 배치 분산 분석(One-way ANOVA)을 사용하였고 (SPSS Inc, USA), 사후 검정은 Tukey's honestly significant difference test를 사용하여 95% 유의수준에서 검정하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. SS에 의한 탄성 리포솜의 안정성 변화

본 연구에서는 리포솜의 가변형성을 증가시키기 위해 사용된 계면활성제가 탄성 리포솜의 안정성에 미치는 영향을 확인하였다. 노르빅신은 첨가하지 않고 최종 농도가 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5 및 2.5 mg/mL이 되도록 SS만 첨가하여 탄성 리포솜(elastic liposomes, EL-1 ~ 7)을 제조한 후 4  $^{\circ}$ C, 4 주 동안 리포솜 막의 물리적 안정성의 중요한 지표로 작용하는 입자 크기, 제타 전위 및 PDI 값의 변화로 안정성을 평가하였다. 0 주차일 때 EL-1으로부터 EL-7까지의 입자 크기는 SS의 함량이 증가함에 따라 각각 179.1, 155.2, 134.4, 93.5, 76.4, 95.4 및 77.9 nm로 입자 크기가 점점 감소하는 경향을 나타냈다(Figure 2A). 이는 SS가 리포솜의 지질 이중층을 안정화시키고, 지질 입자들 간의 응집을 촉진시켜 안정한 리포솜 형성을 도와 입자 크기의 감소에도 기여하는 것으로 사료된다. 리포솜 표면의 정전기적 반발력인 제타 전위는 절대 값이 높을수록 안정적이고 유동성, 투과성 및 세포막과의 상호작용에서 약물 전달 효율을 증가시킨다. EL의 제타 전위는 SS의 함량이 증가함에 따라 증가하는 것으로 나타났지만(Figure 2B), 평균이 1.2 ~ 13.8 (-mV)로 SS는 친수성과 친유성을 가진 양친매성 물질로 비이온성 계면활성제이지만 OH가 증류수에 의해 용해되어 부분 음전하를 띄어 표면 전하에 기여한 것으로 사료된다. EL의 PDI 값은 EL-1 ~ 3에서는 0.3 이상으로 리

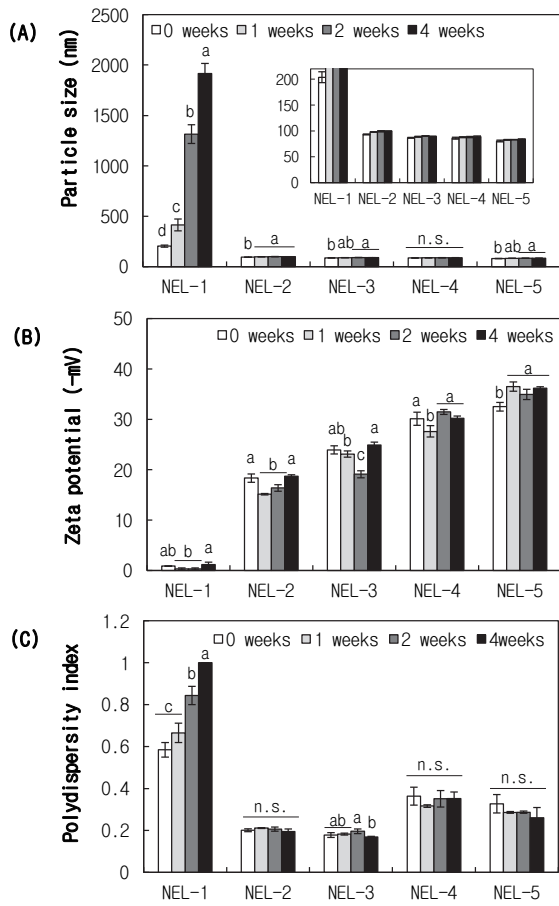
포솜의 크기 분포가 불균일하였으며, SS의 함량이 0.75 mg/mL 이상 존재하는 제형에서는 PDI 값이 0.3 미만으로 입자가 단분산된 형태로 나타났다(Figure 2C). 이는 SS의 함량이 0.75 mg/mL 이상으로 존재할 때 단분산 형태를 나타내는 것으로 판단된다. 4  $^{\circ}$ C에서 4 주 동안 보관한 후에 비교한 결과, EL-1 ~ 3의 제형에서 입자 크기와 PDI 값이 크게 증가하였으나, EL-4 ~ 7의 제형에서는 0 주차와 비교했을 때 유의미한 변화가 관찰되지 않았다. 제타 전위 변화는 모든 시료에서 제조 직후와 큰 차이를 보이지 않았다. 따라서 4  $^{\circ}$ C, 4 주 동안 노르빅신이 담지되지 않은 탄



**Figure 2.** Changes in size, zeta potential, and polydispersity index of elastic liposomes by sucrose stearate at 4  $^{\circ}$ C for 4 weeks. The size (A), zeta potential (B), and polydispersity index (C) of norbixin-free elastic liposomes composed of different concentrations of sucrose stearate (0.25 ~ 2.5 mg/mL) were evaluated at 0 and 4 weeks at 4  $^{\circ}$ C. Each value represents the mean  $\pm$  SD (N = 3). Significant differences from each other were determined by student's *t*-test (\**p* < 0.01, \*\**p* < 0.05). \*n.s.; not significant.

성 리포솜의 안정성은 SS의 함량이 0.75 mg/mL 이상 존재할 때 제형의 안정성이 유지됨을 확인할 수 있었다. 이후, 서로 다른 농도의 SS (0.25, 0.5, 0.75 및 1 mg/mL)에 노르빅신의 농도를 최종 0.15 mg/mL로 하여 담지한 탄성 리포솜(NEL-1 ~ 5)을 제조한 후 위와 같은 방법으로 안정성을 확인하였다. 0 주차일 때 NEL 또한 SS의 함량이 증가할수록 제형별 입자 크기는 203.8, 93.2, 86.8, 86.1 및 80.6 nm로 감소하였고(Figure 3A), 제타 전위는 0.9, 18.3, 23.9, 30.1 및 32.5 (-mV)로 증가하였다(Figure 3B). SS의 함량이 1

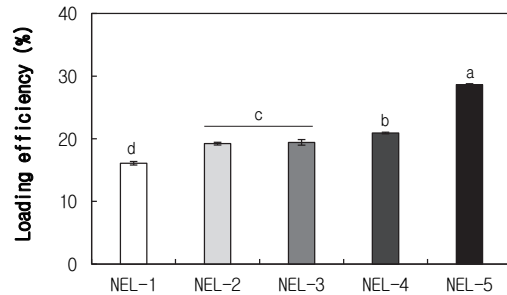
mg/mL이 존재하는 탄성 리포솜인 NEL-5에서 가장 작은 입자 크기(80.6 nm), 높은 제타 전위(-32.5 mV)가 관찰되었다. 탄성 리포솜에 노르빅신을 담지하였을 때, EL과 비교하면 제타 전위가 크게 증가하는 것으로 관찰되었다. 제타 전위는 리포솜 외부막에 존재하는 전하의 분포로 결정된다. 노르빅신은 공액 이중 결합으로 구성된 사슬 양 말단이 카복실기(COOH)로 구성되었으며 주변의 물과 반응하였을 때 그 일부는 수소 이온(H<sup>+</sup>)이 방출되어 음전하(COO<sup>-</sup>)를 띠게 된다. 따라서 음이온을 띠는 노르빅신이 리포솜 외부막에 존재하여 음전하를 증가시켰으며, 이로 인해 NEL의 제타 전위가 증가되었으므로 판단된다. PDI 값은 NEL-1에서만 0.3 이상으로, 나머지 제형에서는 0.3 미만으로 관찰되었다(Figure 3C). 4 °C에서 4 주 동안 NEL의 안정성을 비교한 결과, NEL-1의 제형에서만 입자 크기와 PDI 값이 시간에 따라 증가함이 관찰되었으며, 나머지 제형에서는 유의적인 변화가 관찰되지 않았다. NEL의 제타 전위 변화는 EL과 마찬가지로 제조 직후와 4 주 동안의 안정성을 비교했을 때 큰 차이가 나타나지 않았다. 따라서 노르빅신을 담지한 탄성 리포솜은 SS의 함량이 증가함에 따라 보다 안정한 형태로 유지되는 것으로 확인하였다.



**Figure 3.** Changes in size, zeta potential, and polydispersity index of norbixin-loaded elastic liposomes by sucrose stearate at 4 °C for 4 weeks. The size (A), zeta potential (B), and polydispersity index (C) of norbixin-loaded (0.15 mg/mL) elastic liposomes composed of different concentrations of sucrose stearate (0.25 ~ 1 mg/mL) were evaluated at 0, 1, 2, and 4 weeks at 4 °C. Each value represents the mean ± SD (N = 3). Different letters (a ~ d) indicate a significant difference ( $p < 0.05$ ) based on one-way ANOVA with Tukey's HSD test. \*n.s.; not significant.

### 3.2. SS에 의한 노르빅신 포집 효율 변화

본 연구는 SS의 함량에 따른 탄성 리포솜 내 포집된 노르빅신을 정량하였다. 노르빅신을 방출하기 위해 각 시료를 에탄올과 1 : 1 (v/v)로 혼합하여 리포솜의 지질 이중층을 과도하게 팽창시켜 파괴하였으며, 방출된 노르빅신은



**Figure 4.** Changes in norbixin encapsulation efficiency of elastic liposomes by sucrose stearate. The encapsulation efficiency of norbixin-loaded elastic liposomes in different concentrations of sucrose stearate (0.25 ~ 1 mg/mL) was determined. Each value represents the mean ± SD (N = 3). Different letters (a ~ d) indicate a significant difference ( $p < 0.05$ ) based on one-way ANOVA with Tukey's HSD test.

농도 별 노르빅신 검량 곡선을 이용하여 환산하였다. 제형 (NEL-1 ~ 5) 내 노르빅신의 포집 효율은 SS의 함량이 증가함에 따라 각각 16.1, 19.2, 19.4, 20.9 및 28.6 %로 나타났다(Figure 4). 즉 처음에 첨가한 0.15 mg/mL의 노르빅신과 비교하여 환산했을 때는 24.15, 28.8, 29.1, 31.3 및 42.9  $\mu\text{g/mL}$ 임을 확인하였다. 따라서 SS의 함량이 증가함에 따라 탄성 리포솜 내 담지 되는 노르빅신의 양이 증가함이 관찰되었다. 이는 SS가 탄성 리포솜 내로 노르빅신을 담지 하는데 기여한 것으로 판단된다. 하지만 대체로 일반 탄성 리포솜의 포집효율과 비교해서는 포집율이 크지 않았다 [6,7,29]. 그 이유로는 첫째 탄성 리포솜에 포집되는 SS의 농도가 탄성 리포솜이 담지할 수 있는 양을 벗어나면 SS는 수용액으로 나와 마이셀 등의 수용성 입자를 형성할 수 있고 그곳에 노르빅신을 포집하는 경우, 둘째는 리포솜 막에 담지되고 남은 노르빅신이 일부 친수성으로 물에 녹는 경우와 노르빅신 자체의 소수성 부분과 사슬 양쪽의 친수성 작용기로 인한 자가 조립에 의한 리포솜 유사 지질막인 lipid nanoparticle의 형성에 의해서 포집효율이 비교적 작게 나올 수 있는 가능성이 있다고 사료된다[30,31].

### 3.3. 탄성 리포솜의 가변형성에 미치는 SS의 영향

리포솜 막은 계면활성제에 의해 탄성을 가지게 되어 탄성 리포솜 고유의 독특한 가변형성을 가지게 된다. 가변형성은 외부 환경에 따라 리포솜의 크기와 모양이 변형되는 성질이며, 높은 가변형성을 가진 탄성 리포솜은 일반 리포솜에 비해 각질층을 보다 쉽게 통과하여 피부 투과도를 증가시키는 것으로 보고된 바 있다[32,33]. 따라서 본 연구에서는 노르빅신을 담지한 탄성 리포솜의 피부 투과도를 증가시키기 위해 계면활성제인 SS의 함량에 따른 가변형성 지수를 평가하였다(Table 2). 그 결과, SS의 함량이 증가함에 따라 각 가변형성 지수는 증가하였으며, 탄성 리포솜

제형인 NEL-1 ~ 5는 각각 7.32, 9.68, 10.85, 11.54 및 16.15의 가변형성 지수로 측정되었다. 따라서 노르빅신을 담지한 탄성 리포솜은 계면활성제인 SS의 함량이 증가할수록 가변형성 지수가 증가하는 것으로 관찰됨에 따라 피부 투과 효과에 대해 높은 투과도를 나타낼 것으로 사료된다. 이후 피부 투과 실험에서는 가변형성 지수가 가장 높은 NLE-5를 설정하여 평가하였다.

### 3.4. 탄성 리포솜에 담지된 노르빅신의 광안정성 변화

노르빅신은 빛에 의해 분해되면 색과 화학적 특성이 저하되어 제품에 사용되었을 때 품질 저하를 초래하는 것으로 보고된 바 있다[34]. 리포솜은 색소의 광안정성을 향상시킬 수 있다고 보고된 바 있으므로[35], 본 연구에서는 탄성 리포솜에 노르빅신을 담지했을 때, 빛에 의한 안정성을 평가하였다. 탄성 리포솜에 담지된 노르빅신의 흡수 spectrum의 변화를 350 ~ 600 nm에서 분석한 결과(Figure 5A), 리포솜에 담지 되지 않았을 때 노르빅신의 광 흡수 피이크는 450과 480 nm 영역에서 관찰되었으나, 리포솜에 담지된 노르빅신의 피이크는 460과 490 nm로 흡수 피이크가 장파장으로 레드 시프트(Red shift)가 나타났다. 리포솜에 담지된 노르빅신의 레드 시프트는 흡수 피이크가 장파장 쪽으로 이동하여 흡수되는 빛의 파장이 길어지고 빛의 에너지가 낮아지게 되므로 더 안정적으로, 특히 피부에 대한 청색광 등의 광학적 또는 화학적 손상으로부터 보호될 수 있다.

본 연구에서는 암소와 빛 조건 아래에서 리포솜 내의 담지된 노르빅신의 광안정성을 최대 흡수 피이크인 460 nm에서 평가하였다. 노르빅신과 이를 담지 한 탄성 리포솜의 포집 효율을 고려하여 최종 농도가 30  $\mu\text{g/mL}$ 이 되도록 희석 후, 8 h 동안 암소와 앞선 실험에서 가장 강한 탈색을 유도한 blue LED (10 W/m<sup>2</sup>) 아래에서 반응시켰다. 그 결과 리포솜에 담지 되지 않은 노르빅신이 8 h 동안 암소에서 19.3% (Figure 5B), blue LED 아래에서는 66.5%가 감소하였으며(Figure 5C), 리포솜에 담지된 노르빅신에 비해 더 빠른 탈색이 유도되는 것으로 관찰되었다. 탄성 리포솜에 담지된 노르빅신의 함량은 8 h 동안 암소에서 SS 함량 증가에 따라 97.3, 89.2, 88.6, 95.3 및 95.3 %이었으며, blue LED 아래에서는 그 함량이 63.8, 47.7, 50.1, 55.4 및 48.3 %로 관찰되었으며 SS에 따른 큰 유의미한 변화는 관찰되지 않았다. 따라서 본 결과는 전반적으로 볼 때 리포솜이 노르빅신의 레드 시프트를 유도하여 광안정성 증가에 영향을 미치고 있음을 시사한다.

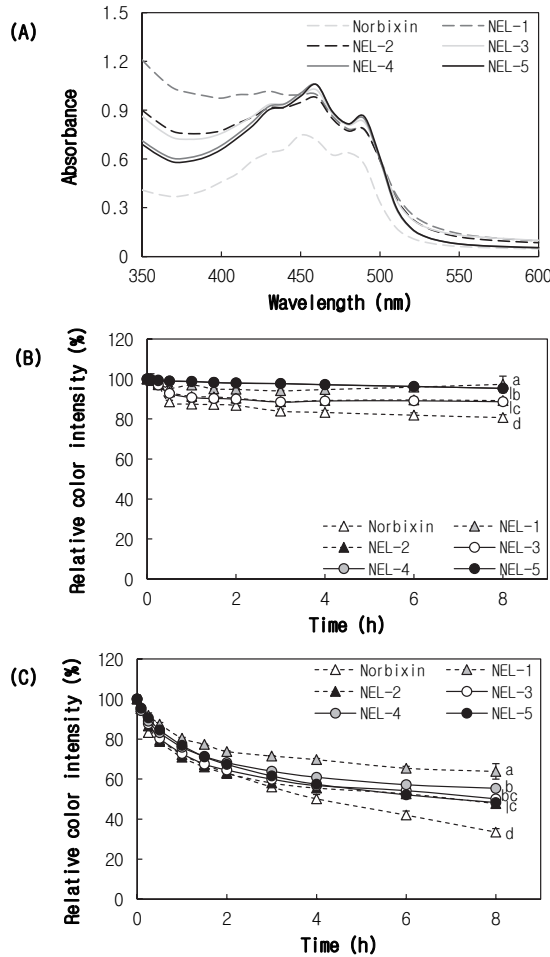
**Table 2.** Deformability of Liposomes Containing Norbixin

Formulation code <sup>1)</sup>	Deformability index
NEL-1	7.32 ± 0.36
NEL-2	9.68 ± 0.26
NEL-3	10.85 ± 0.45
NEL-4	11.54 ± 0.33
NEL-5	16.15 ± 0.11

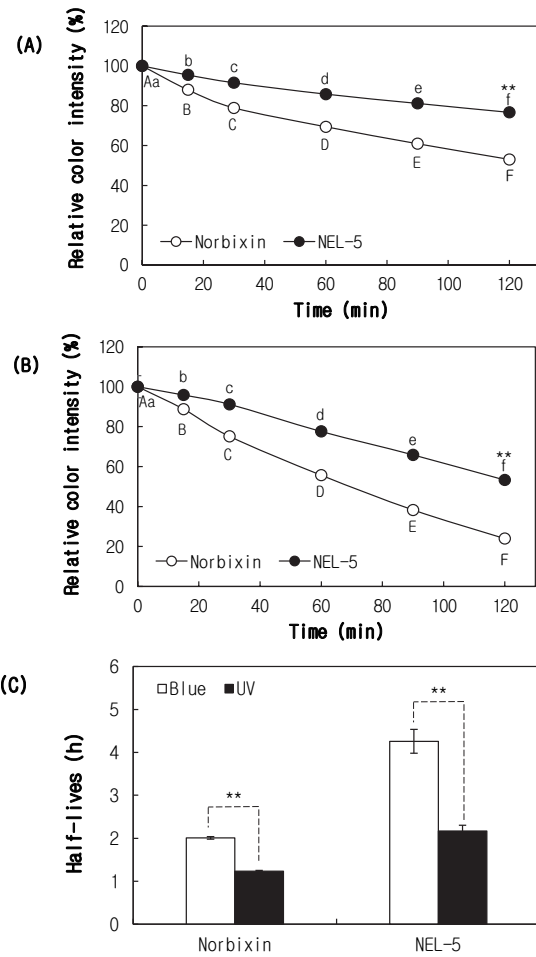
<sup>1)</sup> Norbixin loaded elastic liposomes were prepared with different concentrations of sucrose stearate (0.25 ~ 1 mg/mL) to evaluate their deformability.

이전 결과에 따르면 노르빅신이 함유되지 않은 탄성 리포솜의 제타 전위는 최대 -13.8 mV였으나, NEL의 제타 전위는 최대 -32.5 mV로 2 배 이상 증가하였다. 앞선 실험대로 제타 전위는 리포솜 외부막에 존재하는 전하의 분포로 결정되므로 노르빅신이 탄성 리포솜에 담지될 때 지질 이중층에도 위치할 것으로 판단된다. 만약 탄성 리포솜 내

노르빅신이 외부막에 존재할 때, blue LED보다 파장의 길이가 더 짧은 UV에 의해 탈색이 가속화될 것이라고 예상하였다. 노르빅신 단독과 NEL-5를 10 W/m<sup>2</sup>의 blue LED (Figure 6A)와 0.2 W/m<sup>2</sup>의 UV (Figure 6B)에서 120 min 동안 평가하였다. 그 결과, blue LED 아래에서 리포솜에 담지되지 않은 노르빅신은 46.9 %, NEL-5에 있는 노르빅신



**Figure 5.** Effect of different formulations on the absorbance spectrum and photostability of norbixin-loaded elastic liposomes. Changes in the absorption spectra of norbixin loaded in liposomes were scanned in the range of 400 ~ 600 nm (A). Norbixin (30  $\mu\text{g/mL}$ ) and the equal amount of norbixin entrapped in elastic liposomes were incubated in dark (B) or under blue LED (10  $\text{W/m}^2$ , C), and changes in color intensity of the norbixin were analyzed at 450 nm during 8 h at 25  $^{\circ}\text{C}$ . Each value represents the mean  $\pm$  SD (N = 3). Different letters (a ~ d) indicate a significant difference ( $p < 0.05$ ) based on one-way ANOVA with Tukey's HSD test (in B and C).



**Figure 6.** Changes in photostability of norbixin and norbixin in elastic liposome by blue LED or UV. Norbixin (30  $\mu\text{g/mL}$ ) and NEL-5 were incubated under blue LED (10  $\text{W/m}^2$ , A) and UV (0.2  $\text{W/m}^2$ , B). Changes in the color intensity of norbixin were analyzed at 450 nm during 2 h at 25  $^{\circ}\text{C}$ . The half-lives for norbixin color intensity were also calculated (C). Each value represents the mean  $\pm$  SD (N = 3). Significant differences from each other were determined by student's *t*-test ( $p < 0.05$  in A, B, and C). Different letters (a ~ f and A ~ F) indicate a significant difference ( $p < 0.05$ ) based on one-way ANOVA with Tukey's HSD test (in A and B).



은 23.36 %가 감소하였으며, UV 조사에서는 담지되지 않은 노르빅신이 76.1 % NEL-5 제형에서는 46.76 % 감소되었다. 따라서 탄성 리포솜 내 담지된 노르빅신이 단독으로 존재할 때에 비해 탈색이 현저히 억제되었다. 각 조사 조건에서 노르빅신 탈색이 50% 진행된 시간(half-life)을 산출한 결과, blue LED와 UV에서 노르빅신은 각각 2 h와 1.2 h, NEL-5는 4.3 h와 2.2 h가 산출되었다(Figure 6C). 따라서 blue LED 및 UV 조사시 리포솜없이 노르빅신을 단독으로 사용한 경우에 비교하여 탄성 리포솜 제형(NEL-5)의 막에 존재하는 노르빅신의 반감기가 두배 정도 모두 길었다. 이는 탄성 리포솜 제형(NEL-5)에 담지된 노르빅신이 청색광과 자외선 조사에 대해 훨씬 더 안정함을 시사한다.

### 3.5. 탄성 리포솜에 담지된 노르빅신의 항산화 활성 변화

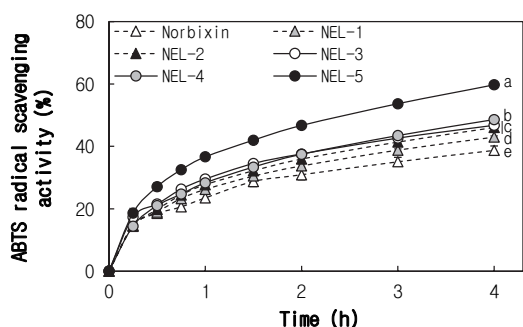
노르빅신은 이전 연구 결과에 따르면 라디칼 제거 및 금속 이온의 킬레이팅으로 항산화 활성을 가지며, 이로 인해 세포 보호 및 산화적 스트레스를 억제할 수 있다[36]. 이러한 노르빅신은 화장품과 식품 산업에서 제품의 항산화제로도 사용될 수 있다[37]. 리포솜 내 담지된 항산화제는 라디칼부터 보호되어 분해되거나 손상될 가능성이 감소함에 따라 항산화 활성이 지속적으로 유지될 수 있음이 보고된 바 있다[38]. 항산화제가 리포솜에 담지되었을 때는 초기 활성은 낮을 수 있으며, 담지 되지 않은 항산화제는 단기적인 효과가 기대되지만, 저장 기간이 길어질수록 산화에 의해 제품 품질이 저하될 수 있다. 그러나 지속적

인 항산화 활성을 가진 항산화제가 제품에 적용되면 저장 기간 동안 제품의 안정성이 더 긴 시간 유지되어 제품의 유통기한을 연장할 수 있으며, 산화로 인한 변질이 최소화될 수 있다. 따라서 제품의 항산화제는 초기 활성이 낮을 수 있음에도 불구하고 장기간 지속적으로 유지되는 것이 더 효과적임을 시사한다. 따라서 본 연구에서 상온, 암소 조건에서 최대 4 h 동안 탄성 리포솜 내에 담지된 노르빅신의 항산화 활성 변화를 ABTS 라디칼 소거 활성을 통해 분석하였다(Figure 7). 4 h 동안 측정된 결과, 노르빅신의 라디칼 소거 활성은 시간이 지남에 따라 증가되는 것으로 관찰되었다. 그중에서도 NEL에 비해 담지 되지 않은 노르빅신의 항산화 활성은 38.71%로 가장 낮은 라디칼 소거 활성을 나타내었다. NEL은 SS 함량이 증가함(0.25 ~ 1 mg/mL, NEL-1 ~ 5)에 따라 누적 항산화 활성이 각각 42.98, 46.04, 46.78, 48.60 및 59.71%로 측정되었으며, 탄성 리포솜에 담지된 노르빅신의 항산화 활성이 더 높고 지속적이며 안정적으로 유지됨이 확인되었다. 담지되지 않은 노르빅신의 초기 활성이 NEL과 유의미한 차이가 관찰되지 않은 이유는, 광안정성을 평가한 결과, 노르빅신이 지질 이중층에도 위치할 가능성을 시사하기 때문이다. 따라서 본 결과는 탄성 리포솜에 담지되었을 때 노르빅신의 항산화 활성이 지속적으로 증가하며, SS의 함량이 증가함에 따라 노르빅신의 항산화 활성을 지속시키는데 영향을 미치는 것으로 시사된다.

### 3.6. 탄성 리포솜의 *In Vitro* 피부 투과 효과

피부의 가장 최외곽 층인 각질층은 죽은 각질 세포가 겹겹이 쌓인 구조로, 외부 환경으로부터의 보호막 역할을 한다. 그러나 이는 피부 내로 특정 유효 성분의 투과를 어렵게 하므로, 피부 투과 효율을 개선하기 위해 인지질과 계면활성제로 구성되어 가변형성을 높인 탄성 리포솜이 연구되고 있다[6,7]. 화장품 산업에서 동물 실험은 화장품의 안정성과 효능 평가를 위해 오랜 기간 동안 진행되었지만, 동물 윤리와 소비자들의 부정적인 시선으로 인해 최근 여러 나라에서 동물 실험을 실시한化妆품을 금지하고 있다. 이로 인해 다양한 대체 시험법들이 개발되고 있으며, 그중에서 Franz diffusion cell은 유효 성분의 경피 흡수 속도를 측정하여 피부 투과 효율을 평가하는 시스템이다[39].

따라서 본 연구에서는 항노화, 미백 및 보습 등의 효과가 알려진 노르빅신의 피부 흡수 증진을 위해 탄성 리포솜 경피 전달 시스템을 개발하여 기존 전달 시스템과 비교하고자 Franz diffusion cell을 이용하여 피부 투과도를 평가하

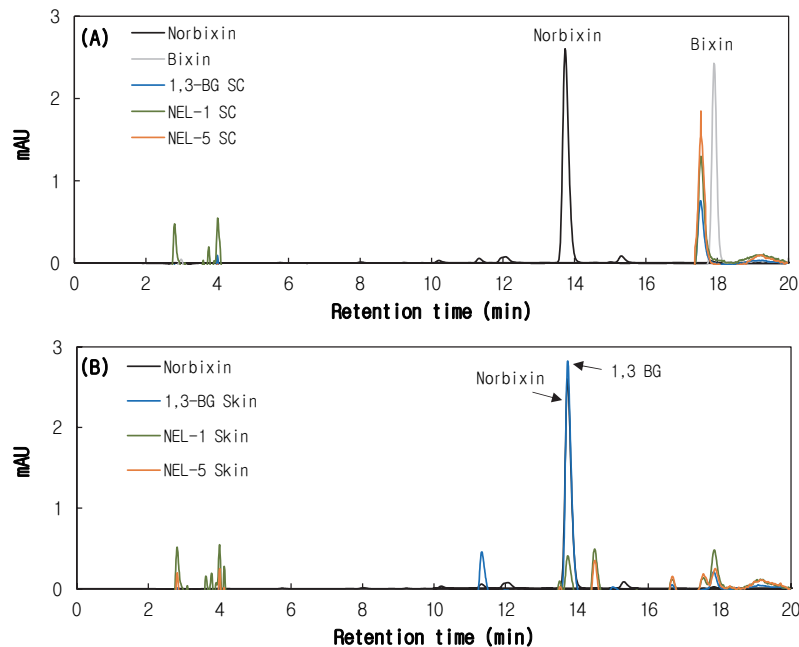


**Figure 7.** Changes in antioxidant activity of norbixin-loaded elastic liposomes over time. ABTS radical scavenging activities of norbixin only (30  $\mu$ g/mL) and the equal amount of norbixin entrapped in elastic liposomes during 4 h-storage in the dark were analyzed. Each value represents the mean  $\pm$  SD (N = 3). Different letters (a ~ e) indicate a significant difference ( $p < 0.05$ ) based on one-way ANOVA with Tukey's HSD test.

였다. 이전 결과에서 높은 가변형성과 물리화학적으로 가장 안정적이었던 1 mg/mL 농도의 SS를 첨가한 제형인 NEL-5를 제조하여 피부 투과 실험에 사용하였으며, 대조군으로는 SS를 첨가하지 않은 NEL-1과 화장품에 사용되는 대표적인 용제로 보습 효과와 피부 자극은 거의 없지만 피부 침투력이 낮고 시간이 지남에 따라 분해되어 안정성이 고려되는 1,3-부틸렌글라이콜(1,3-butylene glycol, 1,3-BG)을 사용하였다. 본 실험에 사용된 제형들은 합성 피부막에 도포된 후 12 h 동안 밀폐된 조건 하에서 진행되었다. 이후 합성 피부막에 잔류한 노르빅신의 양은 자외부흡광검출기(diode array detector, DAD)를 이용하여 HPLC로 평가하였다. HPLC/DAD 분석 시스템에서 노르빅신의 검출 파장은 458 nm이다. HPLC 크로마토그램에서 5 min 이전으로 검출된 피이크는 피부 투과의 용매로 사용된 receptor phase이며, 노르빅신의 피이크는 13.8 min에서 검출되었다. 그러나 합성 막의 최상층(각질층)에 투과된 노르빅신을 분석한 결과, 모든 제형(1,3-BG, NEL-1, NEL-5)들은 노르빅신 피이크가 13.8 min이 아닌 17.5 min에서 나타났다(Figure 8A). 안나토 색소 중 또 다른 성분인 노르빅신의 메틸에스테르 노르빅신보다도 소수성이 큰 빅신은 17.8 min에서 피이크

가 나타났다. 따라서 합성 피부막의 최상층(각질층)에 투과된 노르빅신(17.5 min)은 빅신(17.8 min)과는 소수성 또는 분자 구조에 차이가 있음을 알 수 있으나 그 소수성이나 일부 구조적 특성에 있어서 유사한 점이 있을 수도 있다고 판단된다. 따라서 탄성 리포솜 내의 노르빅신이 합성 피부막을 통과하면서 합성 막의 최상층(각질층)을 이루는 폴리에테르설폰 구조와의 상호 작용에 의한 특정 구조로의 이성질화에 의한 이성질체 생성 가능성, 그리고 각질층을 tape stripping으로 떼어내는 과정에서 노르빅신과 테이프의 접착 분자와의 상호 작용에 의한 특정 복합체 형성과 그 결과로 HPLC에서 17.5 min의 피이크와 관련이 있는지는 추적해서 과학적인 근거를 제시할 필요가 있다고 사료된다.

최상층을 제외한 합성 피부막에서 위와 같은 방법으로 평가한 결과, 1,3-BG, NEL-1 및 NEL-5은 여러 작은 피이크들이 검출되었으며, 1,3-BG에서만 13.8 min에서 노르빅신의 피이크가 정확히 관찰되었다(Figure 8B). 1,3-BG에 용해된 노르빅신은 용매의 성질로 인하여 탄성 리포솜과 달리 노르빅신이 용매와 친화성이 커서 합성 피부막의 폴리에테르설폰과의 소수성 인력이나 수소결합 인력을 압도함으로써 피부 깊숙이 들어갈 수 있고 쉽게 용매로 추출되어



**Figure 8.** Distribution of norbixin and its related compounds in the different skin membrane layers. The skin membrane was loaded with 1,3-BG solution containing norbixin, NEL-1, and NEL-5 and permeabilized for 12 h at 37 °C. Transmitted levels of norbixin or its related compounds in the skin membrane consisting of stratum corneum (SC, A) and epidermis without SC plus dermis (B) were analyzed using the HPLC/DAD.

어떠한 구조적 변화도 없이 HPLC 머무름 시간 13.8 min에 정확하게 나타난 것으로 판단된다. 기타 HPLC 크로마토그램은 가시광선 영역에서 여러 작은 피이크들이 검출되었는데, 이는 실험 과정에서 극히 일부 노르빅신의 이성질체들 또는 유도체가 생성될 수도 있음을 시사한다고 사료된다. 특히 노르빅신은 매우 민감한 분자로 자외선, 청색광 또는 가시광선 조사, 가열(105 °C), 전자레인지(라디오파), TiO<sub>2</sub>, 실리카겔 등의 극성 나노입자와의 상호 작용으로 9'-cis, 9',13'-bis-cis, 9',13-bis-cis, 13-cis, all-trans 등 다양한 이성질체로 존재할 수 있다. 또한 노르빅신은 소수성 사슬과 양쪽 친수성 작용기로 자가 조립 또는 다른 생체 고분자나 화합물과 복합체 형성도 가능한 물질이라는 특성이 있다[31,40].

또한, 합성 피부막을 이용하여 탄성 리포솜의 투과 실험 결과, 노르빅신이 합성 피부막을 거의 투과하지 못하여 최상층에만 머물러 있음이 관찰되었다. 합성 피부막의 폴리에테르설폰은 폐닐기의 강력한 소수성 성질과 설폰기의 산소에 있는 친수성기로 피부 각질층과 소수성 성질이 유사하여 투과 실험에 활용된다. 이러한 구조를 가진 합성 피부막이 노르빅신과의 강력한 상호작용으로 인해 막을 통과하지 못하고 머물러 있을 것으로 추정된다. 이러한 이유로 인해 노르빅신의 피이크가 최상층에서만 관찰되고, 이는 리포솜이 더 깊은 층으로 노르빅신을 운반하지는 못함을 의미한다. 따라서 이러한 합성 피부막은 인체 피부 각질층으로 대변되는 소수성 성질과 비슷한 폴리에테르설폰을 사용하였지만, 본 연구에서 추구하는 노르빅신의 피부 흡수능 측정에는 적합하지 않은 점도 있다고 사료된다. 추후 표피 세포나 섬유아세포 등으로 구성된 인공 피부 모델이나 사람 피부 조직으로 피부 투과 실험이 이루어져야 피부 투과능에 대한 정확한 정보를 얻을 수 있음을 본 연구 결과는 시사한다.

#### 4. 결 론

본 연구에서는 SS를 계면활성제로 이용하여 NEL을 제조하였으며, SS 함량에 따른 물리·화학적 특성과 피부 투과 증진 효과에 대해 평가하였다. 노르빅신이 탄성 리포솜 내로 담지되면 피이크가 장파장으로 이동하는 것이 관찰되었다. SS 함량 증가에 따른 안정성을 측정한 결과, 노르빅신을 담지하지 않은 EL의 경우, 사이즈 감소 및 제타 전위 증가가 관찰되었으며, 이는 NEL에서도 마찬가지로 관

찰되었지만, 제타 전위는 약 2 배 정도 높게 측정되어 노르빅신이 제타 전위 증가에 영향을 미치는 것으로 확인되었다. 4 °C에서 4 주 동안의 안정성을 측정한 결과, SS의 함량이 증가할수록 EL은 0.5 mg/mL 이하의 SS 조건에서, NEL은 SS가 첨가되지 않은 리포솜에서만 입자 크기 및 PDI의 증가가 관찰되었으며, 제타 전위의 유의미한 변화는 나타나지 않았다. NEL은 SS 증가에 따라 노르빅신의 포집량과 탄성 리포솜의 가변형성이 증가하였다. 빛 조사 시 탄성 리포솜 내 노르빅신의 광안정성을 blue LED 하에서 평가한 결과, 담지되지 않은 노르빅신에 비해 광안정성이 증가하였으나, SS 함량에 따른 농도 의존적인 결과는 관찰되지 않았다. 노르빅신의 항산화 활성은 초기에는 노르빅신 단독과 탄성 리포솜에 담지되었을 때 유의적인 차이가 나타나지 않았지만, SS가 증가함에 따라 시간이 지날수록 활성은 지속적으로 증가하였다. 피부 투과 정도를 평가하기 위해, 높은 가변형성과 물리화학적으로 가장 안정적이었던 1 mg/mL 농도의 SS를 첨가한 NEL-5와 SS가 존재하지 않은 NEL-1, 대조군인 1,3-BG로 피부 투과를 진행하여 HPLC로 분석한 결과, 노르빅신이 피부막을 통과하면서 비극성 구조로 변화된 것으로 관찰되었으며, NEL-5 제형에서 노르빅신이 각질층에 가장 많이 존재하였으며, 이를 제외한 피부 층에서는 1,3-BG 용액일 때 가장 많이 존재하였다. 본 연구 결과는 SS를 계면활성제로 노르빅신을 탄성 리포솜에 담지하였을 때 물리화학적 특성과 생리활성변화 및 피부 투과에 미치는 영향에 대해 평가하였으며, 노르빅신은 탄성 리포솜으로 인해 노르빅신의 산화와 같은 부정적인 변화를 보완할 수 있음을 시사하고 있다.

#### Acknowledgement

본 연구는 과학기술정보통신부의 재원의 한국연구재단 일반(2021R1F1A105146612) 및 중견연구자(RS-2024-00345102) 지원사업의 지원에 의해 수행되었음.

#### References

1. G. Honari, R. Andersen, and H. L. Maibach, Skin structure and function, 16, *Sensitive skin syndrome*, CRC Press, Boca Raton, (2017).
2. I. Hatta, Stratum corneum structure and function studied by X-ray diffraction, *Dermato*, **2**(3), 79 (2022).

3. J. van Smeden, M. Janssens, G. S. Gooris, and J. A. Bouwstra, The important role of stratum corneum lipids for the cutaneous barrier function, *BBA-Mol. Cell Biol. L.*, **1841**(3), 295 (2014).
4. D. Guimarães, A. Cavaco-Paulo, E. Nogueira, Design of liposomes as drug delivery system for therapeutic applications, *Int. J. Pharm.*, **601**, 120571 (2021).
5. M. J. Choi and H. I. Mailbach, Elastic vesicles as topical/transdermal drug delivery systems, *Int. J. Cosmet. Sci.*, **27**(4), 211 (2005).
6. S. B. Han, S. S. Kwom, Y. M. Jeong, B. J. Kong, E. R. Yu, and S. N. Park, Physical characterizations and *in vitro* skin permeation of elastic liposomes for transdermal delivery of *Polygonum aviculare* L. extract, *Polymer(Korea)*, **38**(6), 694 (2014).
7. M. S. Lim, S. B. Han, S. S. Kwon, M. A. Park, and S. N. Park, Elastic liposome formulation for transdermal delivery of rutin, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **38**(2), 147 (2012).
8. S. Chen, S. Hanning, J. Falconer, M. Locke, and J. Wen, Recent advances in non-ionic surfactant vesicles (niosomes): Fabrication, characterization, pharmaceutical and cosmetic applications, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **144**, 18 (2019).
9. S. Sugumar, S. Singh, A. Mukherjee, and N. Chandrasekaran, Nanoemulsion of orange oil with non ionic surfactant produced emulsion using ultrasonication technique: evaluating against food spoilage yeast, *Appl. Nanosci.*, **6**, 113 (2016).
10. A. Shimazaki, J. J. Sakamoto, M. Furuta, and T. Tsuchido, Antifungal activity of diglycerinester of fatty acids against yeasts and its comparison with those of sucrose monopalmitateand sodium benzoate, *Biocontrol Sci.*, **21**(2), 123 (2016).
11. L. Shi, J. Ding, and D. Liang, Enhanced CH<sub>4</sub> storage in hydrates with the presence of sucrose stearate, *Energy*, **180**, 978 (2019).
12. N. Garti, A. Aserin, and M. Fanun, Non-ionic sucrose esters microemulsions for food applications. Part 1. Water solubilization, *Colloids Surf. A*, **164**(1), 27 (2000).
13. A. Szűts and P. Szabó-Révész, Sucrose esters as natural surfactants in drug delivery systems-A mini-review, *Int. J. Pharm.*, **433**(1-2), 1 (2012).
14. A. K. Dąbrowska, F. Spano, S. Derler, C. Adlhart, N. D. Spencer, and R. M. Rossi, The relationship between skin function, barrier properties, and body-dependent factors, *Skin Res. Technol.*, **24**(2), 165 (2017).
15. A. Kammeyer and R. M. Luiten, Oxidation events and skin aging, *Ageing Res. Rev.*, **21**, 16 (2015).
16. K. J. Kim, S. H. Xuan and S. N. Park, Licoricidin, an isoflavonoid isolated from *Glycyrrhiza uralensis* Fisher, prevents UVA-induced photoaging of human dermal fibroblasts, *Inter. J. Cosmet. Sci.*, **39**(2), 133 (2017).
17. M. Rimmerthaler, J. Bischof, M. K. Streubel, A. Trost, and K. Richter, Oxidative stress in aging human skin, *Biomolecules*, **5**(2), 545 (2015).
18. B. L. Tan and M. E. Norhaizan, Carotenoids: How effective are they to prevent age-related diseases?, *Molecules*, **24**(9), 1801 (2019).
19. S. M. Baswan, A. Marini, A. E. Klosner, T. Jaenicke, J. Leverett, M. Murray, K. W. Gellenbeck, and J. Krutmann, Orally administered mixed carotenoids protect human skin against ultraviolet A-induced skin pigmentation: a double-blind, placebo-controlled, randomized clinical trial, *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.*, **36**(3), 219 (2020).
20. A. A. Aher, S. M. Bairagi, P. T. Kadaskar, S. S. Desai, and P. K. Nimase, Formulation and evaluation of herbal lipstick from colour pigments of *Bixa orellana* (Bixaceae) seeds, *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, **4**(5), 357 (2012).
21. P. Brudzyńska, A. Sionkowska, and M. Grisel, Plant-derived colorants for food, cosmetic and textile industries: A review, *Materials*, **14**(13), 3484 (2021).
22. K. S. Mala, P. P. Rao, M. B. Prabhavathy, and A. Satyanarayana, Studies on application of annatto (*Bixa orellana* L.) dye formulations in dairy products, *J. Food Sci. Technol.*, **52**(2), 912 (2015).
23. M. Scotter, The chemistry and analysis of annatto food colouring: a review, *Food Addit. Contam.*, **26**(8), 1123 (2009).
24. K. Kovary, T. S. Louvain, M. C. C. e Silva, F. Albano, B. B. M. Pires, G. A. T. Laranja, C. L. S. Lage, and I. Felzenszwalb, Biochemical behaviour of norbixin during *in vitro* DNA damage induced by reactive oxygen species, *Br. J. Nutr.*, **85**(4), 431 (2001).
25. S. Kiokias and M. H. Gordon, Antioxidant properties of

- annatto carotenoids, *Food Chem.*, **83**(4), 523 (2003).
26. A. Anantharaman, H. Hemachandran, S. Mohan, D. M. Ayyathan, T. Kumar D, G. P. Doss C, and R. Siva, Induction of apoptosis by apocarotenoids in B16 melanoma cells through ROS mediated mitochondrial-dependent pathway, *J. Funct. Foods*, **20**, 346 (2016).
  27. C. M. Hong, W. L. Wendorff, and R. L. Bradley Jr, Effects of packaging and lighting on pink discoloration and lipid oxidation of annatto-colored cheeses, *J. Dairy Sci.*, **78**(9), 1896 (1995).
  28. A. A. Sabuz, H. H. Khan, T. Rahman, R. Rana, and S. Brahma, Stability of organic food colorant extracted from annatto seeds on food matrix, *Int. J. Food Sci. Nutr.*, **5**(6), 10 (2020).
  29. A. R. Kim, H. J. An, E. S. Jang, J. D. Lee, and S. N. Park, Preparation, physical characterization, and *in vitro* skin permeation of deformable liposomes loaded with taxifolin and taxifolin tetraoctanoate, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **121**(6), 1800501 (2019).
  30. H. Liu, J. Zhang, Y. Xiong, S. Peng, D. J. McClements, L. Zou, R. Liang, and W. Liu, Improving norbixin dispersibility and stability by liposomal encapsulation using the pH-driven method, *J. Sci. Food Agric.*, **102**(5), 2070 (2022).
  31. A. Jahangiri, A. H. Møller, B. Madsen, B. Joemsgaard, S. Vaerbak, M. Danielsen, T. K. Dalsgaard, Incorporation of bixin in aqueous media: Self-formulation with sorbitol ester of norbixin, *Food Chemistry* **294**, 433 (2019).
  32. H. A. E. Benson, Elastic liposomes for topical and transdermal drug delivery, *Curr. Drug Deliv.*, **6**(3), 217 (2009).
  33. D. Mishra, M. Garg, V. Dubey, S. Jain, and N. K. Jain, Elastic liposomes mediated transdermal delivery of an anti-hypertensive agent: Propranolol hydrochloride, *J. Pharm. Sci.*, **96**(1), 145 (2007).
  34. M. Scotter, The chemistry and analysis of annatto food colouring: a review, *Food Addit. Contam.*, **26**(8), 1123 (2009).
  35. L. Lei, W. Dai, J. Man, H. Hu, Q. Jin, B. Zhang, and Z. Tang, Lonidamine liposomes to enhance photodynamic and photothermal therapy of hepatocellular carcinoma by inhibiting glycolysis, *J. Nanobiotechnol.*, **21**(1), 482 (2023).
  36. V. A. Franklin, B. Biomediciin, E. M. B. Hi, N. S. Y. Wadt, and E. E. Bach, Aqueous extract from urucum (*Bixa orellana* L.): antimicrobial, antioxidant, and healing activity, *Porto. Biomed. J.*, **8**(1) e183 (2023).
  37. Y. D. Franyoto, Mutmainah, I. Puspitaningrum, A. D. R. Nurcahyanti, and L. Kusmita, Characterization of carotenoid extract and bioactivity membrane of the seeds of annatto (*Bixa orellana*), *J. Glob. Pharma Technol.*, **12**(9), 163 (2009).
  38. B. L. Koop, M. N. da Silva, F. D. da Silva, K. T. dos Santos Lima, L. S. Soares, C. J. de Andrade, G. A. Valencia, and A. R. Monteiro, Flavonoids, anthocyanins, betalains, curcumin, and carotenoids: Sources, classification and enhanced stabilization by encapsulation and adsorption, *Food Res. Int.*, **153**, 110929 (2022).
  39. M. Kumar, A. Sharma, S. Mahmood, A. Thakure, M. A. Mirza, and A. Bhatia, Franz diffusion cell and its implication in skin permeation studies, *J. Dispersion Sci. Technol.*, **45**(5), 943 (2024).
  40. G. Bertho, I. E. Oumezziane, C. Caradeuc, L. Guibout, C. Balducci, L. Dinan, P. J. Dilda, S. Camelo, R. Lafont, and N. Giraud, Structural analysis of unstable norbixin isomers guided by pure shift nuclear magnetic resonance, *Magn. Reson. Chem.*, **60**(5), 504 (2022).