



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

박 사 학 위 논 문

병풀추출물을 함유한 지질 기반
나노베지클의 특성과 피부투과 연구

이 은 희

제주대학교 대학원

화학과

2023년 8월

병풀추출물을 함유한 지질 기반
나노베지클의 특성과 피부투과 연구

이 논문을 이학 박사 학위논문으로 제출함

이 은 희

제주대학교 대학원

화학과

지도교수 윤경섭

이은희의 이학 박사 학위논문을 인준함

2023년 6월

심사위원장	현	창	구	인
위	원	이	남	호
위	원	박	경	순
위	원	한	신	호
위	원	윤	경	섭

A Study on the Characteristics and Skin Absorption of Lipid-Based Nano Vesicle Containing Extrat of *Centella asiatica*

A Dissertation submitted to the graduate school of
Jeju National University in partial fulfillment of
the requirements for the degree of Doctor of
Philosophy in Chemistry
under the supervision of **Kyung-Sup Yoon**

The dissertation for the degree of Doctor of Philosophy
by **Eun-hee Lee**

has been approved by the dissertation committee.

2023. 06.

Chair	<u>CHANG-GU HYUN</u>
Member	<u>NAM HO LEE</u>
Member	<u>KYUNG SOON PARK</u>
Member	<u>SIEN-HO HAN</u>
Member	<u>KYUNG-SUP YOON</u>

목차

List of Tables	iii
List of Figures	iv
Abstract	viii
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	14
2.1. 시약 및 기기	14
2.2. Liposome & Transfersome 제조	15
2.3. Ethosome 제조	19
2.4. Transethosome 제조	19
2.5. Nano vesicle의 안정성 측정	22
2.6. 최적화된 nano vesicle 제조	24
2.7. Madecassoside의 HPLC 분석	25
2.8. 최적화된 nano vesicle의 in vitro 피부흡수 실험	28
2.9. 최적화된 nano vesicle의 약물 방출 실험	30
2.10. 최적화된 nano vesicle의 캡슐 효율	30
2.11. 최적화된 nano vesicle의 형태 관찰 (TEM)	30
2.12. 최적화된 nano vesicle의 인지질 종류에 따른 피부투과율	33
2.13. 통계학적 검증	33
III. 결과	36
3.1. Liposome & Transfersome의 물리화학적 특성 및 최적화	36
3.2. Ethosome의 물리 화학적 특성 및 최적화	43
3.3. Transethosome의 물리 화학적 특성 및 최적화	50

3.4. Madecassoside 함량 분석	57
3.5. 최적화된 제형의 약물 방출 (Drug release)	57
3.6. 최적화된 제형의 캡슐 효율	57
3.7. 피부흡수율 및 피부 흡수 플럭스 (Flux)	63
3.8. 최적화된 제형의 형태학적 관찰 (TEM)	67
3.9. 인지질 종류에 따른 피부흡수율 및 피부 흡수 플럭스 (Flux)	69
 IV. 결론	 75
 V. 참고문헌	 79

List of Tables

Table 1. Structure and HLB value of edge activator	17
Table 2. Preparation of liposome & transfersome using different edge activator	18
Table 3. Preparation of ethosome with different EtOH contents	20
Table 4. Preparation of transehtosome with different EtOH contents & edge activator	21
Table 5. Preparation of optimized nano vesicle	26
Table 6. HPLC condition for determination of Madecassoside	27
Table 7. Franz diffusion cells operation and condition	29
Table 8. Penetrant rating chart for permeability coefficients	29
Table 9. Preparation of optimized nano vesicle with Lipoid S75	34
Table 10. Preparation of optimized nano vesicle with Lipoid P100	35
Table 11. Results of dialysis membrane method capsulating efficiency ·	62
Table 12. Mass balance of skin absorption and kinetic parameters of Madecassoside through the Strat-M membrane	66

List of Figures

Figure 1. Cetella Asiatica of main ingredient	3
Figure 2. Schematic illustration of the anatomy of the skin (A) and schematic representation of epidermis layer of skin (B)	5
Figure 3. Schematic representation of transdermal drug delivery mechanisms	6
Figure 4. (A) Structure of phospholipid and (B) structure of liposome	9
Figure 5. Structure and type of phospholipid	9
Figure 6. (A) High-pressure homogenizer and (B) principle of High-pressure homogenizer	11
Figure 7. Classification of vesicle size and lamellarity	13
Figure 8. Different vesicular carriers with defined layers and composition	13
Figure 9. Method of manufacturing liposomes	16
Figure 10. Principles of dynamic (static) light scattering and fluctuation in intensity of the scattered light from suspensions of different size particles ..	23
Figure 11. Traditional experimental setup of an in vitro drug release using dialysis tubing as a separation method (a) and Schematic representation of dialysis (b)	32
Figure 12. Particle size data over time at (a) 25 °C and (b) 45 °C on liposome and transfersome. The results were expressed as the mean ± SD (N = 3), *p < 0.05, **p < 0.01 compared with each 1 d data	37
Figure 13. Plot of particle size (R^3) versus elapsed time (day) at (a) 25 °C and (b) 45 °C on liposome and transfersome	38
Figure 14. PDI data over time at (a) 25 °C and (b) 45 °C on liposome and transfersome. The results were expressed as the mean ± SD (N = 3), *p	

< 0.05, ** p < 0.01 compared with each 1 d data	39
Figure 15. Zeta potential data over time at (a) 25 °C and (b) 45 °C on liposome and transfersome. The results were expressed as the mean \pm SD (N = 3), * p < 0.05, ** p < 0.01 compared with each 1 d data	41
Figure 16. pH data over time at (a) 25 °C and (b) 45 °C on liposome and transfersome. The results were expressed as the mean \pm SD (N = 3)	42
Figure 17. Particle size data over time at (a) 25 °C and (b) 45 °C on ethosome. The results were expressed as the mean \pm SD (N = 3), * p < 0.05, ** p < 0.01 compared with each 1 d data	45
Figure 18. PPlot of particle size (R^3) versus elapsed time (day) at (a) 25 °C and (b) 45 °C on ethosome	46
Figure 19. PDI data over time at (a) 25 °C and (b) 45 °C on ethosome. The results were expressed as the mean \pm SD (N = 3), * p < 0.05, ** p < 0.01 compared with each 1 d data	47
Figure 20. Zeta potential data over time at (a) 25 °C and (b) 45 °C on ethosome. The results were expressed as the mean \pm SD (N = 3), * p < 0.05, ** p < 0.01 compared with each 1 d data	48
Figure 21. pH data over time at (a) 25 °C and (b) 45 °C on ethosome. The results were expressed as the mean \pm SD (N = 3)	49
Figure 22. Particle size data over time at (a) 25 °C and (b) 45 °C on transethosome. The results were expressed as the mean \pm SD (N = 3), * p < 0.05, ** p < 0.01 compared with each 1 d data	52
Figure 23. Plot of particle size (R^3) versus elapsed time (day) at (a) 25 °C and (b) 45 °C on transethosome	53
Figure 24. PDI data over time at (a) 25 °C and (b) 45 °C on transethosome. The results were expressed as the mean \pm SD (N = 3), * p < 0.05, ** p < 0.01 compared with each 1 d data	54

Figure 25. Zeta potential data over time at (a) 25 °C and (b) 45 °C on transethosome. The results were expressed as the mean ± SD (N = 3), * p < 0.05, ** p < 0.01 compared with each 1 d data	55
Figure 26. pH data over time at (a) 25 °C and (b) 45 °C on transethosome. The results were expressed as the mean ± SD (N = 3)	56
Figure 27. Madecassoside calibration curve using HPLC system	59
Figure 28. HPLC chromatograms; (a) madecassoside, asiaticoside, madecassic acid and asiatic acid peaks of Centella quatro, (b) madecassoside standard peak, detected at 202 nm	60
Figure 29. Drug release of 4-types formulation in madecassoside by dialysis membrane method for 24 h (N = 3)	61
Figure 30. Cumulative skin absorption of madecassoside over time by Franz diffusion cell test of four formulations by Strat-M membrane	64
Figure 31. Comparison of four formulations for Flux ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) of madecassoside over time by Franz diffusion cell test by Strat-M membrane	65
Figure 32. Cryo-TEM images of a liposome (A), transfersome (B), ethosome (C), transethosome (D)	68
Figure 33. Cumulative skin absorption of madecassoside over time by Franz diffusion cell test of four formulations using P 75 phosphatidylcholine by Strat-M membrane	71
Figure 34. Comparison of four formulations for Flux ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) of madecassoside over time by Franz diffusion cell test using P 75 phosphatidylcholine by Strat-M membrane	72
Figure 35. Cumulative skin absorption of madecassoside over time by Franz diffusion cell test of four formulations using P 100 phosphatidylcholine by Strat-M membrane	73

Figure 36. Comparison of four formulations for Flux ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) of madecassoside over time by Franz diffusion cell test using P 100 phosphatidylcholine by Strat-M membrane 74

Abstract

A Study on the Characteristics and Skin Absorption of Lipid-Based Nano Vesicle Containing Extrat of *Centella asiatica*

In this study, the physicochemical characteristics and skin permeability of various forms of liposomes containing centella asiatica extract were compared. The physicochemical properties and skin absorption rates of liposome and transfersome using various surfactants as edge activators, ethosome prepared by varying the content of ethanol, and transethosome containing various edge activators and ethanol were compared. The particle size, PDI, zeta potential, and pH of the nano vesicles were observed at 25°C and 45°C for 60 d. First, after 60 d of manufacture, the particle size of liposome and transfersome did not change significantly at 25°C, but the size of the transfersome containing span 80 (HLB 4.3) and Tween 85 (HLB 11) increased, and the smaller the surfactant HLB value, the particle size tended to increase. This is believed to be due to the Ostwald ripening in which when the HLB value of the non-ionic surfactant is large, the surfactant in the small particles melts into the medium more and is adsorbed to the large particles. It was confirmed that the zeta potential, PDI, and pH were stable because there was no significant change from 25°C. Ethosome confirmed that the higher the content of ethanol, the higher the particle size and PDI. It was confirmed that the zeta potential decreased slightly when stored at a 45°C, and the pH did not change significantly. Through this, when the content of ethanol is 5%, the particle size is the smallest and the PDI and zeta

potential are stable.

Through the optimization of ethosome, it was confirmed that the content of ethanol was the most stable when the ethanol was 5%, and transethosome was referred to in manufacturing. Span 80, Tween 20, Tween 80, and Tween 85 were used as edge activators, and as a result, it was confirmed that the particle size was changed by the edge activator. The particle size tends to increase as the surfactant HLB value decreases, and the particle size is the smallest particle size containing Tween 20 with the highest HLB value. It was confirmed that PDI, zeta potential, and pH were stable without significant change. Through this, the optimized conditions were confirmed, and the ratio of phospholipids to surfactants was 80:20, and when Tween 20 was used, it was judged to be the most stable formulation when the ethanol content was 5%.

These results were prepared by liposome, transfersome, ethosome, and transethosome that perform the capsule efficiency, drug release, skin absorption, and TEM. In the capsule efficiency experiment, the efficiency was high in the order of ethosome, transethosome, liposome, and transfersome, and in the drug release experiment, tranfersome was the highest at $46.39 \pm 0.16\%$ after 2 h, and the most release occurred at $94.90 \pm 0.26\%$ after 24 h. After 24 hours, liposome, transehtosome, and ethosome appeared in the order, it was confirmed that the drug was slowly released from four formulations, and it was judged to be an appropriate formulation to deliver the drug. As a result of evaluating the skin permeability of the four formulations using Franz diffusion cell, the skin permeability of transethosome was the highest, followed by transosome, ethosome, and liposome. At the skin permeation rate (Flux), the speed of liposome and ethosome increased after 2 h of initial

permeation, but after 4 h of permeation, it was confirmed that the permeation speed of transethosome and transosome increased rapidly. This reduces the interfacial tension of the lipid membrane present in the stratum corneum because transethosome has both variability and flexibility by surfactants and ethanol, and as the skin barrier loosens, the delivery of active substances into the skin is effectively delivered deeper.

Cryo-TEM was used for morphological observation of the four formulations, all of which identified lipid double layers, and the vesicle size of 90-150 nm.

In addition, when the skin absorption rate was investigated according to the type of phospholipid, the skin absorption rate was higher when using non-hydrogenated Lipoid S75 and Lipoid P100 than the hydrogenated Lipoid S75-3, and the overall absorption rate of transethosome was the highest. However, it was found that raw materials that were not hydrogenated were difficult to store, so it was not easy to use.

Through this study, the physicochemical and morphological characteristics of the four formulations were investigated, and through skin permeation experiments, transethosome with both variability and flexibility had the highest skin permeability and flux. Experiments on various formulations have confirmed that nano vesicles containing bottled grass quantitative extracts can be used as a cosmetic formulation, and it can be expected to play a role not only in cosmetics but also in locally affecting skin problems.

I. 서론

현대 사람들은 삶의 질이 높아짐에 따라 외모에 대한 관심과 함께 아름다운 삶에 대한 욕구가 증가하고 있다. 그러나 사람은 노화가 진행됨으로 인하여 피부와 생리적 특성이 변화되어 피부의 탄력 감소, 주름살, 검버섯 등이 발생하게 된다. 피부의 노화는 자외선의 노출, 외부 환경, 나이의 증가 등의 원인이 있다. 이러한 요인으로 인하여 피부의 진피층에 존재하는 섬유아세포의 작용이 감소하고 콜라겐, 엘라스틴 등의 구조 단백질의 합성량이 감소하며 피부의 수분이 손실된다[1]. 많은 연구를 통하여 피부노화를 예방하고 치료하려는 노력을 하고 있으며, 노화 방지와 피부 개선에 효과적인 물질이 많이 연구되어지고 있다. 코스메슈티컬의 관심이 높아짐에 따라 천연소재에 대한 관심이 높아지고, 그 중에서 병풀추출물에 대한 관심이 증가하며 다양한 연구가 이루어 지고 있다[2].

미나리과 병풀속에 속하는 다년생 포복성 초본인 병풀(*Centella asiatica*)은 아프리카의 마다가스카르 섬이 원산지로서 알려져 있으나 인도, 스리랑카, 등의 남아시아와 인도네시아, 말레이시아와 함께 우리나라 제주도 및 남부 도서지방의 고온 다습한 환경에서도 자생하는 것으로 알려져 있다[3]. 병풀의 다양한 효능은 많은 연구를 통해 알려져 있으며, 신경세포 보호[4], 황산화[5, 6], 항균[7], 항염증[8], 주름개선[9], 보습[10], 미백 및 자외선 차단[11], 피부각질 개선[12] 및 피부재생[13] 등의 다양한 생리활성 증진 효능이 밝혀져 있다. 병풀의 주요 효능성분인 Madecassic Acid, Asiaticoside, Asiatic Acid, Madecassoside는 Pentacyclic triterpene 유도체로 구성되어 있으며(Fig. 1), 피부결합 조직인 섬유아세포와 glycosaminoglycans의 조절에 중요한 역할을 하며, 각화 세포를 유도하여 빠르고 건강한 피부로의 성장을 촉진시켜 준다[3].

피부는 외부 환경으로부터 신체를 보호하는 1차 방어선이며, 인체의 가장 큰 기관으로서 물리적, 화학적인 외부 장애로부터 신체를 보호하는 기능을 한다[14]. 또

한 멜라닌이 풍부하기 때문에 자외선(UV)로부터 인체를 보호하며[15], 온도조절을 통한 항상성을 유지하도록 한다[16]. 피부는 크게 표피, 진피, 피하지방으로 이루어져 있으며, 피부의 가장 바깥에 위치한 표피는 다시 각질층(Stratum corneum), 투명층(Stratum lucidum), 과립층(Stratum granulosum), 유극층(Stratum spinosum), 기저층(Stratum basale)으로 나누어진다. 각질층은 각질화과정(cornification)에서 기저층에 있는 죽은 케라티노사이트 세포에서 나오는 케라틴 단백질로 구성되어 있으며, 이 것이 위로 이동하여 최종적으로 각질층에서 떨어져 나가는데 3-4주가 걸린다[17](Fig. 2). 각질층은 세라마이드, 콜레스테롤, 유리지방산 등으로 구성되어 있으며 외부 유해물질이나 세균의 침투로부터 피부를 보호하는 피부장벽의 역할을 한다. 각질층 아래 투명층은 2-3 층의 케라티노사이트 세포로 구성되어 있으며, 빛을 차단하는 역할을 한다. 그 아래는 과립층이 존재하며, 각질층과 투명층에 비해 두꺼운 막을 가지고 있다. 과립층에서 발견되는 단백질 구조인 케라토히알린이 축적되어 형성된 살아 있는 세포로 구성되어 있다[18]. 과립층 아래에는 유극층이 존재하며, 8 - 10층의 케라티노사이트로 구성된다. Desmosome이라 부르는 이곳은 세포 사이에 존재하며, 수직상 세포인 랑게르한스 세포가 이 층에서 발견된다[19]. 마지막으로 표피의 가장 깊은 층인 기저층은 콜라겐 섬유를 통해 진피와 직접 접촉해 있다. 기저층에서 케라티노사이트가 증식하여 상부 표피층으로 이동하게 되는 것이다[20]. 감각시스템의 세포인 Merkel cell과 melanocyte가 기저층에서 발견된다[21]. 표피 아래에 있는 피부는 진피이며, 유두층과 망상층으로 이루어져 있다. 여기에는 지방세포, 혈관, 림프모세관이 존재한다. 망상층은 콜라겐 섬유의 함량이 높기 때문에 유두층보다 밀도가 높으며 탄성이 존재한다[22]. 진피에는 땀과 피지 분비 시스템 존재로 인하여 모낭, 피지선, 땀샘이 풍부하다[23]. 진피 아래에 가장 깊은 피부층인 피하조직이 있다. 피하층 또는 표피 근막으로도 알려진 피하조직은 피부, 근육 및 뼈 사이의 연결 조직으로 proteoglycan과 Glycosaminoglycans이 풍부하다[24].

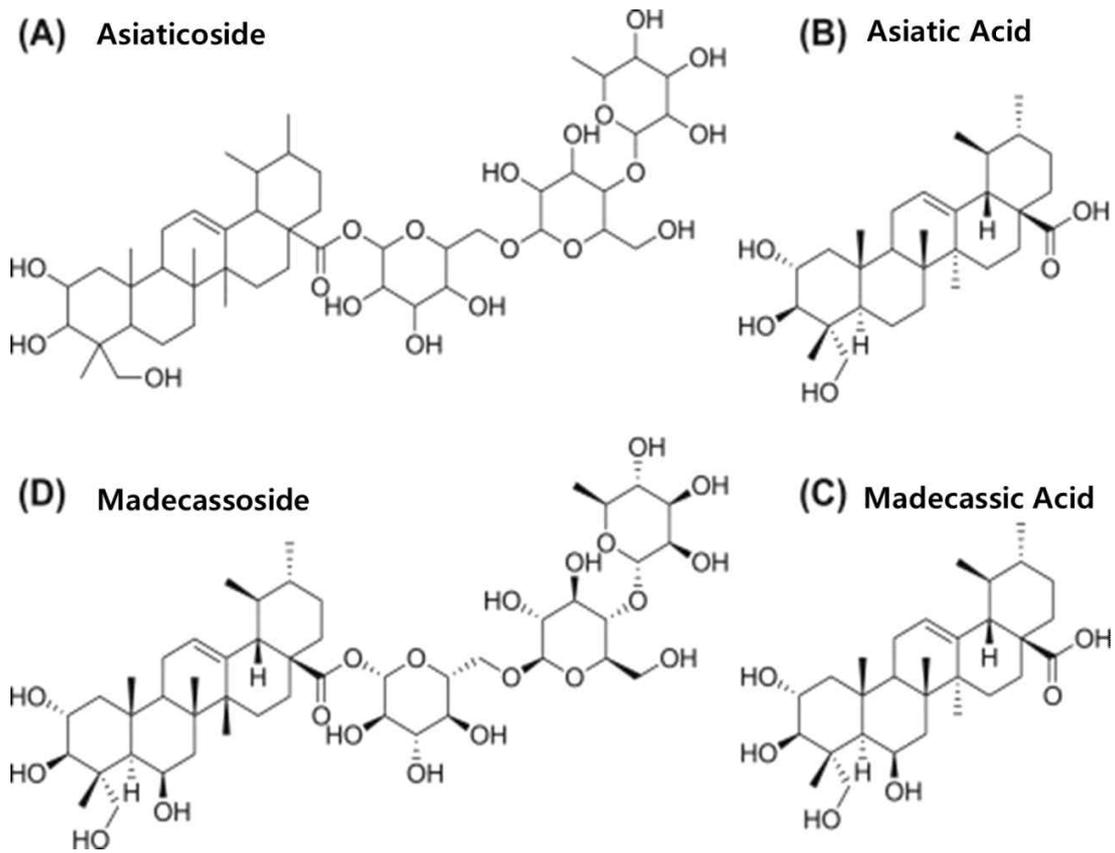


Figure 1. *Cetella Asiatica* of main ingredient.

피부는 넓은 표면적 때문에 약물을 흡수 할 수 있는 곳이고, 약물을 함유한 제형을 피부에 바르면 피부로 흡수되어 방출된다[25]. 그러나 피부를 통한 약물 흡수는 피부의 구조적인 문제로 인하여 매우 어렵다[26]. 표피의 각질층에는 'brick and mortar' 형태로 되어 있으며, 이는 지질과 케라티노사이트로 이루어져 있다[27, 28]. 약물이 더 깊이 흡수 되기 위해서는 이러한 분자적 구조를 침투해야 한다. 일반적으로 표피를 통한 약물흡수는 transepidermal과 transappendageal의 두 가지 경로로 구분할 수 있다(Fig. 3). 첫 번째 주요 흡수 경로는 transepidermal로 알려져 있으며, intercellular 경로는 표피의 각질세포의 세포간 지질을 통과 확산되어야 하는 경로이며, 친수성 화합물이나 작은 분자는 이 경로를 통해 진피까지 전달된다[29]. Transcellular 경로는 표피의 넓은 표면적에 약물이 확산되어 세포를 통과하는 경로이며, 이는 세포막의 지질 복합체의 소수성 특성으로 인하여 소수성 약물이 주로 전달되는 경로이다[30]. 두 번째 경로는 transappendageal로 모낭 또는 땀샘을 통한 약물전달 방법이다. 이 경로는 극성 또는 이온화 가능한 화합물의 경로이며, 큰 분자의 흡수에 유용하다[30]. 그러나 이 경로는 피부 전체에서 적은 흡수 면적으로 인하여 다소 제한적이다. 따라서 연구자들은 화학적, 물리적 방법을 조합하여 피부를 통한 약물 흡수율을 향상시키는 방법으로 경피전달시스템(transdermal delivery system)에 대한 연구가 이루어졌다. 경피 흡수를 향상시키기 위해서는 소낭을 이용하는 방법이 연구되었으며, 피부 구조와 유사한 지질 기반의 인지질을 이용한 나노 소포체인 리포솜(liposome)을 개발하였다. Liposome은 1964년 Bangham과 Horne이 개발한 최초의 인공 소포체이며[32], 지질 이중층을 형성하여 친수성과 소수성 물질을 동시에 담지할 수 있는 장점을 가지고 있어 의약품이나 화장품 산업에 많이 유용된다(Fig. 4A)[33]. Liposome은 구성성분인 지질의 구조 및 배열과 밀접한 관계가 있으며 극성을 띠는 하나의 친수성(Hydrophilic) 머리부분과 탄화수소로 이루어진 두 가닥의 소수성(Hydrophobic) 꼬리부분을 가지는 양친매성 물질이다. 이 분자구조는 인지질이 물에 분산되어 자발적으로 지질 이중층을 형성하게 된다(Fig. 4B)[34, 35].

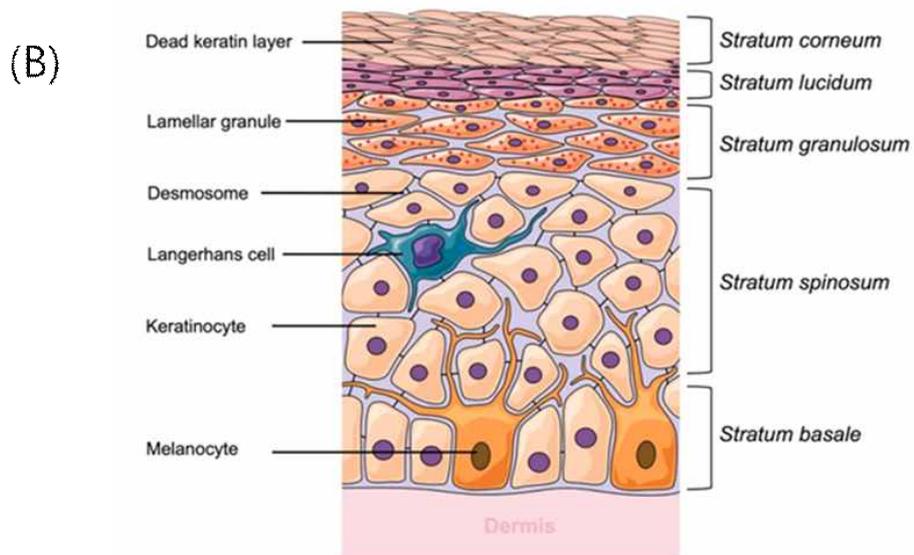
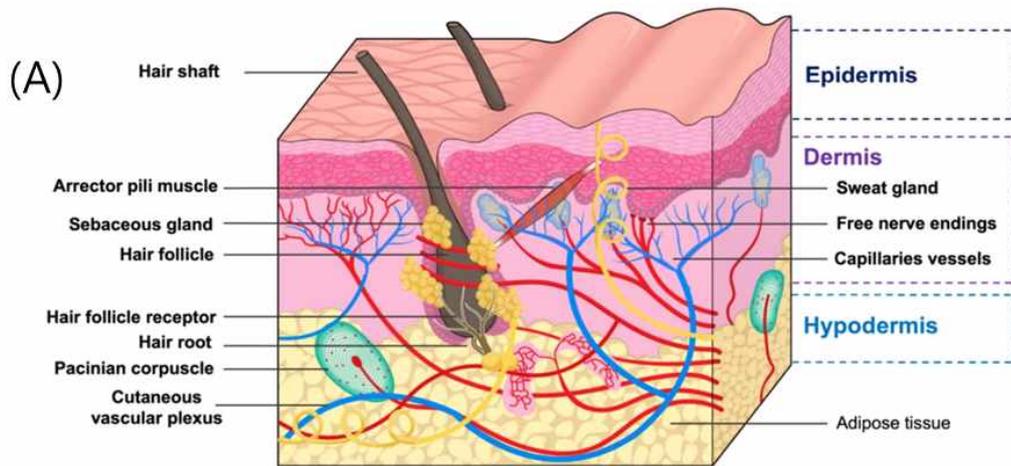


Figure 2. Schematic illustration of the anatomy of the skin (A) and schematic representation of epidermis layer of skin (B)[31].

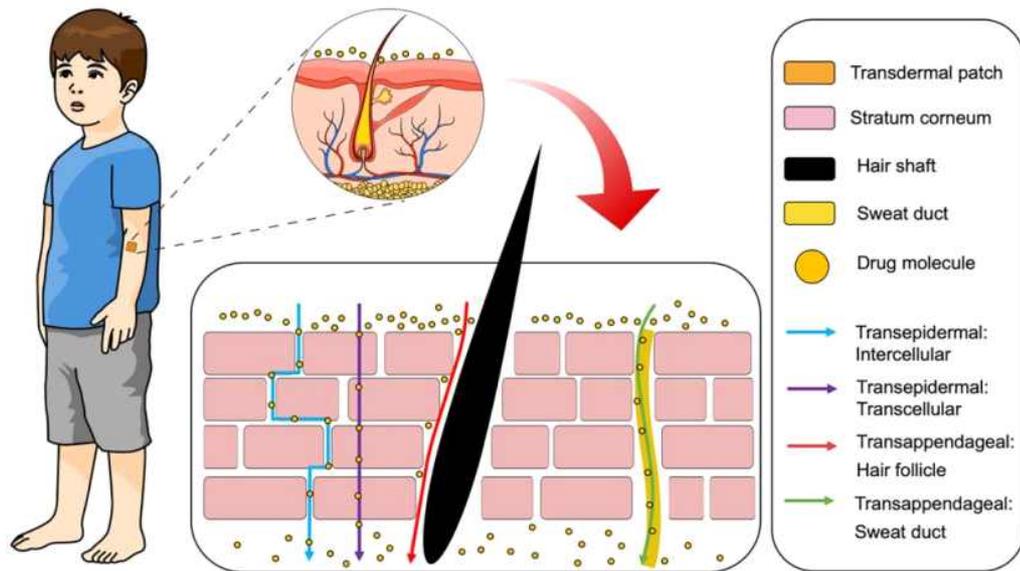


Figure 3. Schematic representation of transdermal drug delivery mechanisms[31].

인지질은 세포막을 구성하는 성분으로, 무해하며 양쪽 이온성 계면활성제 성질을 가지고 있어 오래 전부터 liposome에 많이 사용되어졌다. 실제 liposome 제조시에는 대두, 계란 등에서 추출한 천연인지질인 phosphatidylcholine (PC), Ethano-lamin (PE), serine, sphigomyelins, cardiolipins, plasmalogens, phosmalogens, phosphatidic acid (PA), cerebroside, phosphatidyl glycerol (PG) 같은 인지질 등이 많이 사용되어지며, 이는 인산기에 결합한 알킬기의 종류에 따라 분류된다(Fig. 5). 인지질의 인산기는 중성에서 이온화되어 극성머리 부분은 전하를 갖는다. 물에 인지질을 분산시키면 인지질은 정렬된 구조로 재배열되고 인지질의 소수성기는 안쪽으로 모이고 동시에 친수성인 극성 머리기는 물쪽으로 향하게 된다. 인지질이 수용액상에 존재할 때, 수용상과 긴 탄화수소 지방산 사슬과의 불리한 상호작용을 최소화 하기 위해서 분자들의 결집상태가 마이셀 구조보다는 이중층 판상구조로 배열된다. 판상의 가장자리에서 물과 탄화수소 사슬의 상호작용은 판상이 굽어져 폐쇄된 소낭을 형성하는데, 이 이중층 소낭이 liposome이다. 인지질은 피부 생체막의 물리적 성질에 큰 영향을 미치며 생리활성 및 barrier 기능에 중요한 역할을 한다. 인지질은 하나의 친수기에 두개의 친유성 사슬을 지닌 구조로 보통 친수기의 종류에 따라 분류된다. 일반적으로 인지질 대부분은 이중막구조(bilayer)를 형성하여 물에 분산하면 자발적으로 liposome 구조를 형성한다.

레시틴(Lecithin)은 1847년 Maurice Gobley가 난황(Lekithos)으로부터 분리하여 얻은 물질이며, 통상적으로 인지질이라고 부른다[36]. 레시틴은 모든 세포막의 필수 성분으로서 식물, 잉어알, 혈액 등에서 분리 가능하다. 처음 레시틴의 분리는 난황이었지만, 이 후 콩기름에서 분리 성공으로 인하여 콩으로부터 레시틴 분리가 이루어졌으며 대두 레시틴이 가장 많이 사용되어지고 있다. 레시틴은 천연계면활성제로서 콜레스테롤이나 지질을 혈액속에 분산시켜 인체기관과 동맥에 지방이 축적되는 것을 방지하는 생리적 유화제(Biological emulsifier)로서 작용하며, 생체에 높은 생분해성(Biodegradability), 인체 친화성(Compatibility) 및 무자극성

(Non-irritant)과 무독성(Non-toxic)의 특징을 가진다[37-39].

이러한 레시틴은 불포화 레시틴(Unsaturated lecithins)과 포화레시틴(Hydrogenated lecithin)으로 나눌 수 있는데, 불포화 레시틴은 오일에 잘 녹지 않는 특징이 있으며 오일에 녹일 때 많은 시간과 고온의 조건이 필요한 제약이 따른다. 포화레시틴은 불포화된 레시틴에 촉매 수소 첨가로 얻은 천연물질이다. 포화레시틴은 다양한 유화제와 함께 사용되었을 때, 안정적으로 잘 융합되며 원료 상태에서 안정적으로 보관이 가능하다.

Liposome을 제조할 때, 크기를 감소시키고 입자를 균질화하기 위해서는 주로 extruder, high-pressure homogenizer, ultrasonic homogenizer 등을 사용한다. 각각의 기기들은 liposome의 양과 포집하는 성분의 특성을 고려하여 선택하게 되며, 일반적으로 high-pressure homogenizer의 경우 많은 양의 liposome을 손쉽게 균질화 할 수 있다는 장점이 있다. 본 연구에서는 크기를 감소시키고 균질화시키기 위하여 high-pressure homogenizer를 사용하였다. 원리는 유체가 관을 통과할 때, 입자 간 충돌이 이루어지며 충돌로 인하여 미세하게 파괴된다. 이후, 초음속으로 관을 통과하는 유체는 속도차 및 마찰과 같은 저항의 의해 유체 내 전단력이 작용하여 입자가 끊어지는 현상이 발생하고 초고압에 의해 발생된 초음속 유체는 압력의 의해 공동화 현상이 발생하여 유체의 분자간 응집력이 파괴되어 나노사이즈의 liposome이 만들어지는 원리이다(Fig.6).

Liposome의 종류는 이중층의 수나 liposome 크기에 따라 크게 MLV (multilamellar vesicle), LUV (large unilamellar vesicle), SUV (small unilamellar vesicle)로 분류한다. MLV는 구형의 소포체가 여러 겹으로 만들어져 있으며, 직경은 0.1 μm 이상이며, LUV는 이중층이 단일막으로 형성되어 있으며 직경은 0.1 μm 이상, SUV는 이중층이 단일막으로 형성되어 있으며 0.1 μm 이하의 직경을 가지고 있는 liposome을 말한다[40]. 또한 1 μm 이상의 크기는 가지는 GUV(giant unilamellar vesicle)와 MLV와 유사한 OLV (oligolamellar vesicle)

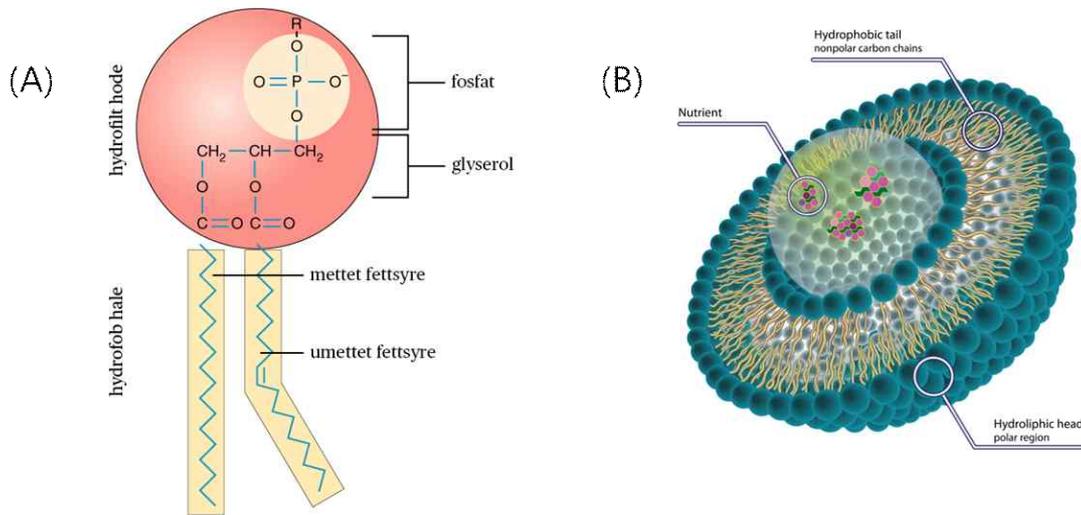
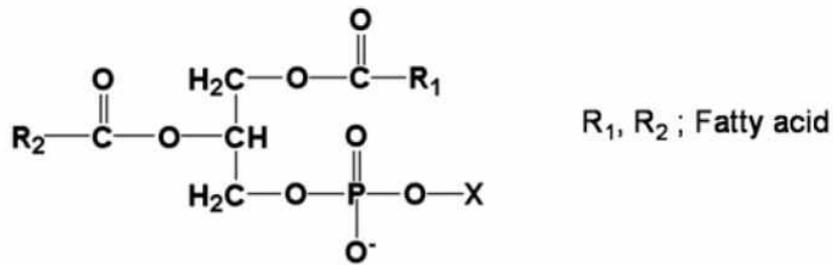


Figure 4. (A) Structure of phospholipid and (B) structure of liposome.



X	Phospholipid
H	Phosphatidic Acid (PA)
$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+$	Phosphatidyl Ethanolamine (PE)
$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	Phosphatidyl Choline (PC)
$\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$	Phosphatidyl Glycerol (PG)

Figure 5. Structure and type of phospholipid.

도 있다(Fig. 7)[41].

또한 1 μm 이상의 크기는 가지는 GUV(giant unilamellar vesicle)와 MLV와 유사한 OLV (oligolamellar vesicle)도 있다(Fig. 7)[41]. MLV와 liposome의 크기는 크면 클수록 안정성이 저하되고 작을수록 안정성이 커지나 반면 liposome 크기가 너무 작으면 약물 수용력이 감소 된다. 따라서 알맞은 liposome의 크기를 80 nm - 200 nm 사이라고 보고되고 있다[42, 43].

그러나 liposome의 단점은 소낭체가 불안정하여 누출이 발생하고, 물에 분산된 상태에서 입자크기가 증가하여 안정성이 낮으며, 낮은 포집효율로 인하여 효과를 기대하기 어려운 경우가 많이 보고 되고 있다[44-48]. 또한 효능 성분이 피부에 깊게 침투하지 못하고 각질층의 위쪽 부분에만 존재하는 것으로 보고되고 있다[49]. 이러한 liposome의 문제를 보완하기 위하여 1990년 초 G. Ceve는 지질 이중층에 단일 사슬 계면활성제인 edge activator를 사용하여 vesicle 막을 불안정하게 하여 막에 가변성을 형성하도록 하는 트랜스퍼솜(Transfersome)을 제안하였다[50]. 가변성을 가진 liposome은 탄성을 가지게 되어 효능성분이 경표피 삼투압 기울기의 영향으로 각질층의 세포간 지질 경로로 빠르게 침투할 수 있다고 보고되고 있다[51-55]. 또한 Touitou등이 개발한 에토솜(Ethosome)은 에탄올에 인지질을 용해시켜 만들어지는 vesicle로 에탄올이 vesicle 막의 유연성을 높여 변형을 유도하면서 계면장력을 낮추고 동시에 각질층의 피부장벽을 낮추는 역할을 하여 피부침투에 더 용이하게 한다고 보고되고 있다[45, 56, 57]. 에탄올의 탄소 꼬리의 소수성 특성은 지질 이중층의 소수성 사슬 영역에서 훨씬 쉽게 침투하고 지질과 주변 수분 사이의 계면 영역에 가깝게 응축하는 에탄올 분자를 만든다고 보고되고 있다. 에탄올의 밀도는 ethosome의 표면에 영향을 끼치므로 정전기적 반발로 인하여 안정성이 향상되며, 피부층의 지질을 교란시켜 피부조직 깊숙이 약물이 침투하도록 도와준다고 보고되고 있다[56]. 2012년 Song 등이 처음 보고한 트랜스에토솜(Transethosome)은 ethosome의 기본 적인 구성과 추가적으로 edge activator를 첨가하여 만들어졌다[58]. 이는 transfersome과 ethosome의 장점을 합친 것으로

(A)



(B)

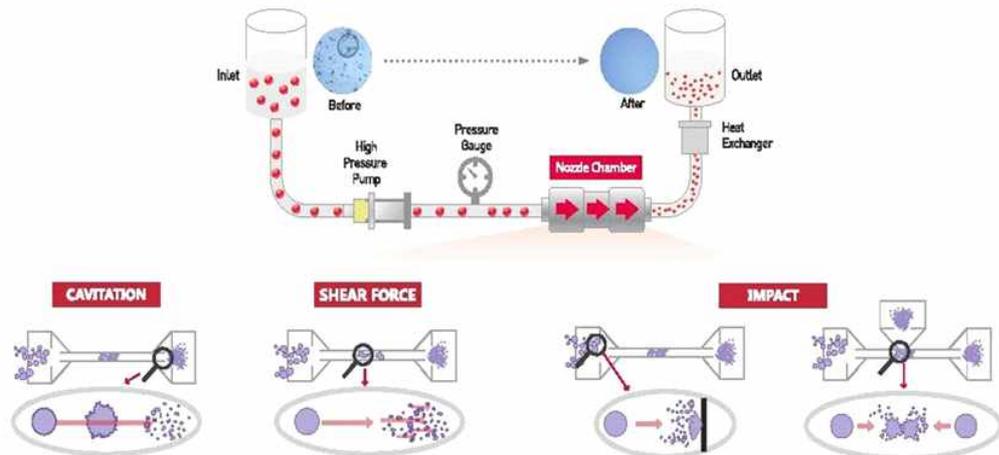


Figure 6. (A) High-pressure homogenizer and (B) principle of High-pressure homogenizer.

가변성과 유연성을 동시에 가져 약물이 피부조직에 더욱 깊숙이 침투할 수 있도록 한다(Fig. 8).

본 연구에서는 병풀추추물을 함유한 지질기반의 nano vesicle인 liposome, transfersome, ethosome, transethosome의 물리 화학적 특성과 제형의 최적 조건을 찾고, 피부 투과 효율 비교를 연구하고자 하였다.

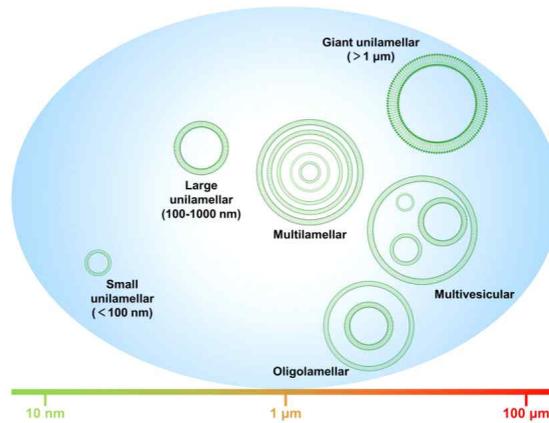


Figure 7. Classification of vesicle size and lamellarity[41].

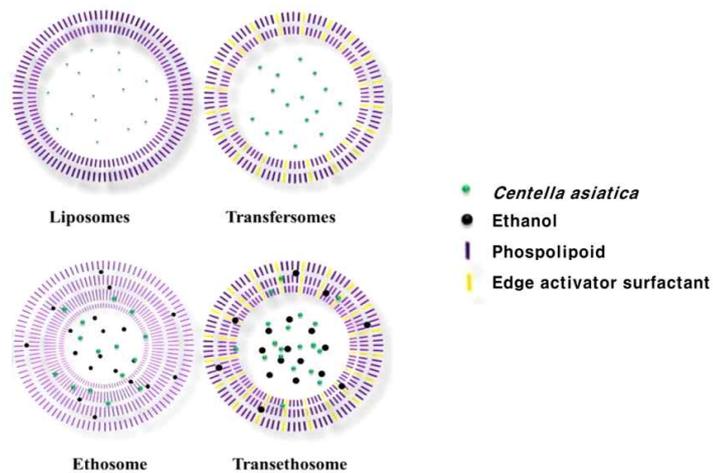


Figure 8. Different vesicular carriers with defined layers and composition[59].

II. 재료 및 방법

2.1 시약 및 기기

본 연구에서 사용한 인지질은 수소 첨가를 통해 불포화 성분을 없앤 Hydrogenated lecithin (Lipoid S75-3 75%, Lipoid, Germany)를 사용하였으며, edge activator로 계면활성제인 Polysorbate 20 (Tween 20, Merck, Germany)을 사용하였다. 병풀의 주요 효능 성분을 포함한 Centella Quatro (Biospectrum, Korea)을 Butylenglycol (1.3-Butylenglycol, 대정화금, Korea)에 5%가 되도록 가온하여 녹인 후 사용하였고, 지표물질로는 병풀의 주요성분 중 Madecassoside (Aladdin, China)을 사용하였다. Edge activator로 사용된 계면활성제는 sorbitan monooleate (HLB 4.3, Span 80, Sigma, USA), polysorbate 20 (HLB 16.7, Rheodol TW-L 120V, Tween 20, Kao, Japan), polysorbate 60 (HLB 14.9, Rheodol TW-S120V, Tween 60, Kao, Japan), polysorbate 80 (HLB 15, Rheodol TW-O120V, Tween 80, Kao, Japan), polysorbate 85 (HLB 11, Tween 85, TCI, Japan)을 사용하였으며, 화학구조를 Table 1에 나타내었다. 이외에 glycerin (Glycerin, Acid Chem Co., India), water (정제수)는 증류수 제조기(Pure RO 130, Human Co., Korea)에서 제조한 것을($< 0.1 \mu\text{S}/\text{cm}$) 사용하였다. 언급되지 않은 다른 모든 화학 성분은 분석용 등급을 사용하였다. Nano vesicle은 High-pressure nanodisperser (NLM100, Ilshin Autoclave, Korea)를 사용하여 제조하였으며, 입자크기, PDI, Zeta potential은 Zetasizer (Nano ZS, Malvern Instrument Ltd, UK)를 통하여 분석하였다. Madecassoside의 함량은 High performance liquid chromatography (HPLC, e2695, Waters, USA)를 사용하였다. 형태학적 관찰을 위하여 Glacios microscope (Cryo-TEM, Thermo Fisher Scientific, USA)을 사용하여 관찰하였으며, 피부투과시험은 Franz Diffusion Cell (DHC-6TD, Logan instrument, USA)을 사용하였고, 사용한 피부는 인공피부(Strat-M membrane 25 mm discs, Merck Millipore, USA),

마이크로 피그(Franz Cell Membrane, 400 μ m, 2cm², 6-month-old, Apures, Korea), 카데바 연구용 피부(실제사람피부, Epidermis & dermis, 2cm², Western Australia University, USA))을 사용하였다.

2.2. Liposome & Transfersome 제조

Liposome과 transfersome을 제조하기 위하여 인지질인 Lipoid S75-3을 사용하였으며, transfersome에는 edge activator로 다양한 HLB value를 가진 계면활성제를 사용하였다(Table 1). 사용된 계면활성제 Span 80 및 Tween 20, 60, 80, 85를 인지질과 80:20의 비율로 구성된 된 유상(oil phase)과 5% Centella quatro로 구성된 수상(water phase)을 각각 70 °C까지 가온하여 용해한 후 유상에 수상을 천천히 넣고 homo-mixer (T.K. auto homomixer mark II 2.5, Tokushukika, Japan)를 사용하여 3,000 rpm의 속도로 5 min 동안 유화시켜 제조하였다. 유화된 것을 high-pressure homogenizer (nanodisperser, NLM1000, Ilshin autoclave, Korea)에 700 bar의 압력으로 2회 통과시켜 nano size의 liposome과 transfersome을 제조하였다(Fig. 9, Table 2).

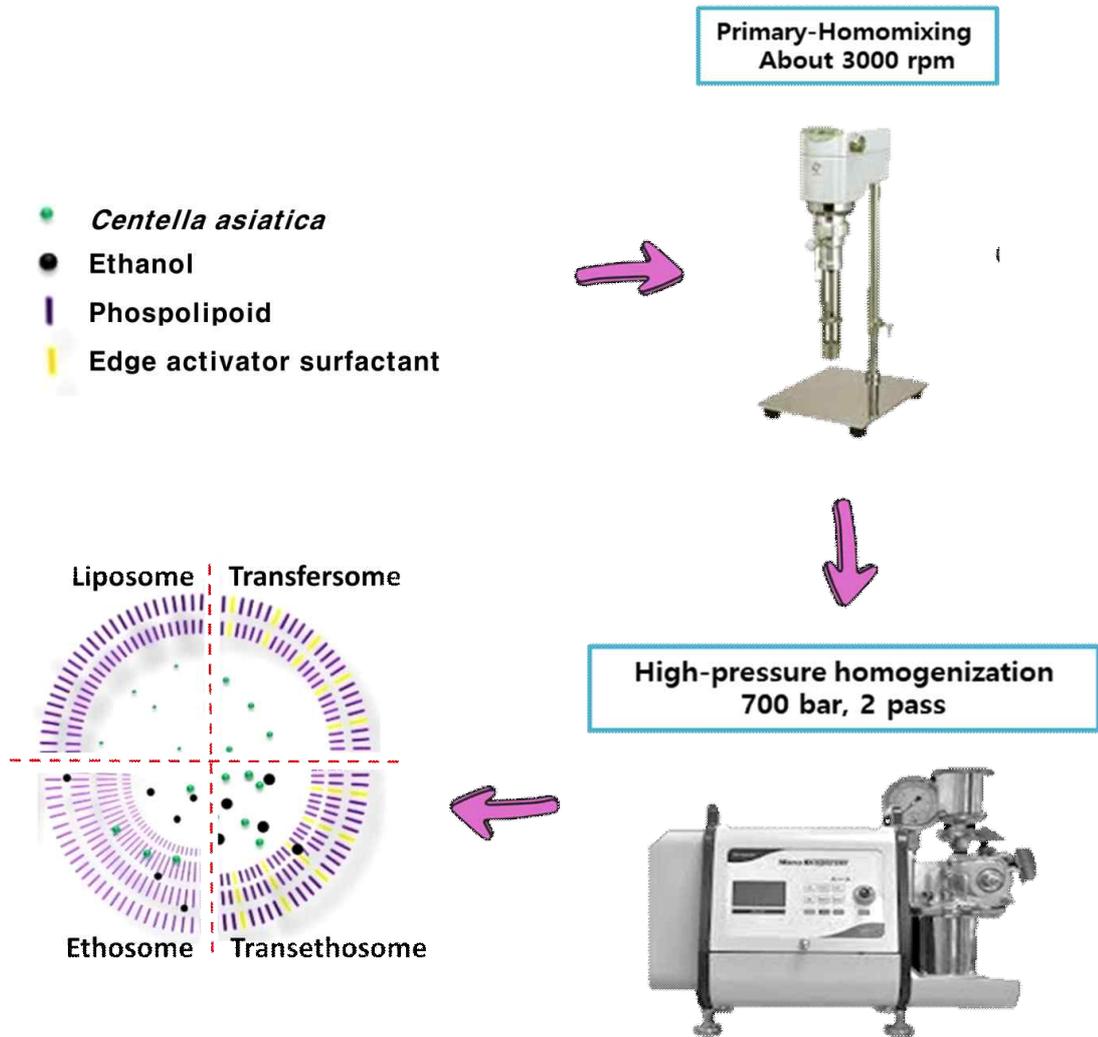


Figure 9. Method of manufacturing liposomes.

Table 1. Structure and HLB value of edge activator.

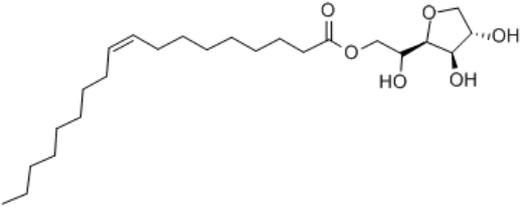
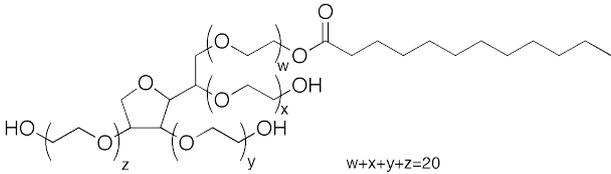
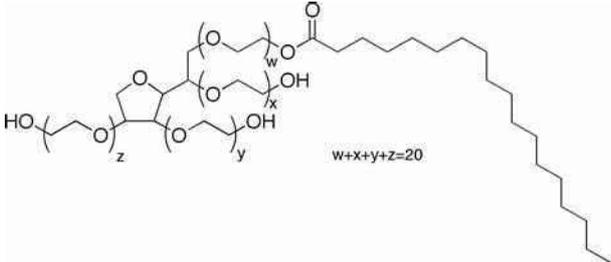
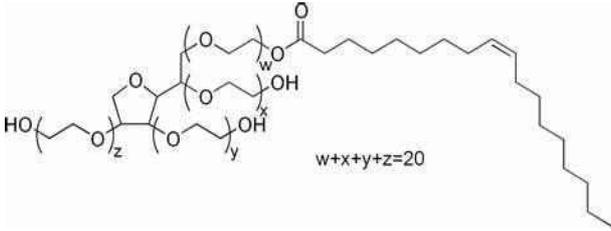
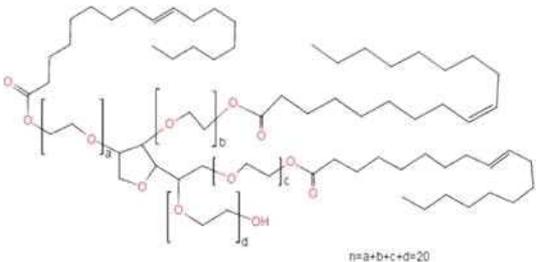
No	Name	INCI	Structure	HLB value
1	Span 80	Sorbitan monooleate		4.3
2	Tween 20	Polysorbate 20		16.7
3	Tween 60	Polysorbate 60		14.9
4	Tween 80	Polysorbate 80		15.0
5	Tween 85	Polysorbate 85		11.0

Table 2. Preparation of liposome & transfersome using different edge activator.

Part	Ingredient name	Liposome	TS-1	TS-2	TS-3	TS-4	TS-5
Oil phase	Lipoid S75-3	2.00	1.60	1.60	1.60	1.60	1.60
	Span 80	-	0.40	-	-	-	-
	Tween 20	-	-	0.40	-	-	-
	Tween 60	-	-	-	0.40	-	-
	Tween 80	-	-	-	-	0.40	-
	Tween 85	-	-	-	-	-	0.40
	Glycerin	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
Water phase	5% Centella quatro Stock sol.	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
	Water	up to 100					

2.3. Ethosome 제조

Ethosome을 제조하기 위하여 에탄올의 비율을 달리하여 제조 하였다. 인지질 Lipoid S75-3을 사용하였고, 에탄올의 비율을 5.0 ~ 30.0 %로 구성된 유상(oil phase)과 5% Centella quatro로 구성된 수상(water phase)을 각각 70°C까지 가온하여 용해한 후 유상에 수상을 천천히 넣고 homo-mixer (T.K. auto homomixer mark II 2.5, Tokushukika, Japan)를 사용하여 3,000 rpm의 속도로 5 min 동안 유화시켜 제조하였다. 유화된 것을 high-pressure homogenizer (nanodisperser, NLM1000, Ilshin autoclave, Korea)에 700 bar의 압력으로 2회 통과시켜 nano size의 ethosome을 제조하였다(Table 3).

2.4. Transeosome 제조

Transethosome을 제조하기 위하여 에탄올의 비율을 고정하고, edge activator로 span 80, Tween 20, Tween 85을 사용하여 제조 하였다. 인지질 Lipoid S75-3을 사용하였고, 에탄올과 edge activator로 구성된 유상(oil phase)과 5% Centella quatro로 구성된 수상(water phase)을 각각 70°C까지 가온하여 용해한 후 유상에 수상을 천천히 넣고 homo-mixer (T.K. auto homomixer mark II 2.5, Tokushukika, Japan)를 사용하여 3,000 rpm의 속도로 5 min 동안 유화시켜 제조하였다. 유화된 것을 high-pressure homogenizer (nanodisperser, NLM1000, Ilshin autoclave, Korea)에 700 bar의 압력으로 2회 통과시켜 nano size의 transethosome을 제조하였다(Table 4).

Table 3. Preparation of ethosome with different EtOH contents.

Part	Ingredient	ET -1	ET -2	ET -3	ET -4
Oil phase	Lipoid S75-3	2.0	2.0	2.0	2.0
	Ethyl alcohol	5.0	10.0	20.0	30.0
	Glycerin	5.0	5.0	5.0	5.0
Water phase	5% Centella Quatro	10.0	10.0	10.0	10.0
	Water	Up to 100			

Table 4. Preparation of transehtosome with different EtOH contents & edge activator.

Part	Ingredient	TE -1	TE -2	TE -3	TE -4
Oil phase	Lipoid S75-3	1.6	1.6	1.6	1.6
	Span 80	0.4	-	-	-
	Tween 20	-	0.4	-	-
	Tween 80	-	-	0.4	-
	Tween 85	-	-	-	0.4
	Glycerin	5.0	5.0	5.0	5.0
	Ethyl alcohol	5.0	5.0	5.0	5.0
water phase	5% Centella Quatro	10.0	10.0	10.0	10.0
	Water	Up to 100			

2.5. Nano vesicle의 안정성 측정

각각 제조된 nano vesicle을 상온(25°C), 항온(45°C)에 보관하여 30 d 및 60 d 동안의 상의 분리, 색상 및 석출여부에 대한 경시변화를 관찰하였다. 제조된 nano vesicle의 평균 입자크기(Particle size), 다분산지수(Polydispersity index, PDI) 및 제타전위(Zeta potential, ZP)를 측정하기 위해 동적 광산란(dynamic light scattering, DLS) 방식을 활용한 zetasizer를 사용하여 측정하였다. 동적 광산란은 통상적으로 분자 및 1 μ m 미만 크기 범위 크기 및 분포를 측정하기 위한 방법이다. 측정원리는 입자가 분산 된 상태의 시료를 레이저 빔에 노출시켜 입자가 빛을 산란시킴으로 발생하는 파장 신호 변화를 통해 입자의 크기를 분석한다. 측정 시간이 10 min 미만으로 정도로 짧고 별도의 보정이 필요하지 않지만 입자 크기 분산도가 큰 물질의 경우 정확한 값을 얻기는 힘들다[60]. 현탁액에서 입자는 브라운 운동(Brownian motion)을 하는데, 레이저를 통하여 속도를 산출하고 그에 따라 입자크기를 산출한다(Fig. 10). 즉, 크기가 작은 입자일수록 좀 더 빠른 브라운 운동을 하기 때문에 확산계수에 관한 Stoke-Einstein 관계식 (1)에 의해 입자크기가 결정된다[61].

$$D = K_B T / (3 \pi \eta d) \quad (1)$$

여기서 K_B 는 볼츠만상수, T 는 절대온도, η 는 점도, d 는 입자의 지름을 각각 나타내며, 식 (1)은 단지 구형의 입자에서만 적용 가능하다. 입자의 지름은 유체역학적 크기를 의미한다. 즉 Van der Waals 인력에 대한 안정성 유지에 영향을 미치는 정전기적 층(Steric layer)까지의 영역을 크기로 읽기 때문에 다른 측정법에서 보다 좀 더 큰 값을 나타낸다. 고정된 검출각이 다르므로 다분산 특성을 가진 입자의 경우 평균 입자의 크기에 대한 편차가 크게 나오기도 한다. 광산란 방식은 측정시간이 빠르고 사용자가 다루기에 쉬운 장점을 가지고 있지만 정확한 분산도 값을 얻기는 어려우며, 단지 분산도의 대략적인 값만을 얻게 된다. 또한 브라운 운동

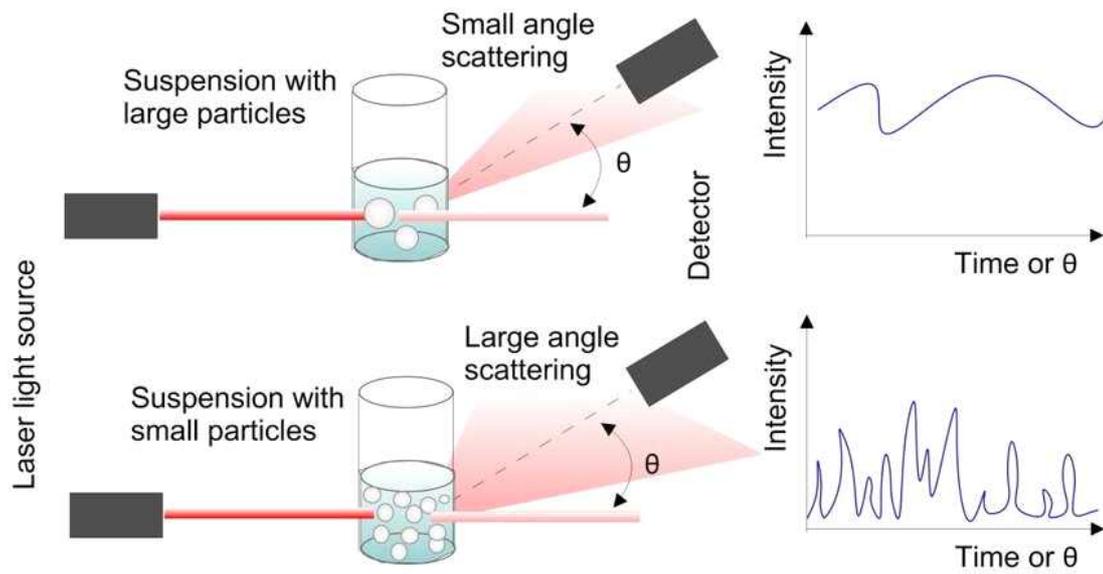


Figure 10. Principles of dynamic (static) light scattering and fluctuation in intensity of the scattered light from suspensions of different size particles[63].

에 의해 입자의 크기를 분석하므로 브라운 운동의 효과가 사라지는 3 μm 이상의 입자 크기를 갖는 물질에 사용하기에는 적절하지 않다[62].

다분산지수(Polydispersity index, PDI)는 입자의 분산정도를 나타내는 지표로써 범위는 0에서 1 내로 표시된다. 입자의 분산지수가 0.3 이하에서는 단분산상 형태, 0.3 - 0.6 범위는 중분산상 형태, 0.6 이상은 다분산상 형태의 입자가 분포되어 있음을 의미한다[64]. 화장품에서는 값이 0.25 이하인 경우, 안정한 상태의 단분산에 가까운 입자 분포를 갖는 것으로 알려져 있다[65]. Zeta potential은 colloidal 시스템에서 안정성은 브라운 운동 시 존재하는 Van der Waals force와 전기 이중층에 의한 척력의 힘으로 결정된다. 모든 입자가 같은 전하를 띄고 있을 때, 서로 반발하는 경향을 가지며 서로 결합하려 하지 않아 colloidal에서는 안정하게 된다. 또한 pH 및 conductivity에 영향을 받는데, 입자가 주변의 이온과 함께 움직일 때, shear plane이 나타나며 이때의 potential을 zeta potential 이라고 하며, 일반적으로 ± 30 mV 이상일 때, 안정하다고 판단한다[66]. 측정을 위해 제조된 nano vesicle은 증류수에 10배 희석 후 측정하였으며, 온도는 25°C 및 45°C로 일정하게 유지되도록 하였고 1 d, 30 d 및 60 d 동안 측정하였다.

2.6. 최적화된 nano vesicle 제조

Liposome, transfersome, ethosome, transethosome을 각각 조건을 달리하여 제조하였으며, 물리화학적 및 안정성 평가를 통하여 최적의 조건을 확인하였다. Transfersome은 인지질과 계면활성제의 비율이 80 : 20일 때, Tween 20을 사용하였을 때 입자크기가 가장 작고 안정함을 확인하였다. Ethosome은 에탄올의 함량이 5% 일 때 입자크기가 가장 작으며, 60 d 이후에도 안정함을 확인하였다. Transethosome은 Tween 20을 사용하고, 에탄올 함량이 5% 일 때, 입자크기가 가장 작고 안정함을 확인하였다. 이러한 정보를 이용하여 최적화된 nano vesicle을 제조하였으며, in vitro 피부흡수, 캡슐효율, 약물방출 실험, TEM을 활용한 형태학적 관찰을 수행하였다(Table 5).

2.7. Madecassoside의 HPCL 분석

병풀추출물의 주요성분인 madecassoside의 함량을 C. Monton 등의 방법[67]을 변형하여 high performance liquid chromatography (HPLC, e2695, Waters, USA)로 분석하였다. 검출기는 PDA detector를 이용하여 202 nm로 측정하였으며, 유속 1.0 mL/min의 조건으로 분석하였다. 이동상으로 0.01% phosphate buffer와 acetonitrile을 이용하였고 gradient로 이동상의 비율을 달리하여 분석을 진행하였다(Table 6).

Table 5. Preparation of optimized nano vesicle.

Part	Ingredient	Liposome	Transfersome	Ethosome	Transethosome
Oil phase	Lipoid S75-3	2.0	1.6	2.0	2.0
	Tween 20	-	0.4	-	0.4
	Ethyl alcohol	-	-	5.0	5.0
	Glycerin	5.0	5.0	5.0	5.0
Water phase	5% Centella Quatro	10.0	10.0	10.0	10.0
	Water	Up to 100			

Table 6. HPLC condition for determination of Madecassoside.

HPLC Condition			
Instrument	e2695 Waters, USA		
Column	Kromasil C18 column, 5 μm , 4.6x250 mm (AkzoNobel, Netherlands)		
Mobile phase	Time (min)	Composition	
		0.01% Phosphate buffer (%)	Acetonitrile (%)
	5	80	20
	10	60	40
	12	40	60
	14	20	80
20	80	20	
Detector wavelength	UV 202 nm		
Injection volume	10 μL		
Flow rate	1 mL/min		
Column temperature	40 $^{\circ}\text{C}$		
Run time	20 min		

2.8. 최적화된 nano vesicle의 *in vitro* 피부투과 실험

병풀추출물을 함유한 liposome과 transfersome의 피부흡수율을 확인하기 위하여 T. I. Hyeon 등의 방법[33]을 변형하여 Franz diffusion cell system (HDC-6TD, Logan instruments, USA)을 사용하였다. 사용된 피부는 인공피부 (Strat-M membrane 25 mm discs)를 사용하였다. 피부를 적용칸(donor chamber)과 회수칸(receptor chamber) 사이에 고정하고 용매로 20 % ethanol 수용액을 사용하였다. 실험이 진행되는 동안 온도를 $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 로 유지하였으며 1, 2, 4, 8, 12 및 24 h 후 회수칸에서 용액을 채취하여, HPLC system을 이용하여 madecassoside의 함량을 분석하였다. 또한, 24 h 후 적용칸과 인공피부 (membrane)에 흡수된 madecassoside 함량을 측정하기 위하여 methanol로 희석 후 분석하였다(Table 7). 지표성분 고유의 흡수특성을 확인하기 위하여 피부 플럭스(Flux, $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)와 흡수계수(K_p , cm/h)를 확인하였다. 흡수계수는 누적흡수량 그래프에서 정상상태(steady-state) 구간의 선형 회귀(linear region) 분석을 통해 계산하였으며, 피부 플럭스에서 지표성분의 초기 농도로 나누어 계산하였다. 흡수 정도는 F. N. Marzulli 등의 분류 기준[68]에 따라 확인하였다(Table 8).

Table 7. Franz diffusion cells operation and condition.

Franz diffusion cells	Condition
Instrument	DHC-6TD, Logan
Skin	Strat-M membrane
Volume of sample solution	0.5 mL
Receptor medium	2% Polysorbate 20 in 20% EtOH
Temperature	37 °C
Stir bar speed	600 rpm
Sampling aliquot	12 mL
Sampling time	1, 2, 4, 8, 12, 24 h

Table 8. Penetrant rating chart for permeability coefficients.

Absorption coefficient	Absorption rating
$K_p > 6 \times 10^{-3}$	Very fast
$6 \times 10^{-4} < K_p \leq 6 \times 10^{-3}$	Fast
$6 \times 10^{-5} < K_p \leq 6 \times 10^{-4}$	Moderate
$6 \times 10^{-6} < K_p \leq 6 \times 10^{-5}$	Slow
$K_p \leq 6 \times 10^{-6}$	Very slow

2.9. 최적화된 nano vesicle의 약물 방출 실험 (Drug release)

4가지의 최적화된 제형에 대한 활성물질인 madecassoside의 방출을 확인하기 위하여 dialysis membrane을 이용하여 실험을 진행하였다. 이 방법은 반투과성 막을 사용하여 liposome 현탁액에서 작은 분자들을 제거 하기 위한 방법으로, 적절한 기공 크기를 가지는 membrane을 사용하여 liposome이 통과하는 것을 막으면서 포집되지 못하거나 liposome에서 빠져나온 약물이 자유롭게 확산을 통해 membrane을 통과하는 방법이다[69]. 300 kDa의 dialysis membrane (Spectra/por Dialysis membrane Bio Tech CE, Spectrum laboratories, New Zealand)에 4가지의 nano vesicle을 각각 2 ml 씩 넣고 집게로 잘 봉입하였다. 0.85% NaCl이 포함된 1xPBS용액 200 ml에 넣은 후 37°C, 200 rpm의 조건으로 교반하면서 투석을 시작하였다. 2, 4, 8, 12, 24 h 시간 마다 용매를 취해 보관하였고 이 후 새로운 매로 완전 교환을 해주었다. 용매 속에 방출된 madecassoside를 HPLC system을 이용하여 분석하였다(Fig. 11).

2.10. 최적화된 nano vesicle의 캡슐효율

제조된 nano vesicle에 대한 캡슐효율(capsulating efficiency)을 측정하기 위하여 dialysis membrane을 이용하였다. 최적화된 4가지의 nano vesicle 1.0 ml을 300 kDa의 분자량 한계인 dialysis membrane에 넣은 후 0.85% NaCl을 함유한 1xPBS 용매 200 ml에 넣은 후 37 °C, 200 rpm의 속도로 교반시켜 주었다. 4 h 후 membrane을 통과한 물질이 포함된 용매와 membrane 안의 남아 있는 제형을 각각 취하여 HPLC system으로 분석 하였다. Membrane 을 통과한 물질은 캡슐화 되지 못한 물질로 판단하여 캡슐효율을 계산하였다.

2.11. 최적화된 nano vesicle의 형태 관찰 (TEM)

Nano-vesicle의 형태학적인 관찰을 하기 위하여 Cryo-TEM을 사용하여 확인하였

다. 시료 1.5~3 μL 를 Copper grid (R1.2/1.3 300, Quantifoil, USA)에 도포하고 전처리는 동결처리를 위하여 Vitrobot markIV (Thermo Fisher Scientific, USA)를 사용하였고 liquid ethane을 이용하여 급속 동결 하였다. Glacios microscope (Cryo-TEM)으로 촬영한 후 관찰하였다.

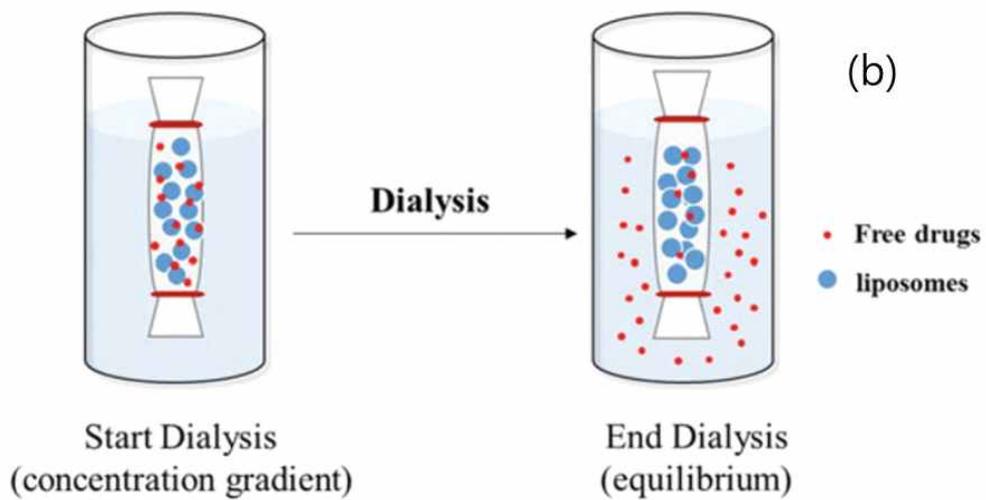
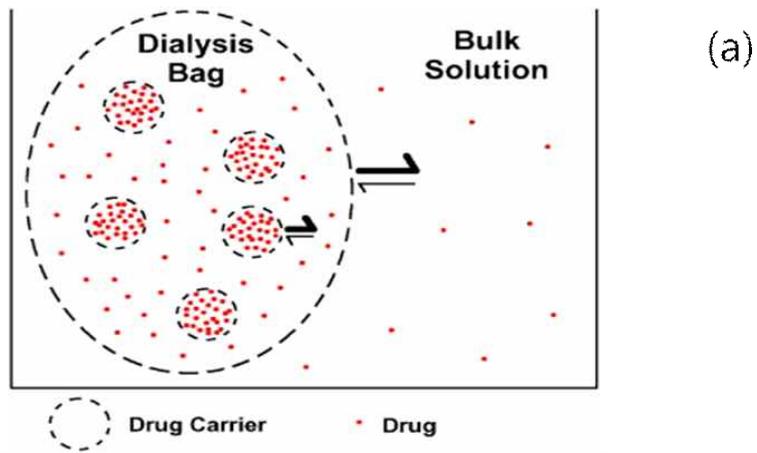


Figure 11. Traditional experimental setup of an in vitro drug release using dialysis tubing as a separation method (a) and Schematic representation of dialysis (b)[69].

2.12. 최적화된 nano vesicle의 인지질 종류에 따른 피부투과율

Nano vesicle을 제조 할 때 사용한 Lipoid S75-3은 하이드로겐화 된 phosphatidylcholine 70 %가 함유된 인지질이다. 하이드로겐화되어 안정적인 파우더형태로 존재하여 사용에 용이하다. 그러나 이러한 하이드로겐화 된 인지질은 피부흡수율이 다소 떨어진다고 알려져 있어, 이 외에 두 가지의 인지질을 사용하여 4가지 type의 nano vesicle을 만들어 피부투과율을 비교해 보았다. 사용한 인지질은 Lipoid S75-3 (hydrogenated with 70% phosphatidylcholine), Lipoid S75 (70% phosphatidylcholine), Lipoid P 100 (90% phosphatidylcholine)을 사용하였다. 제조방법은 앞의 최적화 실험과 동일하며, in vitro 피부투과 실험은 인공 피부인 Strat M membrane을 사용하였고 방법은 동일하다(Table 9, 10).

2.13. 통계학적 검증

실험은 3회 반복 측정 한 후 실험결과를 평균값과 표준편차로 나타내었다. 유의성은 student's *t*-test로 진행하였으며, 유의성에 따라 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 로 나타내었다.

Table 9. Preparation of optimized nano vesicle with Lipoid S75.

Part	Ingredient	Liposome	Transfersome	Ethosome	Transethosome
Oil phase	Lipoid S75	2.0	1.6	2.0	2.0
	Tween 20	-	0.4	-	0.4
	Ethyl alcohol	-	-	5.0	5.0
	Glycerin	5.0	5.0	5.0	5.0
Water phase	5% Centella Quatro	10.0	10.0	10.0	10.0
	Water		Up to 100		

Table 10. Preparation of optimized nano vesicle with Lipoid P100.

Part	Ingredient	Liposome	Transfersome	Ethosome	Transethosome
Oil phase	Lipoid P100	2.0	1.6	2.0	2.0
	Tween 20	-	0.4	-	0.4
	Ethyl alcohol	-	-	5.0	5.0
	Glycerin	5.0	5.0	5.0	5.0
Water phase	5% Centella Quatro	10.0	10.0	10.0	10.0
	Water	Up to 100			

Ⅲ. 결과

3.1. Liposome & Transfersome의 물리 화학적 특성 및 최적화

각각 제조된 liposome과 transfersome은 실온과 항온에 보관하여, 1, 30 및 60 d에 입자크기, 다분산지수, 제타전위 및 pH를 측정하며 경시변화를 관찰하였다. 실온에서 liposome과 transfersome의 입자크기는 초기 대비 60 d까지 큰 변화 없이 안정하였다. 친유성 계면활성제인 Span 80 (HLB 4.3)을 사용한 TS-1 (135 ~ 143 nm)와 Tween 85 (HLB 11)을 함유한 TS-5 (109 ~ 119 nm)는 Tween 20, 60, 80을 사용한 transfersome(92 ~ 100 nm)보다 입자가 크게 나타났다. HLB 값이 작을수록 입자크기가 증가하는 경향을 나타내었다. 실온에서는 60 d 동안 크리밍(creaming), 응집(flocculation), 합일(coalescence)은 물론 오스트발트 라이프닝(Ostwald ripening) 현상에 견딜 수 있는 안정한 상태임을 알 수 있었다. 항온에서는 60 d 경과 후, 제형의 입자가 증가한 것으로 관찰되었다(Fig. 12). Tween 계열의 계면활성제를 함유한 transfersome은 유의하게 크기가 증가하였으며, Span 80을 함유한 transfersome은 오히려 크기가 작아졌음을 확인하였다(Fig. 12b). Liposome과 TS-5는 큰 변화가 없었으며, TS-2 ~ 4는 시간이 지날수록 입자크기가 증가하는 경향을 보였다. 이는 비이온 계면활성제의 HLB 값이 큰 경우에, 작은 입자에서의 계면활성제가 매질에 좀 더 녹아들어 간 후 큰 입자에 흡착되어, 작은 입자는 더욱 작게, 큰 입자는 더욱 크게 커지는 오스트발트 라이프닝(Ostwald ripening)에 의한 것으로 판단된다(Fig. 13)[70].

PDI 값은 0.25보다 큰 0.3 정도로 실온에서 60 d 동안 큰 변화가 없었으나, 항온에서는 60 d 경과 후에 Span 80을 함유한 TS-1의 값이 증가하는 것을 확인하였다(Fig. 14). 이는 오스트발트 라이프닝 속도가 상대적으로 느려, 작은 입자와 큰 입자들이 공존하여 나타나는 현상으로 보인다.

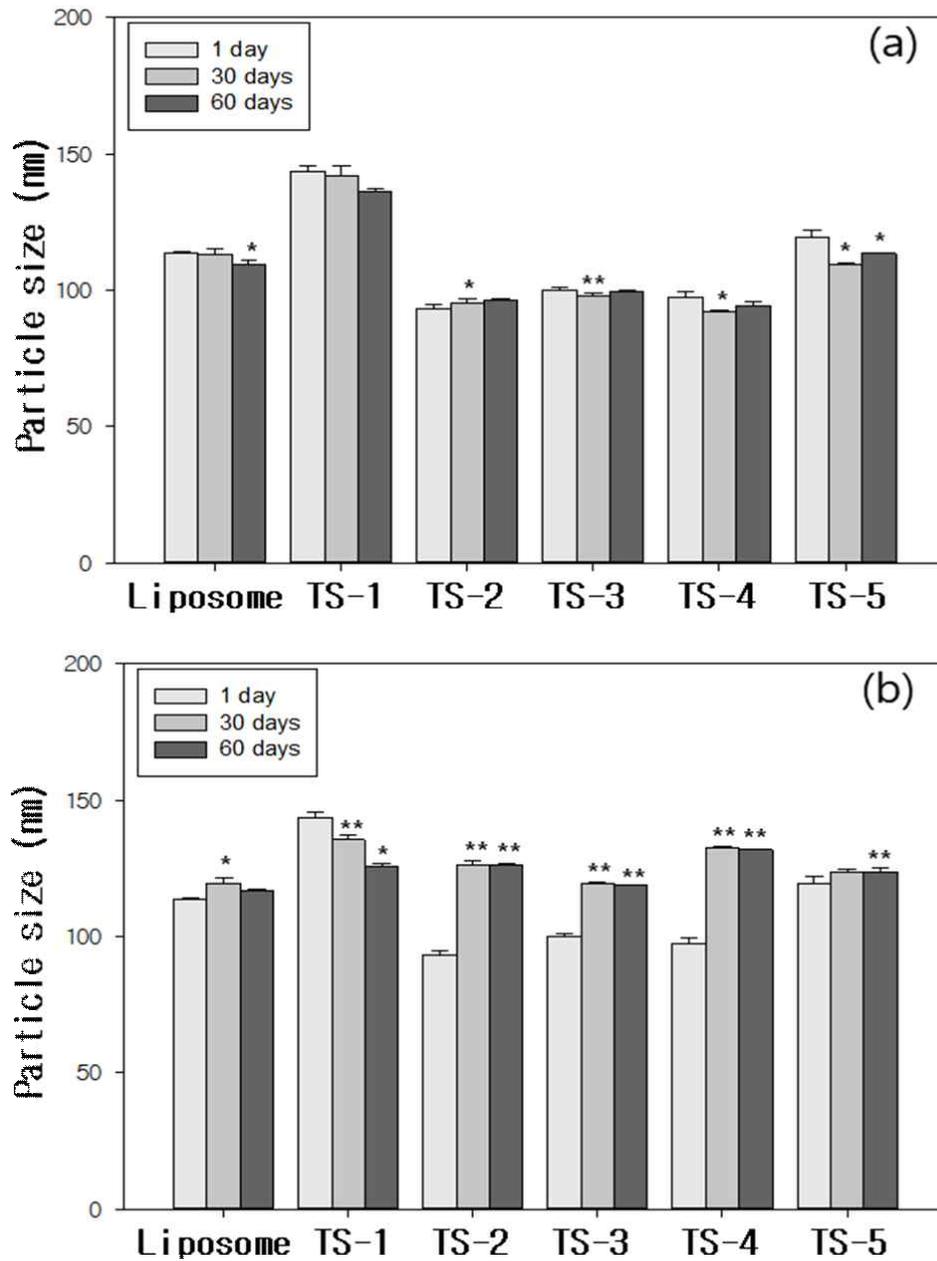


Figure 12. Particle size data over time at (a) 25 °C and (b) 45 °C on liposome and transfersome. The results were expressed as the mean \pm SD (N = 3), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with each 1 d data.

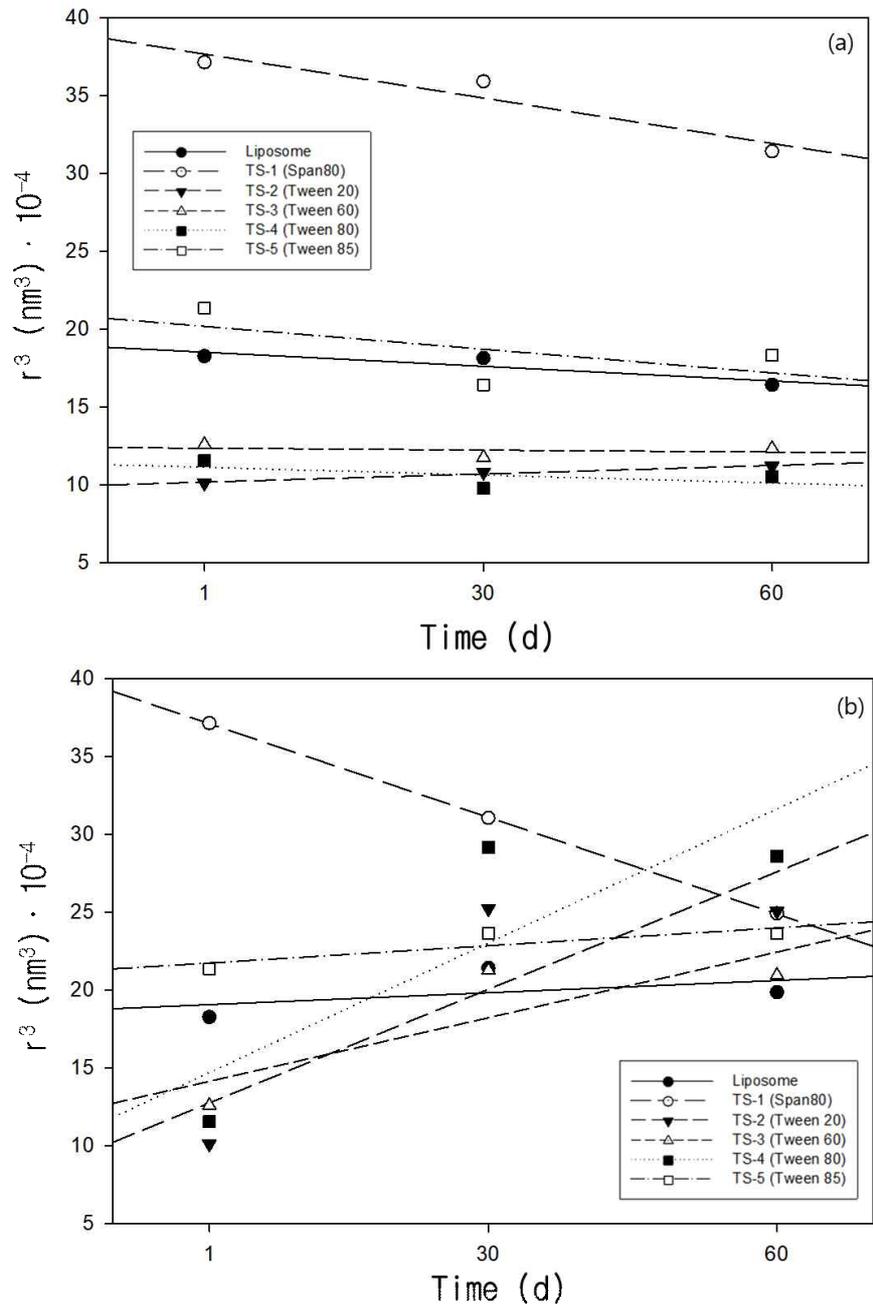


Figure 13. Plot of particle size (R^3) versus elapsed time (day) at (a) 25 °C and (b) 45 °C on liposome and transfersome.

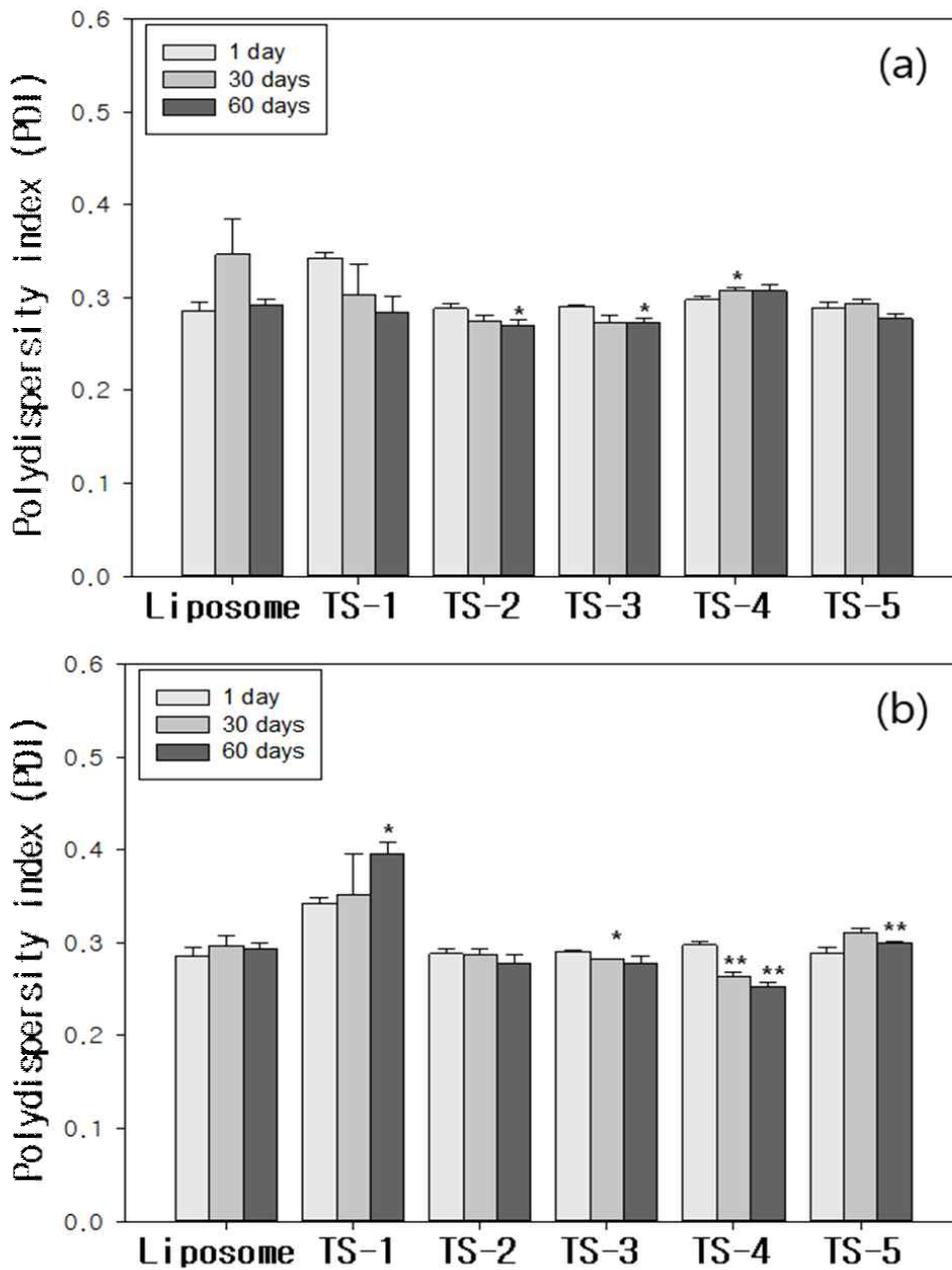


Figure 14. PDI data over time at (a) 25 °C and (b) 45 °C on liposome and transfersome. The results were expressed as the mean \pm SD (N = 3),
**p < 0.05, **p < 0.01* compared with each 1 d data.

제타전위는 각각 제형에서 60 d 동안의 제타전위를 측정한 결과, 실온에서 60 d 경과 후에 liposome에서는 감소 경향을 보였으며, transfersome에서는 큰 변화가 나타나지 않았다. 항온에서는 60 d 경과 후에 값이 증가하는 경향을 보였지만 모두 절댓값 ± 30 mV 이상의 값으로 확인되어 정전기적으로 안정하다고 판단되었다 (Fig. 15).

Liposome과 transfersome의 pH 결과에서는 60 d 동안 실온과 항온에서 변화가 없이 pH 6.64 ~ 7.06 정도로 측정되었다(Fig. 16).

다양한 HLB를 가진 계면활성제를 함유한 transfersome의 물리 화학적 특성에서 HLB가 높을수록 입자의 크기가 작은 것을 확인 하였다. Transfersome을 제조 시, Tween 20을 적적용하는 것이 최적이라고 판단하였다.

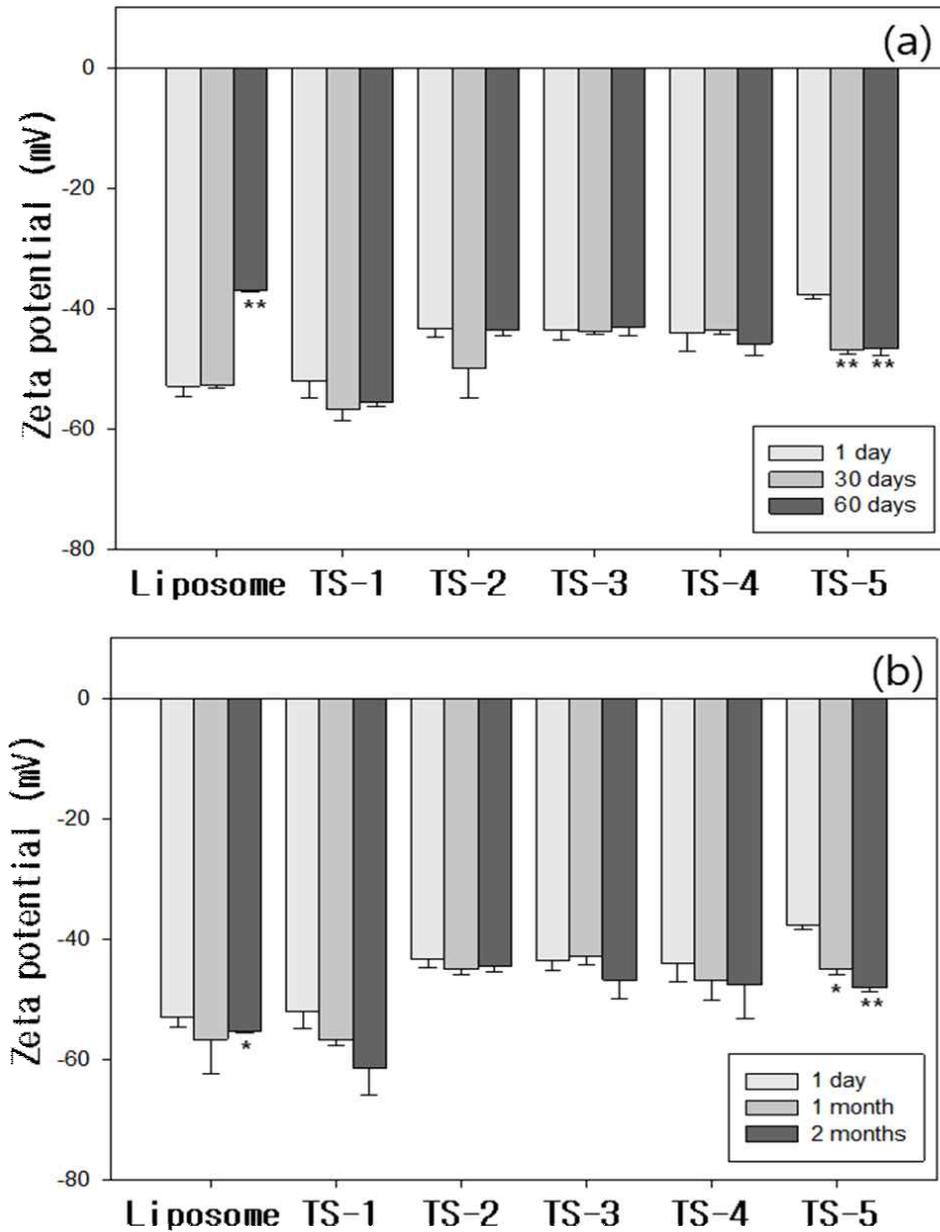


Figure 15. Zeta potential data over time at (a) 25 °C and (b) 45 °C on liposome and transfersome. The results were expressed as the mean \pm SD (N = 3), * p < 0.05, ** p < 0.01 compared with each 1 d data.

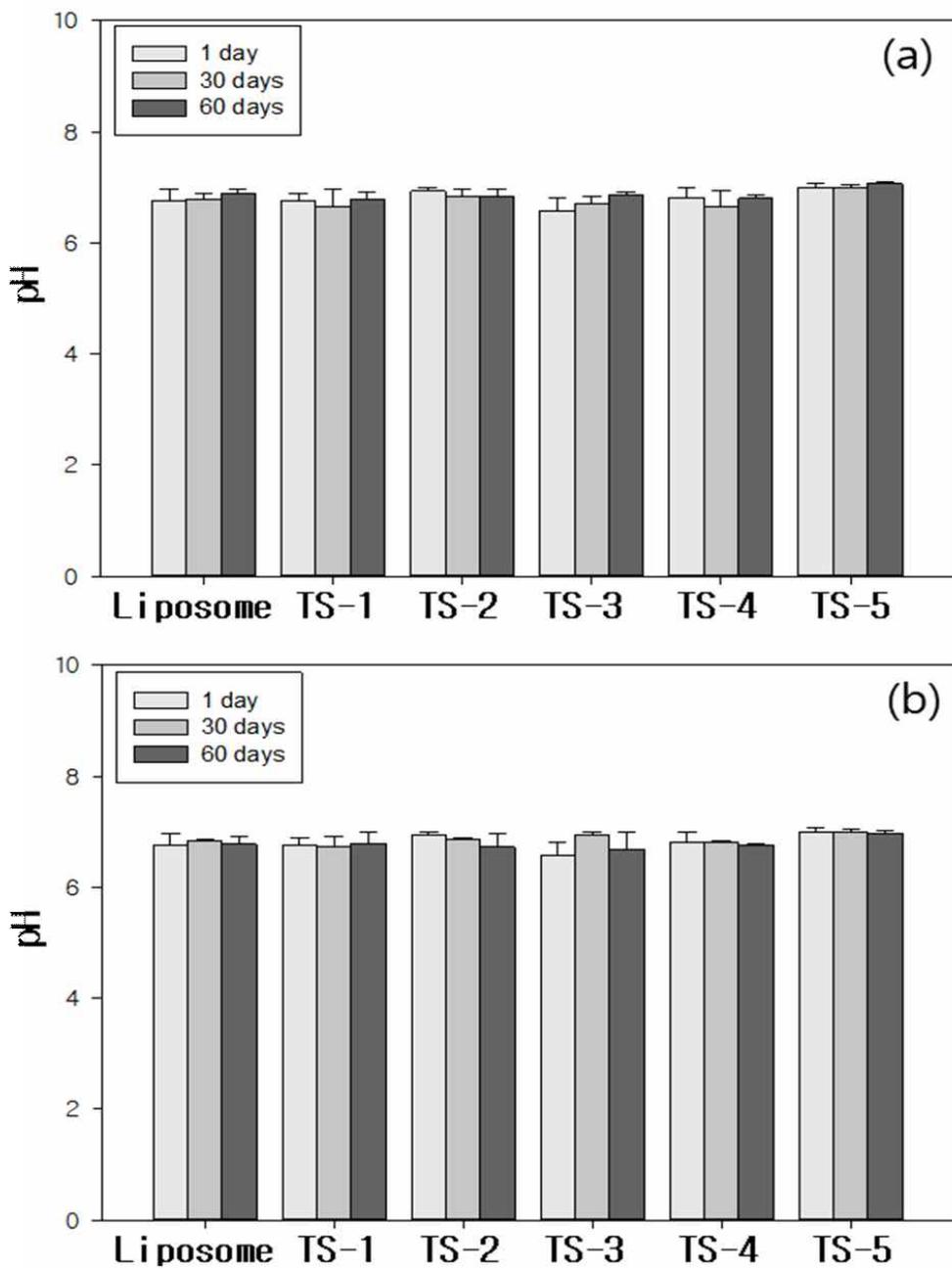


Figure 16. pH data over time at (a) 25 °C and (b) 45 °C on liposome and transfersome. The results were expressed as the mean \pm SD (N = 3).

3.2. Ethosome의 물리 화학적 특성 및 최적화

에탄올의 함량별로 제조한 ethosome은 실온과 항온에 보관하여, 1, 30 및 60 d에 입자크기, 다분산지수, 제타전위 및 pH를 측정하며 경시변화를 관찰하였다. 실온에서 ethosome의 입자크기는 에탄올 5%를 함유한 ET-1을 제외하고는 모두 30 d가 경과하였을 때, 유의하게 입자크기가 증가하였다. 에탄올의 함량이 증가할수록 입자의 크기는 점점 증가함을 확인하였다. 에탄올 5%를 함유한 ET-1과 10%를 함유한 ET-2를 제외하고는 30 d 경과 후 200 nm 이상의 크기로 증가하였다. 이를 통해 실온에서 ET-1과 ET-2는 60 d 동안 크리밍(creaming), 응집(flocculation), 합일(coalescence)은 물론 오스트발트 라이프닝(Ostwald ripening) 현상에 견딜 수 있는 안정한 상태임을 알 수 있었다. 항온에서는 ET-1을 제외하고는 모두 30 d 경과 후 크게 증가하였고, 60 d가 경과하였을 때, 에탄올 함량이 10% ~ 30%를 함유한 제형에서는 400 nm 이상의 크기로 응집되는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 17, 18).

PDI 값은 실온에서는 60 d 동안 0.2 ~ 0.326 정도로 에탄올 함량 30% 인 ET-4를 제외하고는 큰 변화가 없이 안정하였다. 항온에서는 60 d 경과 후에 에탄올 5% 함유한 ET-1을 제외하고는 모두 입자크기 증가와 비슷한 경향으로 PDI 값이 증가하였음을 알 수 있다(Fig. 19).

제타전위를 측정한 결과, 실온에서 60 d 경과 후에 ethosome에서는 감소 경향을 보였으나 큰 변화는 없었다. 항온에서는 60 d 경과 후에 값이 감소하는 경향을 보였으며, 이는 Van Der Waals 인력이 약하여 반발정도가 충분하지 않아 응집(coagulation) 현상이 일어나 입자크기가 커지고 제타전위도 낮아진 것으로 판단된다. 그러나 모두 절댓값 ± 30 mV 이상의 값으로 확인되어 정전기적으로 안정하다고 판단되었다(Fig. 20).

pH 결과에서는 60 d 동안 실온과 항온에서 변화가 없이 pH 5.00 ~ 5.36 정도로 측정되었다(Fig. 21).

에탄올 함량에 따른 ethosome을 제조하였을 때, 에탄올 함량이 5% 함유한 ET-1이 가장안정적으로 나타났다.

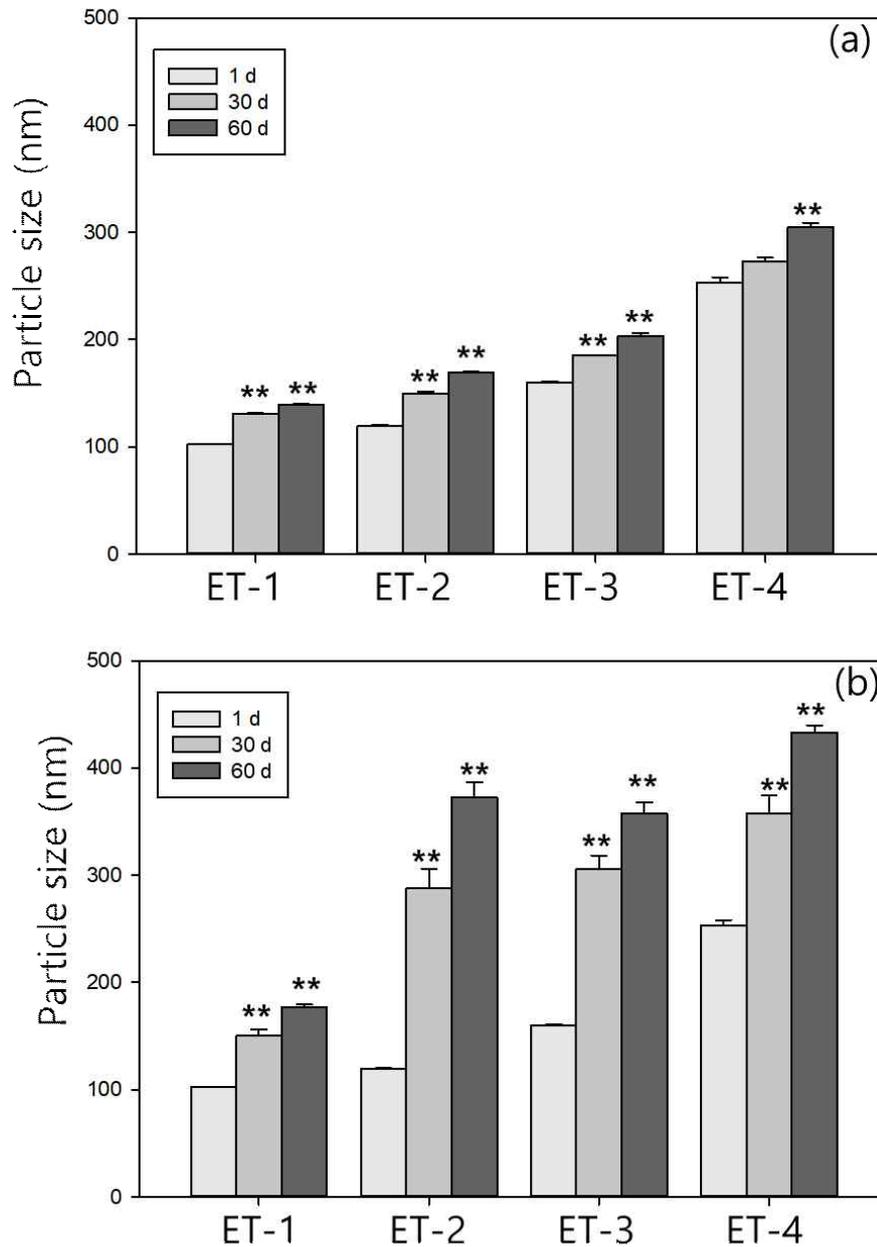


Figure 17. Particle size data over time at (a) 25 °C and (b) 45 °C on ethosome. The results were expressed as the mean \pm SD (N = 3), * p < 0.05, ** p < 0.01 compared with each 1 d data.

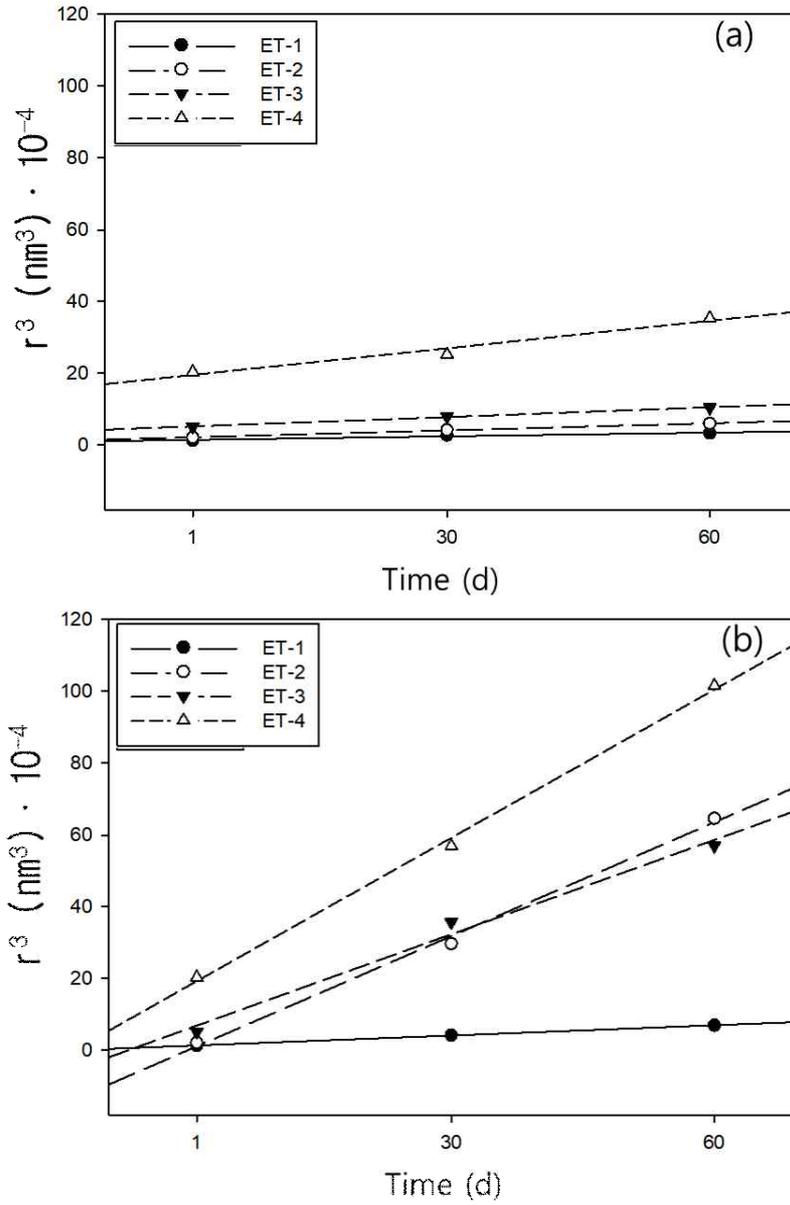


Figure 18. Plot of particle size (R^3) versus elapsed time (day) at (a) 25 °C and (b) 45 °C on ethosome.

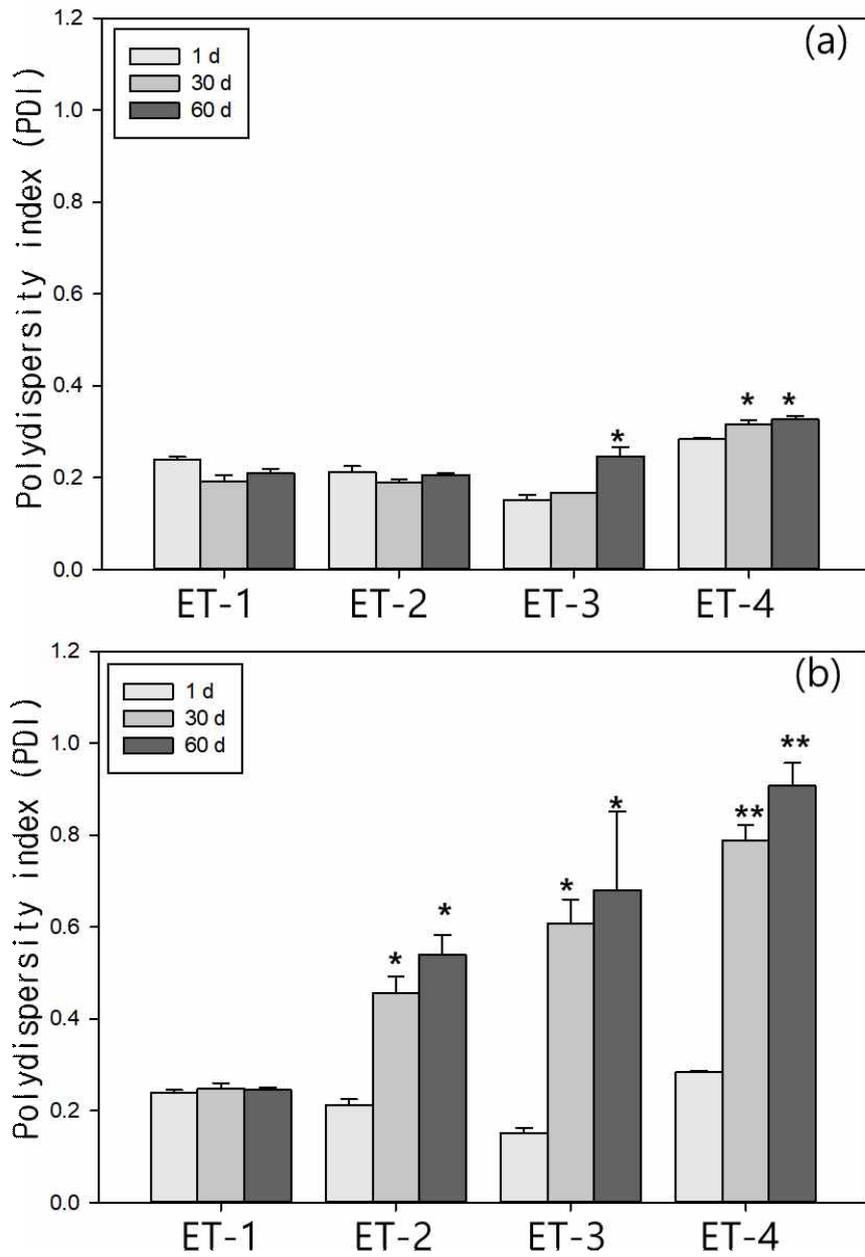


Figure 19. PDI data over time at (a) 25 °C and (b) 45 °C on ethosome.

The results were expressed as the mean \pm SD (N = 3),

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with each 1 d data.

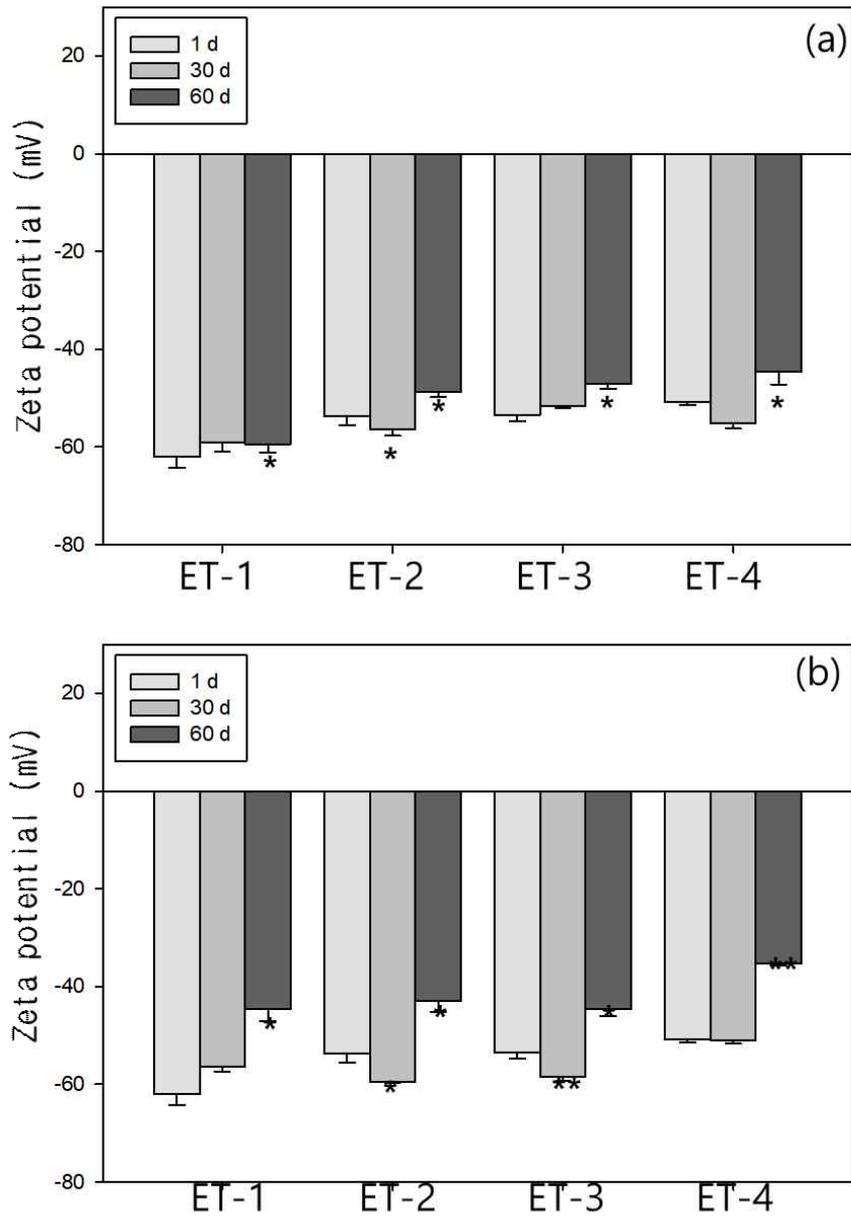


Figure 20. Zeta potential data over time at (a) 25 °C and (b) 45 °C on ethosome. The results were expressed as the mean \pm SD (N = 3),

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with each 1 d data.

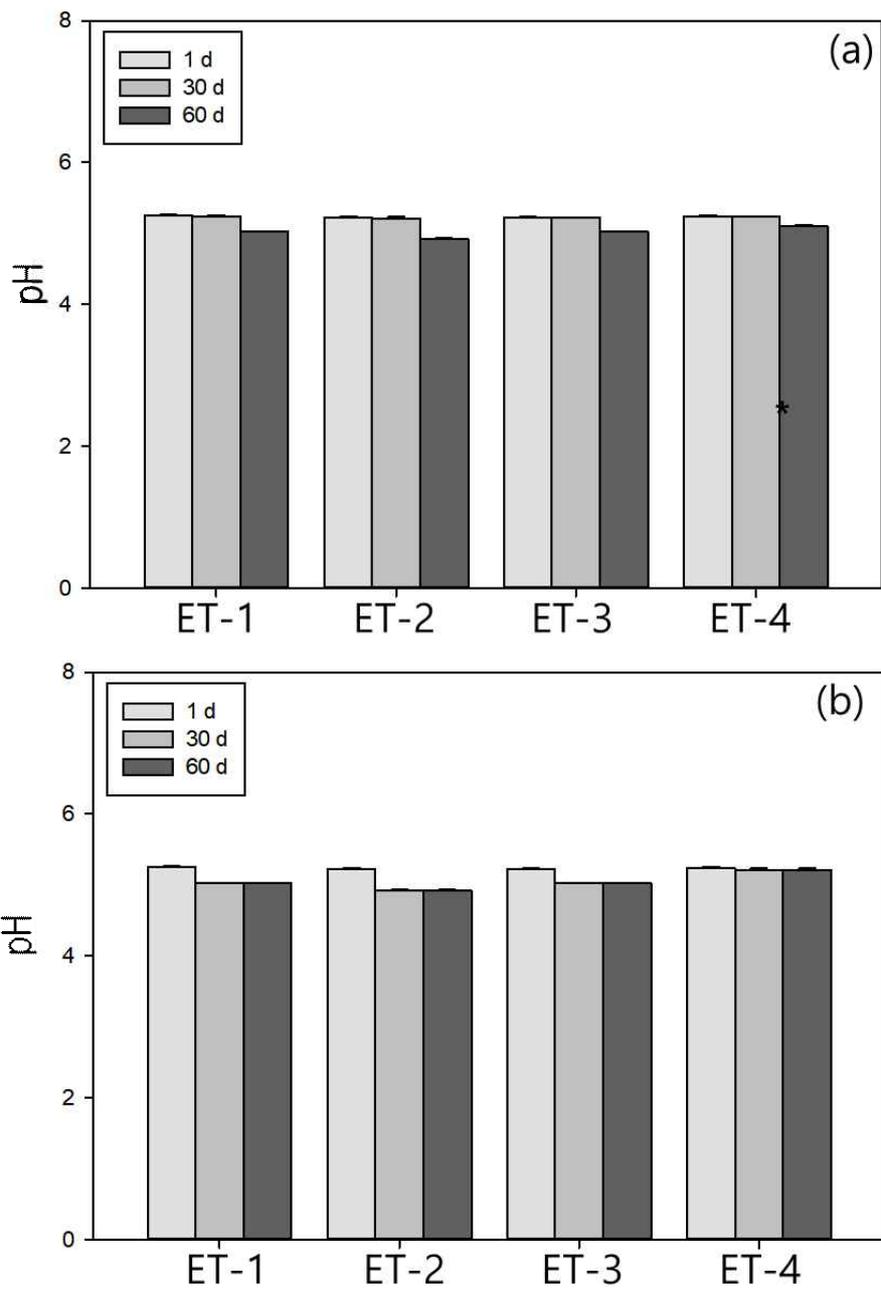


Figure 21. pH data over time at (a) 25 °C and (b) 45 °C on ethosome.

The results were expressed as the mean \pm SD (N = 3).

3.3. Transethosome의 물리 화학적 특성 및 최적화

Ethosome 제형의 실험을 통해 에탄올 함량 5% 일 때, 가장 안정함을 확인하여, transethosome을 제조 할 때, 에탄올을 5% 함유하고, edge activator로 span 80, tween 20, tween 80, tween 85를 인지질과 80 : 20의 비율로 첨가하여 제조하였다. 그 결과, edge activator에 따라서 입자크기가 달라짐을 확인할 수 있었다. 실온에서는 친유성 계면활성제인 Span 80 (HLB 4.3)을 사용한 TE-1 (135 ~ 169 nm)와 Tween 85 (HLB 11)을 함유한 TE-4 (105 ~ 200 nm)가 Tween 20, 80을 사용한 transethosome (95 ~ 147 nm)보다 크게 나타났다. 계면활성제 HLB 값이 작을수록 입자크기가 증가하는 경향을 나타내었다. 항온에서는 60 d 경과 후, 전체적으로 입자크기가 증가하였으며, Tween 계열 계면활성제를 함유한 transethosome은 30 d 경과 이후부터 증가하였다(Fig. 22). 이는 비이온성 계면활성제의 HLB 값이 큰 경우에, 작은 입자에서의 계면활성제가 매질에 좀 더 녹아 들어 간 후 큰 입자에 흡착되어, 작은 입자는 더욱 작게, 큰 입자는 더욱 크게 커지는 오스트발트 라이프닝 현상에 의한 것으로 판단된다. 입자크기를 plotting 한 그래프에서 볼 수 있듯이 Tween 85를 함유한 TE-4의 입자가 가파르게 증가하는 것을 볼 수 있는데, 이는 trans 형의 elaidic acid가 섞여 있는 구조이기 때문에 증가한 것으로 판단된다(Fig. 23).

PDI 값은 실온에서 TE-1 ~ 3 은 0.25보다 큰 0.3 정도이며, 60 d 동안 큰 변화는 없었으나, tween 85를 함유한 TE-4의 값이 다소 높은 것을 확인하였다. 이는 오스트발트 라이프닝 속도가 상대적으로 느려, 작은 입자와 큰 입자들이 공존하여 나타나는 현상으로 보인다(Fig. 24).

제타전위를 측정한 결과, 실온에서 60 d 경과 후에 큰 변화는 관찰되지 않았으며, 항온에서는 Tween 20을 함유한 TE-2의 값이 다소 감소하였으나 그러나 모두 절댓값 ± 30 mV 이상의 값으로 확인되어 정전기적으로 안정하다고 판단되었다(Fig. 25).

pH 결과에서는 60 d 동안 실온과 항온에서 변화가 없이 pH 5.00 ~ 5.18 정도

로 측정되었다(Fig. 26).

에탄올 5%와 HLB가 다른 계면활성제를 함유한 transethosome은 Tween 20을 첨가하였을 때, 입자의 크기가 가장 작으며, 가장 안정하다고 판단하였다.

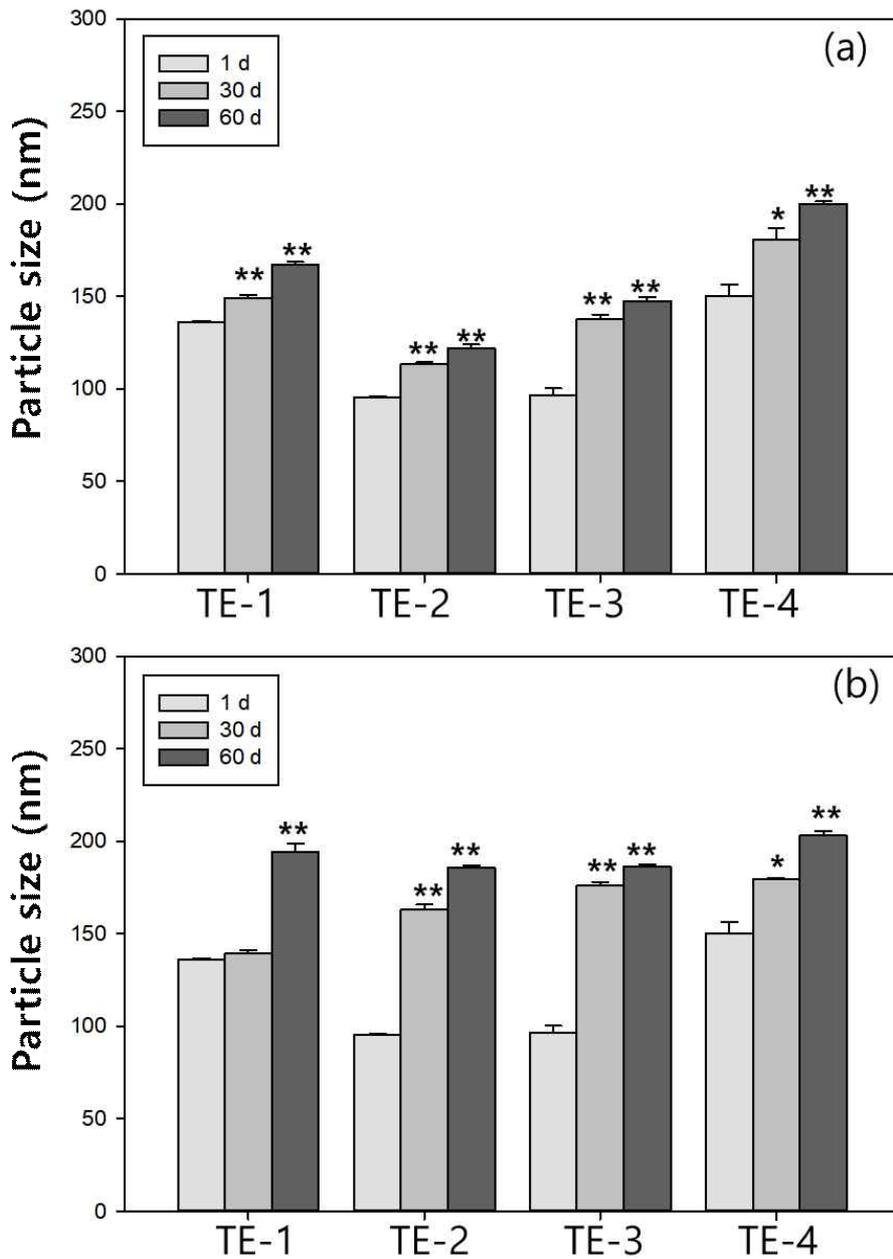


Figure 22. Particle size data over time at (a) 25 °C and (b) 45 °C on transethosome. The results were expressed as the mean \pm SD (N = 3),

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with each 1 d data.

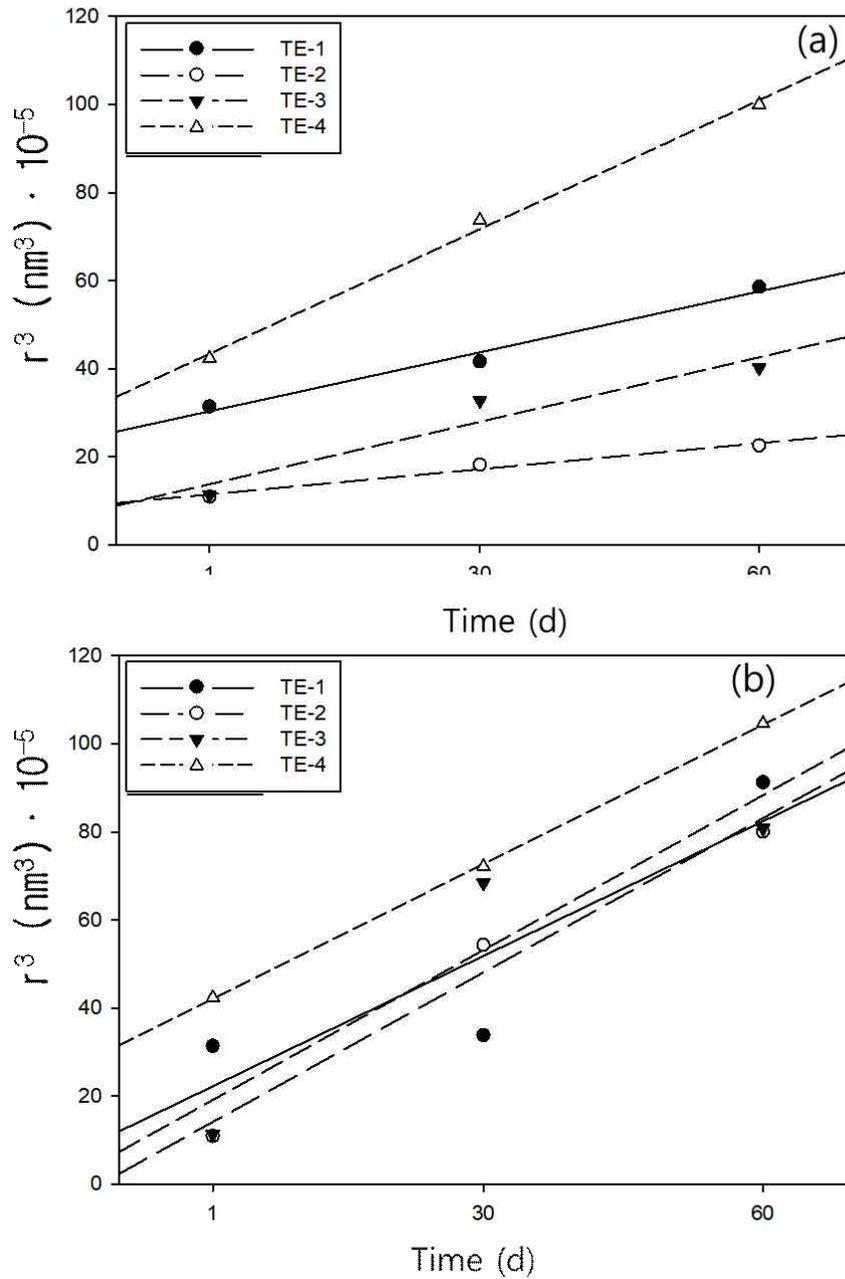


Figure 23. Plot of particle size (R^3) versus elapsed time (day) at (a) 25 °C and (b) 45 °C on transethosome.

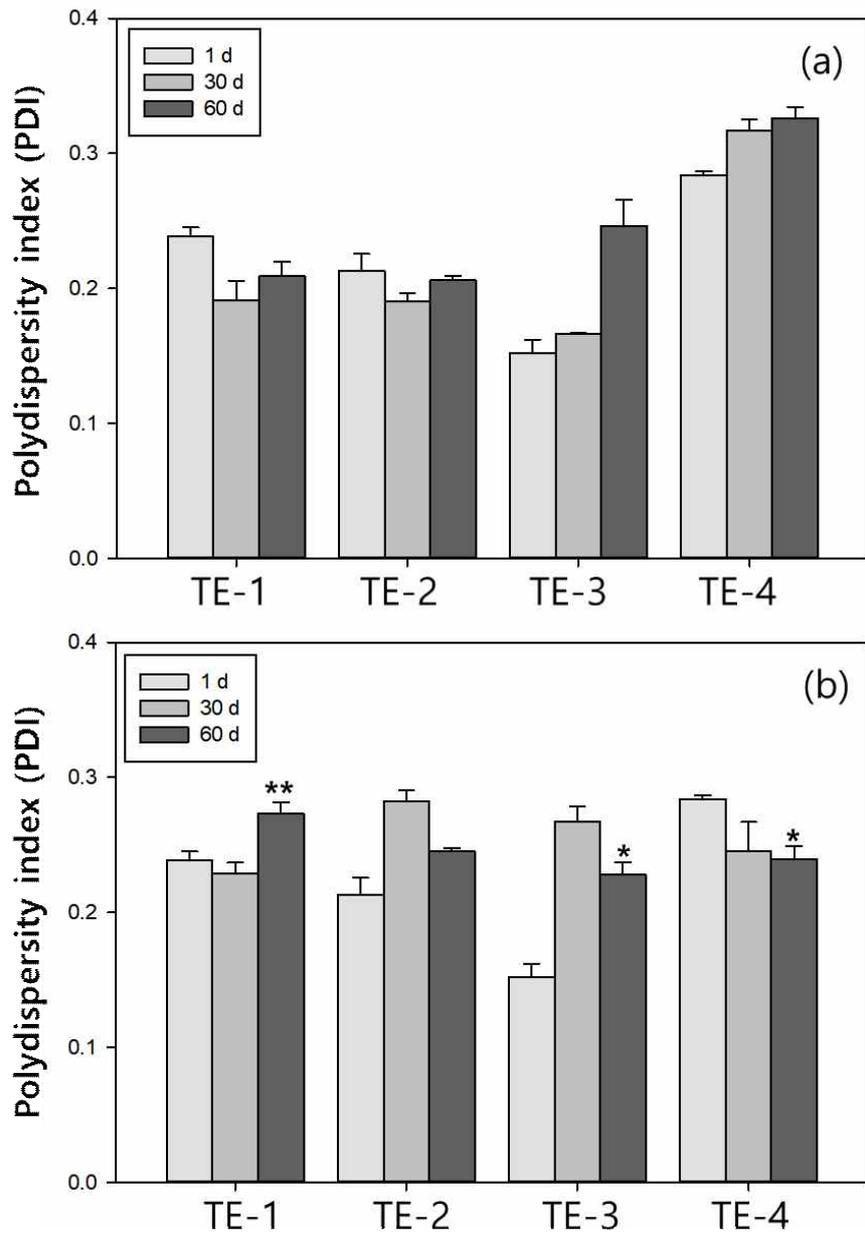


Figure 24. PDI data over time at (a) 25 °C and (b) 45 °C on transthosome. The results were expressed as the mean \pm SD (N = 3), * p < 0.05, ** p < 0.01 compared with each 1 d data.

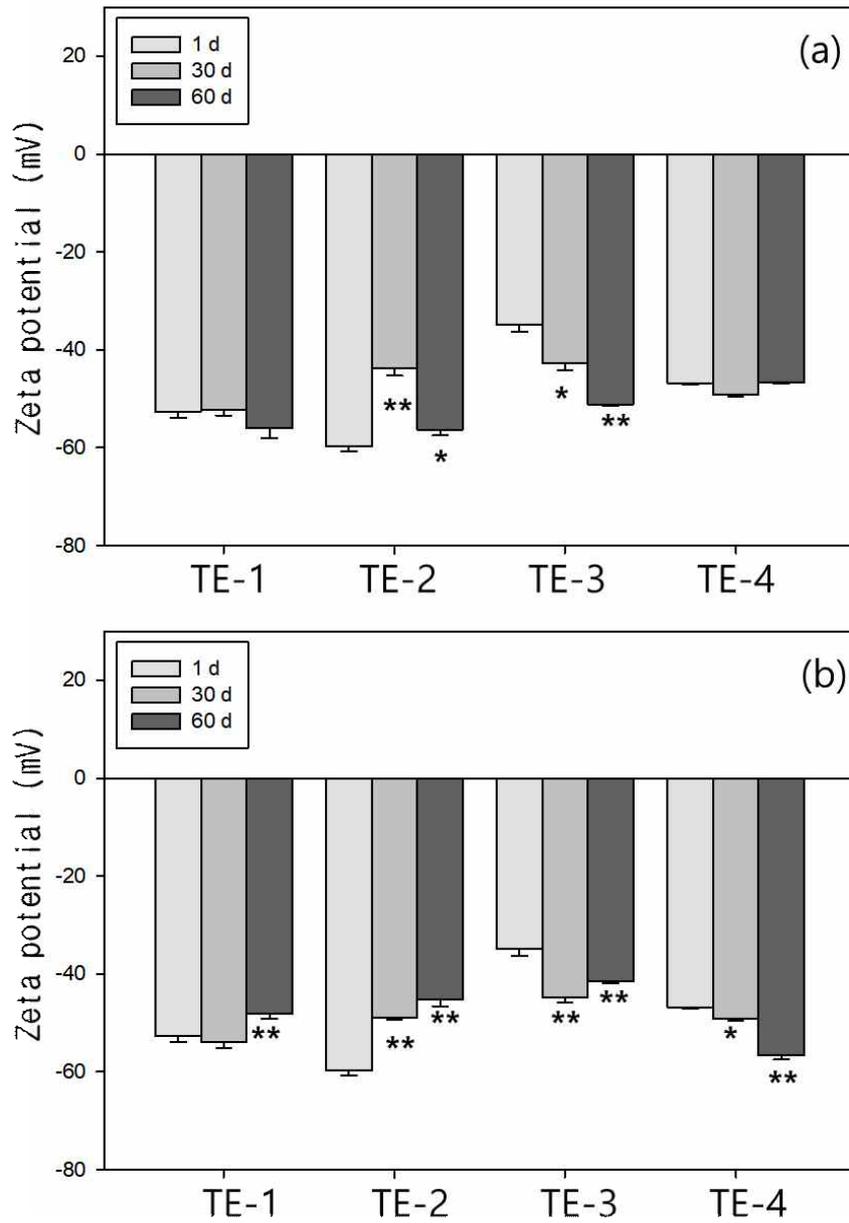


Figure 25. Zeta potential data over time at (a) 25 °C and (b) 45 °C on transethosome. The results were expressed as the mean \pm SD (N = 3), * p < 0.05, ** p < 0.01 compared with each 1 d data.

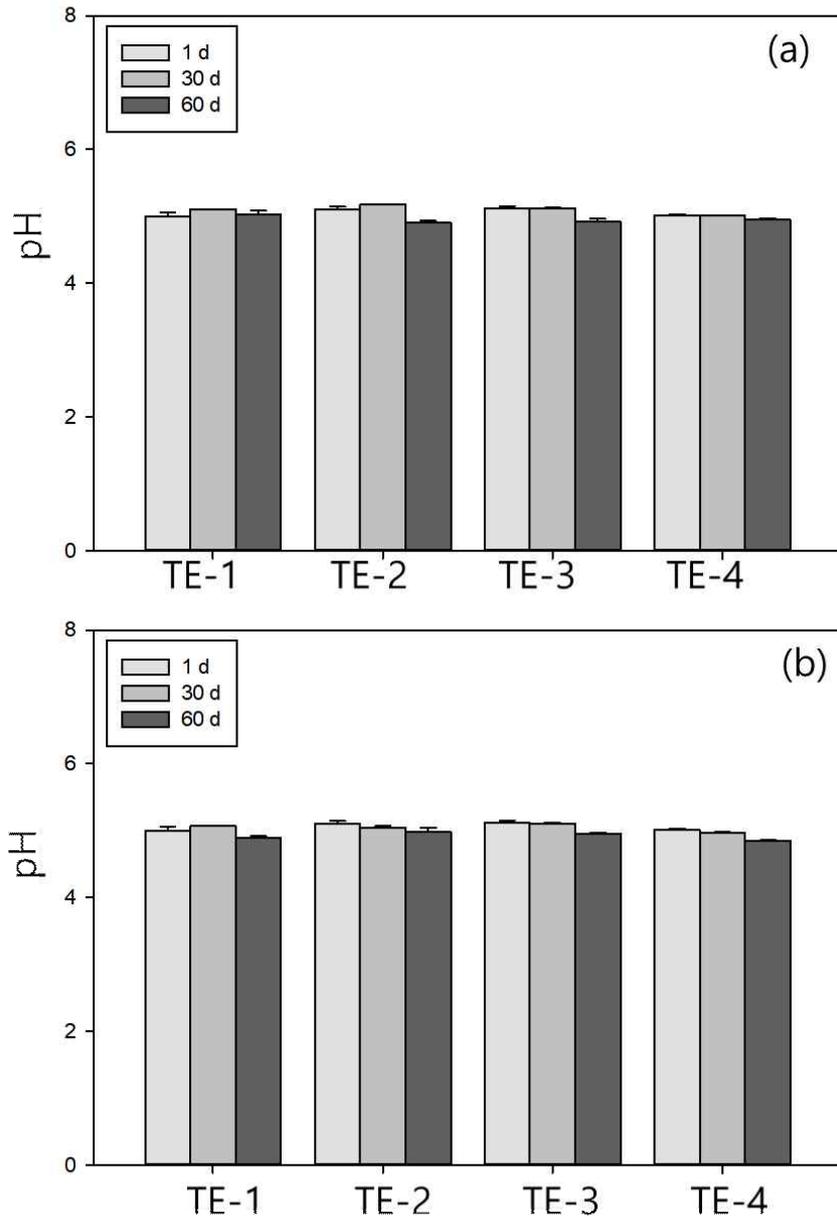


Figure 26. pH data over time at (a) 25 °C and (b) 45 °C on transethosome. The results were expressed as the mean \pm SD (N = 3).

3.4. Madecassoside 함량 분석

피부투과율을 측정하기 위하여 지표물질인 madecassoside를 농도에 따른 추세 곡선을 얻었으며(Fig.27), 이를 이용하여 centella quatro에서의 madecassoside 함량($32.5 \pm 0.81\%$)을 분석하였다. Centella quatro에서 madecassoside는 retention time (RT)가 6.426 min으로 확인되었으며, 지표물질인 madecassoside의 RT는 6.339 min으로 유사한 값을 나타내었다(Fig. 28). 이후, Franz diffusion cell system의 회수칸에 시간 별로 투과된 madecassoside의 농도를 구하여 피부투과율을 계산하였다.

3.5. 최적화된 제형의 약물 방출 (Drug release)

최적화된 4가지의 제형에 대한 약물 방출 실험을 실시하였다. 실험은 37 °C 에서 2, 4, 8, 12, 24 h 간격으로 dialysis membrane을 이용하여 측정하였으며, 시간마다 용매를 채취하고 새로운 용매로 교체하여 주었다. 채취한 것을 HPLC system을 이용하여 madecassoside의 함량을 측정한 뒤 누적 방출량으로 계산하였다. 그 결과, 방출 2 h이 경과 하였을 때, transfersome의 방출이 $46.39 \pm 0.16\%$ 로 가장 높았으며, 24 h 경과 후에도 $94.90 \pm 0.26\%$ 로 가장 많은 방출이 일어났다. Liposome과 Transehtosome은 24 h 경과 후 각각 $88.57 \pm 0.59\%$, $88.00 \pm 0.44\%$ 로 비슷한 방출량이 나타났으며, ethosome은 $82.66 \pm 1.78\%$ 로 가장 낮은 방출량을 나타냈다(Fig. 29). 이를 통해, liposome과 transfersome, ethosome 및 transehtosome은 서서히 방출됨을 확인하였으며, 약물을 전달하기에 적절한 제형이라고 판단되어진다.

3.6. 최적화된 제형의 캡슐효율

Dialysis membrane을 이용한 캡슐효율은 HPLC system을 통해 분석하였다. 그

결과, ethosome이 51.45 ± 0.16 %로 가장 효율이 좋았으며, transethosoem이 44.41 ± 0.80 %, liposome이 43.73 ± 0.16 %, transfersome이 36.65 ± 3.70 %의 순서였다(Tabel. 11).

Transfersome을 제외한 나머지 제형은 모두 비슷한 포집효율이 나타났으며, ethosome이 가장 높은 포집효율을 나타내었는데, 이는 에탄올에 의한 막이 유연해 지면서 포집효율도 높게 나타났다고 판단하였다. Transfersome은 계면활성제에 의해 막의 가변성은 있으나 캡슐효율이 낮게 나타난 것은 특정 농도 이상으로 혼합되었을 때, 마이셀을 형성하기 때문이라고 판단된다.

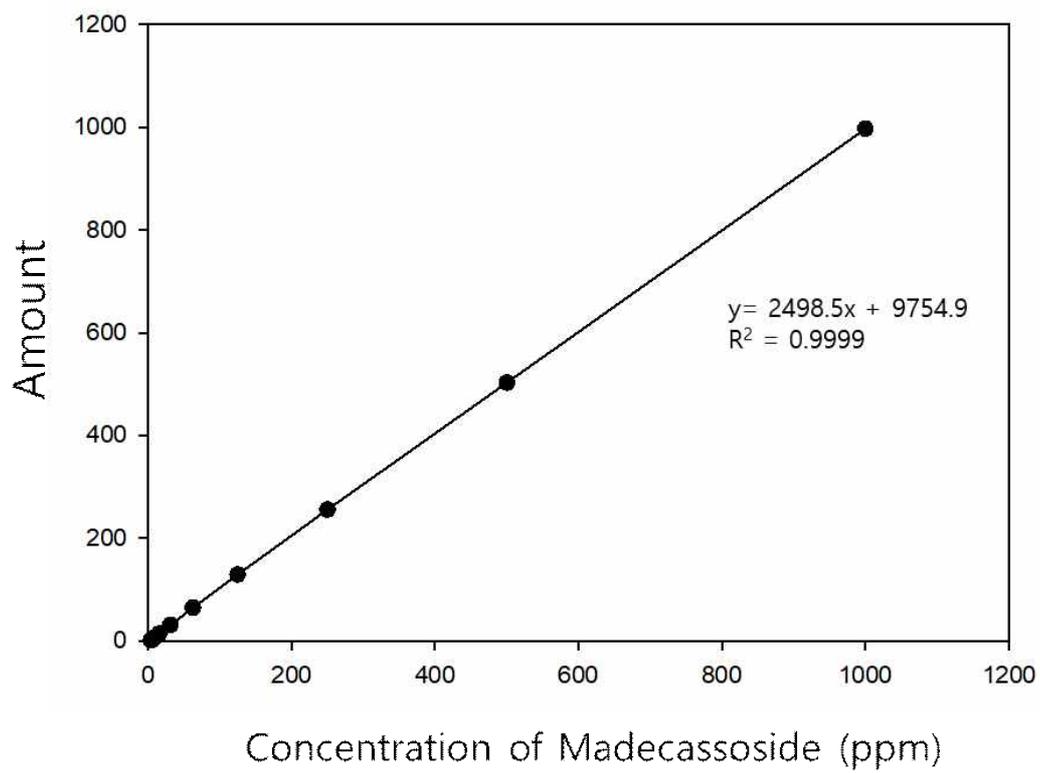


Figure 27. Madecassoside calibration curve using HPLC system.

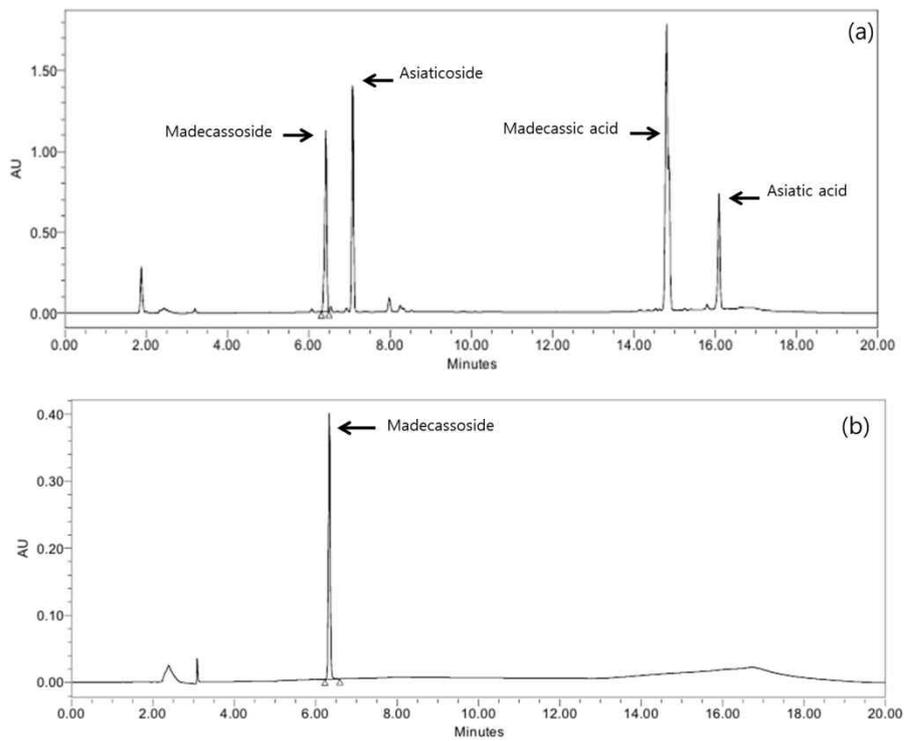


Figure 28. HPLC chromatograms; (a) madecassoside, asiaticoside, madecassic acid and asiatic acid peaks of *Centella quatro*, (b) madecassoside standard peak, detected at 202 nm.

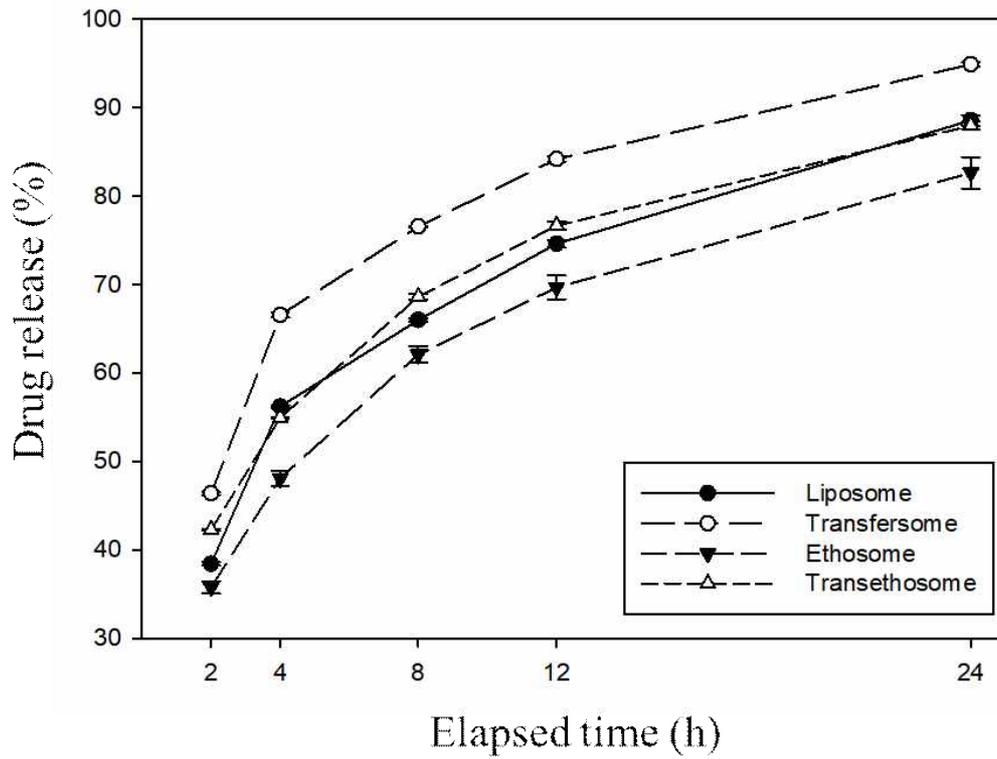


Figure 29, Drug release of 4-types formulation in madecassoside by dialysis membrane method for 24 h (N = 3).

Table 11. Results of dialysis membrane method capsulating efficiency.

Sample	Liposome	Transfersome	Ethosome	Transethosome
Capsulating efficiency (%)	43.73±0.16	36.55±3.70	54.45±1.53	44.47±0.80

3.7. 피부흡수율 및 피부흡수 플럭스(Flux)

병풀추출물을 함유한 4가지의 제형의 피부투과율을 비교분석하기 위하여 Franz diffusion cells system을 이용하여 피부투과율을 비교분석 하였다. 1, 2, 4, 8, 12, 24 h 경과 후 시간마다 수용액을 채취 하였으며, 실험 종료 후 membrane과 공여칸도 함께 지표물질인 Madecassoside의 함량을 HPLC system을 통해 분석하였다. 피부투과율은 24 h후 인공피부를 통과한 Madecassoside의 누적투과율로 나타내었으며, 그 결과, transethosome이 45.18%로 누적피부투과율이 가장 높았으며, transfersome은 43.36%, ethosome은 37.35%, liposome은 36.12%의 순으로 나타났다 (Fig. 30). 투과 2 h까지는 4가지 제형의 투과율은 비슷하였으나 투과 4 h 이후부터 transethosome의 투과율이 증가하였고, 이후 transfersome의 투과량도 증가하였다. Transethosome은 소포체 막의 가변성과 유연성을 동시에 가지게 되므로 피부투과율 가장 높은 것으로 판단되며, 막의 가변성을 가지는 transfersome과 transethosome이 피부 전달 능력이 우수함을 확인하였다.

또한, 피부 투과속도(Flux, $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)는 투과 2 h이 지났을 때 liposome과 ethosome의 투과 속도가 급격히 증가하고, 투과 4 h 이후에는 transfersome과 transethosome의 투과 속도가 급격하게 증가되는 것을 확인하였고, 투과 24 h 이후에는 transethosome은 $10.79 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$, transfersome은 $10.06 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ 로 투과량이 높게 나타났다(Fig. 31). 이 결과를 통해 transethosome은 지질막 사이에 첨가된 계면활성제가 지질막을 불안정하게 하여 막의 가변형성을 증가시키고, ethanol에 의해 피부의 유연성이 증가하여 vesicle이 생체막과 융합하는 것을 촉진시켜 약물의 피부 투과를 증진시킬 수 있다.

F. N. Marzulli 등의 정의에 따라 Kp 정도를 판단하면 모두 'very fast'의 투과도를 나타내었다. Liposome, transfersome, ethosome은 모두 비슷한 값을 나타내었으나, transethosome은 Kp가 조금 큰 값을 나타내었음을 알 수 있다(Table 12).

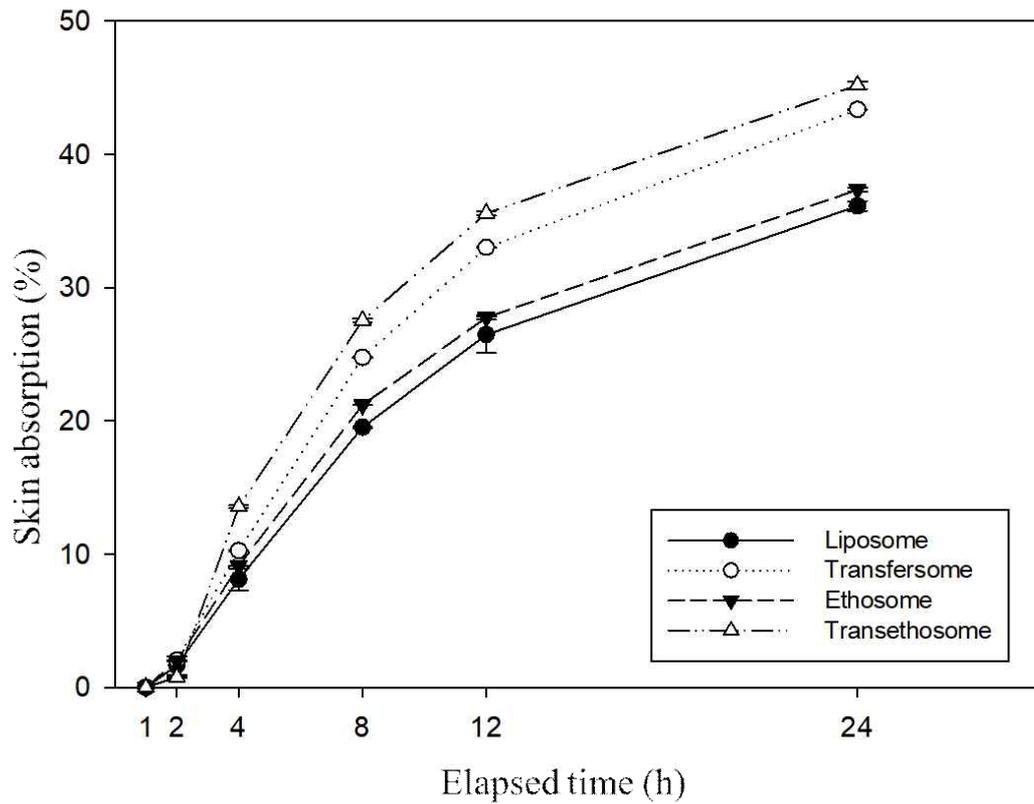


Figure 30. Cumulative skin absorption of madecassoside over time by Franz diffusion cell test of four formulations by Strat-M membrane.

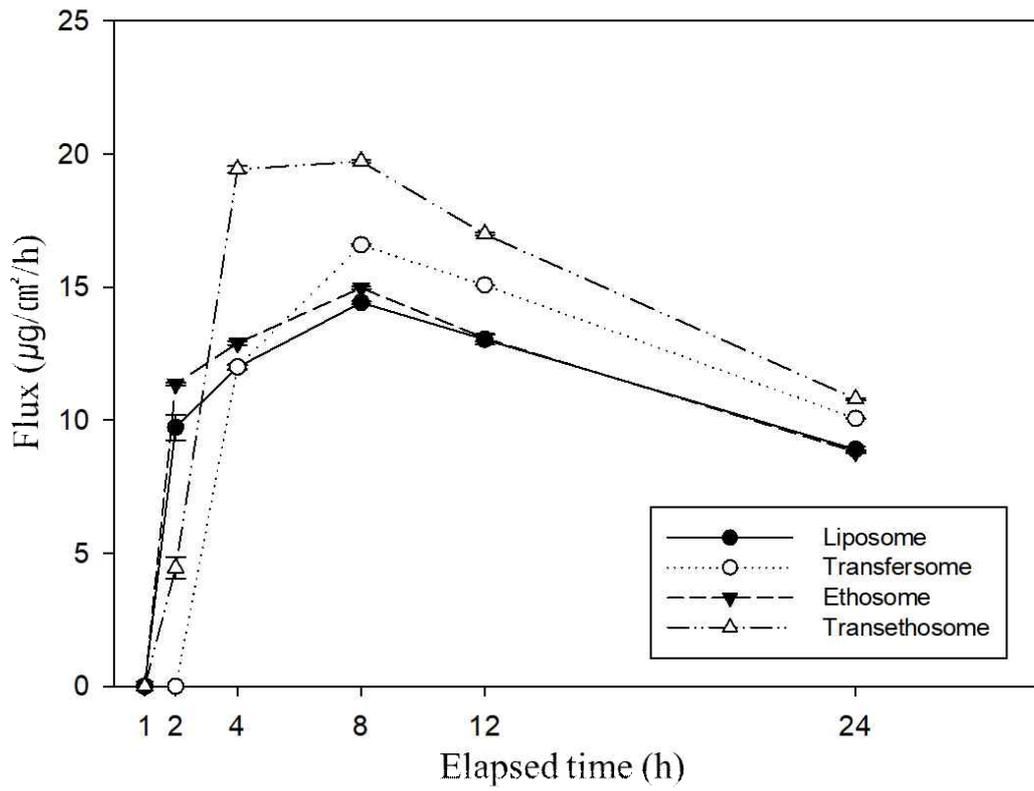


Figure 31. Comparison of four formulations for Flux ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) of madecassoside over time by Franz diffusion cell test by Strat-M membrane.

Table 12. Mass balance of skin absorption and kinetic parameters of Madecassoside through the Strat-M membrane.

Formulation	Steady-state flux ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)	K_p (cm/h)	Absorption rating
Liposome	9.68 ± 0.15	0.0015 ± 0.00012	Very fast
Transfersome	22.97 ± 0.20	0.0015 ± 0.00004	Very fast
Ethosome	31.39 ± 0.20	0.0015 ± 0.00000	Very fast
Transethosome	27.69 ± 0.16	0.0018 ± 0.00002	Very fast

3.8. 형태학적 관찰 (TEM)

4가지 제형에 대한 형태학적 관찰을 위해 Cryo-TEM을 측정하였다. 입자크기가 90-150 nm 사이로 측정된 vesicle size와 유사하였으며, 지질 이중층을 이루는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 32). 이를 통하여 liposome과 비교하였을 때, transfersome은 지질 이중층에 변형이 일어난 것을 확인할 수 있었다. 또한, ethosome의 경우는 ethanol로 인한 큰 변화는 관찰되지 않았지만 liposome의 형태를 띠고 있는 것을 확인하였고, transethosome의 경우는 transfersome과 유사한 형태를 확인할 수 있었다(Fig. 32).

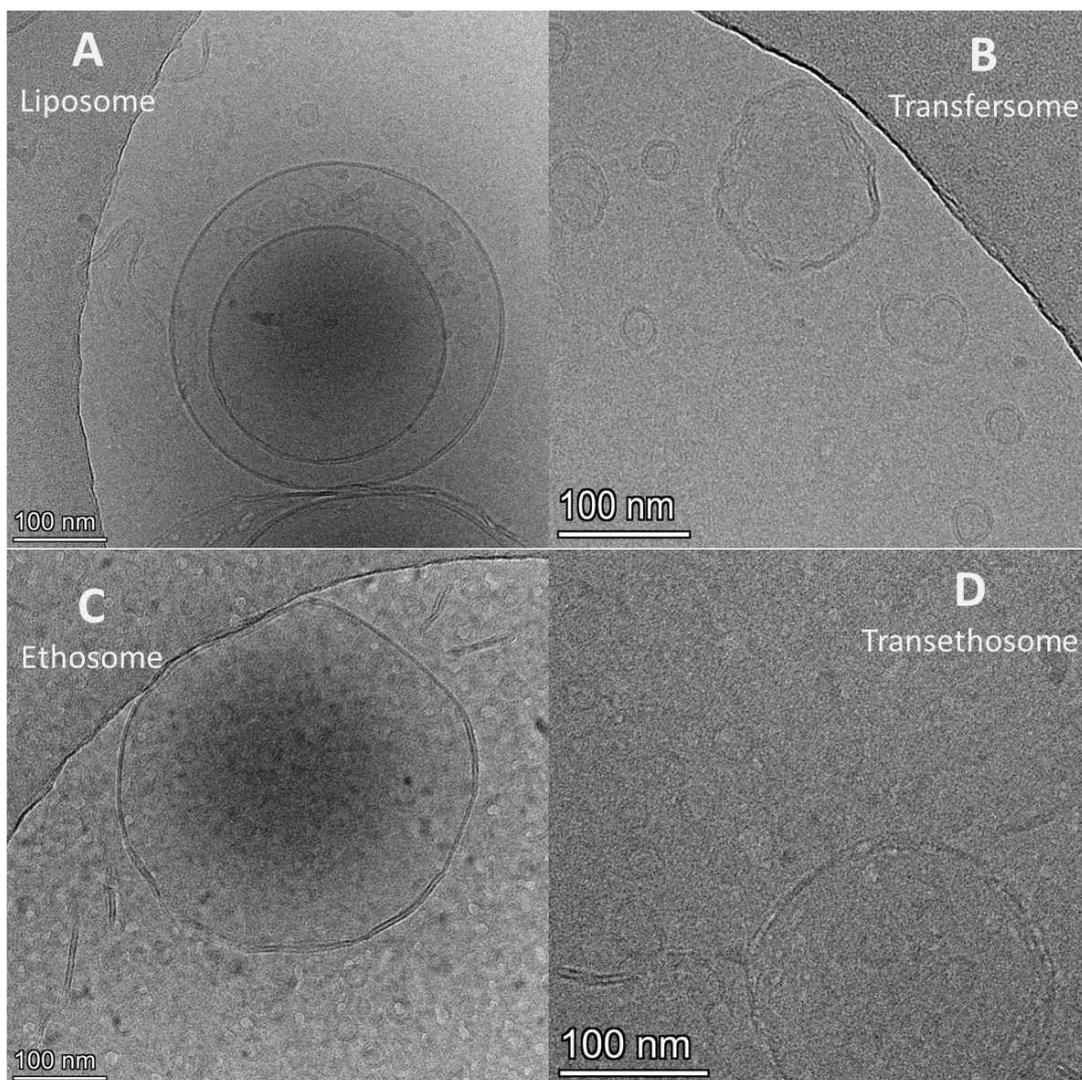


Figure 32. Cryo-TEM images of a liposome (A), transfersome (B), ethosome (C), transethosome (D).

3.9. 인지질 종류에 따른 피부흡수율 및 피부흡수 플럭스(Flux)

병풀추출물을 함유한 4가지의 제형에 대한 최적화된 조건을 확인하였으며, 인지질의 종류에 따른 피부흡수율을 비교해보고자 하였다. 최적화 조건에 사용된 Lipoid S75-3은 하이드로겐화 된 phosphatidylcholine이 70% 이상 함유한 인지질로 수소첨가로 인하여 원료 보관에 좀 더 안정적이다. 그렇기 때문에 대부분 liposome을 제조할 때에는 이 원료를 사용한다. Nano vesicle의 최적 조건에서 인지질만 하이드로겐화 되지 않은 Lipoid S-75(phosphatidylcholine 70%)와 Lipoid P-100 (phosphatidylcholine 90%)을 이용하여 제형을 제조하고 피부흡수율에 대한 실험을 실시하였다.

피부투과율을 비교분석하기 위하여 Franz diffusion cells system을 이용하여 피부투과율을 비교분석 하였다. 1, 2, 4, 8, 12, 24 h 경과 후 시간마다 수용액을 채취 하였으며, 실험 종료 후 membrane과 공여칸도 함께 지표물질인 Madecassoside의 함량을 HPLC system을 통해 분석하였다. 피부투과율은 24 h 후 인공피부를 통과한 Madecassoside의 누적투과율로 나타내었으며, 그 결과, Lipoid S75를 사용한 transethosome이 92.03%로 가장 높은 피부흡수율로 나타났으며, ethosome이 89.87%, transfersome이 84.81%, liposome이 84.16% 순서로 확인되었으며, 전체적으로 높은 흡수율을 나타내었다(Fig. 33). 피부 투과속도(Flux, $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)는 투과 2시간이 지났을 때, 전체적으로 투과 속도가 급격히 증가하였으며, transethosome의 투과속도가 $140.92 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ 로 가장 높게 나타났다. Ethosome, transfersome, liposome 순서로 투과속도가 나타났다(Fig. 34).

Lipoid P-100을 함유한 제형에서는 liposome이 98.43%로 가장 높은 피부흡수율을 나타내었으며, transfersome이 97.10%, ethosome이 92.25%, transethosome이 90.01%의 순서로 나타났으며, 모두 90% 이상의 높은 흡수율을 나타내었다(Fig. 35). 피부 투과속도(Flux, $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)는 투과 4시간이 경과 되었

을 때, 급격하게 증가하였고, 이 때는 transethosome이 $160.56 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ 로 가장 높은 투과량을 나타내었으며, liposome이 $155.70 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$, ethosome이 $141.16 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$, transfersome이 $124.79 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ 의 순서로 나타났다. 전체적인 흡수율은 liposome이 높으나 가장 많이 흡수된 4 시간 경과 후 피부 투과량은 transethosome이 가장 높게 나타났다(Fig. 36).

Lipoid S75-3, Lipoid S75, Lipoid P100을 비교 하였을 때, 전체적인 흡수율은 하이드로겐화 된 인지질보다는 phosphatidylcholine이 90% 함유한 P100을 사용하였을 때 가장 높은 흡수율을 보였고, S75 역시 S75-3 보다 전체적으로 높은 흡수율을 나타내었다. 각각의 결과에서는 transethosome이 피부 흡수율 및 피부투과속도가 가장 높음을 확인하였다. 이 결과를 통해 transethosome은 지질막 사이에 첨가된 계면활성제가 지질막을 불안정하게 하여 막의 가변형성을 증가시키고, ethanol에 의해 피부의 유연성을 증가시켜 vesicle이 생체막과 융합하는 것을 촉진시켜 약물의 피부투과가 증가함을 확인할 수 있었다.

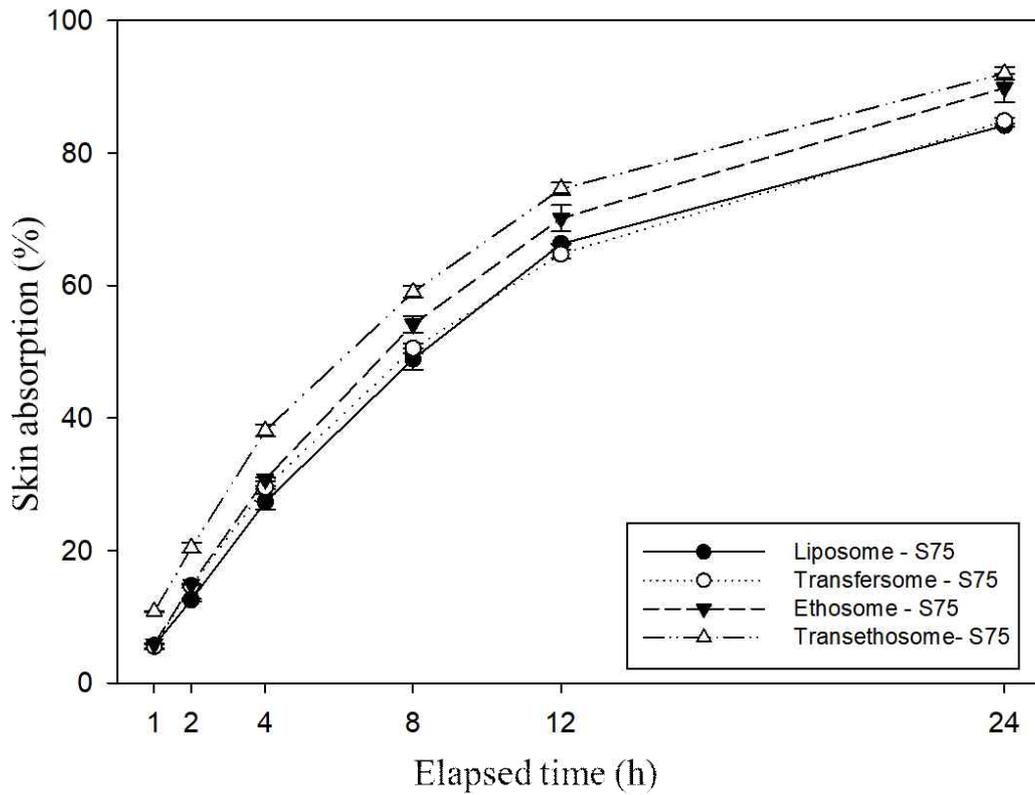


Figure 33. Cumulative skin absorption of madecassoside over time by Franz diffusion cell test of four formulations using P 75 phosphatidylcholine by Strat-M membrane.

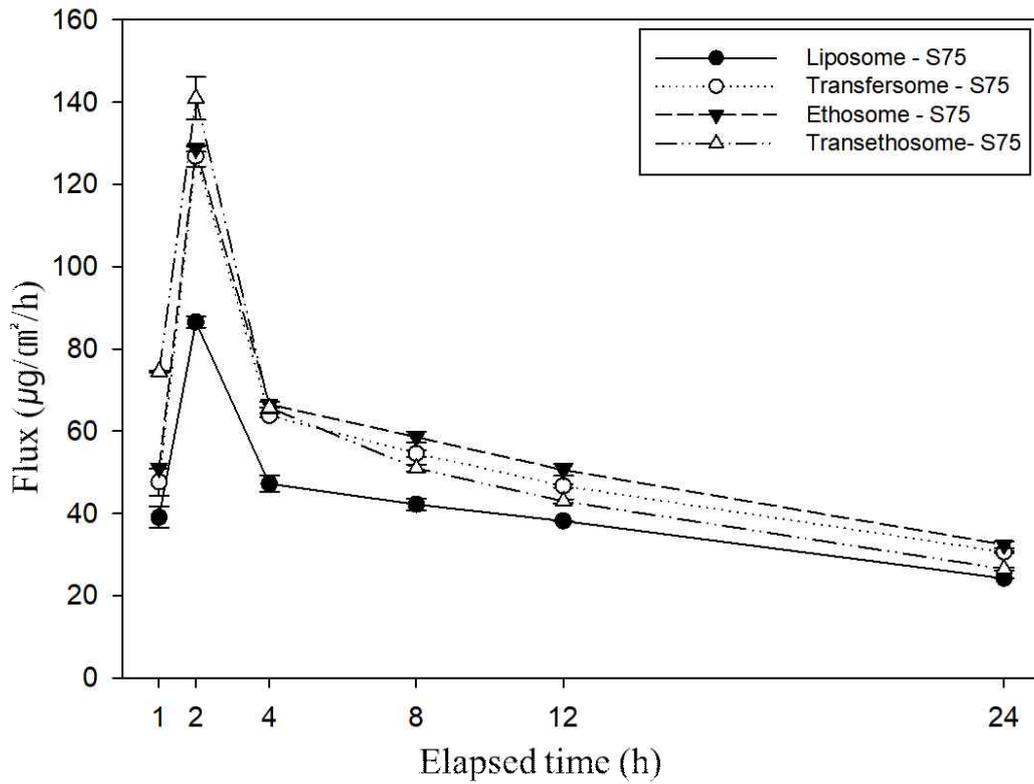


Figure 34. Comparison of four formulations for Flux ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) of madecassoside over time by Franz diffusion cell test using P 75 phosphatidylcholine by Strat-M membrane.

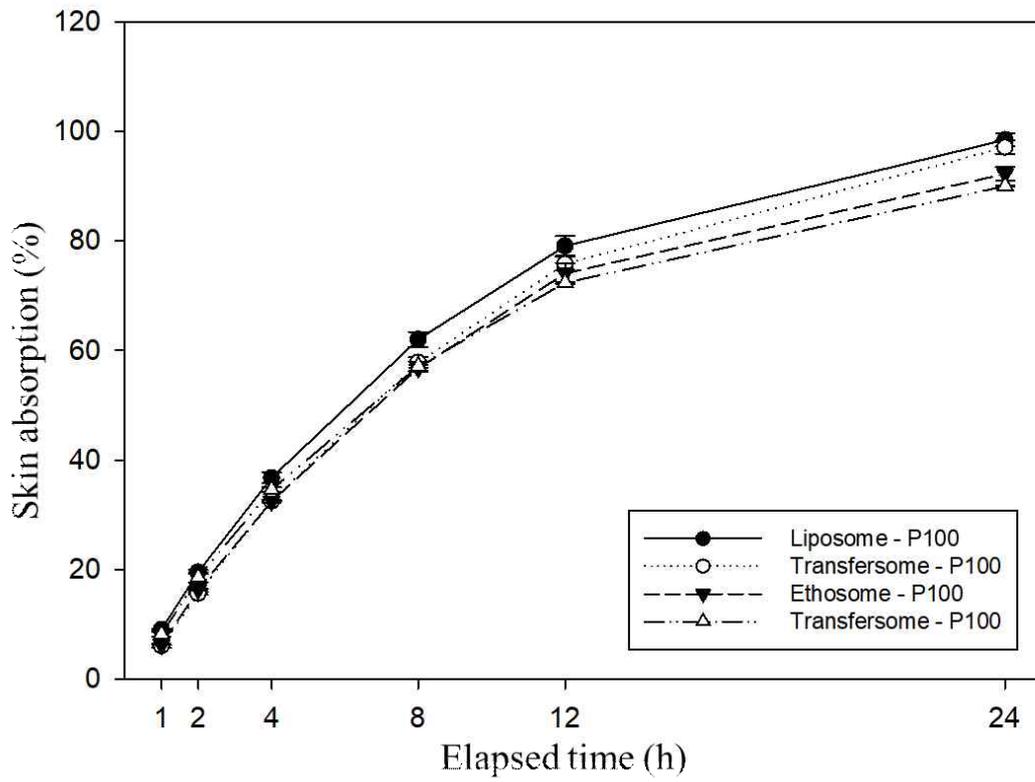


Figure 35. Cumulative skin absorption of madecassoside over time by Franz diffusion cell test of four formulations using P 100 phosphatidylcholine by Strat-M membrane.

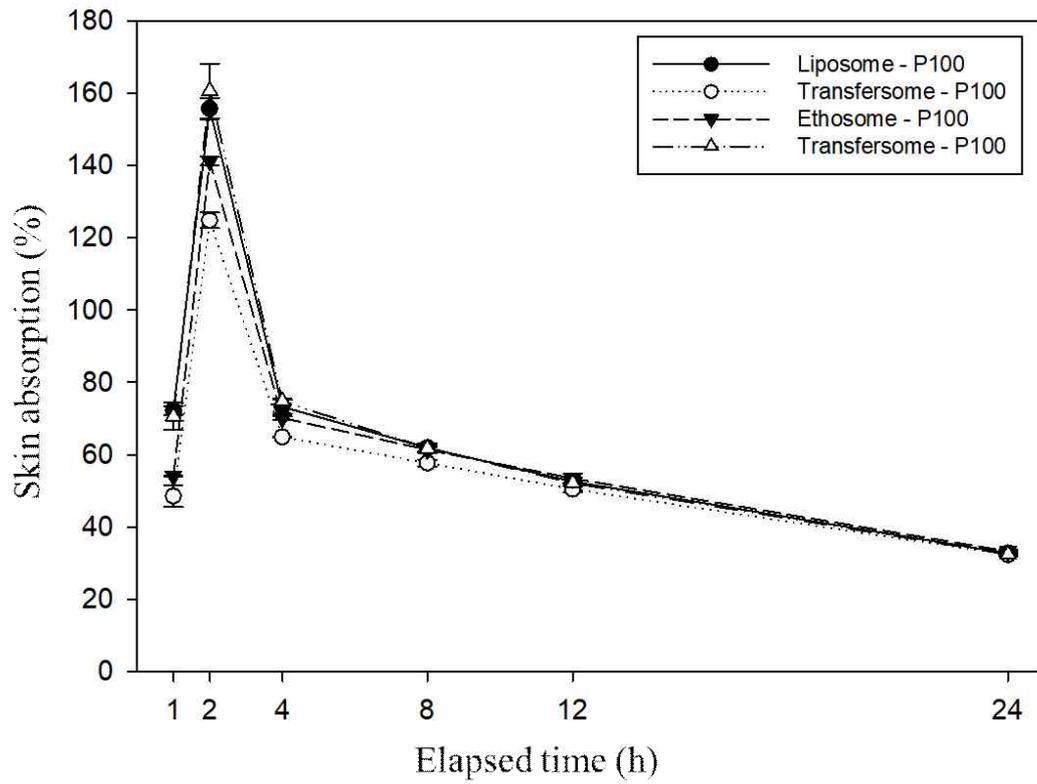


Figure 36. Comparison of four formulations for Flux ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) of madecassoside over time by Franz diffusion cell test using P 100 phosphatidylcholine by Strat-M membrane.

IV. 결론

본 연구에서는 병출추출물을 함유한 liposome의 다양한 형태에 대한 물리 화학적 특성과 피부투과율에 대한 비교를 진행하였다. Liposome과 다양한 계면활성제를 edge activator로 사용하는 transfersome, ethanol의 함량을 달리하여 제조한 ethosome, 다양한 edge activator와 ethanol을 함유한 transethosome을 제조하였으며, 물리화학적 특성과 피부흡수율에 대한 비교를 진행하였다. Nano vesicle의 입자크기, 다분산지수, 제타전위, pH에 대하여 실온, 항온에서 60 d 동안 관찰하였다.

제조 60 d 경과 후, 실온에서 liposome과 transfersome의 입자크기는 큰 변화가 없었지만, 친유성 계면활성제인 Span 80 (HLB 4.3)을 사용한 TS-1 (135 ~ 143 nm)와 Tween 85 (HLB 11)을 함유한 TS-5 (109 ~ 119 nm)가 Tween 20, 60, 80을 사용한 transfersome (92 ~ 100 nm)보다 크게 나타났다. 계면활성제 HLB 값이 작을수록 입자크기가 증가하는 경향을 나타내었다. 항온에서는 60 d 경과 후, Tween 계열의 계면활성제를 함유한 transfersome은 유의하게 크기가 증가하였으며, Span 80을 함유한 transfersome은 크기가 작아졌음을 확인하였다. 이는 비이온 계면활성제의 HLB 값이 큰 경우에, 작은 입자에서의 계면활성제가 매질에 좀 더 녹아들어 간 후 큰 입자에 흡착되어, 작은 입자는 더욱 작게, 큰 입자는 더욱 크게 커지는 오스트발트 라이프닝 현상에 의한 것으로 판단된다. 제타전위는 실온에서 liposome은 감소하였지만, transfersome에서는 큰 변화가 나타나지 않았으며, 항온에서는 값이 증가하는 경향을 보였지만 모두 절댓값 ± 30 mV 이상의 값으로 확인되어 정전기적으로 안정하다고 판단하였다. pH는 60 d 동안 실온과 항온에서 큰 변화가 없음을 확인하였다. Ethosome은 ethanol의 함량이 높을수록 입자크기가 증가하고, PDI 가 증가하는 것을 확인하였다. 제타전위는 항온에서 보관 시 조금 낮아지는 것을 확인하였고, pH는 큰 변화가 없었음을 확인하였다. 이를 통해 ethanol의 함량이 5% 일 때, 입자크기가 가장 작고, PDI, 제타전위

가 안정적임을 확인하였다.

Ethosome의 최적화를 통해 ethanol의 함량이 5% 일 때, 가장 안정적임을 확인하여 transethosome을 제조 시 참고하였다. Edge activator로 Span 80, Tween 20, Tween 80, Tween 85를 사용하여 제조하였으며, 그 결과, edge activator에 의해 입자크기가 달라짐을 확인하였다. 실온에서는 친유성 계면활성제인 Span 80 (HLB 4.3)을 사용한 TE-1 (135 ~ 169 nm)와 Tween 85 (HLB 11)을 함유한 TE-4 (105 ~ 200 nm)가 Tween 20, 80을 사용한 transethosome (95 ~ 147 nm)보다 크게 나타났다. 계면활성제 HLB 값이 작을수록 입자크기가 증가하는 경향을 나타내었다. 입자크기를 plotting 한 그래프에서 볼 수 있듯이 Tween 85를 함유한 TE-4의 입자가 가파르게 증가하는 것을 볼 수 있는데, 이는 trans 형의 elaidic acid가 섞여 있는 구조이기 때문에 증가한 것으로 판단된다. PDI, 제타전위, pH는 큰 변화없이 안정적임을 확인하였다. 이를 통하여 최적화된 조건을 확인하였고, 인지질과 계면활성제의 비율이 80:20 이며, Tween 20을 사용하였을 때, ethanol 함량이 5% 일 때, 가장 안정적인 제형이라고 판단하였다.

이 결과를 통하여 최적의 조건에 맞는 liposome, transfersome, ethosome, transethosome을 제조하였고, 캡슐효율, 약물방출, 피부흡수, 형태학적 관찰을 실시 하였다. 캡슐 효율실험에서는 ethosome, transethosome, liposome, transfersome의 순서로 나타내었으며, 약물 방출실험에서는 방출 2 h이 경과하였을 때, transfersome의 방출이 $46.39 \pm 0.16\%$ 로 가장 높았으며, 24 h 경과후에도 $94.90 \pm 0.26\%$ 로 가장 많은 방출이 일어났다. 24 경과 후 liposome은 $88.57 \pm 0.59\%$, transehtosome은 $88.00 \pm 0.44\%$ 로 비슷한 방출량이 나타났으며, ethosome은 $82.66 \pm 1.78\%$ 로 가장 낮은 방출량을 나타냈다. 이를 통해, liposome과 transfersome, ethosome 및 transethosome은 서서히 방출됨을 확인하였으며, 약물을 전달하기에 적절한 제형이라고 판단하였다. Franz diffusion cell을 이용하여 4가지 제형에 대한 피부투과 능력을 평가한 결과, transethosome의 피부투과율이 가장 높았으며, transfersome, ethosome, liposome 순으로 나타났다. 투과 4 h 이후부터 transethosome의 투과량이

증가하여 41.8%의 피부투과율로 나타났다. 피부투과 속도(Flux)에서는 초기 투과 2 h 경과 후 liposome과 ethosome의 속도가 상승하였으나, 투과 4 h 이후, transethosome과 transfersome의 투과 속도가 급격히 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 transethosome이 계면활성제와 에탄올에 의해서 가변성과 유연성을 동시에 가지게 되므로 각질층 안에 존재하는 지질 막의 계면장력을 감소시켜, 피부장벽이 느슨해지면서 피부 내부로 활성물질의 전달이 효과적으로 더 깊숙한 곳까지 전달되는 것으로 판단된다[58, 71, 72].

4가지 제형에 대한 형태학적 관찰을 위해 Cryo-TEM을 이용하였으며, 모두 지질 이중층을 확인하였고, vesicle size 인 90-150 nm의 크기로 확인되었다.

또한, 인지질의 종류에 따라 피부흡수율을 조사하였을 때, 하이드로겐화 된 Lipoid S75-3보다 하이드로겐화 되지않은 Lipoid S75, Lipoid P100을 사용하였을 때 더 높은 피부흡수율을 확인하였고, 전체적으로 transethosome의 흡수율이 가장 높았다. 그러나 하이드로겐화 되지 않은 원료는 보관이 어렵기 때문에, 사용하기에 쉽지가 않음을 알 수 있었다.

이러한 지질 기반 nano vesicle의 연구가 많이 이루어졌으며, 각각의 제형에 대한 활용이 만행 보고 되고 있다. 활성물질을 담지한 여러 형태의 지질기반 nano vesicle의 결과를 살펴보면, 울금추출물을 함유한 transfersome은 liposome, ethosome보다 피부 수분함량 등 개선에 더 용이하다고 보고하였고[73], 퀴세틴을 함유한 transfersome에서는 liposome보다 유효성분 전달이 더 높은 것으로 나타났다[74]. *Fraxinus angustifolia*의 잎과 껍질 추출물을 함유한 ethosome은 항산화 및 항염증에 더 효과적이라고 보고하였고[75], 히아루론산을 함유한 ethosome은 대조구에 비해 5배의 피부투과 효능이 있음을 보고하였다[76]. Miconazole nitrate를 함유한 transfersomal gel은 대조구에 비해 항진균 효능이 더 높은 것으로 나타났으며[77], Brucine과 strychnine을 담지한 transethosome은 표적기관으로 침투하여 약물 방출을 서서히 진행하여 효과적이라는 결과를 보고하였다

[78]. 지질기반의 nano vesicle은 화장품 산업뿐만 아니라 다양한 분야에서 활용되고 있음을 알 수 있다.

본 연구를 통해 4가지 제형에 대한 물리화학적 특징과 형태학적 특징을 알아보았고, 피부투과실험을 통해 가변성과 유연성을 모두 가지는 transethosome의 피부투과율과 플렉스가 가장 높은 것을 확인하였다. 다양한 제형에 대한 실험을 통해 병풀추출물을 담지한 nano vesicle은 화장품 제형으로서의 이용 가능성이 있음을 확인하였고, 화장품 원료뿐만 아니라 국소적으로 피부의 문제에 효과를 주는 방법의 역할도 기대할 수 있다.

V. Reference

- [1] E. F. Bernstein, Y. Q. Chen, K. Tarnai, K. J. Shepley, K. S. Resnik, H. Zhang, R. Tuan, A. Mauviel, and J. Uitto, Enhanced elastin and fibrillin gene expression in chronically photodamaged skin, *JID*, 103 (1994) 182-186.
- [2] D. W. Kim, M. H. Cho, S. Y. Park, J. H. Lee, G. W. Lee, M. S. Park, J. K. Park, and U. K. Jee, Preparation and evaluation of titrated extract of centella asiatica niosome/W/O system cream for site specific targeting, *J. Pharm. Investig.*, 32 (2002) 291-297.
- [3] Q.N.a.M.S. S Shakir Jamil, Centella asiatica (Linn.) Urban óA Review, *Nat. Prod. Radiance*, 6 (2007) 158-170.
- [4] I.E. Orhan, Centellaasiatica (L.) Urban: From Traditional Medicine to ModernMedicine with Neuroprotective Potential, *eCAM*, 2012 (2012) 1-8.
- [5] F. Pittella, R.C. Dutra, D.D. Junior, M.T.P. Lopes, and N.R. Barbosa, Antioxidant and cytotoxic activities of Centella asiatica (L) Urb, *Int. J. Mol. Sci.*, 10 (2009) 3713-3721.
- [6] M.K. Zainol, A. Abd-Hamid, S. Yusof, and R. Muse, Antioxidative activity and total phenolic compounds of leaf, root and petiole of four accessions of Centella asiatica (L.) Urban, *Food Chemistry*, 81 (2003) 575-581.
- [7] M.R.S. Zaidan, A., N. Rain, A.R. Badrul, A. Adlin, A. Norazah, and I. Zakiah, In vitro screening of five local medicinal plants for antibacterial activity using disc diffusion method, *Trop. Biomed.*, 22 (2005) 165-170.
- [8] C.H. Jo, S.Y. Kim, and I.S. An, The improving effect of Centella

- asiatica extracts on erythema on scalp of aged 20-50's women, *Kor. J. Aesthet. Cosmetol.*, 12 (2014) 921-927.
- [9] W. Bylka, P. Znajdek-Awizen, E. Studzinska-Sroka, and M. Brzezinska, Centella asiatica in cosmetology, *Postepy. Dermatol. Alergol.*, 30 (2013) 46-49.
- [10] J. Lee, C.H. Myung, J.E. Lee, M.R. Jo, H.S. Kim, N.Y. Lee, H. Woo, J. You, H. Jo, and J.S. Hwang, Anti-inflammatory and moisturizing effect of Centella extracts fermented in Jeju lava water, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, 45 (2019) 363-372.
- [11] J.H. Ha, M.C. Kwon, Y. Kim, S.S. Jeong, M.H. Jeong, B. Hwang, and H.Y. Lee, Enhancement of immuno-modulatory of Centella asiatica L. Urban with edible polymer through nano-encapsulation process, *KJMCS*, 17 (2009) 257-265.
- [12] K.J. Kwon, S.J. Choi, and Y. Yoon, Improving Effects of the Cleanser Containing Centella asiatica Extracts and Charcoal and Pearl Powder on the Facial Skin, *Kor. J. Aesthet Cosmetol.*, 10 (2012) 581-586.
- [13] O.T. kim, M.Y. Kim. S.J. kim, Y.J. kim, K.S. kim, J.C. Ahn, S.W. kim, and B. Hwang, Seasonal variations of triterpene glycosides contents in the leaf of Centella asiatica (L.) Urban, *KJMCS.*, 10 (2002) 375-378.
- [14] M. Boer, E. Duchnik, R. Maleszka, and M. Marchlewicz, Structural and biophysical characteristics of human skin in maintaining proper epidermal barrier function, *Postepy Dermatol Alergol.*, 33 (2016) 1-5.
- [15] B.D. Wilson, S. Moon, and F. Armstrong, Comprehensive review of ultraviolet radiation and the current status on sunscreens, *J. Clin. Aesthet Dermatol.*, 5 (2012) 18-23.
- [16] A.A. Romanovsky, Skin temperature: its role in thermoregulation, *Acta Physiol. (Oxf)*, 210 (2014) 498-507.

- [17] L. Eckhart, S. Lippens, E. Tschachler, W. Declercq, Cell death by cornification, *Biochim Biophys Acta*, 1833 (2013) 3471-3480.
- [18] R.R. Wickett, and M.O. Visscher, Structure and function of the epidermal barrier, *AJIC.*, 34 (2006) 98-110.
- [19] S. Jaitley, and TR Saraswathi, Pathophysiology of Langerhans cells, *J. Oral Maxillofac Pathol.*, 16 (2012) 239-244.
- [20] T. Matsui, and M. Amagai, Dissecting the formation, structure and barrier function of the stratum corneum, *Int. Immunol.*, 27 (2015) 269-280.
- [21] M. Cichorek, M. Wachulska, A. Stasiewicz, and A. Tyminska, Skin melanocytes: biology and development, *Postepy Dermatol Alergol.*, 30 (2013) 30-41.
- [22] J.M. Sorrell, and A.I. Caplan, Fibroblast heterogeneity: more than skin deep, *J. Cell Sci.*, 117 (2004) 667-675.
- [23] M. Lovaszi, A. Szegedi, C.C. Zouboulis, and D. Torocsik, Sebaceous-immunobiology is orchestrated by sebum lipids, *Derm.-Endocrinol.*, 9 (2017) e1375636.
- [24] R. Wong, S. Geyer, W. Weninger, J.C. Guimberteau, and J.K. Wong, The dynamic anatomy and patterning of skin, *Exp. Dermatol.*, 25 (2016) 92-98.
- [25] A.L.M. Ruela, A.G. Perissinato, M.E.d.S. Lino, P.S. Mudrik, and G.R. Pereira, Evaluation of skin absorption of drugs from topical and transdermal formulations, *BJPS.*, 52 (2016) 527-544.
- [26] I. Singh, and A.P. Morris, Performance of transdermal therapeutic systems: Effects of biological factors, *Int. J. Pharm Investig.*, 1 (2011) 4-9.
- [27] Z. Nemes, and P. M. Steinert, Bricks and mortar of the epidermal

- barrier, *Exp. Mol. Med.*, 31 (1999) 5-19.
- [28] A.S. Michaels, S.K. Chandrasekaran, and J.E. Shaw, Drug permeation through human skin: Theory and invitro experimental measurement, *AIChE J.*, 21 (1975) 985-996.
- [29] A. Zhang, E.C. Jung, H. Zhu, Y. Zou, X. Hui, and H. Maibach, Vehicle effects on human stratum corneum absorption and skin penetration, *Toxicol Ind. Health*, 33 (2017) 416-425.
- [30] B.W. Barry, Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery, *Eur. J. Pharm. Sci.* 14 (2001) 101-114.
- [31] D. Ramadan, M.T.C. McCrudden, A.J. Courtenay, and R.F. Donnelly, Enhancement strategies for transdermal drug delivery systems: current trends and applications, *Drug Deliv Transl Res.*, 12 (2022) 758-791.
- [32] A. D. Bangham, and R. W. Horne, Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope, *J. Mol. Biol.*, 8 (1964) 660-668.
- [33] T.I. Hyeon, and K.S. Yoon, Skin absorption and physical property of ceramide-added ethosome, *KOCS.*, 38 (2021) 801-812.
- [34] C. Spuch, and C. Navarro, Liposomes for Targeted Delivery of Active Agents against Neurodegenerative Diseases (Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease), *J. Drug Deliv.*, 2011 (2011) 1-12.
- [35] A.R. Patel, and K.P. Velikov, Colloidal delivery systems in foods: A general comparison with oral drug delivery, *LWT-Food Sci. Technol.*, 44 (2011) 1958-1964.
- [36] P. Coutteau, I. Geurden, M.R. Camara, P. Bergot, and P. Sorgeloos, Review on the dietary effects of phospholipids in fish and crustacean larviculture, *Aquac.*, 155 (1997) 149-164.

- [37] A.D. Bangham, M.M. Standish and J.C. Watkins, Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids, *J. Mol. Biol.*, 13 (1965) 238-252.
- [38] R. Fraley, and D. Papahadjopoulos, New generation liposomes: the engineering of an efficient vehicle for intracellular delivery of nucleic acids, *TIBS.*, 6 (1981) 77-80.
- [39] G. Blume and G. Cevc, Liposomes for the sustained drug release in vivo, *BBA.*, 1029 (1990) 91-97.
- [40] A. Sharma, and U. S. Sharma, Liposomes in drug delivery: progress and limitations, *Int. J. Pharm.*, 154 (1997) 123-140.
- [41] G. Zhang, and J. Sun, Lipid in Chips: A Brief Review of Liposomes Formation by Microfluidics, *Int. J Nanomedicine*, 16 (2021) 7391-7416.
- [42] S. Perrett, M. Golding, and W.P. Williams, A simple method for the preparation of liposomes for pharmaceutical applications: characterization of the liposomes, *J. Pharm. Pharmacol.*, 43 (1991) 154-161.
- [43] S. Li, J. Nickels, and A.F. Palmer, Liposome-encapsulated actin-hemoglobin (LEAChb) artificial blood substitutes, *Biomater.*, 26 (2005) 3759-3769.
- [44] M.M. Elsayed, O.Y. Abdallah, V.F. Naggar, and N.M. Khalafallah, Deformable liposomes and ethosomes: mechanism of enhanced skin delivery of ketotifen, *Int. J. Pharm.*, 322 (2006) 60-66.
- [45] E. Touitou, N. Dayan, L. Bergelson, B. Godin, and M. Eliaz, Ethosomes-novel vesicular carriers for enhanced delivery: characterization and skin penetration properties, *JCR*, 65 (2000) 403-418.
- [46] Y.L. Lo, J.C. Tsai, and J.H. Kuo, Liposomes and disaccharides as

- carriers in spray-dried powder formulations of superoxide dismutase, *J. Control Release*, 94 (2004) 259-272.
- [47] U.S. Kadimi, D.R. Balasubramanian, U.R. Ganni, M. Balaraman, and V. Govindarajulu, In vitro studies on liposomal amphotericin B obtained by supercritical carbon dioxide-mediated process, *NBM.*, 3 (2007) 273-280.
- [48] K. Mishima, Biodegradable particle formation for drug and gene delivery using supercritical fluid and dense gas, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 60 (2008) 411-432.
- [49] M.J. Choi, and H.I. Maibach, Elastic vesicles as topical/transdermal drug delivery systems, *Int. J. Cosmet Sci.*, 27 (2005) 211-221.
- [50] G. Cevc, Transfersomes, liposomes and other lipid suspensions on the skin: permeation enhancement, vesicle penetration, and transdermal drug delivery, *Crit Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 13 (1996) 257-388.
- [51] G. Cevc, and G. Blume, Lipid vesicles penetrate into intact skin owing to the transdermal osmotic gradients and hydration force, *BBA.*, 1104 (1992) 226-232.
- [52] G. Cevc, D. Gebauer, J. Stieber, A. Schätzlein, and G. Blume, Ultraflexible vesicles, Transfersomes, have an extremely low pore penetration resistance and transport therapeutic amounts of insulin across the intact mammalian skin, *BBA.*, 1368 (1998) 201-215.
- [53] M.M.A. Elsayed, O.Y. Abdallah, V.F. Naggar, and N.M. Khalafallah, Lipid vesicles for skin delivery of drugs: reviewing three decades of research, *Int. J. Pharm.*, 332 (2007) 1-16.
- [54] M. Trotta, E. Peira, F. Debernardi, and M. Gallarate, Elastic liposomes for skin delivery of dipotassium glycyrrhizinate, *Int. J.*

- Pharm.*, 241 (2002) 319-327.
- [55] M. Trotta, E. Peira, M.E. Carlotti, and M. Gallarate, Deformable liposomes for dermal administration of methotrexate, *Int. J. Pharm.*, 270 (2004) 119-125.
- [56] E. Touitou, B. Codin, and C. Weiss, Enhanced delivery of drugs into and across the skin by ethosomal carriers, *Drug Dev. Res.*, 20 (2000) 406-415.
- [57] E. Touitou, V.M. Meidan, and E. Horwitz, Methods for quantitative determination of drug localized in the skin, *JCR.*, 56 (1998) 7-21.
- [58] C.K. Song, P. Balakrishnan, C.K. Shim, S.J. Chung, S. Chong, and D.D. Kim, A novel vesicular carrier, transethosome, for enhanced skin delivery of voriconazole: characterization and in vitro/in vivo evaluation, *Colloids Surf. B.*, 92 (2012) 299-304.
- [59] K. Sudhakar, S. Fuloria, V. Subramaniyan, K.V. Sathasivam, A.K. Azad, S.S. Swain, M. Sekar, S. Karupiah, O. Porwal, A. Sahoo, D.U. Meenakshi, V.K. Sharma, S. Jain, R.N. Charyulu, and N.K. Fuloria, Ultraflexible Liposome Nanocargo as a Dermal and Transdermal Drug Delivery System, *Nanomaterials (Basel)*, 11 (2021).
- [60] D.L. Black, M.Q. McQuay, and M.P. Bonin, Laser-based techniques for particle-size measurement: A review of sizing methods and their industrial applications, *Prog. Energy Combust. Sci.* 22 (1996) 267-306.
- [61] G. Kroner, H. Fuchs, R. Tatschl, and O. Glatter, Determination of Soot Particle Size in a Premixed Flame: a Static and Dynamic Light Scattering Study, *Part. Part. Syst. Charact.*, 20 (2003) 111-123.
- [62] B.J. Berne, R. Pecora, and J. Wiley, Dynamic Light Scattering, *Br. Polym. J.*, 9 (1976).
- [63] S. Bayryamov, and M. Nikolova, A review of methods and techniques

- for characterization of structure, morphology and dispersion stability of microcapsules, *proceedings of university of ruse*, 58 (2019) 57-63.
- [64] Y. Yuan, Y. Gao, L. Mao, and J. Zhao, Optimisation of conditions for the preparation of β -carotene nanoemulsions using response surface methodology, *Food Chemistry* 107 (2008) 1300-1306.
- [65] 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 (2005) 91-98.
- [66] D.Y. Wang, H.C. van der Mei, Y. Ren, H.J. Busscher, and L. Shi, Lipid-Based Antimicrobial Delivery-Systems for the Treatment of Bacterial Infections, *Front Chem*, 7 (2019) 872.
- [67] C. Monton, C. Luprasong, J. Suksaeree, and T. Songsak, Validated high performance liquid chromatography for simultaneous determination of stability of madecassoside and asiaticoside in film forming polymeric dispersions, *Rev. Bras.*, 28 (2018) 289-293.
- [68] F.N. Marzulli, W. Daniel, C. Brown, and H.I. Maibach, Techniques for Studying Skin Penetration, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 3 (1969) 76-83.
- [69] M. Lin, and X.R. Qi, Purification Method of Drug-Loaded Liposome, *VDI-Wärmeatlas2019*, (20019) 1-11.
- [70] E. Casals, A.M. Galan, G. Escolar, M. Gallardo, and J. Estelrich, Physical stability of liposomes bearing hemostatic activity, *Chem Phys Lipids.*, 125 (2003) 139-146.
- [71] R. Albash, A.A. Abdelbary, H. Refai, and M.A. El-Nabarawi, Use of transethosomes for enhancing the transdermal delivery of olmesartan medoxomil: in vitro, ex vivo, and in vivo evaluation, *Int. J. Nanomedicine.*, 14 (2019) 1953-1968.

- [72] I.M. Abdulbaqi, Y. Darwis, R.A. Assi, and N.A.K. Khan, Transethosomal gels as carriers for the transdermal delivery of colchicine: statistical optimization, characterization, and ex vivo evaluation, *Drug Des. Devel Ther.*, 12 (2018) 795-813.
- [73] C.D. Kaur, and M. & S. Saraf, Topical vesicular formulations of Curcuma longa extract on recuperating the ultraviolet radiation-damaged skin, *Vesicular herbal formulations improving skin properties*, (2011) 1-6.
- [74] S.N. Park, M.S. Lim, M.A. Park, S.S. Kwon, and S.B. Han, Transdermal delivery of quercetin using elastic liposomes: preparation, characterization and In Vitro skin Permeation study, *Polym.*, 36 (2012) 705-711.
- [75] K. Moulaoui, C. Caddeo, M.L. Manca, I. Castangia, D. Valenti, E. Escribano, D. Atmani, A.M. Fadda, and M. Manconi, Identification and nanoentrapment of polyphenolic phytocomplex from Fraxinus angustifolia: in vitro and in vivo wound healing potential, *Eur. J. Med Chem.*, 89 (2015) 179-188.
- [76] M. Chen, V. Gupta, A.C. Anselmo, J.A. Muraski, and S. Mitragotri, Topical delivery of hyaluronic acid into skin using SPACE-peptide carriers, *J. Control Release*, 173 (2014) 67-74.
- [77] M. Qushawy, A. Nasr, M. Abd-Alhaseeb, and S. Swidan, Design, Optimization and Characterization of a Transfersomal Gel Using Miconazole Nitrate for the Treatment of Candida Skin Infections, *Pharmaceutics* 10 (2018) 1-22.
- [78] Y. Wang, R. Wang, X. Qi, W. Li, Q. Guan, R. Wang, X. Li, Y. Li, Z. Yang, Y. Feng, Novel transethosomes for the delivery of brucine and strychnine: Formulation optimization, characterization and in vitro

evaluation in hepatoma cells, Journal of Drug Delivery Science and Technology 64 (2021).