

pH 감응성 나노리포솜 제조 및 특성 분석

한미리, 박정환¹, 윤현희*
 경원대학교 화학생명공학과
¹경원대학교 바이오테크놀로지 대학
 (hhyoon@kyungwon.ac.kr*)

Preparation and Characterization of pH Sensitive Nano-Riposome

Mee Ree Han, Jung Hwan Park¹, Hyon Hee Yoon*
 Department of Chemical Engineering, Kyungwon University
¹College of Bio-Nano Technology, Kyungwon University
 (hhyoon@kyungwon.ac.kr*)

서론

리포솜은 약물전달과 화장품의 효과적인 전달을 위해 기능성 성분의 담지체와 전달체로 사용되고 있다.[1] 최근에는 리포솜 제조에 사용되는 지질의 종류와 제조방법에 따라 pH에 대한 안정성이 변하는 리포솜을 지능형 피부전달시스템에 사용하고 있다.[2] 일반적으로 피부표면과 피부 내부의 섬유아세포 및 멜라닌세포 등의 pH는 5.0 정도이다. 따라서 중성에서는 안정한 리포솜을 유지하고, 약산성에서는 리포솜에 담지되어 있는 기능성물질을 방출하는 즉, 사용 전에는 제형내에서 기능성 소재를 안정화시키며 피부적용 시 1차적으로 피부표면에 방출을 유도하고, 일부 리포솜이 피부에 투과시 표적세포에서 2차적으로 기능성성분의 방출을 유도하는 pH 감응성 나노리포솜에 대한 연구결과가 보고되고 있다.[3-5]

리포솜은 지질의 조성에 따라 그 형태가 변화하여 표면특성이 변화하게 되며, 크기 또한 변화하게 된다. 또한 초음파를 공급함으로써 리포솜에 에너지가 가해져 리포솜의 크기에 영향을 끼칠 것이라 여겨진다. Buffer 또한 리포솜 크기와 안전성에 영향을 주게 된다. 따라서 본 연구에서는 지능형 피부전달시스템에 사용될 수 있는 pH 감응성 나노리포솜을 초음파를 이용하여 제조하였으며, 반응시간과 지질 및 buffer의 종류에 따라 제조된 리포솜의 입도와 pH 안정성을 측정하였다.

실험

리포솜 제조에 사용한 지질은 phosphatidylcholine (PC)과 phosphatidylethanolamine (PE)이며 buffer는 phosphate buffer solution(PBS)와 thylene Diamine Tetraacetic Acid (EDTA)를 사용하였다. 리포솜은 원하는 지질의 조성과 농도로 buffer 용액에서 narrow tip을 사용하여 sonication 시켜 제조하였다. 제조된 리포솜 용액은 UV spectrophometer, Electronic light scattering (ELS) 등을 이용하여 입자크기와 입자크기분포를 측정하였다. 리포솜의 pH에 대한 안정성을 측정하기 위하여, pH 4, 5, 6, 그리고 7.4 등 네 가지의 pH 용액속에서 리포솜의 변화를 입도와 투과도로 관찰하였다. 또한 리포솜의 붕괴를 실제로 측정하기 위하여 리포솜에 calcein을 담지시킨 후, 용액의 pH 변화에 따른 calcein의 방출량을 측정하였다.

결과 및 토론

지질조성 및 반응시간의 영향 : 리포솜 제조시 지질의 조성에 영향을 받을 것이라는 추측에 맞게 PC 만으로 만들어진 리포솜과 PE가 첨가된 리포솜의 사이즈는 크게 차이가

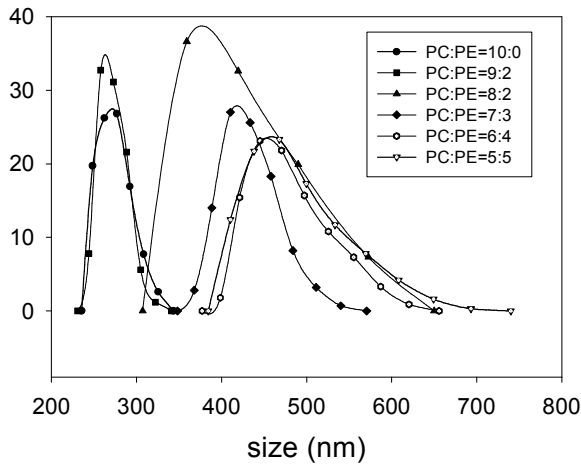


Fig. 1. Particle size distribution of liposomes prepared with different lipid compositions

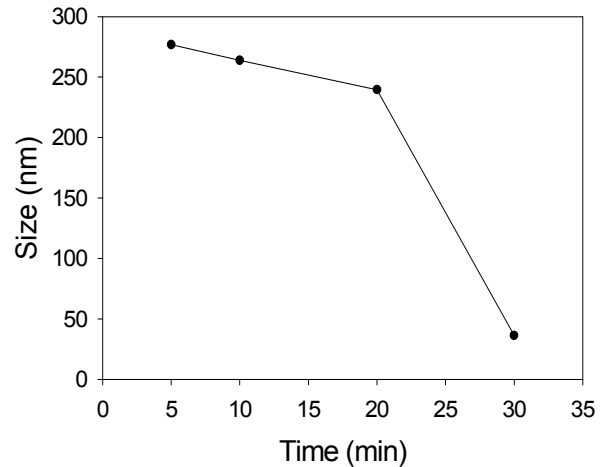


Fig. 2. Liposome size as a function of reaction time.

나타났다. Fig. 1에서 보이듯이 PC 만으로 제조된 리포솜의 입자크기는 평균적으로 274 ± 20 정도의 크기를 나타내고 있다. 반면에, PC와 PE를 5:5로 혼합하여 제조된 리포솜의 입도는 485 ± 57 의 평균값을 나타내고 있다. 약 1.5배 정도의 크기가 커진 것을 알 수 있다. 전체적인 입도분포의 경향성을 살펴보면, PE가 많이 첨가될수록 그 평균 입자크기가 커지고 입도분포도 넓어짐을 알 수 있다. 이러한 현상은 조성이 변화함에 따라서 지질의 구조가 사각형인 PE가 삼각형 모양의 PC에 섞여서 리포솜의 크기가 증가하기 때문이다.

반응시간 역시 리포솜 크기에 영향을 주었다. Fig. 2는 ELS를 통하여 sonication 시간에 따라 리포솜의 평균 입자크기를 관찰 한 것이다. Fig. 2를 살펴보면 20분까지는 미세한 변화가 발생하다 그 이후 급격한 크기변화가 일어나는 것을 알 수 있다. 이러한 현상은 sonication 시간이 증가할수록 리포솜에 가해지는 에너지가 증가하여 리포솜의 크기를 감소시키기 때문으로 여겨진다.

pH에 대한 리포솜의 안정성 : 피부의 pH 조건에서 피부로 전달된 리포솜이 붕괴되어 효과적으로 기능성성분이 피부 속으로 전달되는 리포솜을 제조하기 위하여 pH에 따른 리포솜의 안정성을 조사하였다. 사용한 리포솜은 지질조성을 10:0, 7:3, 5:5, 3:7 (PC : PE)의 비율로 제조하였으며 buffer는 PBS와 EDTA를 사용하여 buffer의 영향을 관찰하였다.

Fig. 3은 리포솜 용액의 pH를 4, 5, 6, 그리고 7.4 등으로 조절하고 5일 동안 시간에 따른 이도분포를 관찰한 결과이다. Fig. 3에 나타난 바와 같이 pH 4에서 입자의 크기 변화가 가장 크게 나타났다. pH 4의 경우 상대적으로 넓은 사이즈 분포를 보이며, 그 크기 또한 커지는 것으로 보여 진다. pH 5, 6의 경우도 pH 4에 비해 변화가 적긴하지만 넓은 분포상태로 변화하여 크기가 커진 리포솜을 발견할 수 있다. 이는 리포솜이 파괴되어 그들끼리 뭉쳐서 나타나는 현상에 의해 전체적인 리포솜 사이즈의 크기가 커진 것이라 여겨진다.

입자의 크기 변화로 나타낸 리포솜의 안정성은 지질의 조성에 따라 다르게 관찰되었다. Fig. 5에 보이듯이, phosphatidyl ethanolamine의 첨가량이 증가할수록 pH에 대한 감응성(불안정성)이 큰 것으로 나타났다.

리포솜의 안정성은 지질의 조성뿐만 아니라 제조시 사용한 buffer의 종류에 따라 변화하였다. Fig.5에서 나타난바와 같이, EDTA의 경우 약 3일 동안 안정한 상태를 유지한 반면, PBS를 사용하여 제조된 리포솜은 1일 경과 후 입자의 크기가 급격히 증가하였다. 이와 같은 실험 결과 리포솜의 제조방법에 따라 pH 감응성을 조절할 수 있는 것을 알 수 있다.

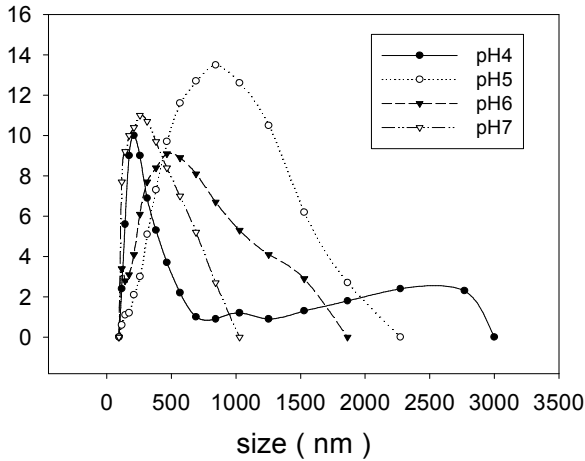


Fig. 3. Particle size distribution of liposomes after 1 day at different pH's.

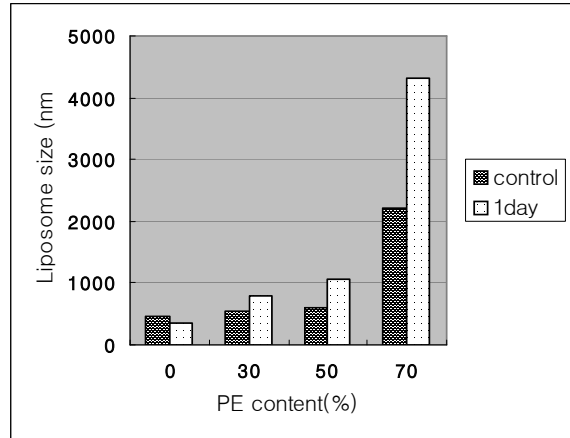


Fig. 4. Particle size changes of liposomes prepared with different lipid content. (after 1 day at pH 4)

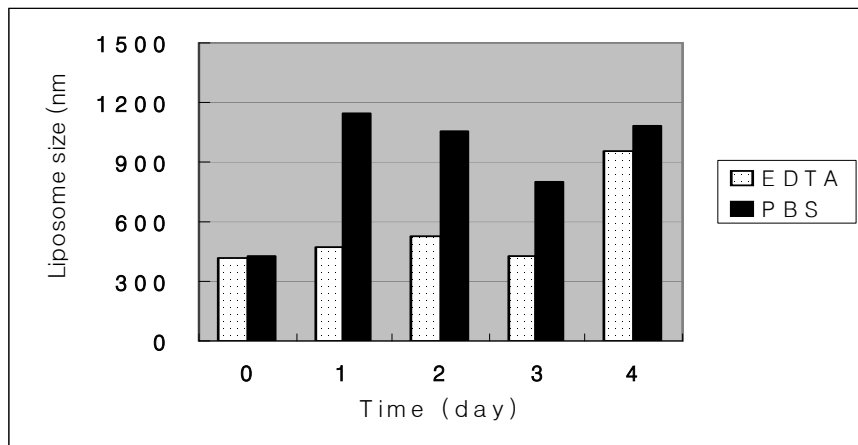


Fig. 5. Particle size changes of liposomes prepared with different buffers. (after 1 day at pH 4)

리포솜의 안정성을 크기로 변화로 나타낸 위의 실험과 더불어, 리포솜에 담지된 용질이 pH에 따라 방출량이 변화하는가를 관찰하였다. Fig. 6은 리포솜에 담지된 calcein의 방출량을 pH 환경에 따라 나타낸 것이다. pH에 따라 리포솜 입자크기 증가율이 변화하는 것과 유사하게, pH가 낮을 수록 리포솜의 membrane의 구조에 변화가 생겨 calcein 방출량이 증가하였다. 입자크기를 측정한 실험결과는 리포솜이 낮은 pH에서 실제로 붕괴가 이루어 졌는지, 혹은 붕괴되지 않고 리포솜이 swelling 되어 입자크기가 더 커진 것인지

판단하기 어렵다. 그러나, 실제 용질의 방출량 측정은 리포솜이 붕괴되지 않더라도 용질이 방출되는 양의 변화를 관찰함으로써 실질적인 리포솜의 pH 변화에 따른 감응성을 알 수 있을 것이다.

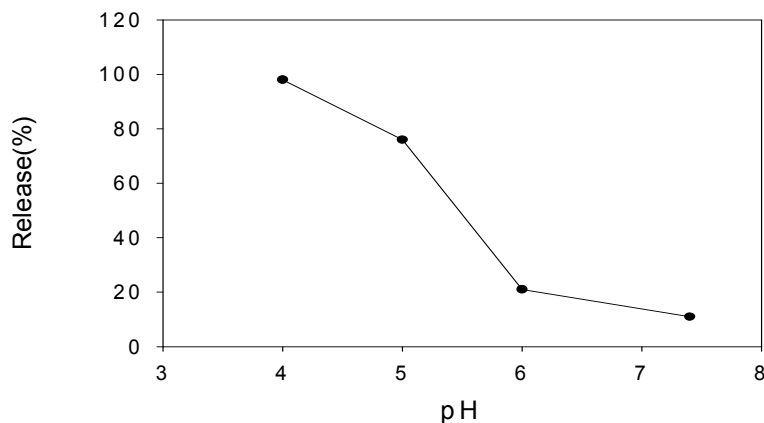


Fig. 6. Release of calcein in liposomes at different pH.

결론

지능형 피부전달시스템에 사용될 수 있는 pH 감응성 나노리포솜을 제조하고 특성을 분석하였다. 초음파를 이용한 제조된 나노리포솜은 본 실험의 범위에서 지질의 함량이 높을수록 제조된 리포솜의 크기가 증가하였으며, 반응시간이 증가할수록 리포솜에 가해지는 에너지가 증가하여 리포솜의 크기를 감소시킬 수 있었다. 반면에, 지질의 함량에 따라 pH 안정성이 변화되었으며, 일반적으로 pH가 낮을수록 pH 안정성이 감소되었다. Calcein을 리포솜안에 담지시킨 후 방출 속도를 pH의 변화에 따라 관찰한 결과, pH가 낮을수록 calcein의 방출 속도가 증가하였다. 본 연구를 통하여, pH 감응성 나노리포솜을 피부상태에 따라 응답하는 지능형 피부전달시스템에 사용될 수 있음을 알 수 있다.

참고문헌

1. Lian, T. and Ho, R. J. Y., "Trends and developments in liposome drug delivery systems", *J. Pharm. Sci.*, 667-680(2001).
2. Ponappa, B. C., Dey, I., Tu, G. C., Zhou, F., Aini, M., Cao, Q. N., and Israel, Y., "In vivo delivery of antisense oligonucleotides in pH-sensitive liposomes inhibits lipopolysaccharide-induced production of tumor necrosis factor- α in rats". *J. Pharmacology and Experimental Therapeutics*. **297**, 1129-1136(2001).
3. Connor, J., Yatvin, M. B., and Huang, L. "pH-sensitive liposomes : Acid-induced liposome fusion", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 1715-1718(1984).
4. Chou, T. H., Chen, S. C., and Chu, I. M., "Effect of composition on the stability of liposomal irinotecan prepared by a pH gradient method", *J. Biosci. Bioeng.*, **95**, 405-408(2003).
5. Sulkowsky, W. W., Pentak, D., Nowak, K., and Sulkowska, A., "The influence of temperature, cholesterol content and pH on liposome stability". *J. Molecular Structure*, **744-747**, 737-747(2005).