

## 초음파와 압력을 이용한 나노 리포솜의 제조

이정민 · 조용진<sup>1</sup> · 박동준<sup>1</sup> · 고성호<sup>1</sup> · 이승철\*

경남대학교 식품생명학과, <sup>1</sup>한국식품연구원

### Preparation of Nano-liposome by Sonication and Pressure

Jung-Min Lee, Yong-Jin Cho<sup>1</sup>, Dong-Joon Park<sup>1</sup>, Sung-Ho Ko<sup>1</sup>, and Seung-Cheol Lee\*

Department of Food Science and Biotechnology, Kyungnam University  
<sup>1</sup>Korea Food Research Institute

**Abstract** Liposomes are artificial membranes prepared by phospholipid. In this study, liposomes were prepared by dehydration-rehydration method, and then nano-sized by sonication and pressure. The sizes of the prepared multilamellar vesicles (MLV) were greater than 10 μm. Sonication with a tip-type sonifier or pressurization with a French press on MLV were carried out to reduce size. Sonication with an output of 112.5 W for 10 min on MLV resulted in sizes less than 450 nm. French press with 6,000 psi of pressure was able to manufacture liposomes of approximately 100 nm uniformly. Also, the sonication or pressure clarified the color of the liposome solutions. The results indicate that sonication and pressure via French press can be applied to obtain nano-sized liposomes.

**Key words:** nanoliposome, sonication, pressure, French press

### 서 론

리포솜은 인지질로 구성된 인위적인 막으로서(1), 지용성 및 수용성 물질을 내부에 함유하는 포집체로 이용될 수 있다. 초기의 리포솜에 대한 연구는 인위적인 세포막의 개념으로 세포의 성질을 규명하는 기초 연구에 한정되었으나, 리포솜을 구성하는 인지질의 조성을 조절하여 리포솜 내부에 함유된 물질을 조절 방출시키는 특성을 발견하고 의약품에 이용하는 연구가 활발히 진행되어 왔다(2). 또한, 화장품 산업에서도 다른 겔보다 액상에서 피부각질층을 더욱 잘 투과시킬 수 있는 장점 때문에 널리 이용되고 있다(3,4).

한편 식품에서는 lysozyme을 리포솜 내에 포집시켜 치즈 숙성 기간을 단축시켰으며(5,6), 리포솜을 이용하여 단백질 가수분해 효소의 방출을 촉진하였고(7), 산화되기 쉬운 불포화 지방산을 인지질과 같이 리포솜을 제조하였으며(8), 리포솜을 이용하여 기능성 식품 소재의 이용성을 향상시킬 수 있다고 보고되어져 있다(9,10). 본 연구진은 그간 레티놀(11-13)과 비타민 C의 안정성 향상(14,15)을 위해 리포솜을 이용하여 보고한 바 있다.

리포솜은 인지질로 이루어져 있어 체내에서 분해가 가능하고 세포독성이 없고, 내부 포집물질의 변화 및 불활성화를 억제하는 효과가 있다. 또한, 포집물질과 리포솜 사이에 화학적 결합이 따로 필요없기 때문에 그 활용이 확대될 것으로 예상된다.

근래 리포솜을 나노화하여 약물 및 식품 소재에 응용하는 연구가 진행되고 있는데(16,17), 본 연구에서는 초음파와 가압 처리를 이용하여 상용화할 수 있는 나노 리포솜의 제조 방법을 조사하였다.

### 재료 및 방법

#### 리포솜 제조

본 연구에 사용한 인지질은 30% soybean phosphatidyl choline (PC)으로서 Sigma사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 탈수화/재수화 방법에 의하여 리포솜을 제조하였다(18,19). 즉, PC 10 mmol(0.18 g)을 20 mL의 chloroform/methanol(2:1, v/v)에 녹인 후, rotary evaporator를 이용하여 30°C에서 20분간 용매를 증발시켰다. 잔류된 유기용매를 완전히 제거하기 위하여 질소 가스로 15분간 치환하였으며, 30 mL의 glycine buffer(10 mM, pH 7.4)를 가하여 rotary evaporator를 이용하여 회전시켜 multilamellar vesicle(MLV)을 조제하였다.

#### 리포솜의 나노화

Multilayer 형태의 리포솜을 나노화하기 위하여 초음파와 압력을 가하였다. 사용한 초음파 처리기는 Sonics & Materials Inc. (Danbury, CT, USA)의 Model VC 375(Power 375W, Frequency 20 kHz)의 것으로서, duty cycle 50%, output control로 출력을 조절하며 mini-probe로 초음파를 처리하였다. 리포솜의 나노화를 위한 가압 처리는 French press(SLM-AMINCO, Spectronic Instruments, Inc., New York, NY, USA)의 20,000 psi용 cell을 이용하였다. 제조한 리포솜의 크기를 측정하기 위하여 입도분석기(Model LS230, Beckman-Coulter, Inc., Fullerton, CA, USA)를 이용하여 측정하였다.

\*Corresponding author: Seung-Cheol Lee, Department of Food Science and Biotechnology, Kyungnam University, 449 Wolyong-dong, Masan 631-701, Korea  
Tel: 82-55-249-2684  
Fax: 82-55-249-2995  
E-mail: sclee@kyungnam.ac.kr  
Received October 25, 2007; accepted December 10, 2007

### 색도측정

리포솜의 나노 입자화가 색도에 어떤 영향을 미치는지 분석하기 위해서 색차계(Spectrometer CM-3500d, Minolta Co., Ltd., Osaka, Japan)를 이용하여 측정하였다.

### 통계처리

데이터의 통계처리는 각 시료를 3회 반복으로 행해졌으며, SAS(statistical analysis system)를 이용하여 평균과 표준오차, Newman-Keul's multiple range tests로 평균값들에 대해 유의성을 검증하였다(20).

## 결과 및 고찰

### 리포솜의 나노화에 대한 초음파와 가압 처리의 영향

대부분의 리포솜 제조법에서 초기에는 균일하지 않은 MLV 형태의 리포솜이 제조된다. 나노 리포솜의 제조에는 주로 초고압 균질기(high-pressure homogenizer)가 이용되고 있으나(21,22), 이 기구는 고비용으로 일반화되어 있지는 않다. 본 연구에서는 실험실 규모에서 나노 리포솜을 효율적으로 제조할 목적으로 초음파 처리 또는 프렌치 프레스를 이용하여 나노 리포솜을 제조해 보았다.

초음파 처리 정도가 리포솜의 크기에 미치는 영향을 Table 1에 나타내었다. 초음파를 처리하지 않은 대조구의 경우 대부분(95.74%) 이 1,261-30,079 nm의 크기에 분포하였으며 median값의 평균 크기는 10,133 nm로써 10 μm를 상회하였다. 이는 수화-재수화법으로 제조된 MLV의 일반적인 크기와 비슷하며, 본 연구에서 제조한 방법이 다른 연구들과 차이가 없음을 의미한다. 초음파 처리기의 세기와 시간을 조절하며 리포솜의 크기를 분석한 결과 세기와 시간에 따라 크기가 감소함을 확인할 수 있었다. 예를 들어 112.5 W의 출력으로 30 mL의 리포솜 용액에 1, 5, 10분간 처리하였을 때 median값의 평균 크기가 각각 4,586, 804, 449 nm로 줄어드는 것을 확인할 수 있었다. 112.5 W, 10분간 초음파 처리의 경우 40-240 nm의 크기에서 38.52%가, 241-1,260 nm에서 49.75%가, 1,261-30,079 nm에서 11.73%가 분포하여 μm 수준의 리포솜이 상당히 잔존함을 알 수 있었다. 한편, 리포솜 용액을 15 mL로 하여 112.5 W

**Table 1. Particle size of liposomes depending on sonication treatment**

Power (W)	Time (min)	Size Distribution (nm)				Median (nm)
		40-240	241-1,260	1,261-30,079	30,080-63,410	
0.0	0	0.00 <sup>ex1)</sup>	1.44 <sup>ey</sup>	95.74 <sup>az</sup>	2.82 <sup>ay</sup>	10,133
	1	1.02 <sup>ey</sup>	2.53 <sup>ey</sup>	93.92 <sup>az</sup>	2.53 <sup>ay</sup>	6,390
37.5	5	4.65 <sup>dex</sup>	18.51 <sup>dy</sup>	77.00 <sup>bz</sup>	0.00 <sup>bw</sup>	3,390
	10	6.73 <sup>dex</sup>	21.88 <sup>cdy</sup>	71.38 <sup>bz</sup>	0.00 <sup>bw</sup>	2,720
70.0	1	2.79 <sup>ex</sup>	10.95 <sup>dey</sup>	86.2 <sup>abz</sup>	0.00 <sup>bw</sup>	5,820
	5	12.42 <sup>dx</sup>	32.31 <sup>bcy</sup>	55.28 <sup>cz</sup>	0.00 <sup>bw</sup>	2,137
	10	28.12 <sup>by</sup>	40.86 <sup>abz</sup>	23.69 <sup>dex</sup>	0.00 <sup>bw</sup>	562
112.5	1	4.63 <sup>dey</sup>	8.95 <sup>dey</sup>	86.41 <sup>abz</sup>	0.00 <sup>bx</sup>	4,586
	5	19.37 <sup>ex</sup>	48.64 <sup>az</sup>	31.99 <sup>dy</sup>	0.00 <sup>bw</sup>	804
	10	38.52 <sup>ay</sup>	49.75 <sup>az</sup>	11.73 <sup>ex</sup>	0.00 <sup>bw</sup>	449

<sup>1)a-e</sup>Different letters within a row indicate significant difference ( $p < 0.05$ ),  $n = 3$ .

<sup>x-z</sup>Different letters within each size are significantly different ( $p < 0.05$ ),  $n = 3$ .

**Table 2. Particle size of liposomes depending on pressure treatment**

Pressure (psi)	Size Distribution (nm)				Median (nm)
	40-240	241-1,149	1,150-2,920	2,921-57,770	
0	0.00 <sup>dx1)</sup>	0.00 <sup>bx</sup>	3.72 <sup>cy</sup>	96.17 <sup>az</sup>	10,508
1,000	13.03 <sup>cy</sup>	26.07 <sup>ay</sup>	26.10 <sup>ay</sup>	34.78 <sup>bz</sup>	2,359
3,000	51.58 <sup>bz</sup>	31.89 <sup>ay</sup>	16.53 <sup>bx</sup>	0.00 <sup>cw</sup>	257
6,000	100.00 <sup>az</sup>	0.00 <sup>bx</sup>	0.00 <sup>dx</sup>	0.00 <sup>cx</sup>	100
14,000	100.00 <sup>az</sup>	0.00 <sup>bx</sup>	0.00 <sup>dx</sup>	0.00 <sup>cx</sup>	111
20,000	100.00 <sup>az</sup>	0.00 <sup>bx</sup>	0.00 <sup>dx</sup>	0.00 <sup>cx</sup>	117

<sup>1)a-d</sup>Different letters within a row indicate significant difference ( $p < 0.05$ ),  $n = 3$ .

<sup>x-z</sup>Different letters within each size are significantly different ( $p < 0.05$ ),  $n = 3$ .

의 출력으로 10분간 초음파 처리했을 때에는 평균 크기가 71 nm 였고, 40-258 nm의 크기에서 92.45%, 1,150-2,660 nm에서 7.55%가 분포하였다(data not shown). 이는 리포솜을 함유 용액의 양에 따라 초음파 처리 정도가 달라져야 함을 의미한다.

리포솜에 대하여 French press를 이용한 가압 처리의 결과를 Table 2에 나타내었다. 압력을 가하지 않은 MLV 형태의 리포솜은 평균 10,508 nm로서 Table 1에서와 유사한 결과를 얻었다. 가해진 압력과 시간이 증가할수록 리포솜의 크기는 급격히 줄어들었다. 3,000 psi의 압력으로 리포솜을 처리하였을 때, 리포솜의 median값의 평균 크기는 257 nm이었으며, 6,000 psi 이상의 압력을 가하였을 때에는 모두 240 nm 이하의 크기이었고 100-117 nm 사이의 범위에 분포하였다. Table 1의 결과와 비교하였을 때, French press를 이용한 방법에서 훨씬 균일한 나노 리포솜을 얻을 수 있었고, 리포솜 용액의 양과 관계없이 제조할 수 있어 효율적인 방법으로 판단되었다.

### 색도측정

리포솜의 나노화가 리포솜 용액의 색도에 미치는 영향을 알기 위하여 본 연구에서 제조된 각 리포솜 용액의 Hunter 색도 변화를 Table 3과 Table 4에 나타내었다. 초음파를 처리한 경우, 대부

**Table 3. Hunter color L, a and b values of liposomes depending on sonication treatment**

Power (W)	Time (min)	Color			
		L	a	b	E
0.0	0	62.35 <sup>g1)</sup>	1.18 <sup>f</sup>	5.08 <sup>c</sup>	0.00
	1	63.24 <sup>f</sup>	1.53 <sup>e</sup>	3.95 <sup>f</sup>	1.48
	37.5	5	66.64 <sup>e</sup>	2.41 <sup>c</sup>	6.64 <sup>d</sup>
70.0	10	69.34 <sup>c</sup>	2.38 <sup>c</sup>	8.23 <sup>b</sup>	7.76
	1	63.26 <sup>f</sup>	0.67 <sup>g</sup>	5.29 <sup>e</sup>	1.06
	5	67.36 <sup>d</sup>	1.63 <sup>c</sup>	7.37 <sup>c</sup>	5.53
112.5	10	69.13 <sup>c</sup>	1.97 <sup>d</sup>	8.44 <sup>b</sup>	7.61
	1	66.40 <sup>e</sup>	2.03 <sup>d</sup>	6.89 <sup>d</sup>	4.52
	5	70.17 <sup>b</sup>	2.68 <sup>b</sup>	9.09 <sup>a</sup>	8.92
10	71.08 <sup>a</sup>	2.92 <sup>a</sup>	9.46 <sup>a</sup>	9.92	

<sup>1)a-g</sup>Different letters within a row indicate significant difference ( $p < 0.05$ ),  $n = 3$ . L, degree of lightness; a, degree of redness; b, degree of yellowness; and  $\Delta E$ , overall color difference.  $\Delta E = [(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2]^{1/2}$

**Table 4. Hunter color L, a and b values of liposomes depending on pressure treatment**

Pressure (psi)	Color			
	L	a	b	E
0	62.33 <sup>fl)</sup>	1.15 <sup>d</sup>	5.78 <sup>f</sup>	0.00
1,000	67.67 <sup>e</sup>	2.45 <sup>b</sup>	6.53 <sup>e</sup>	5.55
3,000	76.04 <sup>d</sup>	2.50 <sup>ab</sup>	12.31 <sup>d</sup>	15.25
6,000	83.76 <sup>c</sup>	2.56 <sup>a</sup>	13.13 <sup>b</sup>	22.70
14,000	85.83 <sup>b</sup>	1.43 <sup>c</sup>	14.61 <sup>a</sup>	25.10
20,000	87.42 <sup>a</sup>	0.86 <sup>e</sup>	12.86 <sup>c</sup>	26.07

1)<sup>a-f</sup>Different letters within a row indicate significant difference ( $p < 0.05$ ),  $n = 3$ . L, degree of lightness; a, degree of redness; b, degree of yellowness; and  $\Delta E$ , overall color difference.  $\Delta E = [(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2]^{1/2}$

본의 경우에서 초음파 처리 세기와 시간이 증가할수록 L값, a값, b값이 증가하였다. 한편 초음파 처리에 따른 리포솜 용액의 색 변화 정도를 구별하기 위해 National Bureau of Standards(NBS)의 정의에 따라 색차(total color difference,  $\Delta E$ )를 이용하였다(23).  $\Delta E$ 도 초음파 처리 세기와 시간에 따라 증가하였고, 본 연구에서 조사한 범위에서는 NBS의 기준에서 검토해 볼 때 현저한 차이(3.0-6.0)와 극히 현저한 차이(6.0-12.0)를 나타내었다. 압력을 처리하여 나노 리포솜을 제조한 경우에도(Table 4) 가해진 압력의 세기가 증가할수록 대부분의 경우에서 L값, a값, b값이 증가하였으나, 14,000 psi 이상의 압력에서는 a값, b값이 감소하였다. 전체적인 색도의 변화( $\Delta E$ )도 압력의 세기가 증가할수록 증가하여 6,000 psi 이상의 압력에서는 20 이상의 값을 나타내어 다른 색으로 분류되었다(21). 육안으로 볼 때는 MLV 상태의 리포솜 용액이 혼탁하였으나, 나노 리포솜으로 될수록 투명하였다. 이는 나노 리포솜의 이용시에 첨가될 식품 또는 상품의 색도에 대한 영향을 줄일 수 있을 것으로 판단된다.

**요 약**

리포솜은 인지질로 구성된 인위적 세포막으로서, 본 연구에서는 초음파와 압력을 이용하여 나노 리포솜을 제조하였다. 먼저 리포솜을 탈수/재수화법으로 제조하였다. 형성된 multilayer vesicles(MLV)의 크기는 10  $\mu m$  이상이였다. Tip-type의 초음파 처리기와 French press를 이용하여 리포솜의 크기를 감소시켰다. MLV에 대한 출력 112.5 W, 10분간의 초음파 처리로 리포솜의 크기가 450 nm 이하로 감소되었다. 또한, 6,000 psi 이상의 압력에서는 100 nm 내외의 균일한 리포솜이 생성되었다. 초음파와 가압에 의한 리포솜 용액의 색도는 대체로 명도, 적색도, 황색도가 증가하였으며, 육안으로는 점점 더 투명하게 되었다. 이러한 결과는 초음파와 French press를 이용한 가압 처리로 나노 크기의 리포솜을 얻을 수 있음을 의미한다.

**감사의 글**

본 논문은 한국식품연구원 식품나노기술개발사업 지원으로 이루어졌습니다.

**문 헌**

1. New RRC. Preparation of liposomes. pp. 33-104. In: Liposomes, a Practical Approach. New RRC (ed). IRL Press, Oxford, England (1994)
2. Lasic DD. Novel applications of liposomes. Trends Biotechnol. 16: 307-321 (1998)
3. Knepp VM, Szoka FC, Guy RH. Controlled drug release from a novel liposomal delivery system. II. Transdermal delivery characteristics. J. Control. Release 12: 25-30 (1990)
4. Kirjavainen M, Urtti A, Koskela RV, Kiesvaara J, Monkkonen J. Liposome skin interactions and their effects on the skin permeation of drugs. Eur. J. Pharm. Sci. 7: 279-286 (1999)
5. Kirby CJ, Brooker BE, LawBA. Accelerated ripening of cheese using liposome-encapsulated enzyme. Int. J. Food Sci. Tech. 22: 355-375 (1987)
6. Kim TJ, Kim YS, Pyun YR. Liposome-microencapsulation of lysozyme and its stimulated release. Korean J. Food Sci. Technol. 28: 399-404 (1996)
7. Koide J, Karel M. Encapsulation and stimulated release of enzymes using lecithin vesicles. Int. J. Food Sci. Tech. 22: 707-723 (1987)
8. Haynes LC, Levin H. Method and liposome composition for the stabilization of oxidizable substances. US patent 5,139,803 (1991)
9. Kirby CJ. Controlled delivery of functional food ingredients: Opportunities for liposomes in the food industry. Vol. 2, pp. 215-232. In: Liposome Technology. Gregoriadis G (ed). CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, USA (1984)
10. Kim HY, Baianu IC. Novel liposome microencapsulation technique for food applications. Trends Food Sci. Technol. 2: 55-61 (1991)
11. Lee SC, Lee KE, Hwang YI, Ludescher RD. Stabilization of retinol by incorporation into liposomes. J. Biochem. Mol. Biol. 35: 358-363 (2002)
12. Lee SC, Kim JJ, Lee KE. Effect of  $\beta$ -sitosterol in liposome bilayer on the stabilization of incorporated retinol. Food Sci. Biotechnol. 14: 604-607 (2005)
13. Lee SC, Lee KE, Kim JJ, Rhim SH. The effect of cholesterol in the liposome bilayer on the stabilization of incorporated retinol. J. Liposome Res. 15: 157-166 (2005)
14. Lee YW, Hwang YI, Lee SC. Effect of liposome on the stabilization of ascorbic acid. Korean J. Food Sci. Technol. 31: 280-284 (1999)
15. Rhim CH, Lee YW, Lee SC, Lee SC. Effect of cholesterol in liposome on the stabilization of encapsulate ascorbic acid. J. Korean Soc. Agr. Chem. Biotechnol. 42: 205-209 (1999)
16. Zhang XY, Ni JM, Qiao H. Studies on antitumor effects of podophyllotoxin nanoliposome. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi (Journals of Chinese Medicine) 31: 148-150 (2006)
17. Colas JC, Shi W, Rao VSNM, Omri A, Mozafari MR, Singh H. Microscopical investigations of nisin-loaded nanoliposomes prepared by Mozafari method and their bacterial targeting. Micron 38: 841-847 (2007)
18. Kirby CJ, Gregoriadis G. Dehydration-rehydration vesicles, a simple method for high yield drug entrapment in liposomes. Biotechnol. 2: 979-984 (1984)
19. Kirby CJ, Gregoriadis G. A simple procedure for preparing liposomes capable of high encapsulation efficiency under mild conditions. Vol. 1, pp. 18-27. In: Liposome Technology. Gregoriadis G (ed). CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, USA (1984)
20. SAS Institute, Inc. SAS User's Guide. Statistical Analysis Systems Institute, Cary, NC, USA (1995)
21. Kang KC, Lee CI, Pyo HB, Jeong NH. Preparation and characterization of nano-liposome using phosphatidylcholine. J. Ind. Eng. Chem. 11: 847-851 (2005)
22. Rodriguez RB, Xamani MS. Liposomes prepared by high-pressure homogenizers. Method Enzymol. 367: 28-45 (2003)
23. Judd DG, Wyszecki G. Applied Colorific Science for Industry and Business. Diamond Co., Tokyo, Japan. p. 333 (1964)