



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](#)

碩士學位論文

Ceramide NP 를 함유한 PLO gel 에서
형성되는 액정에 관한 연구

濟州大學校 大學院

化 學 科

허 민 근

2021年 2月

Ceramide NP를 함유한 PLO gel에서 형성되는 액정에 관한 연구

指導教授 尹 景 燮

許 玟 勤

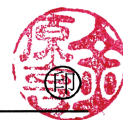
이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2020年 12月

許玟勤의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長

金 原 亨



委 員

任 璽 貞



委 員

尹 景 燮



濟州大學校 大學院

2020年 12月

Study on the Liquid Crystal formed from PLO gel containing Ceramide NP

Min Geun Heo
(Supervised by Professor Kyung-Sup Yoon)

A thesis submitted in partial fulfillment of the
requirement for the degree of Master of Science

2020. 12.

This thesis has been examined and approved.

Won Hyung Kim
.....
Hee-Jung Im
.....
Kyung-Sup Yoon
.....

.....
Date

Department of Chemistry
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

목 차

List of Tables	i
List of Figures	ii
Abstract	iii
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	8
1. 원료 및 기기	8
2. 제조 방법	9
3. PLO gel 제조	10
3-1. 세라마이드의 오일 용해도	10
3-2. 세라마이드를 함유한 PLO gel 제조	10
3-3. 액정 형성 PLO gel 제조	11
3-4. PLO gel의 냉온 안정성 관찰	12
4. PLO gel 평가 및 분석	14
4-1. 경시변화 관찰	14
4-2. 입자크기 및 제타전위 측정	14
4-3. 편광현미경 관찰	15
4-4. SAXS / WAXS 분석	15
4-5. DSC 측정	16
4-6. 점탄성 측정	17
III. 결과 및 고찰	18
1. 세라마이드의 오일 용해도 결과	18
1-1. 경시변화 관찰	18
2. 세라마이드를 함유한 PLO gel 제조 결과	20
2-1. 경시변화 관찰	20

2-2. 편광현미경 관찰	22
3. 액정 형성 PLO gel 제조 결과	24
3-1. 경시변화 관찰	24
3-2. 편광현미경 관찰	26
4. PLO gel의 냉온 안정성 관찰 결과	27
4-1. 경시변화 관찰	27
4-2. 나노제타사이저 측정	29
4-3. 편광현미경 관찰	32
5. SAXS / WAXS 분석	36
6. DSC 측정	40
7. 점탄성 측정	44
IV. 요약 및 결론	48
V. 참고문헌	50

List of Tables

Table 1. Solubility for ceramide with different oil phase composition	10
Table 2. Formulation for PLO gel with different ceramide and lecithin	11
Table 3. Formulation for stability of the liquid crystal formed in the PLO gel	11
Table 4. Formulation for stability in cold temperature of PLO gel	12
Table 5. Particle size and zeta potential analysis of #28 at 25 °C, day 1	30
Table 6. Particle size and zeta potential analysis of #28 at 25 °C, week 1	31
Table 7. Particle size and zeta potential analysis of #28 at 5 °C, week 1	31

List of Figures

Figure 1. Internal structure and arrangement of intercellular lipid	1
Figure 2. Liquid crystal observed by polarized microscope	2
Figure 3. Type of ceramide	3
Figure 4. Structure of Poloxamer 407	6
Figure 5. Structure of Hydrogenated Lecithin	7
Figure 6. Manufacturing method of the PLO gel with ceramide	9
Figure 7. Variation of scatter angle with measurement distance	16
Figure 8. Oil melting stability of ceramide	19
Figure 9. State of the PLO gel containing ceramide according to temperature and time	21
Figure 10. Polarized microscope image of #3	23

Figure 11. State of the PLO gel in which the liquid crystal formed according to temperature and time	25
Figure 12. Polarized microscope image of #11	26
Figure 13. Phase separation of the PLO gel in which the liquid crystal formed at 5 °C	27
Figure 14. State of the PLO gel with different composition according to temperature and time	28
Figure 15. Example of a nano zetasizer measurement graph of #28-1	30
Figure 16. Polarized microscope image of #28 at 25 °C, day 1	33
Figure 17. Polarized microscope image of #28 at 25 °C, week 1	34
Figure 18. Polarized microscope image of #28 at 5 °C, week 1	35
Figure 19. Small-angle X-ray scattering analysis result graph	38
Figure 20. Wide-angle X-ray scattering analysis result graph	39
Figure 21. #28-1 DSC analysis result	41
Figure 22. #28-3 DSC analysis result	42
Figure 23. #28-13 DSC analysis result	43
Figure 24. #28-1 rheology analysis result	45
Figure 25. #28-3 rheology analysis result	46
Figure 26. #28-13 rheology analysis result	47

Abstract

Liquid Crystal formed from PLO gel containing Ceramide NP

Min Geun Heo

Department of Chemistry, Graduate School
Jeju National University, Korea

Supervised by Professor Kyung-Sup Yoon

The stratum corneum is formed as a cytoplasm with keratin cells and lamella structures, and among them, the main ingredient of intercellular lipid is ceramide. Ceramide is a lipid that occurs naturally in the skin, and it can be said that the stratum corneum is the most important ingredient in forming a lamella structure. The stratum corneum has the advantage of preventing foreign matter or irritation from the outside and inhibiting moisture evaporation in the skin, which can be expected to have a positive effect on skin moisturization and elasticity. However, because ceramide is an insoluble substance, it is not suitable for direct application to the skin, so it was intended to apply it to the pluronic lecithin organogel (PLO gel) formulation, which draws constant attention among drug delivery systems used for skin permeation and absorption. A solubility experiment on the oil of the ceramide was conducted to select a suitable oil. Changes in room temperature (25 °C), cold temperature (5 °C) and constant temperature (40 °C) of PLO gel containing selected oil and Ceramide were observed, and formation and stability of the liquid crystal were observed using polarizing microscope and nanozetasizer. In addition, small-angle X-ray

scattering (SAXS) and wide-angle X-ray scattering (WAXS) were conducted to check the structure in the PLO gel, and Differential scanning calorimetry (DSC) and viscosity analysis were also conducted to check the materiality of the PLO gel.

According to the content ratio of ceramide and lecithin in the PLO gel, there were differences in the formation of liquid crystals and the size and stability of the liquid crystals. In addition, through SAXS and WAXS analysis, it was confirmed that the PLO gel containing no ceramide has a hexagonal structure, and the PLO gel containing ceramide has a lamella structure.

1. 서론

사람의 피부는 피하조직, 진피층과 표피층으로 나뉘고 표피층은 기저층, 유극층, 과립층, 각질층으로 분류할 수 있다. 이 중 각질층은 피부의 가장 중요한 역할인 피부장벽의 가장 핵심적인 역할을 하고 있다[1,2].

각질층은 각질세포와 세포간지질로 구성되어 있다. 각질세포는 핵이 사라져 죽어버린 표피세포이고 각질층에서 겹겹이 쌓여있어, 각질층의 수화 역할을 할 뿐만 아니라 자외선과 물리적인 성분이나 자극으로부터 장벽의 역할을 한다. 세포간지질은 각질층의 세포외 영역으로 지질 2 중층들이 각질세포들 사이사이를 촘촘히 채워져 있는 구조이고, 이러한 세포간지질은 체내 수분의 증발을 억제시켜 손실을 줄여주고, 항균, 항산화, 투과성 장벽의 기능을 수행한다고 알려져 있다.[1-6] 세포간지질의 성분은 크게 세라마이드, 콜레스테롤, 자유지방산이다. 대략적으로 세라마이드 50%, 콜레스테롤 25%, 자유지방산 10%로 구성되어 있고 라멜라 구조를 형성하고 있다(Figure 1) [4,7].

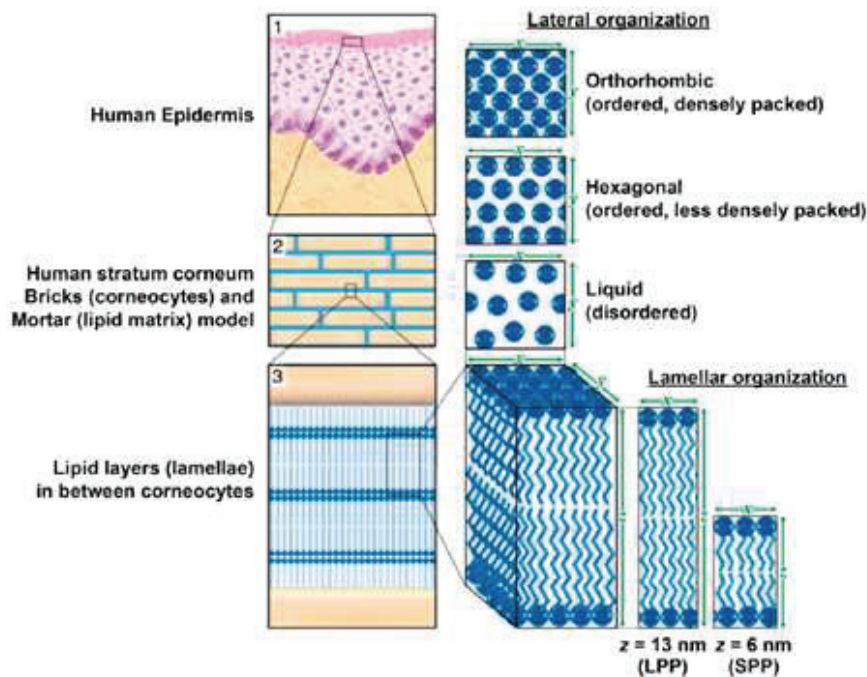


Figure 1. Internal structure and arrangement of intercellular lipid.

라멜라 구조는 지질들이 나란히 배열되어있는 지질 2 층층이 연속된 층상 구조로 여러 인지질 구조들 중 하나이고, 구조에는 라멜라 구조만이 아닌 헥사고날 구조와 큐빅 구조가 존재한다. 이러한 구조들에 대해 많은 연구들이 이루어져 왔다. 이 중 피부의 라멜라 구조는 통상적으로 약 13 nm의 반복 거리를 갖는 장주기상(long periodicity phase)과 약 6 nm의 반복 거리를 갖는 단주기상(short periodicity phase) 두 개의 층상을 갖는 것으로 알려져 있다.[1,2,6-10] 위와 같이 구조가 여러 가지로 존재하듯, 구조를 구성하는 인지질들 간의 내부 배열도 여러 가지로 나뉜다. 반복되는 구조를 이루는 지질들 간의 배열에는 촘촘한 사방정계(orthorhombic) 배열과 사방정계보다 배열의 간격이 좀 더 넓은 육방정계(hexagonal) 배열이 존재한다. 그리고 지질의 이동 자유도가 가장 높은 액체(liquid) 배열이 있다(Figure 1) [1,2,7,8,10]. 결과적으로, 구조의 형태에 따라 라멜라, 헥사고날, 큐빅 구조 등으로 나뉘고 구조들은 지질 간 거리에 따라 각각 사방정계, 육방정계, 액체 배열을 가질 수 있다는 것을 알려준다.

여러 가지의 구조와 내부배열의 라멜라 구조를 갖는 피부 각질층의 세포간지질을 편광현미경으로 관찰하였을 때, 액정의 형성을 보여준다. 편광현미경의 편광자를 통해 편광된 빛이 시료를 지날 때 진폭과 위상이 달라지지 않으면 검광자에 막혀 검출되지 않지만, 시료를 지나 진폭과 위상이 바뀌게 되면 검광자를 지나 밝게 검출되고 검출된 빛의 형태는 액정의 구조를 갖게 된다(Figure 2) [2,5,6,11,12].

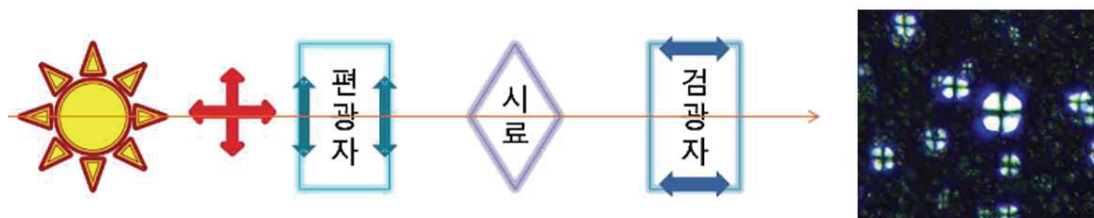


Figure 2. Liquid crystal observed by polarized microscope.

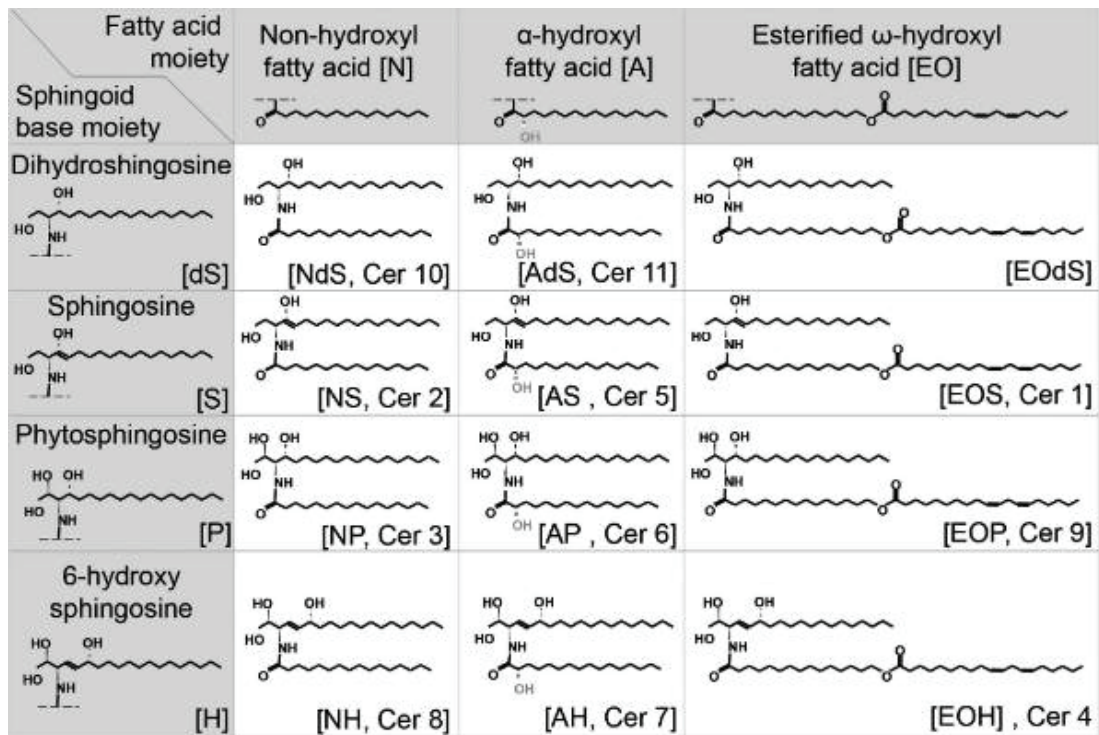


Figure 3. Type of ceramide.

라멜라 구조를 갖는 세포간지질 중 세라마이드는 약 50%를 차지하는 가장 풍부한 세포간지질 성분이고 피부에서 만들어지는 천연 유분이다. 스피고리피드(spingolipids)라고도 알려진 세라마이드는 스피고이드 베이스가 지방산 사슬과 결합되어 형성된다. 결합되는 두 사슬의 종류가 여러 가지 존재하기 때문에 결합되어 만들어지는 세라마이드는 다양해지고, 세포간지질에서는 NdS, NS, NP, NH, AdS, AS, AP, AH, EOdS, EOS, EOP, EOH 총 12 가지의 세라마이드가 생성된다(Figure 3) [7,8,13,14]. 세라마이드가 전체적인 함량이 높은 만큼 존재감이 크기 때문에 피부장벽, 세포간지질, 라멜라 구조는 세라마이드의 변화에 영향을 크게 받는다. 외부 자극이 누적되면 피부장벽이 변화를 일으키고, 세라마이드가 감소하는 방향으로 흘러간다. 이 때, 피부의 노화와 주름, 아토피가 나타날 수 있다[2,4,15]. 반대로 세라마이드가 풍부한 혼합물이나 유연화제를 사용했을 때, 피부장벽 기능을 회복하는데 도움이 된다[2,4,13,15,16].

앞서 설명한 바와 같이 피부장벽의 기능을 하는데 필수요소인 세라마이드를 피부에 직접적으로 적용하면 좋은 효과를 볼 수 있을 것이다. 테이프 박리나 레이저를 사용하거나, 여러 종류의 절제방법 또는 마이크로 니들을 사용하여 각질층을 제거하여 경피에서의 약물 전달을 증가시킬 수 있다. 하지만 이 방법들을 사용 시 각질층의 과도한 손실이 발생하고[13,16,17], 세라마이드는 난용성 물질이기 때문에 부작용이나 다소 성능이 떨어질 수 있다. 그렇기 때문에 각질층에 물리적 피해를 주지 않고 경피 약물 전달 시스템(transdermal drug delivery system, TDDS) 중 꾸준한 관심을 받고 있는 Pluronic Lecithin Organogel (PLO gel) 제형에 세라마이드를 적용하고자 하였다.

약물 전달 시스템의 가장 일반적인 방법은 경구 및 경피를 통해 약물을 전달하는 것이다. 경구 약물 전달 시스템의 경우, 약물의 효과를 확인하려면 오랜 시간이 지나야하기 때문에 피부를 통한 약물 전달에 대한 관심이 커져왔다. 하지만 경피 또는 각질층은 약물의 투과성이 낮기 때문에 이에 대한 많은 연구가 이루어졌고, 더욱 더 나아가 경피 약물 전달 시스템으로 발전되어 왔다[17-19]. 피부장벽에 의한 낮은 투과성으로 많은 제형들이 적합하지 않았지만 lecithin organogel (LO Gel)은 친수성과 소수성, 양쪽성 약물의 경피 전달에 매우 좋은 성능을 보여주었다[17,19,20]. 경구 약물 전달 시스템을 사용했을 때 나타나는 부작용이 감소된다는 연구를 토대로 관심이 더 커지고 있다[18,22]. 약물 전달 시스템에 리포솜, 탄소 튜브, 고분자 등 다양한 물질들이 사용되는데, 이 중 고분자는 제어된 약물 방출, 높은 약물 함량과 같은 장점을 가지고 있어 널리 사용되고 있다[17,22].

PLO gel은 1990년대 초에 Marty Jones와 Lawson Kloesel이 연구하였고, 양친매성 계면활성제로도 사용되는 고분자 물질인 poloxamer 407을 함유하는 LO gel의 한 유형으로 꾸준한 관심을 받으며 사용되고 있는 경피 약물 전달 시스템 중 하나이다[19,22,23]. PLO gel은 유효 성분이 경피에 빠르고 지속적으로 흡수되게 조절하며, 피부에 자극을 주지 않는 장점을 가지고 있다[23-25]. PLO gel의 주성분으로는 poloxamer 407과 lecithin이 있다.

Poloxamer 407 (Pluronic F 127)은 계면활성제와 안정화제로 사용되며 양친매성 공중합체로 잘 알려져 있다[22,24]. 양친매성 공중합체에는 두 개의 중합체가 연결된 di-block 공중합체, 3개가 결합된 tri-block 공중합체, 4개 이상이 결합된 multi-block 공중합체가 존재한다. di-block 공중합체는 제조가 간단하지만 형성되는 구조 또한 단순한 형태이고, 반대로 multi-block 공중합체는 형성되는 구조의 형태를 조절하기 어렵고, 분자량이 크기 때문에 약물 전달 시스템으로의 사용에 한계가 존재한다[22,25].

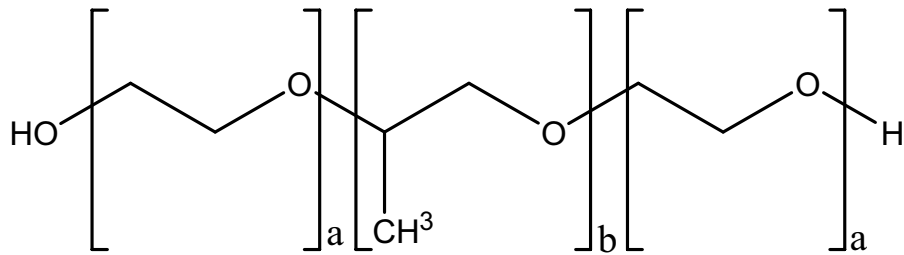


Figure 4. Structure of Poloxamer 407.

tri-block 공중합체는 다른 두 공중합체의 단점을 보완할 수 있어 약물 전달 시스템에 주로 사용된다. tri-block 공중합체는 기본적으로 두 가지 형태로 나뉜다. 소수성 중합체를 중심으로 양 옆에 친수성 중합체가 연결된 ABA 구조와 이와 반대인 BAB 구조가 있다. ABA와 BAB 공중합체는 구조적으로 서로 다른 응집과 결합 형태를 갖고 있고, ABA 공중합체는 미셀의 표면에서 BAB 공중합체보다 강한 결합을 유지할 수 있다[22,25]. 중합체의 길이 변화에 따라 형성되는 폴록사머의 종류가 다양해진다. PLO gel 제조에 사용되는 poloxamer 407은 친수성 중합체(polyethylene oxide)의 길이(a)는 101 개이고 소수성 중합체(polypropylene oxide)의 길이(b)는 56 개인 양친매성 tri-block(ABA) 공중합체이다(Figure 4). 약사인 Dr. Sudaxshina Murdan은 ‘겔의 더 큰 수용성분을 근거로 PLO gel은 ‘하이드로 겔’ 이라고 말할 수 있다’고 제안한다[17,18,26]. poloxamer 407을 기반으로 한 하이드로 겔은 저온에서 흐르는 성상(solution)을 갖지만 상온에서는 흐르지 않는 성상(gel)을 띄는 열에 대한 가역적 특성이 나타난다. 이러한 졸-겔 전이 현상으로 인해 약물의 지속적인 전달을 가능하게 한다[17,23,24,26].

졸-겔 전이 현상은 고분자 구조 및 물성학의 상분리도를 통해 설명될 수 있다. 일반적으로 온도가 증가함에 따라 결합이 약해져 액화나 기화되는 UCST (upper critical solution temperature)가 나타나지만, 고분자 물질과 용액이 수소결합에 영향을 받고 있으면 온도가 증가함에 따라 겔화되는 LCST (lower critical solution temperature)가 나타난다. poloxamer 407 또한, 온도가 증가함에 따라 소수성 중합체의 탈수현상에 의해 겔화되는 LCST가 나타나고, 졸-겔 전이 현상이 일어나는 이유이다[27-31].

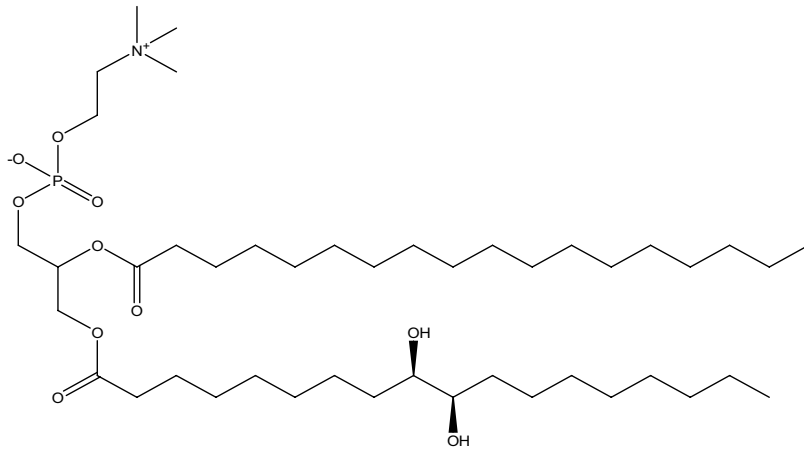


Figure 5. Structure of hydrogenated lecithin.

Lecithin (레시틴)은 소수성인 지방산들과 친수성의 인산기로 구성되어 있고, 생체 적합성 및 생분해성 계면 활성제일 뿐만 아니라 피부장벽을 유연하게 만들어 약물이 피부 깊숙이 침투 할 수 있도록 하는 침투 증강제, 유화제, 안정화제 등의 역할을 하는 성분이다(Figure 5) [20,26]. 그리고 레시틴은 자체적으로 지질 2 중층을 형성할 수 있고, 폴록사머를 이용한 하이드로 겔에 첨가됨에 따라 형성되는 입자의 크기가 작아지고 안정성이 높아진다는 장점을 가지고 있다 [32]. 이러한 poloxamer 407과 레시틴 성분들의 특징들을 통해 PLO gel은 물리적인 피해를 주지 않고 빠르고 지속적인 경피 약물 전달 시스템으로 사용되어져 왔다.

장점이 많은 세라미드를 피부에 적용하기에는 난용성 성질을 가지고 있고, 피부장벽의 기능에 의해 효율이 떨어지고 부작용이 있을 수도 있다. 그렇기 때문에 양친매성 계면활성제와 피부 침투 증강제가 함유되어 약물 전달에 활용되고, 그 효과가 큰 PLO gel에 적용하였다.

본 연구에서는 PLO gel에 세라미드가 첨가되었을 때 PLO gel 내에서 액정이 형성되는지와 액정의 구조적 안정성을 알아보기 위해 편광현미경을 활용하여 관찰하였다. 그리고 PLO gel 내에 형성된 액정의 구조, 내부 배열에 대해 정확하게 판단하기 위해 differential scanning calorimetry (DSC)와 점탄성 측정, Small-angle X-ray scattering (SAXS), Wide-angle X-ray scattering (WAXS) 분석을 진행하였다[30,32-36].

II. 재료 및 방법

1. 원료 및 기기

본 실험에서 PLO gel 제조를 위하여 ABA 타입 계면활성제로서 Pluronic F 127 NF (Poloxamer 407, BASF, Germany), 레시틴으로서 Lipoid S 75-3 (Hydrogenated Lecithin, L-Tec Pharmachem Co., Ltd., Germany)과 세라마이드로서 DS Ceramide Y30 (Ceramide NP, Doosan, Korea)을 사용하였다. 오일로 Meadowfoam Seed Oil (Limnanthes Alba (Meadowfoam) Seed Oil, Kerfoot, United Kingdom)을, 폴리에올로는 PEG-400 (PEG-400, SFC Co., Ltd., Korea)을 사용했고, 방부제는 Sakine 50 (Ethylhexylglycerin, Sachem, United States)과 Dowanol* EPH glycol ether (Phenoxyethanol, Dow corning, United States)를 사용하였다. 정제수(DI-Water)는 초순수를 사용하여 실험을 진행하였다.

PLO gel을 제조하기 위하여 아지믹서(Overhead stirrer, SL4000, Global Lab, Korea)와 핫플레이트 교반기(Hotplate stirrer, HS-20, LK Lab Korea, Korea)를 사용하였다. 액정 확인을 위해 편광현미경(Upright microscope, Nikon eclipse Ni-U, Nikon, Japan)을 사용하였으며, 입자크기 및 제타전위 측정을 위해 나노제타사이저(Nano ZS System, Malven Instrument Ltd., United Kingdom)를 사용하였다.

2. PLO gel 제조 방법

Poloxamer 407과 Phenoxyethanol을 5 °C의 DI-Water에 이지믹서(5 ~ 600rpm)를 사용하여 잘 분산시켜주고, 5 °C에서 대략 12 h 동안 보관하여 수상을 준비한다. Lipoid S 75-3, DS Ceramide Y30, Meadowfoam Seed Oil을 90 ~ 95 °C까지 가열해준 후 25 °C에서 천천히 냉각하여 유상을 준비해준다. PEG-400과 Saskine 50을 75 °C까지 가열 후, 실온으로 냉각하여 준비된 유상에 서서히 첨가하면서 이지믹서(5 ~ 600 rpm)를 사용해 5 min 간 혼합 및 분산시켜준다. 그리고 준비된 수상을 서서히 첨가하면서 이지믹서(1,800 ~ 2,000 rpm)를 사용해 10 min 간 혼합 및 분산시켜 PLO gel을 제조하였다 (Figure 6).

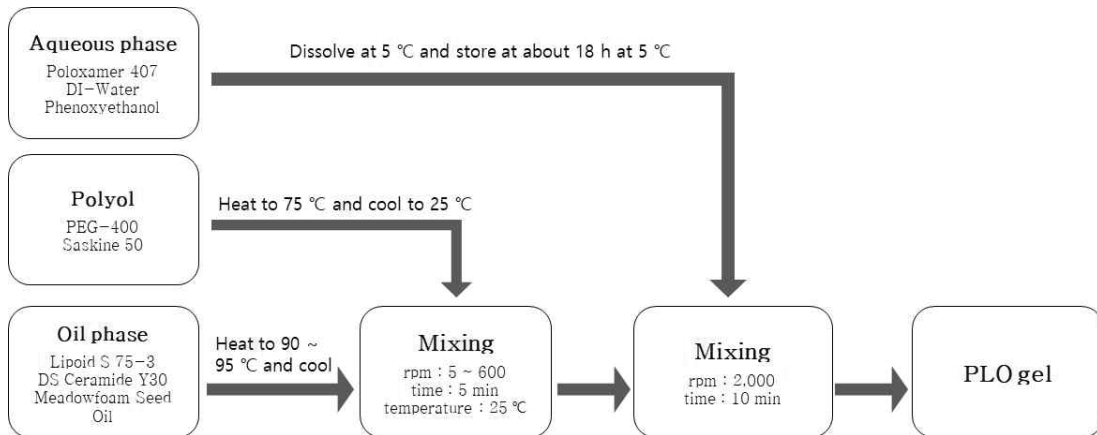


Figure 6. The manufacturing method of the PLO gel with ceramide.

3. PLO gel 제조

3-1. 세라마이드의 오일 용해도

DS Ceramide Y30 (세라마이드)을 PLO gel에 적용하기 위해 우선적으로 여러 오일들을 정하여 세라마이드의 오일에 대한 용해도 실험을 진행하였다. 오일로는 Macadamia Nut Oil, Meadowfoam Seed Oil, Jojoba Oil, Florasun-90, Squalane, CEH 가 선정되었다. 세라마이드를 오일에 첨가하고 90 °C까지 가열하여 용해시킨 후 25 °C로 냉각시켜주었다. 세라마이드가 용해되는 오일의 종류를 알아보고 안정성을 확인하기 위해 Table 1에 따라 기초 실험을 진행하였다.

Table 1. Solubility for DS ceramide Y30 with different oil phase composition

	Ingredients	Content (wt%)					
		#1-1	#1-2	#1-3	#1-4	#1-5	#1-6
A	Macadamia Nut Oil	95	-	-	-	-	-
	Meadowfoam Seed Oil	-	95	-	-	-	-
	Jojoba Oil	-	-	95	-	-	-
	Florasun-90	-	-	-	95	-	-
	Squalane	-	-	-	-	95	-
	CEH	-	-	-	-	-	95
B	DS Ceramide Y30	5	5	5	5	5	5

3-2. 세라마이드를 함유한 PLO gel 제조

이전 실험에서 선정된 Meadowfoam Seed Oil을 사용하였고, 세라마이드를 첨가하였을 때 PLO gel의 안정성 여부와 세라마이드를 첨가하지 않은 PLO gel과의 차이를 확인하기 위해 Table 2와 제조방법에 따라 실험을 진행하였다.

Table 2. Formulation for PLO gel with different ceramide and lecithin

	Ingredients	Content (wt%)				
		#3-1	#3-2	#3-3	#3-4	#3-5
A	Lipoid S 75-3	5.0	←	1.0	3.0	5.0
	DS Ceramide Y30	-	-	3.0	←	←
	CEH / Meadowfoam Seed Oil	10.0/-	-/10.0	←	←	←
B	PEG-400	20.0	←	←	←	←
	Saskine 50	0.2	←	←	←	←
C	Poloxamer 407	15.0	←	←	←	←
	DI-Water	49.5	←	50.5	48.5	46.5
	Phenoxyethanol	0.3	←	←	←	←

3-3. 액정 형성 PLO gel 제조

DS Ceramide Y30 (세라마이드)와 Lipoid S 75-3 (레시틴)의 함량에 따라 액정 형성 유무가 달라졌다. 이에 대해 좀 더 알아보기 위해 세라마이드와 레시틴의 함량비에 따른 액정 형성을 확인하기 위한 실험을 진행하였다. 이전 실험과 동일한 방법으로 Table 3에 따른 실험을 진행하여 PLO gel을 제조하였다.

Table 3. Formulation for stability of the liquid crystal formed in the PLO gel

	Ingredients	Content (wt%)			
		#11-1	#11-2	#11-3	#11-4
A	Lipoid S 75-3	1.0	3.0	5.0	3.0
	DS Ceramide Y30	3.0	←	←	5.0
	Meadowfoam Seed Oil	10.0	←	←	←
B	PEG-400	20.0	←	←	←
	Saskine 50	0.2	←	←	←
C	Poloxamer 407	15.0	←	←	←
	DI-Water	50.5	48.5	46.5	46.5
	Phenoxyethanol	0.3	←	←	←

3-4. PLO gel의 냉온 안정성 관찰

액정을 형성하는 PLO gel을 제조하였을 때, 냉온(5 ℃) 보관 상태에서 성상의 변화가 관찰되었다. 액정을 형성하는 PLO gel의 냉온에서의 안정성을 보완하기 위해 성분들의 함량을 변화시켜 실험을 진행하였다. 이전 실험과 동일한 방법으로 Table 4에 따른 실험을 진행하여 PLO gel을 제조하였다.

Table 4. Formulation for stability in cold temperature of PLO gel

Ingredients		Content (wt%)			
		#28-1	#28-2	#28-3	#28-4
A	Lipoid S 75-3	3.0	←	←	←
	DS Ceramide Y30	3.0	←	←	←
	Meadowfoam Seed Oil	10.0	←	←	←
B	PEG-400	20.0	19.0	18.0	20.0
	Saskine 50	0.2	←	←	←
C	Poloxamer 407	15.0	←	←	14.0
	DI-Water	48.5	49.5	50.5	49.5
	Phenoxyethanol	0.3	←	←	←
Ingredients		#28-5	#28-6	#28-7	#28-8
A	Lipoid S 75-3	3.0	←	←	←
	DS Ceramide Y30	3.0	←	←	←
	Meadowfoam Seed Oil	10.0	←	←	←
B	PEG-400	20.0	19.0	←	18.0
	Saskine 50	0.2	←	←	←
C	Poloxamer 407	13.0	14.0	13.0	14.0
	DI-Water	50.5	50.5	51.5	51.5
	Phenoxyethanol	0.3	←	←	←
Ingredients		#28-9	#28-10	#28-11	#28-12
A	Lipoid S 75-3	3.0	←	←	←
	DS Ceramide Y30	3.0	←	←	←
	Meadowfoam Seed Oil	10.0	←	←	←
B	PEG-400	18.0	21.0	22.0	20.0
	Saskine 50	0.2	←	←	←
C	Poloxamer 407	13.0	15.0	←	16.0
	DI-Water	52.5	47.5	46.5	47.5
	Phenoxyethanol	0.3	←	←	←

	Ingredients	#28-13	#28-14	#28-15	#28-16
A	Lipoid S 75-3	3.0	←	←	←
	DS Ceramide Y30	3.0	←	←	←
	Meadowfoam Seed Oil	10.0	←	←	←
B	PEG-400	20.0	21.0	←	22.0
	Saskine 50	0.2	←	←	←
C	Poloxamer 407	17.0	16.0	17.0	16.0
	DI-Water	46.5	←	45.5	←
	Phenoxyethanol	0.3	←	←	←
	Ingredients	#28-17	-	-	-
A	Lipoid S 75-3	3.0	-	-	-
	DS Ceramide Y30	3.0	-	-	-
	Meadowfoam Seed Oil	10.0	-	-	-
B	PEG-400	22.0	-	-	-
	Saskine 50	0.2	-	-	-
C	Poloxamer 407	17.0	-	-	-
	DI-Water	44.5	-	-	-
	Phenoxyethanol	0.3	-	-	-

4. PLO gel 평가 및 분석

4-1. 경시변화 관찰

제조한 PLO gel을 실온(25 °C), 냉온(5 °C), 항온(40 °C)에 나누어 보관하고 1 일차, 1 주차, 2 주차에 맞추어 변화를 관찰하였다. 경시변화는 제형의 색상과 성상을 관찰하고, 변색과 상분리 여부를 확인하여 평가하였다.

4-2. 입자크기 및 제타전위 측정

제조된 PLO gel의 안정성을 확인하기 위해 1.0 wt%로 희석하여 나노제타사이저를 사용하였다. 입자 크기는 큐벳 (DTS0012, Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, United Kingdom), PDI (polydispersity index) 및 제타전위 (zeta potential)는 큐벳 (DTS1070, Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, United Kingdom)를 이용하여 3 회 반복 측정하고 평균값을 계산하였다. 나노제타사이저는 동적 광 산란 기법이 사용되었고, 사용한 광원은 He-Ne laser이며, 측정 파장은 633 nm이다. 모든 측정은 25 °C에서 진행되었다.

4-3. 편광현미경 관찰

PLO gel 내에 액정의 형성과 안정성을 확인하기 위해 편광현미경을 사용하였다. 슬라이드 글라스 위로 미량의 샘플을 채취하고 커버 글라스를 덮어 도포시켜 각각의 제형에 대해 액정의 형성 유무와 형성된 액정의 변화를 관찰하였다.

4-4. SAXS / WAXS 분석

PLO gel에 형성된 액정의 구조를 SAXS / WAXS를 이용하여 분석하였다. X-선 산란 분석법들은 측정 시료에 X-선을 조사하였을 때, 산란이 일어나게 되고 산란된 빛들이 특정 방향에서 서로 간의 간섭이 일어나게 된다. 이러한 상쇄 및 보강 간섭으로 인해 강한 X-선이 만들어지게 되는데 이를 X-선 회절 현상이라고 한다. SAXS / WAXS도 X-선 산란 분석법 중 하나이기 때문에, 앞서 설명했던 X-선의 회절 현상을 이용해 시료를 분석하는 방법을 사용한다. 시료와 검출기 또는 광원과 시료 간 거리에 따라 검출되는 산란 각도의 범위가 달라지고, 각각 다른 정보들을 얻을 수 있다(Figure 7). SAXS 분석 데이터는 시료의 형태, 구조와 층간 거리를 확인할 수 있고, WAXS 분석 데이터로는 구조의 표면과 인지질 간의 거리 같은 SAXS보다 더 세밀한 분석을 할 수 있다.

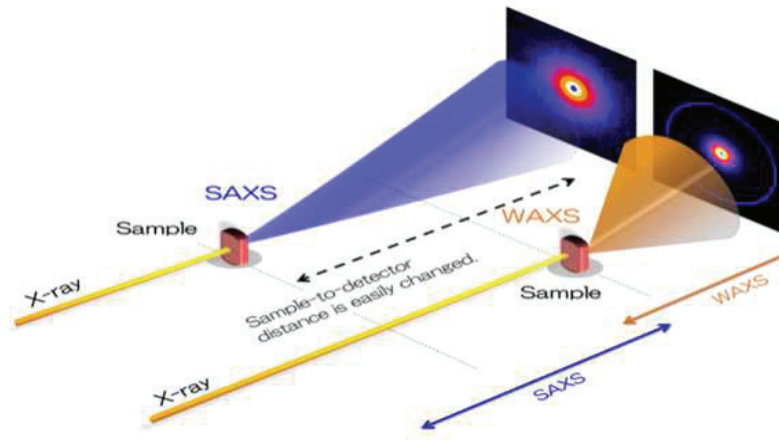


Figure 7. Variation of scatter angle with measurement distance.

사용된 기기는 KIST 특성분석센터의 장비(ScatterX78 stage, PANalytical, United Kingdom)를 사용하였고, 기본 조건은 X-ray source : Cu-K alpha (45 kV, 40 mA), sample to detector length : 240 mm로 설정하였다. 그리고 SAXS는 2 theta (산란각) : 0.08 ~ 5 degree, step size : 0.0131 degree의 조건으로, WAXS는 2 theta (산란각) : 0.5 ~ 78 degree, Step size : 0.0788 degree의 조건으로 분석을 진행하였다. 검출기는 PIXcel^{3D}를 사용하였고, 1D scan 모드로 측정하였다.

4-5. DSC 측정

PLO gel의 특성 평가와 열 분석을 위해 DSC 측정을 하였다. DSC는 열 전이를 결정하기 위해 고분자 재료나 액정을 검사하는데 널리 사용된다. 측정하려는 시료와 reference 시료를 기기에 넣어 일정한 속도로 가열 및 냉각하면, 시료들의 상변화에 따라, reference 시료 대비 측정하려는 시료의 열량의 변화(흡열 : endothermic, 발열 : exothermic 등)를 확인할 수 있다. 변화에 대한 heat flow의 변화를 보고, 시료의 유리전이온도, 결정화온도, 용점, 비열, 반응열 등을

측정할 수 있다. 사용된 기기는 한국고분자시험연구소의 장비(DSC 214 Polyma, NETZSCH, Germany)을 사용하여 넓은 범위의 온도로 분석을 진행하였다. 온도는 1 차적으로 $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에서 $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ 로 가열, $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에서 $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 까지 냉각 후 다시 $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ 까지 가열시켜 준다. 이 때, 승온 속도는 $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 으로 진행하였다.

4-6. 회전형 레오미터 측정

PLO gel의 점탄성에 대한 거동을 알아보기 위해 점탄성 측정을 진행하였다. 회전형 레오미터는 시료 상태가 물에서 다소 용융된 상태의 고분자, 유연한 rubber 등의 점탄성 거동을 보는 장비이다. 시료의 겔보기 점도에 따라 크게 flow test와 oscillation test로 나누어집니다. flow test에서는 주로 shear rate에 따른 점도(Viscosity, η), 전단응력(Shear stress, τ)을 측정한다. 이는 시료가 액상에 가까운 점도 범위를 가지는 점성체를 측정할 때 적합하다. oscillation test에서는 frequency 변화에 따른 저장탄성율(G'), 손실탄성율(G''), tangent delta ($\tan \delta = G'' / G'$)를 측정한다. 이는 시료의 점도 범위가 고분자 용융상태 또는 유연성 고무일 때, 즉, 점성과 탄성이 공존하는 경우에 적합하다. 이 연구에서 제조된 PLO gel에 대해 oscillation test를 사용하였다. 사용된 기기는 한국고분자시험연구소의 장비(ARES-G2, TA instrument Ltd., United State)을 사용하여 각각의 시료를 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $5\text{ }^{\circ}\text{C}$, $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 세 가지의 온도로 고정시키고, frequency에 변화를 주어 점탄성 거동에 대해 분석하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 세라마이드의 오일 용해도 결과

1-1. 경시변화 관찰

6 가지 오일들에 대한 DS Ceramide Y30의 용해도를 알아보았다. 세라마이드를 Macadamia Nut Oil, Meadowfoam Seed Oil, Jojoba Oil, Florasun-90, Squalane, CEH에 각각 5%씩 첨가하여 가열 및 용해시켜주었다. 하지만 세라마이드와 오일을 80 ~ 85 °C까지 가열하였을 때, 완전히 용해되지 않고 층이 약간 나뉜 것을 확인할 수 있었다. 그렇기 때문에 90 °C까지 온도를 높여 가열하였고, 층분리 없이 용해된 것을 확인하여 실온에서 천천히 냉각 후 변화를 관찰하였다. 세라마이드가 용해된 Jojoba Oil과 CEH, Squalane은 1 일차 관찰에서 세라마이드가 침전되어 오일과 분리되거나 혼합물의 표면으로 오일이 새어나와 상분리가 일어난 것을 확인하였다. Macadamia Nut Oil, Meadowfoam Seed Oil, Florasun-90에서는 침전, 분리 같은 변화가 일어나지 않고 안정한 성상을 유지하는 것을 확인할 수 있었고(Figure 8), 세라마이드의 용해에 가장 적절한 오일로 Meadowfoam Seed Oil이 선정되었다.

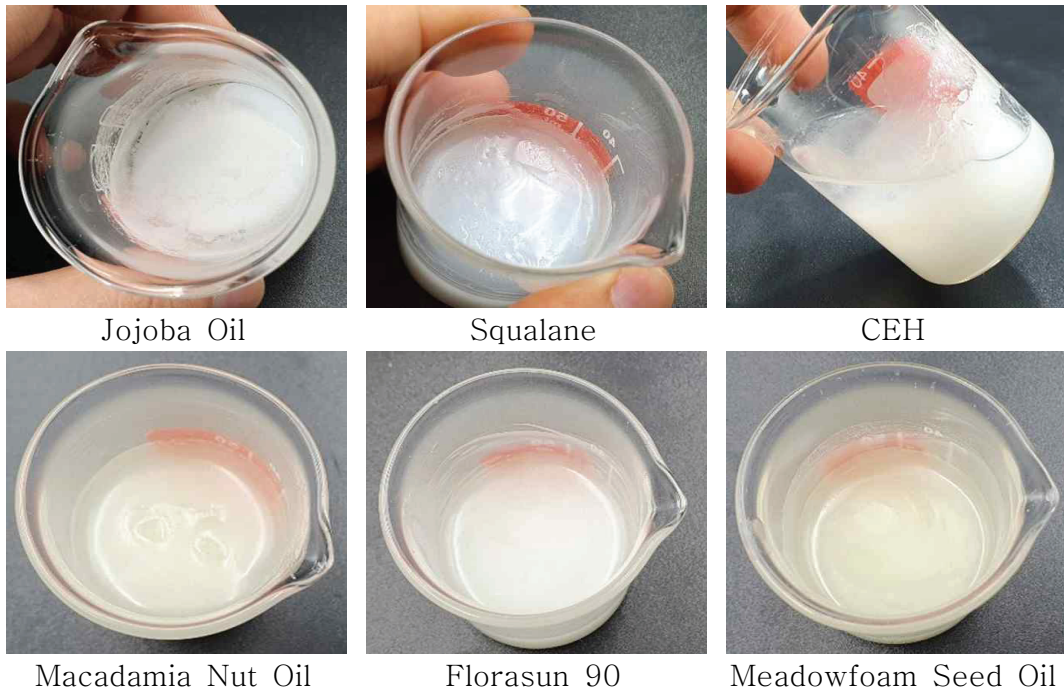


Figure 8. Oil melting stability of ceramide.

2. 세라마이드를 함유한 PLO gel 제조 결과

2-1. 경시변화 관찰

세라마이드와 선정된 오일을 첨가하여 PLO gel을 제조하였을 때, 제조된 PLO gel의 안정성과 세라마이드를 함유하지 않은 PLO gel과의 차이를 확인하였다. 세라마이드를 함유하지 않은 PLO gel의 색상은 미황색의 불투명한 겔이지만 세라마이드가 첨가되면서 PLO gel의 색상이 백색에 가까워지는 것을 확인하였다. 실온에서 2 주일 전후로 대부분의 PLO gel들이 시간의 경과에 따라 불그스름해지는 현상이 나타났지만 제형 내의 성분들이 석출된다거나, 상이 분리되는 현상은 일어나지 않았다. 제형이 불그스름하게 변색되는 현상은 레시틴의 함량이 증가할수록 심해졌지만 세라마이드가 첨가됨에 따라 변색이 완화되는 것을 확인 할 수 있었다. 항온에서는 #3-3과 #3-4 제형을 제외하고 다른 PLO gel들이 1 주일 이후 불그스름하게 변색된 것을 확인하였고, 2 주차에서 #3-3과 #3-4 또한 변색된 것을 알 수 있었다. 냉온에서는 실온, 항온과 달리 변색되는 현상은 일어나지 않았지만 PLO gel의 겔상 유지 확인을 위해 만들어 놓은 홈이 무너지거나 사라지는 것을 확인하였다(Figure 9).

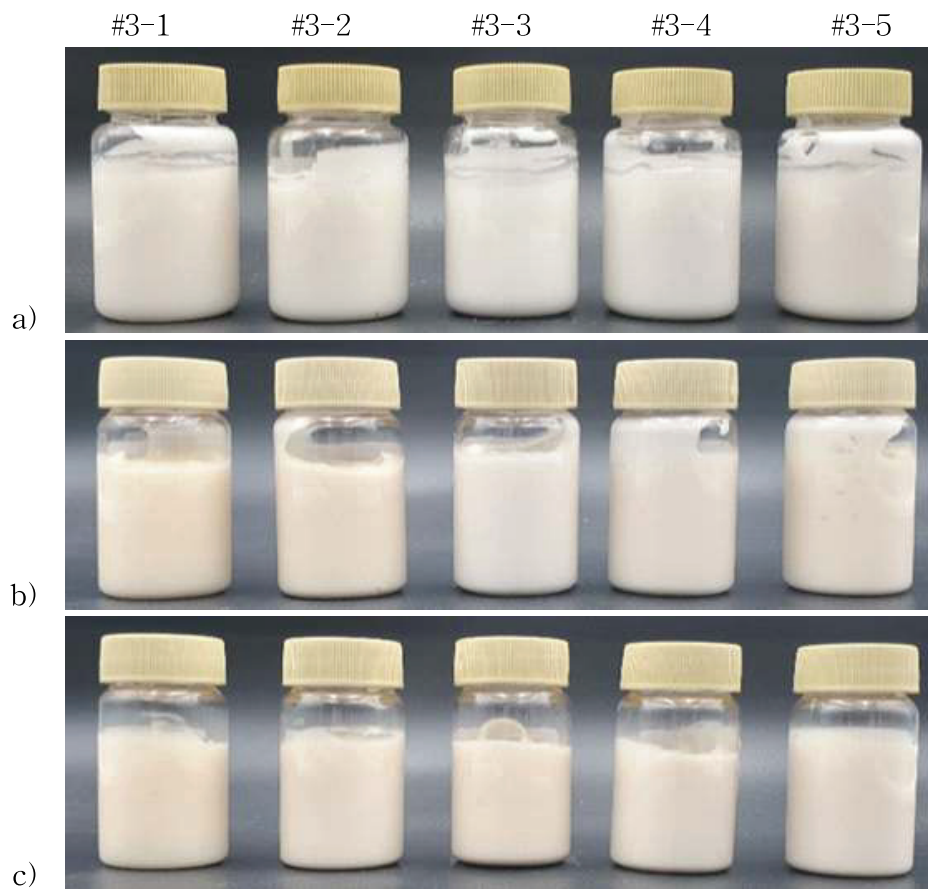


Figure 9. State of the PLO gel containing ceramide according to temperature and time. a) 25 °C, day 1, b) 40 °C, week 1, c) 40 °C, week 2

2-2. 편광현미경 관찰

세라마이드를 직접적으로 관찰하기 위한 방법 중 한 방법으로 편광현미경이 사용되어 왔다. 편광현미경을 통해 PLO gel에 첨가된 세라마이드의 형태 또는 구조적 특성을 알아보았다. 세라마이드를 함유하지 않은 PLO gel (#3-1, #3-2)은 입자들이 어떤 형태를 이루지 않고 분산되어 있었고, 세라마이드가 첨가되면서 액정의 형태를 형성하였고(#3-3 ~ #3-5), 형성되는 액정의 크기가 평균적으로 1 ~ 12 μm 인 것을 확인하였다. 그리고 첨가되는 세라마이드와 레시틴의 함량이 늘어날수록 형태가 점점 뚜렷해지고 액정의 수가 증가하는 것을 확인하였다. 결과적으로, 세라마이드가 첨가됨에 따라 액정이 형성되는 것을 확인할 수 있었다(Figure 10).

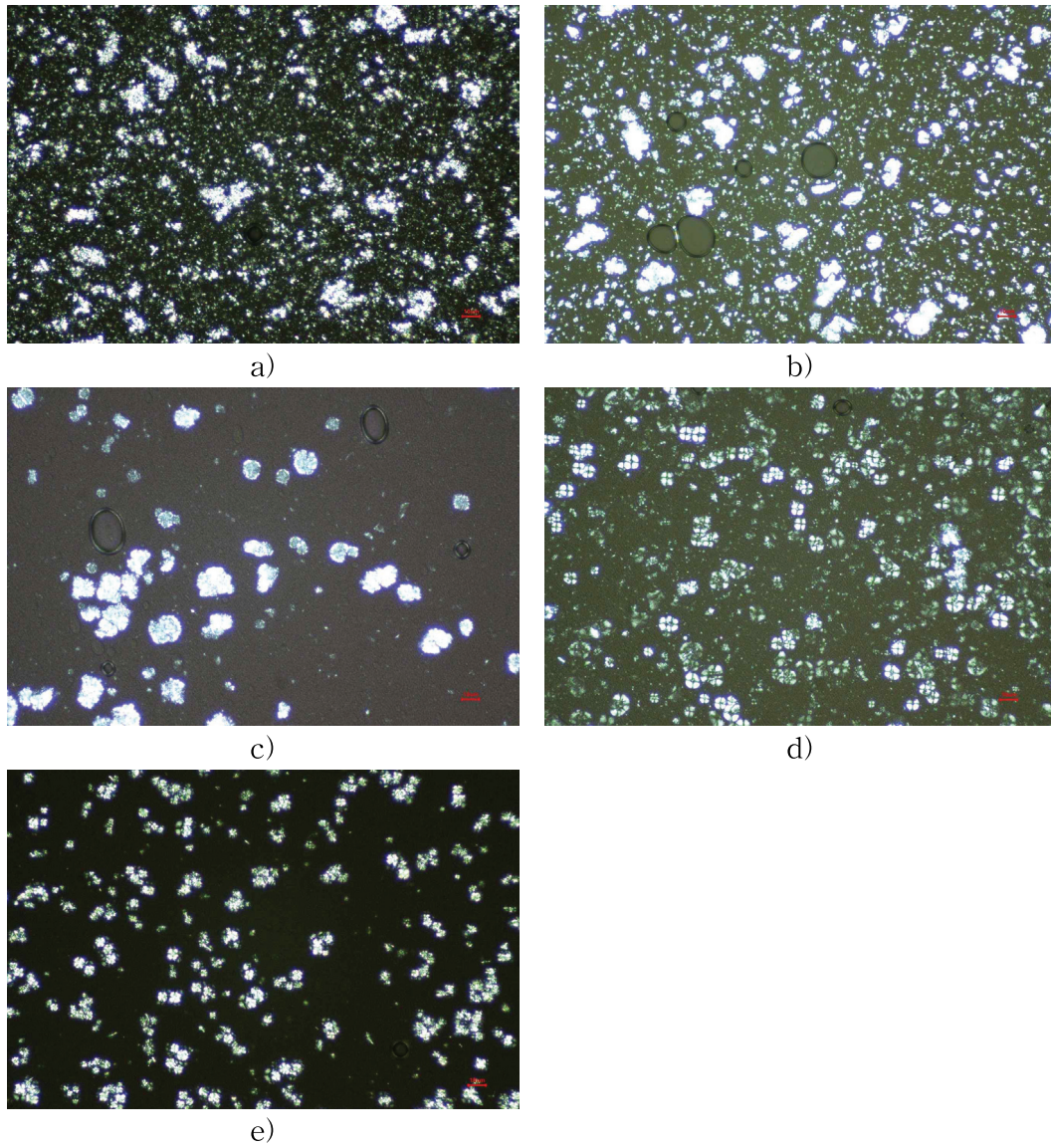


Figure 10. Polarized microscope image (X200) of #3. a) #3-1, b) #3-2, c) #3-3, d) #3-4, e) #3-5

3. 액정 형성 PLO gel 제조 결과

3-1. 경시변화 관찰

세라마이드를 첨가하여 PLO gel을 제조하였을 때, 세라마이드와 레시틴의 함량비에 따른 안정성과 PLO gel 내에 형성되는 액정의 차이를 확인하였다. 실온에서 2 주차 후로 대부분의 PLO gel들이 시간의 경과에 따라 불그스름해지는 현상이 나타났다. 하지만 제형 내의 성분들의 석출이나 상분리는 일어나지 않았다. 항온에서는 1 주차에 #11-3 제형이 살짝 붉게 변색되었다. 2 주차 이후 모든 PLO gel들이 불그스름하게 변색된 것을 확인하였지만, #11-2 제형이 변색이 덜 진행되어 가장 안정한 제형이라고 생각되었다. 냉온에서는 실온, 항온과는 다르게 변색은 일어나지 않았고, PLO gel의 겔상 유지 확인을 위해 만들어 놓은 홈이 무너지거나 사라진 것을 확인하였다(Figure 11).

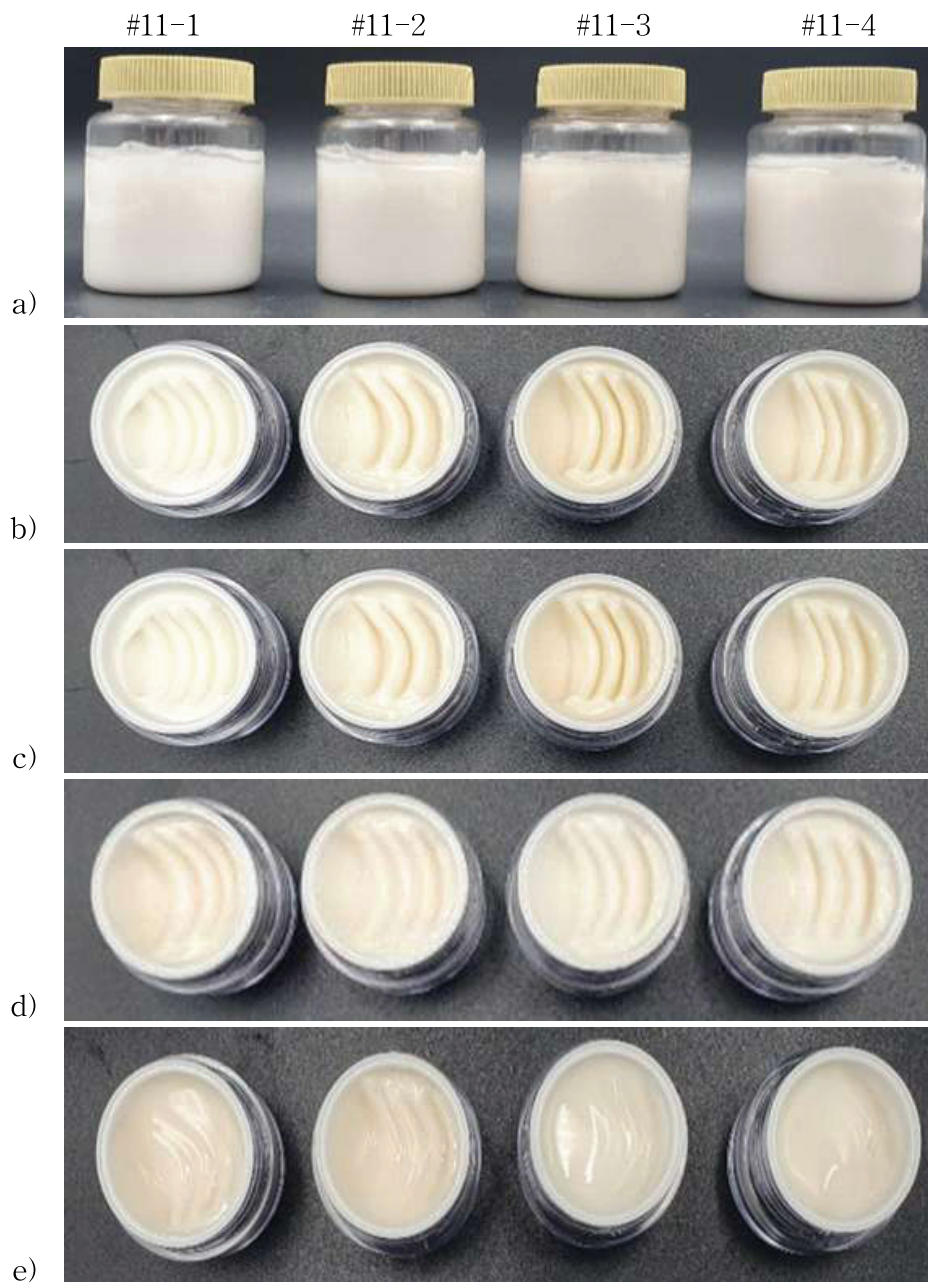


Figure 11. State of the PLO gel in which the liquid crystal formed according to temperature and time. a) 25 °C, day 1, b) 40 °C, week 1, c) 40 °C, week 2, d) 5 °C, week 1, e) 5 °C, week 2

3-2. 편광현미경 관찰

PLO gel에서 형성되는 액정의 세라마이드와 레시틴의 함량비에 따른 변화를 관찰하였다. 세라마이드와 레시틴의 함량이 증가할수록 액정이 형성되었고, 세라마이드와 레시틴의 함량비가 동률일 때 액정이 가장 안정적인 것을 확인하였으며, 일정 함량을 넘을 때는 액정의 형태가 불안정하고 크기가 커지는 것을 확인할 수 있었다. 안정하게 형성되는 액정은 평균적으로 1 ~ 12 μm 의 크기를 보였고 함량 증가에 따라 20 μm 까지 커진 것을 확인하였다. 그리고 2 주차가 지남에 따라 액정의 형태가 불안정해지고 사라지는 것을 확인하였다(Figure 12).

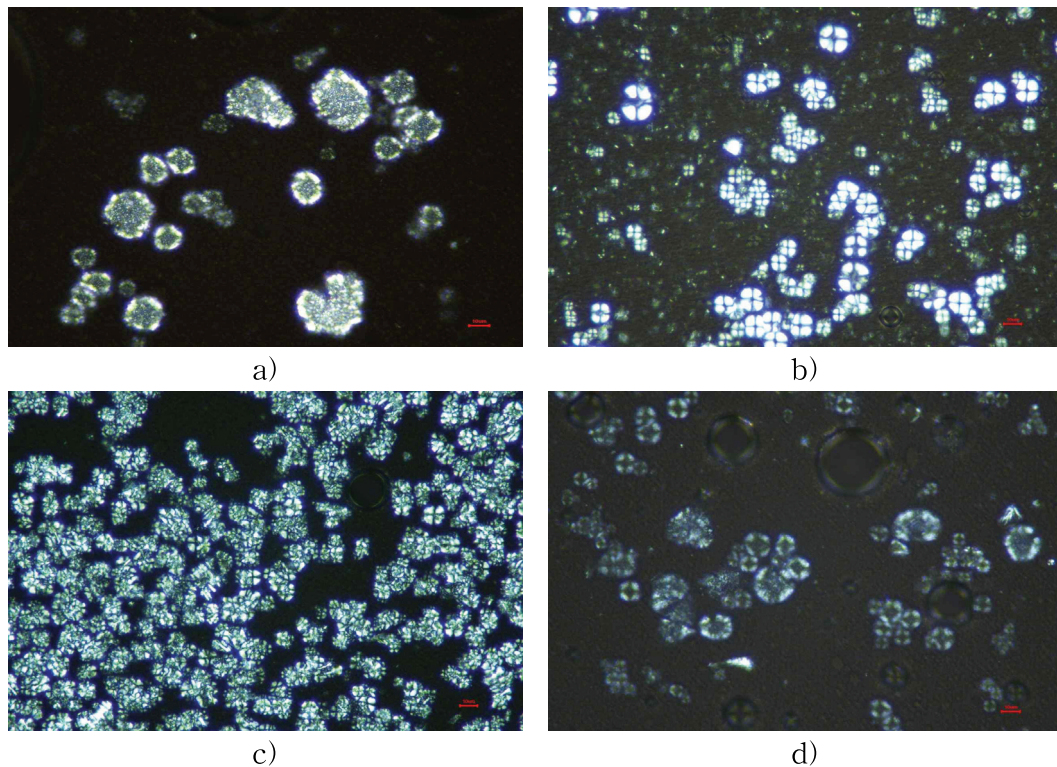


Figure 12. Polarized microscope image (X400) of #11. a) #11-1, b) #11-2, c) #11-3, d) #11-4

4. PLO gel의 냉온 안정성 관찰 결과

4-1. 경시변화 관찰

제조된 PLO gel의 냉온에서의 안정성과 성분들의 함량에 따른 변화를 관찰, 비교하였다. 실온에서 2 주일 후로 대부분의 PLO gel들이 석출이나 상분리는 일어나지 않고 시간의 경과에 따라 불그스름해지는 현상이 나타났다. 항온에서는 2 주차 전후에서 제형이 살짝 붉게 변색되었다. 냉온에서는 실온, 항온과는 다르게 변색은 일어나지 않았지만 PEG-400과 Poloxamer 407의 함량이 낮은 #28-1 ~ #28-9는 겔상 유지 확인을 위해 만들어 놓은 홈이 사라지고 그 중 #28-3 ~ #28-9는 PLO gel의 성상이 변하여 흐름성이 나타났다. 또한, #28-4 ~ #28-9에서는 상분리가 일어난 것을 확인하였다. 이는 PEG-400, Poloxamer 407 함량 감소, DI-Water 함량 증가에 따라 낮아진 Poloxamer 407의 농도에 기인한다는 것을 알 수 있었다. 반대로 #28-10 ~ #28-17은 PEG-400과 Poloxamer 407의 함량이 증가했기 때문에 냉온에서 겔상 유지 확인을 위해 만들어 놓은 홈이 유지되고, 안정성이 높다는 것을 확인할 수 있었다. PEG-400과 Poloxamer 407의 함량 변화는 실온과 항온에서 유효한 변화를 보여주지 않지만 냉온에서의 변화에 크게 관여한다는 것을 알 수 있었다 (Figure 13,14).



Figure 13. Phase separation of the PLO gel in which the liquid crystal formed at 5 °C, day 1.



Figure 14. State of the PLO gel with different composition according to temperature and time. a) 25 °C, day 1, b) 25 °C, week 2, c) 40 °C, week 2

4-2. 나노제타사이저 측정

제조된 PLO gel 내의 입자크기와 제타전위를 측정해 안정성을 확인하였다. Figure 15는 #28-1의 나노제타사이저 3 회 측정 결과를 예시로 보여주고 있다. 측정된 입자크기는 300 ~ 1,000 nm까지 넓은 범위의 입자 크기를 가지고 있는 것으로 확인되었고, 제타전위가 -30 mV 이상의 값을 가지고 있기 때문에 높은 안정성을 갖는 것을 확인할 수 있었다. 그리고 시간 경과에 따라 입자크기가 커지는 것을 확인하였지만 제타전위의 결과값을 통해 안정하다는 것을 알 수 있었다(Table 5-7).

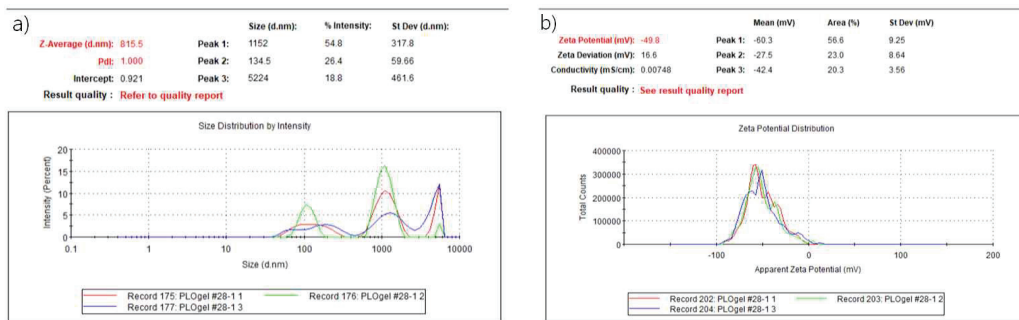


Figure 15. Example of a nano zetasizer measurement graph of #28-1.
a) particle size, b) zeta potential

Table 5. Particle size and zeta potential analysis results at 25 °C, day 1

Sample	Particle Size	PDI	Zeta Potential
	d.nm		mV
#28-1	845.5	0.979	-50.7
#28-2	925.3	0.927	-47.9
#28-3	1,058.0	1.000	-49.1
#28-4	591.1	0.928	-47.7
#28-5	399.2	0.983	-41.5
#28-6	561.7	0.868	-42.4
#28-7	786.3	0.734	-40.0
#28-8	469.5	1.000	-48.7
#28-9	319.7	0.872	-43.8
#28-10	742.0	0.887	-45.4
#28-11	616.0	0.980	-47.6
#28-12	434.4	1.000	-47.6
#28-13	683.8	0.728	-44.1
#28-14	705.3	0.920	-45.0
#28-15	521.7	1.000	-47.4
#28-16	627.0	0.931	-44.0
#28-17	696.7	0.656	-46.7

Table 6. Particle size and zeta potential analysis results at 25 °C, week 1

Sample	Particle Size	PDI	Zeta Potential
	d.nm		mV
#28-1	1,739.7	1.000	-46.6
#28-2	2,238.3	0.968	-47.7
#28-3	2,318.0	1.000	-49.1
#28-4	2,187.7	1.000	-48.9
#28-5	1,055.2	0.953	-44.4
#28-6	1,529.3	1.000	-42.6
#28-7	331.5	0.767	-43.7
#28-8	1,848.0	1.000	-44.4
#28-9	1,099.7	0.885	-44.1
#28-10	4,011.0	0.914	-45.2
#28-11	2,505.3	1.000	-44.2
#28-12	1,370.3	0.991	-44.3
#28-13	952.4	0.809	-45.9
#28-14	1,431.3	1.000	-44.8
#28-15	1,438.7	1.000	-44.9
#28-16	3,483.0	1.000	-46.5
#28-17	1,503.3	0.993	-47.1

Table 7. Particle size and zeta potential analysis results at 5 °C, week 1

Sample	Particle Size	PDI	Zeta Potential
	d.nm		mV
#28-1	1,598.3	0.859	-49.5
#28-2	2,213.0	0.851	-48.5
#28-3	2,469.7	0.910	-48.5
#28-10	2,254.7	0.863	-48.6
#28-11	2,581.0	0.982	-47.9
#28-12	1,960.3	0.895	-47.3
#28-13	2,150.0	0.970	-46.9
#28-14	3,116.3	1.000	-47.2
#28-15	2,445.7	0.914	-47.3
#28-16	1,540.3	1.000	-46.8
#28-17	865.5	0.960	-45.5

4-3. 편광현미경 관찰

PLO gel 내에 형성된 액정이 냉온에서도 안정성과 형태를 유지하는 지를 확인하였다. PEG-400과 Poloxamer 407의 함량이 낮아지거나 높아지는 변화에 상관없이 모든 제형에서 형성된 액정의 형태, 크기가 안정한 것을 확인하였고, 형성된 액정의 크기는 평균적으로 1 ~ 15 μm 인 것을 확인하였다. 그리고 1 주차 실온에서 액정이 변화없이 안정하게 유지되었으며, 냉온에서 상분리가 일어난 제형을 제외한 #28-1 ~ #28-3, #28-10 ~ #28-17의 제형도 1 주차에서도 액정의 형태를 유지하고 있었다. 이를 통해 냉온에서의 액정의 안정성 또한 높다는 것을 확인할 수 있었다(Figure 16-18).

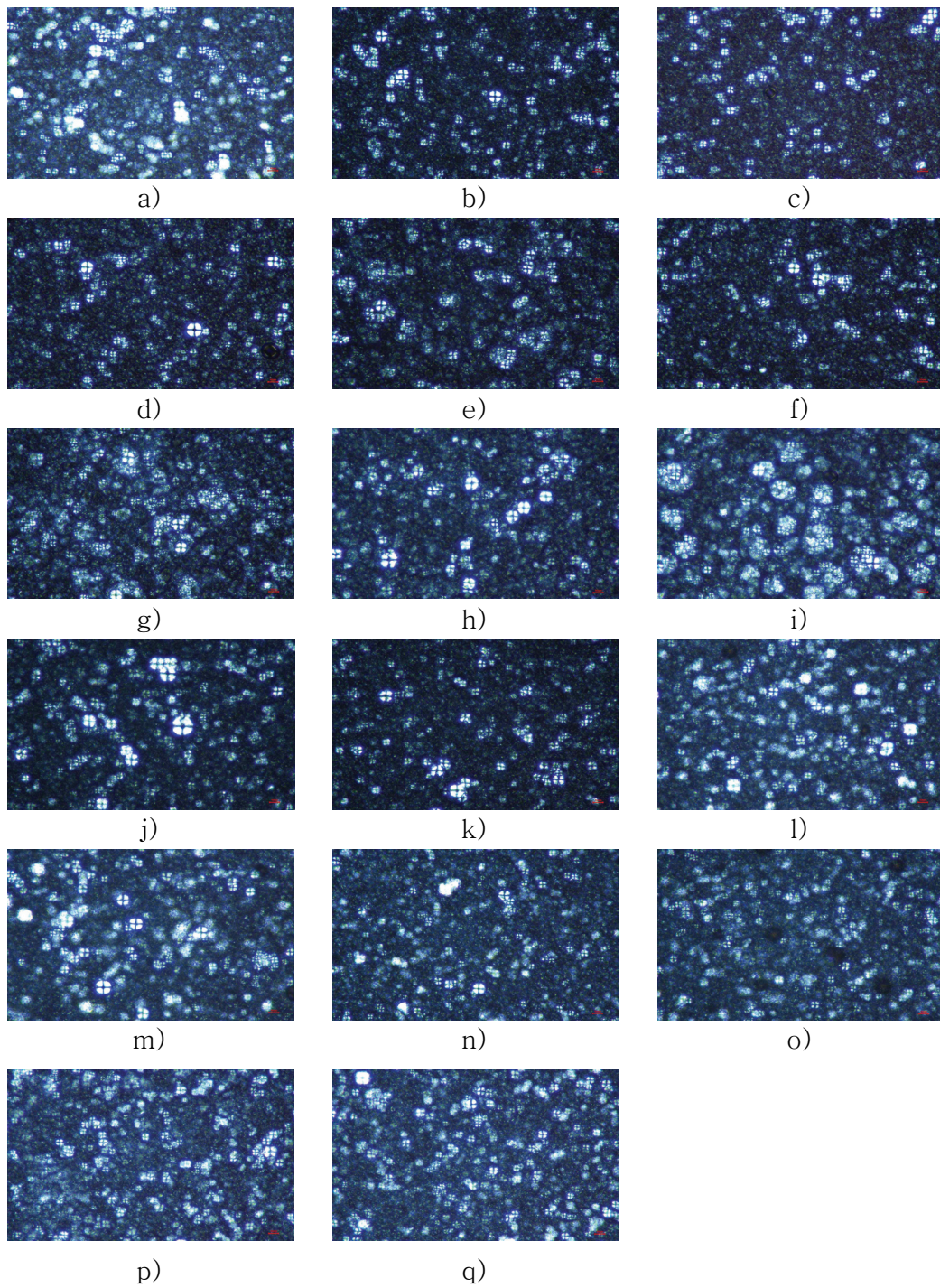


Figure 16. Polarized microscope image (X400) of #28 at 25 °C, day 1.
 a) #28-1, b) #28-2, c) #28-3, d) #28-4, e) #28-5, f) #28-6, g)
 #28-7, h) #28-8, i) #28-9, j) #28-10, k) #28-11, l) #28-12, m)
 #28-13, n) #28-14, o) #28-15, p) #28-16, q) #28-17

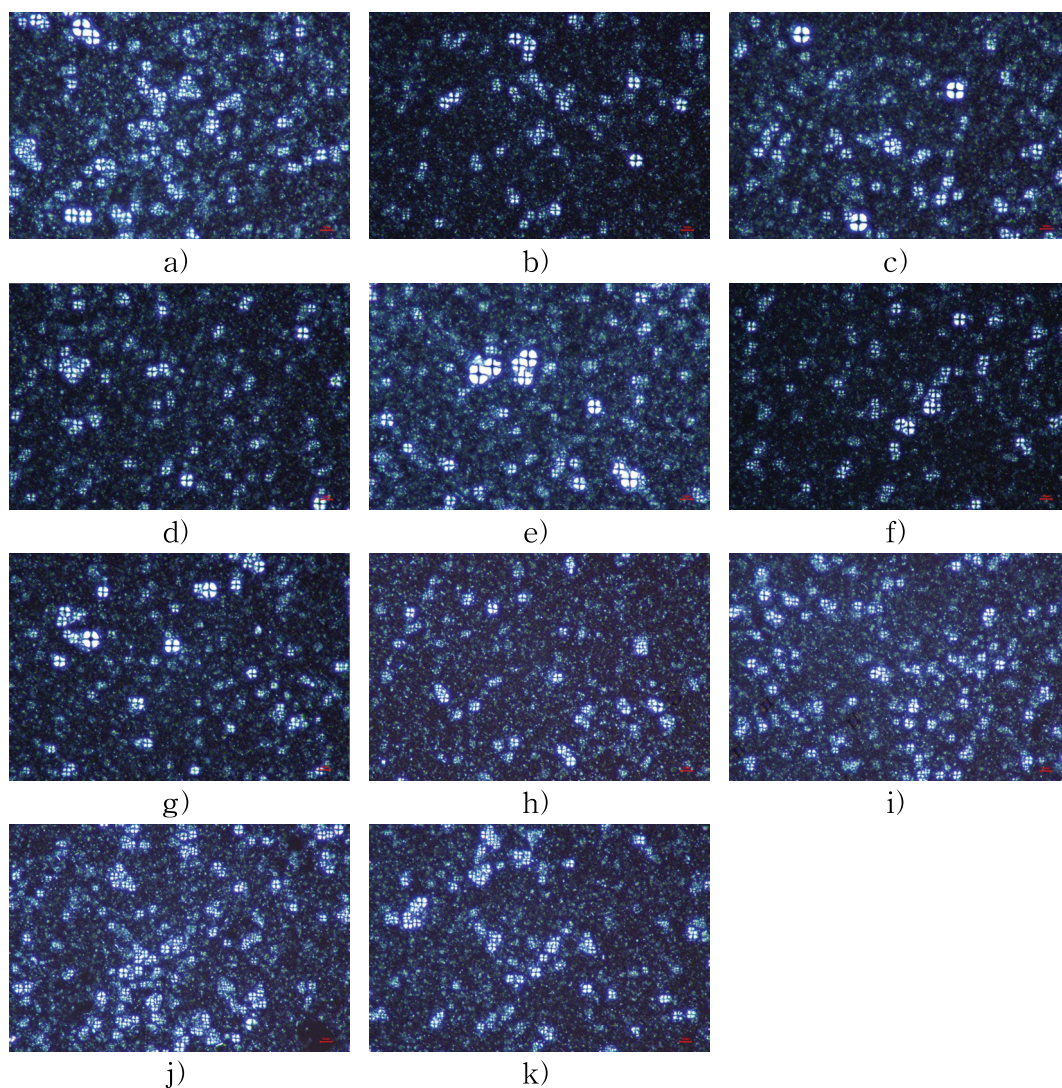


Figure 17. Polarized microscope image (X400) of #28 at 25 °C, week 1.
 a) #28-1, b) #28-2, c) #28-3, d) #28-10, e) #28-11, f) #28-12,
 g) #28-13, h) #28-14, i) #28-15, j) #28-16, k) #28-17

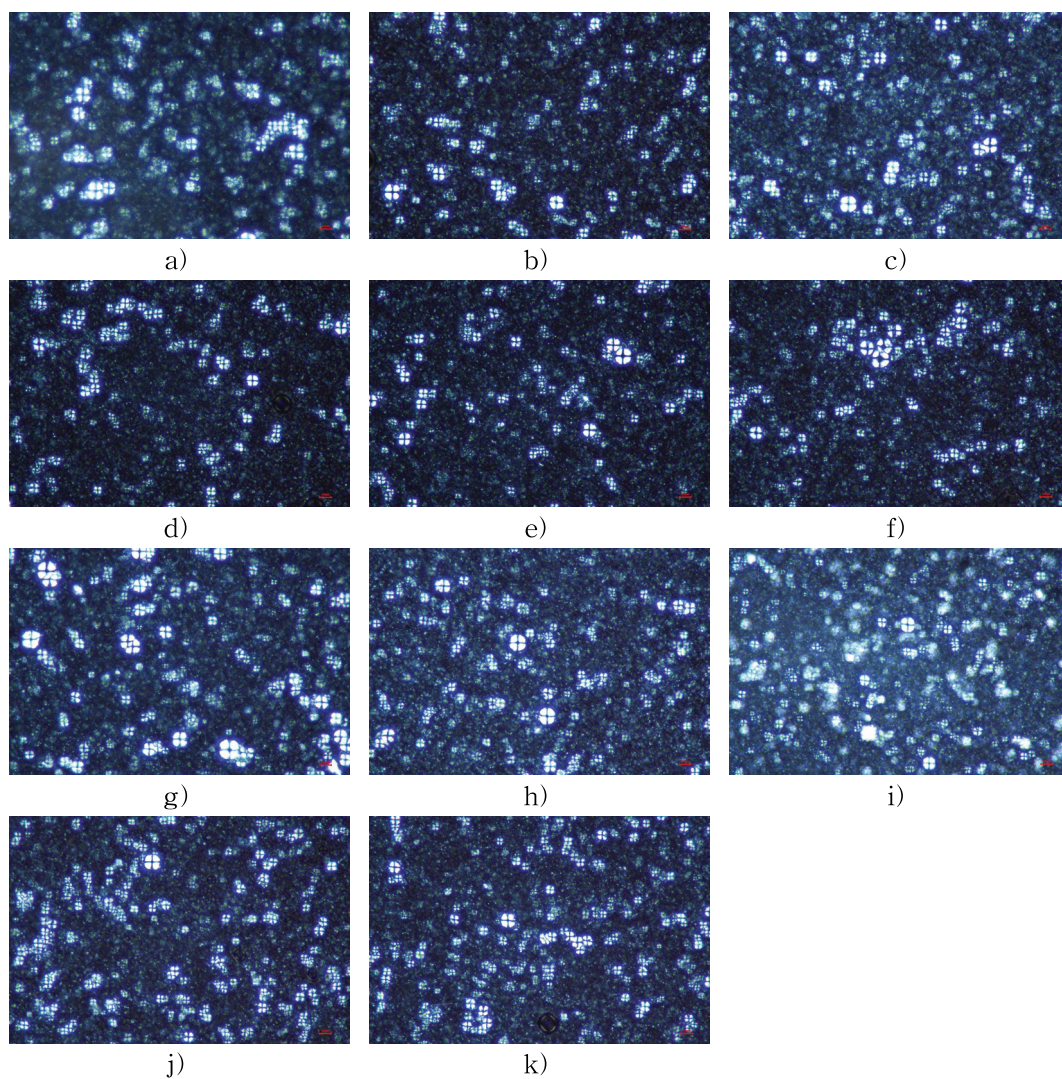


Figure 18. Polarized microscope image (X400) of #28 at 5 °C, week 1.
 a) #28-1, b) #28-2, c) #28-3, d) #28-10, e) #28-11, f) #28-12,
 g) #28-13, h) #28-14, i) #28-15, j) #28-16, k) #28-17

5. SAXS / WAXS 분석

세라마이드를 함유한 PLO gel의 내부 구조와 세라마이드를 함유하지 않은 PLO gel과의 차이를 확인하였다. 분석 그래프는 q 값(x 축)에 대한 산란강도(y 축)를 나타내고 있고, 여기서의 q 값은 파장(λ)과 산란각도(θ)에 대한 관계식으로 나타낼 수 있다.

$$q = (4\pi/\lambda)\sin\theta$$

그래프를 해석하기 위해서 Bragg의 공식이 사용된다.

$$n\lambda = 2d\sin\theta$$

q 값의 관계식을 Bragg의 공식에 대입했을 때, 거리(d)에 대한 식을 구할 수 있다.

$$d = 2\pi/q$$

그래프에서 얻을 수 있는 첫 번째 피크 값을 거리(d)에 대한 식에 대입하면 내부 구조의 층간 거리를 구할 수 있다.

Small-angle X-ray scattering (SAXS) 분석 결과를 통해 액정의 내부 구조를 확인할 수 있다. 구조는 SAXS 그래프에서 나타나는 피크들의 비율에 따라 달라지고 1 : 2 : 3일 때는 라멜라 구조, 1 : $\sqrt{3}$: 2일 때는 헥사고깔 구조, 1 : $\sqrt{2}$: $\sqrt{3}$ 일 때는 큐빅 구조를 가지는 것으로 알려져 있다. Figure 19에서 볼 수 있듯이 세라마이드를 함유하지 않은 PLO gel은 피크가 0.333 nm, 0.557 nm, 0.650 nm에서 나타나고, 피크의 비가 1 : $\sqrt{3}$: 2이므로 헥사고깔 구조를 갖는 것을 확인하였다. 그리고 세라마이드를 함유한 PLO gel은 0.314 nm, 0.557 nm, 0.912 nm의 피크를 갖고, 이는 1 : 2 : 3의 비를 보여주기 때문에 라멜라 구조로 형성된 것을 알 수 있었다. 첫 번째 피크의 q 값을 식에 대입했을 때, 피크 비로 확인된 구조의 층간 거리를 구할 수 있다. 세라마이드를 함유하지 않은 PLO gel의 헥사고깔 구조의 층간 거리는 18.87 nm이고, 세라마이드를 함유한 PLO gel의 라멜라 구조의 층간 거리는 20.01 nm이다. 이는 피부와 매우 유사한 구조(5 ~ 25 nm)임을 알 수 있었다.

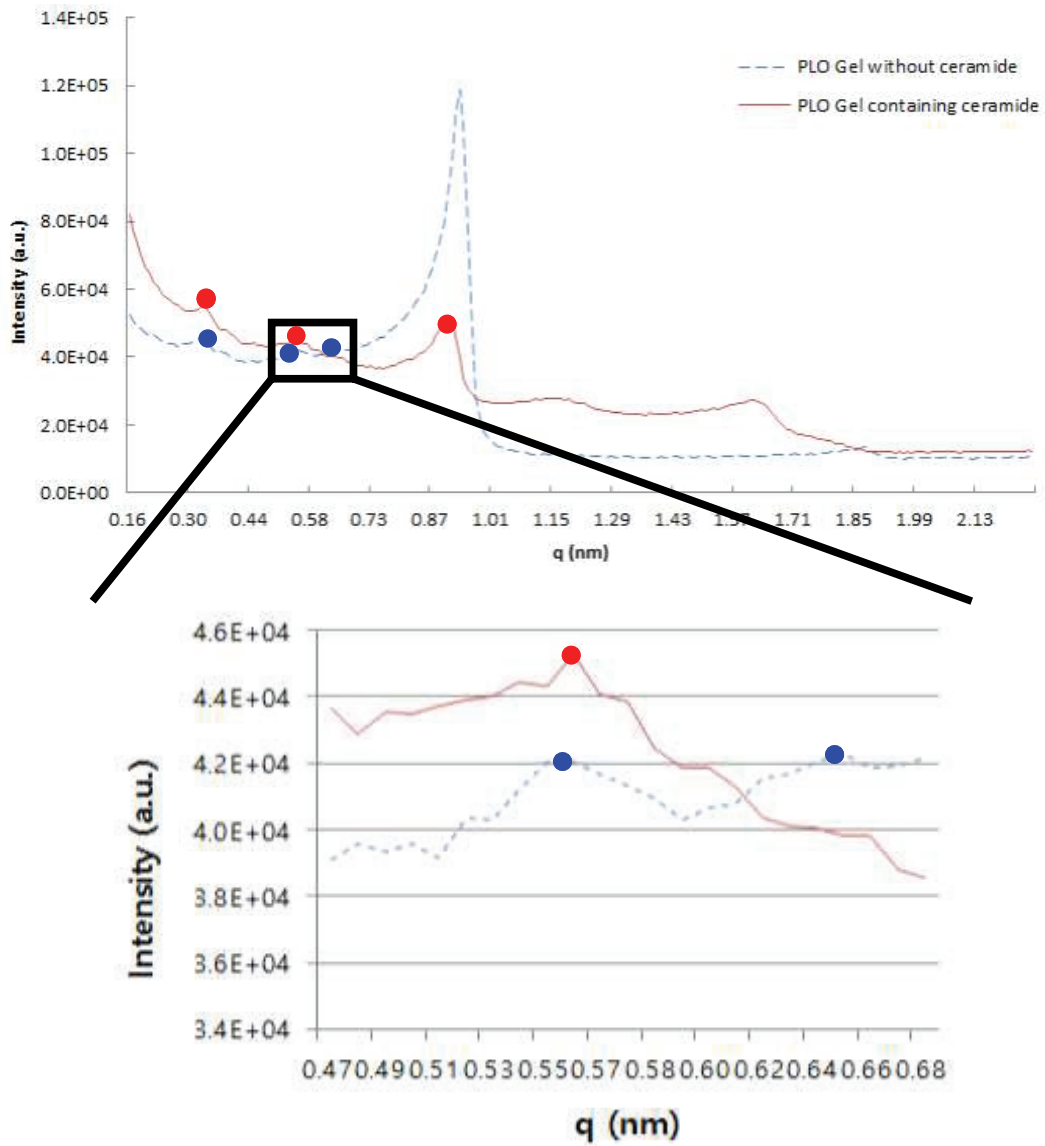


Figure 19. Small-angle X-ray scattering analysis result graph.

Wide-angle X-ray scattering (WAXS) 분석을 통해 구조를 형성하는 지질들의 배열을 확인할 수 있다. 배열들은 지질 간 거리가 0.46 nm인 액체 배열과 0.41 nm인 육방정계 배열, 0.41 nm, 0.37 nm인 사방정계 배열이 있다. Figure 20에서 앞부분의 피크들은 SAXS 분석을 통해 확인한 부분이기 때문에 WAXS 분석은 뒷부분의 피크들을 해석하여 지질들의 배열을 확인하였다. 1.501 nm^{-1} 의 피크와 1.699 nm^{-1} 부근의 넓은 피크 값을 가진다. 이를 Bragg 공식에 대입했을 때, 세라미드를 함유하지 않은 PLO gel의 헥사고랄 구조와 세라미드를 함유한 PLO gel의 라멜라 구조는 0.418 nm와 0.369 nm의 지질 간 거리를 갖기 때문에 사방정계 배열을 하고 있는 것을 확인하였다.

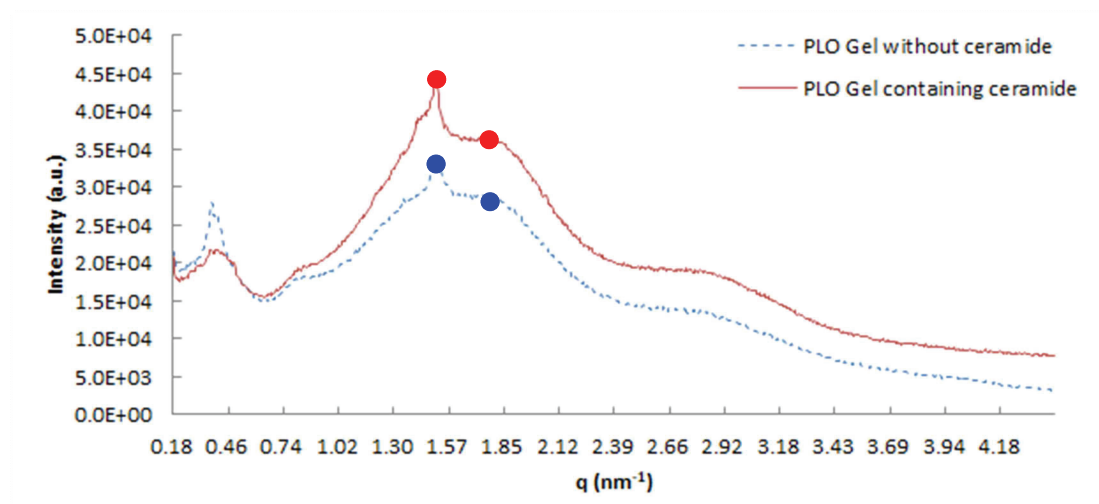


Figure 20. Wide-angle X-ray scattering analysis result graph.

6. DSC 측정

세라마이드를 함유한 PLO gel의 안정성을 확인하기 위해 열분석인 DSC 분석을 진행하였다. poloxamer 407과 PEG-400의 함량이 다른 #28-1, #28-3, #28-13을 $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에서 $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ 까지 1st heating, $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에서 $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 까지 1st cooling, $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에서 $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ 까지 2nd heating 해주었고 승온 속도는 $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 로 측정하였다.

세 가지 제형 모두 1st heating 곡선은 대략 $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에서 용융 시작, $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에서 종료되는 것을 확인할 수 있고, 대략적으로 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 와 $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ 가 용융 온도(T_m : melting temperature)인 것을 알 수 있다. 1st cooling 곡선은 대략 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에서 결정화가 시작되고 $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에서 끝났고 대략적으로 $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 가 결정화 온도(T_c : crystalline temperature)임을 확인하였다. heating과 cooling이 반복되면서 그래프의 피크가 넓어지거나 가라앉는 변화를 보여주기도 한다. 대략 $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 부근에서 1st heating 곡선보다 2nd heating 곡선이 평평하게 변하고 T_m 을 보여주는 피크들이 비교적 뾰족해진 것을 확인 할 수 있었다. 이는 1st heating에서 열 이력이 제거되어 나타나는 현상이라고 생각된다. 그리고 PEG-400과 poloxamer 407의 함량 변화에 상관없이 일상적인 온도에서 상변화가 일어나지 않고 안정하다는 것을 확인할 수 있었다(Figure 21-23).

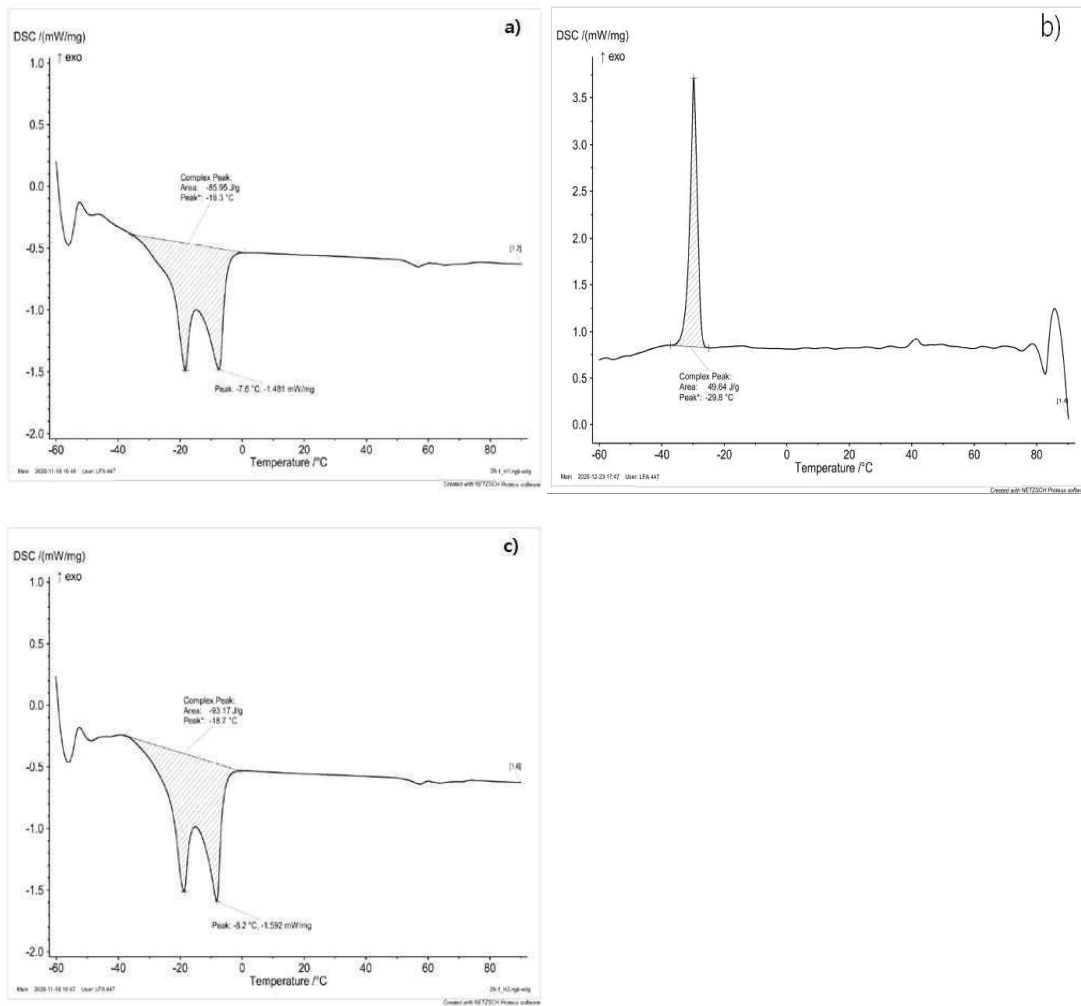


Figure 21. #28-1 DSC analysis result. a) 1st heating, b) 1st cooling, c) 2nd heating

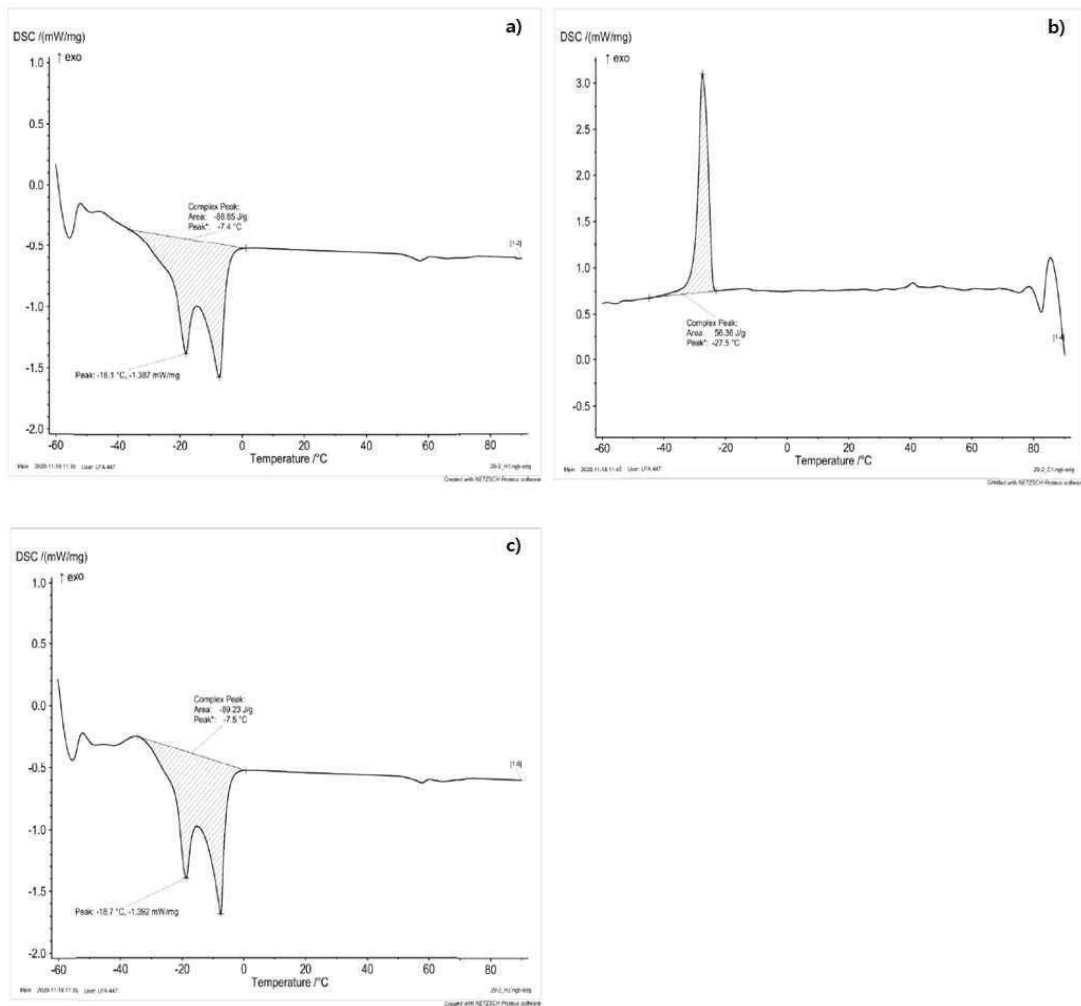


Figure 22. #28-3 DSC analysis result. a) 1st heating, b) 1st cooling, c) 2nd heating

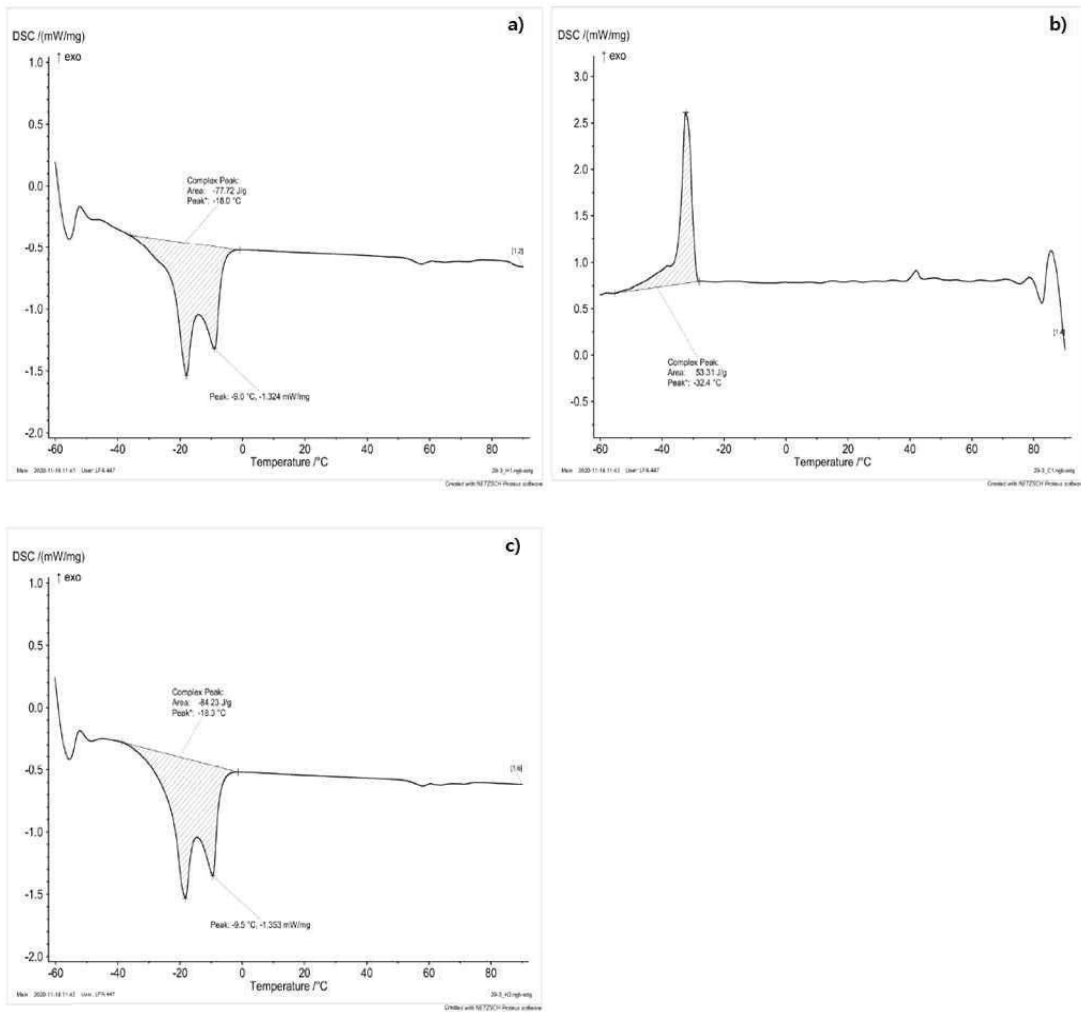


Figure 23. #28-13 DSC analysis result. a) 1st heating, b) 1st cooling, c) 2nd heating

7. 점탄성 측정

세라마이드를 함유한 PLO gel의 성상을 명확히 알아보기 위해 점탄성 분석을 진행하였다. 온도는 5 °C, 25 °C, 40 °C 로 각각 고정하고 frequency를 0.1 ~ 100 Hz의 범위로 변화를 주어 점탄성 거동을 분석하였다.

#28-1 제형은 25 °C와 40 °C 그래프에서는 frequency 변화에 상관없이 저장탄성률(G')이 손실탄성률(G'')보다 큰 값을 가지고 있고, $\tan \delta$ 의 그래프가 겔에서 나타나는 특징을 보여주기 때문에 겔상을 유지한다는 것을 확인하였다. 그리고 5 °C 그래프에서 frequency가 증가함에 따라 10 Hz 이상에서 저장탄성률이 증가하였다. 하지만 10 Hz 이하에서는 손실탄성률이 낮은 값을 보여주고 있기 때문에 #28-1 제형은 5 °C에서 겔상을 유지 못하는 현상을 설명할 수 있다(Figure 24). poloxamer 407과 PEG-400의 함량이 낮은 #28-3 제형은 25 °C, 40 °C에서 #28-1 제형과 비슷한 그래프를 보여주었고, 5 °C 그래프에서는 frequency 변화에 상관없이 손실탄성률이 저장탄성률보다 높은 값을 가지고 있는 것을 확인하였다(Figure 25). 이를 통해 poloxamer 407과 PEG-400, 두 성분의 함량이 낮아지면 겔상을 유지하지 못하고 흐름성이 생겨 분리되는 것을 알 수 있었다. #28-13 제형은 #28-3 제형과 반대로 두 성분의 함량이 높기 때문에 5 °C, 25 °C, 40 °C 모든 그래프에서 겔상을 안정하게 유지하는 것을 보여주었다(Figure 26).

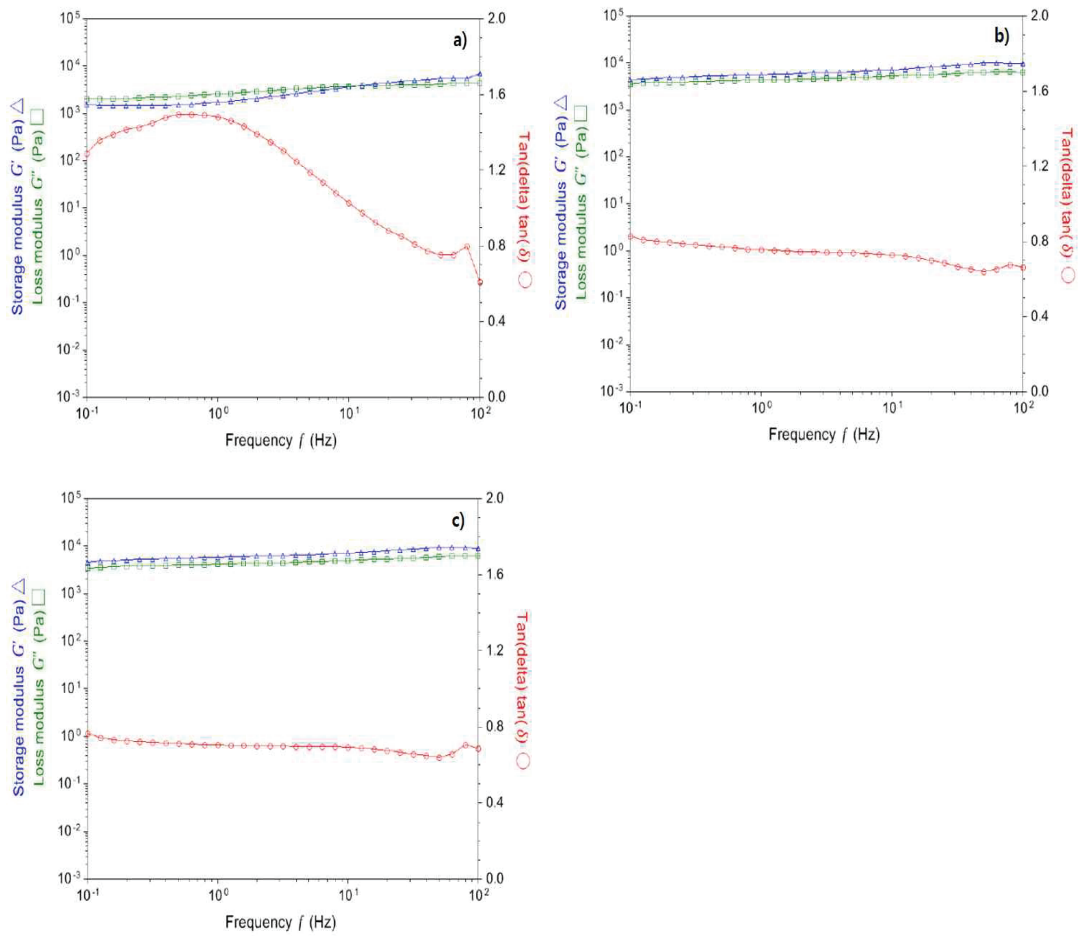


Figure 24. #28-1 rheology analysis result. a) 5 °C, b) 25 °C, c) 40 °C

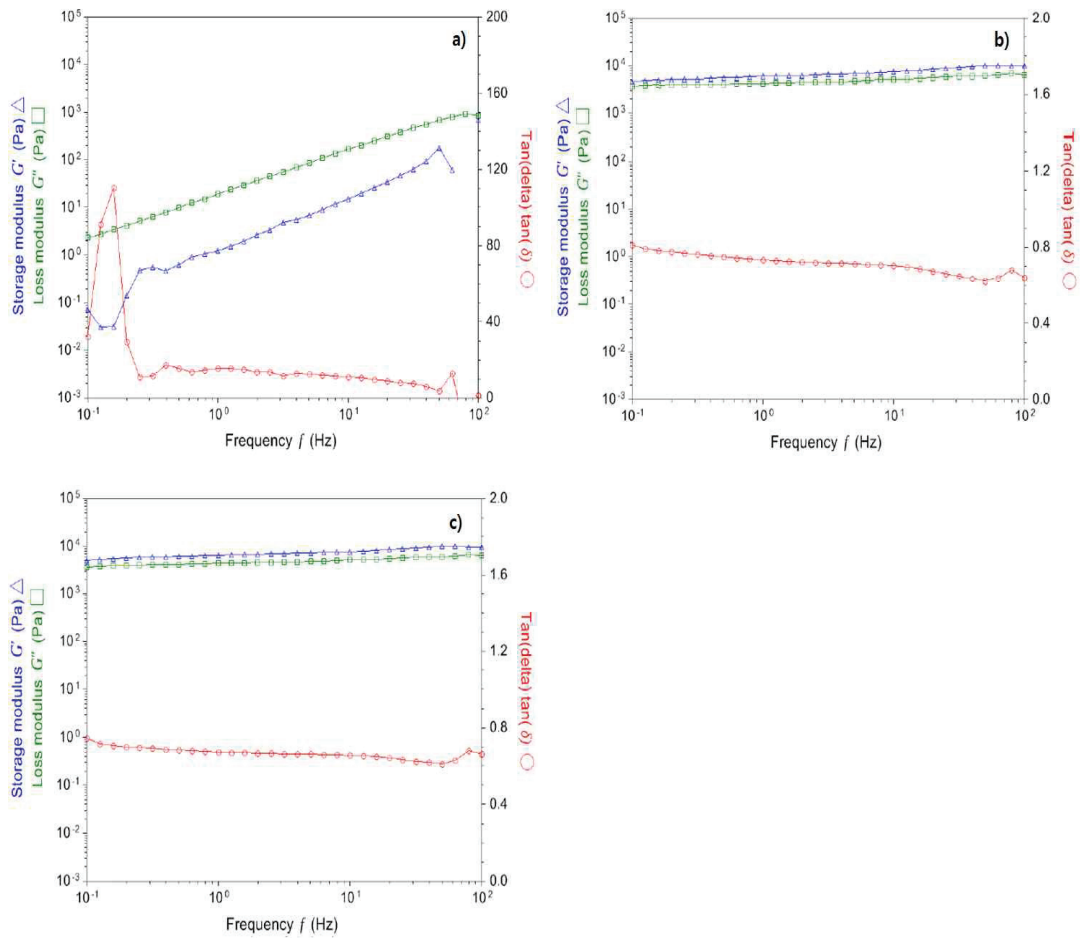


Figure 25. #28-3 rheology analysis result. a) 5 °C, b) 25 °C, c) 40 °C

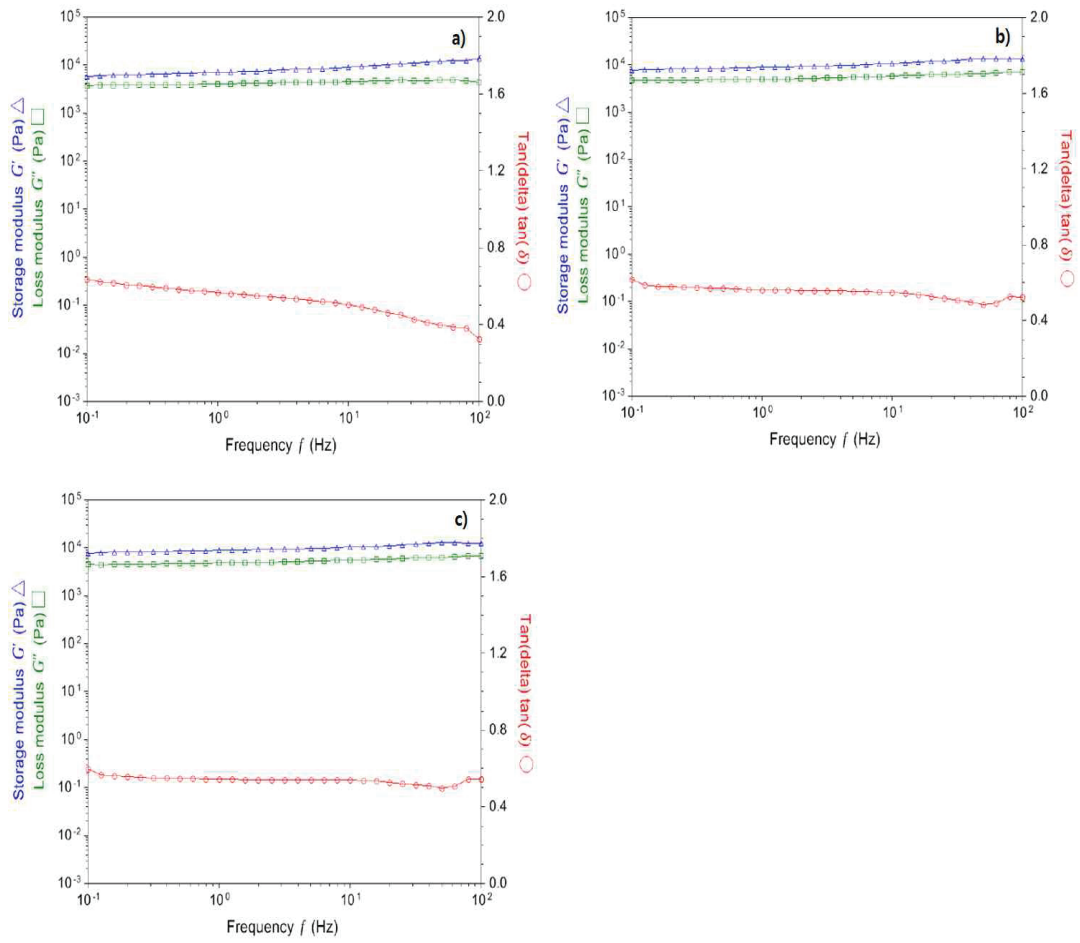


Figure 26. #28-13 rheology analysis result. a) 5 °C, b) 25 °C, c) 40 °C

IV. 요약 및 결론

본 연구에서는 세포간지질의 주성분인 세라마이드를 PLO gel에 첨가하였다. 세라마이드가 함유된 세포간지질은 외부로부터 발생하는 이물질 또는 물리적인 자극들을 차단하고, 피부 내의 수분이 증발하는 것을 막아주는 피부의 주기능인 피부장벽의 역할을 한다. 세포간지질에 50% 이상 존재하는 세라마이드가 감소하면 피부장벽은 기능을 상실하여 피부 내외적으로 손실을 주어 노화, 주름 또는 아토피를 발생시킬 수 있다. 반대로, 세라마이드가 증가한다면 피부장벽의 기능을 회복시켜 피부의 탄력과 수분이 유지될 수 있다. 하지만 세라마이드는 난용성 물질이기 때문에 피부로의 직접적인 적용에 있어 불리하기 때문에 경피 약물 전달 시스템으로 꾸준히 관심을 받고 있는 PLO gel에 첨가하였다. PLO gel은 양친매성 계면활성제로 잘 알려진 공중합체인 poloxamer 407과 피부연화제로도 사용되는 계면활성제인 레시틴을 함께 사용하여 경피에서의 약물이나 수분의 흡수율을 증가시킨 경피 약물 전달 시스템이다.

세라마이드를 PLO gel에 첨가하기 전, 세라마이드가 용해되는 오일을 선정하기 위해 6 가지의 오일을 선택해 실험을 진행하였고 Meadowfoam Seed Oil에서 안정적으로 용해된 것을 확인하였다. 선정된 오일과 세라마이드를 첨가하여 PLO gel을 제조하였을 때 물성변화와 안정성을 확인하였고, 편광현미경을 통해 형성된 입자들을 관찰하였다. 바뀐 오일과 세라마이드가 첨가되었음에도 2 주차 전후까지 안정한 것을 확인하였지만 레시틴의 함량이 높아질수록 변색이 빠르게 진행된다는 것을 알 수 있었다. 그리고 냉온에서 안정성은 괜찮았지만 겔상을 유지하지 못하는 것을 확인하였다. 편광현미경 관찰 결과, PLO gel 내에 액정이 형성된 것을 확인하였다. 이는 세라마이드와 레시틴의 함량이 증가할수록 호전되었다. 세라마이드와 레시틴의 함량이 액정 형성에 영향을 주는 것을 확인하기 위해 실험을 진행하였고, 두 성분의 전체적인 함량이 증가할수록 액정을 많이 형성하였지만 형성된 액정의 크기가 크고 불안정하였다. 결과적으로, 두 성분의 함량비가 동률일 때 액정의 크기와 형태가 가장 안정하였다. 마지막으로, PLO gel의 냉온에서의 성상에 대한 안정성을 확인하였다. poloxamer 407과 PEG-400의 함량이 감소함에 따라 냉온에서 겔상을 유지하지 못했고, 더 나아가 흐름성이 생

기고 상이 분리되었다. 반대로 함량이 증가함에 따라 냉온에서 겔상이 더욱 쉽게 유지되는 것을 확인하였다. 상분리가 된 제형들을 제외한 다른 제형들 내에 형성된 액정은 시간과 온도 변화와는 무관하게 안정적이었다.

세라마이드를 함유하지 않은 PLO gel과 세라마이드를 함유한 PLO gel의 구조적, 물성적 차이점을 알아보기 위해 SAXS / WAXS, DSC, 점탄성 분석을 진행하였다. SAXS 그래프에서 각각의 피크의 비를 해석하였을 때, 세라마이드를 함유하지 않은 PLO gel은 헥사고날 구조를, 세라마이드를 함유한 PLO gel은 라멜라 구조를 형성하고 있었다. WAXS 그래프에서는 형성된 구조들의 지질의 배열을 보여주었고, 세라마이드를 함유하지 않거나, 함유한 PLO gel 둘 다 지질들의 배열이 촘촘한 사방정계 배열을 가지고 있는 것을 확인하였다. DSC 분석을 통해 세라마이드를 함유한 PLO gel이 일상적인 온도에서 상변화 없이 안정하다는 것을 확인하였고, 점탄성 분석을 통해 5 °C, 25 °C, 40 °C 각각에서 겔상을 유지하는 안정성 높은 제형을 알 수 있었다.

본 연구를 통해 세라마이드를 함유한 PLO gel은 촘촘한 사방정계 배열을 갖는 지질들이 라멜라 구조를 형성하고, 이를 편광현미경을 통해 액정이 형성되는 것을 확인할 수 있었다. 세라마이드를 함유한 PLO gel이 보여주는 라멜라 구조와 액정은 피부장벽 역할을 하는 각질층의 세포간지질에서 나타나는 특징적인 구조와 형태이기 때문에 PLO gel 제형을 통해 경피에 적용이 되었을 때, 피부와 피부장벽의 기능에 긍정적인 효과를 기대할 수 있을 것이라고 생각된다.

V. 참고문헌

- 1) D. Groen, Ph. D. Dissertation, Leiden Univ., South Holland, Netherlands (2011).
- 2) Korea Patent 10-2016-0016051 (2016).
- 3) S. H. Lee, S. K. Jeong, and S. K. Ahn, An update of the defensive barrier function of skin, *Yonsei Med J.*, **47**(3), 293-306 (2006).
- 4) M. S. Kwon, T. B. Choi, and G. Y. Kim, The effect on the skin barrier function of ceramide, *Kor J Aesthet Cosmetol*, **3**(1), 131-137 (2005).
- 5) L. Cui, Y. Jia, Z. W. Cheng, Y. Gao, G. L. Zhang, J. Y. Li, and C. F. He, Advancements in the maintenance of skin barrier/skin lipid composition and the involvement of metabolic enzymes, *J Cosmet Dermatol*, **15**(4) 549-558 (2016).
- 6) K. Y. Jeong and D. K. Lee, Influence of ceramide III on the structure of a phospholipid lamellar liquid crystalline phase hydrated in glycerin : structural and thermal behaviors, *Int J Chem Eng Appl*, **21**(6), 603-609 (2010).
- 7) H. J. Cha, C. He, H. Zhao, Y. Dong, I. S. An, and S. An, Intercellular and intracellular functions of ceramides and their metabolites in skin (review), *Int J Mol Med*, **38**(1), 16-22 (2016).

- 8) J. V. Smeden and J. A. Bouwstra, Stratum corneum lipids: their role for the skin barrier function in healthy subjects and atopic dermatitis patients, *Curr Probl Dermatol*, **49**, 8–26 (2016).
- 9) J. A. Bouwstra, G. S. Gooris, J. A. van der Spek, and W. Bras, Structural investigations of human stratum corneum by small-angle x-ray scattering, *J Invest Dermatol*, **97**(6), 1005–12 (1991).
- 10) C. Gorzelanny, C. Mess, S. W. Schneider, V. Huck, and J. M. Brandner, Skin barriers in dermal drug delivery: which barriers have to be overcome and how can we measure them?, *Pharmaceutics*, **12**(7), 684 (2020).
- 11) K. Tashiro, H. Yamamoto, K. Funaki, and J. Hu, Synchrotron microbeam x-ray scattering study of the crystallite orientation in the spherulites of isotactic poly(butene-1) crystallized isothermally at different temperatures, *Polym J*, **51**, 143–153 (2019).
- 12) M. R. Krebs, C. E. Macphee, A. F. Miller, I. E. Dunlop, C. M. Dobson, and A. M. Donald, The formation of spherulites by amyloid fibrils of bovine insulin, *Proc Natl Acad Sci USA*, **101**(40), 14420–14424 (2004).
- 13) L. Cui, Y. Jia, Z. W. Cheng, Y. Gao, G. L. Zhang, J. Y. Li, and C. F. He, Advancements in the maintenance of skin barrier/skin lipid composition and the involvement of metabolic enzymes, *J Cosmet Dermatol*, **15**(4), 549–558 (2016).
- 14) Y. Masukawa, H. Narita, H. Sato, A. Naoe, N. Kondo, Y. Sugai, T.

Oba, R. Homma, J. Ishikawa, Y. Takagi, and T. Kitahara, Comprehensive quantification of ceramide species in human stratum corneum, *J Lipid Res*, **50**(8) 1708–1719 (2009).

15) H. H. Jang and N. L. Sung, Epidermal skin barrier, *Asian J Beauty Cosmetol.*, **14**(3), 339–347 (2016).

16) S. Motta, M. Monti, S. Sesana, L. Mellesi, R. Ghidoni, and R. Caputo, Abnormality of water barrier function in psoriasis Role of ceramide fractions, *Arch Dermatol.*, **130**(4) 452–456 (1994).

17) J. F. Coelho, P. C. Ferreira, P. Alves, R. Cordeiro, A. C. Fonseca, J. R. Góis, and M. H. Gil, Drug delivery systems: advanced technologies potentially applicable in personalized treatments, *EPMA J.*, **1**(1) 164–209 (2010).

18) V. S. Belgamwar, M. S. Pandey, D. S. Chauk, and S. J. Surana, Pluronic lecithin organogel, *Asian J. Pharm.*, **2**(3), 134–138 (2008).

19) S. Saha, S. R. Shivarajakumar, and V. V. S. R. Karri, Pluronic lecithin organogels: an effective topical and transdermal drug delivery system, *IJPSR*, **9**(11), 4540–4550 (2018).

20) S. Raut, S. S. Bhadoriya, V. Uplanchiwar, V. Mishra, A. Gahane, and S. K. Jain, Lecithin organogel: a unique micellar system for the delivery of bioactive agents in the treatment of skin aging, *Acta Pharm Sin B*, **2**(1), 8–15 (2012).

21) L. C. Fuhrman, Jr. Ansel's pharmaceutical dosage forms and drug

delivery systems, 8th Edition, *Am J Pharm Educ*, **70**(3), 71 (2006).

22) N. H. Hoang, C. Lim, T. Sim, and K. T. Oh, Triblock copolymers for nano-sized drug delivery systems, *J Pharm Investig*, **47**, 27–35 (2017).

23) A. Fakhari, M. Corcoran, and A. Schwarz, Thermogelling properties of purified poloxamer 407, *Heliyon*, **3**(8), e00390 (2017).

24) E. Giuliano, D. Paolino, M. Fresta, and D. Cosco, Mucosal applications of poloxamer 407-based hydrogels: an overview, *Pharmaceutics*, **10**, 159 (2018).

25) S. Braun, Encapsulation of cells (cellular delivery) using sol-gel systems, *Elsevier Ltd.*, **4**, 529–543 (2011).

26) H. Almeida, M. H. Amaral, P. Lobao, and M. S. Lobo, Pluronic F-127 and pluronic lecithin organogel (PLO): main feature and their application in topical and transdermal administration of drugs, *J Pharm Pharm Sci.*, **15**(4), 592–605 (2012).

27) E. Russo and C. Villa, Poloxamer hydrogels for biomedical applications, *Pharmaceutics*, **11**(12), 671 (2019).

28) Y. Qiu, S. K. Hamilton, and J. Temenoff, Improving mechanical properties of injectable polymers and composites, *Woodhead Publ Ser Biomater*, **4**, 61–91 (2011).

29) M. L. Bruschi, F. B. Borghi-Pangoni, M. V. Junqueira, and S. B. de Souza Ferreira, Nanostructures for novel therapy, D. Ficai, A.

Grumezescu, **1**, 313–342, *Elsevier Inc.*, Amsterdam, Netherlands (2017).

30) S. Chatterjee, P. C. Hui, C. Kan, and W. Wang, Dual-responsive (pH/temperature) pluronic F-127 hydrogel drug delivery system for textile-based transdermal therapy, *Sci Rep.*, **9**, 11658 (2019).

31) D. L. Price and F. Fernandez-Alonso, Experimental methods in the physical Sciences, M. Shibayama, **49**, 459–546, *Elsevier Inc.*, Amsterdam, Netherlands (2017).

32) M. V. Bentley, J. M. Marchetti, N. Ricardo, Z. Ali-Abi, and J. H. Collett, Influence of lecithin on some physical chemical properties of poloxamer gels: rheological, microscopic and in vitro permeation studies, *Int J Pharm*, **193**(1), 49–55 (1999).

33) S. H. Park, S. J. Kim, M. J. Noh, J. B. Lee, and S. N. Park, Structure analysis of liquid crystal emulsions using x-ray scattering analysis, *J. Cosmet. Sci. Korea*, **42**(3), 297–302 (2016).

34) S. Y. Hong, Y. J. Chang, J. B. Lee, C. H. Park, and M. S. Park, Study on stability of ceramides in liquid crystalline emulsions at high temperature, *J. Cosmet. Sci. Korea*, **45**(1), 1–7 (2019).

35) H. J. Kim and H. J. Ahn, The structure analysis for polymers via the small angle x-ray scattering beamline at PLS-II, *Polym. Sci. Tech.*, **29**(5), 442 (2018).

36) W. Wagermaier, A. Gourrier and B. Aichmayer, Understanding hierarchy and functions of bone using scanning x-ray scattering

methods, P. Fratzl, J. W. Dunlop, and R. Weinkamer, 1, 46, RSC publishing, Cambridge, United Kingdom (2013).

감사의 글

학·석사 통합과정을 통해 대학원에 입학하고 1년 6개월이 지났습니다. 남들에 비해 짧은 기간이지만 논문을 작성하기까지 공부와 실험뿐만 아니라 주변의 많은 분들께 도움을 받은 것이 더 큰 힘이 되었던 것 같습니다. 이 자리를 통해 감사의 인사를 드리고자 합니다.

우선, 학부생 때부터 대학원생까지 언제나 열정을 가지시고 하나라도 더 가르쳐주시려고 노력해주시는 화학과 강창희 교수님, 김덕수 교수님, 김원형 교수님, 이남호 교수님, 현창구 교수님, 임희정 교수님, 배세원 교수님 그리고 부족한 저의 지도교수님께서 써 조언을 아끼지 않으셨던 윤경섭 교수님께 진심을 담아 감사의 인사를 올립니다.

그리고 제가 실험실에 들어왔을 때 반겨주고 많은 것들을 알려주었던 성준이형과 미선누나, 제가 흔들릴 때 마다 붙잡아주던 상덕이형, 동갑이라서 많이 장난쳤던 희주, 조용하지만 할 일 꼭 부러지게 하는 유연이, 열정 넘치는 뜨거운 심장을 갖고 있는 통일이형, 새로 들어와서 천천히 적응 중인 동혁이형, 여러모로 많은 조언을 주고 큰 힘이 되어주셨던 화학과 조교쌤으로 계시는 준오형과 하나쌤께 힘들기도 했지만 덕분에 즐거웠다는 감사의 말씀 드립니다. 마지막으로 뒤에서 묵묵히 지켜봐주고 꾸준히 힘내라고 응원해준 엄마와 동생, 우리 가족들이 있어서 무사히 맞힐 수 있었다고 생각합니다. 사랑하고 감사하다는 말씀 드립니다.

앞으로 다양하고 많은 일들을 겪게 되겠지만 많은 분들이 주신 도움과 조언을 기억하며 당당하게 설 수 있는 사람이 될 수 있도록 할 것입니다.

감사합니다.

2021년 2월

허민근 올림