



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

미녹시딜과 코펙실 성분을
함유하는 니오솜 제형의
물성 및 경피흡수 연구

濟州大學校 大學院

化 學 科

金 保 垆

2023年 02月



미녹시딜과 코펙실 성분을
함유하는 니오솜 제형의
물성 및 경피흡수 연구

指導教授 尹 景 燮

金 保 垞

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함
2022年 12月

金保垞의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長

金原亨



委 員

李南昊



委 員

尹景燮



濟州大學校 大學院

2022年 12月



Physical Properties and Percutaneous
Absorption of Niosome Formulations Containing
Minoxidil and Kopexil

Bo-Kyung Kim
(Supervised by professor Kyung-Sup Yoon)

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

2022. 12.

This thesis has been examined and approved.

Woo Hyung Kim

Nam Ho Lee

Kyung-Sup Yoon

Date

Department of Chemistry
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

목차

List of Tables	iii
List of Figures	iv
Abstract	vi
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	9
2.1. 시약	9
2.2. 활성물질 베이스 제조	10
2.3. 니오솜 제조	11
2.3.1. 미녹시딜 함유 나노니오솜 제조	11
2.3.2. Potassium Cetyl Phosphate 및 Propylene Glycol 함량에 따른 미녹시딜 함 유 나노니오솜 제조	14
2.3.3. 코펙실 함유 나노니오솜 제조	14
2.3.4. 대조군 제조	14
2.4. 니오솜 물리적 특성(안정성) 평가	17
2.4.1. 입자크기, 다분산도 및 제타전위 측정	17
2.4.2. 현미경 관찰	18
2.4.3. 휘발잔분 측정	18
2.4.4. 활성물질 열 중량 측정	19
2.4.5. 활성물질 시차주사열량 측정	19
2.5. Franz diffusion cell을 이용한 <i>in vitro</i> 경피흡수 실험	20
2.6. 니오솜 캡슐효율 측정	23
2.7. 니오솜 약물 방출	24
2.8. 나노니오솜 형상관찰(TEM)	25
2.9. 통계적 검증	25

III. 결과 및 고찰	26
3.1. 제형 안정성 평가	26
3.1.1. 입자크기, 다분산도 및 제타전위 측정	26
1) 계면활성제 HLB 변화에 따른 미녹시딜 함유 나노니오솜 안정성 평가(나노니 오솜 MN #2)	26
2) Potassium cetyl phosphate 및 Propylene glycol 함량에 따른 미녹시딜 나노 니오솜 안정성 평가(나노니오솜 MN #3)	32
3) 코펙실 함유 나노니오솜 안정성 평가(나노니오솜 KN #4)	38
3.1.2. 미녹시딜 함유 나노니오솜 현미경 관찰 결과	42
3.1.3. 휘발잔분 측정	45
3.1.4. 열 중량 분석 측정	46
3.1.5. 활성물질 시차주사열량 측정	48
3.2. 나노니오솜의 <i>in vitro</i> 경피 흡수율	50
3.3. 약물 캡슐효율 측정	54
3.4. 약물 방출 측정	55
3.5. 나노니오솜 형상 관찰	58
IV. 요약 및 결론	61
V. 참고문헌	63

List of Tables

Table 1. Feature of drugs	8
Table 2. Preparation of active substance base using propylene glycol	10
Table 3. Preparation of MN #2 according to HLB	13
Table 4. Preparation of MN #3 with no addition of potassium cetyl phosphate and change in propylene glycol content	15
Table 5. Preparation of KN #4 nano-niosome	16
Table 6. Preparation of control by gel formulation (non niosome)	16
Table 7. Minoxidil and Kopexil simultaneous analysis HPLC method	22
Table 8. Appearance, Particle size, PDI, Zeta potential of MN #2 at 25°C for a day	28
Table 9. Appearance, Particle size, PDI, Zeta potential of MN #3 at 25°C for a day	34
Table 10. Appearance, Particle size, PDI, Zeta potential of KN #4 at 25°C for a day	39
Table 11. Volatile residue amount of MN #2 and MN #3	45
Table 12. Percutaneous penetration efficiency ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) of MN #3-7, MG #5-1	51
Table 13. Percutaneous penetration efficiency ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) of KN #4-1, KG #5-2	51
Table 14. Encapsulation efficiency (%) of MN #3-7, KN #4-1	54
Table 15. Drug release (%) of MN #3-7 and MG #5-1 by dialysis membrane method	56
Table 16. Drug release (%) of KN #4-1 and KG #5-2 by dialysis membrane method	56

List of Figures

Figure 1. Stratum corneum structure	4
Figure 2. Various drug delivery systems	4
Figure 3. Niosome structure	5
Figure 4. Vesicle classification based on size and lamellarity	5
Figure 5. Chemical structure A: Minoxidil and B: Kopexil	8
Figure 6. Preparation of nano-niosome by high pressure homogenization method	12
Figure 7. DLS and Zeta potential analysis principle	17
Figure 8. Microscope	18
Figure 9. Franz diffusion cell system and Strat-M membrane	21
Figure 10. Franz diffusion cell system method preparation	21
Figure 11. HLB change over time at 25°C MN #2 Particle size	29
Figure 12. HLB change over time at 25°C MN #2 PDI	29
Figure 13. HLB change over time at 25°C MN #2 Zeta potential	30
Figure 14. Appearance of MN #2 at 25°C after A: a day, B: 1 month, C: 2 month, D: 3 month	31
Figure 15. Evaluation of the stability of MN #3 Particle size at 25 °C with or without Potassium cetyl phosphate that changed HLB	35
Figure 16. Evaluation of the stability of MN #3 PDI at 25 °C with or without Potassium cetyl phosphate that changed HLB	35
Figure 17. Evaluation of the stability of MN #3 Zeta potential at 25 °C with or without Potassium cetyl phosphate that changed HLB	36
Figure 18. Appearance of MN #3 at 25°C after A: a day, B: 1 month, C: 2 month, D: 3 month	37
Figure 19. Particle size KN #4 at 25°C over time	40
Figure 20. PDI KN #4 at 25°C over time	40
Figure 21. Zeta potential KN #4 at 25°C over time	40

Figure 22. Appearance of KN #4 at 25°C after A: a day, B: 1 month, C: 2 month, D: 3 month	41
Figure 23. Microscopy images of MN#2 HLB changes at 25 °C. A: nano-niosome without minoxidil in HLB 4.7, B: HLB 4.7, C: HLB 6.4, D: HLB 8.1, E: HLB 9.8, F: HLB 11.5, G: HLB 13.2, H: HLB 14.9	43
Figure 24. Microscopy images of MN#3 with or without potassium cetyl phosphate accoding to HLB at 25 °C. A, E: HLB 4.7, B, F: HLB 8.1, C, G: HLB 11.5, D, H: HLB 14.9 (A, B, C, D: Addition of potassium cetyl phosphate), (E, F, G, H: No added potassium cetyl phosphate)	44
Figure 25. Minoxidil TGA measurement	47
Figure 26. Nano-niosome TGA measurement	47
Figure 27. Thermal properties of minoxidil, (A): Nano-niosome, (B): Minoxidil nano-niosome, (C): Minoxidil	49
Figure 28. Thermal properties of kopexil, (A): Nano-niosome, (B): Kopexil nano-niosome, (C): Kopexil	49
Figure 29. Percutaneous absorption efficiency ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) of MN #3-7, MG #5-1 at 37°C±1	52
Figure 30. Percutaneous absorption efficiency ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) of KN #4-1, KG #5-2 at 37°C±1	52
Figure 31. Percutaneous absorption efficiency ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) of MN #3-7, KN #4-1 at 37°C±1	53
Figure 32. Drug release of MN #3-7 and MN #5-1 at 37°C±1 by dialysis membrane method for 48 h	57
Figure 33. Drug release of KN #4-1 and KN #5-2 at 37°C±1 by dialysis membrane method for 48 h	57
Figure 34. Cryo-TEM images of MN #3-1(HLB 4.7)	59
Figure 35. Cryo-TEM images of MN #3-4(HLB 14.9)	60

Abstract

Physical Properties and Percutaneous Absorption of Niosome Formulation Containing Minoxidil and Kopexil

Various drug delivery systems are being studied for effective drug delivery of active substances in the pharmaceutical and cosmetic industries. Among them, a niosome formulation was used, and minoxidil, a drug known as a hair loss treatment, and kopexil, a cosmetic raw material, a hair loss reliever, were used as drugs. Each drug was encapsulated in a niosome formulation to study physical properties and stability evaluation, and it was confirmed that there was a difference in stability depending on the surfactant HLB. The percutaneous absorption rate was compared for the control group of the niosome formulation and the gel formulation, and the minoxidil and kopexil nano-niosome showed 3 to 11 times higher percutaneous absorption rate than the control group of the gel formulation. In addition, the percutaneous absorption rate for 24 h was compared for minoxidil nano-niosome and kopexil nano-niosome, and it was confirmed that $253.78 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ was higher in the kopexil nano-niosome. Encapsulation efficiency was measured at $28.96 \pm 0.12\%$ for minoxidil nano-niosome and $30.50 \pm 0.08\%$ for kopexil nano-niosome, and as a result of drug release, less drug release was seen in the nano-niosome formulation than in the control gel formulation. Additionally, Cryo-TEM, TGA, and DSC analyzes were performed, and based on these studies, it was shown that the niosome formulation is suitable for trapping drugs and is good as a drug delivery system when used as pharmaceutical and cosmetic formulations.

I. 서론

화장품은 피부를 보호하는 것은 물론 인체를 청결, 미화하여 매력을 더하고 용모를 밝게 변화시키는 역할을 한다. 과거에 비해 외모에 대한 관심이 급격히 증가되면서 현대사회에 없어서는 안 될 아이템 중 하나이다. 좀 더 나아가 요즘은 미백, 주름개선, 자외선 차단, 탈모 완화 등과 같은 피부개선에 도움을 줄 수 있는 기능성 화장품에 대한 관심이 증대되고 있다[1]. 이는, 개개인 마다 가지고 있는 피부에 대한 고민을 해결하기 위해서이다. 그러나 기능성 화장품의 유효성분은 피부 각질층의 각질세포로 인해 쉽게 흡수되지 못한다는 점이 있다(Figure 1). 이를 개선하기 위해서는 나노기술을 이용하여 화장품을 효과적인 약물전달체로 이용하는 것이다. 나노기술로써 이용된 약물전달시스템(Drug Delivery System; DDS)은 1970년대부터 시작하여 지금까지도 활발히 연구되고 있다[2]. 일반적으로 리포솜(Liposome)[3], 에토솜(Ethosome)[4], 트랜스퍼솜(Transfersome), 니오솜(Niosome), 폴리머솜(Polymersome), 마이셀(Micelle)[5] 등과 같은 다양한 약물전달체가 있다(Figure 2). 이러한 나노물질은 물리적 안정성이 높고, 입자 크기가 피부의 세포보다 매우 작기 때문에 활성물질을 피부 깊숙이 침투할 수 있으며 표적작용도 동시에 이루어지고 있다[6,7]. 따라서 향상된 활성물질의 피부 흡수를 기대할 수 있다.

먼저, 약물전달체의 일종으로 가장 일반적인 리포솜은 표피층을 통과할 수 있는 소포 중 하나로써 세포의 원형질막과 유사한 특징이 있어 피부에 안전하여 화장품 및 제약 산업에서 많이 사용되어지고 있는 약물전달시스템이다[8,9]. 또한 리포솜은 인지질로 구성되어 있어 우수한 생분해성과 세포 친화성을 가지고 있다[10]. 리포솜은 친수성 부분과 소수성의 이중층으로 구성되어있는 구형의 전달체이며 친수성 약물(활성물질)은 수상 코어에, 소수성 약물(활성물질)은 이중층에 가둘 수 있다. 마찬가지로 니오솜 또한 친수성과 소수성 약물(활성물질)을 동시에 가둘 수 있는 능력이 유사하지만, 인지질로 이루어진 리포솜과는 달리 니오솜은 비이온 계면활성제로 이루어져 있으며 이 때문에 니오솜이라고 불려진다(Figure 3).

니오솜을 생산한 최초의 화장품 산업으로는 로레알(L'Oreal)이 있으며 1980년대 니오솜 제형의 첫 번째 제품은 랑콤(Lancome)에 도입되었다[11,12]. 이 후 비이온성 계면활성제의 낮은 독성으로 제약 분야에서도 많이 연구가 되어졌다. 표적 전달물질로서 혈액, 안구, 경피, 폐 및 경구 투여 경로에 적합하며[13] 다양한 약물, 천연물, 단백질, 효소, 유전자, 백신, 항암제 등을 니오솜에 도입할 수 있다고 전해진다[14].

니오솜은 비이온성 계면활성제의 자가 조립에 의해 형성되어지며 열역학적으로 안정적인 이중층 구조가 형성되기 위해 계면활성제와 콜레스테롤이 적절한 비율로 혼합되고 온도가 겔-액체 전이온도 이상일 때만 형성되어진다고 알려져 있다 [15,16].

니오솜에서 중요한 비이온 계면활성제는 친수성 그룹과 친유성 그룹(또는 극성 그룹과 비극성 그룹)을 모두 결합한 분자로 구성되며 친수성-친유성 균형을 HLB (Hydrophilic Lipophilic Balance)라고 한다[17]. HLB는 친수성, 친유성 반대 그룹의 크기와 강도 균형을 수치로 나타낼 수 있으며 0 ~ 20 범위를 가지고 있다. 따라서 친유성 계면활성제는 낮은 HLB 값을, 친수성 계면활성제는 높은 HLB 값을 가진다[18,19]. 니오솜의 소포 형성은 HLB 값에 따라 달라질 수 있다. 따라서 HLB가 제공됨으로서 소포체(Vesicle) 형성 능력에 대한 새로운 종류의 화합물을 평가 하는데 있어서 유용하다[20]. 친유성의 Sorbitan 계면활성제를 사용하면 4~8사이의 HLB 값으로, 소포 형성에 유리한 것으로 알려져 있으며[21] 친수성 계면활성제는 수용해도가 높아 소포를 형성할 수 없지만 응집되어 라멜라 구조를 형성하는 것으로 나타났다[22,23]. 따라서 결과적으로 니오솜은 HLB 값이 14~17인 계면활성제로는 소포가 형성되지 않지만 콜레스테롤을 첨가함으로써 소포 형성에 근본적인 역할을 한다[24]. 이렇게 비이온 계면활성제 HLB 값에 따라 니오솜을 제조할 수 있다.

니오솜 제조 시 막의 안정성을 높이기 위해 일반적으로 콜레스테롤을 사용하며 [25-27] 콜레스테롤은 소포에 강성을 부여한다고 알려져 있다. 또한, 전하 유도체인 Dicetyl phosphate, Potassium cetyl phosphate를 첨가하여 소포의 응집을 막아주어 정전기적 안정화를 부여할 수 있다[27,28]. 니오솜은 국소 제제에서 사용된 활성물질의 접촉 시간을 증가시킬 수 있으며[29] 무엇보다 비이온 계면활성제

소포에 대한 높은 안정성, 낮은 생산비용과 높은 생체 적합성 등의 장점을 가지고 있다[30,31]. 이로써 화장품 제형에 적용 가능한 니오솜은 생체 이용률을 향상시키고 표적 부위에 활성물질을 잘 전달함으로써 기능성, 의약품에 대한 치료 효과를 볼 수 있다[32,33]. 이에 따라 니오솜 제형을 산업화시키기 위해 안정성, 입자의 균일성, 약물의 캡슐효율 재현성 등을 보완해야하며 E. Mayhew 등은 고압 유화기를 이용함으로써 제형에 대한 작은 입자크기 제조방법을 보고하였다[34]. 또한 연속 흐름 미세 유체의 사용에 초점을 맞추어 재현 가능한 방식으로 좁은 입자크기 분포를 갖는 마이크로(micro) 또는 나노(nano) 크기의 제형 생산에 대한 보고가 있었다[35,36].

니오솜과 같은 소포는 소포체의 크기와 형태에 따라 크게 MLV (multilamella vesicle)와 ULV (unilamella vesicle)로 나눌 수 있으며 ULV에서 크기에 따라 SUV (small unilamella vesicle), LUV (large unilamella vesicle), GUV (giant unilamella vesicle)로 구분할 수 있다. 보통 SUV는 20 ~ 100 nm, LUV는 100 ~ 1,000 nm, GUV는 1000 nm 이상의 범위를 가지며 MLV는 500 ~ 1,000 nm 크기를 나타낸다(**Figure 4**) [37,38]. 이 외에도 다양한 크기와 형태에 따라 분류할 수 있으며, 소포체의 크기, 형태는 약물을 캡슐화 할 수 있는 정도, 약물을 보호할 수 있는 정도에 영향을 끼치므로 중요한 요소가 될 수 있다.

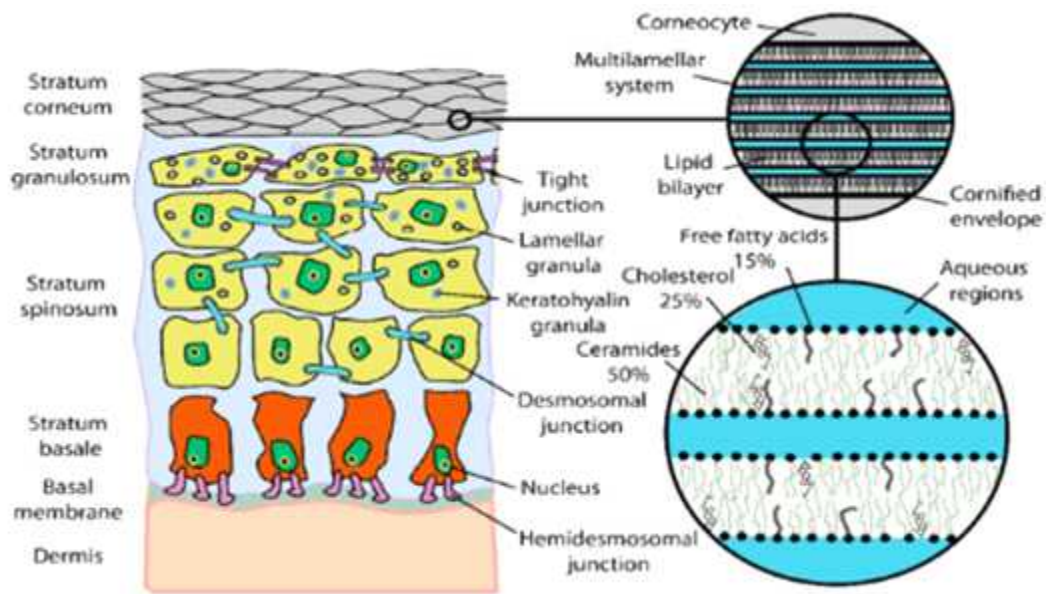


Figure 1. Stratum corneum structure

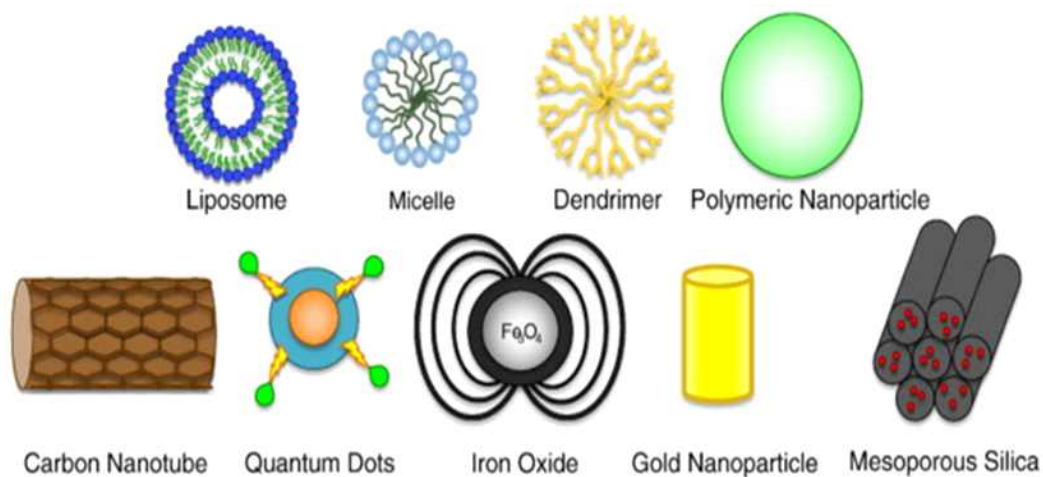


Figure 2. Various drug delivery systems [20]

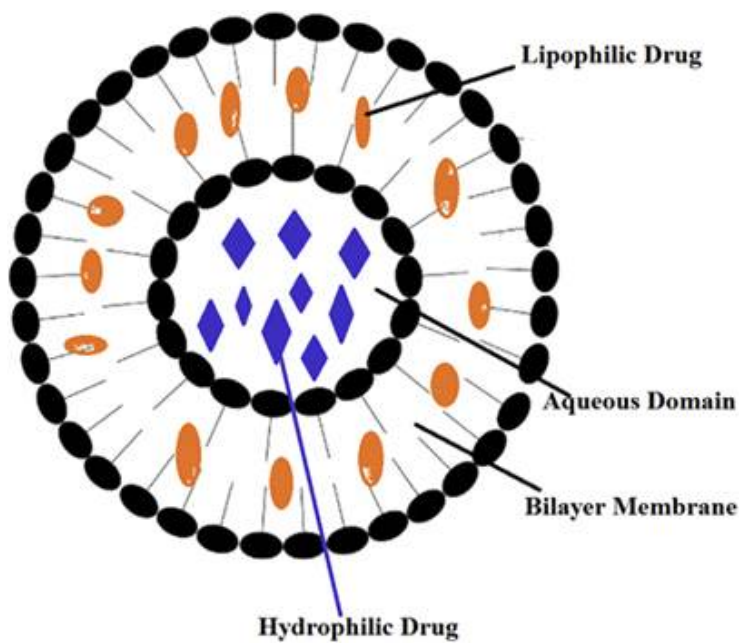


Figure 3. Niosome structure [11]

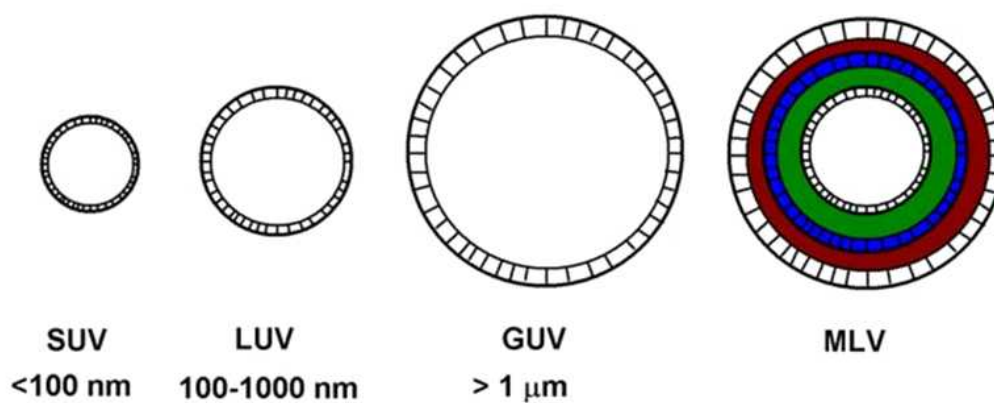


Figure 4. Vesicle classification based on size and lamellarity [38]

최근 들어 남녀노소 할 것 없이 피부 고민 중 가장 큰 고민은 탈모라고 생각한다. 탈모(Alopecia)는 정상적인 피부에서 비정상적으로 일시적 또는 영구적으로 모발이 빠지는 현상으로 요즘은 탈모를 현대병이라고 일컫는다[39]. 탈모의 원인은 다양하고 복잡하며 과학적으로 확실하게 규명되지 않았다고 한다. 크게는 외인성과 내인성으로 나눌 수 있으며 외인성으로는 기계적 원인(압력과 당김), 화학적 원인(염색, 펴), 자연적 원인(기온, 대기압) 등이 있고 내인성으로는 생리적인 요인, 호르몬과 유전, 과도한 스트레스 등으로 보고 있다[40]. 요즘에는 20-30대 탈모 환자들의 급증으로 탈모 고민을 해결하기 위해 탈모에 관한 치료제(의약품), 의약외품, 화장품 등이 활성화 되고 있다.

미녹시딜(Minoxidil)은 의약품으로서 1970년대에 고혈압 치료제로 먼저 도입되었지만 이를 복용한 사람들에게서 털이 많이 자라나는 다모증 증상을 보였다. 이러한 증상으로 인해 미녹시딜이 모발의 휴지기를 단축시켜 휴지기의 모낭을 성장기로 조기 진입시키는 원인이 되며 성장기의 연장을 유발, 모낭 크기를 증가시킨다는 연구가 밝혀졌다[41]. 따라서 미녹시딜은 남성, 여성의 탈모증 치료를 위한 국소 제형 개발로 이어졌다. 미녹시딜은 피리미딘 유도체로써 안드로겐성 탈모(Androgenetic alopecia; AGA)를 치료하기 위한 효능이 입증된 유일한 국소 치료법이다[42]. AGA는 유전성 탈모라고도 하며 이는 모발의 주기 중 성장기가 줄어들고 휴지기가 늘어나 생기는 탈모를 말한다. 국소 미녹시딜은 우수한 안전성을 가지고 있지만 효능 입증에 대한 낮은 통계를 보이고 있으며 또한 피부 침투력이 좋지 않아 모발 성장 치료에 강력한 활성물질로 유용하지 않다고 보고되었다[43,44]. 또한 일반적인 국소 미녹시딜 치료제는 용매로 에탄올을 활용하므로 피부를 건조하게 만들거나 가려움증과 같은 부작용도 종종 나타난다고 보고되었다[43,45].

코펙실(Kopexil)은 탈모치료제인 미녹시딜 유도체로서 콜라겐 생성을 저해하는 Lysyl hydroxylase (LH) 효소 생성을 막아 두피 콜라겐 생성을 촉진하는 기능을 가진 화장품 원료이다. 이는 샴푸에 가장 많이 쓰이며 얇아진 혈관이 확장되어 모낭에 직접적인 영양이 공급될 수 있도록 모발 재성장에 도움을 준다고 한다.

본 연구에서는 약물로서 미녹시딜과 코펙실을 사용하였으며 약물의 구조식은 **Figure 5**, 특징은 **Table 1**에 나타내었다. 의약품의 탈모 치료제인 미녹시딜의

낮은 피부 침투율과 부작용을 개선하기 위해, 또한 화장품 원료의 탈모 완화제인 코펙실의 경피 흡수를 확인하고자 약물전달시스템인 니오솜 제형을 이용하였다. 니오솜은 HLB 4.7인 Sorbitan stearate (Span 60)와 HLB 14.9인 Polysorbate 60 (Tween 60)을 사용하였으며 막의 견고함을 더해주기 위해 콜레스테롤을 첨가하여 제조되었다. 또한, 입자크기를 줄여 피부 흡수를 향상시키기 위해 고압유화 방법을 통해 미녹시딜 니오솜, 코펙실 니오솜을 나노사이즈로 제조하였다. 이 후, 제조된 미녹시딜, 코펙실 나노 니오솜의 물리적 특성인 입자크기, Polydispersity index (PDI), Zeta potential (ZP)를 측정하였으며, 겔 제형 대조군과의 경피 흡수율 비교, 미녹시딜과 코펙실 나노 니오솜의 경피 흡수율 비교, 약물 캡슐화, 약물 방출에 대한 연구를 진행하였다.

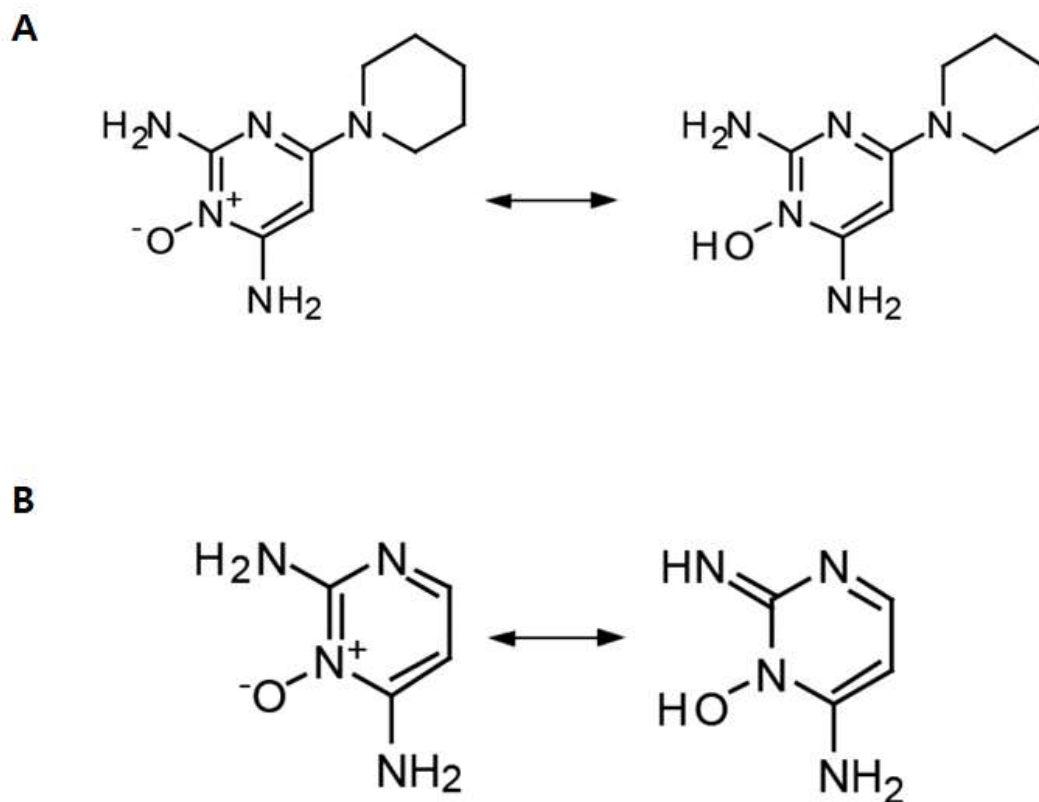


Figure 5. Chemical structure A: Minoxidil and B: Kopexil

Table 1. Feature of drugs

Drug	Minoxidil	Kopexil
Molecular weight	209.25 g/mol	126.12 g/mol
Formula weight	C ₉ H ₁₅ N ₅ O	C ₄ H ₆ N ₄ O
Activate effect	Hair loss treatment	Hair loss reliever
Appearance	White powder	White powder
Purity	98.0 %	99.3 %
Melting point	272-274 °C	210-218 °C
Solubility (mg/ml)	Propylene glycol: 75	Water: Slightly soluble

II. 재료 및 방법

2.1. 시약

니오솜 제조를 위해 사용된 비이온 계면활성제로는 Sorbitan stearate (Rheodol AS-10V, Kao, Japan), Polysorbate 60 (Rheodol TW-S120V, Kao, Japan)을 사용하였으며 소포 막(membrane)의 안정성을 위해 콜레스테롤(Cholesterol JP, Nippon Fine Chemical Co., LTD, Japan)을 사용하였다. 제형에 대한 응집을 감소시키기 위해 음이온 계면활성제인 Potassium cetyl phosphate (Amphisol-K, DSM, Netherlands)를 사용하였으며 폴리올로 프로필렌글라이콜(Propylene Glycol, SK Chemical, Korea), 오일은 마카다미아씨오일(Macadamia ternifolia Oil, Jan Dekker, Netherlands)을 사용하였다. 보존제로 Ethylhexylglycerin (Saskain 50, Sachem Corporate, USA), 정제수는 증류수 제조기(EXL1 Analysis, Vivagen, Korea)로 3차 증류수를 제조($<0.1 \mu\text{S}/\text{cm}$)하여 사용하였다. 코펙실(Kopexil, Jene chemicals, India)과 미녹시딜(Minoxidil, Daejung, Korea)은 순도 98% 이상의 HPLC 급을 사용하였다. 겔 제형의 대조군을 제조하기 위해 점증제인 Carbomer (HK-992, Hannong Chemical Inc, Korea), Xanthan Gum (Ketrol-F, C.P.kelco. USA)과 점증제를 중화시키는 역할로서 알지닌(L-Arginine, Ajinomoto, Japan)을 사용하였다. 추가적으로 헥산다이올(1,2-Hexanediol, Twin Coschem Co., LTD, Korea), Disodium EDTA (EDTA-2Na, Nagase ChemteX Corporation, Japan)을 사용하였다.

2.2. 활성물질 베이스 제조

Hot plate & Magnetic stirring (PA1180, LK Lab, Korea)을 이용하여 완전히 녹을 때 까지 가열한 후 5% 미녹시딜 베이스와 코팩실 베이스를 제조하였으며 용매로는 Propylene glycol을 사용하였다(**Table 2**). 이는 용해도 실험을 기반으로 제조되었다.

Table 2. Preparation of active substance base using propylene glycol

	Materials	MB #1-1	KB #1-2
Active substance base	Minoxidil	5.0	—
	Kopexil	—	5.0
	Propylene glycol	95.0	95.0

2.3. 니오솜 제조

2.3.1. 미녹시딜 함유 나노니오솜 제조

HLB 변화에 따른 미녹시딜 함유 니오솜을 제조하기 위해 Sorbitan stearate, Polysorbate 60, 콜레스테롤 구성인 계면활성제상(Surfactant phase)을 전상온도 이상으로 가열하여 용해시킨 후 75 ~ 80 °C로 유지하였다. 또한 Water, Ethylhexylglycerin, Potassium cetyl phosphate로 구성된 수상(Water phase), 프로필렌글라이콜과 **Table 2**의 미녹시딜 베이스로 구성된 폴리올상(Polyol phase), 마카다미아씨오일의 유상(Oil phase) 모두 75 ~ 80 °C로 유지하였다. 이후 계면활성제상에 수상을 서서히 첨가하면서 호모믹서(Homogenizing mixer Mark II Model 2.5, PRIMIX, Japan)로 3,500 ~ 4,000 rpm, 5 min 동안 유화시켰다. 다음 폴리올상을 첨가하면서 같은 조건으로 유화시켰으며 마찬가지로 유상도 같은 조건으로 유화시켜 니오솜을 제조하였다(**Table 3**). 제조된 니오솜을 탈포한 후 50 ~ 55 °C에서 고압유화기(Nanodisperser, NLM1000, Ilshin Autoclave, Korea)를 사용하여 압력 800 bar, 2 회의 통과 횟수 조건으로 고압유화 처리하여 나노 니오솜을 제조하였다(**Figure 6**).

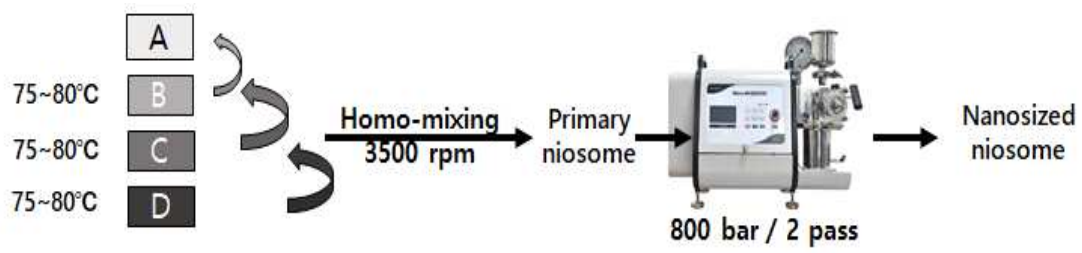


Figure 6. Preparation of nano-niosome by high pressure homogenization method

Table 3. Preparation of MN #2 according to HLB

Part	Materials	MN #2-1	MN #2-2	MN #2-3	MN #2-4	MN #2-5	MN #2-6	MN #2-7	MN #2-8
A	Sorbitan stearate	6.0	6.0	5.0	4.0	3.0	2.0	1.0	—
	Polysorbate 60	—	—	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0
	Cholesterol	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
B	Potassium cetyl phosphate	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
	Ethylhexyl glycerin	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
	Water	to 100	to 100	to 100	to 100	to 100	to 100	to 100	to 100
C	Propylene glycol	30.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
	Minoxidil base	—	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0
D	Macadamia ternifolia seed oil	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0

2.3.2. Potassium cetyl phosphate 및 Propylene glycol 함량에 따른 미녹시딜 함유 나노니오솜 제조

Table 3에서 미녹시딜의 석출되는 점을 보완하기 위해 용해도가 좋은 Propylene glycol의 함량을 증가시켰으며 음이온 계면활성제인 Potassium cetyl phosphate와의 상관성을 확인하기 위해 Potassium cetyl phosphate을 사용하지 않고 **Table 3**의 실험과 동일한 조건으로 진행하였다(**Table 4**).

2.3.3. 코펙실 함유 나노니오솜 제조

코펙실을 함유한 니오솜을 제조하기 위해 **Table 2**의 코펙실 베이스를 사용하여 **Table 4**와 동일한 조건으로 나노니오솜을 제조하였다(**Table 5**).

2.3.4. 대조군 제조

본 실험에서 실험품과의 비교를 위해 대조군을 제조하였다. 대조군은 겔 제형으로써 수상과 알지닌 (10%)으로 중화시킨 점증제를 각각 Agi-Mixer (Overhead stirrer, SL 4000, Global Lap, Korea)를 사용하여 분산시켜주었다. 다음 알지닌 (10%) 함유 점증제를 수상에 첨가하여 Agi-Mixer로 잘 분산시켜주었다. 제조 조성은 **Table 6**에 나타내었다.

Table 4. Preparation of MN #3 with no addition of potassium cetyl phosphate and change in propylene glycol content

Part	Materials	MN #3-1	MN #3-2	MN #3-3	MN #3-4	MN #3-5	MN #3-6	MN #3-7	MN #3-8
A	Sorbitan stearate	6.0	4.0	2.0	—	6.0	4.0	2.0	—
	Polysorbate 60	—	2.0	4.0	6.0	—	2.0	4.0	6.0
	Cholesterol	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
B	Potassium cetyl phosphate	0.8	0.8	0.8	0.8	—	—	—	—
	Ethylhexyl glycerin	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
	Water	to 100	to 100	to 100	to 100	to 100	to 100	to 100	to 100
C	Propylene glycol	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0
	Minoxidil base	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0
D	Macadamia ternifolia seed oil	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0

Table 5. Preparation of KN #4 nano-niosome

Part	Materials	KN #4-1
A	Sorbitan stearate	2.0
	Polysorbate 60	4.0
	Cholesterol	3.0
B	Ethylhexylglycerin	0.2
	Water	to 100
C	Propylene glycol	20.0
	Kopexil base	20.0
D	Macadamia ternifolia seed oil	20.0

Table 6. Preparation of control by gel formulation (non niosome)

Part	Materials	MG #5-1	KG #5-2
A	Minoxidil base	20.0	—
	Kopexil base	—	20.0
	Ethylhexylglycerin	0.1	0.1
	Hexanediol	1.0	1.0
	Disodium EDTA (2%)	0.5	0.5
	Water	to 100	to 100
B	Carbomer (1%)	30.0	30.0
	Xanthan Gum (1%)	5.0	5.0
	Arginine (10%)	3.0	3.0

2.4. 니오솜 안정성 평가

2.4.1. 입자크기, 다분산도 및 제타전위 측정

나노니오솜은 증류수를 이용하여 1%로 희석한 후 볼텍스(Vortex Genie 2, Scientific Industries, Bohemia)로 1분 동안 혼합하였다. 니오솜의 입자크기와 다분산 지수는 브라운 운동을 하고 있는 미세입자들에 광원을 조사하여 크기분포 측정하는 원리를 이용한 Dynamic light scattering 방식인 제타사이저(Nano-ZS, Malvern Panalytical, England)를 사용하여 25 °C에서 측정하였다. 제타전위는 Laser-Doppler법 즉, Electrophoretic light scattering 방식으로 매체의 입자나 분자, 등이 띄고 있는 전하의 표면 전하와 용액의 농도 또는 이온 유형에 따라 달라지게 되는데, 이 전하에 따라 분산 또는 용액의 안정성이 결정된다. 이러한 원리를 통해 제타사이저(Nano-ZS, Malvern Panalytical, England)를 사용하여 25 °C에서 측정하였다(Figure 7). 또한 안정성 확인을 위해 1 일, 1 개월, 2 개월 및 3 개월 주기로 측정하였다.

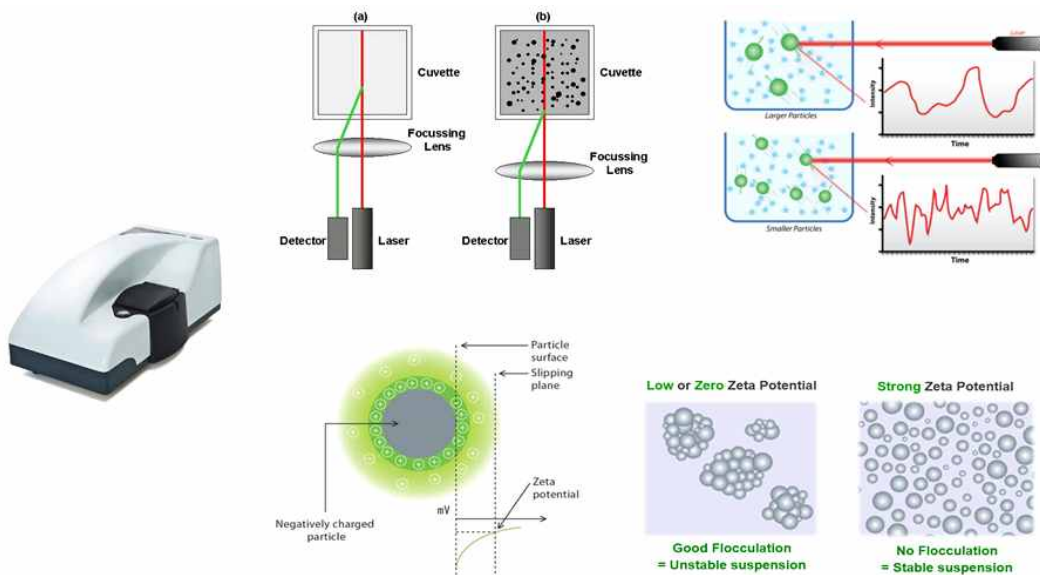


Figure 7. DLS and Zeta potential analysis principle

2.4.2. 현미경 관찰

Table 3와 Table 4에서 제조된 나노니오솜을 실온(25 ℃)에 보관하여 현미경 (Eclipse Ni-UTA, Nikon, Japan)을 사용하여 400 배율로 미녹시딜의 석출(결정화) 여부를 관찰하였다(Figure 8).



Figure 8. Microscope

2.4.3. 휘발잔분 측정

휘발잔분은 일반적으로 에센스, 세럼, 크림 등에서 잔분량을 통해 피부에 사용 시 보습감을 판단하기 위해 사용된다. 하지만 본 연구에서는 나노니오솜에 포함되는 원료들의 휘발잔분 즉, 계면활성제, 콜레스테롤, 오일 등의 잔분을 확인하기 위해 미녹시딜 나노니오솜에 대한 휘발잔분량을 측정하였다. 적외선수분계(IR moisture determination balance, FD-720, Kett, Japan)를 사용하였으며 측정 시료는 약 0.6 g, 110 ℃, BIAS < 0.01% 조건에서 진행하였다.

2.4.4. 활성물질 열 중량 측정(TGA)

미녹시딜 원료와 미녹시딜을 함유하지 않은 니오솜에 대한 열 중량 변화를 관찰하기 위해 한국고분자시험연구소를 통해 열중량분석기(TGA, Thermogravimetric analysis, TA Instrument Q500, USA)를 사용하여 측정하였으며 10 °C/min의 속도로 분석하였다.

2.4.5. 활성물질 시차주사열량 측정(DSC)

활성물질인 미녹시딜, 코펙실의 캡슐화 되어있는지를 확인하기 위해 외부기관인 한국기초과학지원연구원에서 시차주사열량분석계(DSC, Differential scanning calorimetry, TA Instrument Q200, PH407 PUSAN KBSI)를 사용하여 측정하였다. 활성물질 녹는점을 기반으로 미녹시딜의 경우, 온도 25 ~ 300 °C, 코펙실의 경우, 온도 25 ~ 250 °C 범위에서 측정하였으며 10 °C/min의 속도로 분석하였다.

2.5. Franz diffusion cell을 이용한 *in vitro* 경피흡수 실험

활성물질 나노니오솜의 경피흡수율을 확인 및 비교하기 위해 Franz diffusion cell system (HDC-6TD, Logan instruments, USA)을 이용하였으며 사람의 피부를 모사한 인공피부(Strat-M membrane 25mm discs, Merck Millipore, USA)를 사용하여 실험을 진행하였다(**Figure 9**). membrane의 각질층(매끄러운 부분)이 위를 향하게 하여 donor와 receptor phase 사이에 고정시킨 후, 12 mL의 PBS를 receptor chamber에 채웠다(**Figure 10**). 다음 receptor phase의 magnetic bar를 600 rpm 속도로 37 ± 1 °C에서 30분 간 안정화시켰으며 그 후 donor에 겔 제형의 대조군과 실험품 400 μ L를 각각 membrane 표면에 도포하였다. receptor solution은 1, 2, 4, 8, 12, 24 h 간격으로 채취하였으며 PDA 검출기(2998, Waters, USA)가 장착된 HPLC (2695, Waters, USA)를 이용하여 활성물질 투과량을 동시분석 조건을 통해 정량분석 하였다[32]. 24 h 후 donor 부분은 코니칼 튜브에 회수하여 메탄올 20 mL로 희석하였으며, membrane에 남아있는 활성물질의 양을 측정하기 위해 membrane을 수거하여 receptor solution으로 세척한 후 8등분하여 코니칼 튜브에서 메탄올 10 mL로 희석하였다. 그 후, 1 h 30 min 동안 초음파(Ultrasonic cleaner JAC-3010, Kodo, Japan) 처리를 통해 나노니오솜의 이중층을 분해하였다. 분해되어 메탄올 용액에 용출시킨 활성물질의 양을 HPLC를 이용하여 동시분석을 통해 정량하였다. HPLC 조건은 **Table 7**에 나타내었다.



Figure 9. Franz diffusion cell system and Strat-M membrane

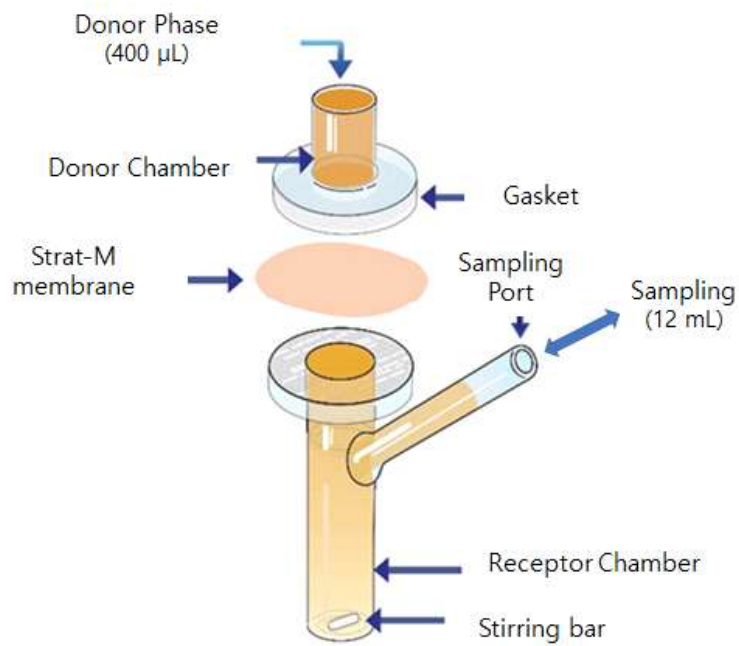


Figure 10. Franz diffusion cell system method preparation

Table 7. Minoxidil and Kopexil simultaneous analysis HPLC method

System	Condition	
	Minoxidil	Kopexil
Column	Kromasil C18 column, 5 μ m, 4.6 \times 250 mm (AkzoNobel, Netherlands)	
Detector	Photodiode Array	
Temperature of column and sample	40 $^{\circ}$ C and 25 $^{\circ}$ C	
Flow rate	1.0 mL/min	
Mobile phase	1 M Phosphate (pH 3) : Methanol = 50 : 50	
wavelength	250 nm	
Injection volume	20 μ L	
Time	10 min	

2.6. 나노솜 캡슐효율 측정

나노나노솜의 활성물질 즉, 미녹시딜과 코펙실의 캡슐효율을 측정하기 위해 H. J. Gwak et al[46], C. K. Kim[47]을 참고하여 실험을 진행하였다. 활성물질을 포집한 나노나노솜을 원심분리기(Varispin 15R multi centrifuge, Novapro, Korea)로 18000 xg, 4 °C, 20 h 조건으로 원심분리 하였다. 활성물질의 전체 함량을 측정하기 위해 상층액과 하층액으로 분리된 나노 나노솜을 캡슐화 되지 않은 상층액, 캡슐화 된 하층액을 각각 취하여 샘플링 하였다. 그 후 10 mL 메탄올로 희석하여 30 min 동안 초음파 처리해주었다. **Table 7**과 같이 HPLC를 이용하여 분석하였다. 캡슐효율 계산방법은 나노나노솜 내 캡슐화 된 하층액의 활성물질 함량을 전체 활성물질 함량으로 나누었다. 따라서 다음과 같은 식으로 나타낼 수 있다.

$$EE (\%) = \frac{C_p}{C_t} \times 100$$

C_p = Amount of active substance in pellet (μg)

C_t = Amount of active substance in total niosome sample (μg)

2.7. 니오솜 약물 방출 측정

나노니오솜 제형과 겔 제형의 대조군 내 미녹시딜, 코펙실의 방출을 확인하기 위해 Dialysis membrane 방법을 이용하여 실험을 진행하였다. 약물 방출에 사용된 용액은 10% 메탄올과 PBS를 혼합하여 사용하였으며 실험 전 Dialysis tube (Spectra/Por[®] Dialysis Membrane, 14 kD, Spectrum laboratories, Inc., USA)를 증류수에 10분 간 담군 후 사용하였다. 다음, 비커에 용액 600 mL로 채우고 Dialysis tube 안에 미녹시딜 나노니오솜, 코펙실 나노니오솜을 각각 5 mL 넣은 후 집게를 사용하여 tube를 막아주었다. 막은 Dialysis tube를 준비된 600 mL 용액 안에 넣어 37 °C, 200 rpm의 조건으로 교반하였다. 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48 h 간격으로 비커의 용액을 5 mL 취했으며 새로 준비된 용액 600 mL로 교체하였다. 5 mL 취한 샘플 용액을 5 mL 메탄올로 희석한 후, **Table 7**과 같이 HPLC로 분석하였다.

2.8. 나노니오솜 형상관찰(TEM)

나노니오솜의 소포 형상을 관찰하기 위해 외부기관인 KIST에서 초저온 투과전자현미경(Cryo-TEM, Cryogenic transmission electron microscope, Tecnai F20 G2, FEI Company, USA)을 사용하여 측정하였다.

2.9. 통계적 검증

실험은 3회 반복 수행하고 실험결과를 평균 \pm 표준편차로 나타내었으며, 유의성은 student's *t*-test를 통해 유의성에 따라 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 로 표시하였다.

III. 결과 및 고찰

3.1. 제형 안정성 평가

3.1.1. 입자크기, 다분산도 및 제타전위 측정

1) 계면활성제 HLB 변화에 따른 미녹시딜 함유 나노니오솜 안정성 평가(나노니오솜 MN #2)

나노니오솜의 안정성을 확인하기 위해 25 °C에서 3 개월 동안 한 달 간격으로 제타사이저를 이용하여 입자크기, 다분산도 및 제타전위를 측정하였으며 하루 측정 데이터는 **Table 8**에 나타내었다.

먼저, 계면활성제 Sorbitan stearate와 Polysorbate 60 비율에 따라 HLB에 변화를 주었으며 입자크기의 범위는 99 ~ 123 nm로 측정되었다. HLB가 상대적으로 낮은 것과 높은 것을 비교하였을 때 HLB가 높아질수록 입자의 크기가 줄어드는 것을 볼 수 있었으며 시간경과에 따라 점점 증가되는 것을 볼 수 있었다. 하지만 HLB가 낮을수록 입자크기는 상대적으로 크지만 시간경과에 따라 안정성이 대체적으로 좋다고 판단되어진다. 또한 MN #2-1과 MN #2-2는 미녹시딜 함유하지 않은 것과 함유한 것으로 미녹시딜이 입자크기에 크게 영향을 주지 않는다는 것을 볼 수 있었다(**Figure 11**).

PDI는 입자 크기 분포 특성화와 관련하여 지질 나노운반체 시스템의 크기 범위를 정의하는 데 사용되는 매개변수를 다분산 지수라고 하며 다분산도는 입자 크기 분포의 불균일 정도를 설명하는데 사용된다[48]. PDI 측정된 결과, 0.176 ~ 0.241 범위로 측정되었으며 3 개월 동안 모든 샘플이 0.300을 넘지 않은 것으로 보아 대체적으로 입자크기가 균일한 제형이라 판단되어진다(**Figure 12**). 보통은 PDI 값이 0.250 이하인 경우, 안정한 상태의 단분산에 가까운 입자 분포를 갖는 것으로 알려져 있다[49,50].

일반적으로 니오솜과 같은 나노 분산액의 분산 안정성을 향상시키기 위해 물리적 안정화뿐만 아니라 정전기적 안정화도 중요시 여겨진다[3]. 따라서 나노 분산액의 분산 안정성을 확인하는 방법으로 제타전위를 측정하는 방법이 사용되고 있다[51]. 본 실험에서 제타전위를 측정한 결과, 계면활성제 HLB가 상대적으로 높아질수록 제타전위의 값이 줄어드는 것을 볼 수 있었으며 시간경과에 따라 안정성이 줄어드는 것을 볼 수 있었다(**Figure 13**). 이 때 절댓값이 감소 또는 증가되는 오차가 포함된 것으로 보여진다. 측정 범위는 $-59.7 \sim -80.7$ mV 로써 일반적으로 안정하다고 볼 수 있는 제타전위 범위인 ± 30 mV 이상으로 측정되어 정전기적으로 안정함을 알 수 있었으며 제타전위의 절댓값이 클수록 콜로이드 입자간의 반발력이 커져 콜로이드 상태가 안정한 것으로 알려져 있다[52].

시간 경과에 따라 성상 관찰을 진행하였으며 미녹시딜을 함유하지 않은 제형 MN #2-1을 제외한 나머지 제형에서 제형을 제조한 직후 미녹시딜이 석출됨을 확인할 수 있었으며 시간이 지날수록 미녹시딜 함유된 나노니오솜에서 색상변화가 있는 것을 확인하였다(**Figure 14**). 이는 피페리디노 구조로 인한 결과로 판단되어진다.

Table 8. Appearance, Particle size, PDI, Zeta potential of MN #2 at 25°C for a day (mean±SD, n=3)

No.	Feature	Appearance	Particle size (nm)	Polydispersity Index	Zeta potential (mV)
MN #2-1	—	Off-white, Opaque	123.3±0.29	0.198±0.010	-73.9±1.27
MN #2-2	1% Minoxidil	Off-white, Opaque	127.6±1.00	0.241±0.010	-77.7±1.46
MN #2-3	1% Minoxidil	Off-white, Opaque	112.3±0.21	0.206±0.011	-75.8±0.92
MN #2-4	1% Minoxidil	Off-white, Opaque	117.3±0.15	0.200±0.011	-71.4±1.06
MN #2-5	1% Minoxidil	Off-white, Opaque	113.0±0.57	0.230±0.016	-70.8±1.65
MN #2-6	1% Minoxidil	Off-white, Opaque	101.4±0.45	0.216±0.004	-73.5±0.84
MN #2-7	1% Minoxidil	Off-white, Opaque	99.00±0.70	0.221±0.028	-71.8±0.35
MN #2-8	1% Minoxidil	Off-white, Opaque	101.1±1.96	0.230±0.004	-64.2±2.71

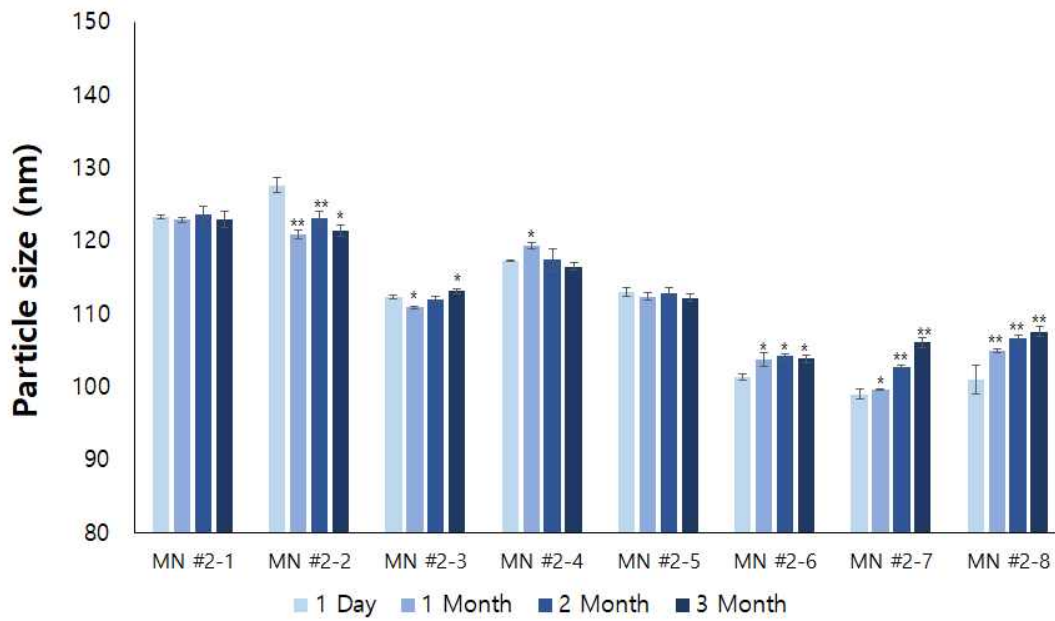


Figure 11. HLB change over time at 25°C MN #2 Particle size (*p*-value **p* < 0.05, ***p* < 0.01, *n*=3)

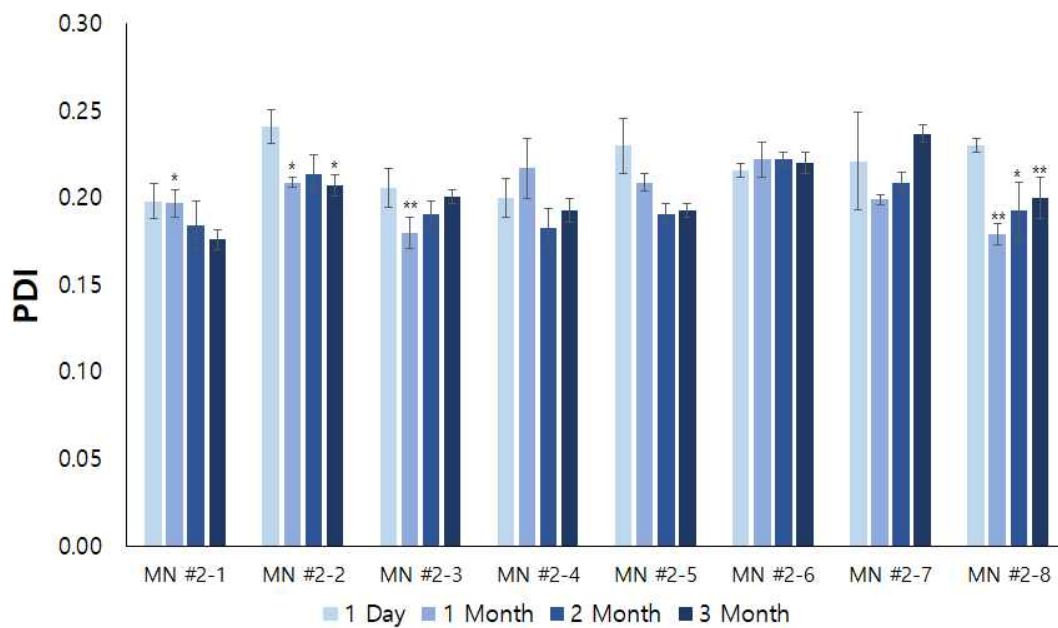


Figure 12. HLB change over time at 25°C MN #2 PDI (*p*-value **p* < 0.05, ***p* < 0.01, *n*=3)

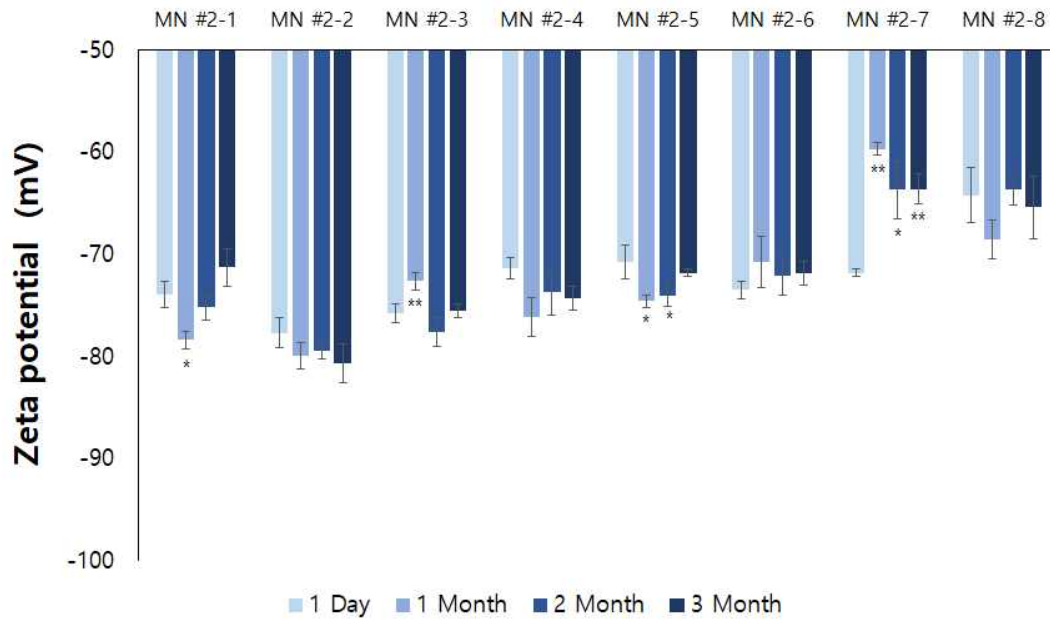


Figure 13. HLB change over time at 25°C MN #2 Zeta potential (*p*-value
 p* < 0.05, *p* < 0.01, *n*=3)

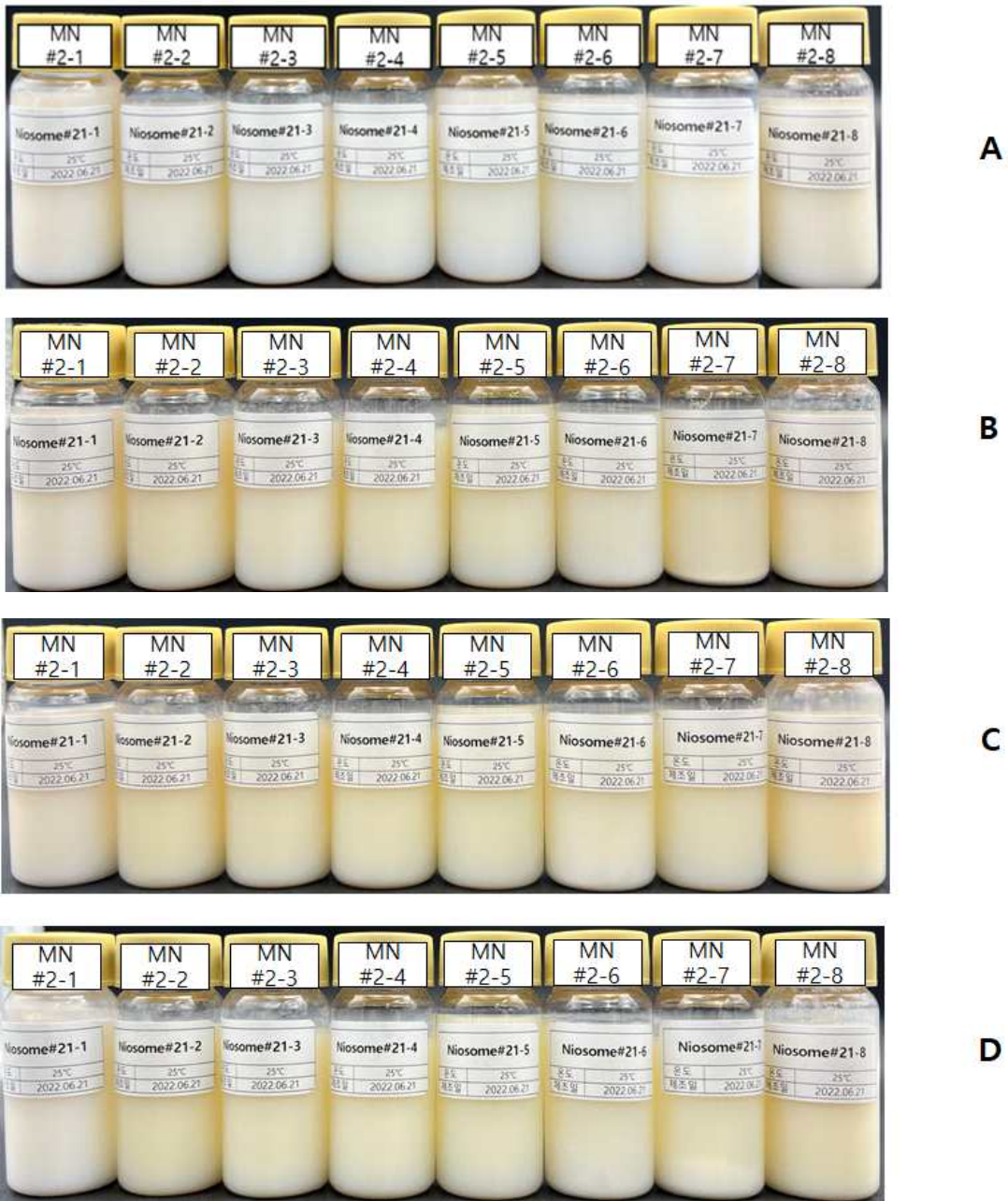


Figure 14. Appearance of MN #2 at 25°C after A: a day, B: 1 month, C: 2 month, D: 3 month

2) Potassium cetyl phosphate 및 Propylene glycol 함량에 따른 미녹시딜 나노니오솜 안정성 평가(나노니오솜 MN #3)

MN #2 제형과 달리 Propylene glycol 함량을 20%로 증가시켰으며 HLB 변화에 차이를 주어 Potassium cetyl phosphate를 함유한 제형(MN #3-1, MN #3-2, MN #3-3, MN #3-4)과 함유하지 않은 제형(MN #3-5, MN #3-6, MN #3-7, MN #3-8)을 3 개월 동안 1 개월 간격으로 안정성 실험을 진행하였다. 하루 측정 데이터는 **Table 9**에 나타내었다.

Potassium cetyl phosphate 유무와 관계없이 공통적으로 1 day에서 HLB의 값이 상대적으로 높아질수록(MN #3-1, MN #3-2, MN #3-3, MN #3-4 / MN #3-5, MN #3-6, MN #3-7, MN #3-8) 입자크기가 작아지는 것을 볼 수 있었으며 시간경과에 따라서는 HLB가 높을수록 입자크기의 증가가 더 극대화 되는 것을 볼 수 있었다. 이는 HLB값이 상대적으로 낮은 제형이 안정성에 대해 더 높다고 판단이 되어진다. 또한 MN #3-1과 MN #3-5, MN #3-2와 MN #3-6의 경우, Sorbitan stearate의 비율이 Polysorbate 60 비율보다 높아 HLB값이 상대적으로 낮으며 Potassium cetyl phosphate 유무의 차이이다. 이 때 Potassium cetyl phosphate가 있는 MN #3-1, MN #3-2보다 Potassium cetyl phosphate가 없는 MN #3-5, MN #3-6에서 1 day에 더 큰 입자를 보였으며 HLB가 상대적으로 높은 MN #3-3과 MN #3-7, MN #3-4와 MN #3-8을 비교하면, Potassium cetyl phosphate가 있는 MN #3-3, MN #3-4보다 Potassium cetyl phosphate가 없는 MN #3-7, MN #3-8에서 1 day에 더 작은 입자를 보였다. 입자크기의 범위는 85.51 ~ 136.8 nm로 측정되었다(**Figure 15**).

PDI 측정 결과, 0.100 ~ 0.206의 범위로 측정되었으며 모든 샘플이 Potassium cetyl phosphate의 유무와 관계없이 3 개월 동안 0.300을 넘지 않은 것으로 보아 대체적으로 입자크기가 균일한 제형으로 판단되어진다(**Figure 16**).

제타전위 측정 결과, 범위는 30.7 ~ 74.5 mV로서 Potassium cetyl phosphate를 함유한 제형(MN #3-1, MN #3-2, MN #3-3, MN #3-4)에서는 계면활성제 HLB와 관계없이 상대적으로 높은 절댓값의 제타전위를 보여주었으며 시간경과에 따라서도 크게 변하지 않은 값을 통해 안정성이 양호하다고 판단되어진다. 하지만

Potassium cetyl phosphate를 함유하지 않은 제형(MN #3-5, MN #3-6, MN #3-7, MN #3-8)에서는 계면활성제 HLB 값이 높아질수록 낮은 절댓값의 제타전위를 볼 수 있었다. 이러한 결과를 통해 HLB가 낮은 제형에서는 그 자체만으로 안정성이 양호해 Potassium cetyl phosphate 유무에 관계없이 안정성이 좋은 것을 알 수 있었으며 반대로 HLB가 높은 제형은 Potassium cetyl phosphate 유무에 대한 안정성에 큰 차이를 보여주어 친수성 계면활성제일수록 전하의 영향을 많이 받는 것으로 판단되어진다(**Figure 17**). Potassium cetyl phosphate는 소포막의 이중층에 (음)전하를 부여하여 소포의 응집을 막아주는 역할을 함으로써 막의 안정성에 영향을 주는 것으로 알려져 있으며 표면 전하를 쉽게 조절하기 위해 사용되기도 한다[53].

성상 관찰을 진행하였으며 Potassium cetyl phosphate를 함유한 제형 MN #3-1, MN #3-2, MN #3-3, MN #3-4 중 HLB가 상대적 높은 제형에서 미녹시딜 석출을 볼 수 있었으며 Potassium cetyl phosphate를 함유하지 않은 MN #3-5, MN #3-6, MN #3-7, MN #3-8에서는 HLB에 관계없이 석출을 보이지 않았다. 시간이 지날수록 HLB가 상대적 낮고 Potassium cetyl phosphate 함유된 제형 MN #3-2, HLB가 상대적 높고 Potassium cetyl phosphate 함유하지 않은 제형 MN #3-8에서는 미녹시딜 석출이 일어나는 것을 볼 수 있었다. 또한 시간경과에 따라 미녹시딜 함유된 나노니오솜에서 색상변화가 있는 것을 확인하였으며 이는 피페리디노 구조로 인한 색 변화로 판단되어진다(**Figure 18**).

Table 9. Appearance, Particle size, PDI, Zeta potential of MN #3 at 25°C for a day (mean±SD, n=3)

No.	Feature	Appearance	Particle size (nm)	Polydispersity Index	Zeta potential (mV)
MN #3-1	1% Minoxidil	Off-white, Opaque	107.3±0.59	0.187±0.008	-71.5±1.78
MN #3-2	1% Minoxidil	Off-white, Opaque	104.5±0.15	0.182±0.006	-72.2±2.60
MN #3-3	1% Minoxidil	Off-white, Opaque	98.88±0.55	0.187±0.011	-63.5±2.57
MN #3-4	1% Minoxidil	Off-white, Opaque	95.34±0.72	0.202±0.013	-65.5±1.71
MN #3-5	1% Minoxidil	Off-white, Opaque	127.4±0.98	0.155±0.018	-69.6±1.65
MN #3-6	1% Minoxidil	Off-white, Opaque	106.5±0.60	0.159±0.004	-53.5±0.30
MN #3-7	1% Minoxidil	Off-white, Opaque	97.40±0.84	0.186±0.011	-48.7±1.10
MN #3-8	1% Minoxidil	Off-white, Opaque	85.51±0.23	0.198±0.003	-38.4±0.82

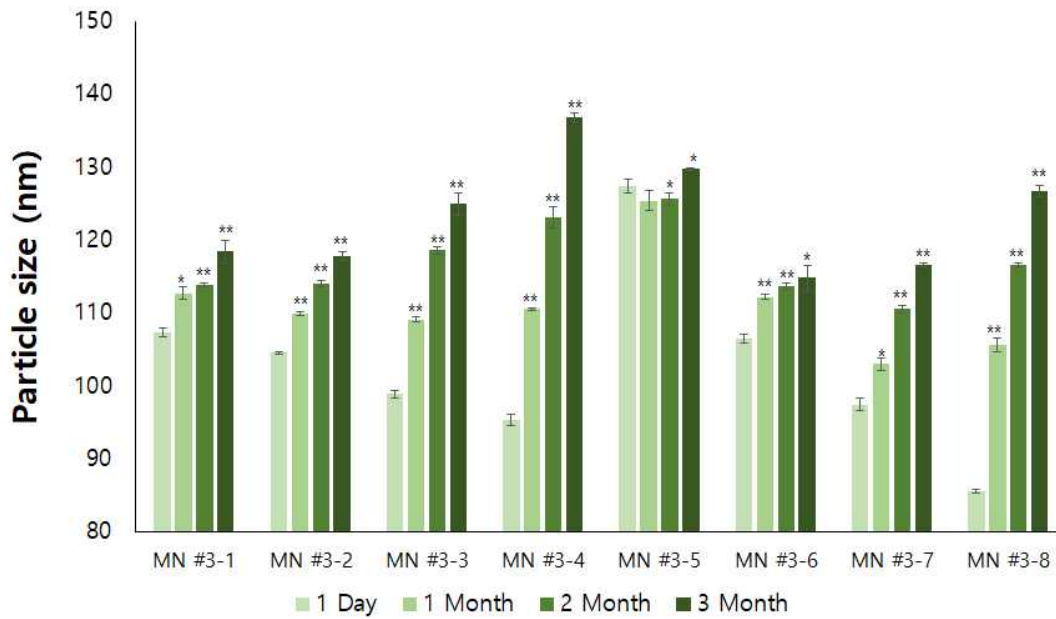


Figure 15. Evaluation of the stability of MN #3 Particle size at 25°C with or without Potassium cetyl phosphate that changed HLB (*p*-value **p* < 0.05, ***p* < 0.01, *n*=3)

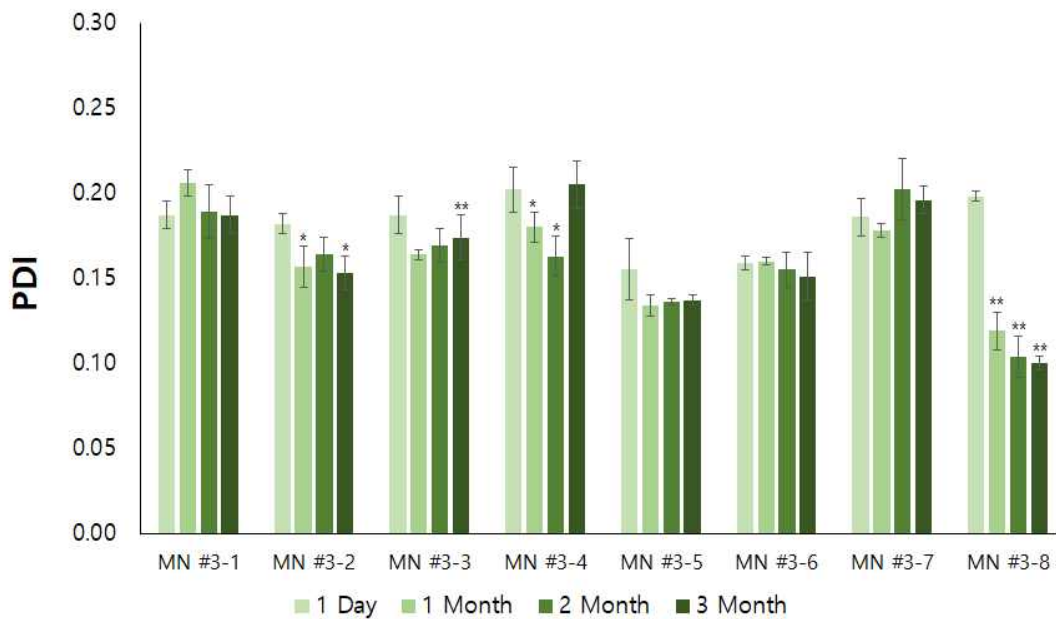


Figure 16. Evaluation of the stability of MN #3 PDI at 25°C with or without Potassium cetyl phosphate that changed HLB (*p*-value **p* < 0.05, ***p* < 0.01, *n*=3)

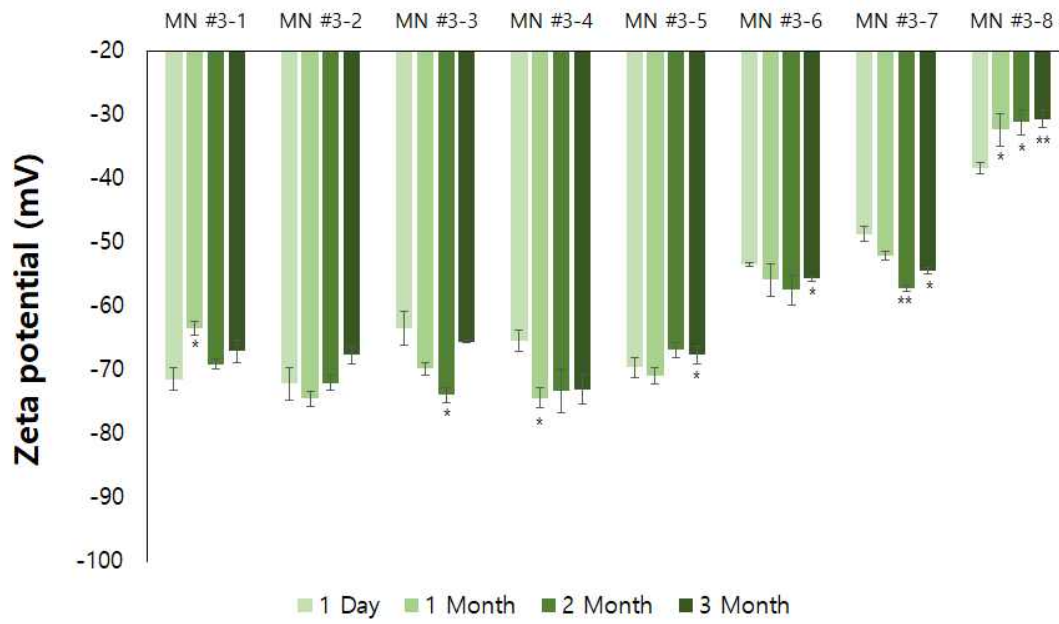


Figure 17. Evaluation of the stability of MN #3 Zeta potential at 25°C with or without Potassium cetyl phosphate that changed HLB (*p*-value **p* < 0.05, ***p* < 0.01, *n*=3)



Figure 18. Appearance of MN #3 at 25°C after A: a day, B: 1 month, C: 2 month, D: 3 month

3) 코펙실 함유 나노니오솜 안정성 평가(나노니오솜 KN #4)

미녹시딜 함유 니오솜 제조 실험 **Table 4**에서 최적의 제형 1 개를 골라 코펙실 함유 니오솜을 제조하였으며 제조한 코펙실 함유 니오솜의 안정성을 관찰하기 위해 25 °C에서 3 개월 동안 한 달 간격으로 제타사이저를 이용하여 입자크기, 다분산도 및 제타전위를 측정하였다. 하루 측정 데이터는 **Table 10**에 나타내었다.

코펙실 함유 나노니오솜은 입자가 작고, 미녹시딜 석출이 일어나지 않은 미녹시딜 함유 나노니오솜 MN #3-7 처방과 똑같이 하여 같은 조건으로 제조하였다. KN #4-1의 입자크기의 범위는 94.58 ~ 96.81 nm로 측정되었으며 시간 경과에 따라 입자크기가 조금씩 증가하는 것을 볼 수 있었다. 크게 변하지 않는 것으로 보아 안정성이 좋다고 판단되어진다(**Figure 19**).

PDI 값은 0.164 ~ 0.149의 범위로서 시간이 지나도 0.300을 넘지 않는 것으로 보아 입자크기가 잘 분산되어 있다 볼 수 있다(**Figure 20**).

Potassium cetyl phosphate를 첨가하지 않은 제형으로써 제타전위는 -43.9 ~ -44.8 mV로 측정되었다. 제타전위의 안정한 범위인 ± 30 mV 이상으로서 정전기적으로 안정하며 입자 응집이 되지 않은 것을 확인할 수 있다(**Figure 21**).

성상 관찰 결과, 미녹시딜과 달리 석출되지 않음을 확인하였으며 시간 경과에 따라서도 석출되지 않고 제형상 안정한 것을 확인하였다. 또한 색 변화가 없는 것으로 보아 피페리디노를 포함하지 않기 때문이라고 판단되어진다(**Figure 22**).

Table 10. Appearance, Particle size, PDI, Zeta potential of KN #4 at 25°C for a day (mean±SD, n=3)

No.	Feature	Appearance	Particle size (nm)	Polydispersity Index	Zeta potential (mV)
KN #4-1	1% Kopexil	Off-white, Opaque	94.58±0.27	0.164±0.008	-44.8±1.86

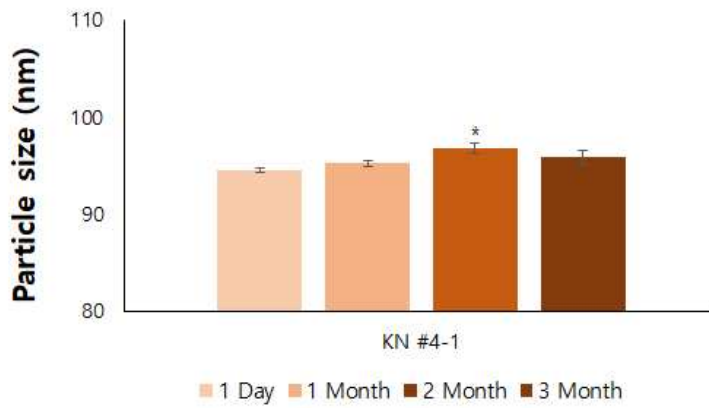


Figure 19. Particle size KN #4 at 25°C over time (p -value * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, $n=3$)

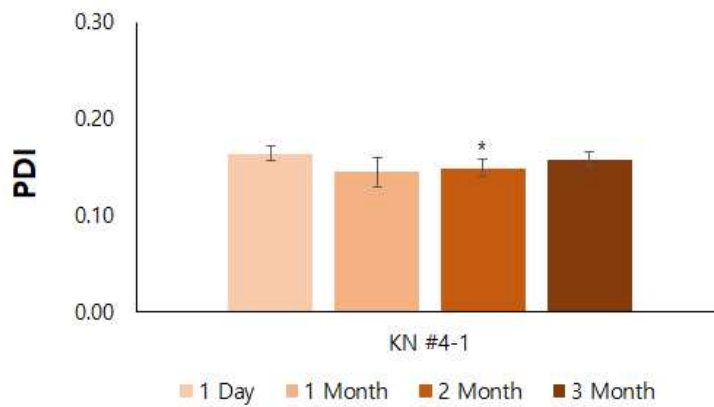


Figure 20. PDI KN #4 at 25°C over time (p -value * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, $n=3$)

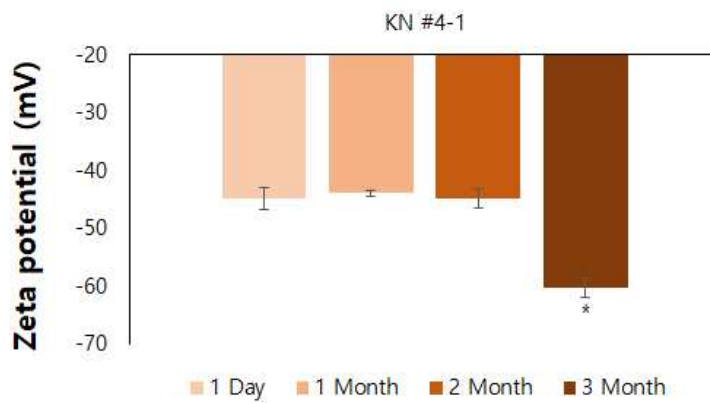


Figure 21. Zeta potential KN #4 at 25°C over time (p -value * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, $n=3$)

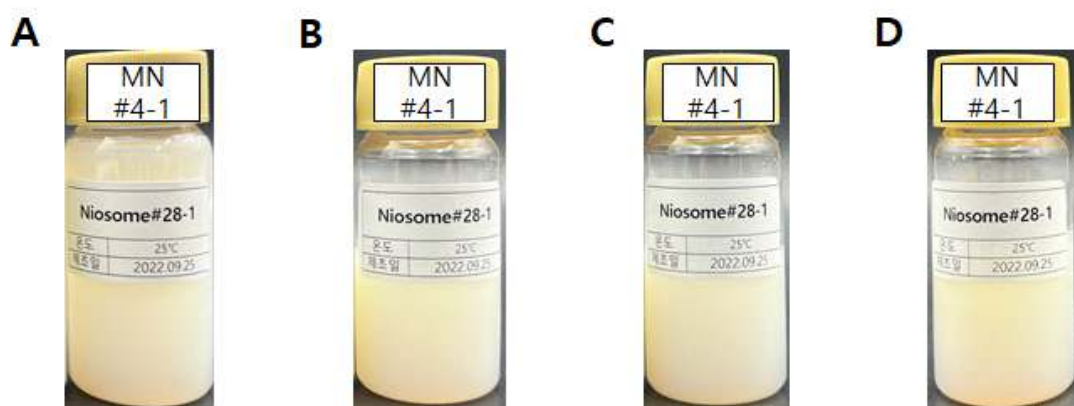


Figure 22. Appearance of KN #4 at 25°C after A: a day, B: 1 month, C: 2 month, D: 3 month

3.1.2. 미녹시딜 함유 나노니오솜 현미경 관찰

Table 3, Table 4의 미녹시딜 함유 나노니오솜에서 미녹시딜 석출(결정화)을 관찰하기 위해 25 °C 보관한 샘플을 400 배율로 현미경 관찰을 진행하였다.

Table 3의 미녹시딜 함유 나노니오솜은 계면활성제 HLB에 관계없이 미녹시딜을 함유하지 않은 A(MN #2-1)를 제외한 나머지 제형에서 미녹시딜의 석출을 볼 수 있었으며 이는 미녹시딜의 좋지 않은 용해도 때문이라 판단되어진다 (**Figure 23**).

Table 4의 미녹시딜 함유 나노니오솜은 **Table 3**의 미녹시딜 석출을 보완하기 위해 Propylene glycol 함량을 20%로 늘렸으며 Potassium cetyl phosphate를 첨가한 A (MN #3-1), B (MN #3-2), C (MN #3-3), D (MN #3-4)에서 계면활성제 HLB가 상대적으로 낮은 A와 B는 미녹시딜 석출을 볼 수 없었지만 HLB가 상대적으로 높은 C와 D에서는 석출이 된 것을 확인할 수 있었다(**Figure 24**). Potassium cetyl phosphate를 첨가하지 않은 E (MN #3-5), F (MN #3-6), G (MN #3-7), H (MN #3-8)에서 HLB가 상대적 가장 높은 H에서만 미세한 석출을 볼 수 있었으며 이를 통해 C, D의 석출은 음이온 계면활성제가 가지는 전하를 통해 Salting out 현상으로 인한 석출로 보여지며 용해도로 인한 Propylene glycol 함량 증가와 Potassium cetyl phosphate를 첨가하지 않음으로서 미녹시딜 석출을 보완할 수 있는 것으로 확인되었다. (시간경과에 따라 B, H는 석출됨을 확인)

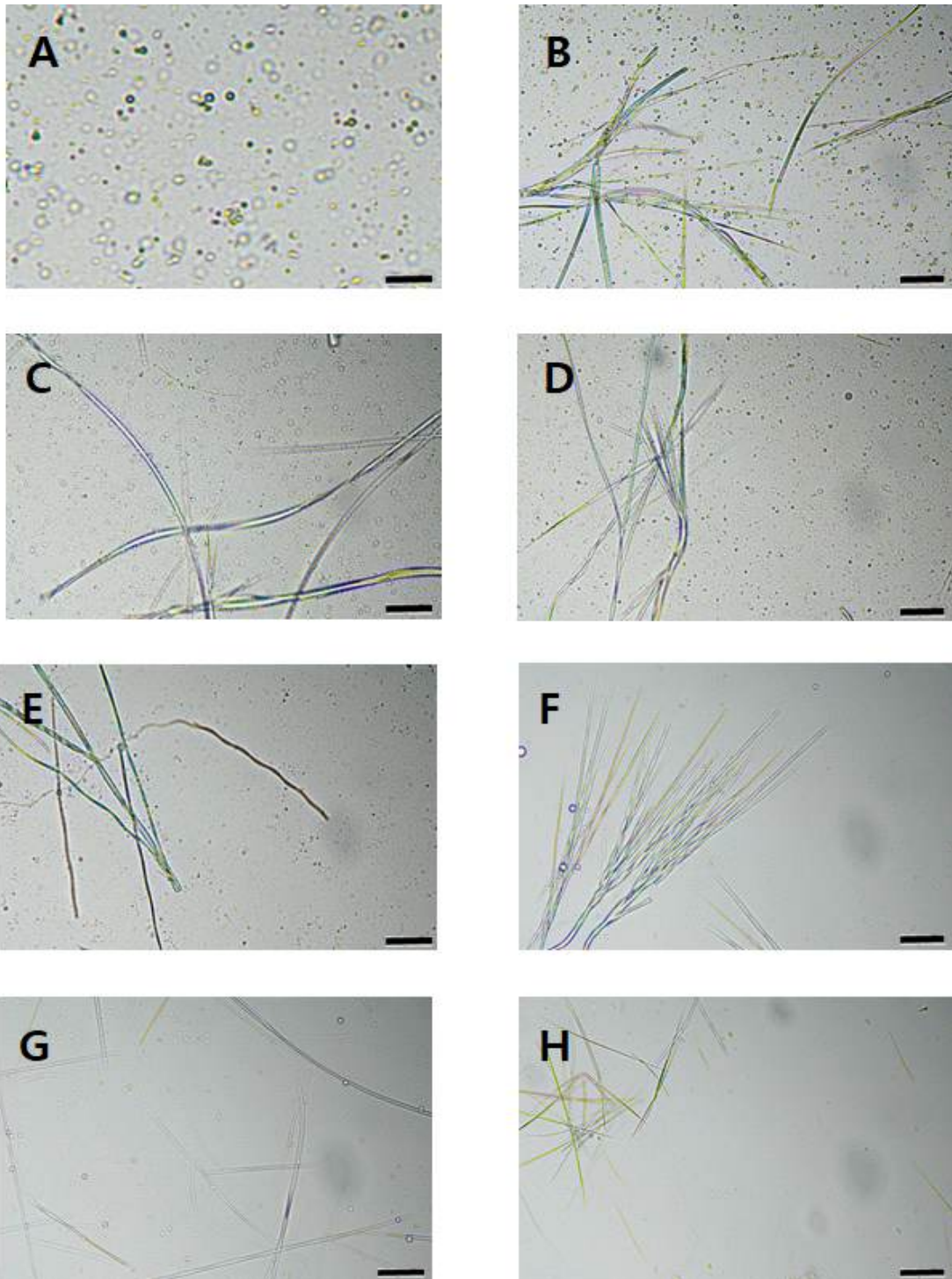


Figure 23. Microscopy images of MN#2 HLB changes at 25°C. A: nano-niosome without minoxidil in HLB 4.7, B: HLB 4.7, C: HLB 6.4, D: HLB 8.1, E: HLB 9.8, F: HLB 11.5, G: HLB 13.2, H: HLB 14.9 (scale bar 20 μm)

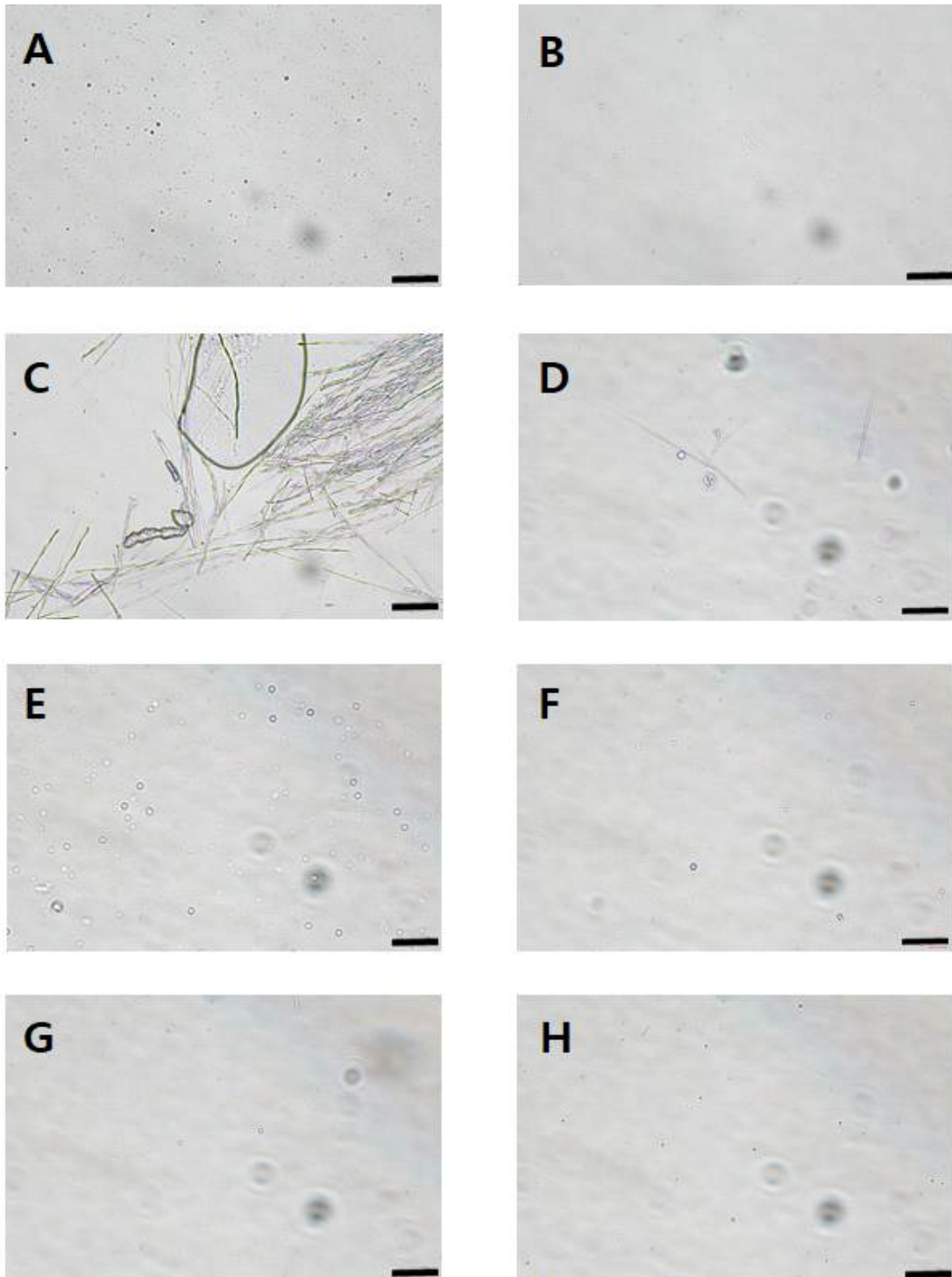


Figure 24. Microscopy images of MN#3 with or without potassium cetyl phosphate according to HLB at 25°C. A, E: HLB 4.7, B, F: HLB 8.1, C, G: HLB 11.5, D, H: HLB 14.9 (A, B, C, D: Addition of potassium cetyl phosphate), (E, F, G, H: No added potassium cetyl phosphate) (scale bar 20 μ m)

3.1.3. 휘발잔분 측정

미녹시딜 함유 나노니오솜에 대해 휘발잔분은 BIAS < 0.01%, 110 °C에서 측정하였다. 미녹시딜 함유 나노니오솜의 이론적 잔분 값은 대략 30.00%이며, 실제 휘발잔분 데이터는 **Table 11**에 나타내었다. 미녹시딜 함유 니오솜 휘발잔분량이 30.00% 부근으로 측정된 것을 보아 Water, Propylene glycol, 등 일부 휘발 되는 것을 제외한 계면활성제, 콜레스테롤, 오일의 양이 이론적 값과 유사한 것을 확인할 수 있었다.

Table 11. Volatile residue amount of MN #2 and MN #3

(110 °C, BIAS < 0.01%, mean±SD, n=3)

No.	Volatilization residue (%)	No.	Volatilization residue (%)
MN #2-1	30.79±0.03	MN #3-1	31.45±0.01
MN #2-2	30.34±0.02	MN #3-2	32.02±0.04
MN #2-3	30.86±0.12	MN #3-3	32.33±0.01
MN #2-4	30.80±0.08	MN #3-4	32.18±0.06
MN #2-5	30.03±0.01	MN #3-5	30.82±0.02
MN #2-6	27.07±0.02	MN #3-6	30.77±0.02
MN #2-7	28.94±0.02	MN #3-7	30.52±0.04
MN #2-8	31.80±0.11	MN #3-8	30.07±0.02

3.1.4. 열 중량 분석 측정(TGA)

미녹시딜 원료와 미녹시딜이 함유되지 않은 나노니오솜의 열 중량을 측정하였다. 미녹시딜의 경우, 원료의 녹는점 전까지 중량에 대한 변화가 없다가 녹는점 부근 즉, 290.82 °C에서 중량이 줄어드는 것을 확인하였으며 이 데이터를 통해 미녹시딜 원료임을 재확인하였다. 또한 온도가 계속해서 높아질수록 유기물이 점점 분해되는 것을 관찰할 수 있었다(Figure 25).

나노니오솜은 여러 가지의 원료가 포함되어 있다. 68.40 °C 부근에서 점차 중량이 감소되는 것은 휘발이 잘 되는 원료인 Propylene glycol, Water 등으로 판단되어진다. 또한 155 °C에서 중량이 감소되어 일정해지는 구간을 볼 수 있으며 중량은 약 38.0%이다. 이는 Table 11의 나노니오솜의 휘발잔분 값이 평균 30.00%인 것과 비슷하며 이론적 휘발잔분 값인 30.00%와 크게 차이가 나지 않은 것을 확인할 수 있었다. 휘발잔분은 계면활성제, 콜레스테롤, 오일 등의 원료로 판단되어지며 363.65 °C 부근에서는 유기물이 점점 분해되는 지점으로 판단되었다(Figure 26).

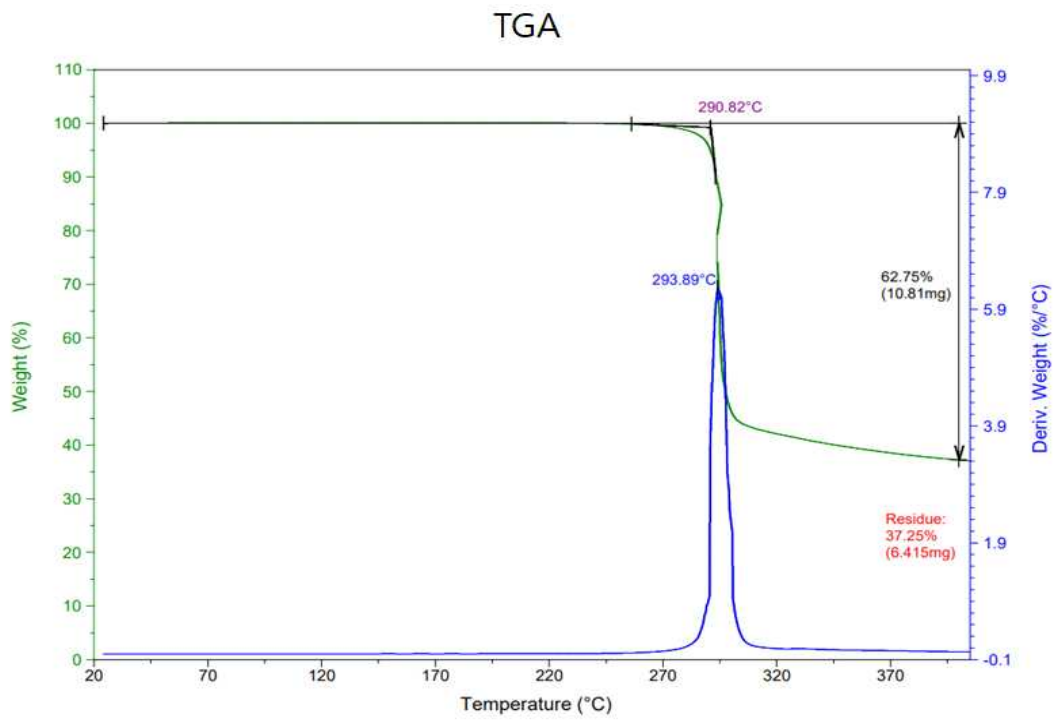


Figure 25. Minoxidil TGA measurement

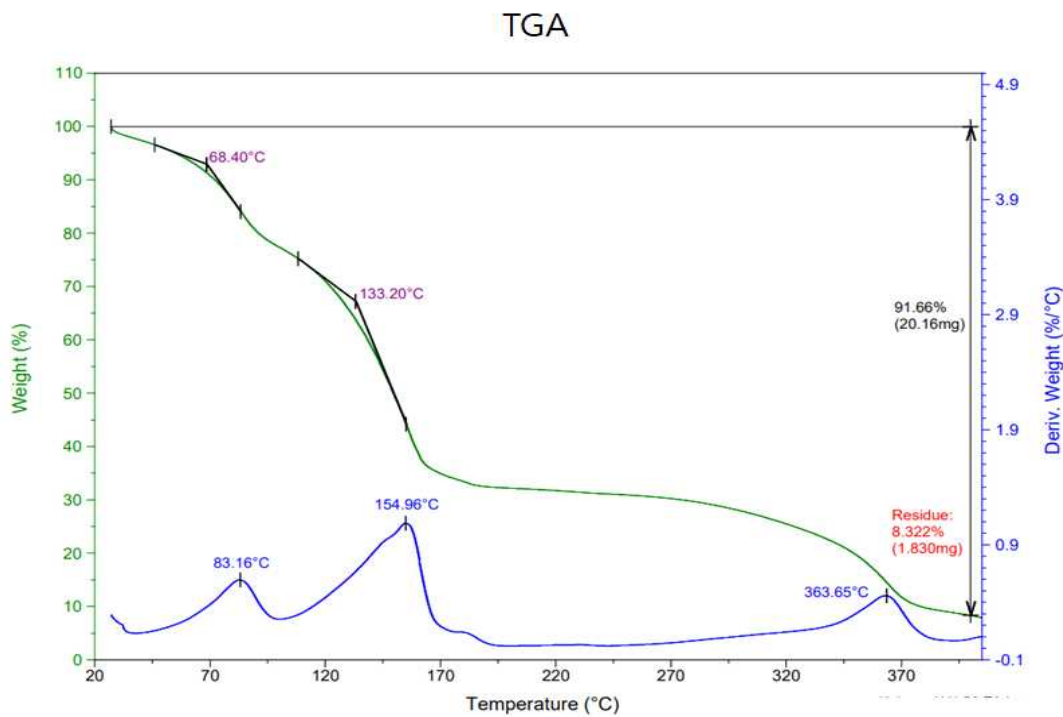


Figure 26. Nano-niosome TGA measurement

3.1.5. 활성물질 시차주사열량 측정(DSC)

DSC는 서로 다른 지질 변형이 서로 다른 녹는점을 갖는다는 사실을 사용하여 활성물질의 결정성 또는 무정형 특성에 관한 정보를 제공할 수 있다[54]. 결정성 물질인 미녹시딜이 니오솜 제형에 캡슐화 되어있는지 확인하기 위해 **Table 4**의 MN #3-1제형을 통해 진행하였다.

먼저, 미녹시딜 원료의 녹는점은 **Table 1**에서 나타낸 녹는점과 유사하며 285.34 °C에서 흡열 피크가 확인되었다. 미녹시딜을 함유하지 않은 나노니오솜은 130.69 °C에서 흡열 피크가 나타난 것을 볼 수 있었다. 미녹시딜을 포함한 나노니오솜 MN #3-1에서는 118.86 °C에서 흡열 피크를 볼 수 있었으며 나노니오솜의 피크는 계면활성제 및 부가적인 원료들로 인해 나타나는 흡열 피크로 예상된다. 미녹시딜 원료의 녹는점 285.34 °C의 흡열 피크가 나타나지 않은 것을 보아 미녹시딜이 니오솜 제형에서 무정형 상태에 있다고 볼 수 있다. 따라서 미녹시딜이 무정형 상태로 존재하고 니오솜 내에 균일하게 분산되어 있다고 볼 수 있다(**Figure 27**).

코펙실 원료의 녹는점은 213.55 °C에서 확인되었으며 코펙실을 함유하지 않은 나노니오솜에서 136.72 °C의 흡열 피크를 보였다. 코펙실 함유 나노니오솜 KN #4-1에서는 137.76 °C의 흡열 피크를 나타냈으며 코펙실 원료의 녹는점 213.55 °C의 흡열 피크가 나타나지 않은 것을 보아 코펙실이 니오솜 제형 내에 균일하게 분산되어 있다고 볼 수 있다(**Figure 28**).

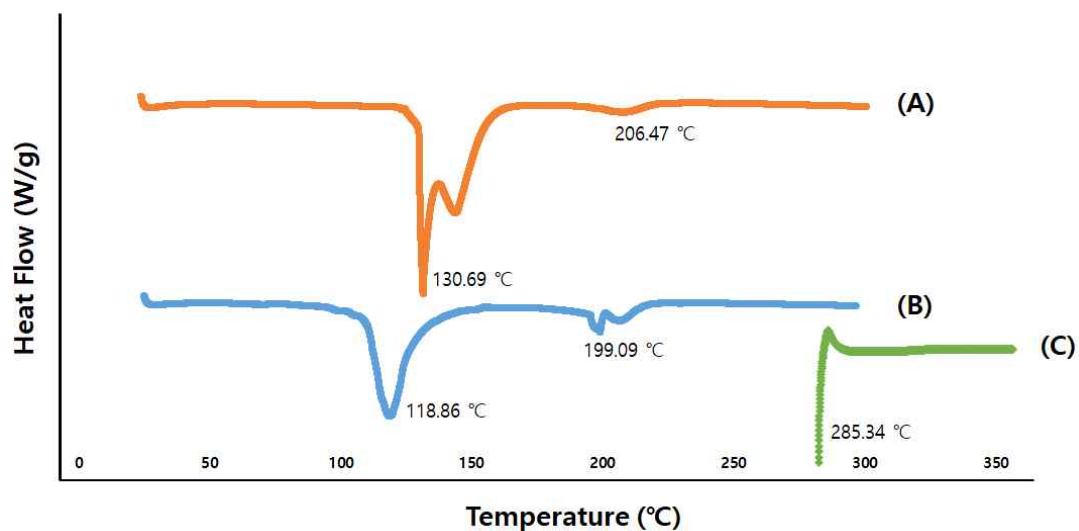


Figure 27. Thermal properties of minoxidil. (A): Nano-niosome, (B): Minoxidil nano-niosome, (C): Minoxidil

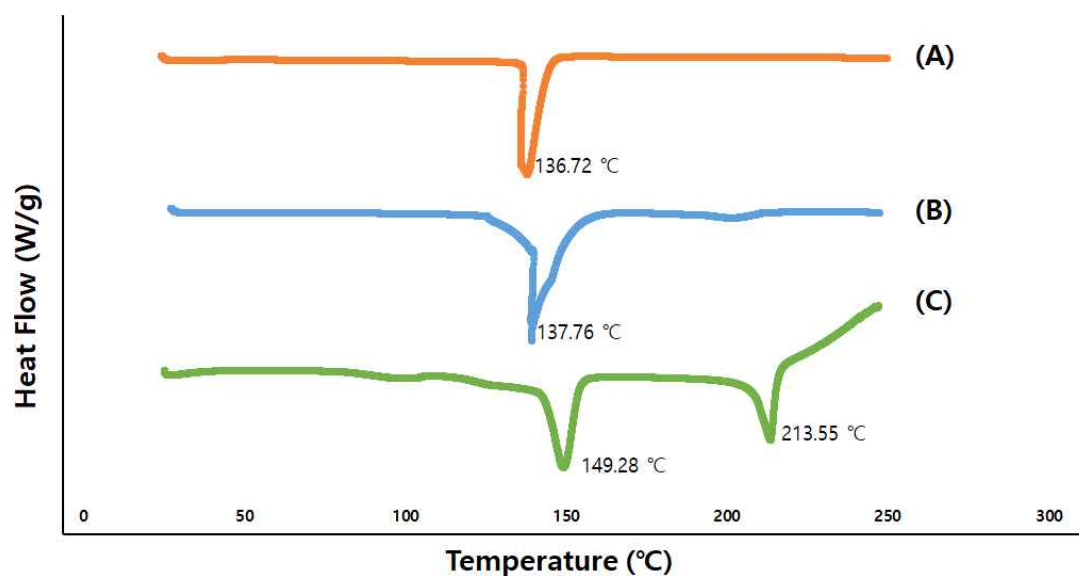


Figure 28. Thermal properties of kopexil, (A): Nano-niosome, (B): Kopexil nano-niosome, (C): Kopexil

3.2. 나노니오솜의 *in vitro* 경피흡수 측정

활성물질인 미녹시딜, 코팩실 나노니오솜에 대한 경피 흡수율을 확인하기 위해 Franz diffusion cell을 사용하여 37 ± 1 °C 조건에서 1, 2, 4, 8, 12, 24 h 간격으로 실험을 진행하였으며 그 후 샘플에 존재하는 활성물질의 양은 HPLC로 정량하였다. 경피 흡수율에 대한 데이터는 각각 **Table 12**, **Table 13**에, 그래프는 **Figure 29**, **Figure 30**에 나타내었다.

대조군과 실험품은 모두 미녹시딜을 함유하고 있으며 제형에 차이를 두었다. 대조군인 겔 제형 MG #5-1은 12 h 경과까지 흡수율을 보이지 않았으며 24 h 경과 후 membrane 면적 당 620.34 ± 1.54 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 의 흡수율을 보였다. 실험품인 나노니오솜 제형 MN #3-7은 4 h 경과부터 376.53 ± 3.98 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 8 h 경과 후 1054.47 ± 3.73 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 12 h 경과 후 1769.83 ± 33.81 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 24 h 경과 후 2106.46 ± 4.79 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 의 흡수율을 보였으며 최종적으로 대조군 MG #5-1보다 실험품 MN #3-7이 3배 높은 흡수율을 볼 수 있었다.

또한 대조군과 실험품 모두 코팩실을 함유하고 있으며 대조군인 겔 제형 KG #5-2는 8h 경과 후 16.32 ± 0.95 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 12 h 경과 후 106.86 ± 0.18 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 24 h 경과 후 211.80 ± 0.17 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 의 흡수율을 보였고 실험품인 나노니오솜 제형 KM #4-1은 4 h 경과 후 475.49 ± 13.83 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 8 h 경과 후 1237.46 ± 13.85 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 12 h 경과 후 2055.80 ± 1.18 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 24 h 경과 후 2360.23 ± 2.40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 의 흡수율을 보였으며 최종적으로 대조군 KG #5-2보다 실험품 KM #4-1이 대략 11배 높은 흡수율을 볼 수 있었다.

따라서 나노니오솜 제형이 경피흡수 향상에 도움을 줄 수 있을 것이라 판단되어진다.

다음, 미녹시딜 함유 나노니오솜 MN #3-7과 코팩실 함유 나노니오솜 KM #4-1의 경피 흡수율을 비교하였다. 그래프는 **Figure 31**에 나타내었다.

24 h 경과 했을 때 2106.46 ± 4.79 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 의 흡수율을 보여준 미녹시딜 함유 나노니오솜 MN #3-7보다 2360.23 ± 2.40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 의 흡수율을 보여준 코팩실 함유 나노니오솜 KM #4-1에서 유사하지만 조금 더 높은 흡수율을 보여주었다. 이는 분자량

이 경피흡수에 영향을 주는 것으로 판단되어진다.

Table 12. Percutaneous penetration efficiency ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) of MN #3-7, MG #5-1 ($37\text{ }^\circ\text{C}\pm 1$, mean \pm SD, $n=3$)

Sampling Site	Time (h)	MN #3-7	MG #5-1 (Control)
Receptor Phase	1	0	0
	2	0	0
	4	376.53 \pm 3.98 **	0
	8	1054.47 \pm 3.73 **	0
	12	1769.86 \pm 33.81 **	0
	24	2106.46 \pm 4.79 **	620.34 \pm 1.54 **

Table 13. Percutaneous penetration efficiency ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) of KN #4-1, KG #5-2 ($37\text{ }^\circ\text{C}\pm 1$, mean \pm SD, $n=3$)

Sampling Site	Time (h)	KN#4-1	KG#5-2 (Control)
Receptor Phase	1	0	0
	2	0	0
	4	475.49 \pm 13.83 **	0
	8	1237.46 \pm 13.85 **	16.32 \pm 0.95 **
	12	2055.80 \pm 1.18 **	106.86 \pm 1.73 **
	24	2360.23 \pm 2.40 **	211.80 \pm 3.62 **

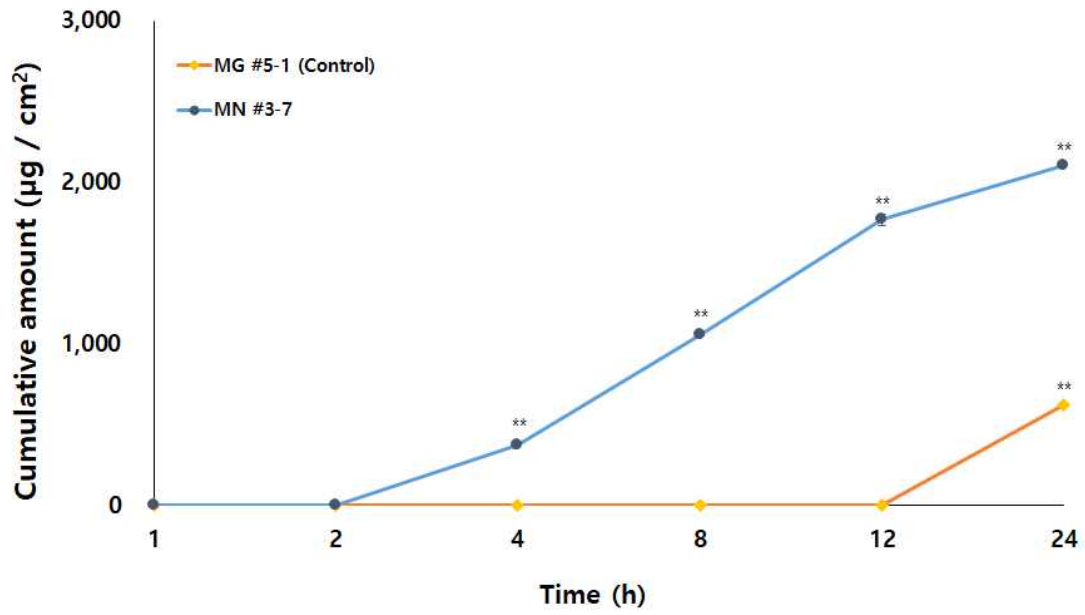


Figure 29. Percutaneous absorption efficiency ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) of MN #3-7, MG #5-1 at $37^\circ\text{C}\pm 1$ (*p*-value **p* < 0.05, ***p* < 0.01, *n*=3)

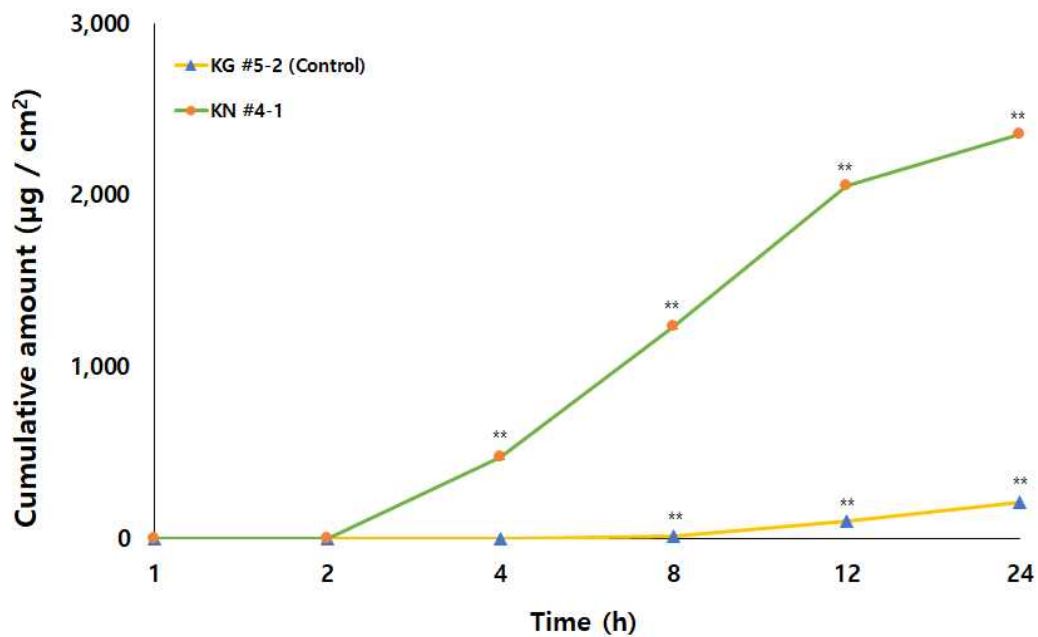


Figure 30. Percutaneous absorption efficiency ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) of KN #4-1, KG #5-2 at $37^\circ\text{C}\pm 1$ (*p*-value **p* < 0.05, ***p* < 0.01, *n*=3)

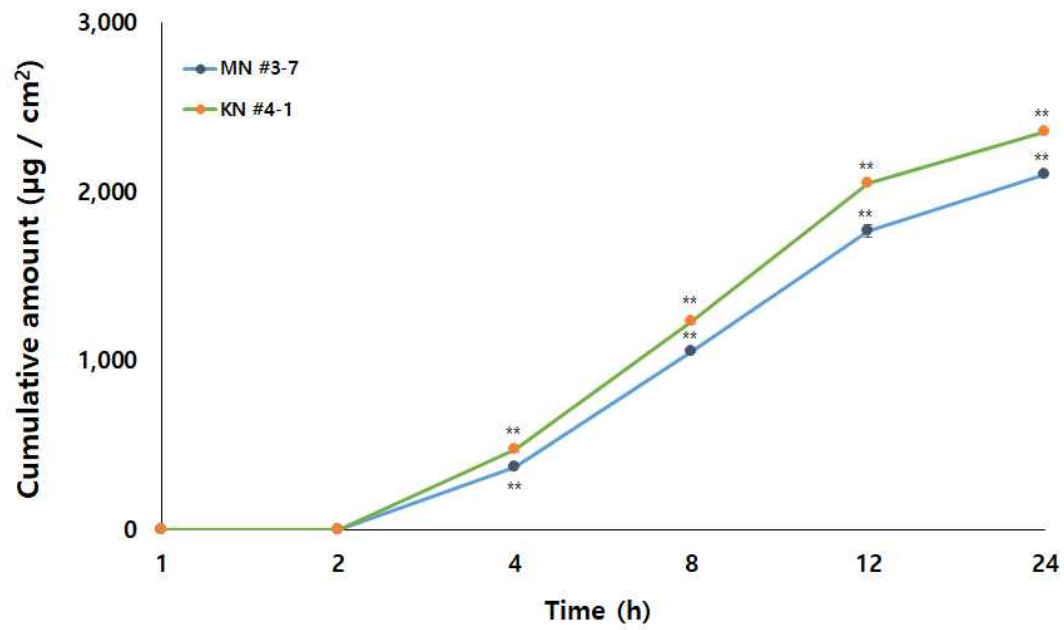


Figure 31. Percutaneous absorption efficiency ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) of MN #3-7, KN #4-1 at $37^\circ\text{C} \pm 1$ (*p*-value **p* < 0.05, ***p* < 0.01, *n*=3)

3.3. 약물 캡슐효율 측정

나노니오솜 내 포집되어 있는 미녹시딜, 코펙실의 캡슐효율을 측정하기 위해 원심분리기를 이용하였으며 분리된 상층액과 하층액을 취하여 HPLC로 분석하였다. 분리된 상층액은 약물(미녹시딜, 코펙실)이 나노니오솜 내 포획되지 않았음을 나타내며, 하층액은 약물이 나노니오솜 내 포획됐음을 나타낸다.

미녹시딜을 함유한 나노니오솜 MN #3-7의 캡슐효율은 $28.96 \pm 0.12\%$ 측정되었으며 비교적 낮은 캡슐효율을 보였지만 현미경 관찰 **Figure 24**와 DSC **Figure 27**의 데이터처럼 미녹시딜이 석출없이 잘 용해 되었음을 볼 수 있다. 코펙실을 함유한 나노니오솜 KN #4-1의 캡슐효율은 $65.17\% \pm 0.06$ 로 측정된 것을 볼 수 있었다(**Table 14**).

Table 14. Encapsulation efficiency (%) of MN #3-7, KN #4-1 (mean \pm SD, $n=3$)

	MN #3-7	KN #4-1
EE (%)	28.96 ± 0.12	30.50 ± 0.08
Pellet (%)	24.72 ± 0.03	29.24 ± 0.16
Supernatant (%)	58.39 ± 0.10	67.73 ± 0.11
Drug total (%)	85.36 ± 0.14	95.88 ± 0.05

3.4. 약물 방출 측정

나노니오솜 제형과 겔 제형의 대조군 내 미녹시딜, 코펙실에 대한 약물 방출 실험을 $37\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1$ 에서 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48 h 간격으로 Dialysis membrane을 이용하여 측정하였으며 약물 방출에 사용된 용액은 10% 메탄올과 PBS를 혼합하여 사용하였다. 시간 경과에 따른 누적 방출량을 **Figure 32**, **Figure 33**에 나타냈으며 데이터는 **Table 15**, **Table 16**에 나타내었다.

미녹시딜 함유 나노니오솜에서는 1 h에서 $19.25\pm 0.03\%$, 2 h에서 $33.36\pm 0.01\%$, 4 h에서 $46.59\pm 0.00\%$, 8 h에서 $52.79\pm 0.01\%$, 12 h에서 $54.53\pm 0.00\%$ 24 h에서 $55.52\pm 0.01\%$ 방출하는 것을 볼 수 있었으며 이 이후부터는 동일한 약물 방출이 일어나는 것을 확인할 수 있었다.

미녹시딜 함유 겔 제형의 대조군은 1 h에서 $16.36\pm 0.15\%$, 2 h에서 $44.06\pm 0.00\%$, 4 h에서 $67.26\pm 0.03\%$, 8 h에서 $78.02\pm 0.00\%$, 12 h에서 $79.62\pm 0.01\%$, 24 h에서 $80.71\pm 0.00\%$ 방출하는 것을 볼 수 있었으며 이 이후부터는 동일한 약물 방출이 일어나는 것을 확인할 수 있었다.

코펙실 함유 나노니오솜에서는 1 h에서 $51.92\pm 15.93\%$, 2 h에서 $57.54\pm 2.70\%$, 4 h에서 $63.39\pm 1.89\%$, 8 h에서 $65.04\pm 0.53\%$, 12 h에서는 동일한 방출, 24 h에서 $65.71\pm 0.22\%$ 방출하는 것을 볼 수 있었으며 이 이후부터는 일정한 양으로 방출되는 것을 확인할 수 있었다.

코펙실 함유 겔 제형의 대조군은 1 h에서 $67.35\pm 17.98\%$, 2 h에서 $81.24\pm 4.68\%$, 4 h에서 90.69 ± 2.62 방출되는 것을 확인하였으며 시간경과에 따라 방출되지 않는 것을 확인하였다.

따라서 미녹시딜, 코펙실 모두 겔 제형의 대조군 보다 나노니오솜 제형에서 약물방출이 상대적으로 천천히 일어나는 것을 볼 수 있었으며 약물을 전달하기에 적절한 제형이라 판단되어진다.

Table 15. Drug release (%) of MN #3-7 and MG #5-1 by dialysis membrane method (37°C±1, mean±SD, n=3)

Time (h)	MN #3-7	MN #5-1 (Control)
0	0.00±0.00	0.00±0.00
1	19.25±0.03	16.36±0.15
2	33.36±0.01	44.06±0.00
4	46.59±0.00	67.26±0.03
8	52.79±0.01	78.02±0.00
12	54.53±0.00	79.62±0.01
24	55.52±0.01	80.71±0.00
48	55.52±0.00	80.71±0.00

Table 16. Drug release (%) of KN #4-1 and KG #5-2 by dialysis membrane method (37°C±1, mean±SD, n=3)

Time (h)	MN #3-7	MN #5-1 (Control)
0	0.00±0.00	0.00±0.00
1	51.92±15.93	67.35±17.98
2	57.54±2.70	81.24±4.68
4	63.39±1.89	90.69±2.62
8	65.04±0.53	91.35±0.16
12	65.04±0.00	91.35±0.00
24	65.71±0.22	91.35±0.00
48	65.71±0.00	91.35±0.00

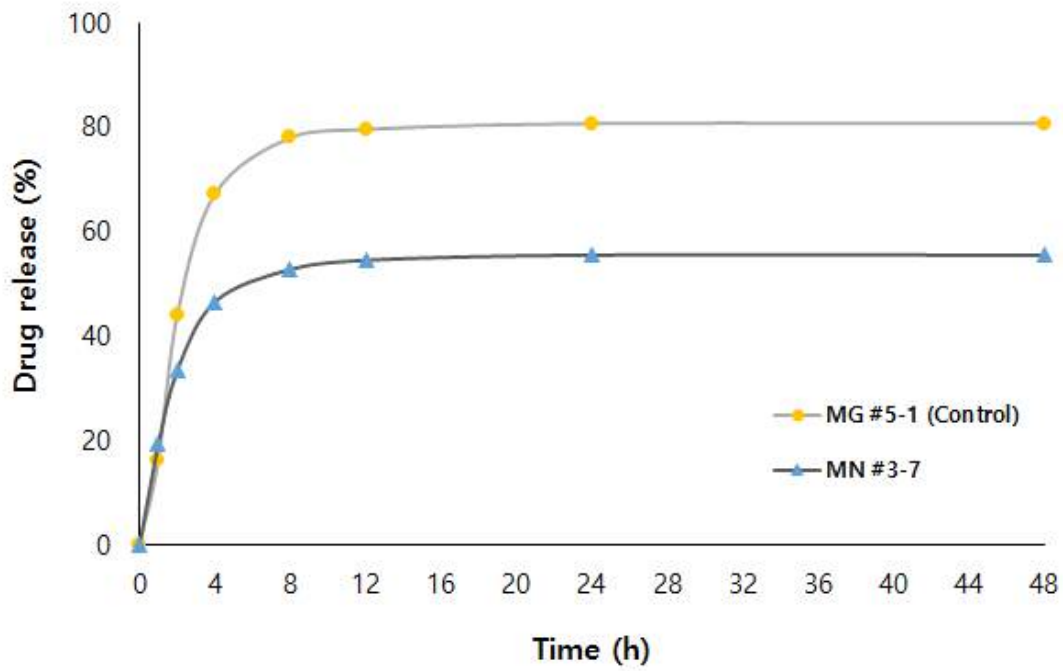


Figure 32. Drug release of MN #3-7 and MN #5-1 at 37°C±1 by dialysis membrane method for 48 h ($n=3$)

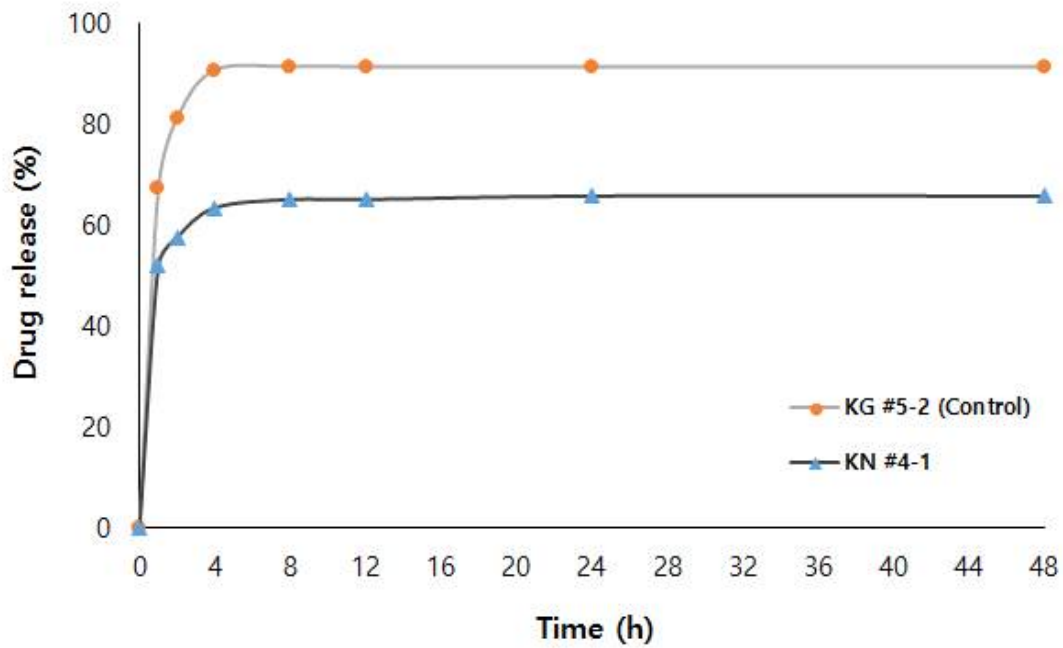


Figure 33. Drug release of KN #4-1 and KN #5-2 at 37°C±1 by dialysis membrane method for 48 h ($n=3$)

3.5. 나노니오솜 형상 관찰(TEM)

나노니오솜의 형상을 관찰하기 위해 KIST (Korea Institute of Science and Technology, Korea)를 통해 Cryo-TEM을 사용하여 측정하였다.

친유성 계면활성제 Sorbitan stearate만 사용하여 제조한 HLB 4.7인 상대적 가장 낮은 제형 MN #3-1과 친수성 계면활성제 Polysorbate 60만 사용하여 제조한 HLB 14.9인 상대적 가장 높은 제형 MN #3-4를 관찰한 결과, 모두 구형 구조임을 보였으며 MN #3-4는 HLB가 높음에도 불구하고 콜레스테롤의 첨가로 인해 소포가 형성된 것이라 볼 수 있다[20]. 니오솜 제조 시 상대적 낮은 HLB를 사용하면 콜레스테롤 없이도 소포형성이 가능하며, 약물에 대한 포집 또한 가능하다. 상대적 높은 HLB를 사용하면 콜레스테롤을 첨가해야만 소포형성을 이룰 수 있는 단점이 있지만[55], 약물에 대한 흡수가 증가한다는 장점이 알려져있다[56].

본 실험에서는 HLB가 높을 때 미녹시딜 원료에 대한 석출이 감소되는 것을 확인할 수 있었다.

입자는 200 nm 보다 훨씬 작은 입자크기를 볼 수 있었으며 입자가 SUV와 LUV의 중간 형태를 띠는 것을 확인 할 수 있었다[57]. 이를 통해 본 실험에서 진행된 제조방법을 통해 양호한 나노니오솜을 제조할 수 있었고 콜레스테롤을 첨가함으로써 친유성, 친수성 모두 나노니오솜의 형태를 띠는 것을 관찰할 수 있었다(Figure 34, Figure 35).

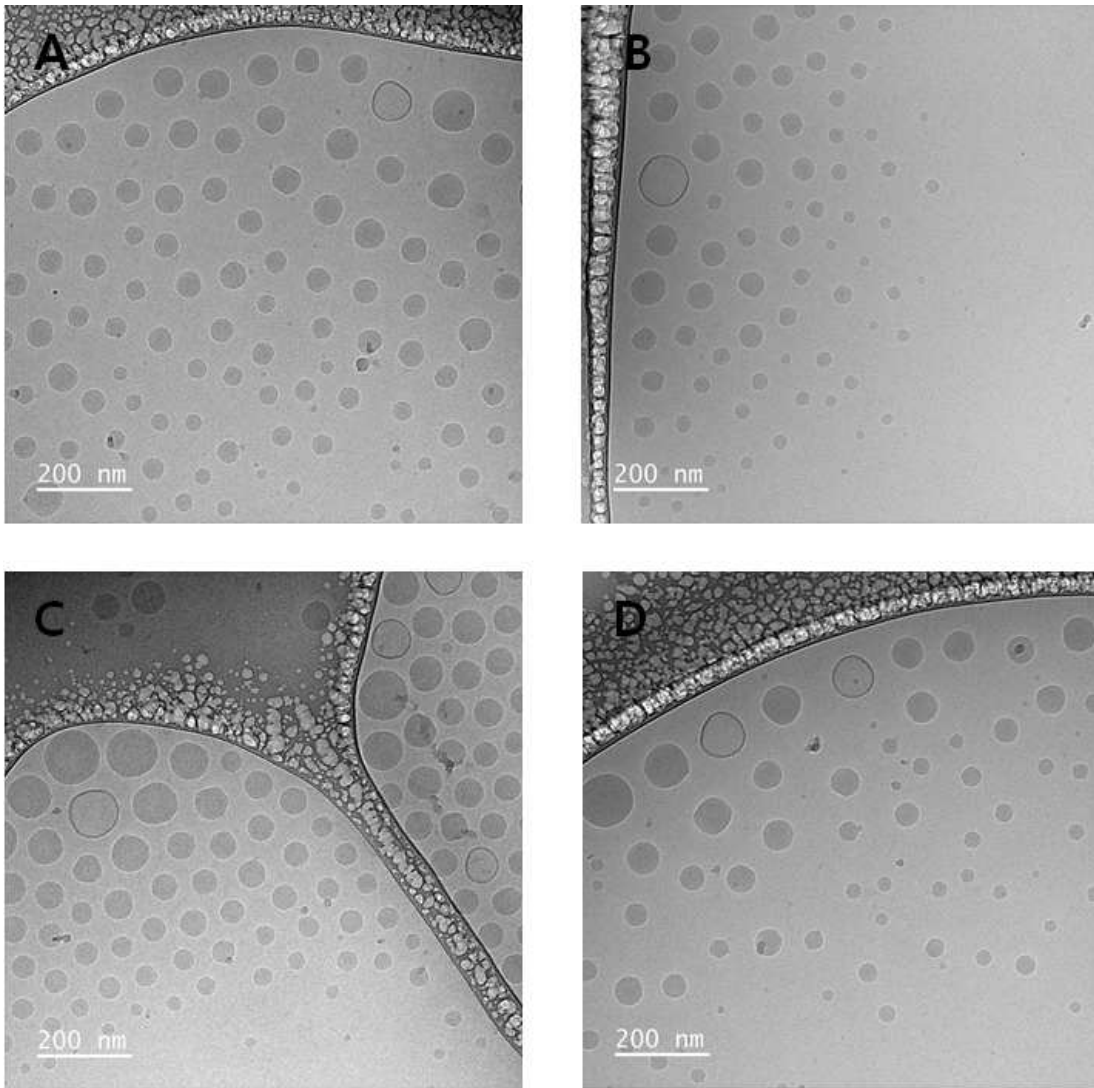


Figure 34. Cryo-TEM images of MN #3-1(HLB 4.7)

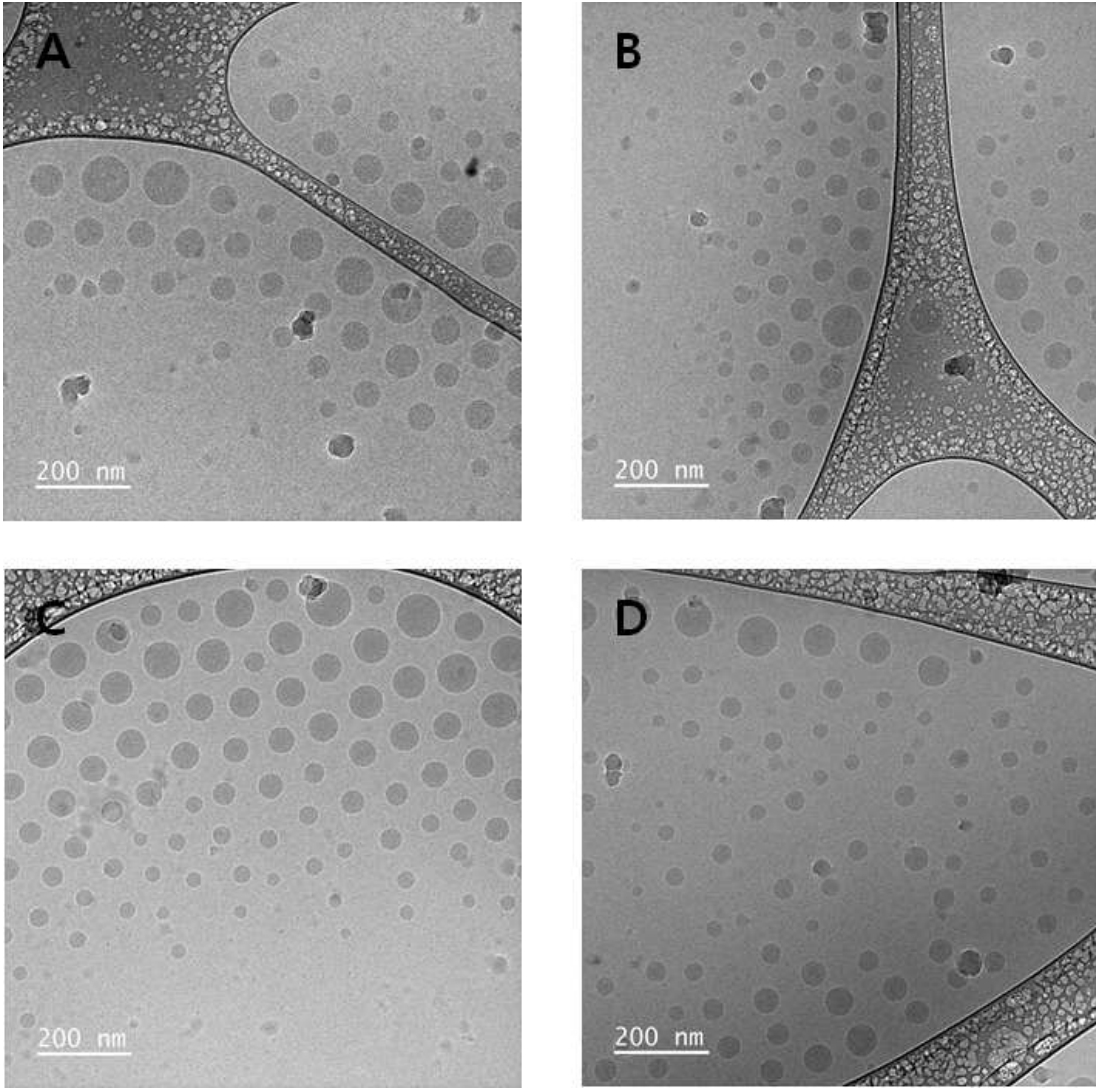


Figure 35. Cryo-TEM images of MN #3-4(HLB 14.9)

IV. 요약 및 결론

본 연구에서는 피리미딘 유도체인 의약품 원료 미녹시딜(Minoxidil)과 화장품 원료 코펙실(Kopexil)을 약물전달체(Drug delivery system)의 일종인 나노니오솜(Nano niosome)을 통한 경피흡수 비교에 대해 목적을 두고 실험을 진행하였다.

본 실험에서는 나노니오솜을 제조하기 위해 고압유화기(Nanodisperser)를 사용하였으며 나노니오솜 제조 후 제타사이저를 통해 25 °C에서 입자크기, PDI, 제타전위를 측정하여 물리화학적 특성 및 안정성을 보았다. 또한 계면활성제 HLB, Propylene glycol 함량, Potassium cetyl phosphate 존재에 따라 결정화 물질인 미녹시딜의 석출 여부를 판단하였으며 실험결과를 통해 미녹시딜은 Propylene glycol에 가장 잘 용해되며 상대적 높은 HLB 값을 가지는 제형, 음이온 계면활성제인 Potassium cetyl phosphate를 첨가하지 않은 제형에서 대체적으로 석출되지 않는 것으로 확인되었다.

이렇게 최적화된 조건으로 미녹시딜 나노니오솜 조건과 동일하여 코펙실 나노니오솜 제조 후, DSC 측정을 통해 결정성 물질인 미녹시딜이 나노니오솜 내부에 캡슐화 되어있는 것을 확인하였으며 코펙실 원료 또한 나노니오솜 내부에 캡슐화 되어있는 것을 확인할 수 있었다.

미녹시딜 나노니오솜과 코펙실 나노니오솜에 대해 경피 흡수율을 비교 및 관찰하였으며 겔 제형의 대조군과 나노니오솜 제형에 대한 경피 흡수율도 비교하였다. 겔 제형보다 나노니오솜 제형에서 3, 11배 이상의 높은 흡수율을 보였으며, 미녹시딜 나노니오솜과 코펙실 나노니오솜 경피흡수 비교 결과, 비슷한 경피 흡수율을 보였으나 코펙실 나노니오솜에서 조금 더 높은 흡수율을 보였다. 이는 미녹시딜의 분자량보다 코펙실의 분자량이 더 작으므로 흡수율에 약간의 차이가 나는 것으로 보여진다.

약물의 캡슐효율을 측정하였으며, 미녹시딜 나노니오솜에서는 $28.96 \pm 0.12\%$, 코펙실 나노니오솜에서는 $30.50 \pm 0.08\%$ 의 캡슐효율을 볼 수 있었다.

활성물질(미녹시딜, 코펙실)을 포함하고 있는 나노니오솜과 겔 제형인 대조군에서 약물 방출 실험을 진행하였으며 대조군보다 나노니오솜 제형에서 상대적으로

약물방출이 서서히 일어나는 것을 볼 수 있었다. 따라서 약물을 전달하기에 적절한 제형이라 판단된다.

또한 Cryo-TEM을 통하여 상대적 가장 낮은 HLB 값을 가지는 제형과 가장 높은 HLB 값을 가지는 제형에서 모두 나노니오솜 생성된 것을 볼 수 있었으며 SUV와 LUV 형태 중간임을 확인하였다.

결론적으로 이러한 실험을 통해 의약품으로 사용되는 미녹시딜과 화장품 원료인 코펙실을 나노니오솜 제형에 캡슐화시킴으로서 효과적인 약물전달을 기대할 수 있을 것이라 생각된다.

V. 참고문헌

- [1] J. Y. Chung, H. S. Han, The recent trend of percutaneous absorption used in cosmetics, *Kor. J. Aesthet. Cosmetol.*, 2014, 12(5), 597-605
- [2] H. E. Jin, J. H. Kim, I. Y. Paik, Transdermal drug delivery system, *J. Korean Ind. Eng. Chem.*, 2005, 16(1), 15-20
- [3] S. J. Yang, T. Y. Kim, C. M. Lee, K. S. Lee, K. S. Yoon, Study on the Stability of Biotin-containing Nano-liposome, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, 2020, 46(2), 133-145
- [4] T. I. Hyeon, K. S. Yoon, Skin Absorption and Physical Property of Ceramide-added Ethosome, *Journal of the Korea Applied Science and Technology*, 2021, 38(3), 801-812
- [5] M. S. Kim, K. S. Yoon, Stabilization of Tocopheryl Acetate of Swollen Micelle by Poloxamer, *The Korean Oil Chemists' Society*, 2019, 36(2), 609-622
- [6] S. K. Dubey, A. Dey, G. Singhvi, M. M. Pandey, V. Singh, P. Kesharwani, "Emerging trends of nanotechnology in advanced cosmetics", *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 2022, 214
- [7] L. Mu, R. L. Sprando, "Application of nanotechnology in cosmetics", *Pharmaceutical Research*, 2010, 27(8), 1746-1749

- [8] N. Filipczak, J. Pan, S. S. K. Yalamarty, V. P. Torchilin, “Recent advancements in liposome technology”, *Advanced drug delivery reviews*, 2020, 156, 4-22
- [9] A. Akbarzadeh, R. S. Rogaie, S. Davaran, S. W. Joo, N. Zarghami, Y. Hanifehpour, M. Samiei, M. Kouhi, N. K. Kazem, “Liposome: classification, preparation, and applications”, *Nanoscale Research Letters*, 2013, 8(1), 1-9
- [10] Z. Huang, X. Li, T. Zhang, Y. Song, Z. She, J. Li, Y. Deng, “Progress involving new techniques for liposome preparation”, *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2014, 9(4), 176-182
- [11] S. J. Purohit, M. Tharmavaram, D. Rawtani, P. Prajapati, H. Pandya, A. Dey, Niosomes as cutting edge nanocarrier for controlled and targeted delivery of essential oils and biomolecules, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 2022, 73
- [12] D. Kaur, S. Kumar, Niosome: Present Scenario and Future Aspects, *Journal of Drug Delivery & Therapeutics*, 2018, 8(5)
- [13] M. Gharbavi, J. Amani, H. K. Manjili, H. Danafar, A. Sharafi, Niosome: A Promising Nanocarrier for Natural Drug Delivery through Blood-Brain Barrier, *Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences*, 2018
- [14] S. Moghassemi, A. Hadjizadeh, Nano-niosomes as nanoscale drug delivery systems: An illustrated review, *Journal of Controlled Release*, 2014, 185, 22-36

- [15] C. Shuo, H. Sara, F. James, L. Michelle, W. Jingyuan, Recent advances in non-ionic surfactant vesicles (niosomes): Fabrication, characterization, pharmaceutical and cosmetic applications, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2019, 144, 18-39
- [16] P. Bhardwaj, P. Tripathi, R. Gupta, S. Pandey, Niosomes: A review on niosomal research in the last decade, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 2020, 56
- [17] X. Jin, D. A. Streett, C. A. Dunlap, M. E. Lyn, Application of hydrophilic - lipophilic balance (HLB) number to optimize a compatible non-ionic surfactant for dried aerial conidia of *Beauveria bassiana*, *Biological Control*, 2008, 46(2), 226-233
- [18] W. C. Griffin, Classification of surface-active agents by "HLB", *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 1949, 1, 311-326
- [19] W. C. Griffin, Calculation of HLB Values of Non-ionic Surfactants, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 1954, 5, 249-256
- [20] C. Marianecchi, L. D. Marzio, F. Rinaldi, C. Celia, D. Paolino, F. Alhaique, S. Esposito, M. Carafa, Niosomes from 80s to present: The state of the art, *Advances in Colloid and Interface Science*, 2014, 205, 187-206
- [21] I. F. Uchegbu, A. T. Florence, Non-ionic surfactant vesicles (Niosome): Physical and pharmaceutical chemistry, *Advances in Colloid Interface Science*, 1995, 58, 1-55

- [22] H. Jousma, J. G. H. Joosten, G. S. Gooris , H. E. Junginger, Changes of mesophase structure of BRIJ 96/water mixtures on addition of liquid paraffin, *Colloid and Polymer Science*, 1989, 267, 353-364
- [23] H. Jousma, J. G. H. Joosten, H. E. Junginger, Mesophases in mixtures of water and polyoxyethylene surfactant: Variations of repeat spacing with temperature and composition, *Colloid and Polymer Science*, 1988, 266, 640-651
- [24] L. Tavano, P. Alfano, R. Muzzalupo, B. de Cindio, Niosomes vs microemulsions: New carriers for topical delivery of Capsaicin, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2011, 87(2), 333-339
- [25] A. A. Kassem, Abd El-Alim, S. H., M. H. Asfour, “Enhancement of 8-methoxypsoralen topical delivery via nanosized niosomal vesicles: Formulation development, in vitro and in vivo evaluation of skin deposition”, *International Journal of Pharmaceutics*, 2017, 517(1-2), 256-568
- [26] R. Muzzalupo, L. Tavano, “Niosomal drug delivery for transdermal targeting: recent advances”, *Research and Reports in Transdermal Drug Delivery*, 2015, 4, 23-33
- [27] M. Masjedi, T. Montahaei, “An illustrated review on nonionic surfactant vesicles (Niosomes) as an approach in modern drug delivery: Fabrication, characterization, pharmaceutical, and cosmetic applications”, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 2021, 61

- [28] L. F. Uchegbu, S. P. Vyas b, Non-ionic surfactant based vesicles (niosomes) in drug delivery, *International Journal of Pharmaceutics*, 1998, 172(1-2), 33-70
- [29] M. Mokhtar, O. A. Sasmour, M. A. Hammad, N. A. Megrab, “Effect of some formulation parameters on flurbiprofen encapsulation and release rates of niosomes prepared from proniosomes”, *International Journal of Pharmaceutics*, 2008, 361(1-2), 104-111
- [30] L. Basiri, G. Rajabzadeh, A. Bostan, “ α -tocopherol-loaded niosome prepared by heating method and its release behavior”, *Food Chemistry*, 2017, 221, 620-628
- [31] G. M. Pablo, N. D. Machado, M. A. Fernández, B. L. María Carmen, M. Matos, G. Gutiérrez, “Effect of drug molecular weight on niosomes size and encapsulation efficiency”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2020, 186
- [32] N. B. Mahale, P. D. Thakkar, R. G. Mali, D. R. Walunj, S. R. Chaudhari, “Niosomes: Novel sustained release nonionic stable vesicular systems-An overview”, *Advances in Colloid and Interface Science*, 2012, 183-184(15), 46-54
- [33] E. J. Yang, Master’s Thesis Dissertation, Konkuk Univ., Seoul, Korea, 2003
- [34] E. Mayhew, R. Lazo, W. J. Vail, J. King, and A. M. Green, Characterization of liposomes prepared using a microemulsifier, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1984, 775(2), 169-174

- [35] M. S. Park, J. K. Park, G. W. Lee, M. K. Baek, and U. K. Jee, Preparation and evaluation of aclarubicin liposome using microfluidizer, *Yakhak Hoeji*, 1998, 42(3), 265-274
- [36] D. Carugo, E. Bottaro, J. Owen, E. Strider, and C. Nastruzzi, Liposome production by microfluidics: potential and limiting factor, *Sci. Rep.*, 2016, 6
- [37] A. Laouini, C. Jaafar-Maalej, I. Limayem-Blouza, S. Sfar, C. Charcosset, and H. Fessi, Preparation, characterization and applications of liposome: state of the art, *J. Colloid Sci. Biotechnol.*, 2012, 1(2), 147-168
- [38] M. Rajabi, S. A. Mousa, Lipid Nanoparticles and their Application in Nanomedicine, *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2016, 17, 662-672
- [39] M. R. Song, J. H. Mo, The Effect of Environment and Genetic Elements on Women's Alopecia, *Journal of the Korea Society of Design Culture*, 2010, 16(3), 256-261
- [40] Y. S. Kang, W. S. Kim, S. H. Hwang, W. Y. Lee, H. J. Park, A Study on the Relationship between Hair Conditions, Lifestyle and Alopecia, *J. Kor. Soc. Cosm.*, 2008, 14(4), 1098-1110
- [41] A. G. Messenger, J. Rundergren, "Minoxidil: mechanisms of action on hair growth", *British Journal of Dermatology*, 2004, 150(2), 186-194

- [42] P. Balakrishnan, S. Shanmugam, W. S. Lee, W. M. Lee, J. O. Kim, D. H. Oh, D. D. Kim, J. S. Kim, B. K. Yoo, H. G. Choi, J. S. Woo, C. S. Yong, "Formulation and in vitro assessment of minoxidil noisomes for enhanced skin delivery", *International Journal of Pharmaceutics*, 2009, 377(1-2), 1-8
- [43] A. Goren, T. Naccarato, "Minoxidil in the treatment of androgenetic alopecia", *Dermatologic Therapy*, 2018, 31(5)
- [44] J. E. Grice, S. Ciotti, N. Weiner, P. Lockwood, S. E. Cross, M. S. Roberts, "Relative uptake of minoxidil into appendages and stratum corneum and permeation through human skin in vitro", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2010, 99(2), 712-718
- [45] I. Rizwana, K. V. Prakash, G. K. Mohan, "Simultaneous Estimation of Minoxidil and Aminexil In Bulk and Pharmaceutical Formulations by RP-HPLC Method", *Oriental Journal of Chemistry*, 2015, 31(1), 277-284
- [46] H. J. Gwak, B. S. Jin, Preparation and Characterization of EGCG Entrapped Ethosome, *J. Korean. Ind. Eng.Chem.*, 2007, 18(2), 130-135
- [47] C. K. Kim, M. H. Min, K. H. Min, W. R. Lah, B. J. Lee, Y. B. Kim, Synthesis of N-Stearyl lactobionamide(N-SLBA) and preparation of Neo-galactosylated liposome, *Yakhak Hoeji.*, 1992, 36(2), 159-166

- [48] M. Danaei, M. Dehghankhoid, S. Ataei, F. Hasanzadeh Davarani, R. Javanmard, A. Dokhani, S. Khorasani, M. R. Mozafari, Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems, *Pharmaceutics*, 2018, 10(2), 57
- [49] J. Lee, G. Y. Chi, and J. Lim, Effect of fatty acid on the membrane fluidity of liposomes, *Appl. Chem. Eng.*, 2017, 28(2), 177
- [50] E. Yilmaz, 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.*, 2005, 60(1), 91
- [51] Y. P. Patil and S. Jadhav, Novel methods for liposome preparation, *Chem. Phys. Lipids.*, 2013, 177, 8-18
- [52] E. N. An, C. K. Kang, J. W. Kim, and B. S. Jin, Lipid-based vesicles as transdermal delivery system, *KIC News*, 2010, 13(4), 24
- [53] H. S. Jeon, E. S. Jo, M. S. Kim, M. H. Kang, D. H. Oh, and S. K. Lee, A retinyl palmitate-loaded solid lipid nanoparticle system: Effect of surface modification with dicetyl phosphate on skin permeation *in vitro* and anti-wrinkle effect *in vivo*, *International Journal of Pharmaceutics*, 2013, 452(1-2), 311-320
- [54] S. Uprit, R. K. Sahu, A. Roy, A. Pare, "Preparation and characterization of minoxidil loaded nanostructured lipid carrier gel for effective treatment of alopecia", *Saudi Pharmaceutical Journal*, 2013, 21(4), 379-385

- [55] M. Aranya, W. Paveena, M. Jiradej, S. Hideki, S. Fumio, Y. Makoto, and A. Masahiko, Characterization of vesicles prepared with various non-ionic surfactants mixed with cholesterol, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2003, 30(1-2), 129-138
- [56] Y. Morteza, H. Azadeh, B. Noushin, S. Soraya and D. Simin, The Impact of Surfactant Composition and Surface Charge of Niosomes on the Oral Absorption of Repaglinide as a BCS II Model Drug, *International Journal of Nanomedicine*, 2020, 15, 8767-8781
- [57] D. H. Bae and J. S. Shin, Silicone nanoemulsion stabilized with hydrogenated lecithin, *J. Korean. Ind. Eng. Chem.*, 2000, 11(5), 522-528