

L-ascorbic acid가 포집된 BGsome의 특성 및 안정화 효과

황수연 · 진병석[†]

동덕여자대학교 자연과학대학 응용화학과
(2011년 9월 2일 접수 ; 2011년 9월 19일 채택)

Characteristics of L-Ascorbic Acid Encapsulated BGsome and its Stabilization Effect

Sue-Yun Hwang · Byung-Suk Jin[†]

Department of Applied Chemistry, Dongduk Women's University,
Seoul 136-714, Korea
(Received September 2, 2011 ; Accepted September 19, 2011)

Abstract : Encapsulation of L-ascorbic acid(AA) into BGsome was attempted to improve its stability. BGsome is a bio-compatible vesicular system prepared by dispersion of hydrated liquid crystalline phase formed through hydration of 1,3-butylene glycol(BG)-dissolved lecithin with an aqueous solution containing hydrophilic component. The characteristics of AA encapsulated BGsome, such as droplet size, surface charge, and solution appearance, was investigated. The concentration of AA solution had considerable effect on droplet size and surface charge of BGsome. Several tens nanometer droplet made by sonication treatment did not showed any change of size with storage time. Stability of AA was improved by encapsulation into BGsome, which was verified through DPPH test and HPLC assay.

Keywords : BGsome, L-ascorbic acid, 1,3-butylene glycol, hydrated liquid crystalline vesicle.

1. 서론

약물이나 피부활성 물질 등을 인위적으로 만든 베시클(vesicle) 안에 포집(encapsulation)시켜 피부 투과를 용이하게 하는 경피전달 체계(transdermal delivery system)에 관한 연구가 활발히 진행되어 왔고 가장 대표적인 예로 리포솜(liposome)을 들 수 있다. 리포솜은 단순히 피부투과 뿐 아니라 물, 산소, 빛 등에 의해 쉽게 산화되는 불안정한 물질을 안정화시키고 리

포솜에 포집된 물질의 방출 속도를 필요에 따라 조절하는 기능으로 인하여 의약, 화장품, 식품 등에 오랫동안 널리 활용되어 왔다. 리포솜은 인지질이라는 생체 구성 성분으로 이루어져 생체 내에서 분해가 가능하고 독성이 없을 뿐 아니라 수용성 또는 지용성 성분 모두를 리포솜 내로 포집할 수 있는 등의 여러 장점을 지니고 있다. 하지만 리포솜은 막 자체의 물리적 불안정성, 리포솜 막을 구성하는 지질 류의 산화 및 가수분해 가능성, 제형상태에서의 유화 안정성 등의 여러 문제를 안고 있다. 이외에도 리포솜은 포집효율이 극히 낮고 정상 피부에서

[†]주저자 (E-mail : bsjin@dongduk.ac.kr)

는 리포솜의 피부투과 효능이 확실치 않는 등 리포솜 사용에 따른 효과가 제한적인 경우가 많았다. 이러한 문제들을 개선하기 위해 수많은 연구와 다양한 방법들이 시도되어 왔는데, 특히 일반적인 리포솜 대부분이 피부 속 깊이 침투하지 못하고 피부 각질층에 그대로 남게 된다는 많은 보고가 있따르자 이를 해결하기 위해 deformable vesicle이 고안되었다. 피부 각질층에서 각질세포 사이에 간격은 대략 수십나노 정도이기 때문에 최소한 수백 나노미터 이상의 크기를 갖는 리포솜과 일반적인 베시클이 이 간격 틈사이로 통과하기 어렵다. 따라서 베시클이 자체의 직경보다도 작은 구멍을 통과하기 위해서는 좀 더 유연하면서 탄력적으로 변형이 가능해야 하는데 이러한 원리를 적용하여 transfersome, ethosome 등의 명칭으로 deformable vesicle이 개발되었다.

G.Cevc 에 의해 개발된 transfersome은 인지질에 edge activator라고 일컫는 단일사슬의 계면 활성제를 혼합 구성하여 만들어진다[1,2]. Edge activator는 인지질과 함께 구형 소포체 막의 곡면을 구성하는데 인지질과 다른 곡률반경을 갖는 edge activator는 소포체의 지질 이중층 막을 약화시켜 소포체 막의 변형이 쉽게 일어날 수 있도록 유도한다[3]. Edge activator로는 sodium cholate, sodium deoxycholate, Span60, Span65, Span 80, Tween 20, Tween 60, Tween 80, dipotassium glycyrrhizinate 등이 사용되어 왔고 El Maghraby 등은 인지질과 여러 edge activator 간의 상호작용을 열분석을 통해 살펴면서 지질 이중층의 상전이 및 지질 이중층막 내에서의 edge activator의 배열위치와 역할을 분석한 결과를 발표하였다[4]. 이 후에는 Van den Bergh가 비이온 계면 활성제를 주성분으로 구성한 2세대 deformable vesicle을 선보였고 이 역시 여러 약물의 피부투과를 향상시키는데 효과적임을 Honeywell-Nguyen 등이 입증하였다[5-7]. Ethosome은 Touitou에 의해 개발되었는데 인지질을 에탄올에 녹여 물에 분산시켜 만든 지질구조체로 제조 과정에서 마이크로 플루다이버와 같은 특별히 강한 전단력을 가하는 장치를 사용하지 않고도 리포솜보다 작은 크기의 입자로 만드는 것이 가능하다[8,9]. 이전에도 소량의(전체 중 약 10~15%) 에탄올이나 프로필렌 글리콜을 첨가하여 만든 리포솜 형식의 유사한 사례[10]가 있었지만

ethosome은 에탄올 함유량에서 큰 차이가 난다. 에탄올은 전부터 피부투과 증진제로 많이 알려져 있기 때문에 에탄올을 지질과 함께 사용하여 베시클을 만들면 지질, 에탄올, 피부지질층 간 상호작용으로 인하여 약물의 피부투과에서 시너지 효과를 얻을 수 있게 된다. 이밖에도 에탄올은 여러 약물의 용해도를 높여 일반 리포솜에 비해 ethosome의 포집효율을 높이는 데도 크게 기여한다.

이들 베시클은 공통적으로 기존의 일반 리포솜에 비해 극단적 변형(ultra deformation)이 가능하여 표피의 각질세포 간 지질층 사이로 침투이동이 더욱 효과적으로 이루어지지만 유효성분의 포집효율이 그리 만족스럽지 못하거나 ethosome의 경우에는 물리적 안정성 낮고 또한 피부 자극이 높은 에탄올 성분을 비교적 많이 함유하는 문제가 지적되어 왔다. 이에 따라 본 연구진은 기존 ethosome 제조 방식과 약간 다르게 2단계 과정(수화과정과 분산과정)으로 수화 액정형 베시클을 만들어 에탄올의 함량을 최소화하면서 ethosome의 포집효율을 더욱 높이는 체계적 고찰을 시도하였다[11,12].

본 연구에서는 ethosome에서의 에탄올을 대신하여 피부 자극이 거의 없고 보습효과가 뛰어난 1,3-부틸렌 글리콜(butylene glycol)을 사용하여 새로운 형태의 수화 액정형 베시클(이하 BGsome) 제조를 시도하였다. BGsome에 생리활성 성분으로 항산화 효능이 뛰어난 L-ascorbic acid(AA)를 포집시킨 후 입자크기, 입자 안정성, 표면전하 등의 특성 등을 살펴보았다. 또한 수용액 상에서 쉽게 산화하는 불안정한 AA를 BGsome에 포집시켰을 때 산화가 지연되고 항산화 효능 유지에 얼마나 영향을 미치는지 살펴보았다.

2. 실험

2.1. 실험재료

본 연구에서 사용한 인지질은 soybean에서 추출한 지질을 수소 첨가시켜 불포화 성분을 없앤 레시틴(Lecithin)으로 PC(Phosphatidyl Choline)성분이 95% 이상인 Emulmetik 950(Lucas Meyer사)을 사용하였으며 편의상 명칭을 HPC(Hydrogenated Phosphatidyl Choline)로 나타내었다. 레시틴 용해에 사용되

는 1,3-부틸렌 글리콜(BG)과 베시클 내로 포집되는 수용성 물질인 L-ascorbic acid(AA) 등도 Sigma Chemical 회사의 시약을 사용하였다. HPC와 함께 BGsome 막을 구성하는 콜레스테롤(CH)과 토크페롤(TO), 항산화 시험에 쓰이는 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical 등도 모두 Sigma 제품을 사용하였다.

2.2. 사용기기

BGsome 입자 크기는 레이저 광산란 측정 장치인 PSS사의 Nicomp 380을 이용하여 측정하였다. 용액 속에 분산되어 있는 입자의 크기는 광 산란에 의해 측정되며 입자의 브라운 운동으로 확산이 일어날 때 입자의 확산계수는 입자 크기에 반비례한다는 원리를 이용하여 레이저로 입자의 확산계수를 구한 후 확산계수와 입자 크기와의 상관관계로부터 입자의 크기를 측정하게 된다. 입자의 표면전하를 살펴보기 위하여 Brookhaven사의 Zetaplus를 사용하여 zeta potential값을 측정하였다. DPPH 실험에서 Shimadzu의 UV-1650 모델인 UV-분광광도계를 사용하였고 AA의 성분 분석은 Jasco사의 HPLC(LC-2000series)로 측정 하였다. 이동상은 인산(Phosphoric acid, H_3PO_4) 수용액을 pH 2.48로 만들어 유속 1 ml/min로 운전하였고 C-18 컬럼(column)을 사용하였다. UV에서 AA의 흡수파장은 245 nm로 고정하였다. 이외에도 초음파 기기는 Sonics & Materials inc.의 VC505 모델(probe type)을 사용하였고 pH측정은 Metro Toledo의 MP220모델을 사용하였다.

2.3. BGsome 제조

HPC와 1,3-부틸렌글리콜 각각 1 g 씩을 둥근바닥 플라스크에 넣은 후 입구를 마개로 막고 65°C의 항온조에서 완전히 용해시켜 HPC가 등방성 상태로 투명한 졸 용액을 만든다. 투명한 졸 상태의 용액에 AA 수용액 적당량을 넣은 후 교반기를 이용하여 2분 이상 자석 교반시키면 용액은 겔 상태로 변하면서 백색의 수화 액정상(hydrated liquid crystalline phase)이 형성된다. 다음은 수화 액정상의 분산단계로 교반기를 계속 돌린 상태로 전단력을 가하면서 정량송액 펌프를 이용 증류수 60 ml 를 약 5 ml/min의 속도로 한 방울 씩 서서히 첨가하면 수화 액정상은 베시클 형태의 입자로 물속에 분산되는데 이 베시클 입자가 BGsome이다.

BGsome 입자가 분산된 현탁액을 항온조에서 상온으로 옮겨 약 1시간 정도 자석교반 하에 서서히 냉각시키며 베시클 액정을 안정화시킨다. 상온까지 냉각된 BGsome 입자의 현탁액에 초음파를 가하면 BGsome 입자는 더욱 작고 고르게 분산된다. Fig. 1에 BGsome 제조 과정을 요약하여 나타내었다.

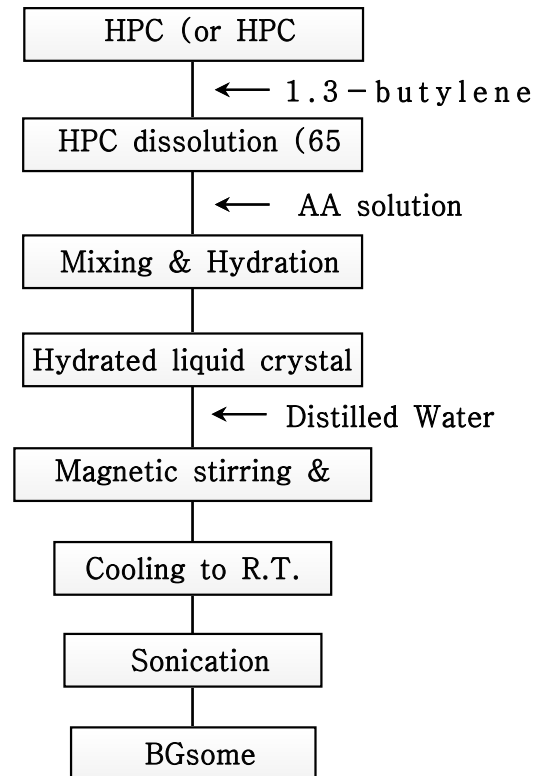


Fig. 1. Typical process scheme for the preparation of AA-encapsulated BGsome.

2.4. 산화 안정성 실험

AA가 BGsome에 포집되었을 때 AA의 산화 안정 효과는 DPPH 실험의 radical scavenging activity를 측정하여 판별하였다. DPPH 실험은 다음과 같은 방법으로 진행되었다. AA 수용액과 AA가 포집된 3종의 BGsome 현탁액을 40°C의 오븐에 보관하면서 매주 일정량을 채취한 후 BGsome 베시클 막을 용해시키기 위해 에탄올에 희석시킨다. 이 용액 각각 2ml 에탄올에 용해시킨 0.2mM DPPH 용액 1ml를 첨가

하여 섞은 후 실온에서 10 min 동안 반응 시킨 후 UV-vis spectrophotometer로 519 nm 에서 흡광도를 측정하여 다음 식에 따라 DPPH radical scavenging activity(%)를 구하였다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity(\%)} = \left(1 - \frac{S-B}{C}\right) \times 100$$

S : DPPH 용액에 시료를 첨가한 반응용액의 흡광도

B : 시료용액의 흡광도

C : DPPH 용액에 시료를 첨가하지 않은 반응용액의 흡광도 농도

3. 결과 및 고찰

레시틴과 같은 인지질을 소량의 용매에 녹였을 때 이 용액은 온도에 따라 액정으로 상전이가 일어나는 열방성 액정(thermotropic liquid crystal) 특성을 지니지만, 용매나 가해진 액체의 양에 따라서도 액정이 형성되는 유방성 액정(lyotropic liquid crystal) 특성도 지니게 된다. 본 연구에서 HPC를 65°C의 고온에서 용매인 부틸렌 글리콜에 완전히 용해시키면, HPC는 용액 속에서 등방성 상태(isotropic state)로 존재하여 용액이 투명해지고 이 투명한 용액을 상온까지 온도를 낮추면 열방성 액정이 형성되어 백색으로 변하게 된다. 65°C 온도에서 투명한 용액에 적당량의 AA 수용액을 첨가하게 되면 비용매성(non-solvent)인 물 분자에 의해 용매의 용해력이 떨어지면서 HPC 분자는 질서 정연한 배열구조를 갖게 되어 비등방성 상태(anisotropic state)가 된다. HPC 분자는 용매인 부틸렌 글리콜과 함께 층 구조(layer structure)를 형성하고 이러한 HPC층 사이에 AA 수용액이 포집된 라멜라 형태의 수화 액정상(hydrated liquid crystalline phase)이 형성된다. 이렇게 형성된 수화 액정상에 과량의 증류수를 서서히 첨가하면서 교반기를 이용해 전단력을 가하면 최종적으로 AA가 포집된 나노 크기의 베시클(vesicle)인 BGsome이 형성되어 증류수에 분산된다.

수화 액정상을 만드는 단계에서 첨가되는 AA 수용액의 농도에 따라 수화 액정상으로부터 형성되는 베시클 입자크기가 달라진다. Fig.

2는 AA 수용액의 농도를 6 mg/ml 에서 300 mg/ml 까지 변화시켰을 때 수용액 농도에 따라 BGsome 입자크기 변화를 나타낸 것이다. 저 농도보다는 고 농도 수용액을 첨가하였을 때 입자크기가 작아지고 특히 150 mg/ml 이상의 농도에서는 단순한 교반으로만 100 nm 이하의 작은 입자가 형성되었다. 이런 현상에 대해서는 AA의 hydrotrope 작용과 관련지어 생각할 수 있다[13]. AA는 전자가 풍부한 카르보닐 산소를 지니고 있고 이는 HPC choline기의 + 전하와 결합하여 수용액 상에서 HPC의 용해도를 높이게 된다. 수화액정의 구성 성분인 HPC가 물과의 친화력이 클수록 액정 베시클은 더욱 작게 분산이 가능해진다. 베시클을 의약이나 화장품 등의 제형에 경피 전달체로 활용한다면 베시클이 가능한 한 유효성분을 많이 포집하고 입자크기가 작을수록 활용 가치가 크게 된다. 따라서 AA는 포화 용해도에 가까운 300 mg/ml 의 농도로 수용액을 만들어서 BGsome 제조에 첨가하는 것이 바람직하다.

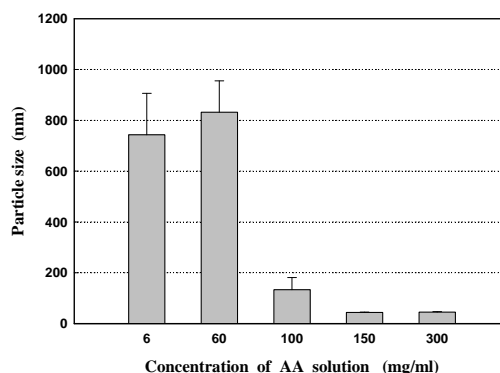


Fig. 2. Change of BGsome particle size with concentration of L-ascorbic acid solution.

교반기에서 제조된 BGsome 현탁액에 초음파를 가했을 때 BGsome 입자 크기와 현탁액 외관의 변화를 Fig. 3과 4에 각각 나타내었다. 초음파 기기는 probe type을 사용하였고 주어진 시간 동안 3초 pulse on, 1초 pulse off, amplitude 30%로 맞추어 작동시켰다. 그림에서와 같이 수용액의 농도에 상관없이 2분 정도의 초음파를 가하면 모두 입자 크기가 50 nm 정도로 작아지는 것을 확인할 수 있다. BGsome 현탁액에 초음파를 가하면 가시광선 파장의

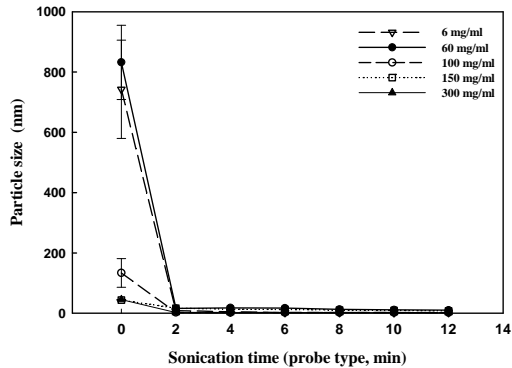


Fig. 3. Change of BGsome particle size with sonication time.

발생하고 몇 주 후에는 입자의 크기가 점점 커지는 현상이 일어났지만 초음파를 가한 BGsome 현탁액에서는 시간이 경과한 후에도 입자크기가 변하지 않고 처음과 같은 상태를 안정하게 유지하고 있었다. 초음파를 가하면 BGsome입자들은 수십 나노 크기로 비교적 고른 입자 분포를 갖게 되고 이런 작은 입자들은 입자 간 인력이나 중력의 영향을 벗어나 현탁액 내에서 보다 자유롭게 브라운 운동(Brown motion)을 하게 된다. 이렇게 활발히 브라운 운동을 하는 입자들은 입자 간 서로 가까이 접촉할 기회가 없기 때문에 침강, 응집, 합일 등에 의한 입자크기 변화가 일어나지 않는다.

AA의 농도에 따른 BGsome입자의 표면전하 변화를 zeta-potential 값으로 측정하여 Fig. 6

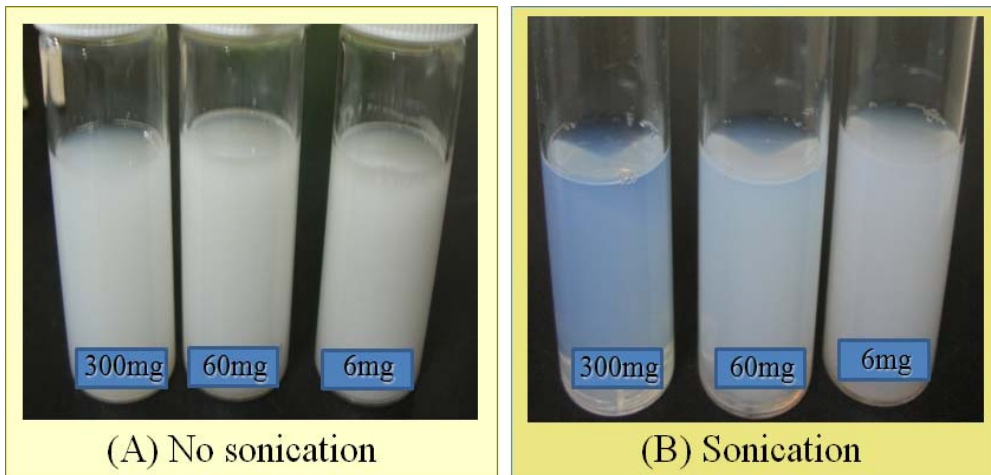


Fig. 4. Sonication effect on the appearance of BGsome suspension.

1/4 인 100 nm 이하로 입자크기가 작아지면서 입자 분포도 비교적 고르게 분산되기 때문에 백색의 불투명했던 현탁액이 반투명해지면서 블루밍 효과가 나타나게 된다. 베시클과 같은 작은 입자들이 분산되는 현탁 콜로이드 용액에서 입자가 불안정한 경우에 침강, 응집(flocculation) 및 합일(coalescence)등의 현상이 일어나 시간이 지나면서 분산된 입자의 크기가 커지게 된다. Fig. 5는 BGsome이 분산되어 있는 현탁액에서 4주 동안에 입자의 크기 변화를 살펴본 것이다. 교반으로만 제조된 BGsome 현탁액에서는 시간이 경과하면서 입자의 침강이

에 나타내었다. 그림에서 순수한 물(0 mg/ml)로 수화시켜 BGsome을 만든 경우, zeta-potential값은 약 -20 mV 정도의 마이너스 값을 갖지만 AA 수용액을 수화시켜 BGsome을 만든 경우, 수용액의 농도가 증가할수록 zeta-potential 값은 마이너스 값에서 점점 증가하면서 플러스 값을 나타내게 된다. 이런 결과들은 이전의 다른 논문들 발표를 종합해 볼 때 다음과 같이 설명된다[14,15]. BGsome 입자 표면에 위치한 HPC의 극성머리 부분은 phosphatidyl기와 choline기에 의해 - 와 + 전하 모두를 지니고 있지만 이온이 거의 없는 순

수한 물에서 극성머리 부분은 지방산 꼬리 쪽을 향해 굽어지고 이때 choline기의 +전하는 지방산에 가려지므로 BGsome 입자 표면은 상대적으로 음전하를 띠게 된다. AA가 포집된 BGsome의 경우에는 AA 수용액 농도를 6에서 300 mg/ml 까지 증가시킬 때 전체 현탁액의 pH는 4.15에서 2.93까지 내려갔다. 용액이 산성일수록 수소이온(H⁺)이 많이 존재하여 음전하를 띠는 BGsome 입자표면에 위치하기 때문에 순수 물에서 마이너스 값을 보였던 BGsome 표면 전하가 용액이 산성으로 변할수록 플러스 값으로 변하게 된다.

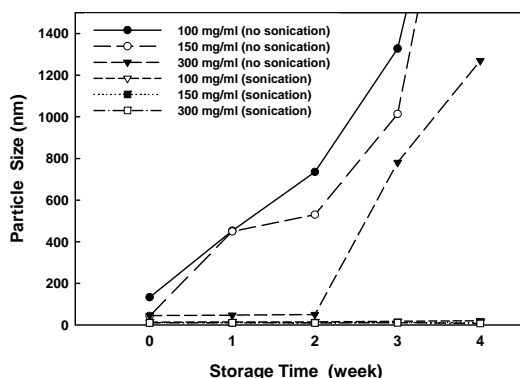


Fig. 5. Change of particle size with storage time.

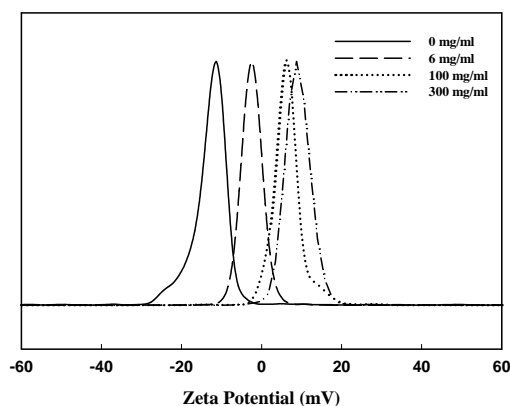


Fig. 6. Effect of AA solution concentration on the zeta potential of BGsome vesicles.

AA는 항산화제로 널리 사용되지만 수용액 상에서 쉽게 산화가 일어나는 불안정한 물질이

기 때문에 AA를 BGsome에 포집시켰을 때 안정화되는 효과를 실험을 통해 확인하여 보았다. DPPH 항산화 실험을 이용하여 시간 경과에 따라 AA 항산화능 변화를 살폈고 또한 HPLC를 이용하여 시간이 경과한 후에도 산화되지 않고 잔존하는 AA양을 측정하였다. Fig. 7은 40°C 오븐에서 보관된 여러 시료의 DPPH 라디칼의 소거활성 SC50 값의 변화를 나타낸 것으로 AA를 포집한 3종류의 BGsome 현탁액- HPC 단독(BG)과 HPC에 콜레스테롤(CH) 또는 토코페롤(TO)을 각각 10% 혼합-을 만들고 이를 AA 수용액과 비교하였다. AA 수용액은 2주가 지나면서 부터 SC50 농도가 크게 증가하면서 항산화능이 떨어지는데 반해 AA를 BGsome에 포집시킨 경우는 HPC 지질 구성종류에 상관없이 4주 동안 항산화능이 큰 변화 없이 일정하게 유지됨을 알 수 있다. 이러한 결과는 수용액 상태로 있는 AA는 외부 산화 요인들에 직접 노출되어 산화에 의한 가수분해 반응이 자유롭게 진행될 수 있는데 반하여 BGsome에 포집된 경우는 AA가 분자 간 규칙적 배향을 갖는 액정 구조 속에 갇힘으로써 상대적으로 분자의 운동이 자유롭지 못하고 산소 등과 같이 산화를 촉진하는 반응 인자와의 접촉이 제한되기 때문에 항산화능을 그대로 유지하게 된다. 시간이 경과 후에도 산화되지 않고 남아있는 AA 농도를 HPLC로 측정해본 결과 수용액에서는 40°C 온도에서 4주 후에 산화되지 않고 남아있는 AA의 양은 20%정도에 불과하였다. 이에 반하여 BGsome에 포집되어 있을 경우는 4주 후에도 70~80%의 AA가 남아있는 것을 확인할 수 있었다. 4주 후에 20 내지 30%의 AA가 산화 되었는데도 불구하고 DPPH 실험에서 항산화능이 처음과 거의 동일하게 유지되는 결과는 다음과 같이 설명된다. AA 산화과정의 메커니즘을 살펴보면 AA는 탈수소화 가역반응으로 dehydro-L-ascorbic acid(DHA)가 되고 이는 다시 비가역 과정으로 가수분해를 일으켜 2,3-diketogulonic acid(DKG)가 된다. DHA는 AA의 산화형 물질이지만 AA의 활성 효능을 유지하는 것으로 알려지고 있다. 따라서 4주 후에 AA의 일부분이 DHA로 산화가 진행되었을 경우에 HPLC에서 AA 농도 감소로 측정되지만 DPPH 실험에서 항산화 효능은 그대로 유지할 수가 있다.

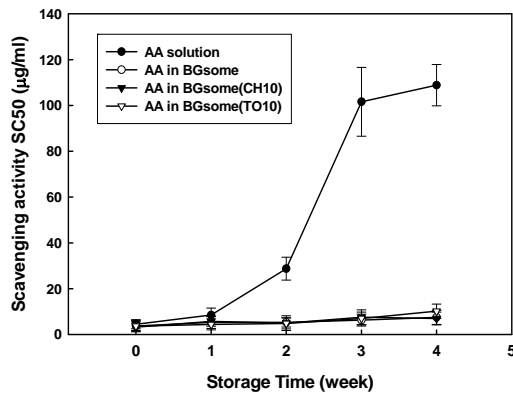


Fig. 7. Change of Free radical scavenging ability of AA solution and AA in BGsome with storage time (DPPH test).

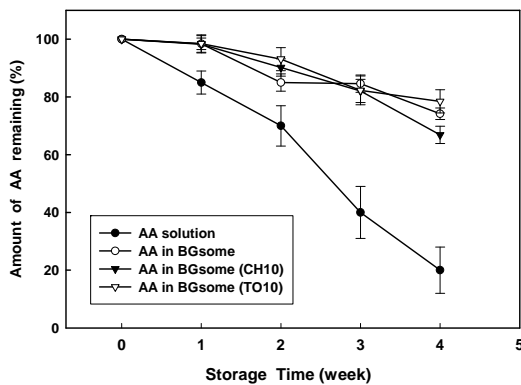


Fig. 8. Change of AA remaining (%) with storage time (by HPLC).

4. 결론

생체막의 주요성분인 레시틴을 부칠렌 글리콜에 용해시킨 후 AA 수용액으로 수화시켜 만든 액정을 물속에 분산시키는 과정을 통해 생체 친화적인 수화 액정형 베시클인 BGsome을 만들 수 있다. 베시클에 포집되는 AA 수용액 농도가 높을수록 크기가 작은 BGsome 입자가 형성되고 초음파와 같은 강한 진단력을 가하면 수십 나노크기의 안정한 상태의 입자가 형성되었다. 순수 물을 포집시킨 BGsome 입자의 표면전하는 - 전하 값을 나타내지만 AA를 고농

도로 포집시킬수록 BGsome 입자의 표면전하는 + 전하 값으로 변하게 된다. AA를 BGsome에 포집시킨 후 40°C 온도에서 4주 간 보관하면서 산화에 대한 안정성을 살펴본 결과 약간의 산화는 일어나지만 항산화 효능은 처음과 거의 동일하게 유지됨을 확인할 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 2010년 동덕여자대학교 학술연구비 지원에 의해 이루어 졌으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. G.Cevc and G.Blume, Lipid vesicles penetrate into intact skin owing to the transdermal osmotic gradients and hydration force, *Biochim. Biophys. Acta*, **1104**, 226 (1992).
2. G.Cevc, Transfersomes, liposomes and other lipid suspensions on the skin: permeation enhancement, vesicle penetration, and transdermal drug delivery, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, **13**, 257 (1996)
3. M.A. Elsayed et al., Lipid vesicles for skin delivery of drugs : reviewing three decades of research, *Int. J. Pharm.*, **332**, 1 (2007)
4. G.M. El Maghraby, A.C. Williams, and B.W. Barry, Interaction of surfactant and skin penetration enhancers with liposomes, *Int. J. Pharm.* **276**, 143 (2004).
5. B.A. van den Bergh et al., Elasticity of vesicles affects hairless mouse skin structure and permeability, *J. Cont. Rel.* **62**, 367(1999).
6. P. L. Honeywell-Nguyen, P.M. Frederik, P.H. Bomans, H.E. Jungin,ger, and J.A. Bouwstra, Transdermal delivery of pergolide from surfactant based elastic and rigid vesicles, *Pharm. Res.* **19**, 991 (2002).

7. P. L. Honeywell-Nguyen, J.A. Bouwstra, The in vitro transport of pergolide from surfactant based elastic vesicles through human skin, *J. Cont. Rel.* **86**, 145 (2003).
8. E. Touitou, N. Dayan, L. Bergelson, B.Godin, and M. Eliaz, Ethosomes - novel vesicular carriers for enhanced delivery : characterization and skin penetration properties, *J. Cont. Rel.* **65**, 403 (2000).
9. E. Touitou, B. Godin, and C. Weiss, Enhanced delivery of drugs into and across the skin by ethosomal carriers, *Drug Dev. Res.* **50**, 406 (2000).
10. M. Foldvari, A. Gesztes, M. Mezei, L. Cardinal, I. Kowalczyk, and M. Behl, Topical liposomal local anesthetics : design, optimization and evaluation of formulations, *Drug Dev. Ind. Pharm.* **19**, 2499 (1993).
11. B.S. Jin, S.M. Lee, and K.H.Lee, A study on the factors affecting entrapment efficiency and particle size of ethosomes, *J. Kor. Ind. Eng. Chem.* **17(2)**, 138 (2006).
12. H.J. Gwak, and B.S. Jin. Preparation and characterization of EGCG entrapped ethosome, *J. Kor. Ind. Eng. Chem.* **18(2)**, 130 (2007).
13. W.Yu, A.Zou, and R.Guo, Hydrotrope and hydrotrope-solubilization action of Vitamin C, *Colloids and Surfaces*, **167**, 293 (2000).
14. K.Makino, T.Yamada, M. Kimura, T. Oka, and H. Ohshima, Temperature and ionic strength induced conformational changes in the lipid head group region of liposomes, *Biophys. Chem.*, **41**, 175 (1991).
15. M. N. Jones, The surface properties of phospholipid liposome systems and their characterization, *Adv. in Colloid and Interface Science*, **54**, 93 (1995).