

세라마이드 IIIB와 각질층 지질을 함유한 나노에멀전의 거동

조 완 구[†] · 김 경 아 · 장 선 일* · 조 병 옥*

전주대학교 의과대학 바이오기능성식품학과

*전주대학교 의과대학 보건관리학과

(2018년 2월 23일 접수, 2018년 3월 6일 수정, 2018년 3월 7일 채택)

Behaviour of Nanoemulsions Containing Ceramide IIIB and Stratum Corneum Lipids

Wan Goo Cho[†], Kyung Ah Kim, Seon Il Jang*, and Byoung Ok Cho*

Dept. of Functional Foods & Biotechnology, College of Medical Science, Jeonju University, 303 Cheonjam-ro,
Wansan-Gu, Jeonju-si, Jeonbuk-do 55069, Korea

*Dept. of Healthcare & Science, Jeonju University, Jeonbuk-do 55069, Korea

(Received February 23, 2018; Revised March 6, 2018; Accepted March 7, 2018)

요 약: 오일/정제수(O/W) 나노에멀전은 피부의 투과성을 변화시키는 효과적인 매개체이다. 본 연구에서 우리는 콜레스테롤, 팔미틴산과 같은 피부 각질층 지질과 세라마이드 IIIB (CIIIB)의 피부 적용을 위한 콜로이드성 운반체 역할을 하는 나노에멀전의 제조와 특성화에 초점을 두었다. 나노에멀전을 최적화하기 위해, 입자 크기, 나노에멀전 안정성 및 CIIIB의 용해도와 관련하여 유화 공정 조건을 검토하였다. 80 °C의 유화 온도 및 PIC (phase inversion composition) 유화법을 통해 입자 크기의 감소가 관찰되었다. CIIIB는 오일 및 물에 대한 용해도가 낮다. CIIIB의 농도가 증가하면 나노 에멀전의 입자 크기가 증가하였다. Lipoid S75-3을 오일 상에 첨가하면 CIIIB의 용해도가 증가하여 DSC 측정에서 보여주는 일부 상호 작용을 나타냈다. CIIIB와 피부 각질층 지질은 결정화 또는 물리적 불안정성 없이 성공적으로 나노 에멀전에 혼입될 수 있었다. 결론적으로, 피부 각질층 지질을 함유하는 안정한 나노 에멀전은 피부를 위한 효과적인 보습 시스템으로서 효과적일 수 있다.

Abstract: Oil/water (O/W) nanoemulsions are effective vehicles to change the permeability of the skin. In this study, we focused on the preparation and characterization of nanoemulsion which serve as colloidal carriers for the dermal application of ceramide IIIB (CIIIB) and stratum corneum (SC) lipids such as cholesterol, and palmitic acid. In order to optimize the nanoemulsions, emulsification process conditions were conducted with regard to droplet size, nanoemulsion stability, and solubility of CIIIB. A decrease in droplet size was observed through emulsification temperature of 80 °C and phase inversion composition (PIC) method. CIIIB has low solubility in oil and water. When the concentration of CIIIB was increased, the droplet size of nanoemulsion was increased. When Lipoid S75-3 was added to the oil phase, the solubility of CIIIB increased, indicating some interactions shown in DSC measurements. CIIIB and SC lipids could be successfully incorporated in nanoemulsions without crystallization or physical instability. In conclusion, a stable nanoemulsion containing the SC lipids could be effective as an efficient moisturizing system for skin.

Keywords: ceramides, stratum corneum lipid, nanoemulsion, PIC, HLB

† 주 저자 (email: wgcho@jj.ac.kr)
call: 063)220-2064

1. 서 론

피부는 조직학적으로 표피, 진피 및 피하 지방조직의 세 층으로 구성된다. 표피에서 가장 최외각의 각질층은 각화 세포와 피부 지질로 구성되며 피부 지질은 피부 장벽 역할을 수행한다[1]. 피부 지질에서의 피부 장벽 기능을 담당하는 주요 지질은 표피 각질 세포의 분화에 의해 생성된 지질이다. 이 지질은 분화된 각화 세포 사이의 공간을 채운다. 이 지질은 주로 세라마이드, 콜레스테롤 및 유리 지방산으로 구성되며 전체 각질층의 약 40-65%, 10% 및 25%를 각각 차지한다. 또한 소량의 피토스핑고신과 스핑고신이 함께 존재한다[2,3]. 세라마이드는 수분의 증발을 억제하고 수분과 결합하여 피부의 수분을 흡수하여 최적의 대사 기능을 수행하는 최적의 환경을 제공하는 것으로 알려져 있다.

나노에멀전은 입자 크기가 20-200 nm 정도이므로 반투명 한 외관을 가진다[4,5]. 마이크로에멀전과는 달리, 나노에멀전은 열역학적으로 안정하지는 않지만 오랜 시간 동안 안정할 수 있고 계면활성제가 마이크로에멀전과는 달리 저농도로 함유되어 제약, 화장품 및 농업 분야에서 광범위하게 응용될 수 있다[6-8]. 일반적으로 나노에멀전은 전단력이 있는 혼합기를 이용하여 고 에너지 부여함으로써 제조된다[9]. 그러나 최근에는 PIC (phase inversion composition) 및 자발적 유화 방법과 같이 저에너지를 이용한 유화 방법이 관심의 대상이 되고 있다. 이러한 방법은 미세 입자 크기를 보유한 나노에멀전의 제조에 유용하게 사용될 수 있다[10-12].

본 연구에서는 일반적으로 오일과 정제수에 대한 용해도가 낮은 세라마이드 IIIB (CIIIB)와 다양한 각질층의 지질 성분을 함유하는 나노에멀전을 저에너지 PIC 법을 이용하여 O/W 나노에멀전을 제조하고, 계면 활성제 농도, 계면활성제의 HLB 값, 유화 온도 및 지질 구성 성분의 변화 등에 의한 나노에멀전의 거동과 특성을 입도 분포 측정기와 DSC 측정 장치를 이용하여 관찰하였다.

2. 실험

2.1. 시약

사용된 시료는 Table 1에 나타난 것과 같은 화장품

용 등급의 원료를 사용하였다. 증류수는 Milli Q (Millipore Co., Milford, MA, USA) 장치를 통과시킨 것을 사용하였다.

2.2. 실험 방법

2.2.1. O/W 나노에멀전의 제조

나노에멀전은 PIC (phase inversion composition)법으로 제조하였다. 먼저, 오일과 지질 성분을 Tween 80과 Span 80을 포함한 유화제와 함께 80 °C에서 유상으로 용해시켰다. 그 다음 EDTA-2Na를 정제수에 용해하여 수용액상을 제조하였다. 에멀전을 자석 교반기(모델명: HSD 180, 미성과학, 한국)를 사용하여 400 rpm으로 교반하면서, 수용액상을 80 °C에서 10 mL/min의 속도로 오일상에 첨가하였다. 유화가 완료되면, 샘플을 수조에서 실온으로 냉각시켰다. 나노에멀전은 Table 2와 같이 구성하였다.

2.2.2. 장기 안정성 실험

평균 입경과 분포도는 dynamic light scattering 방법을 활용한 입자측정기(ELS-8000, Otsuka, Japan)를 사용하여 에멀전을 희석하지 않고 실온에서 평균 입자 크기 및 분포를 측정 하였다. 측정시의 산란각은 90°였다. 시험 시간을 줄이기 위해 실온에서 4주 동안 에멀전을 보관하여 시험을 수행하였다. 최적화된 에멀전의 장기 안정성을 평가하기 위해 제타 전위, 평균 입자 크기 및 크기 분포를 4주 동안 관찰하였다. Zetasizer 4 (Malvern Instruments, Worcestershire, UK)를 사용하여 표면 전하를 측정하여 제타 전위(ZP)를 측정하였다. 측정은 NaCl, HCl 및 NaOH가 함유된 수용액으로 pH (pH 미터 모델 pH 522, WTW, 독일) 및 전기 전도도(50 mS/cm, Accumet AP85; Fisher Scientific, Pittsburgh, USA)를 조정하였다. CIIIB와 계면활성제 및 지질 성분 간의 상호 작용을 평가하기 위해 시차 주사 열량계(DSC) 측정하였다. 샘플을 40 mL 알루미늄 팬에 캡슐화하고 뚜껑의 미세한 홀을 통해 열분석 분석기(DSC 821e, Mettler-Toledo, Giessen, Germany)를 사용하여 측정하였다. 샘플을 100 °C에서 10 min간 예비 가열하고, 실온으로 냉각한 다음, 실온에서 200 °C까지 10 K/min의 속도로 가열하였다.

Table 1. Materials for Experiments

INCI name	Trade name	Company
Ceramide	Ceramide IIIB	Evonik (Germany)
Palmitic Acid	Palmitic Acid	Hayashi Chem. Ind. (Japan)
Cholesterol	Cholesterol	Sigma-Aldrich (Japan)
Polyoxyethylene (20) Sorbitanmonooleate	Tween 80	Croda (UK)
Sorbitan Monooleate	Span 80	Croda (UK)
Hydrogenated Phospholipid	Lipoid S75-3	Lipoid (Germany)
Isononyl Isononanoate	KAK 99	Kokyu Alcohol (Japan)
EDTA-2Na	EDTA-2Na	AKZO (Netherlands)

Table 2. Nanoemulsion used for Optimizing Emulsification Processing Parameters

Compound	Content (w/wt%)	Property
<i>Oil phase</i>		Disperse phase
KAK 99	1.0, 2.0, 3.0	Liquid lipid
LipoidS75-3	0.1, 0.2, 0.3 , 0.4, 0.5	Co-surfactant
Tween 80	3.0, 3.5, 4.0, 4.5	Hydrophilic surfactant
Span 80	0.1, 0.2 , 0.3, 0.4, 0.5	Lipophilic surfactant
Ceramide IIIB	0.1, 0.3 , 0.5, 0.7, 1.0	Related stratum corneum lipid
Palmitic acid	0.05 , 0.1	Stratum corneum lipid
Cholesterol	0.05 , 0.1	Stratum corneum lipid
<i>Water phase</i>		Continuous phase
EDTA-2Na	0.05	Preservative
Water to	100	Deionized water

Bold numbers indicate the content of the compounds for optimizing emulsification processing parameters.

2.2.3. 전기전도도 측정

전기전도도는 W/O에서 O/W로 전상 되는 영역을 확인하기 위해서 측정하였다. 유상에 수용액상을 자석교반기를 이용하여 혼합하면서 측정하였다. 측정은 휴대용 전기전도도 측정기를 이용하였다(Accumet AP85; Fisher Scientific, Pittsburgh, USA).

2.2.4. 점도 측정

나노에멀전의 점도는 Brookfield 점도계(Model DV-E, Brookfield, USA)를 사용하여 실온에서 속도 60 rpm, spindle No. 6로 2 min 후에 측정하였다.

2.2.5. 세라마이드의 용해도 측정

세라마이드 CIIIB의 용해도는 일정량의 CIIIB (0.05 wt% 간격)를 나노에멀전의 유상에 첨가함으로써 결정

하였다. 용해도는 1주일 동안 현미경(Axioskop, Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Germany)을 사용하여 결정이 검출되지 않은 최대 CIIIB의 농도로 정의하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 유효온도와 세라마이드 농도에 따른 나노에멀전의 입도 분포

Span 80/Lipoid S75-3/Tween 80에 의해 안정화된 O/W 에멀전을 제조하기 위해 PIC법을 사용하였다. 에멀전의 형성은 HLB, 계면활성제 농도 및 온도 등의 파라미터와 관련하여 평가하였다. 세라마이드 IIIB(CIIIB)를 함유 한 O/W 나노 에멀전의 입자 크기에 대한 혼합 온도의 영향을 Figure 1에 나타내었다. 여기서, O/W 나노에멀전은 각질층에 존재하는 세라마이

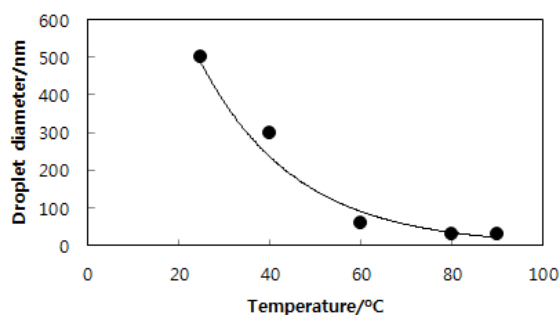


Figure 1. Effect of emulsification temperature on mean droplet size and polydispersity index.

드와 지질을 피부에 전달하는 의미 있는 전달체로서 작용할 수 있다. Figure 1에서, 입자 크기는 유화 온도가 증가함에 따라 감소하였다. 혼합은 자석교반기의 에너지 정도로 충분하였다. 혼합 온도를 올리면 상대적으로 높은 계면 장력이 존재하면 나노 에멀전을 얻을 수 없으므로 입자 크기가 작아지는 것으로 생각된다. O/W 경계면에서 흡착된 계면 활성제 분자의 양은 온도가 증가함에 따라 점차적으로 증가한다. 계면 활성제 흡착은 고온(≥ 70 °C)에서 포화 상태에 도달할 수 있다. 이 실험에서 혼합 온도는 80 °C로 고정하였다.

CIIB는 일반적으로 화장품에 사용되는 오일과 정제수에 대한 용해도가 낮으며 화장품에는 적용이 제한적 이어서 폴리올 또는 과량의 가용화제를 사용하는 것으로 보고되어 있다[13,14]. 본 실험에서는 CIIB를 80 °C에서 상대적으로 용해도가 높은 오일에 용해시켜 제조한 에멀전의 나노 에멀전 형성 가능성과 안정성을 조사하였다. Figure 2에는 PIC법에 의해 80 °C에서 제조된 에멀전의 외관을 나타냈다. 육안상으로 관찰할 수 있듯이 CIIB의 농도가 0.5 wt%까지는 50 nm 정도의 입자 크기를 갖는 나노에멀전이 형성되었으며 0.7 wt%에서는 150 nm 정도의 나노에멀전이 형성되었다. Figure 3은 시간 경과에 따른 입자 크기 및 입자 크기 변화를 나타냈다. Figure 3에서 알 수 있듯이 입자 크기는 CIIB 농도의 증가에 따라 증가하는 경향이 있으나 0.7 wt%까지는 반투명 나노 에멀전을 형성하고 시간에 따른 안정성의 변화는 관찰되지 않았다. 그러나 1 wt%의 CIIB를 함유한 에멀전은 제조 직후 상 분리를 나타냈다.

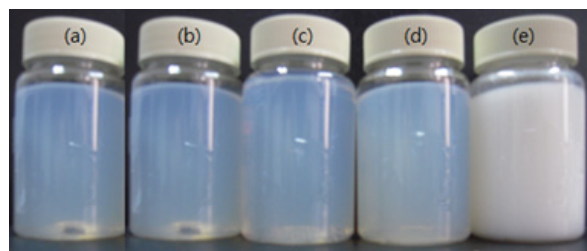


Figure 2. Photograph of emulsions prepared from Tween 80/Span 80/ceramide IIIB/KAK99/water system using PIC process varying the concentration of ceramide IIIB, (a): 0.1 wt%, (b): 0.3 wt%, (c): 0.5 wt%, (d): 0.7 wt%, (e): 1.0 wt%.

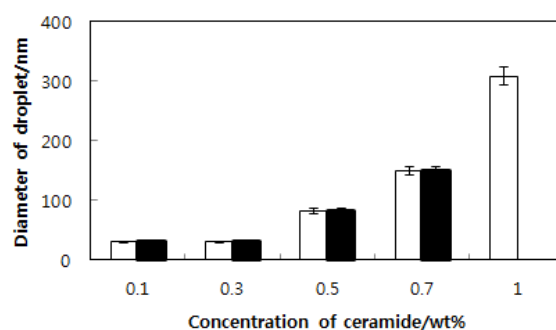


Figure 3. Effect of concentration of ceramide IIIB on mean droplet size; empty bars represent mean droplet size immediately after production and filled bars show mean droplet size after storage at room temperature for 4 weeks.

3.2. 혼합계면활성제의 HLB에 따른 에멀전의 입자 크기 변화와 전상점 부근에서 수용액상 첨가에 따른 나노 에멀전의 거동

Figure 4에서는 Tween 80 및 Span 80의 농도를 변경하여 에멀전을 생성하도록 HLB (hydrophile-lipophile balance) 값을 조정하였다. 약 14.0의 HLB에서, 가장 작은 입자 크기를 갖는 나노 에멀전이 형성되었고, Tween 80 대 Span 80의 비율은 9 : 1이었다. 친수성-친유성 균형(HLB) 값이 13.5-14.5이고 계면 활성제-오일 비가 1 : 1일 때 30 nm 이하의 입자 직경을 갖는 안정한 나노에멀전이 형성되었다.

Figure 5에서, HLB는 14.0으로 고정하였고, 생성된 혼합물의 형상 및 물성을 수용액상의 분율을 변화시킴으로써 측정하였다. Figure 5에서 (a)는 수용액상을 첨가하기 전의 형상을 나타낸다. 그 후, 매우 높은 점도를 갖는 겔이 정제된 수용액상의 분획이 0.05가 될 때까지 형성되었다. 따라서 전기 전도도는 여전히 낮고,

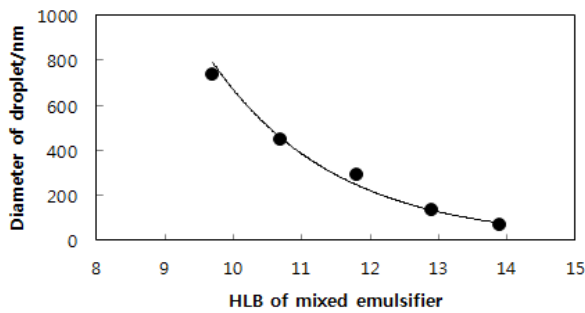


Figure 4. Effect of HLB of mixed surfactant on mean droplet size of emulsions prepared from Tween 80/Span 80/ceramide IIIB/KAK99/water system using PIC process.

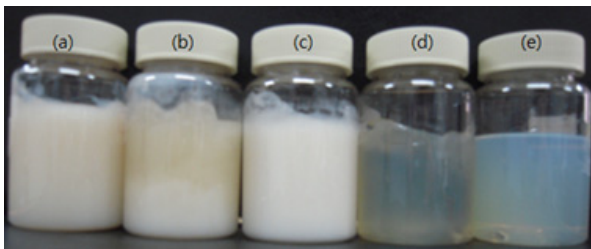


Figure 5. Photograph of emulsions varying water volume fraction, (a): 0, (b): 0.01, (c): 0.03, (d): 0.05, (e): 0.1.

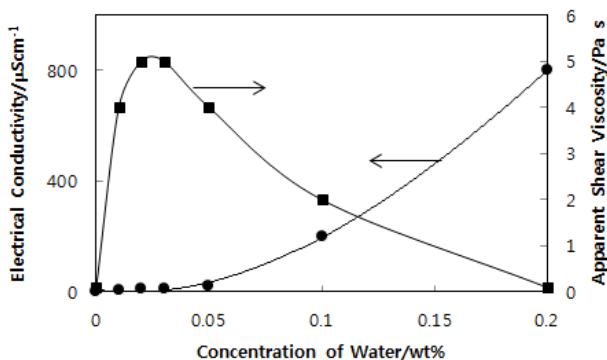


Figure 6. Effect of increasing water concentration on the electrical conductivity and apparent shear viscosity of emulsions varying water volume fraction, (a): 0, (b): 0.01, (c): 0.03, (d): 0.05, (e): 0.1 (■; viscosity, ●; electrical conductivity).

겔의 점도는 약 0.03의 수용액상 분율에서 감소하기 시작하고, 에멀전은 수용액상의 분율이 0.1에서 전기 전도도의 증가를 나타내며, 전상은 대략 0.05의 수용액상 분율에서 나타나는 것으로 보인다. Figure 6은 수용액상의 분율에 따른 에멀전의 전기 전도도와 점도 변

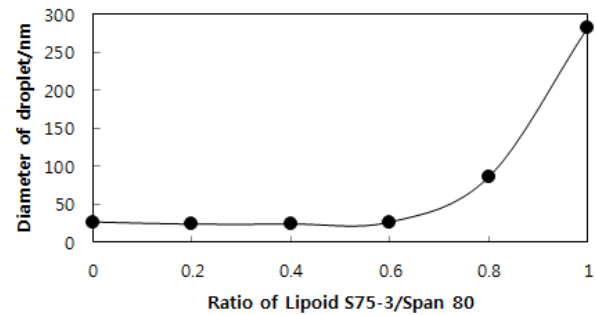


Figure 7. Effect of Lipoid S75-3/Span 80 ratio on mean droplet size.

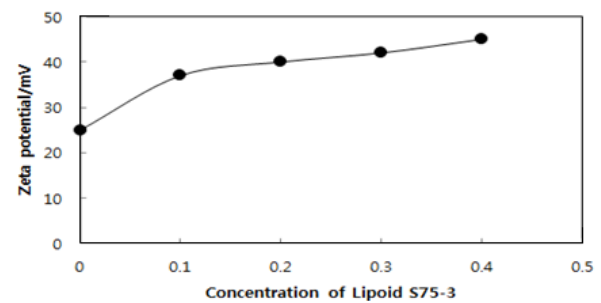


Figure 8. Zeta-potential of nanoemulsions varying the concentration of Lipoid S75-3.

화를 보여준다.

3.3. 인지질 계면활성제인 Lipoid S75-3를 첨가한 나노에멀전의 거동

이전 연구에서 혼합 온도는 80 °C로 고정되었고, 친유성 계면활성제인 Span 80과 Lipoid S75-3의 효과를 Figure 7에 나타냈다. 친유성 유화제 농도는 0.5 wt%로 고정하였고 Span 80을 Lipoid S75-3에 첨가하여 에멀전을 제조하였다. Figure 7에 나타난 바와 같이, Lipoid S75-3의 비율을 증가시켜도, 두 계면활성제의 비율이 0.6이 될 때까지 입경의 변화는 관찰되지 않았다. 안정성 시험의 결과로, 0.5 wt%의 친유성 유화제가 안정한 나노 에멀전의 제조에 필수적인 것으로 여겨진다. 그러나 Lipoid S75-3의 특정 분율 이상에서의 입자 크기의 증가는 최적의 HLB 변화에 기인한 것으로 보인다.

Figure 8에는 Lipoid S75-3의 효과에 대한 제타 전위의 변화를 나타냈다. Lipoid S75-3이 0에서 0.4 wt%로 증가함에 따라 제타 전위는 25 mV에서 47 mV까지 증가했다. 따라서 Lipoid S75-3 첨가에 따른 표면 전하의

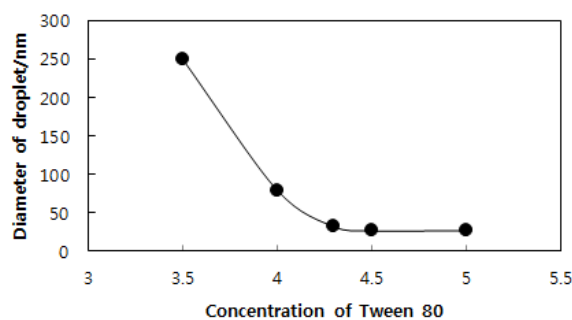


Figure 9. Effect of concentration of Tween 80 on mean droplet size.

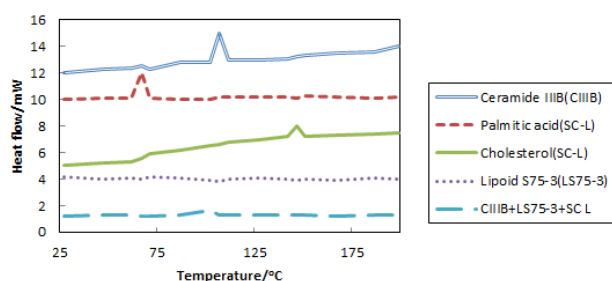


Figure 10. DSC thermogram of ceramide III(B), SC lipids (palmitic acid and cholesterol), Lipoid S75-3, and their mixture.

증가는 안정성에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 생각된다. 친수성 유화제인 Tween 80이 안정성에 미치는 영향을 Figure 9에 나타냈으며 Tween 80의 농도를 증가 시키면 입자 크기가 80 nm에서 30 nm로 감소되었다. 안정한 나노에멀전을 얻기 위해서는 적어도 3.0 중량 %의 Tween 80이 필요했다. 2.5 wt% 미만에서는 형성된 나노 에멀전이 불안정하고 입자 응집에 의해 층 분리가 관찰되었다.

피부 각질층의 지질 장벽은 피부의 보습작용에 주요하며 건강하게 유지하는 데 필수적인 역할을 한다. CIIB는 일반적인 화장품용 오일에 대한 용해도는 온도가 증가하면 증가하지만 실온에서 방치하면 석출된다. 그러나 KAK 99, Tween 80, Span 80, Lipoid S75-3 및 콜레스테롤과 팔미틴산을 포함한 나노에멀전 시스템에서는 결정 석출이 관찰되지 않았다. Lipoid S75-3의 첨가는 CIIB와 콜레스테롤의 용해도를 증가시키는 것으로 생각된다. Figure 10은 DSC 다이어그램을 보여주며 Lipoid S75-3에서 CIIB의 용해도에 미치는 영향이 잘 설명될 수 있다. Figure 10에서 CIIB, 팔미틴산 및 콜레스테롤의 흡열 피크가 관찰된다. 그러나 Lipoid

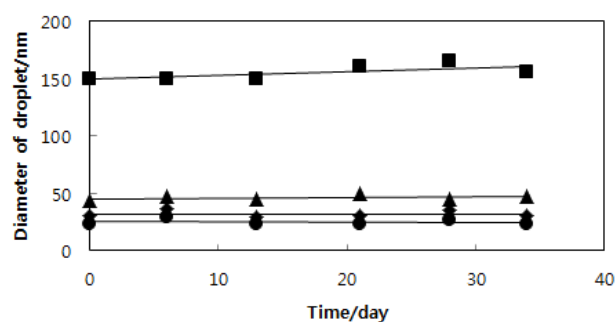


Figure 11. Mean droplet size after storage of nanoemulsions over a period of 1 month, ■:(d) in Figure 2, ▲:(c) in Figure 2, ◆:(b) in Figure 2, ●:(a) in Figure 2.

S75-3을 CIIB, 팔미틴산, 콜레스테롤과 2 : 1 : 1 : 1의 비율로 혼합하였을 때 가열 및 냉각 단계에서 흡열 피크가 관찰되지 않았다. 약 100 °C에서 약한 피크를 관찰할 수 있는데 이는 Lipoid S75-3과 CIIB 및 지질 성분의 상호 작용으로 생각되며 이러한 상호 작용이 결정화를 방지하는 요인으로 생각된다.

3.4. 나노에멀전의 안정성

나노에멀전에 함유된 CIIB 0.3 wt%는 Figure 11에 나타난 바와 같이 4주 이상 동안 실온에서 결정 형성 없이 안정하였다. Figure 2에서 (a)를 1개월 동안 관찰한 결과, 나노에멀전은 평균 입자 크기에 특별한 변화를 나타내지 않았다. 나노에멀전은 입자의 응집, 크리밍, 합일 및 오스트발트 라이퍼닝으로 인한 불안정성을 나타내지 않았다.

4. 결 론

세라마이드(CIIB)와 피부 지질 성분을 함유하는 1개월 이상 동안 안정한 양전하를 띤 나노 에멀전을 개발하였다. 양호한 안정성은 Lipoid S75-3과 pH에 의해 유도된 나노 입자의 양전하에서 기인되는 반발력 등으로 생각되었다. 이 연구에서 세라마이드는 Lipoid S75-3를 첨가하여 재결정화하지 않고 양전하를 띤 나노에멀전에 안정적으로 혼합될 수 있었다. 경피 흡수가 유력한 저농도의 계면활성제를 함유하고 세라마이드와 지방산 및 콜레스테롤 등 피부 지질 성분을 함유한 안정한 나노에멀전은 화장품 및 의약품 기제로 사용이 유력할 것으로 생각된다.

Reference

1. O. Sonnevile-Aubrun, J. T. Simonnet, and F. L. Alloret, Nanoemulsions: a new vehicle for skincare products, *Adv. Colloid Interface Sci.*, **108-109**, 145 (2004).
2. W. Liu, D. Sun, C. Li, Q. Liu, and J. Xu, Formation and stability of paraffin oil-in-water nano-emulsions prepared by the emulsion inversion point method, *J. Colloid Interface Sci.*, **303**(2), 557 (2006).
3. A. Forgiarini, J. Esquena, C. Gonzalez, and C. Solans, Formation of nano-emulsions by low-energy emulsification methods at constant temperature, *Langmuir*, **17**, 2076 (2001).
4. P. Fernandez, V. Andra, J. Rieger, and A. Kuhnle, Nano-emulsion formation by emulsion phase inversion, *Colloids Surf. A*, **251**, 53 (2004).
5. J. R. Villalobos-Hernandez and C. C. Muller-Goymann, Sun protection enhancement of titanium dioxide crystals by the use of carnauba wax nanoparticles: The synergistic interaction between organic and inorganic sunscreens at nanoscale, *Int. J. Pharm.*, **322**, 161 (2006).
6. R. D. Hagenmaier and R. A. Baker, Reduction in gas exchange of citrus fruit by wax coatings. *J. Agric. Food Chem.*, **41**, 283 (1993).
7. S. Chen and A. Nussinovitch, Permeability and roughness determinations of wax-hydrocolloid coatings, and their limitations in determining citrus fruit overall quality, *Food Hydrocolloids*, **15**, 127 (2001).
8. K. Golemanov, S. Tcholakova, N. D. Denkov, and T. Gurkov, Selection of surfactants or stable paraffin-in-water dispersions, undergoing solid-liquid transition of the dispersed particles, *Langmuir*, **22**, 3560 (2006).
9. J. Giermanska-Kahn, V. Laine, S. Arditty, V. Schmitt, and F. Leal-Calderon, Particle stabilized emulsions comprised of solid droplets, *Langmuir*, **21**, 4316 (2005).
10. J. Giermanska, F. Thivilliers, R. Backov, V. Schmitt, N. Drelon, and F. Leal-Calderon, Gelling of oil-in-water emulsions comprising crystallized droplets, *Langmuir*, **23**, 4792 (2007).
11. H. J. Yang, J. H. Kim, W. G. Cho, and S. N. Park, The Stability of Emulsions Formed by Phase Inversion with Variation of Surfactant HLB, *J. Kor. Oil Chem. Soc.*, **26**(2), 117 (2009).
12. R. P. Gullapalli and B. B. Sheth, Influence of an optimized non-ionic emulsifier blend on properties of oil-in-water emulsions, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **48**, 233 (1999).
13. S. M. Hodge and D. Rousseau, Flocculation and coalescence in water-in-oil emulsions stabilized by paraffin wax crystals, *Food Res. Int.*, **36**, 695 (2003).
14. D. Rousseau and S. M. Hodge, Stabilization of water-in-oil emulsions with continuous phase crystals, *Colloids Surf. A*, **260**, 229 (2005).