

PEG-free 계면활성제를 사용한 Nanoemulsion의 안정화

¹김희주* · ²정태규 · ²김자영 · ¹윤경섭†

¹제주대학교 화학·코스메틱스학과, ²(주)사임당화장품 피부과학연구소
(2019년 5월 28일 접수: 2019년 6월 24일 수정: 2019년 6월 25일 채택)

Stabilization of Nanoemulsion Using PEG-free Surfactant

¹Huiju Kim · ²Taek Kyu Jung · ²Ja Young Kim · ¹Kyung-Sup Yoon†

¹Department of Chemistry and Cosmetics, College of National Science,
Jeju National University, Korea

²Skin Science R&D Center, Saimdamg Cosmetics, Co., Ltd., Korea
(Received May 28, 2019; Revised June 24, 2019; Accepted June 25, 2019)

요약 : 폴리에틸렌글라이콜(PEG)은 계면활성제, 세정제, 유화제 등으로 화장품에 많이 사용된다. 이들은 제조 과정 중, ethylene oxide의 이량체화에 의해 인간에 몸에 유해한 1,4-dioxane이 부산물로 생성될 수 있다. 화장품 성분에 대한 소비자들의 관심이 증가함에 따라, 퍼스널케어 시장에서 PEG 성분이 없는 보다 안전한 에멀전 연구의 필요성이 증대되고 있다. PEG-free 계면활성제로 사용되는 polyglycerol ester (PGE)는 비이온성 계면활성제로서 식품, 화장품 등의 분야에서 많이 사용되며 글리세롤과 지방산을 에스테르화 하여 생산된다. 본 연구에서는 PEG 성분을 함유하지 않은 나노에멀전 제형의 개발 및 안정화를 목표로 하였다. 최적화된 나노에멀전 제형 개발을 위해 RSM (Response Surface Methodology)를 사용하였다. 독립변수 및 변수의 범위 결정을 위한 예비 실험의 결과로 계면활성제 함량(2~4%), 오일 함량(4~8%), 폴리올 함량(12~24%)을 독립변수로 설정하였다. 반응변수로는 제형의 입자 크기(particle size), 제타 전위(zeta potential), 현탁도(turbidity), 다분산지수(polydispersity index)를 측정하였다. 제조한 나노에멀전을 FIB (Focused ion beam)로 측정된 결과, 구형의 입자들이 100~200 nm의 크기를 가지고 분포되어 있는 것을 확인하였다. 제조된 제형에 대해 30일 간 각 온도별(4°C, 25°C, 45°C) 안정성 평가를 진행하였고, 최적의 입자 크기, 현탁도, 다분산지수, 제타 전위를 고려한 최적의 처방은 계면활성제(2%), 오일(8%), 폴리올(24%)로 확인되었다.

주제어 : 나노에멀전, PEG-free, 반응표면분석, FIB (Focused ion beam), 폴리글리세롤에스터

Abstract : Polyethylene glycol (PEG) is widely used in cosmetics as a surfactant, detergent and emulsifier. During the manufacturing process, 1,4-dioxane, which is toxic to humans, can be produced as a by-product by dimerization of ethylene oxide. As consumers' interest in cosmetic ingredients has

†Corresponding author
(E-mail: ksyoonjh@jejunu.ac.kr)

increased, the need for safe emulsion research without PEG ingredients in the personal care market has increased. With increasing consumer interest in cosmetic ingredients, the need for safer emulsion research without the PEG ingredient in the personal care market has increased. In this study, we aimed to develop and stabilize nanoemulsion formulation without PEG. Response Surface Methodology (RSM) was used to develop optimized nanoemulsion formulations. Surfactant content (2~4%), oil content (4~8%) and polyol content (12~24%) were set as independent variables as a result of preliminary experiments for determining independent variables and ranges. The particle size, zeta potential, turbidity, and polydispersity index of the formulation were measured as response variables. As a result of measurement of the prepared nanoemulsion by FIB (Focused ion beam), spherical particles were found to have a size distribution of 100 to 200 nm. The stability of each formulation was evaluated for 30 days at each temperature (4°C, 25°C, and 45°C). The optimal formulation considering the optimum particle size, turbidity, polydispersity index and zeta potential was found to be surfactant (2%), oil (8%) and polyol (24%).

Keywords : Nanoemulsion, PEG-free, RSM (Response Surface Methodology), FIB (Focused ion beam), Polyglycerol ester

1. 서론

피부는 크게 표피, 진피, 피하지방층으로 나눌 수 있다. 이 중 표피의 가장 바깥쪽에는 각질층이 존재한다. 각질층은 각화 세포와 피부 지질로 구성되며, 외부 자극으로부터 신체를 보호하는 장벽 역할을 한다. 또한, 각질층은 활성 성분의 피부 투과를 크게 제한하여 활성 성분의 피부 흡수에 있어 장애 요인으로 작용한다. 활성 성분대에 대한 피부 흡수를 극대화하기 위해서는 이 장벽을 극복해야 한다[1-3].

나노에멀전은 최근에 화장품의 피부 전달 및 활성 성분의 최적화된 분산을 위한 잠재적인 매개체로서 점점 중요해지고 있다. 나노에멀전(nanoemulsion)은 30~100 nm의 입자 크기를 가지고, 입자 크기가 작기 때문에 반투명하거나 특유의 푸른빛의 외관을 갖는다. 그들은 마이크로에멀전과는 달리 열역학적으로 안정하지 않지만 미세 분산된 입자의 브라운 운동에 의해 매크로에멀전에서 관찰되는 고유한 크리밍, 침전, 응집 또는 합일 현상이 방지되어 장시간 물리적으로 안정성을 유지한다[4-6].

나노에멀전은 특유의 생산 공정을 통해 제조되는데 제조 방법은 크게 고에너지 방법과 저에너지 방법으로 나눌 수 있다. 고에너지 방법은 초음파 장치 및 고압유화기(high pressure homogenizer) 등의 기계 장치를 이용하여 에멀전

에 강한 에너지를 가해 미세 입자를 생성한다. 저에너지 유화 방법으로는 자발적 유화, 상전이 유화법 등이 있는데 이는 계에 저장된 에너지를 활용하여 미세 입자를 생성한다[7]. 나노에멀전은 일반적인 에멀전보다 작은 입자 크기를 갖기 때문에 활성물질의 피부투과에 방해 요소인 표피 장벽을 극복하는데 도움이 된다고 알려져 있다. 나노에멀전 입자는 친유성의 내부를 가지기 때문에, 친유성 화합물의 수송 매개체로 적합하다[3-5].

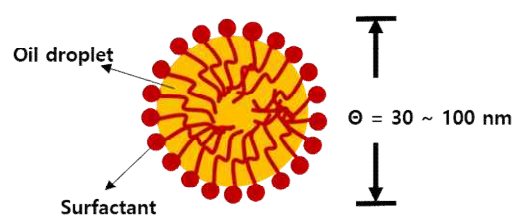


Fig. 1. Model and size of nanoemulsion.

폴리에틸렌글라이콜(PEG)은 계면활성제, 세정제, 유화제 등으로 화장품에 많이 사용된다. 이들은 ethylene oxide를 중합시켜 polyethoxylated alcohols을 형성함으로써 제조된다. 제조 과정에서, ethylene oxide의 이량체화에 의해 1,4-dioxane이 부산물로 생성될 수 있다. 1,4-dioxane은 간, 폐와 신장, 중추신경계에 독성

이 있을 수 있다는 보고가 있다[8-10]. 화장품 성분에 대한 소비자들의 관심이 증가함에 따라, 퍼스널케어 시장에서 PEG 성분이 없는 보다 안전한 에멀전 연구의 필요성이 증대되고 있다[4]. PEG-free 계면활성제와 관련하여 polyglycerol ester (PGE) 타입의 계면활성제가 사용될 수 있다. PGE는 비이온성 계면활성제로서 식품, 화장품 등의 분야에서 많이 사용되며 글리세롤과 지방산을 에스테르화 하여 생산된다[11,12].

이러한 PGE 계면활성제를 사용하여 PEG 성분을 함유하지 않은 보다 피부 친화적인 나노에멀전 제형의 개발을 위해 반응표면분석법(Response Surface Methodology, RSM)을 이용하여 실험을 진행하였다. RSM은 독립변수(X)와 반응변수(Y) 간의 관계 분석을 위한 강력하고 효과적인 통계 도구이다[13]. 본 연구에서는 RSM을 이용하여 나노에멀전 특성(Y)에 각 요인(X)들이 미치는 영향을 확인하고, 안정한 PEG-free 나노에멀전을 제조하는 것을 목표로 하였다.

2. 실험

2.1. 시약

PEG-free 비이온계면활성제로 Sunsoft Q-18Y-C를 사용하였다. 폴리올로는 glycerin과 1,3-BG를 사용하였으며, 오일은 meadowfoam seed oil과 Paester R-20SP를 구매하여 사용하였

다. 정제수는 증류수제조기(Pure RO 130, Human Corporation, Korea)를 이용하여 제조된 것을 사용하였다(Table 1).

2.2. 나노에멀전의 제조

Homogenizer (Homo Mixer Mark II, PRIMIX, Japan)를 사용하여 비이온성 계면활성제인 Sunsoft Q-18Y-C를 포함한 계면활성제상과 오일상을 75°C에서 4,000 rpm으로 10분간 혼합하였다. 그 후 온도를 유지하며 수상을 계면활성제상과 오일상 혼합물에 서서히 첨가하며 2,000 rpm으로 5분 동안 Homo-mixing하였다. 1차 유화 후 제조한 에멀전을 45°C로 냉각한 후, 고압유화기(NLM100, Ilshin Autoclave, Korea)를 사용하여 1,000 bar에서 2회의 고압유화를 수행하였다.

2.3. RSM 독립변수 및 범위 결정

최적의 PEG-free 나노에멀전 제형 개발을 위한 독립 변수 및 범위 설정을 위해 예비 실험을 수행하였다. 계면활성제 함량, 오일 함량, 고압유화(high pressure homogenization, HPH) 횟수를 독립변수로 설정하였다. 예비 실험의 독립변수의 범위를 Table 2에 나타내었다.

실험설계를 위해 Design-Expert® Software Version 11 (Stat-Ease Inc., USA)를 사용하여 RSM의 한 종류인 박스-벤컨 설계(Box-Behnken design)를 수행하였다. 박스-벤컨 설계는 전체 입

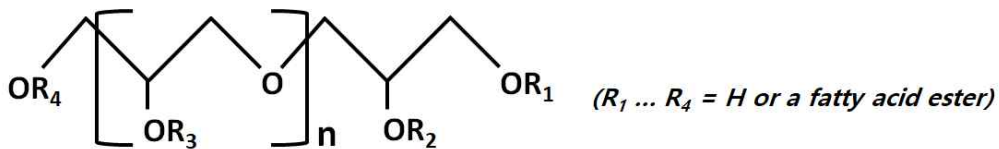


Fig. 2. Structure of polyglycerol ester.

Table 1. List of used raw materials

INCI Name	Trade Name	Company
Polyglyceryl-10 Stearate	Sunsoft Q-18Y-C	Taiyo Kagaku Co., Ltd. (Japan)
Limnanthes Alba (Meadowfoam) Seed Oil	Meadowfoam Seed Oil	Kerfoot (UK)
Octyldodecanol	Paester R-20SP	Patech (Taiwan)
Glycerin	Glycerin	KL-Kepong Oleomas Sdn. Bhd. (Malaysia)
Butylene glycol	1,3-BG	Daicel (Japan)

Table 2. Independent variable range of preliminary experiments

Independent Variables	Level		
	Low(-1)	Middle(0)	High(+1)
A: Surfactant (wt%)	2.0	3.0	4.0
B: Oil (wt%)	5.0	6.5	8.0
C: HPH (pass)	1	3	5

방체의 중심점(Center)과 중심점으로부터 동일한 거리인 요인실험의 중앙점 (IBFact)으로 구성된다. 다음 Fig. 3은 요인이 3개일 때 박스-벤컨 설계 구조도를 나타낸 것이다[14].

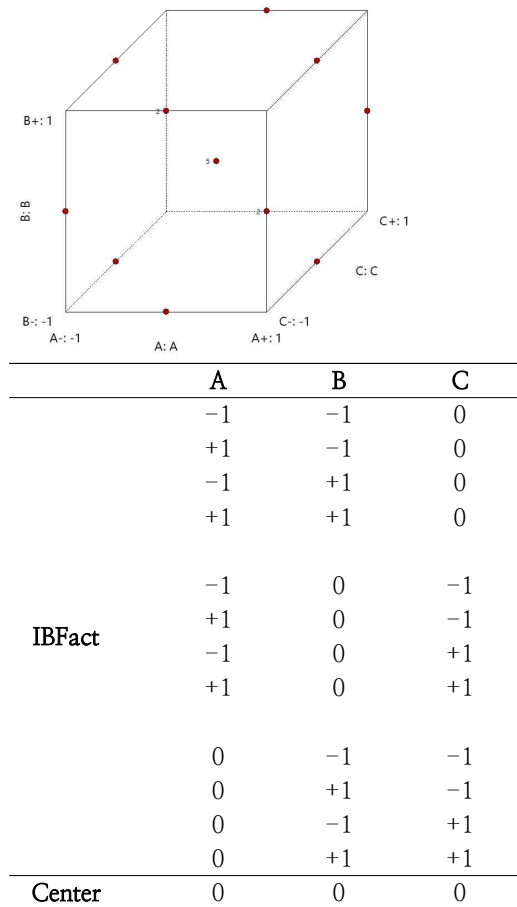


Fig. 3. Box-Behnken design, The point at the center of the cube corresponds to the center of the Box-Behnken design, and the point at the middle of each line of the cube corresponds to the IBFact.

2.4. PEG-free 나노에멀전 최적화

RSM 방법에 의한 예비 실험의 결과 데이터를 기반으로 3개의 독립 변수 및 범위가 결정되었다. 나노에멀전 제조 예비 실험 후, Design-Expert® Software Version 11을 사용하여 박스-벤컨 설계가 수행되었다. 독립변수로는 계면활성제 함량(2~4%), 오일 함량(4~8%), 폴리올 함량(12~24%)이 선정되었다(Table 3). 외부 요인에 의한 오차를 최소화하기 위해 총 17회의 실험이 랜덤으로 진행되었다(Table 4). 반응변수로 입자 크기(particle size), 다분산지수 (polydispersity index, PDI), 제타 전위(zeta potential), 현탁도(turbidity)를 측정하였다.

실험설계를 통해 얻은 데이터를 이용하여 반응 변수(Y)와 독립변수(X) 간의 관계를 수학적 관계식을 사용하여 표현할 수 있다. 이 수학적 관계식을 모델이라 한다[14]. 본 실험에서 RSM에 따른 반응표면모델을 다음과 같이 나타낼 수 있다.

$$Y_i = a_0 + a_1A + a_2B + a_3C + a_{12}AB + a_{13}AC + a_{23}BC + a_{11}A^2 + a_{22}B^2 + a_{33}C^2$$

Y_i 는 예상 반응 변수 값이고, A, B, C는 각 3가지의 독립 변수이다. a_0 는 상수이며, a_i, \dots, a_{ii} 는 각각 선형항, 2차항, 상호작용항의 계수를 나타낸다.

2.5. 입자크기 및 제타 전위, 다분산지수 측정

평균 입자 크기와 제타 전위 및 다분산지수 측정을 위해 dynamic light scattering 방식을 활용한 입도분석기(NANO ZS, Malven Instrument Ltd., UK)를 사용하였다. 에멀전을 증류수로 10% 희석 후 실온에서 측정하였다.

Table 3. Independent variables range of PEG-free nanoemulsion optimization experiments

Independent variables	Level		
	Low(-1)	Middle(0)	High(+1)
A: Surfactant	2.0	3.0	4.0
B: Oil	4.0	6.0	8.0
C: Polyol	12.0	18.0	24.0

Table 4. Independent variable range for PEG-free nanoemulsion optimization experiments

Run	Space Type	Factor 1	Factor 2	Factor 3
		A: SAA	B: Oil	C: Polyol
		wt%	wt%	wt%
1	IBFact	4.0	6.0	12.0
2	IBFact	2.0	6.0	12.0
3	Center	3.0	6.0	18.0
4	Center	3.0	6.0	18.0
5	IBFact	4.0	8.0	18.0
6	Center	3.0	6.0	18.0
7	IBFact	4.0	6.0	24.0
8	IBFact	3.0	8.0	24.0
9	IBFact	2.0	6.0	24.0
10	IBFact	3.0	4.0	12.0
11	IBFact	3.0	4.0	24.0
12	IBFact	2.0	8.0	18.0
13	IBFact	4.0	4.0	18.0
14	Center	3.0	6.0	18.0
15	IBFact	2.0	4.0	18.0
16	IBFact	3.0	8.0	12.0
17	Center	3.0	6.0	18.0

2.6. 에멀전 현탁도 측정

나노에멀전의 성상 확인을 위해 에멀전의 현탁도를 측정하였다. 나노에멀전의 투과율은 UV-Visible spectrophotometer (Optizen Alpha, KLAB, Korea)를 이용하여 250nm 파장에서 측정하였다. 현탁도는 다음과 같은 식으로 구할 수 있다[15].

$$\text{Turbidity} = 100 - \%T$$

2.7. 온도 안정성 평가

에멀전의 안정성을 확인하기 위해 제조한 나노에멀전을 실온(25°C), 향온(45°C), 냉온(4°C)에서

30일 간 보관하면서 시간 경과에 따른 나노에멀전의 성상을 육안으로 관찰하였다.

2.8. 에멀전 입자 형태 측정

제조한 나노에멀전의 입자 크기 및 형태를 확인하기 위해 FIB (Quanta 3D FEG, FEI Company, USA)를 사용하였다. FIB (Focused ion beam) 장치는 고에너지의 이온빔을 시료 표면에 집속 조사하여 발생하는 전자/원자를 검출하여 시료 표면을 관찰한다[16].

3. 결과 및 고찰

3.1. PEG-free 나노에멀전 최적화를 위한

독립변수 및 범위 결정

PEG-free 나노에멀전 개발을 위한 독립변수 및 범위 설정을 위해 예비 실험을 수행하였다. 제조된 에멀전에 대한 시간에 따른 안정성 평가 결과를 Table 5에 나타내었다.

실온에서 고압유화 횟수가 1회인 실험품에서 모두 분리가 일어났고, 5회인 실험품에서는 침전 현상이 관찰되었다. 반면에 3회인 실험품은 대부분이 오랜 기간 동안 안정성을 유지하였다. 고압유화기 사용 시 에멀전에 가한 에너지는 조작 압력을 증가시키거나 유화 횟수를 늘림으로써 증가할 수 있다. 압력 및 유화 횟수가 증가함에 따라 에멀전 크기가 감소하는 경향을 나타내지만, 과도한 처리로 인하여 에멀전 계면이 계면활성제 분자에 의해 완전히 덮이지 못하게 되고 그로인해 입자의 크기가 증가할 수 있다[17]. 따라서 고압유화 3회 이상은 나노에멀전 형성에 부정적인

영향을 줄 수 있다고 판단하였다.

보조계면활성제는 물리화학적 성질이나 분자간 현상 때문에 에멀전 내에서 계면활성제의 성질을 바꿔 나노에멀전 형성에 영향을 줄 수 있다 [13]. 작은 극성 머리 부분과 소수성 부분으로 구성되고, 수상에서 일정한 용해도를 갖는 폴리올은 에멀전 제조 시 보조계면활성제의 역할을 할 수 있다[4]. 본 예비 실험의 결과로 고압유화 횟수를 2회로 고정하고, 고압유화 횟수 대신 보조계면활성제 역할을 하는 폴리올을 독립변수로 선정하여 계면활성제(surfactant, SAA) 함량(2~4%), 오일(oil) 함량(4~8%), 폴리올(polyol) 함량(12~24%)의 3가지를 요인으로 PEG-free 나노에멀전 개발을 위한 RSM 이용 최적화 실험을 수행하였다.

3.2. RSM 이용한 PEG-free 나노에멀전의 최적화

다음 표(Table 6)는 실험 설계에 따라 수행된 실험에서 독립 변수에 따른 반응 변수의 데이터

Table 5. Preliminary experiment by Box-Behnken design

Run	Space Type	Factor 1 A: SAA wt%	Factor 2 B: Oil wt%	Factor 3 C: HPH pass	Response 1 Stability 30 days
1	Center	3.0	6.5	3	stable
2	Center	3.0	6.5	3	stable
3	IBFact	2.0	6.5	5	stable
4	Center	3.0	6.5	3	stable
5	IBFact	2.0	5.0	3	stable
6	IBFact	4.0	5.0	3	stable
7	IBFact	3.0	5.0	1	separation
8	IBFact	3.0	8.0	5	precipitation
9	IBFact	4.0	6.5	1	separation
10	IBFact	4.0	6.5	5	stable
11	IBFact	2.0	8.0	3	stable
12	IBFact	2.0	6.5	1	stable
13	Center	3.0	6.5	3	stable
14	IBFact	3.0	5.0	5	precipitation
15	IBFact	4.0	8.0	3	stable
16	IBFact	3.0	8.0	1	stable
17	Center	3.0	6.5	3	stable

를 보여준다.

분산분석은 독립 변수에 대해 가장 적합한 반응표면모형을 결정하는데 사용되었다. 반응표면모형을 통해 독립 변수인 계면활성제, 오일 및 폴리올 함량에 따른 반응변수인 입자 크기, 제타 전위, 현탁도, 다분산지수의 변화를 예측할 수 있다. 분산분석 결과에 따른 적합 모델을 Table 7에 나타내었다. 또한 모형 내 반응변수에 대한

독립변수의 영향을 나타내는 각 항의 계수 및 p-value가 Table 8에 제시되었다. 3D 반응표면 그래프(Fig. 4)는 반응표면모형에서 반응변수에 대한 독립변수의 유의한 영향($p < 0.05$)을 해석하는데 사용되었다.

3.2.1. 입자 크기(Y_1)에 영향을 미치는 요인

Table 7의 분산분석 결과는 선형(Linear) 모델

Table 6. Box-Behnken design experiments for PEG-free nanoemulsion optimization

Run	Space Type	Factor 1 A: SAA wt%	Factor 2 B: Oil wt%	Factor 3 C: Polyol wt%	Response 1 Particle Size Nm	Response 2 Zeta Potential mV	Response 3 Turbidity (250 nm) %	Response 4 PDI
1	IBFact	4.0	6.0	12.0	142.7	61.2	49.83	0.197333
2	IBFact	2.0	6.0	12.0	167.3	50.9	53.73	0.161667
3	Center	3.0	6.0	18.0	132.4	55.7	38.71	0.204333
4	Center	3.0	6.0	18.0	139.8	52.3	41.74	0.212000
5	IBFact	4.0	8.0	18.0	121.8	51.2	44.71	0.190000
6	Center	3.0	6.0	18.0	151.3	52.5	28.99	0.190000
7	IBFact	4.0	6.0	24.0	133.4	50.0	36.77	0.249333
8	IBFact	3.0	8.0	24.0	116.0	53.6	28.71	0.195337
9	IBFact	2.0	6.0	24.0	117.9	57.1	36.67	0.216667
10	IBFact	3.0	4.0	12.0	162.5	59.1	22.06	0.206333
11	IBFact	3.0	4.0	24.0	144.0	50.5	36.67	0.216333
12	IBFact	2.0	8.0	18.0	126.3	54.9	48.70	0.167667
13	IBFact	4.0	4.0	18.0	154.2	54.0	30.63	0.224000
14	Center	3.0	6.0	18.0	131.2	55.4	35.26	0.207000
15	IBFact	2.0	4.0	18.0	156.7	56.3	28.96	0.229000
16	IBFact	3.0	8.0	12.0	134.1	54.9	54.54	0.160000
17	Center	3.0	6.0	18.0	121.5	55.5	35.09	0.191333

Table 7. ANOVA for the model

	Y_1 - Particle Size (nm)	Y_2 - Zeta Potential (mV)	Y_3 - Turbidity (%)	Y_4 - PDI
p-value	0.0004***	0.0033**	0.0100**	0.0001***
F-value	12.31	7.31	6.71	16.08
R^2	0.7397	0.8143	0.8962	0.7877
Adjusted R^2	0.6796	0.7029	0.7627	0.7387
SD	8.93	1.67	4.58	0.0122
Lack-of-fit p-value	0.8271	0.5705	0.5474	0.3020
Model	Linear	2FI	Quadratic	Linear

이 예측에 적합함을 나타낸다. 이 선형 모델의 p-value (<0.05), F-value 12.31은 모델이 유의성을 가짐을 의미한다. Lack-of-fit p-value는 0.8271 ($p>0.05$)이므로 모델의 적합 결여가 없고 주어진 영역에서 시스템을 잘 나타냄을 보여준다. 입자크기에 대해 제안된 반응표면모델은 다음과 같다.

$$Y_1 = 138.43 - 2.01A - 14.90B - 11.91C$$

Y_1 은 입자크기이고, A는 계면활성제 함량, B는 오일 함량, C는 폴리올 함량을 나타낸다. 상기 식을 보면 계면활성제, 오일, 폴리올 함량 모두 입자 크기와 상반 관계를 나타냄을 알 수 있다. Table 8에 나타난 각 계수의 p-value를 살펴보면 오일 및 폴리올 함량이 입자 크기에 유의미한 영향을 미치지 않지만(<0.05), 계면활성제 함량은 실험 범위 내에서 유의성을 갖지 않음(>0.05)을 알 수 있다.

3D 반응표면 그래프를 통해 나노에멀전 입자 크기에 영향을 미치는 매개변수를 알 수 있다. 나노에멀전 입자 크기에 가장 큰 영향을 미치는 변수는 오일과 폴리올의 1차항이었다. 반응표면 그래프는 오일 함량이 증가할수록 입자 크기가 감소함을 나타낸다. 더욱이 폴리올 함량의 증가는 입자 크기를 감소시켰다(Fig. 4A-C).

3.2.2. 제타 전위(Y_2)에 영향을 미치는 요인

분산분석 결과 2요인 상호작용(2FI) 모델이 예측에 적합하였다. 모델의 p-value (<0.05)와 F-value 7.31은 모델이 유의적임을 의미한다. Lack-of-fit test에서 p-value가 0.5705 (>0.05)로 적합 결여를 나타내지 않았고, 결정계수(R^2) 0.8143, 조정된 결정계수(Adjusted R^2)는 0.7029로 모델이 시스템에 적합함을 나타낸다. 제타 전위에 대해 제안된 반응표면모델은 다음과 같다.

$$Y_2 = 54.42 - 0.3500A - 0.6625B - 1.86C - 0.3500AB - 4.35AC + 1.83BC$$

Y_2 은 제타 전위의 값을 나타낸다. 위 모델에서 오일과 폴리올의 상호작용항을 제외하고는 모든 항이 반응변수인 제타 전위와 상반 관계를 나타냈다. Table 8에서 각 계수의 p-value를 살펴보면 폴리올 함량 및 계면활성제와 폴리올의 상호작용항이 제타 전위에 유의미한 영향(<0.05)을

미침을 알 수 있다. 3D 반응표면 그래프는 폴리올 함량이 증가할수록 제타 전위 값이 감소함을 보여준다(Fig. 4D-F).

3.2.3. 현탁도(Y_3)에 영향을 미치는 요인

현탁도에 대한 분산분석 결과에서 2차 다항식(Quadratic) 모델이 적합함을 보여주었다. 모델의 p-value는 0.0100 (<0.05), F-value 6.71로 유의성을 갖는다. Lack-of-fit test에서 p-value가 0.5474 (>0.05)로 적합 결여를 나타내지 않았고, 결정계수(R^2) 0.8962, 조정된 결정계수(Adjusted R^2)가 0.7627로 모델이 시스템에 적합함을 나타낸다. 현탁도에 대해 제안된 반응표면모델은 다음과 같다.

$$Y_3 = 35.96 - 0.7650A + 7.29B - 5.17C - 1.42AB + 1.0000AC - 10.11BC + 5.52A^2 - 3.23B^2 + 2.77C^2$$

Y_3 은 현탁도를 나타낸다. 위 모델에서 오일과 폴리올의 상호작용항을 제외하고 모든 항이 반응변수와 상반 관계를 나타냈다. Table 8에서 각 계수의 p-value를 살펴보면 오일과 폴리올의 1차항 및 오일과 폴리올의 상호작용항, 계면활성제의 2차항이 현탁도에 유의미한 영향(<0.05)을 미침을 알 수 있다. 반응표면 그래프는 오일 함량이 증가할수록 현탁도가 증가하고 폴리올 함량이 증가할수록 현탁도가 감소함을 보여준다(Fig. 4G-I).

3.2.4. 다분산지수(Y_4)에 영향을 미치는 요인

Table 7의 다분산지수에 대한 분산분석 결과는 선형(Linear) 모델이 예측에 적합함을 나타낸다. 이 선형 모델의 p-value가 0.001 (<0.05), F-value가 12.31로 모델이 유의성을 가짐을 의미한다. Lack-of-fit p-value는 0.8271 ($P>0.05$)이므로 모델의 적합 결여가 없고, 결정계수(R^2) 0.7877, 조정된 결정계수(Adjusted R^2) 0.7387의 값은 모델이 주어진 영역에서 시스템을 잘 나타냄을 보여준다. 다분산지수에 대해 제안된 반응표면모델은 다음과 같다

$$Y_4 = 0.2011 + 0.0107A - 0.0203B + 0.0190C$$

Y_4 은 다분산지수를 나타낸다. 위 모델에서 오일 함량을 제외하고 모든 항이 반응 변수와 양의

관계를 보였다. Table 8에 나타난 각 계수의 p-value에 따르면 계면활성제, 오일, 폴리올 함량 모두 다분산지수에 유의미한 영향(<0.05)을 미쳤

다. 3D 반응표면 그래프는 계면활성제 및 폴리올 함량이 증가할수록, 오일 함량이 감소할수록 다분산지수가 감소함을 보여준다(Fig. 4J-L).

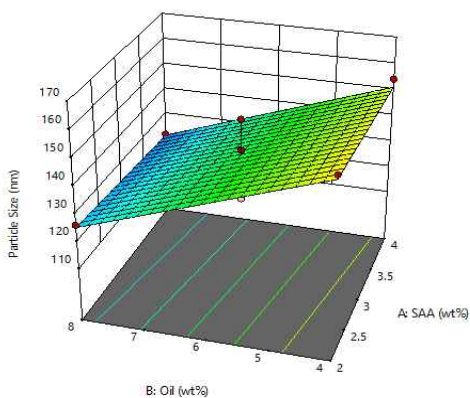
Table 8. Coefficient table

	Intercept	A: SAA	B: Oil	C: Polyol
Particle Size	138,4180	-2.0125	-14.9000	-11.9125
p-values		0.5348	0.0004***	0.0023**
Zeta Potential	-54,4176	0.3500	0.6625	-1.8625
p-values		0.5656	0.2870	0.0101*
Turbidity (at 250 nm)	35,9580	-0.7650	7,2925	-5,1675
p-values		0.6507	0.0028**	0.0152*
PDI	0,2011	0,0107	-0,020	0,0190
p-values		0,0270*	0,0004***	0,0007***

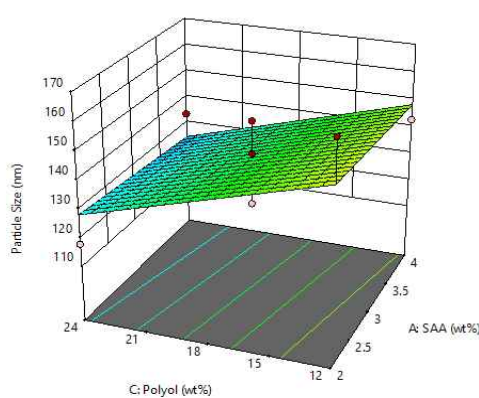
	AB	AC	BC	A ²	B ²	C ²
Particle Size						
p-values						
Zeta Potential	0,3500	-4,3500	-1,8250			
p-values	0,6833	0,0004***	0,0533			
Turbidity (at 250 nm)	-1,4150	1,0000	-10,1100	5,5235	-3,2315	2,7685
p-values	0,5558	0,6752	0,0031**	0,0424*	0,1905	0,2544
PDI						
p-values						

The table shows the p-values of the coefficients and coefficients of each term of the response surface model. The coefficient with a negative value indicates the opposite relationship with the response variable. (*P≤0.05; **P≤0.01; ***P≤0.001).

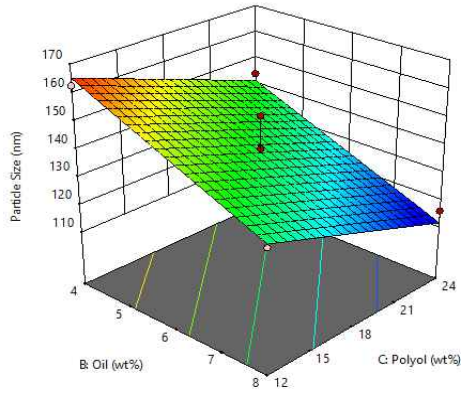
(A)



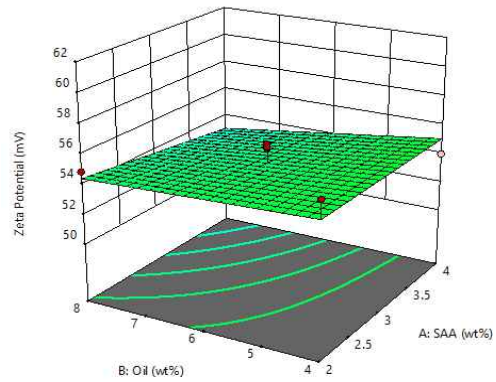
(B)



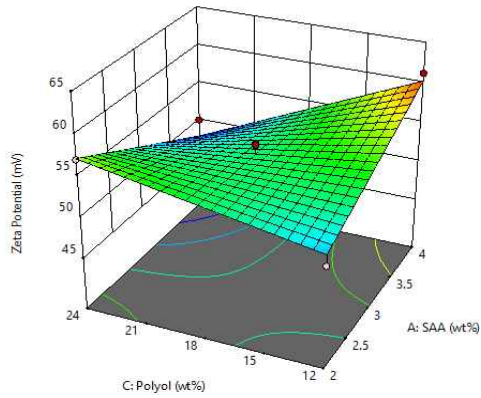
(C)



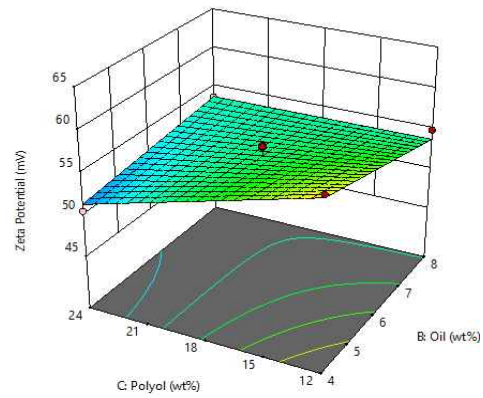
(D)



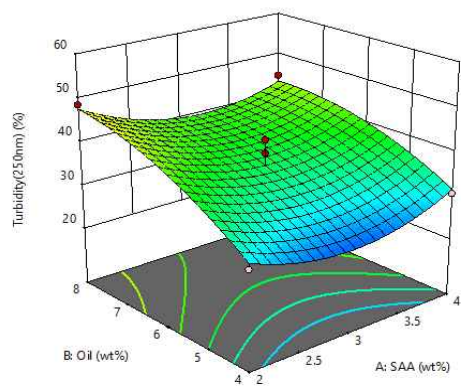
(E)



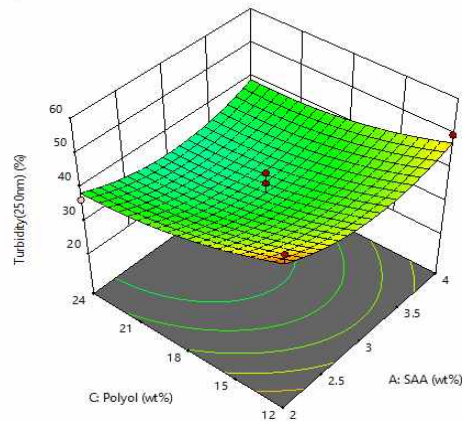
(F)



(G)



(H)



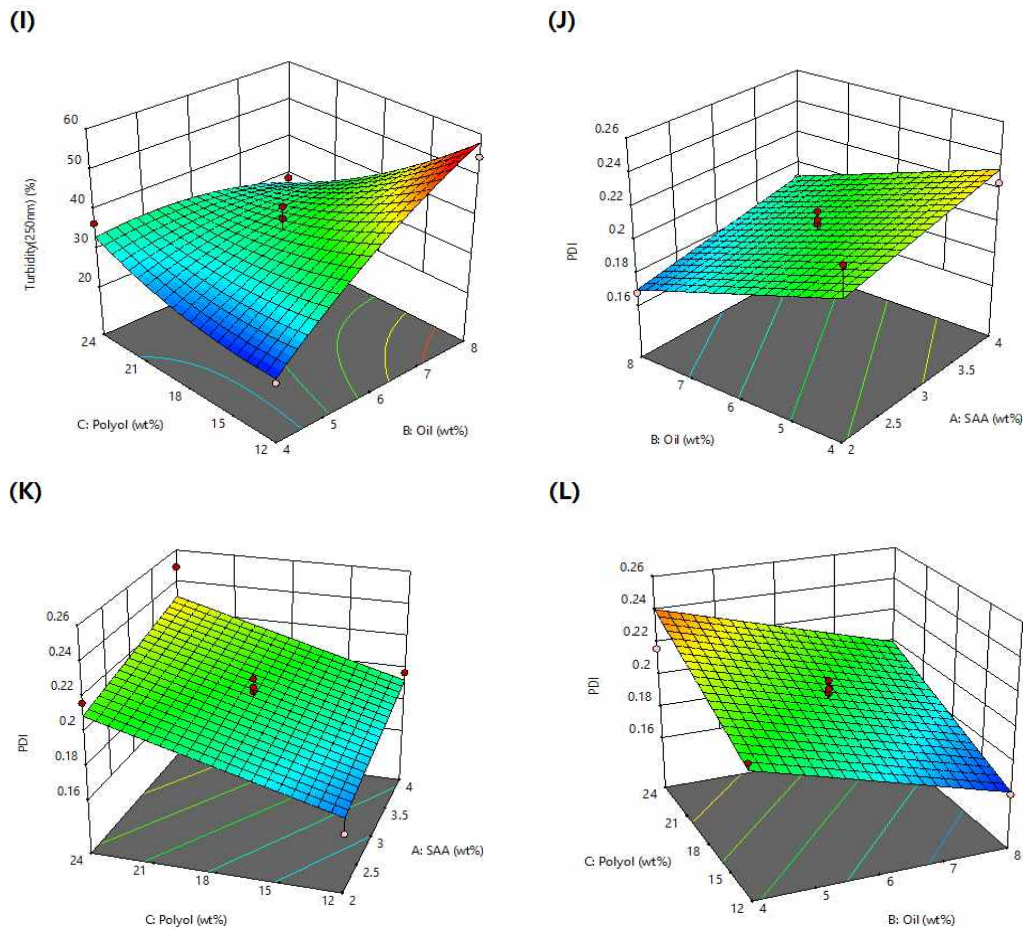


Fig. 4. 3D surface graphs. (A-C): particle size of nanoemulsion depending on surfactant, oil, and polyol contents; (D-F): Zeta potential of nanoemulsion depending on surfactant, oil, and polyol contents; (G-I): turbidity of nanoemulsion depending on surfactant, oil, and polyol contents; (J-L): PDI of nanoemulsion depending on surfactant, oil, and polyol contents.

3.2.5. PEG-free 나노에멀전 최적화

다음 분석 결과를 바탕으로 Design-Expert® Software Version 11을 사용하여 최적화된 PEG-free 나노에멀전 처방을 구하였다. 본 연구에서는 작은 입자 크기 및 다분산지수를 가지고, 제타 전위 값이 높으며, 낮은 현탁도를 나타내는 제형을 최적의 나노에멀전으로 고려하였다. PEG-free 나노에멀전 최적화 기준(Table 9)에 따른 최적 처방은 다음과 같다(Table 10).

RSM을 이용한 PEG-free 나노에멀전의 최적 처방은 계면활성제 함량 2%, 오일 함량 8%, 폴

리올 함량 24%인 제형으로, 입자 크기는 113.618 nm, 제타 전위는 58.768 mV, 현탁도는 34.213%, 다분산도는 0.189의 값을 가질 것으로 예측되었다.

3.3. 온도 안정성

30일 간 온도 안정성 평가 결과, 제조된 나노에멀전 중 Run 1, 10, 13 실험품이 실온 및 4°C에서 분리되었다. 반면, 45°C에서는 모든 에멀전이 안정하였다. 다음은 각 실험품에 대한 입자 크기, 제타 전위, 현탁도, 다분산도의 값을 그래

Table 9. PEG-free nanomultimate optimization criteria

Name	Goal	Lower Limit	Upper Limit
A-SAA	is in range	2.0	4.0
B-Oil	is in range	2.0	6.0
C-Polyol	is in range	12.0	24.0
Y ₁ -Particle Size (nm)	minimize	116.0	167.3
Y ₂ -Zeta Potential (mV)	Maximize	50.0	61.2
Y ₃ -Turbidity (%)	Minimize	22.06	54.54
Y ₄ -PDI	Minimize	0.160000	0.249333

Table 10. PEG-free nanoemulsion optimal prescription

Independent Variables	Optimum Conditions
A-SAA (wt%)	2.0
B-Oil (wt%)	8.0
C-Polyol (wt%)	24.0
Dependent Variables	Predicted Value
Y ₁ -Particle Size (nm)	113.618
Y ₂ -Zeta Potential (mV)	58.768
Y ₃ -Turbidity (%)	34.213
Y ₄ -PDI	0.189

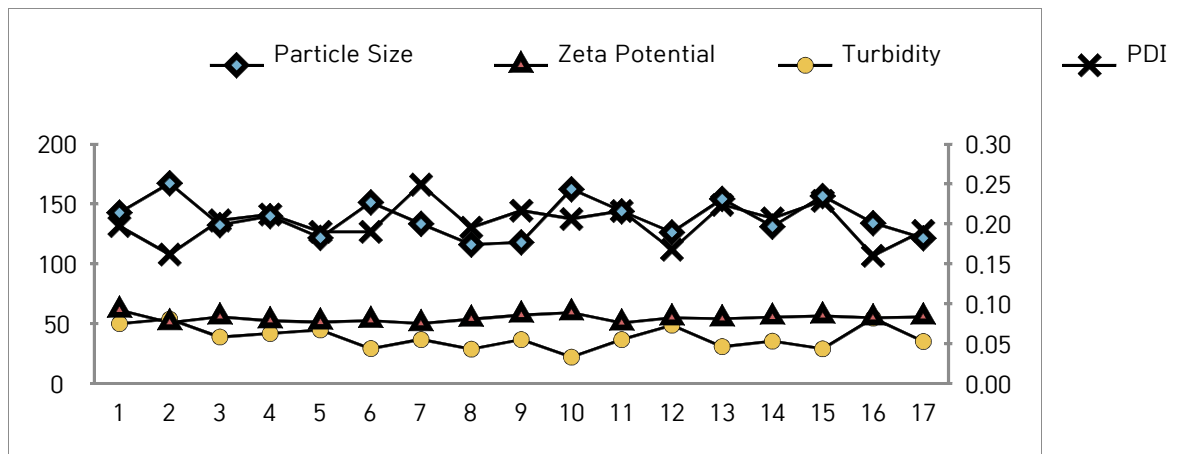


Fig. 5. Response variable values for each sample.

프로 나타낸 것이다(Fig. 5). 왼쪽 Y축 값은 입자 크기, 제타 전위, 현탁도를, 오른쪽 Y축은 다분산지수 값을 나타내었다.

본 실험에서 폴리올 및 오일 함량이 감소할수록 입자 크기가 증가하는 경향을 보였다. Run 1, 10 실험품은 가장 적은 폴리올 함량으로 제조되어 다소 큰 입자 크기를 가진다(Fig. 4C). Run

10 실험품은 또한 가장 적은 오일 함량을 갖는다. 실제로 안정성 평가에서 Run 10 실험품에서 가장 먼저 에멀전의 분리가 관찰되었다. 따라서 폴리올 및 오일 함량의 요인이 에멀전의 안정성에 부정적인 영향을 주었다고 추측된다.

폴리올 함량이 증가함에 따라 입자 크기가 감소하였으나, 제타 전위가 감소하고 다분산지수가

증가하는 경향을 보이면서 제조된 나노에멀전의 안정성에 부정적인 영향을 미침을 알 수 있다 (Fig. 4B-L). Run 13 실험품은 폴리에틸렌 함량이 증가하면서 입자 크기가 감소하였으나 입자 간의 반발하는 힘의 값인 제타 전위가 감소하면서 에멀전의 안정성이 감소하였다고 생각된다.

3.4. FIB를 사용한 나노에멀전 형태 확인

Fig. 6은 FIB (Quanta 3D FEG, FEI Company, USA)를 사용하여 측정된 PEG-free 나노에멀전의 입자 사진이다. Fig. 6에서 나타난 것과 같이 100~200nm 크기의 나노 입자들(연한 회색 반점)이 구형을 가지고 분포되어 있는 것을 확인하였다.

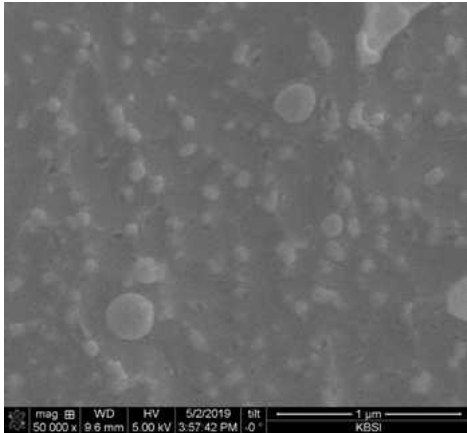


Fig. 6. FIB image of PEG-free nanoemulsion (magnification 50,000x).

4. 결론

본 연구에서는 PEG-free 나노에멀전의 특성 및 안정성에 계면활성제, 오일 및 폴리에틸렌 함량이 미치는 영향을 확인하기 위하여 RSM이 사용되었다.

반응 표면 분석 결과는 다음과 같다.

- 1) Particle size: 실험 조건 및 범위 내에서 계면활성제의 함량은 나노에멀전 입자 크기에 큰 영향을 미치지 않았고 오일 및 폴리에틸렌 함량이 감소할수록 나노에멀전의 입자 크기가 증가하였다.
- 2) Zeta potential: 실험 조건 및 범위 내에서 증가된 폴리에틸렌 함량 및 증가된 계면활성제와 폴리에틸렌 함량의 조합은 제타 전위를 감소시켰다.

3) Turbidity: 오일 함량이 감소할수록, 폴리에틸렌 함량이 증가할수록 현탁도가 감소하였다. 실험 범위 내에서 계면활성제 함량이 증가할 때 현탁도는 감소하였다가 증가하였다.

4) PDI: 실험 조건 및 범위 내에서 오일 함량이 증가할수록 입자 크기와 다분산지수가 감소하는 반면, 폴리에틸렌 및 계면활성제 함량이 증가할수록 다분산지수 또한 증가하였다.

다음 분석의 결과로 얻은 최적화된 나노에멀전 처방은 계면활성제 함량 2%, 오일 함량 8%, 폴리에틸렌 함량 24%로 확인되었다. 본 연구로 최적화된 나노에멀전 제형을 얻을 수 있었다. 현재 나노에멀전은 유용성 성분의 피부 전달 매개체로 주목받고 있다. 우리는 본 연구의 결과를 바탕으로 추후 PEG-free 나노에멀전의 활성성분 담지 및 피부흡수에 관한 연구를 수행할 예정이다.

감사의 글

본 연구는 산업통상자원부와 한국산업기술진흥원이 지원하는 광역협력권산업육성사업으로 수행된 연구결과입니다(과제번호 P0002186).

References

1. P. Thiagarajan, "Nanoemulsions for drug delivery through different routes", *Research in Biotechnology*, Vol.2, No.3, pp. 01-13, (2011).
2. G. Y. Noh, J. Y. Suh, S. N. Park, "Ceramide-based nanostructured lipid carriers for transdermal delivery of isoliquiritigenin: Development, physico-chemical characterization, and in vitro skin permeation studies", *Korean Journal of Chemical Engineering*, Vol.34, No.2, pp. 400-406, (2017).
3. W. G. Cho, K. A. Kim, S. I. Jang, B. O. Cho, "Behaviour of nanoemulsions containing Ceramide III B and stratum corneum lipids", *Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea*, Vol.44, No.1, pp. 31-37, (2018).

4. J. Meyer, R. Scheuermann, H. H. Wenk, "Combining convenience and sustainability: simple processing of PEG-free nanoemulsions and classical emulsions", *SÖFW Journal*, Vol.134 No.6, pp. 54-61, (2008).
5. W. G. Cho, E. H. Kim, B. J. Jeon, Y. K. Cha, S. K. Park, "Stability of nano-emulsions prepared upon change of composition", *Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea*, Vol.39, No.1, pp. 55-63, (2013).
6. P. Shah, D. Bhalodia, P. Shelat, "Nanoemulsion: a pharmaceutical review", *Systematic Reviews in Pharmacy*, Vol.1, No.1, pp. 24-32, (2010).
7. Y. Singh, J. G. Meher, K. Raval, F. A. Khan, M. Chaurasia, N. K. Jain, M. K. Chourasia, "Nanoemulsion: concepts, development and applications in drug delivery", *Journal of Controlled Release*, Vol.252, pp. 28-49, (2017).
8. C. Fruijtier-Pölloth, "Safety assessment on polyethylene glycols (PEGs) and their derivatives as used in cosmetic products", *Toxicology*, Vol.214, No.1/2, pp. 1-38, (2005).
9. R. E. Black., F. J. Hurley, D. C. Havery. "Occurrence of 1, 4-dioxane in cosmetic raw materials and finished cosmetic products", *Journal of AOAC International*, Vol.84, No.3, pp. 666-670, (2001).
10. C. B. Fuh, M. Lai, H. Y. Tsai, C. M. Chang, "Impurity analysis of 1, 4-dioxane in nonionic surfactants and cosmetics using headspace solid-phase microextraction coupled with gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry", *Journal of Chromatography A*, Vol.1071, No.1/2, pp. 141-145, (2005).
11. T. Kato, T. Nakamura, M. Yamashita, M. Kawaguchi, T. Kato, T. Itoh, "Surfactant properties of purified polyglycerol monolaurates", *Journal of Surfactants and Detergents*, Vol.6, No.4, pp. 331-338, (2003).
12. K. C. Kang, N. H. Jeong, "A study on the stability of emulsion by polyglycerol ester", *Journal of Oil & Applied Science*, Vol.30, No.1, pp. 152-159, (2013).
13. R. Su, L. Yang, Y. Wang, S. Yu, Y. Guo, J. Deng, Q. Zhao, X. Jin, "Formulation, development, and optimization of a novel octyldodecanol-based nanoemulsion for transdermal delivery of Ceramide IIIB", *International Journal of Nanomedicine*, Vol.12, pp. 5203-5221, (2017).
14. I. M. Yang, G. T. Oh, C. B. Yu, I. G. Hwang, "Design and analysis of experiments", pp. 432-433, Minyoungsa, (2015).
15. L. O. Orafidiya, F. A. Oladimeji, "Determination of the required HLB values of some essential oils", *International Journal of Pharmaceutics*, Vol.237, No.1/2, pp. 241-249, (2002).
16. K. W. Kim, S. G. Baek, B. J. Park, H. W. Kim, I. J. Rhyu, "Applications of focused ion beam for biomedical research", *Korean Society of Electron Microscopy*, Vol.40, No.4, pp. 177-183, (2010).
17. S. Kotta, A. W. Khan, S. H. Ansari, R. K. Sharma, J. Ali, "Formulation of nanoemulsion: a comparison between phase inversion composition method and high-pressure homogenization method", *Drug Delivery*, Vol.22, No.4, pp. 455-466, (2015).