

센텔라 아시아티카 정량추출물을 함유한 Water in Oil in Water ($W_1/O/W_2$) 에멀전 제조에 관한 연구

서 동 환 · 이 흥 선* · 윤 종 혁 · 김 연 준 · 변 상 요*†

코스맥스 R&I center, *아주대학교 대학원 응용생명공학과 화장품과학전공
(2015년 12월 1일 접수, 2015년 12월 14일 수정, 2015년 12월 15일 채택)

A Study on Preparation of Water in Oil in Water ($W_1/O/W_2$) Emulsion Containing Titrated Extract of *Centella asiatica*

Dong Hoan Seo, Hong Seon Lee*, Jong Hyuk Yoon, Youn Joon Kim, and Sang Yo Byun*†

Cosmax R&I Center, Pangyo innovalley E 601, 255, Pangyo-ro, Bundang-gu, Seongnam-si, Gyeonggi-do 13486, Korea
*Cosmetic Science Major, Applied Biotechnology Department, Graduate School, Ajou University, Gyeonggi-do 16499, Korea
(Received December 1, 2015; Revised December 14, 2015; Accepted December 15, 2015)

요약: 센텔라 아시아티카 정량추출물(TECA)은 병풀에서 얻은 난용성 추출물로 상처치유 및 항주름 물질로 알려져 있다. 본 연구에서는 TECA를 함유한 water in oil in water ($W_1/O/W_2$) 에멀전 제조에 필요한 최적의 실험 조건을 찾기 위해 연구를 진행하였다. TECA의 용해도는 UV 흡광도계를 이용하였으며, 디프로필렌글라이콜(40.0 g), 에탄올(20.0 g) 및 정제수(10.0 g)의 조성에서 2.55 g의 TECA가 용해되는 것을 확인하였다. 에멀전(W_1/O , $W_1/O/W_2$)의 안정도에 영향을 미치는 요인에 대하여 조사하였다. W_1/O 에멀전의 제조하기 위한 최적의 수상 조건은 디프로필렌글라이콜 : 에탄올 : 정제수 : TECA가 40.0 : 20.0 : 10.0 : 2.5% (w/w), 유상 조건은 스쿠알란 : 세틸피이지/피피지-10/1디메치콘 : 세테아릴알코올이 22.5 : 4.0 : 1.0% (w/w)임을 확인하였다. $W_1/O/W_2$ 멀티에멀전을 제조하기 위한 최적의 조건은 정제수 : W_1/O 에멀전 : 폴리소르베이트 80 : 카보머 : 트리에탄올아민의 비율이 55.8 : 40.0 : 4.0 : 0.1 : 0.1% (w/w)임을 확인하였다.

Abstract: Titrated extract of *Centella asiatica* (TECA), which is poorly soluble in water is well known for wound healing and anti wrinkle agent. This study was conducted to find the optimum condition for the preparation of water in oil in water ($W_1/O/W_2$) emulsion containing TECA. Solubility of TECA were measured by UV spectrophotometer. 2.55 g of TECA was dissolved in solution composed of dipropylene glycol (40.0 g), ethanol (20.0 g), and water (10.0 g). Factors affecting stability of the emulsions (W_1/O , $W_1/O/W_2$) was investigated. The optimum conditions for the preparation of W_1/O emulsion was composed of dipropylene glycol : ethanol : water : TECA in a weight ratio of 40.0 : 20.0 : 10.0 : 2.5 for water phase and squalane : cetyl PEG/PPG-10/1 dimethicone : cetearyl alcohol in a weight ratio of 22.5 : 4.0 : 2.5 for oil phase. The optimum conditions for the preparation of $W_1/O/W_2$ multiple emulsion was composed of water : W_1/O emulsion : polysorbate 80 : carbomer : triethanolamine in a weight ratio of 55.8 : 40.0 : 4.0 : 0.1 : 0.1.

Keywords: titrated extract of *Centella asiatica*, $W_1/O/W_2$ multiple emulsion, W_1/O emulsion, solubility, ethanol

† 주 저자(e-mail: dhseo78@cosmax.com)
call: 031)789-3114

1. 서 론

나이가 증가함에 따라 진피층에 존재하는 섬유아세포의 작용과 그 수가 감소하여 콜라겐, 엘라스틴 등의 구조 단백질의 합성량이 감소하고, 피부세포 내 수분이 손실되며, 각질층의 구조가 변화된다[1]. 이런 여러 가지 기전에 의하여 발생하는 피부노화를 예방하고 치료하려는 노력들이 많은 연구자들에 의하여 시도되고 있다. 노화방지용 화장품성분으로 널리 사용된 대표적인 물질들을 살펴보면 주름개선원료인 레티놀과 레티닐팔미테이트(retinylpalmitate), 아테노신, N-acetylglucosamine (NAG), 코엔자임, 효모추출물 등이 많이 사용되었고 최근에는 피부세포에 작용하는 인체 유래성분인 epidermal growth factor (EGF), 펩타이드 등으로 다양해지고 있는 추세이다[2,3]. 피부 노화를 개선시키기 위한 천연물질 개발에 연구가 활발히 진행되고 있으며 세포실험, 임상 실험 등을 통해 특히 천연소재 개발에 노력하고 있다. 천연소재 중 녹차 카테킨, 이소플라본, 커큐민 등이 효과를 나타내는 것으로 보고되고 있고 그 외 코스메슈티컬 소재로 병풀추출물(센텔라 아시아티카 정량추출물)에 관한 다양한 연구가 이루어지고 있다[4-6].

센텔라 아시아티카 정량추출물(titrated extract of *C. asiatica*, TECA)은 asiaticoside 40%, madecassic acid 40%, asiatic acid 20%가 주성분으로 함유되어 있으며, 이 물질들은 피부결합조직, 특히 섬유아세포와 glycosaminoglycans의 정상화 조절에 매우 중요한 역할을 하고 각화세포를 유도해 주며 조직 구성성분의 빠르고 건강한 성장을 촉진시켜 준다. 분자생물학적 기능은 콜라겐 1과 3의 생산과 분비를 촉진시켜 주며, 더 정확하게는 콜라겐 1은 asiaticoside와 madecassic acid에 의해 그리고 콜라겐 3은 madecassic acid에 의해서만 생산 분비가 증가된다. 상처치유 과정에서 중요한 역할을 하는 콜라겐은 proline-RNA 복합체로부터 생합성 되는데 asiaticoside는 proline-RNA 복합체의 생성에 관여하는 폴리펩타이드 합성효소에 직접 작용한다. 궁극적으로 손상된 상피의 콜라겐 형성을 조절하여 상처를 회복시키는 효과를 갖고 있다[6]. 이러한 효능을 가지고 있는 TECA를 화장품에 적용할 경우 주름개선 효과가 기대되나 물에 대한 용해도가 매우 낮아 화장품에 적용하기에는 큰 어려움이 있다. 일반적인 O/W 에멀전

제조 시 TECA를 별도로 용해시키고, 수상에 첨가하여 유화할 경우 TECA의 용해도가 급격하게 떨어져 석출될 가능성이 매우 높으며 수상에 TECA를 용해시켜 W/O 에멀전을 제조할 경우 분리되거나 점도가 떨어지는 문제가 발생할 수 있다. 따라서 내수상인 W₁ 상에 TECA를 용해시키고 W₁/O/W₂ 에멀전을 제조할 경우 석출 및 상 분리 등의 문제들을 해결할 수 있다.

본 실험에서는 상처치유 및 콜라겐생성 능력이 우수하여 제약산업에서도 사용되고 있는 TECA의 용해도를 최대한 높일 수 있는 용매 비율을 찾고 안정한 W₁/O 1차 에멀전을 제조하고자 하였다. 또한 용해도 및 안정도를 유지하기 위해 W₁/O/W₂ 타입의 멀티에멀전의 제조 조건을 확인하고자 하였다.

2. 재료 및 실험

2.1. 기기 및 시약

주성분은 센텔라 아시아티카 정량추출물(TECA, Dong Kook pharm., Korea)을 사용하였으며 주성분을 용해시키기 위한 용매로는 에탄올(ethanol, Korea alcohol industrial, Korea), 부틸렌글라이콜(butylene glycol, Oxea, Germany), 디프로필렌글라이콜(dipropylene glycol, SKC, Korea), 글리세린(glycerine, Emery, Malaysia)을 사용하였다. 1차 에멀전을 제조하기 위한 계면활성제로는 5종을 선정하였고, 계열에 따라 alkyl dimethicone copolyol 계열의 cetyl PEG/PPG-10/1 dimethicone (Evonik, Germany), PEG ester 계열의 PEG-30 dipolyhydroxystearate 및 sugar ester 계열의 sorbitan stearate (Croda, Spain), ether 계열의 steareth-2 (Nikkol, Japan), polyether modified silicone 계열의 PEG-10 dimethicone (Shin-Etsu, Japan)을 사용하였다. 2차 에멀전을 제조하기 위한 계면활성제로는 3종을 선정하였으며 polysorbate 20 (Uniqema, USA), polysorbate 60 (Croda, Spain), polysorbate 80 (I.C.I, Spain)을 사용하였다. 오일로는 식물성계 오일로 squalane (Caroi line cosmetica S. L., Spain), 탄화수소계 오일로 mineral oil (Seojin chemical, Korea), 실리콘계 오일로 cyclopentasiloxane (Shin-Etsu, Japan), 에스테르계 오일로는 caprylic/capric triglyceride (BASF, Germany)를 이용하였다. 1차 에멀전의 계면막의 안정도를 높여주기 위해 사용한 왁스는 식물성인 carnauba wax (Cera rica noda, Japan), 합성왁

Table 1. Solubility of TECA of Different Solvent

		Solvent (g)	Solubility (g)
TECA 3.0 g	Ethanol	30.0	1.52
	Butylene glycol	30.0	1.17
	Dipropylene glycol	30.0	1.39
	Glycerin	30.0	0.13

스로 glyceryl behenate/eicosadioate (Iwase cosfa, Japan), 고급알콜류로는 cetearyl alcohol (BASF, Germany), 고급지방산류로 stearic acid (Yeong nam fat & oil chemical, Korea)를 이용하였다. 2차 에멀전의 점도를 유지하고 안정도를 위하여 수분산성 폴리머로 carbomer (Carbopol 940, Lubrizol, USA)를 이용하였다. 멀티에멀전을 확인하기 위한 형광물질은 calcein (Sigma-Aldrich, USA), pH 조절제로는 triethanolamine (Dow chemical, HongKong)을 이용하였다.

에멀전 제조 기기로는 1차 에멀전 및 2차 에멀전을 제조하기 위하여 homomixer (PRIMIX, Japan), 에멀전의 입자형태를 확인하기 위해 microscope (Olympus BX51, Japan)와 형광입자를 확인하기 위하여 fluorescent microscope (AMG EVOS FL, Japan)를 사용하였다. 용해도를 측정하기 위해 UV-Vis spectrophotometer (Agilent Cary 100 Series UV-Vis, USA)를 사용하였다. 안정도를 확인하기 위해 원심분리기(MF-80, HanIl, SCi. Ind. Korea)를 사용하였다.

2.2. TECA의 용해도 측정

TECA를 최대한 용해시킬 수 있는 용매 조건을 설정하기 위하여 다음과 같은 방법으로 실험하였다. TECA 3.0 g과 에탄올, 부틸렌글라이콜, 디프로필렌글라이콜 및 글리세린을 각각 30.0 g씩 혼합 후 70 °C까지 가온하여 완전 용해시킨 후 24 h 뒤 원심분리기를 이용하여 8000 rpm으로 20 min 동안 원심분리하고 상층액을 취해 0.45 μm 멤브레인필터로 여과 후 TECA의 최대 흡수 파장인 214 nm에서 측정하여 용해도를 측정하였으며 용매 비율에 따른 용해도 측정 또한 같은 방법을 적용하였다.

2.3. W₁/O 1차 에멀전 제조

TECA를 함유한 W₁/O 1차 에멀전은 다음과 같은 방법으로 제조하였다. 수상은 TECA, 디프로필렌글라이

콜, 에탄올 및 정제수를 무게비율로 혼합 후 70 °C까지 가열하여 완전 용해시킨 후 유상은 오일, 계면활성제 및 왁스를 무게비율로 혼합하고 70 °C까지 가열하여 완전 용해시킨다. 수상을 유상에 천천히 투입하며 수상이 유상에서 자리를 잡을 때까지 호모믹서는 2000 rpm 이하로 진행하고 수상이 유상에 포집된 후부터는 rpm을 서서히 올려가며 최종 6500 rpm으로 5 min 동안 교반한다. 유화과정 완료 후 30 °C까지 냉각하였다.

2.4. W₁/O/W₂ 에멀전 제조

W₁/O 1차 에멀전을 함유하는 W₁/O/W₂ 에멀전은 다음과 같은 방법으로 제조하였다. 수상은 정제수, 점증제 및 계면활성제를 무게비율로 혼합하여 완전 용해시킨 후 제조된 W₁/O 1차 에멀전을 서서히 첨가시키며 2500 rpm으로 5 min 동안 교반하고 pH 조절제를 첨가하였다.

2.5. 에멀전 유화 입자 측정

제조된 W₁/O형 에멀전 및 W₁/O/W₂형 다중에멀전의 유화입자는 광학현미경과 칼세인을 함유한 W₁/O/W₂형 다중에멀전의 유화입자는 형광현미경을 이용하여 측정하였다.

2.6. 에멀전의 안정도 평가

제조된 W₁/O형 에멀전 및 W₁/O/W₂형 다중에멀전의 안정도 테스트는 A. Segail이 사용했던 방법으로 원심분리기를 이용하여 상온에서 3500 rpm, 30분 적용 후 분리되는 정도를 관찰하여 안정도를 확인하였다[7].

3. 결과 및 고찰

3.1. TECA의 용해

TECA는 물에 대한 용해도가 매우 낮은 난용성 물질이기 때문에 용해도를 최대한 높일 수 있는 용매 및 비율의 변화를 주면서 용해도를 확인하였다. Table 1은 에탄올, 부틸렌글라이콜, 디프로필렌글라이콜 및 글리세린을 30.0 g으로 고정하고 TECA를 3.0 g 첨가하여 과포화상태로 만들어 용해한 후 원심분리로 침전시켜 상등액만을 측정된 것이다. 에탄올이 1.52 g으로 제일 좋은 용해도를 보였으며 폴리올류도 1.17 g 이상 용해시켰으나 보습제로 많이 사용하는 글리세린의 경우 거의 용해되지 못하고 분산되는 상태임을 확인하였다.

Table 2. Solubility of TECA of Different Concentration Solvent

		Ethanol (g)	Dipropylene glycol (g)	Solubility (g)
TECA 3.0 g	Water 10.0 g	10.0	50.0	2.46
		20.0	40.0	2.55
		30.0	30.0	2.62
		40.0	20.0	2.63
		50.0	10.0	2.65

에탄올은 기능성물질을 용해시키는 용매의 기능으로 많이 사용하고 있으나 약물 전달 시스템에서는 약물의 침투효과를 높이는 것으로 보고되고 있다[8]. 에탄올 및 디프로필렌글라이콜의 용해도가 1.52 g 및 1.39 g임을 확인하였다.

Table 2는 TECA를 3.0 g, 정제수를 10.0 g으로 고정시키고 용해도가 가장 높았던 에탄올과 디프로필렌글라이콜의 비율을 10.0 ~ 50.0 : 50.0 ~ 10.0 g으로 변화하며 용해도를 관찰하였다. 용매의 비율에 따라 용해되는 양은 2.46 ~ 2.65 g임을 확인하였고 이는 용해도가 가장 좋았던 에탄올의 함량이 증가함에 따라 용해도 또한 증가하는 것을 확인하였다. 에탄올은 용해도를 높이는 용매이나 에멀전의 안정도 측면에서는 점도를 떨어트리거나 에멀전의 계면을 파괴할 수 있어 최소한의 양인 20.0 g으로 고정하였으며 이때 디프로필렌글라이콜은 40.0 g이며 TECA가 2.55 g 용해됨을 확인하였다. 디프로필렌글라이콜은 프로필렌글라이콜 두 개가 결합되어있으며 용제 및 보습제로 사용되며 녹는점 2 °C 이하로 W₁/O 1차 에멀전의 내수상이 열면서 입자가 파괴되는 것을 막아주어 저온에서의 안정도를 높여 줄 수 있다. 또한 수소결합을 통하여 수분이 피부에서 증발하는 것을 막아줌으로써 보습 효과를 유지시켜주며, 피부에 성분들을 침투시키도록 운반하는 역할을 한다[9]. 용매 및 비율은 디프로필렌글라이콜 : 에탄올 : 정제수 : TECA를 40.0 : 20.0 : 10.0 : 2.5% (w/w)로 선정하였다.

3.2. W₁/O 1차 에멀전 제조

3.2.1. 계면활성제의 종류에 따른 영향

W₁/O 1차 에멀전을 제조하기 위한 계면활성제 선정

Table 3. Formulation of W₁/O Emulsion (A1 ~ 5: Containing Different Surfactant)

Ingerident	w/w (100%)				
	A1	A2	A3	A4	A5
Mineral oil	to 100				
Cetyl PEG/PPG-10/1 dimethicone	4.0	-	-	-	-
PEG-30 dipolyhydroxystearate	-	4.0	-	-	-
Sorbitan stearate	-	-	4.0	-	-
Steareth-2	-	-	-	4.0	-
PEG-10 dimethicone	-	-	-	-	4.0
Dipropylene glycol	40.0				
Ethanol	20.0				
Water	10.0				
TECA	2.5				

은 각 계열에서 1종씩 선택하여 5종을 선정하였고, 내상은 디프로필렌글라이콜 : 에탄올 : 정제수 : TECA로 40.0 : 20.0 : 10.0 : 2.5% (w/w)이며 내상의 합이 72.5%로 high internal phase ratio emulsion 수준의 내상의 비율로 고정하였다[10]. 외상은 탄화수소계인 미네랄오일을 23.5% (w/w) 고정하고 계면활성제는 4.0% (w/w) 함량으로 종류에 따른 에멀전입자의 형성을 확인하였다. Table 3은 계면활성제의 함량 및 처방을 나타내고 있으며 계면활성제는 계열에 따라 alkyl dimethicone copolyol 계열의 cetyl PEG/PPG-10/1 dimethicone, PEG ester 계열의 PEG-30 dipolyhydroxystearate, sugar ester 계열의 sorbitan stearate, ether 계열의 steareth-2, poly-ether modified silicone 계열의 PEG-10 dimethicone을 사용하였다. Cetyl PEG/PPG-10/1 dimethicone과 PEG-30 dipolyhydroxystearate를 제외한 나머지 3종 계면활성제는 유화는 되었으나 3일 만에 분리가 일어났으며 sorbitan stearate, steareth-2 및 PEG-10 dimethicone은 사용하기에 부적합을 확인하였다. Figure 1은 제조 후 1일이 지난 현미경입자 사진이며 A3, A4 및 A5는 초기부터 입자의 크기가 매우 큰 것을 확인할 수 있었다. PEG-30 dipolyhydroxystearate 계면활성제 또한 안정함을 유지하는 못하고 5일 경과 시 2층으로 분리되었으며 상층부분이 젤링된 것을 확인하였다. 이 계면활성제는 굉장히 긴 체인모양으로 가운데 부분은 폴리엠틸렌글라이콜그룹이 형성되어 친수성이 강하고 양쪽 끝부분엔 폴리하이드록시스테레이트가 있는 친유성

Table 4. Formulation of W₁/O Emulsion (B1 ~ 4: Containing Different Oil, C1 ~ 5: Containing Different Concentration Cetyl PEG/PPG-10/1 Dimethicone)

Ingerident	w/w (100%)								
	B1	B2	B3	B4	C1	C2	C3	C4	C5
Squalane	23.5	-	-	-	-	-	-	-	-
Mineral oil	-	23.5	-	-	-	-	-	-	-
Cyclopentasiloxane	-	-	23.5	-	-	-	-	-	-
Caprylic/Capric triglyceride	-	-	-	23.5	-	-	-	-	-
Cetyl PEG/PPG-10/1 dimethicone			4.0		1.0	2.0	4.0	6.0	8.0
Dipropylene glycol					40.0				
Ethanol					20.0				
Water					10.0				
TECA					2.5				

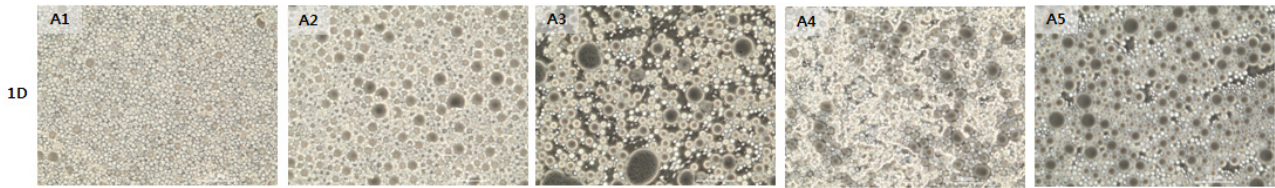


Figure 1. Optical microscopy images of a W₁/O emulsion. (A1: cetyl PEG/PPG- 10/1 dimethicone, A2: PEG-30 dipolyhydroxystearate, A3: sorbitan stearate, A4: steareth-2, A5: PEG-10 dimethicone) (X 400).

그룹이 존재하여 W/O 에멀전 형성 시 U자 모양으로 친수성부분은 수상쪽으로 친유성부분은 유상쪽으로 배열을 하게 되나 수상을 이루고 있는 구성 성분 중 정제수의 함량이 적고 디프로필렌글라이콜과 에탄올과의 계면에서의 상용성이 좋지 못하여 튼튼한 계면을 형성하지 못하고 분리된 후 오일상에서 겔링 된 것으로 판단된다[11]. Cetyl PEG/PPG-10/1 dimethicone 계면활성제의 경우 다른 계면활성제에 비해서 입자도 작고 균일하게 형성되는 것을 확인하였으며 유희시 호모믹서의 회전수와 시간을 증가 시켜도 일정하게 유희가 됨을 확인하였다. 수상의 조성이 디프로필렌글라이콜 : 에탄올 : 정제수 : TECA로 40.0 : 20.0 : 10.0 : 2.5% (w/w)일 때 가장 적합한 계면활성제는 cetyl PEG/PPG-10/1 dimethicone임을 확인하였다.

3.2.2. 오일의 종류에 따른 영향

Table 4는 오일의 종류에 따른 처방을 나타내고 있으며 사용한 오일은 4종으로 식물성계 오일인 스쿠알란, 탄화수소계 오일로 미네랄오일, 실리콘계 오일로

cyclopentasiloxane, 에스테르계 오일로 caprylic/capric triglyceride를 사용하였으며 모두 같은 함량으로 실험을 진행하였으며 입자형태를 측정하고 안정도를 확인하였다. 가장 불안정하고 큰 입자를 형성한 것은 caprylic/capric triglyceride이었으며 7일 만에 분리가 일어났다. 에탄올과 caprylic/capric triglyceride를 단일 혼합 후 층 분리현상을 관찰한 결과 에탄올이 caprylic/capric triglyceride에 약 50% 정도가 용해되는 것을 확인하였고 결국 W₁/O 에멀전의 유희 과정 및 형성된 후 에탄올이 내상에서 외상으로 빠져 나오면서 에멀전이 파괴된 것으로 생각된다. cyclopentasiloxane을 적용한 에멀전 입자 또한 매우 불안정해 보였고 14일 만에 분리됨을 확인하였다. 외상인 오일상에 용해되어 입자를 형성하는 계면활성제인 cetyl PEG/PPG-10/1 dimethicone과 cyclopentasiloxane의 상용성이 좋지 못해 완전히 용해되지 못하고 현탁한 상태였으며 에멀전 제조 시 계면활성제가 계면에서 계면활성제로의 기능을 제대로 작용하지 못해 분리된 것을 확인하였다. 스쿠알란과 미네랄오일은 초기 입자 형성도 작고 균일했으며 28일

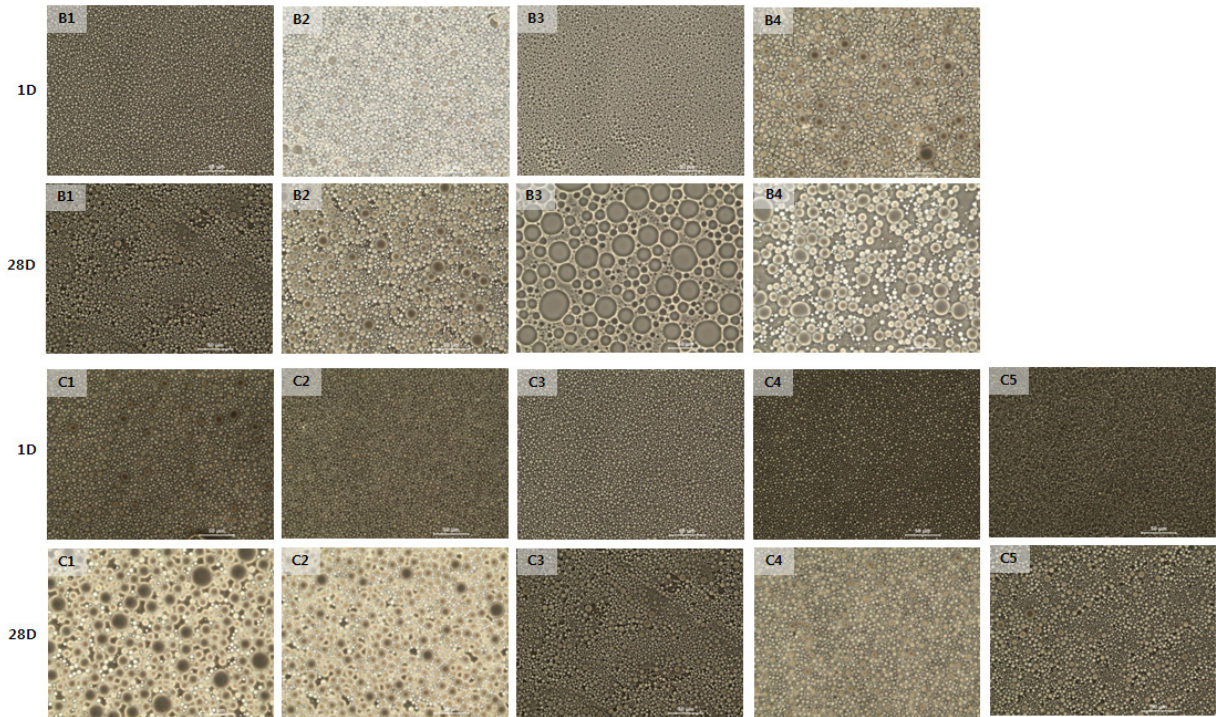


Figure 2. Optical microscopy images of a W_1/O emulsion. (B1: squalane, B2: mineral oil, B3: cyclopentasiloxane, B4: caprylic/capric triglyceride, C1 ~ 5: cetyl PEG/PPG-10/1 dimethicone 1.0 ~ 8.0% (w/w)) (X 400).

경과 후의 입자 크기 또한 크게 변하지 않았으나 스쿠알란의 입자가 좀더 작고 안정하게 유지되는 것을 확인하였다. 미네랄오일보다는 직선 구조를 가지고 있는 스쿠알란과 cetyl PEG/PPG-10/1 dimethicone의 탄소사슬과의 상용성이 좋아 안정된 입자를 형성하는 것으로 판단된다.

3.2.3. 계면활성제의 함량에 따른 영향

Figure 2 (C1 ~ 5)는 cetyl PEG/PPG-10/1 dimethicone의 함량 변화에 따른 에멀전의 형태를 나타내고 있다. Table 4의 조성으로 제조된 W_1/O 에멀전의 입자형태 비교 결과 cetyl PEG/PPG-10/1 dimethicone의 함량이 증가 할수록 입자는 작고 균일해졌으나 함량이 1.0 ~ 2.0% (w/w)일 때 28일 경과 후 입자의 크기가 커진 것을 확인하였다. 이러한 결과는 에멀전의 계면에서 충분한 양의 계면활성제가 존재해야 안정된 상태를 유지하나 계면활성제의 양이 부족하여 불안정한 상태로 에멀전이 커진 것으로 판단된다[11,12]. 에멀전 제조 시 4.0 ~ 8.0% (w/w)에서 입자크기 변화는 거의 없었으며 안정된 입자가 형성됨을 확인하였고 최적의 계면활성

제 함량은 4.0% (w/w)임을 확인할 수 있었다.

3.2.4. 왁스의 종류에 따른 영향

에멀전 제형에서 왁스는 점도를 유지하거나 사용감 및 W_1/O 에멀전을 이용하여 $W_1/O/W_2$ 멀티 에멀전 제조 시 1차 에멀전의 계면막을 튼튼하게 유지시켜 주기 위한 목적으로 사용한다[13]. Table 5는 왁스의 종류에 따른 처방이며 사용한 왁스로는 식물성인 carnauba wax, 합성왁스인 glyceryl behenate/eicosadioate, 고급알코올류로는 ceteryl alcohol, 고급지방산류로는 stearic acid를 이용하였다. 내상은 디프로필렌글라이콜 : 에탄올 : 정제수 : TECA를 40.0 : 20.0 : 10.0 : 2.5% (w/w)로 외상은 squalane : cetyl PEG/PPG-10/1 dimethicone을 22.5 : 4.0% (w/w)로 고정하고 왁스 종류에 따른 영향을 확인하였다. Carnauba wax의 경우 매우 긴 탄소사슬로 인해 입자도 크고 안정도도 떨어지는 현상을 보였다. Glyceryl behenate/eicosadioate는 큰 부피로 인해 계면에 배열할 때 입체장애 효과로 더 큰 입자를 형성하고 안정도 또한 떨어지는 것을 확인할 수 있었다[12]. Figure 3에서 ceteryl alcohol 및 stearic acid를 적용한 초기 에

Table 5. Formulation of W₁/O Emulsion (D1 ~ 4: Containing Different Wax, E1 ~ 5: Containing Different Concentration Cetearyl Alcohol)

Ingerident	w/w (100%)								
	D1	D2	D3	D4	E1	E2	E3	E4	E5
Squalane					to 100				
Cetyl PEG/PPG-10/1 dimethicone					4.0				
Carnauba wax	1.0	-	-	-	-	-	-	-	-
Glyceryl behenate/eicosadioate	-	1.0	-	-	-	-	-	-	-
Cetearyl alcohol	-	-	1.0	-	0.0	0.5	1.0	2.0	3.0
Stearic acid	-	-	-	1.0	-	-	-	-	-
Dipropylene glycol					40.0				
Ethanol					20.0				
Water					10.0				
TECA					2.5				

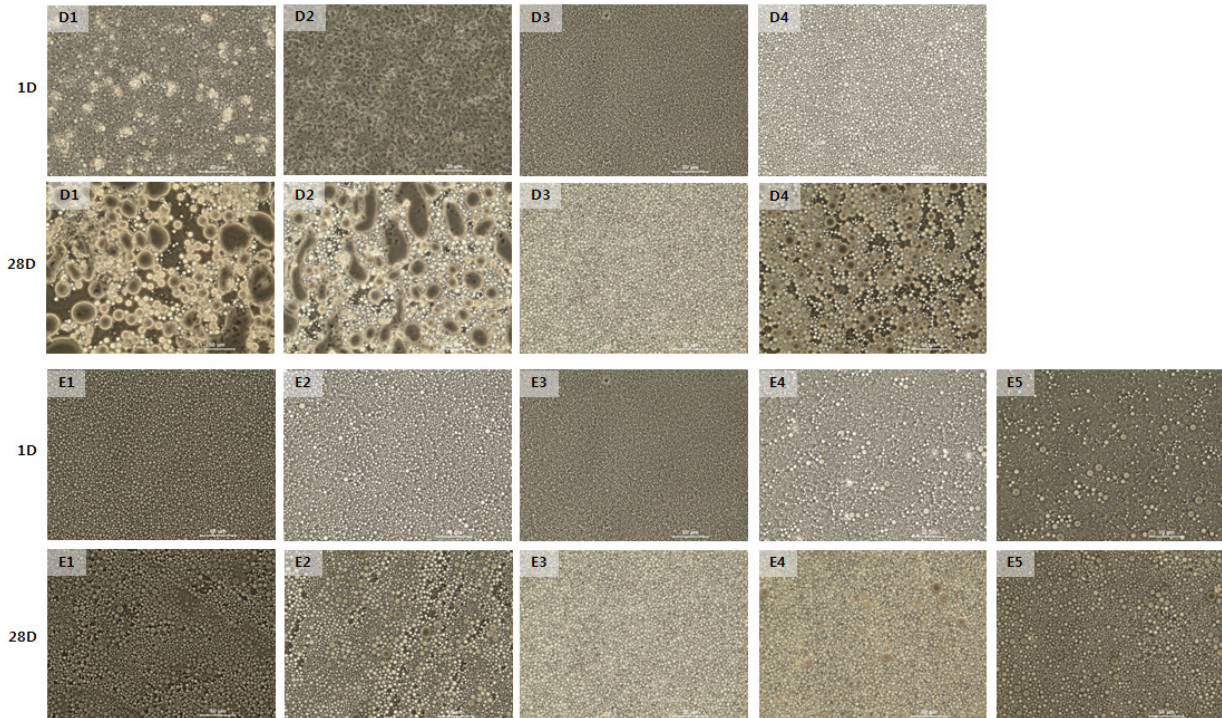


Figure 3. Optical microscopy images of a W₁/O emulsion. (D1: carnauba wax, D2: glyceryl behenate/eicosadioate, D3: cetearyl alcohol, D4: stearic acid, E1 ~ 5: cetearyl alcohol 0.0 ~ 3.0% (w/w)) (X 400).

멀전의 크기가 비슷하게 유지됨을 확인하였으며 유사한 탄소사슬 길이를 가지고 있어 에멀전 형성 시 계면활성제의 탄소사슬길이와 근접하는 탄소수를 가진 고급알코올이나 고급지방산이 입자형성에 도움을 주는 것을 확인할 수 있었다[14]. 안정도 관찰 결과 stearic

acid를 포함한 에멀전의 입자가 cetearyl alcohol 에멀전보다 커진 것을 확인하였고 cetearyl alcohol이 좀 더 안정한 형태를 이루는데 도움을 주는 것을 확인할 수 있었다.

Table 6. Formulation of $W_1/O/W_2$ Emulsion (F1 ~ 3: Containing Polysorbate 20, 60 and 80)

Ingerident	w/w (100%)		
	F1	F2	F3
Water	to 100		
Carbopol 940 (1%)	10.0		
Polysorbate 20	4.0	-	-
Polysorbate 60	-	4.0	-
Polysorbate 80	-	-	4.0
W_1/O emulsion (E3)	40.0		
Triethanolamine (10%)	1.0		

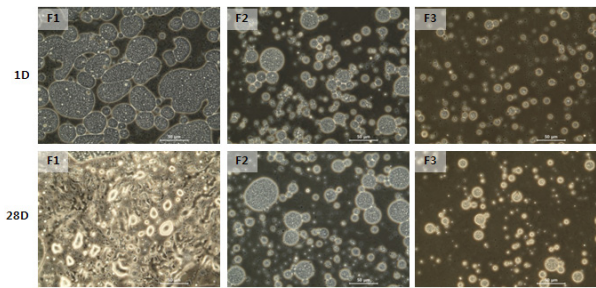
3.2.5. 왁스의 함량에 따른 영향

오일상에 존재하는 ceteryl alcohol은 유화과정 중 오일상과 외부수상에 존재하는 계면활성제에 의해 계면과 수상으로 이동하여 수소결합에 의한 라멜라 구조를 형성하여 견고한 막을 형성한다[12]. Table 5는 ceteryl alcohol의 함량에 따른 처방을 나타내고 있으며 모든 함량에서 초기 입자의 형태는 비슷하게 형성되었으나 안정도 관찰 후 0.0 ~ 0.5% (w/w) 경우 1.0% (w/w) 이상 함유한 에멀전 보다는 입자가 커진 것을 확인하였다. 그러나 2.0 ~ 3.0% (w/w) 적용한 경우 오일상 내에서 부분적으로 결정화되어 석출되는 것을 확인하였다. Figure 3 (E1 ~ 5)에서 ceteryl alcohol이 1.0% (w/w) 이상일 때 입자의 안정도에 영향을 주는 것을 확인하였으며 최적의 조건은 1.0% (w/w)임을 확인할 수 있었다.

3.3. $W_1/O/W_2$ 에멀전 제조

3.3.1. 계면활성제의 종류에 따른 영향

$W_1/O/W_2$ 에멀전은 W_1/O 1차 에멀전이 내상인 오일상이 되고 W_2 수상에 친수성 계면활성제가 용해되어 있어 오일상이 혼합되면서 기계적인 교반에 의해 멀티 에멀전이 형성 된다. 이때 친수성 계면활성제의 특성에 따라 입자의 크기 및 안정도에 매우 큰 차이가 발생한다. 이에 따라 계면활성제의 종류를 변경하면서 최적의 제조 조건을 확인하고자 하였다. 멀티 에멀전을 제조하기 위해 사용한 비이온성 계면활성제인 polysorbate는 솔비탄 에스테르와 에틸렌 옥사이드의 반응으로 만들어지며 지방산잔기의 종류에 따라 laurate

**Figure 4.** Optical microscopy images of a $W_1/O/W_2$ emulsion. (F1: polysorbate 20, F2: polysorbate 60, F3: polysorbate 80) (X 400).

(polysorbate 20, HLB: 16.7), stearate (polysorbate 60, HLB: 14.9), oleate (polysorbate 80, HLB: 15)로 구분된다. polysorbate 계면활성제는 독성이 없고 안정한 에멀전 입자를 만드는 것으로 알려져 있으며[15] 화장품이나 transdermal drug delivery system에 사용되고 있다[16]. Polysorbate 20, 60 및 80의 함량 변화에 따른 입자의 형태 및 안정도를 확인하였으며 Table 6은 1차 에멀전(처방 E3)의 비율을 40% (w/w)로 고정하고 polysorbate 20, 60 및 80의 함량을 4.0% (w/w)로 첨가하며 멀티에멀전을 제조하였다. 입자의 크기 및 안정도에서는 polysorbate 20이 가장 크고 불안정한 형태를 이루었고 polysorbate 60 및 80 순서로 작고 균일하며 안정한 입자를 형성하였다(Figure 4). Polysorbate를 이용한 나노사이즈 크기의 입자 제조 시 동일한 친수성그룹을 가지고 있기 때문에 소수성그룹이 짧을수록 작은 입자를 형성하는 것은 일반적이며 Navideh Anarjan의 결과에서도 보여주고 있다[17]. 그러나 단순한 오일상이 아닌 수상을 포함하고 있는 마이크로 크기의 오일상(W_1/O 1차 에멀전)을 유화하기 위해서는 소수성그룹이 짧은 쪽 보다는 긴 쪽이 안정하고 균일한 $W_1/O/W_2$ 에멀전을 형성하는 것을 확인할 수 있었다. 소수성 그룹이 상대적으로 짧은 polysorbate 20 보다는 polysorbate 60 및 80이 좀 더 작고 균일한 입자를 형성하였고 polysorbate 80을 적용했을 가장 안정한 에멀전을 형성하는 것을 확인할 수 있었다.

3.3.2. Calcein을 함유한 $W_1/O/W_2$ 에멀전의 입자관찰

Calcein은 수용성 형광물질로 W_1 수상에 용해시켜 $W_1/O/W_2$ 에멀전 제조할 경우 멀티에멀전이 제조됨을 확인할 수 있다[7]. Calcein을 1차 에멀전의 내수상에

Table 7. Centrifuge Test Data of Sample (A1 ~ F3) (A1 ~ 5 Is Only Measured 1 d)

	A1	A2	A3	A4	A5	B1	B2	B3	B4	C1	C2	C3	C4	C5	D1	D2	D3	D4	E1	E2	E3	E4	E5	F1	F2	F3	
1 d	O	△	X	X	X	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
28 d	-	-	-	-	-	O	O	X	X	X	X	O	O	O	X	X	O	O	O	O	O	△	△	X	O	O	

No Separation-O, Slightly Separation or Precipitation-△, Separation-X

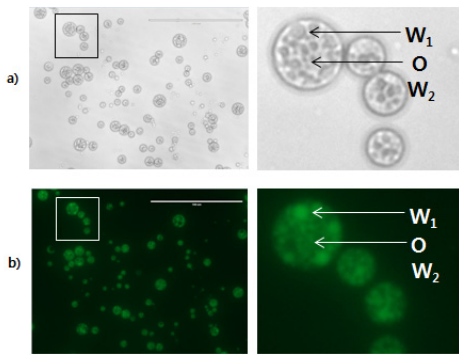


Figure 5. Fluorescence microscopy image of a W₁/O/W₂ emulsion containing calcein. (a: optical microscopy image, b: fluorescence microscopy image) (X 400).

0.05% (w/w) 적용하여 멀티에멀전을 제조하였으며 형광현미경을 통해 관찰하였다. Figure 5에서 멀티에멀전의 내수상의 밝기가 더 밝은 것을 확인하였고 멀티에멀전에서 전체적인 형광빛이 나타나는 것은 W₁/O/W₂ 에멀전이 구형을 이루고 있기 때문이다. 형광현미경 관찰에서 W₁/O/W₂ 멀티에멀전이 형성된 것을 확인할 수 있었다.

3.4. 에멀전의 안정도 평가

화장품산업에서 안정도 평가는 일반적으로 향취, 색상, 점도 및 입자의 크기 변화를 관찰하여 평가하며 특히 에멀전 입자의 평가는 현미경을 통한 크기 변화를 관찰하여 확인한다. 불안정한 에멀전인 경우 일정기간 경과 후 입자는 매우 커지거나 파괴되지만 계면이 튼튼하게 형성된 입자의 경우는 크기 변화가 없거나 변화도도가 작은 편이다. 좀 더 빠른 시간에 안정도를 확인방법으로는 원심분리를 이용한 연구가 진행되었으며[7,18], 분리가 발생하면 불안정한 것으로 볼 수 있고 안정할수록 분리 되는 현상이 적거나 없다. Table 7에서 각 샘플에 대한 원심분리 결과를 나타내고 있으며 분리되어 불안정한 경우(X), 조금 분리되거나 침전이 발생하여 불안정해 보이는 경우(△) 및 분리되지 않고

안정한 경우(O)를 확인하였다. 5종의 계면활성제에 의해 제조된 A1 ~ 5는 제조 후 하루가 경과된 1 d만 측정하였으며 A1 (cetyl PEG/PPG-10/1 dimethicone)만 분리 현상도 없었고 입자 크기 또한 작게 형성됨을 확인하였다. 4종의 오일에서는 B1 ~ 2가 분리현상이 없었으나 입자변화가 작았던 B1 (squalane)이 가장 안정하였고, cetyl PEG/PPG-10/1 dimethicone의 함량에서는 C3 ~ 5 (4.0 ~ 8.0% (w/w))가 입자의 크기 변화가 거의 없었고 분리현상 또한 없어 안정함을 나타내었다. 왁스의 종류 및 함량 변화에서는 D3 (cetearyl alcohol) 및 E1 ~ 3 (cetearyl alcohol 0.0 ~ 1.0% (w/w))에서 안정하였으나, E4 ~ 5 (cetearyl alcohol 2.0 ~ 3.0% (w/w))에서는 석출된 cetearyl alcohol이 침전되어 불안정함을 확인하였다. W₁/O/W₂ 에멀전에서는 polysorbate 80을 적용한 F3 멀티에멀전이 입자 변화도 작았고 분리현상도 없는 것을 확인하였다. 결론적으로 입자의 크기 변화가 작으며 원심분리 실험에서도 분리되지 않은 것이 안정함을 확인할 수 있었다.

4. 결 론

본 연구에서는 TECA의 용매 조건과, TECA를 함유한 W₁/O 에멀전의 제조 조건 및 이를 함유한 W₁/O/W₂ 에멀전의 제조 조건을 관찰하였다. 디프로필렌글라이콜, 에탄올 및 정제수의 비율을 변화시켜 용해도를 측정한 결과 디프로필렌글라이콜(40.0 g), 에탄올(20.0 g) 및 정제수(10.0 g)의 조성일 때 TECA를 2.55 g을 용해시킬 수 있는 것을 확인하였다. W₁/O 에멀전을 제조하기 위하여 계면활성제의 종류 및 함량, 오일의 종류, 왁스의 종류 및 함량을 변화시켜 입자를 제조한 결과 미네랄오일이 외상을 이루고 있을 때 alkyl dimethicone copolyol 계열의 cetyl PEG/PPG-10/1 dimethicone이 가장 작고 균일한 입자를 얻었으며, 계면활성제가 cetyl PEG/PPG-10/1 dimethicone일 때 오일 중에서는 스쿠알란이 가장 안정한 입자를 형성하는 것을 확인하였고

계면활성제의 함량이 증가함에 따라 안정한 에멀전이 형성되었으며 4.0% (w/w) 이상에서는 큰 차이가 없었다. 왁스의 종류를 변화시키며 제조한 결과 부피가 큰 형태의 왁스 보다는 계면활성제의 탄소사슬과 유사한 형태를 가지고 있는 cetearyl alcohol이 가장 안정하였으며 함량이 증가할수록 안정한 입자를 형성하였고 함량이 1.0% (w/w)일 때 가장 안정한 입자가 형성되었다. 본 결과로서 TECA의 용해도를 최대한 높이고 안정한 W₁/O 에멀전 제조를 위한 수상의 조건은 디프로필렌글라이콜 : 에탄올 : 정제수 : TECA가 40.0 : 20.0 : 10.0 : 2.5% (w/w), 유상의 조건은 squalane : cetyl PEG/PPG-10/1 dimethicone : cetearyl alcohol이 22.5 : 4.0 : 1.0% (w/w)임을 확인하였다.

W₁/O/W₂ 에멀전 제조 조건으로 비이온성 계면활성제인 polysorbate 20, 60 및 80을 적용하였으며 소수그룹이 가장 긴 polysorbate 80을 4.0% (w/w) 적용했을 때 균일하고 안정한 입자를 형성하는 것을 확인하였다. 제조된 멀티에멀전의 형광현미경 확인결과 내 수상의 형광빛이 상대적으로 높은 것으로 보아 W₁/O/W₂ 멀티에멀전이 형성된 것을 확인하였다. 에멀전의 입자형태 및 원심분리 확인 결과 입자의 크기가 급격하게 커지지 않는다면 안정할 것으로 판단된다. W₁/O/W₂ 에멀전의 최적의 제조 조건은 정제수 : W₁/O에멀전 : polysorbate 80 : carbomer : triethanolamine의 비율이 55.8 : 40.0 : 4.0 : 0.1 : 0.1% (w/w)임을 확인하였다.

Reference

1. I. D. Kim, R. H. Kwon, Y. Y. Heo, H. J. Jung, H. Y. Kang, and B. J. Ha, Supercritical extraction of oriental herb: anti-aging and anti-wrinkles effects, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, **23**(6), 529 (2008).
2. E. J. Lee, The development of anti-wrinkle cosmetic ingredients from glehniae radix cum rhizoma, Master's Thesis Dissertation, Chung Ang Univ., Seoul, Korea (2010).
3. Y. K. Jo, The development of anti-wrinkle cosmetic ingredients from leonuri herba extract, Master's Thesis Dissertation, Chung Ang Univ., Seoul, Korea (2011).
4. S. Lee, Novel nantural products as active material for beauty food, *J. Food Sci.*, **40**, 10 (2008).
5. M. S. Lim, M. A. Pack, and S. N. Park, Preparation of nano-emulsion containing *Polygonum aviculare* extract for enhanced transdermal delivery, *Appl. Chem. Eng.*, **23**(2), 222 (2012).
6. D. W. Kim, M. H. Cho, S. Y. Park, J. H. Lee, G. W. Lee, M. S. Park, J. K. Park, and U. K. Jee, Preparation and evaluation of titrated extract of *Centella asiatica* niosome/w/o system cream for site specific targeting, *J. Kor. Pharm. Sci.*, **32**(4), 291 (2002).
7. A. Segall, M. Sosa, A. Alami, C. Enero, F. Hormaechea, M. T. Pizzorno, C. Bregni, and R. Serrao, Stability study of lipoic acid in the presence of vitamins A and E in o/w emulsions for cosmetic application, *J. Cosmet. Sci.*, **55**, 449 (2004).
8. E. Touitou, N. Dayana, L. Bergelsonb, B. Godina, and M. Eliazza, Ethosomes—novel vesicular carriers for enhanced delivery: characterization and skin penetration properties, *J. of Controlled Release*, **65**(3), 403 (2000).
9. A. C. Williams and B. W. Barry, Penetration enhancers, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **64**, 128 (2012).
10. K. J. Lissant, Structure of high-internal-phase-ratio emulsions, *J. Colloid Interface Sci.*, **47**(2), 416 (1974).
11. W. H. Kim, K. S. Lee, and K. K. Lee, An experimental study on the property and stability of W/O emulsion by various structures of emulsifier, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **38**(2), 119 (2012).
12. J. Y. Yeon, B. R. Shin, T. G. Kim, J. M. Seo, C. H. Lee, S. G. Lee, and H. B. Pyo, A study on emulsion stability of O/W and W/S emulsion according to HLB of emulsifier, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **40**(3), 227 (2014).
13. E. J. Lim, A study on the release of electrolyte from W/O/W multiple emulsion stabilized with xanthan gum and cetostearyl alcohol, Master's Thesis Dissertation, Kon Kuk Univ., Seoul, Korea (1995).
14. C. K. Zhoh, K. Y. Lee, and D. N. Kim, The influen-

- ces of fatty alcohol and fatty acid on rheological properties of o/w emulsion, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **35**(2), 103 (2009).
15. R. Jantharaprapap and G. Stagni, Effects of penetration enhancers on *in vitro* permeability of meloxicam gels, *Int. J. Pharm.*, **343**, 26 (2007).
 16. W. Liu, D. Sun, C. Li, Q. Liu, and J. Xu, Formation and stability of paffin oil-in-water nano-emulsions prepared by the emulsion inversion point method, *J. Colloid. Interface. Sci.*, **303**, 557 (2006).
 17. N. Anarjan and C. P. Tan, Effects of selected polysorbate and sucrose ester emulsifiers on the physicochemical properties of astaxanthin nanodispersions, *Molecules*, **18**, 768 (2013).
 18. C. Anchisi, A. M. Maccioni, C. Sinico, and D. Valenti, Stability studies of new cosmetic formulations with vegetable extracts as functional agents, *Il Farmaco*, **56**, 427 (2001).