

레조르시놀 비스-에틸헥사노에이트를 함유한 나노에멀전의 유화제 종류에 따른 형성

조 완 구[†]

전주대학교 의과대학학 바이오·기능성식품학과
(2016년 1월 11일 접수, 2016년 2월 23일 수정, 2016년 3월 11일 채택)

Formation of Nano-emulsions with Resorcinol bis-ethylhexanoate upon Type of Emulsifiers

Wan Goo Cho[†]

College of Medical Science, Jeonju University, 303, Cheonjam-ro, Wansan-gu, Jeonju 55069, Korea
(Received January 11, 2016; Revised February 23, 2016; Accepted March 11, 2016)

요약: 본 연구에서는 미백제인 RS White를 함유한 O/W 나노에멀전의 형성 가능성을 유화제 종류별로 실험하였다. 친수성계면활성제로 Tween 80, 60, HCO 60 및 40과 친유성 계면활성제로 Span 80을 사용한 시스템에서는 적절한 농도에서 나노에멀전이 형성되었으나 Myrj 52, Montanov L 및 Tegocare 450과 Span 80을 사용한 시스템에서는 형성되지 않았다. 형성된 나노에멀전은 입자의 직경이 100 nm 미만의 반투명 외관을 보였으며 시간 경과에 따른 안정성 평가에서도 안정성을 유지하였다. 이들의 경피흡수 정도를 마이크로에멀전과 비교한 결과 24 h 동안 피부 투과량은 나노에멀전은 $70.84 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, O/W 마이크로에멀전은 $28.97 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 으로 나타났다. 따라서, 본 연구는 RS White 미백제를 함유한 안정한 나노에멀전이 기능성 소재의 효율적인 피부 전달체로서 응용 가능성이 있음을 시사한다.

Abstract: RS White (resorcinol bis-ethylhexanoate) is used in cosmetics as a skin whitening agent. In this study, we studied the possibility of nano-emulsion formation containing whitening agent, RS White, with different types of emulsifying agents. With Tween 80, 60, HCO 60 and 40 as a hydrophilic surfactants and Span 80 as a hydrophobic surfactant, nano-emulsions were formed at appropriate concentrations, but they were not formed in the system using the Myrj 52, Montanov L, and Tegocare 450 with Span 80. The diameter of nano-emulsion sphere was smaller than 100 nm. The emulsion showed a translucent appearance and maintained stability in stability evaluation with time. *In vitro* skin permeation experiments showed that amounts of skin permeated nano-emulsion for 24 h were $70.84 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ and those of O/W emulsion were $28.97 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. In conclusion, a stable nano-emulsion containing the resorcinol bis-ethylhexanoate is effective for potential efficacy system as an efficient delivery system of the functional materials into skin.

Keywords: nano-emulsion, resorcinol bis-ethylhexanoate, emulsifier, absorption, PIC

[†] 주 저자 (e-mail: wgcho@jj.ac.kr)
call: 063)220-2064

1. 서 론

멜라닌은 피부를 보호하는 중요한 방어수단이나, 자외선, 호르몬 또는 약물 부작용 등의 다양한 요인으로, 멜라닌이 과도하게 합성되어 피부 표면에 침착되면, 기미, 주근깨 등의 원하지 않는 색소 침착이 유발된다. 따라서 이러한 색소 침착을 개선하기 위해 알부틴(arbutin), 하이드로퀴논(hydroquinone), 비타민 C 유도체(vitamin C derivatives) 등의 물질이 개발되어 사용되어 왔다[1,2]. 또한 다양한 유기 합성 방법을 활용하여 에스테르 형태의 미백제가 개발되어 보고되고 있다[2].

나노에멀전은 입경이 20 ~ 200 nm 정도의 크기를 가지며 입경이 작기 때문에 반투명한 외관을 갖는다[3-5]. 마이크로에멀전과는 다르게 나노에멀전은 열역학적으로 안정하지 않지만 장시간 물리적으로 안정할 수 있으며 산업적으로 중요한 의미가 있는 계면활성제의 함량이 적기 때문에 의약품, 화장품 및 농업 분야에서 다양하게 응용되고 있다[6,7]. 일반적으로 나노에멀전은 전단력을 가진 믹서를 이용하여 계에 기계적인 에너지를 가하거나 고압 유평기 또는 초음파 등과 같이 높은 에너지를 사용하는 방법으로 제조된다[8]. 그러나 저 에너지를 이용한 유평 방법이 최근 관심의 대상이 되고 있는데 이는 상전이 방법, 직접 또는 자발적 유평 방법 등이며 이들 방법은 미세한 입경의 에멀전 제조는 물론 입경 분포의 폭이 적은 에멀전을 얻을 수 있다[9].

상전이 방법은 유평과정 중에 발산되는 화학적 에너지를 이용하는 방법으로 이는 계면활성제 분자의 곡률이 음에서 양으로 또는 양에서 음으로의 변화를 의미한다. 이러한 변화는 일정 온도에서는 조성의 변화로 달성할 수 있으며 이러한 유평법을 조성 상전이 유평법(phase-inversion composition method, PIC)이라 칭한다[10-12]. PIC 유평방법에서 중심이 되는 사항은 작은 입경의 에멀전을 얻기 위해서는 유평과정에서 라멜라액정상 또는 이중 연속상 마이크로에멀전이 생성되어야 하며 이는 계면활성제 집합체의 평균 곡률이 영이 됨을 의미한다[13-15].

본 연구에서는 개발된 피부 미백제를 오일상으로 하고 다양한 혼합계면활성제를 사용하여 상승된 온도에서 저 에너지 유평법의 일종인 PIC 유평법을 이용하여 형성된 에멀전의 성질과 안정성에 대해 보고하고자 한다. 또한 제조된 나노에멀전과 마이크로에멀전의 경피

흡수 결과를 비교하였다.

2. 재료 및 실험방법

2.1. 시약

Table 1에 실험에 사용한 시약을 정리하였다. 화장품용 원료는 각 생산업체로부터 받아 그대로 사용하였으며 물은 Milli Q (Millepore Co., Milford, MA, USA)에서 18 MW·cm로 통과시킨 것을 사용하였다. 백색 무취의 RS White는 레조르시놀 비스-에틸헥사노에이트이며 제공된 시료를 그대로 사용하였다.

2.2. O/W 나노에멀전의 제조

조성 상전이(phase inversion composition, PIC) 방법을 이용하여 나노에멀전을 제조하였다. 먼저 오일상으로 칸테릴라 왁스, RS White, Tween 80, Span 80을 80 °C로 용해하였다. 다음으로 수용액은 물에 EDTA-2Na를 용해하여 준비하였다. 유평은 유상에 수용액을 80 °C에서 스포이드를 이용하여 2 mL/min.의 속도로 첨가하면서 교반하였으며 300 rpm으로 고정하였다. 유평이 끝나면 시료를 물중탕에서 실온으로 냉각하였다.

2.3. 입자 크기, 다분산도 및 안정성 실험

평균 입경과 분포도는 dynamic light scattering 방법을 활용한 입자측정기(ELS-8000, Otsuka, Japan)를 사용하여 에멀전을 희석 없이 실온에서 측정하였다. 측정할 때의 산란각은 90 °C에서 진행하였다.

2.4. 경피 흡수 측정

RS White를 함유한 나노 에멀전의 피부 투과 증진을 확인하기 위해 Franz diffusion cell을 이용하여 피부 투과 실험을 진행하였다. 피부 투과 실험에 사용한 쥐의 피부는 경추 탈골로 치사시킨 ICR outbred albino mice (7주령, 암컷)의 등에서 적출하여 사용하였다. 적출한 피부는 피하지방과 조직을 제거한 후 사용하였다. Receptor chamber에 receptor phase (pH 7.4 PBS) 5 mL를 채운 후 각질층이 위로 향하도록 donor와 receptor phase 사이에 피부를 고정시켰다. 실험이 진행되는 동안 항온수조를 이용해 온도를 37 ± 1 °C로 유지하였다. 시료 0.2 g을 donor 부분의 피부 표면에 가한 후 시간에 따라 매회 0.4 mL의 receptor phase를 sampling port

Table 1. List of Used Reagents

| Chemical name | Trade name | Company |
|---|----------------|---------------------------------|
| Polyoxyethylene (20) sorbitanmonooleate | Tween 80 | Croda (UK) |
| Sorbitan monooleate | Span 80 | Croda (UK) |
| Candelilla wax | Candelilla wax | Kahl GmbH & Co. KG (Germany) |
| Resorcinol bis-ethylhexanoate | RS White | R&S (Korea) |
| EDTA-2Na | EDTA-2Na | AKZO (Netherlands) |
| Polyglyceryl-3 methylglucose distearate | Tegocare 450 | Evonik (Germany) |
| Polyoxyethylene (40) stearate | Myrj 52S | Croda (UK) |
| Cetearyl olivate, Sorbitan olivate | Olivem 1000 | Vital (Brasil) |
| C14-22 Alcohols & C12-20 Alkyl glucoside | Montanov L | Seppic (France) |
| PEG-60 Hydrogenated castor oil | HCO 60 | Nikko (Japan) |
| PEG-40 Hydrogenated castor oil | HCO 40 | Nikko (Japan) |
| Polyoxyethylene (20) sorbitanmonostearate | Tween 60 | Croda (UK) |

Table 2. HPLC Conditions for Quantification of RS White

| | |
|----------------------|---|
| Column | Shim-pack VP-ODS (L : 250 nm, LD : 4.6 mm) |
| Column temperature | 40 °C |
| Detector | UVD 170s DIONEX |
| Detection wavelength | 274 nm |
| Flow rate | 1 mL/min |
| Injection volume | 20 µL |
| Mobile phase | 7% acetic acid in water : 100% acetonitrile |
| Analytical condition | 0 - 15 min (B, 20 → 40%), 15 - 30 min (B, 40 → 100%), 30 - 40 min (B, 100%), 40 - 50 min (100 → 20%) |

를 통하여 채취하였다. 채취 직후 동량의 receptor phase를 receptor chamber에 보충하였다. 채취한 시료 속 약물의 양은 HPLC을 이용하여 측정하였다. 시료 속 RS White의 정량은 최대흡수파장(λ_{max})인 274 nm의 흡광도를 이용하여 HPLC를 이용하여 분석하였다. 분석 조건은 Table 2에 나타내었으며 다음과 같은 분석 조건에서 RS White의 피크는 24 min에서 관찰되었고, 검량선을 이용하여 RS White의 양을 정량하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 계면활성제 종류에 따른 RS White / 칸데릴라 왁스 나노에멀전의 형성

다양한 친수성 계면활성제를 변화시켜 친수성계면활성제/친유성계면활성제/칸데릴라 왁스/미백제를 오일상으로 하고 EDTA-2Na, 0.02 wt%를 함유하는 수용액상을 75 °C에서 오일상에 첨가하는 PIC 유화법으로 나노에멀전을 제조하였다. 여기서 친수성 계면활성제

는 Tegocare 450, Myrj 52, Olivem 1000, Montanov L, HCO 60, HCO 40, Tween 60 및 Tween 80를 각각 사용하였으며 친유성 계면활성제는 Span 80으로 고정하였다. 계면활성제는 친수성/친유성 계면활성제 비율을 4.5 / 0.5로 하고 칸데릴라왁스/RS White는 3.0 / 3.0 비율로 전체 오일상의 농도를 11.0 wt%로 하여 나노에멀전을 제조하고 그 결과를 Figure 1에 나타냈다. Tegocare 450, Myrj 52, Olivem 1000 및 Montanov L을 사용한 시스템에서는 겔을 형성하는 D상의 전상 영역을 관찰하게 어려웠으며 Tegocare 450 및 Olivem 1000를 사용한 시스템에서는 제조 후 냉각 과정에서 계면활성제의 석출로 층분리가 관찰되었다. Myrj 52와 Montanov L을 사용한 시스템은 분리 현상은 관찰되지 않았으나 나노에멀전의 외관인 반투명을 보이지 않았으며 입도 측정에서도 수 µm의 입도를 보였다. 그러나 Figure 1에서 반투명의 외관을 보이는 HCO 60, 40, Tween 60 및 80으로 제조된 에멀전의 입도는 모두 100 nm 미만의 평균 입도를 보였다.



Figure 1. Photograph of nano-emulsions of hydrophilic surfactant / hydrophobic surfactant / candelilla wax / RS White / water system using PIC emulsification process.

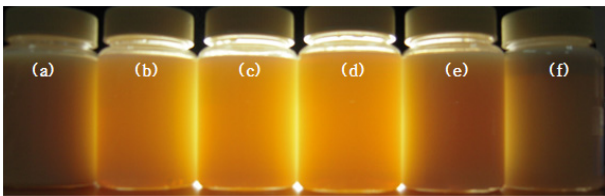


Figure 2. Photograph of nano-emulsions of Tween 60 / Span 80 / candelilla wax / RS White / water system using PIC emulsification process varying the HLB of emulsifiers, the ratio of Tween 60 / Span 80, (a): 5.0 / 0.0, (b): 4.5 / 0.5, (c): 4.1 / 0.9, (d): 3.6 / 1.4, (e): 3.4 / 1.6, (f): 2.9 / 2.1.

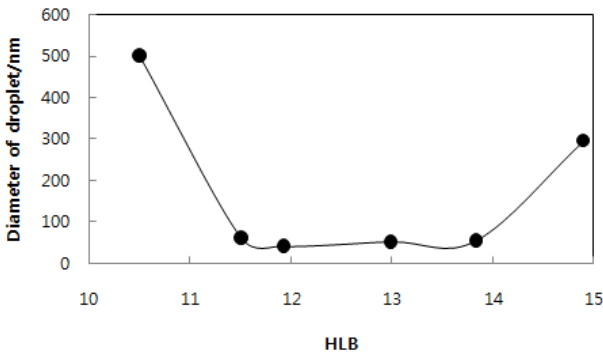


Figure 3. Diameter of nano-emulsions of Tween 60 / Span 80 / candelilla wax / RS White / water system using PIC emulsification process varying the HLB of emulsifiers.

3.2. 선정된 계면활성제의 HLB에 따른 유화 입자 크기 대한 영향

앞 절에서 나노에멀전을 형성한 Tween 60과 HCO 40 및 60과 Span 80의 혼합 계면활성제의 조성에 따른 최적의 나노에멀전을 제조하기 위하여 혼합계면활성제의 HLB에 따른 에멀전의 입도 분포를 평가하고자

하였다. 혼합계면활성제의 HLB는 Tween 80을 친수성 계면활성제로 사용하여 먼저 보고된 다음의 산술적 방법으로 계산할 수 있었다[16].

$$HLB_{mix} = HLB_A \times A\% + HLB_B \times B\%$$

여기서 HLB_{mix} 는 혼합계면활성제의 HLB이고 $HLB_{A/B}$ 는 각각 계면활성제 A와 B의 HLB이며 A%와 B%는 계면활성제 A와 B의 중량 %이다. 모든 HLB는 25 °C에서 얻었다. Figure 2에는 Tween 60 / Span 80의 HLB에 따른 에멀전 형성 결과를 나타냈다. Figure 3에는 입자 크기에 대한 HLB의 영향에 대해 나타냈다. 이 결과는 보고된 Tween 80 시스템과 유사한 결과를 보였다[17-19]. 혼합계면활성제의 HLB가 11.5 ~ 14 사이에서 50 nm 정도의 입도를 가진 나노에멀전이 형성되었다. 그러나 HLB 값이 11 이하이거나 15 이상에서는 나노에멀전이 형성되지 않고 마이크로에멀전이 형성되었으며 외관상으로도 현탁된 보습을 보였다. 이들 마이크로에멀전은 제조 후 1주일 이내에 크리밍 현상으로 인한 상분리 현상을 보여 불안정하였다.

Figure 4에는 HCO 60 / Span 80의 HLB에 따른 에멀전 형성 결과를 나타냈으며 Figure 5에는 입자 크기에 대한 HLB의 영향에 대해 나타냈다. HLB의 변화에 따라 12 부근의 매우 좁은 영역에서 나노에멀전을 형성하였으며 Figure 6에 나타난 HCO 40 / Span 80의 경우에도 계면활성제 비율이 4.5 / 0.5인 경우에 57.1 nm 정도의 입자 크기를 갖는 나노에멀전이 형성되었으나 그 밖의 HLB 영역에서는 나노에멀전을 형성하지 않았다.

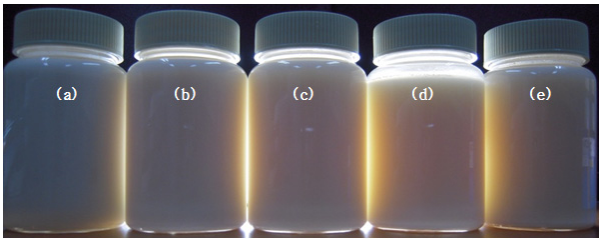


Figure 4. Photograph of nano-emulsions of HCO 60 / Span 80 / candelilla wax / RS White / water system using PIC emulsification process varying the HLB of emulsifiers, the ratio of HCO 60 / Span 80, (a): 5.0 / 0.0, (b): 4.5 / 0.5, (c): 4.1 / 0.9, (d): 3.6 / 1.4, (e): 3.4 / 1.6.

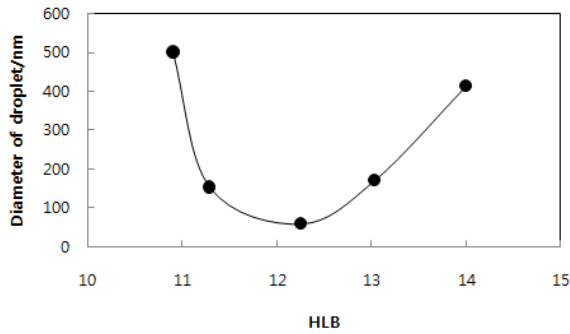


Figure 5. Diameter of Nano-emulsions of HCO 60 / Span 80 / candelilla wax / RS White / water system using PIC emulsification process varying the HLB of emulsifiers.

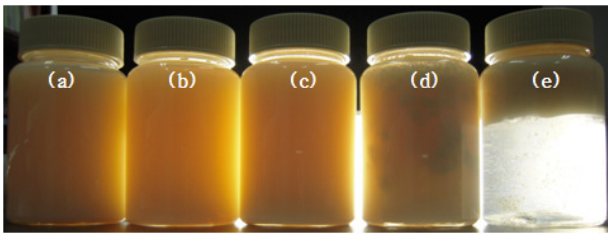


Figure 6. Photograph of nano-emulsions of HCO 40 / Span 80 / candelilla wax / RS White / water system using PIC emulsification process varying the HLB of emulsifiers, the ratio of HCO 60 / Span 80, (a): 5.0 / 0.0, (b): 4.5 / 0.5, (c): 4.1 / 0.9, (d): 3.6 / 1.4, (e): 3.4 / 1.6.

3.3. 나노에멀전의 장기 안정성

Figure 7에 제조된 나노에멀전의 시간 경과에 따른 안정성 결과를 나타냈다. 4주간 입자 크기의 변화를 주기적으로 측정하였으며 입자 크기가 작은 나노에멀전은 변화를 보이지 않았다. 이는 사용된 미백제와 칸데릴라

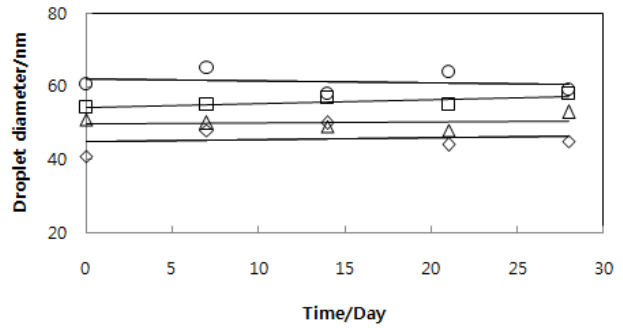


Figure 7. Droplet diameter of Tween 60 / Span 80 / candelilla wax + RS White / water system using PIC emulsification process against time varying the ratio of Tween 60 / Span 80, ◇: 4.5 / 0.5, ○: 3.4 / 1.6, △: 4.1 / 0.9, □: 3.6 / 1.4.

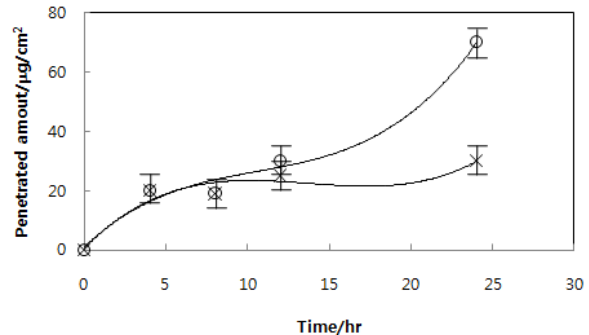


Figure 8. *In vitro* skin-permeation profiles of O/W emulsion and nano-emulsion containing RS White through dorsal mouse skin.

왁스의 물에 대한 용해성이 낮아 Ostwald ripening으로 설명되는 안정성 변화에 영향을 받지 않는 것으로 생각되었다. 그러나 나노에멀전이 형성되지 않고 입도가 나노에멀전 입도 범위를 벗어나는 에멀전의 상층부에 크리밍 현상이 관찰되었으며 상분리가 관찰되었다.

3.4. 나노에멀전의 경피 흡수

RS White를 함유한 나노에멀전의 경피 흡수능을 비교하기 위해 3.0 wt%의 미백제를 함유한 Figure 2의 (c)의 나노에멀전을 피부투과실험에 사용하였다. 대조군으로는 3.0 wt% RS White를 담지한 o/w 에멀전을 사용하였다. Figure 8에 나타난 것과 같이 24 h 동안 시간에 따른 피부 투과량은 나노에멀전(70.84 µg/cm²)와 O/W 에멀전(28.97 µg/cm²)의 결과를 보였고 시간별 투과능 관찰 결과 8 h 이후부터 나노에멀전의 피부 투과 효과

가 커지는 것을 관찰하였다. 이러한 결과를 통해 RS White를 나노에멀전에 담지 했을 경우 대조군에 비해서 유효 성분을 피부 깊숙이 잘 전달시키는 것으로 확인되었고, 8 h 이후부터 나노에멀전의 피부 투과 효과가 커지는 것을 확인하였다. 이는 나노에멀전의 약물 경피흡수 증가의 실험 결과와 일치하는 결과를 보였다[20].

4. 결 론

본 논문에서는 미백제인 RS White (레조르시놀 비스-에틸헥사노에이트)를 함유하고 칸데릴라 왁스를 오일 상으로하고 친수성계면활성제/친유성계면활성제로 구성된 O/W 나노에멀전의 형성 가능성을 실험한 결과 다음과 같은 결과를 도출하였다.

1) 친수성 계면활성제로서 Tween 80, 60, HCO 60 및 40은 친유성계면활성제로 Span 80으로 구성된 적정한 농도에서 나노에멀전이 형성되었으나 Myrj 52, Olivem 1000, Montanov L 및 Tegocare 450은 형성되지 않았다.

2) 형성된 나노에멀전은 100 nm 미만의 반투명 외관을 보였으며 시간 경과에 따른 안정성 평가에서도 안정성을 유지하였다.

3) 형성된 나노에멀전의 경과흡수 가능성을 마크로에멀전과 비교한 결과 24 h 동안 시간에 따른 피부 투과량은 나노에멀전은 $70.84 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, O/W 에멀전은 $28.97 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 을 나타냈다.

따라서 RS White를 함유한 안정한 나노에멀전은 기능성 소재의 효율적인 피부 전달체로서 응용 가능성이 있음을 시사한다.

Acknowledgement

본 연구는 보건복지부 보건의료연구개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것임(과제고유번호 HN12C0056).

Reference

1. S. Briganti, E. Camera, and M. Picardo, Chemical and instrumental approaches to treat hyperpigmentation, *Pigment. Cell. Res.*, **16**(2), 101 (2003).
2. W. G. Cho, C. T. Kim, S. H. Choi, and Y. K. Cha, Report of global cosmetic projects of Ministry of Health & Welfare, Republic of Korea (Project No. HN12C0056) (2014).
3. C. Solans, P. Izquierdo, J. Nolla, N. Azemar, and M. J. Garcia-Celma, Nano-emulsions, *Curr. Opin. Colloid Inter. Sci.*, **10**(3-4), 102 (2005).
4. C. Solans, I. Sole, A. Fernandez-Arteaga, J. Nolla, N. Azemar, J. M. Gutierrez, A. Maestro, C. Gonzalez, and C. M. Pey, Surfactant science series, Ed. Hidalgo-Alvarez Roque, 146, Taylor and Francis Group (2010).
5. J. M. Gutierrez, C. Gonzalez, A. Maestro, I. Sole, C. M. Pey, and J. Nolla, Nano-emulsions: New applications and optimization of their preparation, *Curr. Opin. Colloid Interf. Sci.*, **13**, 245 (2008).
6. M. Antonietti and K. Landfester, Polyreactions in miniemulsions, *Prog. Polym. Sci.*, **27**(4), 689 (2002).
7. J. M. Asua, Miniemulsion polymerization, *Prog. Polym. Sci.*, **27**, 1283 (2002).
8. T. Delmas, H. Piraux, A. C. Couffin, I. Texier, F. Vinet, P. Poulin, M. E. Cates, and J. Bibette, How to prepare and stabilize very small nanoemulsions, *Langmuir*, **27**(5), 1683 (2011).
9. F. Ganachaud and J. L. Katz, Nanoparticles and nanocapsules created using the Ouzo effect: spontaneous emulsification as an alternative to ultrasonic and high-shear devices, *Chem. Phys. Chem.*, **6**(2), 209 (2005).
10. A. Forgiarini, J. Esquena, C. Gonzalez, and C. Solans, Formation of nano-emulsions by low-energy emulsification methods at constant temperature, *Langmuir*, **17**(7), 2076 (2001).
11. 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 Interf. Sci.*, **303**(2), 57 (2006).
12. O. Sonneville-Aubrun, D. Babayan, D. Bordeaux, P. Lindner, G. Rata, and B. Cabane, Phase transition pathways for the production of 100 nm oil-in-water emulsions, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **11**(1), 101 (2009).
 13. D. Morales, J. M. Gutierrez, M. J. Garcia-Celma, and C. Solans, A study of the relation between bicontinuous microemulsions and oil/water nanoemulsion formation, *Langmuir*, **19**(18), 7196 (2003).
 14. P. Izquierdo, J. Esquena, Th. F. Tadros, C. Dederen, J. Feng, M. J. Garcia-Celma, N. Azemar, and C. Solans, Phase behavior and nano-emulsion formation by the phase inversion temperature method, *Langmuir*, **20**(16), 6594 (2004).
 15. E. H. Kim and W. G. Cho, Nano-emulsion formed with phospholipid-nonionic surfactant mixtures and its stability, *J. Soc. Cosmet. Sci. Kor.*, **40**(3), 221 (2014).
 16. E. H. Kim and W. G. Cho, Candelilla wax nano-emulsions prepared by phase inversion composition(PIC) method, *J. Kor. Oil Chem. Soc.*, **31**(2), 203 (2014).
 17. E. H. Kim and W. G. Cho, Nanoemulsions containing vitamin E acetate prepared by PIC(Phase Inversion Composition) methods: Factors affecting droplets sizes, *J. Kor. Oil Chem. Soc.*, **30**(4), 602 (2013).
 18. E. H. Kim and W. G. Cho, Stable liquid paraffin-in-water nanoemulsions prepared by phase inversion composition method, *J. Soc. Cosmet. Sci. Kor.*, **40**(2), 133 (2014).
 19. W. G. Cho, Application of stable O/W nanoemulsions with skin depigmenting agent for integration type of cosmetics, *J. of Digital Convergence*, **13**(4), 417 (2015).
 20. F. Shakeel, S. Baboota, A. Ahuja, J. Ali, and S. Shafiq, Skin permeation mechanism and bioavailability enhancement of celecoxib from transdermally applied nanoemulsion, *J. of Nanobiotechnology*, **6**(8), 1 (2008).