

Poloxamer를 이용한 Swollen Micelle의 Tocopheryl Acetate 안정화

김미선* · 윤경섭†

제주대학교 화학·코스메틱스학과

(2019년 5월 30일 접수; 2019년 6월 25일 수정; 2019년 6월 28일 채택)

Stabilization of Tocopheryl Acetate of Swollen Micelle by Poloxamer

Mi-Seon Kim* · Kyung-Sup Yoon†

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

(Received May 30, 2019; Revised June 25, 2019; Accepted June 28, 2019)

요약 : 계면활성제가 수용액 중에 용해되면 용액 내에서 micelle (< 20 nm) 이라는 응집체를 형성하며, micelle은 그 내부에 활성물질을 담지하여 가용화 제형이 형성될 수 있다. Swollen micelle은 50~100 nm 정도로 일반 가용화 제형보다 더 많은 양의 활성물질을 담지할 수 있는 제형이다. Swollen micelle은 고압 유회와 같은 별도의 공정이 필요한 liposome이나 nanoemulsion과는 달리 특별한 공정이 필요 없어 생산적인 면에서 좀 더 효율성 있는 가용화 및 입자형성 방법이라고 할 수 있다. 본 연구에서는 Poloxamer 407을 이용하여 swollen micelle 제형에 대한 안정화 실험을 진행한 후, Response Surface Methodology (RSM) 을 이용하여 tocopheryl acetate 가용화에 대한 제형 최적화 실험을 진행하였다. 가용화에 영향을 주는 계면활성제와 활성물질인 tocopheryl acetate를 요인(factor)로 설정하고 서로 간의 상관관계를 확인하였다. 평가방법으로서 온도 및 시간에 따른 안정성과 입자 분포 및 크기를 확인하였으며, FIB를 통해 효능 물질을 담지한 swollen micelle의 입자 구조 및 모양을 확인하였다. 이러한 실험 결과들을 통하여 tocopheryl acetate를 안정화시킨 swollen micelle은 poloxamer 407 0.500%, octyldodeceth-16 0.387%, tocopheryl acetate 0.945%일 때 가장 최적화된 처방이라 할 수 있다.

주제어 : *Micelle, Swollen micelle, Poloxamer 407, Tocopheryl acetate, Response Surface Methodology, FIB*

Abstract : When the surfactant is dissolved in an aqueous solution, it forms aggregate called micelles (<20 nm) in the solution, and micelles can form the solubilized formulation by supporting the active ingredient therein. Swollen micelles are formulations capable of carrying larger amounts of active

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

ingredient than conventional solubilized formulations at 50~100 nm. Unlike liposomes or nanoemulsions, which require a separate process such as high pressure emulsification, Swollen micelle is a more efficient method of solubilization and particle formation from a productive point of view. In this study, stabilization experiments on swollen micelle formulations were carried out using poloxamer 407, and then optimized formulation experiments for tocopheryl acetate components were performed using Response Surface Methodology (RSM). Tocopheryl acetate, a surfactant that affects solubilization and an active substance, were set as a factor and the correlation between them was confirmed. As the evaluation method, stability and particle size distribution and size were confirmed by temperature and time, and the structure and shape of the swollen micelle carrying the active ingredient were confirmed by FIB. These results show that poloxamer 407 0.500%, octyldodeceth-16 0.387% and tocopheryl acetate 0.945% are the most optimized prescriptions for swollen micelle stabilized with tocopheryl acetate.

Keywords : Micelle, Swollen micelle, Poloxamer 407, Tocopheryl acetate, Response Surface Methodology, FIB

1. 서론

Micelle을 이용한 가용화 제형은 화장품 산업에서 스킨, 미스트, 에센스 등 다양한 제형으로 이용되고 있다. Micelle은 입자 자체가 매우 작기 때문에 활성물질의 담지체 역할보다는 향을 가용화시키는 정도로 활용되고 있다. 계면활성제가 수용액 중에 분산되면 소수성의 꼬리 부분은 물과 접촉을 피하기 위해 머리 부분은 외부로 향하여 전체적으로 구형의 응집체를 형성하게 되며, 이러한 응집체를 micelle (< 20 nm)이라고 한다. Micelle이 형성되기 시작하는 농도를 임계미셀농도(Critical Micelle Concentration, CMC)라고 한다. Micelle은 계면활성제의 친수성이 바깥으로 향하고 소수성이 안쪽으로 향한 구형 형태의 입자로 수용성 물질보다는 지용성 물질을 담지할

수 있다. 이러한 micelle의 내부에 지용성 성분을 담지하여 팽창시켜 입자의 크기는 nano size로 유지하면서 활성물질을 담지하고 있는 제형을 swollen micelle (50~100 nm)이라고 한다. 이렇게 형성된 swollen micelle은 지용성 물질을 담지할 수 있는 제형으로서 가용화 제형에 많이 사용되고 있다. 그러나 작은 입자를 가진 swollen micelle은 고 농도의 계면활성제를 사용하는 것이 좋으나 비용, 자극성을 최소화하고 효능 및 안정성을 향상시키기 위해 계면활성제의 최적화된 함량을 찾는 것은 매우 중요하다[1-5].

본 연구에서는 상기 문제점을 개선하고자 swollen micelle 연구에 poloxamer 407를 이용하고자 하였다. 많은 연구진들에 의해 오랫동안 poloxamer 407를 이용한 블록공중합체 미셀(micelle)의 약물전달체 연구가 진행되어 왔다. 블

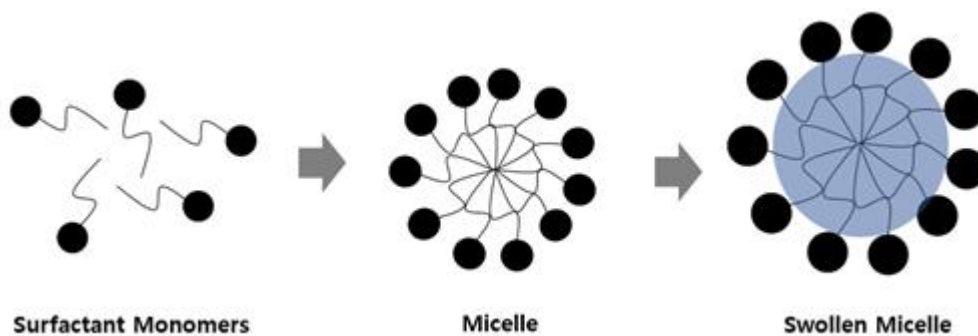


Fig. 1. Particle form of micelle and swollen micelle.

록공중합체 미셀은 구형으로 되어 있으며, 약 20 nm 정도의 직경을 갖는다. 약물 전달을 위해 블록공중합체 미셀은 작은 크기와 가용화 및 생체 내 지속 가능성으로 인해 많은 연구진들의 관심의 대상이 되어 왔다[6]. 계면활성제 미셀에 비해 고분자 미셀은 일반적으로 현저히 낮은 임계미셀농도로 안정되어 있으며 해리 속도가 느려서 피부로 투과된 약물을 유지할 수 있으며 궁극적으로는 목표로 하는 지점에 도달할 수 있다[7]. 블록공중합체 미셀에 사용되는 계면활성제인 poloxamer 407는 일반적인 부류의 공중합체인 친수성 비이온 계면활성제이다. Poloxamer 407은 polyethylene glycol (PEG)의 2개 친수성 블록이 측면에 위치하는 polypropylene glycol (PPG)의 중앙 소수성 블록으로 이루어진 트리블록 공중합체이다. 2개 PEG 블록의 대략적인 길이는 101 반복 단위인 반면, propylene glycol 블록의 대략적인 길이는 56 반복 단위이다[8].

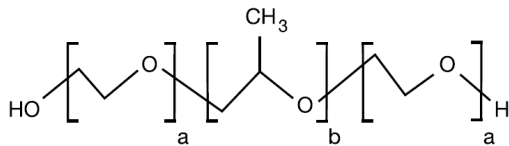


Fig. 2. Structure of poloxamer 407 (approximate block lengths of $a = 101$ and $b = 56$).

Poloxamer 407는 온도감응성 고분자로서 외부 온도에 따라서 그 성질이 바뀌는 고분자로서 특정 온도에서 가역적인 졸-겔 상전이(sol-gel phase transition) 현상이 일어난다. 이러한 상전이가 나타나는 온도를 임계용해온도(critical solution temperature)라 하며, 가장 낮은 상전이 온도를 LCST (lower critical solution temperature)라 한다. 즉 LCST 이하의 온도에서는 물 분자간의 수소결합에 의해 물에 분산되어 있어 흐름성을 보이나, LCST 이상의 온도에서는 탈수화 현상으로 인하여 PPG 블록이 소수성으로 코일에서 구형으로 상분리 현상이 나타난다. Poloxamer 407는 PEG와 PPG가 반복되어 나타나는 가교결합의 그물망 구조를 나타낸다. 이러한 그물망 구조는 양친매성 물질을 포집할 수 있으며, 피부에 자극이 적다는 큰 장점가지고 있다. 이러한 특징으로 인하여 의약품 분야의 약물 피부전달 연구의 제형으로서 연고 등에 사용되어

왔으나, 화장품 산업 분야에서는 오히려 이러한 점들 때문에 잘 사용되지 않았다[8-12]. Poloxamer 407의 겔화 특징은 일정 농도 이상에서 나타나기 때문에, 본 연구에서와 같이 적은 농도로 사용하는 측면에서는 가역적인 졸-겔 상전이 현상은 없으나, PPG 블록이 소수성으로, 난용성 물질을 가용화시키기에는 좋은 계면활성제로 볼 수 있다. Tocopheryl acetate는 화장품산업 분야의 기초화장품 등 피부 관련 제품의 원료로 사용되고 있다. Tocopheryl acetate는 유해산소로부터 피부를 보호하는 역할을 한다고 알려져 있다. 안정성 측면에서 순수 tocopherol의 대안 물질로도 사용되고 있으며, 세포막을 구성하는 불포화지방산의 산화를 억제하는 등 항산화 효과를 가지고 있어 다양하게 사용되고 있다[13].

본 연구에서는 가용화제로서 poloxamer 407과 octyldodeceth-16를 사용하여 활성물질인 tocopheryl acetate를 가용화 및 안정화시킬 때의 최적화 처방 및 이의 원료에 대한 상관관계를 정량적으로 알아보고자 실험을 진행하였다. 이와 같은 상관관계를 정량적으로 해석하는데, 반응표면 분석법(Response Surface Methodology, RSM)을 활용하였다. RSM은 통계학적 분석방법으로서 기초 실험을 통해 변수에 따른 반응 결과 값을 예측하여 원하는 반응치에 따른 최적 조건을 도출해주는 방법이다. 본 연구에서는 RSM의 기법 중 하나인 박스-벤켄 설계(Box-Behnken design)를 사용하여 모델링하고 정확한 예측을 할 수 있게 함으로써 최적의 조건과 최적의 처방을 제시하고자 한다[14,15].

2. 실험

2.1. 원료 및 기기

본 실험에서의 원료로는 Table 1에 기재된 리스트로 구매하여 사용하였다. 정제수는 증류수제조기(Pure RO 130, Human Corporation, Korea)를 이용하여 제조된 것을 사용하였다. 또한 swollen micelle 제조에는 Agitator (SL4000, Global Lab, Korea)을 사용하여 실험을 진행하였다. 통계학적으로 최적하기 위해 Design-Expert® Software Version 11 (Stat-Ease Inc., USA)를 이용하였다. Particle size 및 Zeta potential을 관찰하기 위해 particle size & Zeta potential analyzer (Zetasizer Nano ZS, Malven,

UK)로 측정하였다. SEM 측정은 Cyro-SEM/FIB (Quanta 3D FEG, FEI, USA)을 이용하였다.

2.2. 제조방법

수상을 제외한 오일 및 계면활성제 등의 원료들을 A part로 하여 평량하고 A part가 녹을 정도의 온도로 가열하여 용해 및 분산시킨다. 그 다음 A part를 B part에 1초에 3방울의 속도로 서서히 첨가하면서 Agitator로 3분간 교반한다 (Fig. 3).

2.3. 물성평가 및 안정성 평가

각 제품들을 실온, 냉온(4°C), 항온(45°C)에서 보관하여 약 30일 간 현탁도 및 물성에 대한 안정성평가를 진행하였다.

3.1. 계면활성제 종류에 따른 실험

가용화에 미치는 다양한 종류의 계면활성제 (poloxamer 407, polysorbate 80, PEG-60 hydrogenated castor oil, octyldodeceth-16)에 대한 기초 실험 처방을 Table 2에 작성하였다. 그 결과 Fig. 4와 같이 poloxamer 407이 적용된 실험품(# 1-1)이 상대적으로 투명함을 확인하였다. 이 결과를 바탕으로 하여 poloxamer 407의 함량 및 poloxamer 407과 octyldodeceth-16이 비율이 가용화에 영향을 미치는지 확인하기 위해 실험을 진행하였다(Table 3). 그 결과 poloxamer 407의 함량이 높을수록 가용화되는 것을 알 수 있었다. Poloxamer 407만 첨가한 실험의 경우 냉온(4°C)에서 분리되었으나 octyldodeceth-16와 함께 첨가하였을 때 각 온도 별 조건에서 안정한 것을 확인하였다.

3. 결과 및 고찰

Table 1. Information about the raw materials used in the experiment

Material	INCI Name	Company and Nation
Pluracare F 127	Poloxamer 407	BASF, Germany
Emalex OD-16	Octyldodeceth-16	Nihon Emulsion, Japan
Vitamin E. Acetate	Tocopheryl Acetate	DSM, UK
Rheodol TW-O120V	Polysorbate 80	Kao, Japan
Eumulgin CO 60	PEG-60 Hydrogenated Castor Oil	BASF, Germany
Isostearic Acid	Isostearic Acid	Kokyu Alcohol Kogyo, Japan
TW-HD	1,2-Hexanediol	Twin Coschem, Korea
Ethanol	Ethanol (Ethyl Alcohol 95%)	Daejung, Korea

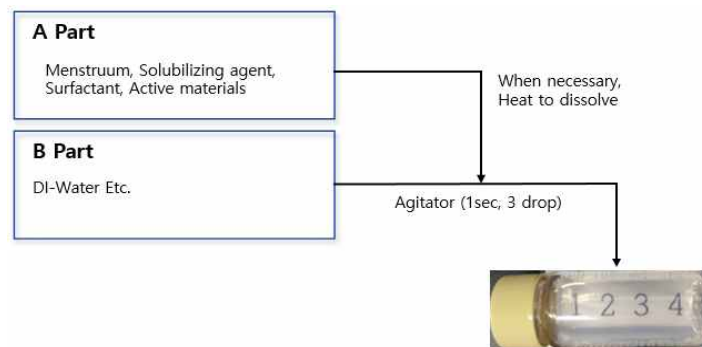


Fig. 3. Manufacturing method of swollen micelle.

Table 2. Prescription experiment for solubilizers affecting solubilization

Part	INCI Name	# 1-1	# 1-2	# 1-3
A	Polxamer 407	1.0	-	-
	Polysorbate 80	-	1.0	-
	PEG-60 Hydrogenated Castor Oil	-	-	1.0
	Octyldodeceth-16	0.5	0.5	0.5
	Isostearic Acid	1.0	1.0	1.0
	Ethanol	3.0	3.0	3.0
	1,2-Hexanediol	4.5	4.5	4.5
B	DI-Water	to 100	to 100	to 100

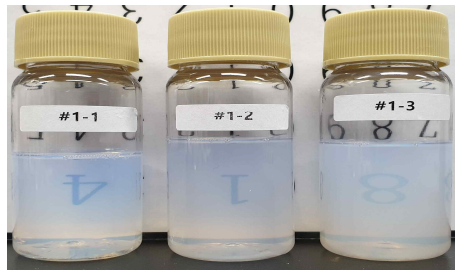


Fig. 4. Results of prescription for various solubilizers affecting solubilization in Table 2.

Table 3. Solubilization prescription experiments on Poloxamer 407 content changes

Part	INCI Name	# 2-1	# 2-2	# 2-3	# 2-4
A	Polxamer 407	1.5	1.0	0.5	-
	Octyldodeceth-16	-	0.5	1.0	1.5
	Isostearic Acid	1.0	1.0	1.0	1.0
	Tocopheryl Acetate	0.3	0.3	0.3	0.3
	Ethanol	3.0	3.0	3.0	3.0
	1,2-Hexanediol	4.5	4.5	4.5	4.5
B	DI-Water	to 100			

계면활성제 함량 1.5% 기준으로 가용화 실험을 진행한 결과 Fig. 5와 같이 투명도는 실험품(# 2-1)이 가장 양호하였으나, 각 온도 별로 실온, 냉온(4°C) 그리고 향온(45°C)에서 1개월 동안 관찰한 결과, poloxamer 407과 octyldodeceth-16의 비율을 2:1로 한 실험품(# 2-2)이 가장 안정성이 양호하였다. 이와 같은 결과를 바탕으로 가장 적합하다고 판단된 poloxamer 407과 octyldodeceth-16 비율을 2:1로 하여 활성물질인 tocopheryl acetate에 대한 함량 실험을 진행하였다.

Table 4의 실험품(# 3-1~# 3-4)은 tocopheryl acetate에 대한 함량 실험으로, tocopheryl acetate 함량이 0.5%일 때 가장 투명도가 높았다(Fig. 6). 이는 swollen micelle 제조 시 함께 사용한 isostearic acid는 가용화제 층 사이에 흡착되어 micelle 크기를 늘리는 역할을 하는 것으로 기대되나, 가용화제와 피가용화제의 종류와 농도에 따라서 isostearic acid가 가용화제 층이 아닌 core에 위치하여 투명도가 감소하는 것으로 보인다.

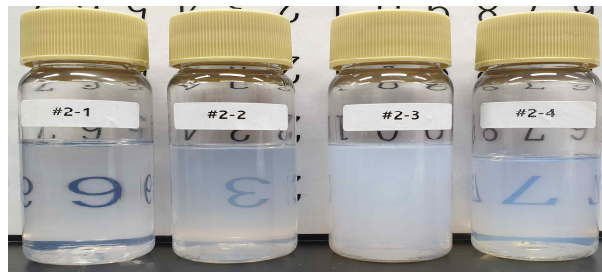


Fig. 5. Results of prescription for changes in content of poloxamer 407 and Octyldodeceth-16 in Table 3.

Table 4. Tocopheryl acetate solubilization experimental prescription

Part	INCI Name	# 3-1	# 3-2	# 3-3	# 3-4	# 3-5	# 3-6
A	Polxamer 407	1.0	1.0	1.0	1.0	1.5	1.5
	Octyldodeceth-16	0.5	0.5	0.5	0.5	-	-
	Isostearic Acid	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
	Tocopheryl Acetate	-	0.3	0.5	1.0	0.5	1.0
	Ethanol	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
	1,2-Hexanediol	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5
B	DI-Water	to 100					

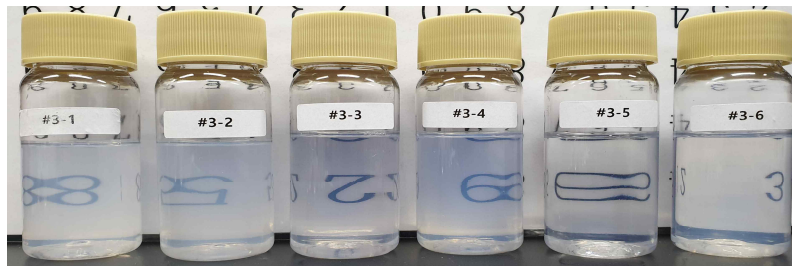


Fig. 6. Results of tocopheryl acetate solubilization for changes in content of poloxamer 407 and Octyldodeceth-16 in Table 4.

실험품(# 3-3~# 3-6)에서 octyldodeceth-16가 가용화에 직접적으로 큰 영향을 미치는 것으로 보이지는 않으나 실험품을 제조하고 나서 경시변화 관찰 시, octyldodeceth-16를 첨가하지 않은 실험품(# 3-5, # 3-6)은 현탁도가 확연히 높아진 것을 확인하였다. 따라서 octyldodeceth-16는 활성물질인 tocopheryl acetate의 안정화에 대한 보조적 역할을 하는 것을 알 수 있었다.

상기 처방 실험들의 결과에 의하면 활성물질인 tocopheryl acetate의 swollen micelle 제형을 통한 가용화에 poloxamer 407, octyldodeceth-16,

tocopheryl acetate 함량이 주요 요인으로서 3가지 원료를 RSM factors로 설정하였으며, 각 factor에 대한 범위를 Table 5에 나타내었다.

실험에 사용되는 RSM의 기법 중 Box-Behnken design은 Fig. 7을 기본 바탕으로 하여 factor에 대한 범위가 설정되어 처방이 결정된다. 3개의 factor, 3개의 level 그리고 기타 외부요인에 의한 오차를 최소화하기 위해서 12개의 IBFact점, 5회 반복되는 Center점을 포함하여 총 17회의 실험이 랜덤으로 수행되었다(Table 6)[16].

Table 5. Setting and scope of independent variables as RSM factors

Factor	Independent Variables	Level		
		Low (-1)	Middle (0)	High (+1)
A	Poloxamer 407	0.5	1.0	1.5
B	Octyldodeceth-16	0.0	0.5	1.0
C	Tocopheryl Acetate	0.2	0.6	1.0

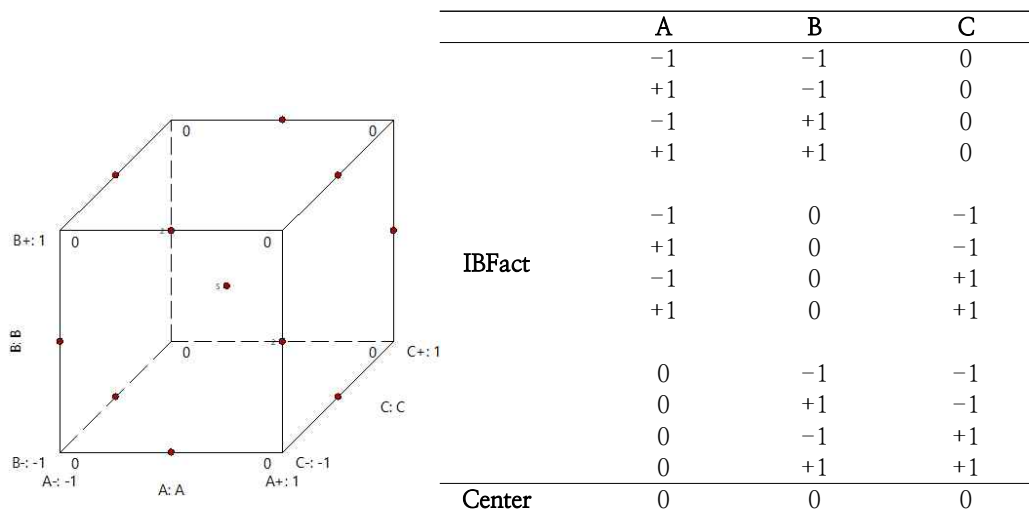


Fig. 7. Box-Behnken design, The point at the center of the cube corresponds to the center of the Box-Behnken design, and the point at the middle of each line of the cube corresponds to the IBFact.

Table 6. Experiments on RSM factor range of 17 prescriptions

Run	Space Type	Factor 1 (A)	Factor 2 (B)	Factor 3 (C)
		Poloxamer 407	Octyldodeceth-16	Tocopheryl Acetate
		wt%	wt%	wt%
1	IBFact	1.5	0.0	0.6
2	IBFact	1.5	0.5	0.2
3	Center	1.0	0.5	0.6
4	IBFact	1.0	1.0	1.0
5	Center	1.0	0.5	0.6
6	IBFact	1.0	0.0	0.2
7	IBFact	0.5	0.5	0.2
8	IBFact	1.0	0.0	1.0
9	IBFact	0.5	0.0	0.6
10	IBFact	0.5	1.0	0.6
11	Center	1.0	0.5	0.6
12	Center	1.0	0.5	0.6
13	Center	1.0	0.5	0.6
14	IBFact	1.5	0.5	1.0
15	IBFact	1.5	1.0	0.6
16	IBFact	1.0	1.0	0.2
17	IBFact	0.5	0.5	1.0

Table 7. Y-axis variable results for 17 experiments using Box-Behnken design

Run	Space Type	Factor 1 (A)	Factor 2 (B)	Factor 3 (C)	Response 1	Response 2	Response 3
		Poloxamer 407	Octyldodeceth-16	Tocopheryl Acetate	Particle Size	PDI	Zeta Potential
		wt%	wt%	wt%	nm		mV
1	IBFact	1.5	0.0	0.6	33.13	0.49	-8.00
2	IBFact	1.5	0.5	0.2	23.84	0.25	-5.74
3	Center	1.0	0.5	0.6	45.21	0.24	-15.80
4	IBFact	1.0	1.0	1.0	68.81	0.99	-6.13
5	Center	1.0	0.5	0.6	31.48	0.43	-5.31
6	IBFact	1.0	0.0	0.2	30.93	0.55	-8.37
7	IBFact	0.5	0.5	0.2	260.10	0.47	-28.30
8	IBFact	1.0	0.0	1.0	60.06	0.58	-12.47
9	IBFact	0.5	0.0	0.6	130.03	0.30	-31.47
10	IBFact	0.5	1.0	0.6	122.77	0.62	-17.87
11	Center	1.0	0.5	0.6	24.87	0.24	-3.76
12	Center	1.0	0.5	0.6	31.92	0.44	-5.50
13	Center	1.0	0.5	0.6	20.88	0.27	-4.53
14	IBFact	1.5	0.5	1.0	36.63	0.38	-3.97
15	IBFact	1.5	1.0	0.6	90.22	1.00	-6.34
16	IBFact	1.0	1.0	0.2	292.07	0.97	-9.18
17	IBFact	0.5	0.5	1.0	82.85	0.54	-9.98

Table 8. Variance analysis for Y axis variable data

	Y1-Particle Size	Y2-PDI	Y3-Zeta Potential
	nm		mV
p-value	0.0064	0.0319	0.0123
F-value	7.8300	4.3900	5.4000
R ²	0.9096	0.8496	0.5549
Adjusted R ²	0.7934	0.6563	0.4522
SD	36.7100	0.1499	6.1100
Lack-of-fit (p-value)	0.0024	0.1195	0.3141
Model	Quadratic	Quadratic	Linear

3.2. RSM을 이용한 실험 결과에 대한 분산 분석

RSM factor 범위에 대한 17개 처방에 대해 실험을 진행한 후 입자 크기(particle size), 제타 전위(Zeta potential), 다분산지수(polydispersity index, PDI)를 측정하여, Table 7에 나타내었다. 이에 대한 분산 분석을 Table 8에 나타내었다.

RSM factor와 Y축의 변수에 대한 결과는 다음 식과 같이 반응표면모델 방정식을 이용하여 계수에 대한 결과를 나타낼 수 있다.

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

Y_i는 예상 반응변수 값이고, A, B, C는 각 3가지의 독립 변수이다. a₀는 상수값이고 a_i, ..., a_{iii}는 각각 선형항, 2차항, 상호작용항의 계수를 나타낸다[17,18].

Table 7, 8에서 Y축 변수에 대한 계수에 대한 설명은 다음과 같다.

① Y₁ - Particle Size (nm)

$$\text{Particle size} = 30.87 - 51.49A + 39.96B - 44.82C + 16.09AB + 47.51AC - 61.10BC + 25.53A^2 + 37.64B^2 + 0.1280C^2$$

분산분석 결과에서 2차 다항식 모델이 적합함을 보여주었다. 모델의 p-value는 0.0064 (< 0.05), F-value 7.8300로 유의성을 갖는다. Lack-of-fit test에서 p-value가 0.0024 (> 0.05)로 적합성 결여를 나타내지 않았다.

② Y² -PDI

$$\text{PDI} = 0.3240 + 0.0238A + 0.2075B + 0.0313C + 0.0475AB + 0.0150AC - 0.0025BC - 0.0420A^2 + 0.3205B^2 + 0.1280C^2$$

분산분석 결과에서 2차 다항식 모델이 적합함을 보여주었다. 모델의 p-value는 0.0319 (< 0.05), F-value 4.3900로 유의성을 갖는다. Lack-of-fit test에서 p-value가 0.1195 (> 0.05)로 적합성 결여를 나타내지 않았다.

③ Y³ -Zeta Potential (mV)

$$\text{Zeta potential} = -10.75 + 7.95A + 2.60B + 2.38C$$

Table 8의 분산분석 결과는 선형 모델이 예측에 적합함을 나타내었다. 이 선형 모델의 p-value가 0.0123 (< 0.05), F-value가 5.4000로 모델이 유의성을 가짐을 의미한다. Lack-of-fit p-value는 0.3141 (> 0.05)이므로 모델의 적합성 결여를 나타내지 않았다.

3.3. RSM의 3D Model

RSM의 3D Model은 분산 분석을 통해 적합한 model을 찾아 해당하는 model의 계수를 다음 Table 9에 나타내었다. 이러한 분산 분석과 계수들을 가지고 각 model들을 3D 그래프로 나타내었다(Fig. 8~10).

Fig. 8는 입자 크기에 대한 factor들의 상관관계를 3D 그래프로 나타내었다. 이를 Table 9와 함께 보면, p-value가 0.05 이하로 유의성이 있는 값으로 해당 상관관계들이 Y축 변수인 입자 크기에 영향을 미친다는 것을 알 수 있다. Factor 3개가 입자 크기에 영향을 준다는 것을 알 수 있지만 factor 간의 상관관계를 보면 tocopheryl acetate가 더 큰 영향을 미친다는 것을 알 수 있다. 또한 p-values 값만 보면 poloxamer 407의 값이 가장 수치가 적다는 것을 알 수 있다. 이는

Table 9. Coefficient table to 3D model of variance analysis (A : Poloxamer 407 / B : octyldodeceth-16 / C : tocopheryl acetate)

	Intercept	A	B	C
Particle Size	30.872	-51.4912	39.965	-44.8238
p-values		0.0054**	0.0178*	0.0106*
PDI	0.324	0.02375	0.2075	0.03125
p-values		0.6677	0.0058**	0.5740
Zeta Potential	-10.7482	7.9462	2.5987	2.3800
p-values		0.0028**	0.2502	0.2903

	AB	AC	BC	A ²	B ²	C ²
Particle Size	16.0875	47.51	-63.0975	25.5265	37.639	44.4565
p-values	0.4098	0.0360*	0.0109*	0.1967	0.0735	0.0419*
PDI	0.0475	0.015	-0.0025	-0.042	0.3205	0.128
p-values	0.5465	0.8471	0.9743	0.5834	0.0032**	0.1233
Zeta Potential						
p-values						

(* p ≤ 0.05; ** p ≤ 0.01; *** p ≤ 0.001)

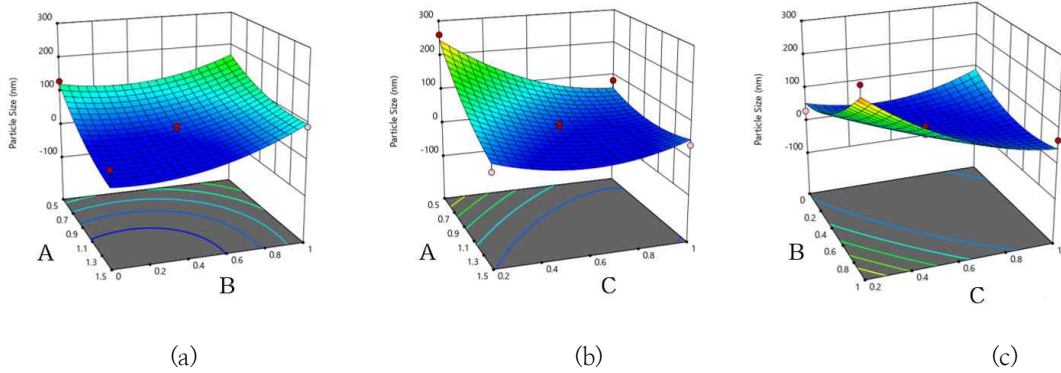


Fig. 8. 3D model for particle size of RSM (A: poloxamer 407, B: octyldodeceth-16, C: tocopheryl acetate / (a): AB, (b): AC, (c): BC).

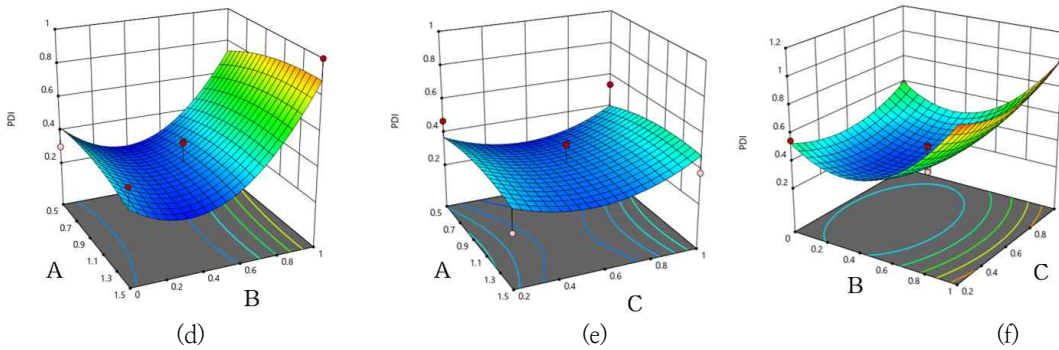


Fig. 9. 3D model for PDI of RSM (A: poloxamer 407, B: octyldodeceth-16, C: tocopheryl acetate / (d): AB, (e): AC, (f): BC).

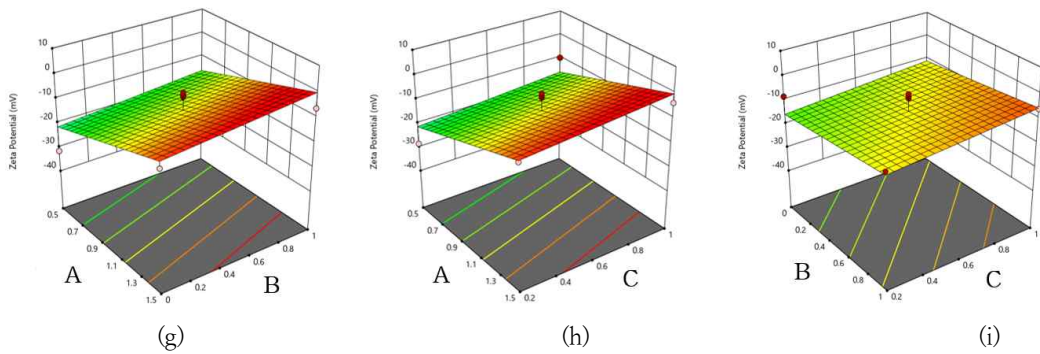


Fig. 10. 3D model for Zeta potential of RSM (A: poloxamer 407, B: octyldodeceth-16, C: tocopheryl acetate / (g): AB, (h): AC, (i): BC).

poloxamer 407은 물론 tocopheryl acetate가 입자 크기에 큰 영향을 미친다는 것을 알 수 있다. 다음 Y축 변수인 PDI는 Table 9에서 p-value

가 0.05 이하인 계수는 octyldodeceth-16으로 보아 octyldodeceth-16이 PDI에 영향을 준다는 것을 알 수 있다. Fig. 9에서 octyldodeceth-16과의

관계를 나타낸 Fig. 9(d)와 9(f)에서만 곡선의 파동이 큰 것으로 보아 더 큰 영향을 준다는 것을 알 수 있다.

마지막 Y축 변수인 제타 전위는 선형모델로 각 factor의 영향만 미치는 것을 알 수 있다. Table 8에서 poloxamer 407의 p-value가 가장 신뢰성이 있는 것으로 나타났다. Fig. 10에서 poloxamer 407이 제타 전위에 가장 영향을 주는 것을 확인할 수 있었고, octyldodeceth-16과 tocopheryl acetate은 유의미한 영향을 나타내지 않았다(Fig. 10(g)-(i)).

따라서, 입자 크기는 poloxamer 407과 tocopheryl acetate, PDI는 octyldodeceth-16, 제타 전위는 poloxamer 407의 영향을 받는 것을 알 수 있다.

3.3. 안정성 평가

30일 간 온도 안정성 평가 결과, RSM 처방에서 Center를 나타내는 실험품(Run 3, 5, 11, 12, 13)은 실온(A), 냉온(B)(4°C), 향온(C)(45°C)에서 모두 안정하였으나, Run 1, 2, 6, 9 실험품의 경우는 실온(A)과 향온(C)(45°C)에서는 안정하나 냉온(B)(4°C)에서 분리되는 것을 확인하였다(Fig. 11).

분리된 실험품(Run 1, 2, 6, 9)는 octyldodeceth-16을 첨가하지 않았거나 낮은 함량의 제품으로, poloxamer 407가 최대 함량인

1.5%로 첨가되어도 octyldodeceth-16의 함량이 낮으면 안정성에 부정적인 영향을 미치는 것으로 추측된다. 앞서 예비 실험에서와 같이 octyldodeceth-16이 활성물질인 tocopheryl acetate의 가용화에 영향을 미치는 것을 확인할 수 있었다. Fig. 11에서 안정한 제품들은 각 온도 별 조건에서도 같은 성상을 나타내고 있으나, 불안정한 제품들은 성상이 탁해지고 변화된 성상을 확인할 수 있다.

제조 직후의 성상과 30일 후의 성상의 현탁도를 10점법으로 평가하여 Fig. 12에 나타내었다. 제조 직후에도 현탁도를 나타냈던 성상은 현탁도가 유지되거나 높아지는 것을 확인하였다. 또한 Run 16, 17 실험품은 제조 직후에는 현탁도가 높았으나 30일 후에는 현탁도가 낮아지는 것으로 나타났다. 제조 직후 충분한 시간을 두고 기포 및 안정화가 되지 않은 상태에서 비교 평가를 진행하여 나타난 현상으로 보인다.

3.4. Cyro-SEM (FIB) 관찰 결과

Swollen micelle 입자의 활성물질 포집 및 형성에 대한 관찰을 위해 Cyro-SEM (FIB) 촬영을 진행하여, 결과를 Fig. 13에 나타내었다. SEM 사진은 왼쪽이 RSM Run 13 실험품이고 오른쪽이 RSM Run 16 실험품으로 nano size 크기의 구형인 것을 확인하였다.

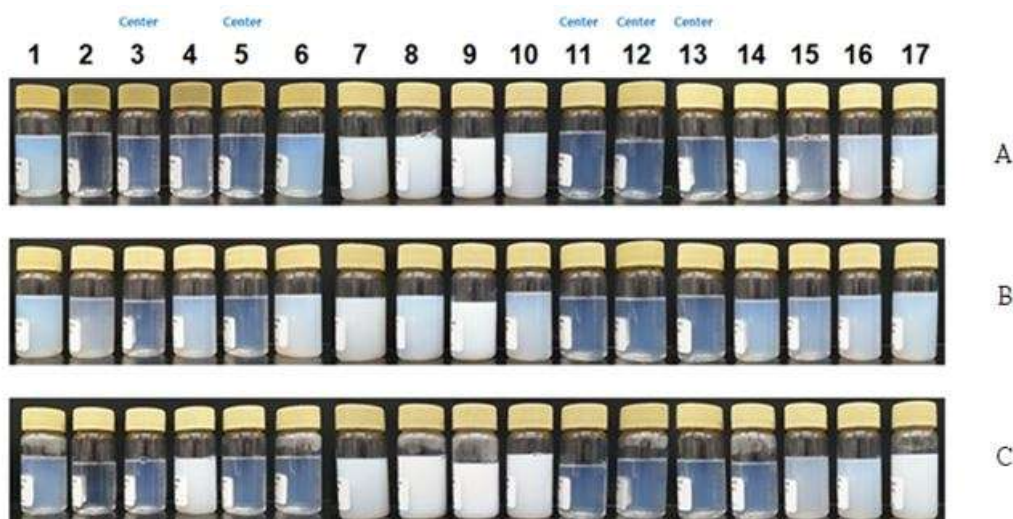


Fig. 11. Stability comparison of swollen micelles after 30 days.

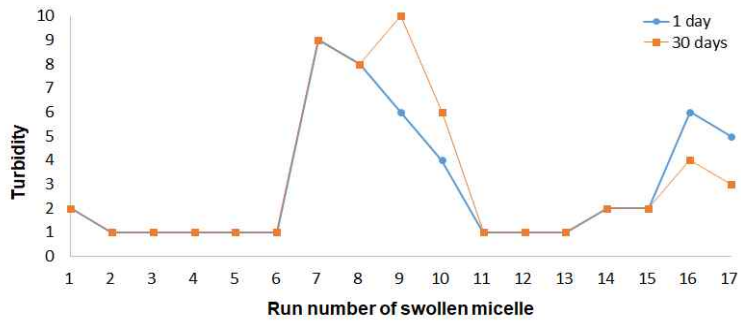


Fig. 12. Turbidity comparison of swollen micelles after 30 days. Rating: 1-10 (the higher the score, the higher the turbidity).

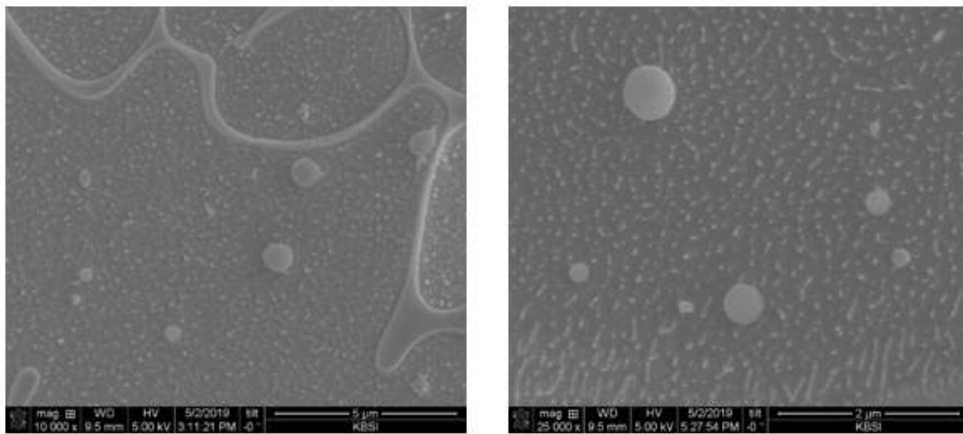


Fig. 13. Cryo-SEM image (left: Run 13 / right: Run 16)

Table 10. Optimal condition setting using RSM

	INCI Name	Goal	Lower Limit	Upper Limit	Optimized Condition
A	Poloxamer	is in range	0.50	1.50	0.500
B	Octyldodeceth-16	is in range	0.00	1.00	0.387
C	Tocopheryl Acetate	maximize	0.20	1.00	0.945
Y	Particle Size	minimize	20.88	292.07	70.115
	PDI	minimize	0.24	1.00	0.348
	Zeta Potential	minimize	-31.47	-3.76	-17.225

3.5. Tocopheryl acetate 함유 swollen micelle 최적화

다음 분석 결과를 바탕으로 Design-Expert® Software Version 11을 사용하여 최적화된 swollen micelle 처방을 구하였다. 본 연구에서는

작은 입자 크기 및 다분산지수를 가지고, 제타 전위 값이 낮은 제형을 최적의 swollen micelle로 고려하였다. Swollen micelle 최적화 기준에 따른 최적 처방은 다음과 같다(Table 10).

RSM을 이용한 tocopheryl acetate 함유 swollen

micelle 최적 처방은 poloxamer 407 0.500%, octyldodeceth-16 0.387%, tocopheryl acetate 0.945% 제형으로 입자 크기는 70.115 nm, 제타 전위는 -17.225 mV, 다분산도는 0.348의 값을 가질 것으로 예측되었다.

4. 결론

본 실험에서 제조한 swollen micelle의 입자는 20~292 nm로 나타났다. Poloxamer 407과 tocopheryl acetate가 입자의 형성 및 크기에 대한 영향을 미치며, poloxamer 407는 입자 간의 반발력을 통해 안정성을 확인을 하는 제타 전위에도 영향을 주었다. 또한 가용화제로 알려진 octyldodeceth-16의 경우 PDI에 영향을 주나 입자의 크기 및 안정성에는 크게 영향을 주지 않는 것을 확인하였다. 현탁도와 안정성을 30일 간 확인한 결과 poloxamer 407과 octyldodeceth-16의 첨가 비율이 현탁도에 영향을 미치며, 안정성은 RSM Run Center의 값으로 주어진 처방이 가장 안정하며 입자 크기도 20~50 nm로 가장 이상적인 크기의 입자로 측정되었다. Tocopheryl acetate를 안정화시키는 swollen micelle은 poloxamer 407 0.500%, octyldodeceth-16 0.387%, tocopheryl acetate 0.945%가 가장 최적화된 처방이라고 할 수 있다. 추후 실험을 통해 최적화 제형의 확인 및 피부투과 실험 및 장기 안정성에 대한 평가를 진행할 예정이다.

감사의 글

이 논문은 2018학년도 제주대학교 교원성과지원사업에 의하여 연구되었음

References

1. S. J. Kim, Y. L. Jeong, J. J. Nam, J. H. Jang, H. L. Yeo, M. S. Yoon, K. J. Yoo, and J. B. Lee, "A study of stabilization for insoluble active ingredients using swollen micelles", *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, Vol.42, No.1, pp. 9-13, (2016).
2. C. O. Rangel-Yagui, A. Pessoa-Jr, L. C. Tavares, "Micellar solubilization of drugs", *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*, Vol.8, No.2, pp. 147-163, (2005).
3. M. S. Kim, "A phenomenological study on micellization and solubilization", *J. of the Korean Chemical Society*, Vol.33, No.5, pp. 459-467, (1989).
4. S. K. Swafford, W. R. Bergmann, K. G. Migliorese, J. L. Lichtin, A. Sakr, "Characterization of swollen micelles containing linoleic acid in a microemulsion system", *J. Soc. Cosmet. Chem.*, Vol.42, pp. 235-247, (1991).
5. E. Ruckenstein, R. Krishnan, "Swollen micellar models for solubilization", *J. of Colloid and Interface Science*, Vol.71, No.2, pp. 321-335, (1979).
6. G. S. Kwon, M. Naito, K. Kataoka, M. Yokoyama, Y. Sakurai, T. Okano, "Block copolymer micelles as vehicles for hydrophobic drugs", *Colloids and Surfaces B, Biointerfaces*, Vol.4, No.2, pp. 429-434, (1994).
7. K. Kataoka, A. Harada, Y. Nagasaki, "Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance", *Advanced Drug Delivery Reviews*, Vol.64, pp. 37-48, (2012).
8. M. Manik, G. Farid, M. Kruk, "Swollen mixed Pluronic surfactant micelles as templates for mesoporous nanotubes with diverse bridged-organosilica frameworks", *J. of Colloid and Interface Science*, Vol.524, pp. 445-455, (2018).
9. M. N. Freitas, M. Farah, R. E. S. Bretas, E. Ricci-Júnior, J. M. Marchetti, "Rheological characterization of Poloxamer 407 nimesulide gels", *J. of Colloid and Interface Science*, Vol.27, No.1, pp. 113-118, (2006).
10. M. Manik, G. Farid, M. Kruk, "Swollen mixed Pluronic surfactant micelles as templates for mesoporous nanotubes with diverse bridged-organosilica frameworks", *J. of Colloid and Interface Science*,

- Vol.524, pp. 445-455, (2018).
11. H. Almeida, M. H. Amaral, P. Lobão, J. M. S. Lobo, "Pluronic F-127 and Pluronic lecithin organogel (PLO): main features and their applications in topical and transdermal administration of drugs", *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*, Vol.15, No.2, pp. 592-605, (2012).
 12. H. Alsaab, S. P. Bonam, D. Bahl, P. Chowdhury, K. Alexander, S. HS. Boddu, "Organogels in drug delivery: a special emphasis on organogels Pluronic lecithin", *J. Pharm. Pharm. Sci.*, Vol.19, No.2, pp. 252-273, (2016).
 13. J. H. Kim, H. J. Yang, B. R. Won, Y. J. Ahn, M. K. Kang, S. N. Park, "Preparation of vitamin E acetate nano-emulsion and in vitro research regarding vitamin E acetate transdermal delivery system which use Franz diffusion cell", *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, Vol.35, No.2, pp. 91-101, (2009).
 14. M. A. Bezerra, R. E. Santelli, E. P. Oliveiraa, L. S. Villar, L. A. I. Escaleiraa, "Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry", *Talanta*, Vol.76, pp. 965-977, (2008).
 15. K. Y. Lee, G. S. Choi, T. W. Kim, K. H. Cho, D. J. Kang, S. T. Kim, D. J. Jang, "Modeling and optimization of dough properties using response surface design", *Food Eng. Prog.*, Vol.21, No.2, pp. 132-137, (2017).
 16. I. M. Yang, G. T. Oh, C. B. Yu, I. G. Hwang, "Design and analysis of experiments." pp. 432-433, Minyoungsa, (2015).
 17. S. L. C. Ferreira, R. E. Bruns, H. S. Ferreira, G. D. Matos, J. M. David, G. C. Brandão, E. G. P. da Silva, L. A. Portugal, P. S. dos Reis, A. S. Souza, W. N. L. dos Santos, "Box-Behnken design: an alternative for the optimization of analytical methods", *Analytica Chimica Acta*, Vol.592, No.2, pp. 179-186, (2007).
 18. S. Rane, B. Prabhakar, "Optimization of paclitaxel containing pH-sensitive liposomes by 3 factor, 3 level Box-Behnken design", *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol.75, No.4, pp. 420-426, (2013).