

## $\alpha$ -Bisabolol을 함유한 PIT Nanoemulsion의 최적화 및 피부흡수연구

김희주\* · 윤경섭†

제주대학교 화학·코스메틱스학과, 학생

제주대학교 화학·코스메틱스학과, 교수

(2020년 11월 18일 접수: 2020년 12월 28일 수정: 2020년 12월 29일 채택)

### Study on Optimization and Skin Permeation of PIT Nanoemulsion Containing $\alpha$ -Bisabolol

Huiju Kim · Kyung-Sup Yoon†

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

*(Received November 18, 2020; Revised December 28, 2020; Accepted December 29, 2020)*

**요약** : 피부는 표피, 진피, 피하지방의 세 부분으로 나누어져 있으며, 표피의 가장 윗부분에 존재하는 각질층은 약물의 피부 전달을 방해하는 장벽 역할을 한다. 나노에멀전은 특유의 작은 입자크기 때문에 세포간 지질을 통과하여 약물의 피부전달에 효과적이라고 알려져 있다. 본 연구에서는  $\alpha$ -bisabolol의 효과적인 피부흡수를 위해 반응표면분석법(response surface methodology, RSM)을 이용하여 상반전온도(phase inversion temperature, PIT) 유화법으로 제조한  $\alpha$ -bisabolol을 함유한 나노에멀전을 최적화하였다. 예비실험으로  $2^{5-2}$  일부요인배치법과  $2^3$  요인배치법이 수행되었다. 요인배치법의 결과를 바탕으로 계면활성제(6.3~12.6%), 보조계면활성제(5.2~7.8%) 및  $\alpha$ -bisabolol (0.5~5.0%) 함량을 인자로 하고 반응변수를 나노에멀전의 입자크기로 하는 Box-Behnken design을 수행하였다. RSM 결과에 따라 PIT 나노에멀전 최적화를 수행하였고, 그 결과 최적의 나노에멀전 처방 조건은 계면활성제 함량 10.4%, 보조계면활성제 함량 6.3%,  $\alpha$ -bisabolol 함량 5.0%로 예측되었다. 피부흡수시험 결과 PIT 나노에멀전의 최종 피부흡수율은  $35.11 \pm 1.01\%$ , 대조군인 일반에멀전의 최종 피부흡수율은  $28.25 \pm 1.69\%$ 로 PIT 나노에멀전의 피부흡수율이 더 우수함을 확인하였다.

**주제어** : 나노에멀전,  $\alpha$ -bisabolol, 피부흡수, 반응표면분석법, 상반전온도

**Abstract** : The skin is divided into three parts: the epidermis, the dermis, and the subcutaneous fat, and the stratum corneum, which is located at the top of the epidermis, acts as a barrier that prevents drug delivery. Nanoemulsions are known to be effective in transdermal delivery of drugs through

†Corresponding author

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

intercellular lipids because of their unique small particle size. In this study, phase inversion temperature (PIT) nanoemulsion containing  $\alpha$ -bisabolol was optimized using response surface methodology (RSM) for effective skin absorption of  $\alpha$ -bisabolol. As a preliminary experiment, the  $2^{5-2}$  fractional factorial design method and the  $2^3$  full factorial design method were performed. Box-Behnken design was performed based on the results of the factorial design method. The content of surfactant (6.3~12.6%), co-surfactant (5.2~7.8%) and  $\alpha$ -bisabolol (0.5~5.0%) were used as factors, and the dependent variable was the particle size of the nanoemulsion. PIT nanoemulsion optimization was performed according to the RSM results, and as a result, the optimal nanoemulsion formulation conditions were predicted to be 10.4% surfactant content, 6.3% co-surfactant content, and 5.0%  $\alpha$ -bisabolol content. As a result of the skin absorption test, the final skin absorption rate of the PIT nanoemulsion was  $35.11 \pm 1.01\%$ , and the final skin absorption rate of the general emulsion as a control was  $28.25 \pm 1.69\%$ , confirming that the skin absorption rate of the PIT nanoemulsion was better.

*Keywords : Nanoemulsion,  $\alpha$ -Bisabolol, Skin absorption, Response Surface Methodology, Phase Inversion Temperature*

## 1. 서론

피부는 크게 표피층, 진피층, 피하지방층의 3개의 층으로 나눌 수 있다[1]. 그 중에서도 표피층 최외각에 존재하는 각질층은 각질세포와 다층 라멜라구조의 세포간 지질로 이루어져 있다. 각질층은 주로 brick-mortar 모델로 설명되는데 세라마이드, 콜레스테롤 및 지방산 등으로 구성된 세포간 지질(morta) 사이에 각질세포가 벽돌(brick)처럼 존재하는 구조이다. 각질층은 수분 손실을 방지하고 여러 가지 자극으로부터 피부를 보호하는 역할을 수행하지만 약물의 피부 흡수를 방해하여 유효 성분의 피부 투과 장벽으로 작용하기도 한다[1-3]. 보통 약물의 투과는 각질층의 세포간 지질을 통하여 이루어진다. 나노에멀전은 세포간 지질 간격보다 작은 입자크기를 가져 약물의 피부 전달 매개체로 효과적이라고 알려져 있다[4].

나노에멀전은 100 nm 이하의 작은 입자크기를 가지고 있어 빛을 강하게 산란시키지 않아 투명하거나 약간 탁한 성상을 가진다[5]. 열역학적으로 안정한 마이크로에멀전과 달리 나노에멀전은 열역학으로 불안정하지만[6], 특유의 작은 입자크기 때문에 일반에멀전보다 분리, 응집 등에 대한 요인으로부터 안정하다. 나노에멀전은 특수한 공정을 통하여 제조되는데 제조공정은 크게 고에너지 방법과 저에너지 방법으로 나눌 수 있다. 고에너지 방법은 고압유화기, 초음파 장치와 같이 강력한 파괴력을 가지는 특수한 기기를 사용하여

미세입자를 제조하는 방법이다. 저에너지 방법은 계면활성제 분자의 용해도 등에 의한 계면 현상의 제어에 의존하여 미세입자를 생성한다. 저에너지 방법에는 자발적 유화, 상반전온도유화법, 상반전조성유화법 등이 있다[5,6].

저에너지 방법 중 상반전온도유화법(phase inversion temperature, PIT)은 온도 변화에 따른 비이온계면활성제 분자의 구조 변화를 기반으로 한다[7]. 낮은 온도에서 계면활성제는 고도로 수화되지만 온도가 점차 증가함에 따라 탈수된다. 저온에서 계면활성제는 친수성이고 O/W 에멀전을 형성하지만 고온에서는 친유성의 성질을 띠며 W/O 에멀전 형성에 더 유리하게 된다. 이러한 변화는 계면활성제 층의 곡률을 변경한다. 저온과 고온 사이에서 온도가 상승함에 따라 수상에서 유상으로 계면활성제의 용해도가 바뀌는 온도가 있는데 이 온도를 PIT라고 한다[6,7]. 온도가 PIT에 가까워지면 그에 상응하는 계면 장력 감소로 인해 액적이 매우 불안정해져 입자가 커질 수 있기 때문에 에멀전을 급냉하여 미세입자가 생성되도록 해야 한다[7,8].

$\alpha$ -Bisabolol은 monocyclic sesquiterpene alcohol로, 1951년 캐모마일 꽃에서 처음 분리되었다[9].  $\alpha$ -Bisabolol은 약한 꽃 냄새를 가지고 있고 항염증, 항균, 방부 및 항산화 효과와 같은 여러 생물학적 활성을 가지고 있다.  $\alpha$ -Bisabolol은 바디로션, 선케어 및 베이비케어 제품 등 여러 화장품 제형에 여러 자극으로부터 피부를 보

호하기 위한 활성 성분으로 널리 사용되어왔다 [10]. 또한  $\alpha$ -bisabolol은 미백 기능성 성분으로 0.5% 사용 시 피부 속 멜라닌 생성을 억제하여 피부 미백에 효능을 나타낸다고 알려져 있다.

본 연구에서는 이러한 활성물질의 효과적인 피부전달을 위해 반응표면분석법(response surface methodology, RSM)을 이용하여  $\alpha$ -bisabolol을 함유한 최적의 PIT 나노에멀전 제조를 수행하였다. 이후 나노에멀전의 피부흡수율을 평가하기 위해 일반에멀전과 비교하여 피부흡수시험을 진행하였다.

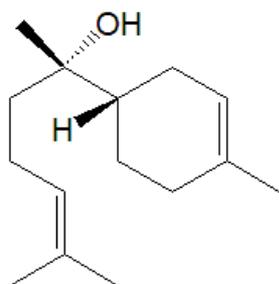


Fig. 1. Molecular structure of  $\alpha$ -bisabolol.

## 2. 실험

### 2.1. 시약

비이온계면활성제(surfactant, SAA)로 Eumulgin B1, Eumulgin B2, 보조유화제(co-surfactant, CoSAA)로 Kalcol 6850과 GMS 105를 사용하였다. 오일로 Dekanex 2004 FG를 사용하였으며 1,3-BG를 폴리올로 사용하였다. 정제수는 증류수제조기(EXL1 Analysis, Vivagen, Korea)를 이

용하여 제조된 3차 증류수를 사용하였다(Table 1).

### 2.2. PIT Nanoemulsion 제조

Hot plate (PA1180, LK Lab, Korea)를 사용하여 계면활성제와 오일을 포함한 유상과 수상을 전상온도 이상으로 가열하여 균일하게 혼합하였다. 그 후 온도를 유지하며 수상을 유상에 서서히 첨가하였고, 이후 30°C까지 급속 냉각시켜 나노에멀전을 제조하였다.

### 2.3. 일부요인계획법을 이용한 주요 인자 확인

PIT 나노에멀전 제조 시 다양한 공정 변수들이 나노에멀전 형성에 영향을 준다. 이처럼 관심 요인이 여러 가지인 경우 일부요인배치법을 사용하는 것이 효율적이다. 요인배치법을 수행할 때 요인의 수가 증가할수록 실험의 횟수가 급속히 늘어나 비경제적이다. 따라서 불필요한 고차의 상호작용을 배제하고 처리조합 중에서 일부만 실험하는 일부실험법 (fractional factorial design)을 이용하여 나노에멀전에 영향을 주는 주요인자를 선정하였다[11-13]. 본 실험에서는 Design-Expert® Software Version 11 (Stat-Ease, Inc., USA)를 사용하여 PIT 나노에멀전 제조에 영향을 주는 5가지 요인(계면활성제 함량, 보조계면활성제 함량, 오일 함량, 유화온도, 유화시간) 중 가장 큰 영향을 주는 주요 인자만을 선별하고자  $2^{5-2}$  일부요인배치법을 수행하였다(Table 2).

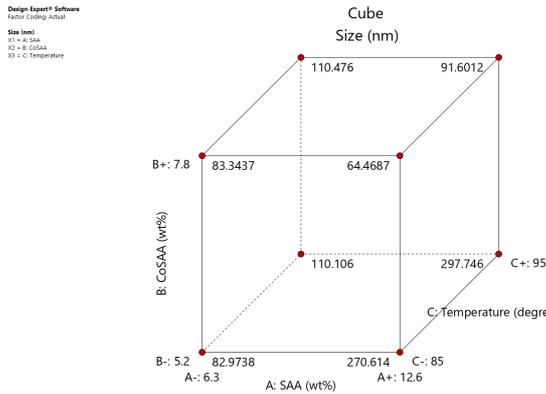
### 2.4. 완전요인배치법을 이용한 RSM 인자 선정

$2^n$  완전요인배치법은 2수준인 요인을 n개 선택하여 모든 수준조합에서 랜덤하게 실험하는 방법

Table 1. List of used raw material

| Trade Name          | INCI Name               | Company                  |
|---------------------|-------------------------|--------------------------|
| $\alpha$ -Bisabolol | $\alpha$ -Bisabolol     | Sigma-Aldrich (USA)      |
| 1,3-BG              | Butylene glycol         | Daicel (Japan)           |
| Dekanxe 2004 FG     | Hydrogenated polydecene | Jan Dekker (Netherlands) |
| Eumulgin B1         | Ceteth-12               | BASF (Germany)           |
| Eumulgin B2         | Ceteth-20               | BASF (Germany)           |
| Ethyl alcohol       | Ethyl alcohol           | Sigma-Aldrich (USA)      |
| GMS 105             | Glyceryl stearate       | Ilshin Wells (Korea)     |
| Kalcol 6850         | Cetearyl alcohol        | Kao (Japan)              |
| Rheodol TW-L120V    | Polysorbate 20          | Kao (Japan)              |
| Saskine 50          | Ethylhexylglycerin      | Sachem (USA)             |

으로 수준수가 적어 요인 실험의 초기단계에서 유용하다(Fig. 2)[11]. 앞서  $2^{5-2}$  일부요인배치법을 통해 주요인자로 선정된 세 가지 요인(계면활성제 함량, 보조계면활성제 함량, 유화온도)을 이용하여  $2^3$  완전요인배치법을 수행하였다(Table 3).



|   | A  | B  | C  |
|---|----|----|----|
| 1 | -1 | -1 | -1 |
| 2 | 1  | -1 | -1 |
| 3 | -1 | 1  | -1 |
| 4 | 1  | 1  | -1 |
| 5 | -1 | -1 | 1  |
| 6 | 1  | -1 | 1  |
| 7 | -1 | 1  | 1  |
| 8 | 1  | 1  | 1  |

Fig. 2. Experimental matrix for the  $2^3$  full factorial design.

Table 2. Experimental conditions for the  $2^{5-2}$  fractional factorial design

| Factor              | Minimum | Maximum |
|---------------------|---------|---------|
| A: SAA (%)          | 8.4     | 12.6    |
| B: CoSAA (%)        | 5.2     | 7.8     |
| C: Oil (%)          | 13.0    | 23.0    |
| D: Temperature (°C) | 85      | 95      |
| E: Time (min)       | 5       | 10      |

SAA: Surfactant, CoSAA: Co-surfactant

Table 3. Experimental conditions for the  $2^3$  full factorial design

| Factor              | Minimum | Maximum |
|---------------------|---------|---------|
| A: SAA (%)          | 6.3     | 12.6    |
| B: CoSAA (%)        | 5.2     | 7.8     |
| C: Temperature (°C) | 85      | 95      |

## 2.5. RSM을 이용한 $\alpha$ -bisabolol 함유 PIT 나노에멀전 최적화

$\alpha$ -Bisabolol 함유 PIT 나노에멀전 최적화를 위해 Box-Behnken design을 수행하였다. 요인배치법을 통한 예비 실험 결과를 바탕으로 PIT 나노에멀전에 가장 큰 영향을 미치는 요인이 계면활성제 함량, 보조계면활성제 함량을 확인하였다. 본 연구는  $\alpha$ -bisabolol을 함유한 PIT 나노에멀전을 최적화하는 것을 목표로 하였기 때문에  $\alpha$ -bisabolol 함량을 인자로 추가하여 계면활성제 함량, 보조계면활성제 함량,  $\alpha$ -bisabolol 함량의 3가지 요인을 RSM 인자로 선정하고 Box-Behnken design을 수행하였다. 나노에멀전 입자 크기를 반응변수로 하였다(Table 4). 중심점 5회 반복실험을 포함한 총 17회의 실험이 랜덤으로 수행되었다.

## 2.6. 에멀전 입자크기 및 다분산도 측정

Dynamic light scattering 방식을 활용한 입도 분석기(Nano ZS, Malven Instrument Ltd, UK)를 사용하여 에멀전의 입자크기 및 다분산도를 측정하였다. 에멀전은 증류수를 이용하여 1%로 희석 후 25°C에서 측정하였다.

## 2.7. 에멀전 현탁도 측정

액체 내 부유입자에 의해 굴절되는 빛의 양을 분석하여 샘플의 선명도를 측정하는 Turbidometer (TU-2016, Lutron Electronics, Inc., Taiwan)를 사용하여 에멀전의 현탁도를 측정하였다. 에멀전은 증류수를 이용하여 1%로 희

Table 4. Independent variables range of PIT nanoemulsion optimization experiments

| Independent variables      | Level   |           |          |
|----------------------------|---------|-----------|----------|
|                            | Low(-1) | Middle(0) | High(+1) |
| A: SAA (%)                 | 6.3     | 9.45      | 12.8     |
| B: CoSAA (%)               | 5.2     | 6.5       | 7.8      |
| C: $\alpha$ -Bisabolol (%) | 0.5     | 2.75      | 5.0      |

Table 5. Condition of HPLC analysis

| System              | Condition  |
|---------------------|--|
| Column              | Kromasil C18 column, 5 $\mu$ m, 4.6 $\times$ 250 mm (AkzoNobel, Netherlands) |
| Detector            | 2998 Photodiode Array (PDA) Detector (Waters, USA)                           |
| Flow rate           | 1.0 mL/min   |
| Mobile phase        | Acetonitrile : 0.1% Acetic acid = 80 : 20 (v/v)                              |
| Detector wavelength | 210 nm   |
| Injection volumn    | 10 $\mu$ L   |
| Time                | 15 min   |

석하였고, 측정용 병에 샘플을 10 mL 넣고 850 nm에서 측정하였다.

## 2.8. Franz diffusion cell을 이용한 피부흡수 실험

$\alpha$ -Bisabolol 함유 PIT 나노에멀전의 피부흡수율을 평가하기 위해 Franz diffusion cell method를 이용하여 *in vitro* 피부흡수실험을 수행하였다. PIT 나노에멀전과 동일한 조성의 전상온도 이하에서 제조한 일반 에멀전을 대조군으로 사용하였다. Membrane으로는 각질층을 모사한 인공 합성막인 Strat-M membrane (Merck Millipore, Billerica MA, USA)을 사용하였고, receptor fluid로는  $\alpha$ -bisabolol의 용해도를 고려하여 50% 에탄올에 2% polysorbate 20을 첨가한 용액을 사용하였다.

Franz diffusion cell에 membrane을 고정시킨 후 12 mL의 receptor 용액을 투여하고 온도를  $32\pm 1^\circ\text{C}$ 로 유지하였다. Donor에 시료를 500  $\mu$ L 가한 후 1, 4, 8, 24 h 간격으로 시료를 채취하였고, HPLC를 이용하여  $\alpha$ -bisabolol 투과량을 정량분석하였다.

24 h 후 membrane에 남아있는  $\alpha$ -bisabolol의 양을 측정하기 위해 membrane 수거 후 receptor 용액으로 세척하고 16조각으로 세절하였다. 이후 30 min 동안 초음파 세척기 (JAC-3010, Kodo Technical Research Co., Ltd., Korea)를 이용하여 receptor 용액에 용출시

킨  $\alpha$ -bisabolol의 양을 HPLC를 이용하여 정량하였다. HPLC 조건을 Table 5에 나타내었다.

$\alpha$ -Bisabolol의 피부흡수율은 modified Fick's equation을 사용하여 계산하였다[14].

$$J = \frac{Vd_c}{Ad_t}$$

$J$ 는 단위 면적당 정상 상태 플럭스(steady-state flux,  $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ )이고,  $V$ 는 receptor part 부피( $\text{cm}^3$ ),  $A$ 는 membrane 면적( $\text{cm}^2$ ),  $dc/dt$ 는 시간당 membrane을 통과하는 약물의 농도이다.

## 2.9. 통계적 검증

실험은 3회 반복 수행하여 실험결과를 평균 $\pm$  표준편차로 나타내었으며, 통계분석은 유의수준  $p < 0.05$ 에서 Student's t-test를 수행하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 일부요인계획법을 이용한 주요인자 확인

나노에멀전 최적화를 위한 일부요인계획법에서 나노에멀전에 영향을 주는 요인은 계면활성제 함량, 보조계면활성제 함량, 오일 함량, 유화시간, 유화온도의 5가지를 선정하였다. 총 8회의 실험이 진행되었고, 실험결과를 Table 6에 나타내었다. 또한 일부요인계획법 실험 결과를 바탕으로 분산분석을 수행하였다(Table 7).

Table 6. Experimental matrix for the fractional factorial design and particle size

|   | Factor 1 | Factor 2 | Factor 3 | Factor 4       | Factor 5 | Response 1 |
|---|----------|----------|----------|----------------|----------|------------|
|   | A: SAA   | B: CoSAA | C: Oil   | D: Temperature | E: Time  | Size       |
|   | %        | %        | %        | °C             | min      | nm         |
| 1 | 6.3      | 5.2      | 18       | 95             | 10       | 64.94      |
| 2 | 12.6     | 5.2      | 18       | 85             | 5        | 244.03     |
| 3 | 6.3      | 7.8      | 18       | 85             | 10       | 88.03      |
| 4 | 12.6     | 7.8      | 18       | 95             | 5        | 62.44      |
| 5 | 6.3      | 5.2      | 28       | 95             | 5        | 110.5      |
| 6 | 12.6     | 5.2      | 28       | 85             | 10       | 205.77     |
| 7 | 6.3      | 7.8      | 28       | 85             | 5        | 94.28      |
| 8 | 12.6     | 7.8      | 28       | 95             | 10       | 93.51      |

Table 7. ANOVA of the fractional factorial design

| Source         | SS       | df | MS       | F-value | P-value |             |
|----------------|----------|----|----------|---------|---------|-------------|
| Model          | 29286.75 | 3  | 9762.25  | 17.19   | 0.0095  | significant |
| A: SAA         | 7688     | 1  | 7688     | 13.54   | 0.0212  |             |
| B: CoSAA       | 10294.69 | 1  | 10294.69 | 18.12   | 0.0131  |             |
| D: Temperature | 11304.06 | 1  | 11304.06 | 19.90   | 0.0112  |             |
| Residual       | 2271.97  | 4  | 567.99   |         |         |             |
| Cor total      | 5487.15  | 7  |          |         |         |             |

분산분석은 두 개 이상의 다수 집단을 비교할 때 집단들의 효과 차이가 존재하는지에 대해 통계적 유의성을 검증하는 방법으로 분산분석표는 변동의 근원(source of variation), 제곱합(SS), 자유도(df), 평균제곱(MS), 검증 통계량 (p-value, F-value)으로 구성되어있다[13].

분산분석 결과 계면활성제 함량, 보조계면활성제 함량, 유화온도가 유의한 영향( $p < 0.05$ )을 가짐을 확인하였고, 오일 함량 및 유화시간은 통계적으로 유의하지 않았다( $p > 0.05$ ). 인자들의 주효과를 Fig. 3에 나타내었다. Fig. 3에서 볼 수 있듯이 주요인자인 계면활성제 함량, 보조계면활성제 함량, 유화온도 그래프는 다른 인자들에 비해 나노에멀전 입자 크기가 크게 변화하는 것을 알 수 있다. 위 결과를 바탕으로 계면활성제 및 보조계면활성제 함량, 유화온도를 주요인자로 하여  $2^3$  완전요인배치법을 진행하였다. 일부요인배치법의 결과를 참고하여 나머지 2가지 요인들의 값을 고정하였다. 오일 함량 23.0%, 유화시간은 10 min으로 고정하여  $2^3$  완전요인배치법을 수행하였다.

### 3.2. $2^3$ 완전요인배치법을 이용한 RSM 인자 선정

나노에멀전 최적화를 위한 일부요인계획법에서 계면활성제 함량, 보조계면활성제 함량, 유화온도의 3가지를 주요 인자로 선정하였다. 선정된 주요 인자 3가지를 이용하여  $2^3$  완전요인배치법을 진행하였다. 총 8회의 실험을 수행하여 그 결과를 Table 8에 나타내었다.  $2^3$  완전요인배치법의 분산분석 결과는 Table 9와 같았다.

분산분석 결과 계면활성제 함량과 보조계면활성제 함량 및 계면활성제와 보조계면활성제의 상호작용이 PIT 나노에멀전 제조에 유의한 영향( $p < 0.05$ )을 미쳤다. 또 실험범위 내에서 유화온도는 유의하지 않음( $p > 0.05$ )을 확인하였다.

3가지 인자에 대한 주효과 및 상호작용효과를 그래프로 나타내었다. Fig. 4에서 볼 수 있듯이 계면활성제 함량이 감소할수록, 보조계면활성제 함량이 증가할수록 나노에멀전 입자크기가 감소하는 경향을 보였다. 계면활성제와 보조계면활성제 상호작용 그래프(Fig. 5)를 살펴보면 보조계면활성제 함량이 적을 경우 계면활성제 함량이 증가

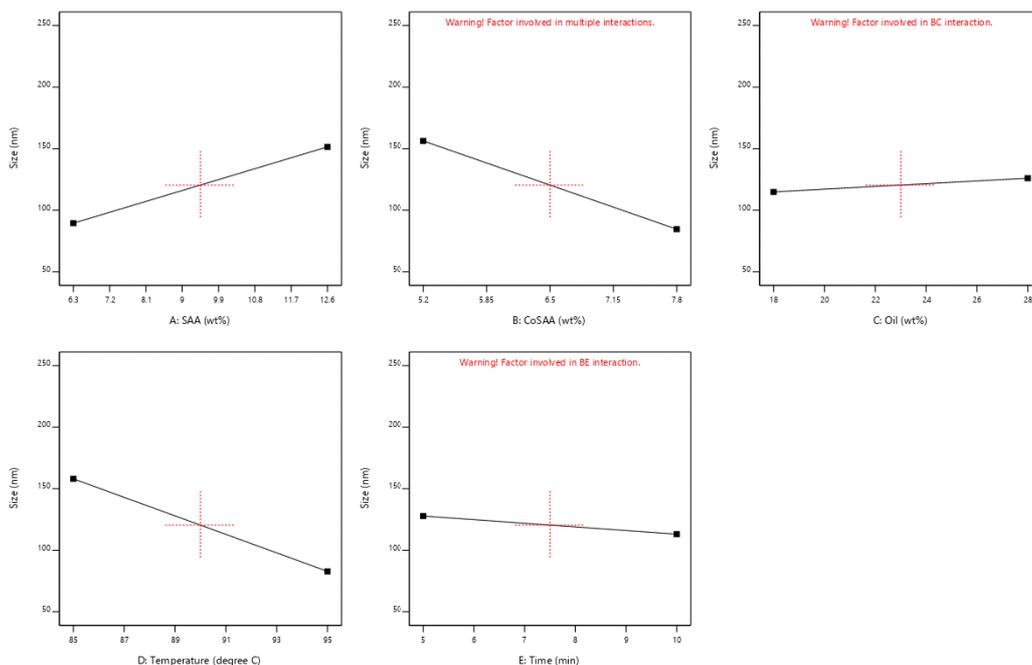


Fig. 3. Main effect plot for particle size obtained from the fractional factorial design.

Table 8. Experimental matrix for the full factorial design and particle size

|     | Factor 1 | Factor 2 | Factor 3       | Response 1 |
|-----|----------|----------|----------------|------------|
| Std | A: SAA   | B: CoSAA | C: Temperature | Size       |
|     | %        | %        | °C             | nm         |
| 1   | 6.3      | 5.2      | 85             | 81.71      |
| 2   | 12.6     | 5.2      | 85             | 253.43     |
| 3   | 6.3      | 7.8      | 85             | 92.39      |
| 4   | 12.6     | 7.8      | 85             | 73.87      |
| 5   | 6.3      | 5.2      | 95             | 111.37     |
| 6   | 12.6     | 5.2      | 95             | 314.93     |
| 7   | 6.3      | 7.8      | 95             | 101.43     |
| 8   | 12.6     | 7.8      | 95             | 82.2       |

Table 9. ANOVA of the full factorial design

| Source         | SS       | df | MS       | F-value | P-value |             |
|----------------|----------|----|----------|---------|---------|-------------|
| Model          | 52771.51 | 4  | 13192.88 | 20.46   | 0.016   | significant |
| A: SAA         | 13326.91 | 1  | 13326.91 | 20.66   | 0.020   |             |
| B: CoSAA       | 22064.70 | 1  | 22064.70 | 34.21   | 0.010   |             |
| C: Temperature | 699.38   | 1  | 699.38   | 1.08    | 0.374   |             |
| AB             | 16680.51 | 1  | 16680.51 | 25.86   | 0.015   |             |
| Residual       | 1934.72  | 3  | 644.91   |         |         |             |
| Cor total      | 54706.23 | 7  |          |         |         |             |

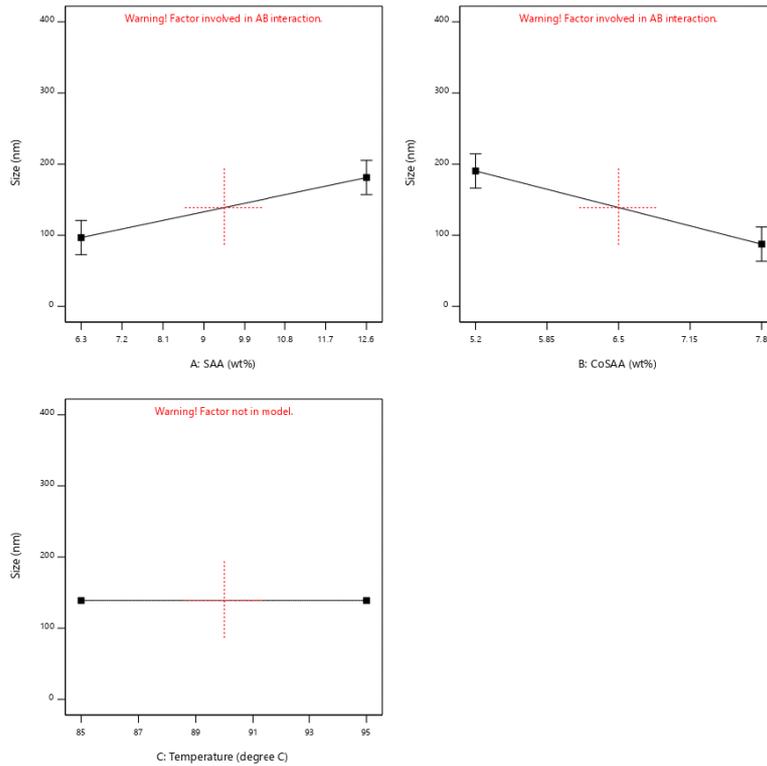


Fig. 4. Main effects plot for particle size obtained from the 2<sup>3</sup> full factorial design.

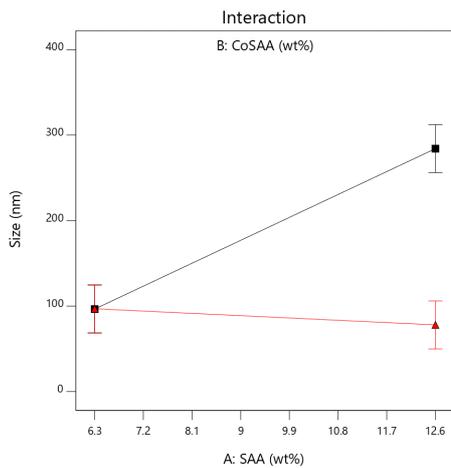


Fig. 5. Interaction effects plot for particle size obtained from the 2<sup>3</sup> full factorial design.

할수록 나노에멀전 입자크기가 크게 증가함을 알

수 있다. 반면 실험범위 내에서 전상온도 이상의 유화온도가 입자크기에 미치는 영향은 매우 미미하였다.

### 3.3. Box-Behnken design을 이용한 나노에멀전 최적화

요인배치법을 통한 예비실험 결과를 바탕으로 계면활성제 함량(6.3~12.6%), 보조계면활성제 함(5.2~7.8%)을 인자로 선정하였고,  $\alpha$ -bisabolol 함량(0.5~5.0%)을 인자로 추가하여 총 3가지 인자가 반응변수인 나노에멀전 입자크기에 미치는 영향을 확인하였다.

$\alpha$ -Bisabolol 함유 PIT 나노에멀전 최적화를 위해 Box-Behnken design을 수행하였다. 전체 입방체의 중심점(center) 5회 반복실험을 포함하여 중심점으로부터 동일한 거리인 요인실험의 중앙점 (IBFact) 12회의 총 17회의 실험을 진행하였다. Box-Behnken design 결과를 Table 10에 나타내었고, 결과 데이터를 바탕으로 분산분석을 수행하였다(Table 11).

Table 10. Box-Behnken design experiments for PIT nanoemulsion optimization

|    | Space Type | Factor 1 | Factor 2 | Factor 3               | Response 1    |
|----|------------|----------|----------|------------------------|---------------|
|    |            | A: SAA   | B: CoSAA | C: $\alpha$ -Bisabolol | Particle Size |
|    |            | %        | %        | °C                     | nm            |
| 1  | IBFact     | 6.3      | 5.2      | 2.75                   | 97.51         |
| 2  | IBFact     | 12.6     | 5.2      | 2.75                   | 114.9         |
| 3  | IBFact     | 6.3      | 7.8      | 2.75                   | 80.67         |
| 4  | IBFact     | 12.6     | 7.8      | 2.75                   | 118.70        |
| 5  | IBFact     | 6.3      | 6.5      | 0.5                    | 83.55         |
| 6  | IBFact     | 12.6     | 6.5      | 0.5                    | 121.47        |
| 7  | IBFact     | 6.3      | 6.5      | 5.0                    | 85.81         |
| 8  | IBFact     | 12.6     | 6.5      | 5.0                    | 77.79         |
| 9  | IBFact     | 9.45     | 5.2      | 0.5                    | 187.70        |
| 10 | IBFact     | 9.45     | 7.8      | 0.5                    | 106.30        |
| 11 | IBFact     | 9.45     | 5.2      | 5.0                    | 80.45         |
| 12 | IBFact     | 9.45     | 7.8      | 5.0                    | 81.29         |
| 13 | Center     | 9.45     | 6.5      | 2.75                   | 82.61         |
| 14 | Center     | 9.45     | 6.5      | 2.75                   | 64.98         |
| 15 | Center     | 9.45     | 6.5      | 2.75                   | 85.56         |
| 16 | Center     | 9.45     | 6.5      | 2.75                   | 75.20         |
| 17 | Center     | 9.45     | 6.5      | 2.75                   | 65.99         |

Table 11. ANOVA for the model

| Source                 | SS       | df | MS      | F-value | p-value | significant     |
|------------------------|----------|----|---------|---------|---------|-----------------|
| Model                  | 11169.06 | 6  | 1861.51 | 6.87    | 0.0042  | significant     |
| A-SAA                  | 909.94   | 1  | 909.94  | 3.36    | 0.0968  |                 |
| B-CoSAA                | 1095.12  | 1  | 1095.12 | 4.04    | 0.0721  |                 |
| C- $\alpha$ -Bisabolol | 3770.59  | 1  | 3770.59 | 13.92   | 0.0039  |                 |
| BC                     | 1690.85  | 1  | 1690.85 | 6.24    | 0.0316  |                 |
| B <sup>2</sup>         | 2658.82  | 1  | 2658.82 | 9.81    | 0.0106  |                 |
| C <sup>2</sup>         | 863.91   | 1  | 863.91  | 3.19    | 0.1045  |                 |
| Residual               | 2709.59  | 10 | 270.96  |         |         |                 |
| Lack of Fit            | 2358.63  | 6  | 393.1   | 4.48    | 0.0841  | not significant |
| Pure Error             | 350.96   | 4  | 87.74   |         |         |                 |
| Cor Total              | 13878.64 | 16 |         |         |         |                 |

### 3.3.1. 입자크기( $Y_1$ )에 영향을 미치는 요인

Table 11의 결과는 축소된 이차다항식(reduced quadratic) 모형이 예측에 적합함을 나타낸다. 모형의 p-value (<0.05)와 F-value는 이 다항식 모형이 유의성을 가짐을 의미한다. Lack-of-fit p-value (>0.05)는 모형이 주어진 영역에서 시스템을 잘 나타냄을 보여주었다. 나노에멀전 입자크기에 대한 제안된 반응표면모형은 다음과 같다.

$$Y_1 = 74.868 + 10.665A - 11.7B - 21.71C + 20.56BC + 24.93B^2 + 14.14C^2$$

$Y_1$ 은 나노에멀전의 입자크기를 의미하고, A는 계면활성제 함량, B는 보조계면활성제 함량, C는  $\alpha$ -bisabolol의 함량이다. 분산분석 결과로 확인한 반응표면모형 계수의 p-value 및 F-value 값은 각 반응변수인 나노에멀전의 입자크기에 어떤 인자가 더 중요한 영향을 미치는가를 나타낸다. 더 작은 p-value와 더 큰 F-value 값을 갖는 인자일수록 반응변수에 더 큰 영향을 미친다[15].

분산분석 결과에 따라 나노에멀전 입자크기에 가장 큰 영향을 미치는 요인은  $\alpha$ -bisabolol 함량이었으며, 그 다음이 보조계면활성제 함량의 2차

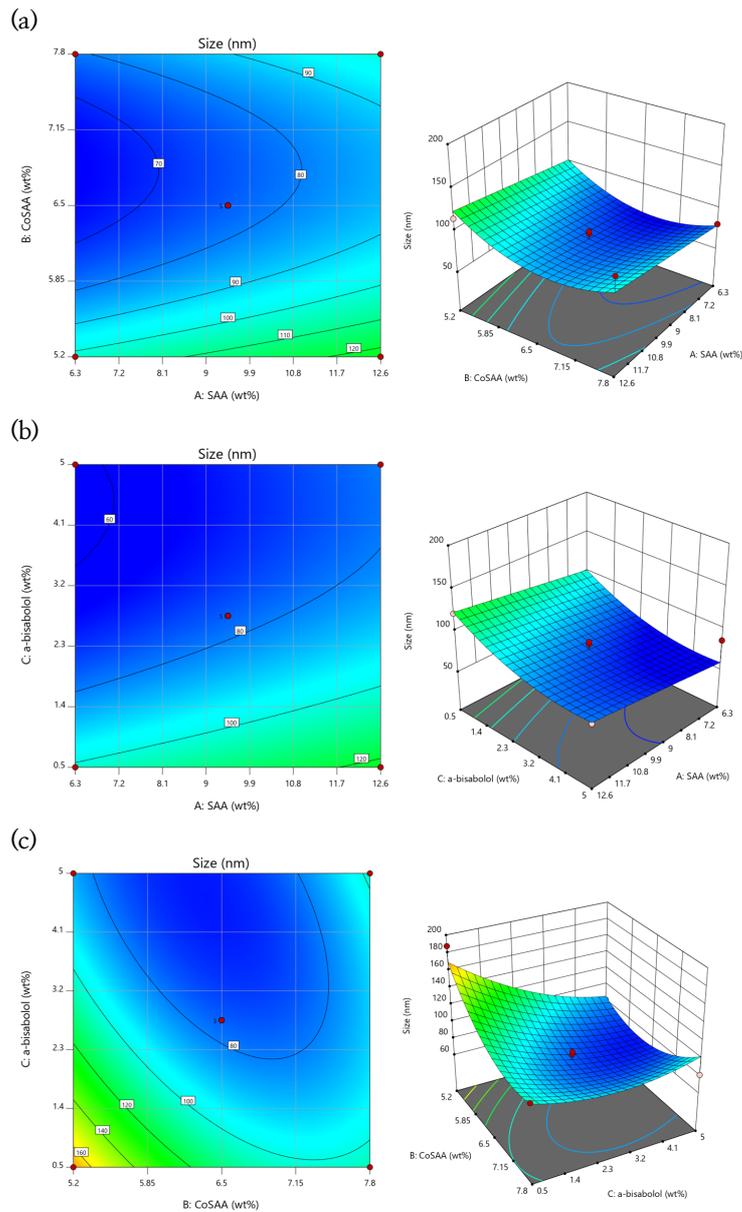


Fig. 6. 3D surface model graph. (a): particle size of nanoemulsion depending on surfactant and co-surfactant; (b): particle size of nanoemulsion depending on surfactant and  $\alpha$ -bisabolol; (c): particle size of nanoemulsion depending on co-surfactant and  $\alpha$ -bisabolol.

항, 보조계면활성제 및  $\alpha$ -bisabolol 함량의 상호 작용항 순으로 입자크기에 유의미한 영향 ( $p < 0.05$ )을 미쳤다.

반응변수에 대한 세가지 인자의 효과를 시각화 하기 위해 실험 범위 내에서 세 가지 인자 중 한

개를 중심점에 고정하고 나머지 두 개의 인자를 변화시켜 2차 다항식 모형의 3D Surface 및 등고선 그래프를 생성하였다(Fig. 6).

Fig. 6-a는  $\alpha$ -bisabolol 함량을 2.75%로 고정하고 계면활성제와 보조계면활성제 함량을 변화

시켰다. 실험범위 내에서 계면활성제 함량이 증가할수록 입자크기가 커지는 경향을 보였으나 그 효과는 매우 미미하였다( $p < 0.05$ ). 또한 입자크기는 보조계면활성제 함량이 증가할수록 점점 감소하다가 보조계면활성제 함량 6.5% 부근을 기점으로 함량이 증가할수록 입자크기가 점점 증가하는 경향을 보였다( $p < 0.05$ ).

Fig. 6-b는 보조계면활성제 함량을 6.5%로 고정하고 계면활성제와  $\alpha$ -bisabolol 함량을 변화시켰다. 실험범위 내에서  $\alpha$ -bisabolol 함량이 증가할수록 나노에멀전의 입자크기가 감소하는 경향을 보였다( $p < 0.05$ ). 계면활성제 함량은 실험범위 내에서 유의미한 영향을 나타내지 않았다( $p > 0.05$ ).

Fig. 6-c는 계면활성제 함량을 9.45%로 고정하고 보조계면활성제와  $\alpha$ -bisabolol 함량을 변화시켰다.  $\alpha$ -Bisabolol 함량이 증가할수록 작은 입자크기를 가졌고, 보조계면활성제 함량이 5.8~7.2% 부근일 때 가장 작은 입자크기를 가지는 것을 확인하였다.

### 3.3.2. $\alpha$ -Bisabolol 함유 nanoemulsion의 최적화

Box-Behnken design 결과를 바탕으로  $\alpha$ -bisabolol 함유 PIT 나노에멀전의 최적화를 수행하였다.  $\alpha$ -Bisabolol 함유 PIT 나노에멀전 최적화 조건은  $\alpha$ -bisabolol 함량이 최대값을 가질 때, 나노에멀전의 입자크기가 최소값을 가지는 것

을 목표로 하였다. 앞에서 언급한 조건을 바탕으로 계면활성제 함량 10.4%, 보조계면활성제 함량 6.3%,  $\alpha$ -bisabolol 함량 5.0%를 최적 조건으로 선택하였다(Table 12).

최적 조건을 바탕으로  $\alpha$ -bisabolol 함유 PIT 나노에멀전을 제조하였다. 3회 반복 제조하여 나노에멀전의 입자크기를 측정하였고, 나노에멀전의 입자크기는 68.66 nm로 예상 입자크기의 95% 신뢰수준 이내에 들어오는 것을 확인하였다(Table 13).

### 3.4. $\alpha$ -Bisabolol 함유 nanoemulsion의 피부흡수실험

$\alpha$ -Bisabolol 함유 PIT 나노에멀전의 피부흡수율을 평가하기 위해 Franz diffusion cell method를 이용하여 피부흡수시험을 수행하였다. PIT 나노에멀전과 동일한 조성의 전상온도 이하에서 제조한 일반에멀전을 대조군으로 사용하였다(Table 14).

나노에멀전 및 일반에멀전의 시간별 누적 피부투과량을 정량분석하여 Fig. 8에 나타내었다. 초기 4 h까지 일반에멀전과 PIT 나노에멀전의 투과량은 유사하였다. 이는 전상온도 이하에서 제조한 일반에멀전도 100 nm 정도의 작은 입자크기를 가지고 있기 때문으로 생각된다. 하지만 4 h 이후부터 나노에멀전의 흡수율이 점점 증가하는 것을 확인할 수 있었다.  $\alpha$ -Bisabolol의 24 h 경과 후 누적 투과량은 일반에멀전  $2,992.33 \pm 153.51 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  (초기

Table 12. Optimization condition

| Independent Variables      | Optimum Conditions |
|----------------------------|--------------------|
| A: SAA (%)                 | 10.4               |
| B: CoSAA (%)               | 6.3                |
| C: $\alpha$ -Bisabolol (%) | 5.0                |
| Dependent variables        | Predicted value    |
| Y1: Size                   | 66.25              |

Table 13. Confirmation

| Solution 1 of 61 | Predicted | Std Dev | n | SE Pred | 95% PI low | Data Mean | 95% PI high |
|------------------|-----------|---------|---|---------|------------|-----------|-------------|
| Size             | 66.25     | 17.05   | 3 | 14.46   | 32.07      | 68.63     | 100.43      |

Table 14. Characteristic of samples

| Sample             | Size (nm)          | PDI               | Turbidity (ntu)    |
|--------------------|--------------------|-------------------|--------------------|
| PIT nanoemulsion   | $68.63 \pm 0.203$  | $0.157 \pm 0.008$ | $182.67 \pm 1.528$ |
| Emulsion (control) | $118.67 \pm 1.050$ | $0.174 \pm 0.015$ | $560.67 \pm 0.577$ |

투입량 대비 27.10±1.70%), PIT 나노에멀전 3,702.66±92.10 μg/cm<sup>2</sup> (초기 투입량 대비 32.90±1.00%)으로 PIT 나노에멀전의 투과량이 더 큰 것을 확인하였다.

24 h 이후 membrane에 남아있는 α-bisabolol의 양을 정량분석하였다. 일반에멀전의 membrane 잔류량은 225.69±12.45 μg (초기 투입량 대비 1.15±0.06%), PIT 나노에멀전의 membrane 잔류량은 440.09±34.90 μg (초기 투입량 대비 2.21±0.18%) 이었다(Fig. 9). 상대적으로 입자크기가 더 작은 PIT 나노에멀전의 membrane 잔류량이 많은 것을 확인하였다.

나노에멀전의 *in vitro* 피부흡수시험 결과 PIT 나노에멀전의 최종 피부흡수율은 35.11±1.01%, 일반에멀전의 최종 피부흡수율은 28.25±1.69%로 PIT 나노에멀전의 피부흡수율이 더 우수하였다 (p<0.05).



Fig. 7. Samples for *in-vitro* transdermal permeation experiment.

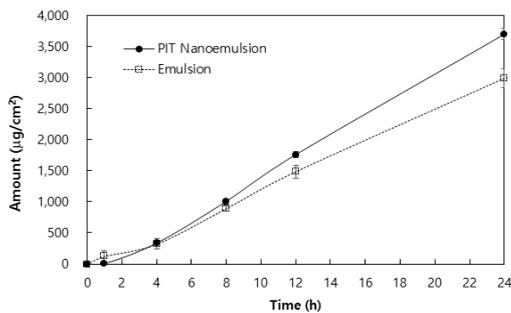


Fig. 8. Permeation profiles of α-bisabolol through Strat-M membrane from the emulsions (mean±SD, n=3).

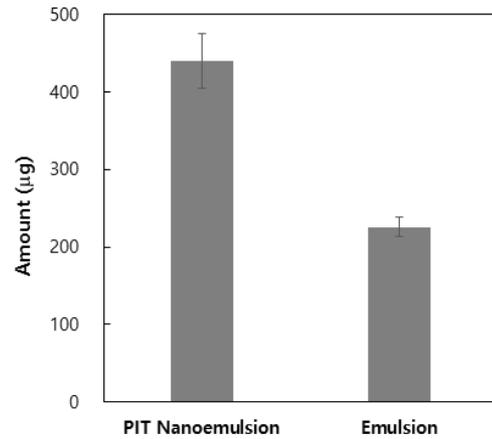


Fig. 9. Permeation profiles of α-bisabolol through Strat-M membrane from the emulsions (mean±SD, n=3).

#### 4. 결론

본 연구에서는 α-bisabolol 함유 PIT 나노에멀전 최적화를 위해 반응표면분석법을 이용하였다. 계면활성제 함량(6.3~12.6%), 보조계면활성제 함량(5.2~7.8%), α-bisabolol 함량(0.5~5.0%)의 3가지 요인이 나노에멀전 입자크기에 미치는 영향을 확인하였다. Box-Behnken design 결과 이차다항식(quadratic) 모형이 예측에 적합하였다. 나노에멀전 입자크기에 대한 제안된 반응표면모형은 실험범위 내에서 나노에멀전 제조 조건 변화에 따른 α-bisabolol 함유 나노에멀전 입자크기의 변화를 충분히 예측하고 잘 나타내었다(p<0.05). α-Bisabolol 함량, 보조계면활성제 함량, 보조계면활성제 및 α-bisabolol 함량의 상호작용이 나노에멀전 입자크기에 유의미한 영향(p<0.05)을 미쳤다.

반응표면분석 결과에 따라 PIT 나노에멀전 최적화를 수행하였다. 최적화 결과 최적의 나노에멀전 처방 조건은 계면활성제 함량 10.4%, 보조계면활성제 함량 6.3%, α-bisabolol 함량 5.0%로 예측되었다. 최적 나노에멀전 3회 반복 제조 결과 평균 68.63 nm의 입자크기를 가졌고, 예상 입자크기인 66.25 nm의 95% 신뢰수준 이내에 들어오는 것을 확인하였다.

피부흡수시험 결과 PIT 나노에멀전의 최종 피부흡수율은 35.11±1.01%, 대조군인 일반에멀전

의 최종 피부흡수율은  $28.25 \pm 1.69\%$ 로 PIT 나노에멀전의 피부흡수율이 더 우수한 피부흡수율을 보이는 것을 확인하였다.

### 감사의 글

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

### References

1. S. B. Han, S. S. Kwon, Y. M. Jeong, B. J. Kong, E. R. Yu, S. N. Park, "Physical Characterizations and In vitro skin permeation of elastic liposomes for transdermal delivery of polygonum aviculare L. extract", *Polymer (Korea)*, Vol.38 No.6, pp. 694-701, (2014).
2. S. K. Ahn, S. M. Hwang, E. H. Choi, W. S. Lee, "Morphologic characteristics of skin barrier and stratum corneum", *The Journal of Skin Barrier Research*, Vol.1, No.1, pp. 22-28, (1999).
3. 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).
4. S. P. Hong, "Bricks and mortar: Two compartment system", *The Journal of Skin Barrier Research*, Vol.12, No.1, pp. 35-40, (2010).
5. Y. Chang, D. J. McClements, "Optimization of orange oil nanoemulsion formation by isothermal low-energy methods: influence of the oil phase, surfactant, and temperature", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol.62, No.10, pp. 2306-2312, (2014).
6. Z. Jeirani, B. Mohamed Jan, B. Si Ali, I. Mohd Noor, S. Chun Hwa, W. Saphanuchart, "Prediction of phase-inversion temperature of a triglyceride microemulsion using design of experiments", *Industrial and Engineering Chemistry Research*, Vol.52, No.2, pp. 744-750, (2013).
7. J. Rao, D. J. McClements, "Stabilization of phase inversion temperature nanoemulsions by surfactant displacement", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol.58, No.11, pp. 7059-7066, (2010).
8. P. huesiang, U. Siripatrawan, R. Sanguandeeikul, L. McLandsborough, D. J. McClements, "Optimization of cinnamon oil nanoemulsions using phase inversion temperature method: Impact of oil phase composition and surfactant concentration", *Journal of Colloid and Interface Science*, Vol.514, No.5, pp. 208-216, (2018).
9. R. Kadir, B. W. Barry, " $\alpha$ -Bisabolol, a possible safe penetration enhancer for dermal and transdermal therapeutics", *International Journal of Pharmaceutics*, Vol.70, No.1-2, pp. 87-94, (1991).
10. N. F. M. Rocha, E. R. V. Rios, A. M. R. Carvalho, G. S. Cerqueira, A. de Araújo Lopes, L. K. A. M. Leal, M. L. Dias, D. P. de Sousa, F. C. F. de Sousa, "Anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of (-)- $\alpha$ -Bisabolol in rodents", *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, Vol.384, No.6, pp. 525-533, (2011).
11. Y. B. Lim, S. H. Park, B. J. An, Y. I. Kim, "Practical design of experiments", *Freeacademy*, pp. 224-247, (2008).
12. C. H. Sim, "Optimization of process variables for insulation coating of conductive particles by response surface methodology", *Korean Chemical Engineering Research*, Vol.54, No.1, pp. 44-51, (2016).
13. I. M. Yang, G. T. Oh, C. B. Yu, I. G. Hwang, "Design and analysis of

- experiments”, *Minyoungsa*, pp. 83-264, (2015).
14. S. Kim, D. H. Kwon, D. H. Lim, G. S. Kim, C. Y. Kang, “In vitro study of transdermal delivery system for caffeine in slim patch type” *Journal of Korean Pharmaceutical Sciences*, Vol.36, No.2, pp. 97-102, (2006).
15. L. Quanhong, F. Caili, “Application of response surface methodology for extraction optimization of germinant pumpkin seeds protein”, *Food Chemistry*, Vol.92, No.4, pp. 701-706, (2005).