



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

석사학위논문

Glabridin 함유 나노에멀전 제형의
피부흡수 최적화 연구

김세연

제주대학교 대학원

화학과

2024년 2월

Thesis for the degree of Master of Science

Study on Optimization for Skin
Absorption of Nanoemulsion
Containing Glabridin

Se-Yeon Kim

Department of Chemistry
The Graduate School
Jeju National University

February 2024

Glabridin 함유 나노에멀전 제형의 피부흡수 최적화 연구

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함

김 세 연

제주대학교 대학원

화 학 과

지 도 교 수 김 원 형

김세연의 이학석사 학위논문을 인준함

2023년 12월

심사위원장	이	남	호	인	
위	원	김	원	형	인
위	원	윤	경	섭	인



Study on Optimization for Skin Absorption of Nanoemulsion Containing Glabridin

A Thesis submitted to the graduate school of
Jeju National University in partial fulfillment of
the requirements for the degree of Master of Science
under the supervision of **Won Hyung Kim**

The thesis for the degree of Master of Science
by **Se-Yeon Kim**
has been approved by the dissertation committee.

2023.12.

Chair _____

Member _____

Member _____

목 차

요약	1
List of Figures	3
List of Tables	7
I. 서론	9
II. 재료 및 방법	15
2.1. 시약 및 기기	15
2.2. 활성물질 베이스 제조	17
2.3. RSM 인자 설정을 위한 나노에멀전 제조	18
2.4. Box-Behnken Design을 이용한 Glabridin 함유 나노에멀전 제조 ..	23
2.5. 대조군 제조	32
2.6. 입자 크기, 다분산지수 및 제타전위 측정	33
2.7. 나노에멀전 형상 관찰(TEM)	32
2.8. Franz Diffusion Cell을 이용한 Glabridin 나노에멀전의 <i>In-Vitro</i> 피부 흡수 시험	36
2.9. Glabridin 함량 분석	38
2.10. 통계적 검증	39
III. 결과 및 고찰	40
3.1. RSM 인자 설정을 위한 나노에멀전의 입자 크기 측정	40
3.2. 나노에멀전 형상 관찰(TEM)	43
3.3. RSM을 이용한 실험계획법	44
3.3.1. 입자 크기(Y_1)에 미치는 영향	47
3.3.2. 피부 흡수율(Y_2)에 미치는 영향	56

3.4. Glabridin 함유 나노에멀전 최적화	65
3.4.1. 최적의 Glabridin 함유 나노에멀전 제조	65
3.4.2. 최적의 Glabridin 함유 나노에멀전과 에멀전의 안정성 평가	67
3.5. Glabridin 함량 분석	70
3.6. Franz Diffusion Cell을 이용한 최적의 Glabridin 함유 나노에멀전의 <i>In-Vitro</i> 피부 흡수 시험	71
IV. 요약 및 결론	73
V. 참고문헌	75
Abstract	83

Glabridin 함유 나노에멀전 제형의 피부흡수 최적화 연구

김 세 연

제주대학교 대학원 화학과

요약

화장품 업계에서는 미백, 주름, 항산화, 항노화 등 기능성 화장품의 신소재 개발과 더불어 실제로 피부에 적용 시 피부 흡수율을 높이는 기술이 중요하다. 이에 본 연구에서는 실험설계법인 반응표면분석법(Response Surface Methodology, RSM)을 활용하여 나노에멀전 제형을 최적화하고자 하였다. 유용성감초추출물의 주성분인 glabridin을 활성성분으로 하여 고압유화(High-Pressure Homogenization, HPH) 방법으로 나노에멀전을 제조하였으며, 최종적으로 최적화한 나노에멀전의 피부 흡수율을 평가하였다. RSM 인자로 계면활성제 함량(1.0 ~ 5.0 wt%), 콜레스테롤 함량(0.1 ~ 0.5 wt%), 오일 함량(2.0 ~ 10.0 wt%), 폴리올 함량(2.0 ~ 18.0 wt%), 고압유화 압력(400 ~ 1,000 bar), 고압유화 횟수(1 ~ 5 pass)를 달리하여 나노에멀전을 제조하였다. 그 중 입자 크기에 가장 큰 영향을 미치는 인자인 계면활성제 함량, 오일 함량, 고압유화 압력, 고압유화 횟수를 독립변수로 하였고, 나노에멀전의 입자 크기와 피부 흡수율을 반응변수로 하였다. 실험은 중심점 5 회 반복을 포함하여 총 29 회 실험이 무작위로 수행되었으며, 제조된 나노에멀전의 입자 크기와 피부 흡수율을 측정하였다. 그 결과를 바탕으로 최소 입자 크기, 최대 피부 흡수율을 갖는 제형을 최적화하였으며, 계면활성제 함량 5.0 wt%, 오일 함량 2.0 wt%, 고압유화 압력 1,000 bar, 고압유화 횟수 4 pass를 최적 조건으로 도출하였다. 최적 조건으로 제조한 나노에멀전의 물성으로 pH는

6.90 ± 0.01, 입자 크기는 111.6 ± 0.2 nm, 다분산지수(Polydispersity Index, PDI)는 0.247 ± 0.014, 제타전위(Zeta Potential, ZP)는 -56.7 ± 1.2 mV로 측정되었다. 나노에멀전의 피부 흡수율을 대조군인 에멀전과 비교한 바, 24 h 후 나노에멀전의 누적 흡수율은 79.53 ± 0.23%, 대조군으로서 에멀전의 누적 흡수율은 66.54 ± 1.45%로 나노에멀전이 에멀전보다 13% 높은 누적 투과량을 보였다.

List of Figures

Figure 1. Pathways of skin absorption.	10
Figure 2. Structure of a W/O or an O/W nanoemulsion.	11
Figure 3. Schematic procedure of HPH method.	12
Figure 4. Chemical structure of glabridin.	13
Figure 5. Manufacturing process of nanoemulsions by high-pressure homogenization method.	22
Figure 6. Manufacturing process of glabridin nanoemulsions by high-pressure homogenization method.	31
Figure 7. Schematic diagram of dynamic light scattering according to particle size.	34
Figure 8. Surface charge and zeta potential of nanoparticles.	34
Figure 9. Schematic diagram of Franz diffusion cell.	37
Figure 10. Particle size of #N1 after 1 d at 25 °C according to (A): surfactant content, (B): cholesterol content, (C): oil content, (D): polyol content, (E): HPH pressure, (F): HPH cycling number (N = 3, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).	42

Figure 11. Cryo-TEM images of #N1-18.	43
Figure 12. Appearance of #GN after 1 d at 25 °C (A): #GN-1 ~ #GN-6, (B): #GN-7 ~ #GN-12, (C): #GN-13 ~ #GN-18, (D): #GN-19 ~ #GN-24, (E): #GN-25 ~ #GN-29.	45
Figure 13. 3D surface model (A) and contour graph (B) for particle size of nanoemulsion depending on surfactant content and oil content.	49
Figure 14. 3D surface model (A) and contour graph (B) for particle size of nanoemulsion depending on surfactant content and HPH pressure.	50
Figure 15. 3D surface model (A) and contour graph (B) of particle size for Glabridin nanoemulsion depending on surfactant content and HPH cycling number.	51
Figure 16. 3D surface model (A) and contour graph (B) for particle size of nanoemulsion depending on oil content and HPH pressure.	52
Figure 17. 3D surface model (A) and contour graph (B) for particle size of nanoemulsion depending on oil content and HPH cycling number.	53
Figure 18. 3D surface model (A) and contour graph (B) for particle size of nanoemulsion depending on HPH pressure and HPH cycling number.	54

Figure 19.	3D surface model (A) and contour graph (B) for skin absorption rate of nanoemulsion depending on surfactant content and oil content.	58
Figure 20.	3D surface model (A) and contour graph (B) for skin absorption rate of nanoemulsion depending on surfactant content and HPH pressure.	59
Figure 21.	3D surface model (A) and contour graph (B) for skin absorption rate of nanoemulsion depending on surfactant content and HPH cycling number.	60
Figure 22.	3D surface model (A) and contour graph (B) for skin absorption rate of nanoemulsion depending on oil content and HPH pressure.	61
Figure 23.	3D surface model (A) and contour graph (B) for skin absorption rate of nanoemulsion depending on oil content and HPH cycling number.	62
Figure 24.	3D surface model (A) and contour graph (B) for skin absorption rate of nanoemulsion depending on HPH pressure and HPH cycling number.	63
Figure 25.	Appearance of optimized nanoemulsion and emulsion at 25 °C after (A): 1 d, (B): 1 week, (C): 2 week, (D): 3 week.	68

Figure 26. Accelerated test data at 45 °C for 21 d of optimized nanoemulsion and emulsion (A): particle size of nanoemulsion, (B): particle size of emulsion, (C): PDI, (D): ZP (N = 3, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). 69

Figure 27. Glabridin calibration curve using HPLC system. 70

Figure 28. HPLC chromatogram of glabridin. 70

Figure 29. Skin absorption rate for 24 h of glabridin nanoemulsion and emulsion (mean \pm SD, N = 3, $p < 0.01$) 72

List of Tables

Table 1. List of Used Raw Material	16
Table 2. Composition of Active Substance Base	17
Table 3. Composition and Process Conditions of Nanoemulsions for Determine RSM Factor (unit: wt%)	19
Table 4. Variables in Box-Behnken Design for Preparation of Glabridin Nanoemulsions	24
Table 5. Composition and Process Conditions of Glabridin Nanoemulsions Obtained from the Box-Behnken Design (unit: wt%)	25
Table 6. Composition of Glabridin Emulsion (unit: wt%)	32
Table 7. HPLC Conditions for Glabridin Analysis	38
Table 8. Particle Size of #N1 in Table 3 after 1 d at 25 °C (mean ± SD, N = 3)	41
Table 9. Box-Behnken Design Experimental Conditions and Results of Glabridin Nanoemulsion	46
Table 10. ANOVA for Quadratic Model of Particle Size	47
Table 11. ANOVA for Quadratic Model of Skin Absorption Rate	56

Table 12. Optimized Glabridin Nanoemulsion Conditions	65
Table 13. Verification of Optimized Glabridin Nanoemulsion	66
Table 14. Appearance, Particle Size, Polydispersity Index, Zeta Potential Data of Optimized Nanoemulsion and Emulsion after 1 d at 45 °C (mean ± SD, N = 3)	68
Table 15. Skin Absorption Rate for 24 h of Glabridin Nanoemulsion and Emulsion (mean ± SD, N = 3, $p < 0.01$, unit: %)	72

I. 서 론

우리의 몸을 둘러싸고 있는 피부는 신체의 가장 바깥쪽에 존재하며 외부의 자극과 변화로부터 생체를 보호하는 역할을 한다. 피부는 표면으로부터 표피, 진피, 피하조직의 세 개 층으로 구분되고, 모발, 손·발톱, 피부선(피지샘, 땀샘) 등 부속기관이 존재한다. 피부의 가장 바깥층인 표피는 신체의 중요한 장기를 보호하는 장벽기능의 가장 중심 역할을 하며 아래로부터 기저층, 유극층, 과립층, 최외각의 각질층으로 구분된다[1]. 피부장벽 역할을 하는 각질층은 편평한 모양의 각화세포가 여러 층으로 이루어져 있으며 케라틴이라고 불리는 소수성의 불용성 섬유상 단백질이 각질세포를 채우고 있고, 각질세포 사이를 세라마이드, 지방산, 콜레스테롤 등으로 구성된 세포간지질이 채우고 있는 라멜라구조를 이루고 있다.

일반적으로 피부흡수 과정은 각질층으로 성분의 확산(diffusion)과 분배(division)가 이루어져 침투가 일어나고 표피를 통해 진피로 확산되며 진피에서 모세혈관으로 흡수된 후 전신으로 전달된다[2]. 대부분의 성분들은 각질층을 통해 흡수되고, 이 경로는 transcellular (각질세포를 직접 통과하는 경로)와 intercellular (각질세포 사이 비극성 지질층을 통과하는 경로)로 나누어진다[3]. 그러나 각질형성세포는 결정구조인 케라틴으로 구성되어 있으며 벽돌 모양의 구조적 특징으로 인해 intercellular 경로가 주된 흡수 경로이지만, 외부 물질에 대한 매우 낮은 투과성을 가지며 화장품의 유효성분 또한 분자량의 제한으로 인해 표피층까지의 침투에 한계가 있다[4]. 피부 흡수를 향상시키기 위한 방법으로는 피부의 전기적 환경을 변화시켜 이온성 약물의 침투를 증가시키는 iontophoresis, 초음파를 이용하여 약물을 침투시키는 sonophoresis, 고전압을 이용한 electroporation, 물리적으로 각질을 제거하는 tape stripping, microneedle therapy system (MTS) 등의 물리적인 방법과 고분자 수화겔, 고분자 마이셀, 나노에멀전, 리포솜, 탄성 리포솜, 에토솜, 니오솜 등의 제형 기술이 개발되고 있다[5,6].

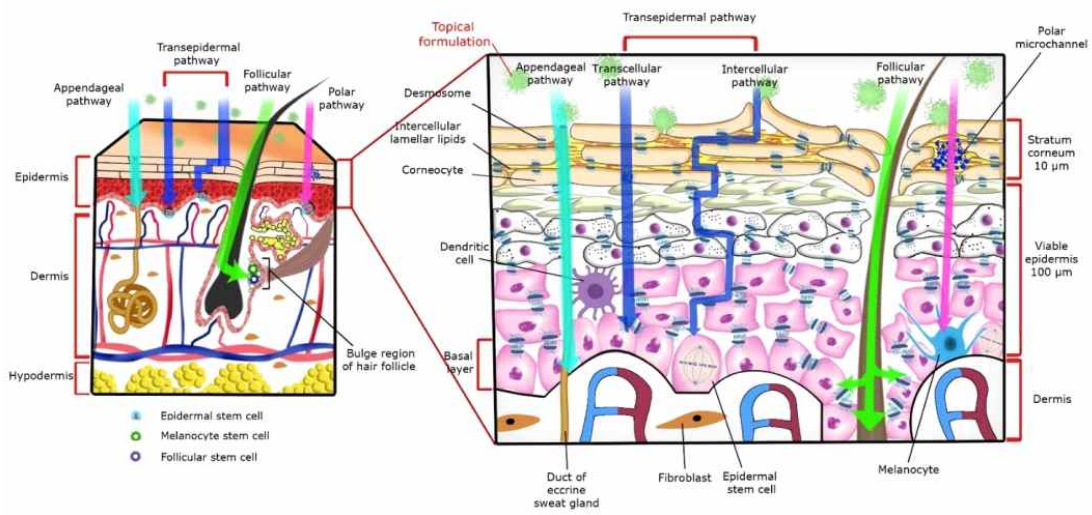


Figure 1. Pathways of skin absorption[3].

나노에멀전 제형은 최근 피부과 및 미용 분야에서 약물 및 생리 활성 물질의 경피 흡수를 향상시키는 유망한 전달 수단으로 조사되었다[7]. 나노에멀전은 일반적으로 입자 크기가 20 ~ 200 nm 이며, oil-in-water (O/W) 또는 water-in-oil (W/O) 에멀전으로 분류될 수 있다(Figure 2)[8]. 작은 입자 크기로 인해 중력의 영향을 최소화하여 입자가 브라운 운동을 하므로 침강 (sedimentation), 크리밍(creaming) 및 응집(aggregation)에 대해 매우 안정하다고 알려져 있다[9,10]. 또한, 나노 크기의 에멀전은 혼합물의 안정성을 증가시킬 뿐만 아니라 활성물질의 생체 이용률 향상에 기여한다[11]. 이러한 장점으로 인하여 나노에멀전은 지용성 생리활성물질의 전달체로 그 활용의 중요성이 점점 증가하고 있다[12]. 하지만 열역학적으로 안정한 마이크로에멀전에 비해, 나노에멀전은 동역학적으로는 안정하나 열역학적으로 불안정하여 Ostwald ripening 현상에 의해 안정성 문제가 나타날 수 있다[13].

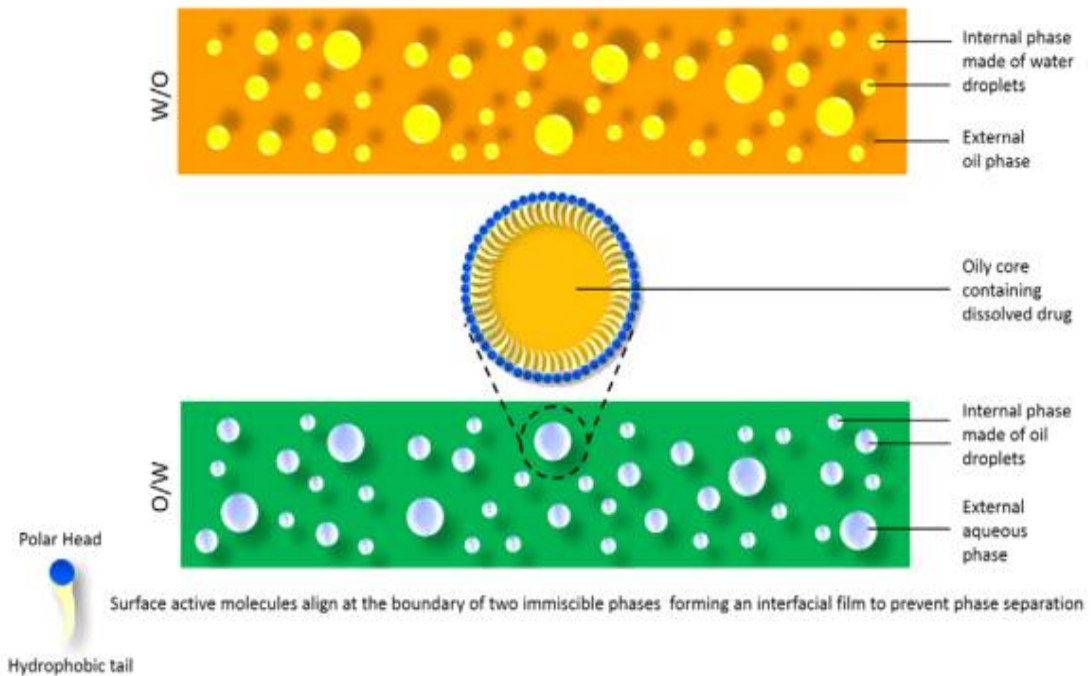


Figure 2. Structure of a W/O or an O/W nanoemulsion[14].

나노에멀전 제조방법에는 저에너지 공정과 고에너지 공정이 있다. 고압유화 (high-pressure homogenization, HPH)[15], 초음파 유화(ultrasonication)[16], 미세유동화(microfluidization)의 고에너지 공정은 충돌효과(impact effect), 전단력효과(shear force effect), 공동효과(cavitation effect)와 같은 집중적인 파괴력에 의해 유상을 기계적으로 파쇄하여 초미세 입자를 생성한다[17,18]. 본 연구에서 사용한 HPH의 원리는 다음과 같다. 먼저, 고압을 가하면 유체의 속도가 감소하며 약간의 충돌효과(impact effect)가 나타난다. 이후 좁은 관을 통과하면서 유체의 속도가 증가하고 전단력효과(shear force effect)가 나타나며 베르누이 정리에 의해 유체의 압력이 감소하게 된다. 상대적으로 기체 압력이 커지게 되어 헨리의 법칙에 의해 유체에 대한 기체의 용해도가 증가하게 되며, 기체의 압력과 유체의 압력이 평형상태에 도달하게 되면 유체 압력을 기체의 포화증기압에 이르게 하여 공동효과에 의해 유체에 vapor bubble을 생성한다. 압력 차이로 인한 vapor bubble의 파열로 유체의 입자 크기가 감소하고 입자들이 기체를 빠져나오는 과정에서 또 한번의 충돌효과를 거치게 되어 최종적으로 미세한 입자들이 생성된다(Figure 3)[19,20]. 물리화학적 방법으로도 알려진 저에너지 공정에는 전상온도(Phase Inversion Temperature, PIT) 유화, 조성 상전이(Phase Inversion Composition, PIC) 유화, D상 유화(D-phase emulsification, DPE)[21], 자발적 유화(spontaneous emulsification)가 있다[22].

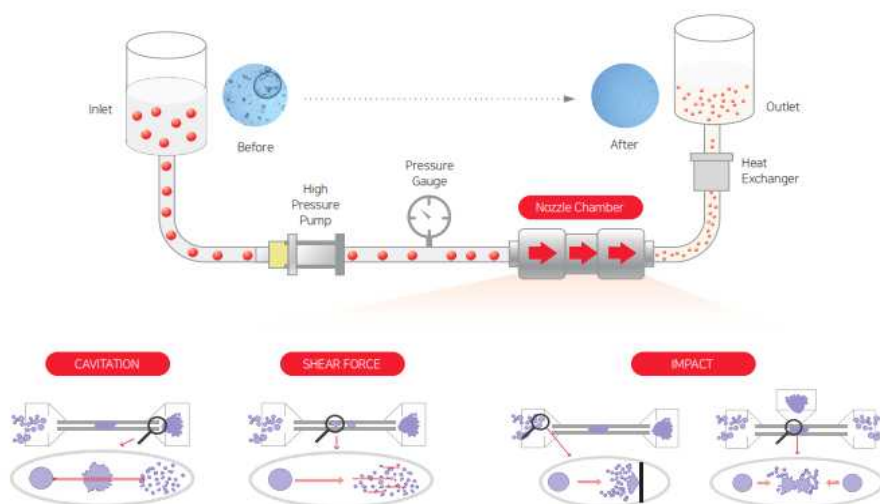


Figure 3. Schematic procedure of HPH method[23].

감초 추출물의 주성분인 glabridin은 *Glycyrrhiza glabra*의 뿌리에서 분리된 isoflavonoid이다(Figure 4). Glabridin은 항종양, 항균, 피부 미백뿐만 아니라 항산화, 항염증, 신경보호 등 다양한 생물학적 특성이 보고되었다[24-26]. Glabridin은 tyrosinase 활성을 억제하여 색소침착과 홍반현상을 막아주며 잡티 완화에 도움을 주고, 피부 부작용도 없어 화장품용 미백 물질로 주목받고 있다 [27]. 하지만 유용성 성분으로서 중성 pH에서 물에 녹지 않으며 산화 분해되기 쉽고, 일반적인 보관 조건에서 생체 이용률이 낮고 약리 활성이 손실된다.

이를 해결할 수 있는 방법의 하나로 glabridin을 함유하는 처방 실험에서 실험 계획법(design of experiments)을 활용하고자 하였다. 실험계획법이라고도 하는 통계적 실험 설계는 최소한의 분석으로 최대한의 정보를 얻기 위해 실험을 계획하고 수행하는 방법론이다[28]. 실험계획법 중 하나인 반응표면분석법(Response Surface Methodology, RSM)은 하나 이상의 반응 변수와 실험 요인들 간의 관계뿐만 아니라 반응 값을 최적화하는 요인들의 수준을 찾기 위해 사용된다. 실제 처방 실험을 바탕으로 경향성을 분석하여 유도된 회귀방정식을 통해 최적 값을 도출하고, 이들 사이의 상호작용을 2 차원 또는 3 차원 표면으로 나타낼 수 있다[29,30]. RSM에서는 반응치에 영향을 주는 변수인 계량(quantitative factor) 또는 계수(qualitative factor) 인자(X), 변수에 대한 결과 값인 반응치(response), 변수들의 설정 값 또는 조절조건인 수준(level), 결과 값과 인자 변화의 관계를 나타내는 수학적 관계인 모델, 인자가 반응치에 미치는 영향을 나타내는 주효과도(main effect), 인자가 2 개 이상일 때 인자 수준의 조합에서 일어나는 효과를 나타내는 교호효과도(interaction effect) 등을 이용하여 최적화 과정을 수행한다[31,32].

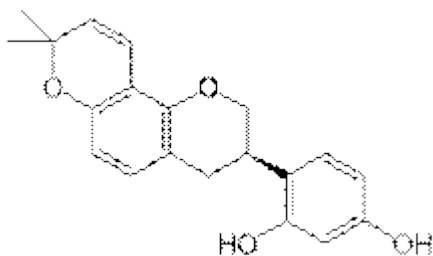


Figure 4. Chemical structure of glabridin.

본 연구에서는 이전 연구에서와 같이 glabridin을 활성성분으로 하여 나노에멀전을 제조하였다[33]. 이전 연구와 비교 시 PEG-free 타입의 계면활성제 선정과 함량 감소, 유상 함량 증가 및 고압 유화 시 압력 감소 외에 고압 유화 횟수의 RSM 인자 확대에 차이점이 있다[34]. 특히 기존 연구의 RSM 인자들에 따른 단순한 물성 변화 외에 4가지 RSM 인자에 따른 최적화한 나노에멀전 처방에 대한 피부 흡수율 평가를 통해 glabridin의 생체 이용률 향상을 목표로 하였다.

II. 재료 및 실험

2.1. 시약 및 기기

나노에멀전 제조를 위해 계면활성제로 polyglyceryl-10 stearate를 사용하였고, 보조계면활성제로 stearic acid, glyceryl stearate citrate, glycerin and inulin lauryl carbamate, sodium stearyl glutamate를 사용하였다. 오일은 macadamia ternifolia seed oil을 사용하였고, 폴리올로 butylene glycol을 사용하였다. 정제수는 증류수 제조기(EXL1 Analysis, Vivagen, Korea)로 제조된 3차 증류수($< 0.1 \mu\text{S}/\text{cm}$)를 사용하였다. 활성물질은 glabridin 함량 35% 이상인 oil soluble licorice (glycyrrhiza) extract (OSLE, Biospectrum, Korea)를 사용하였다. 대조군 에멀전은 최적화된 나노에멀전과 동일한 처방으로 homo-mixer만 사용하여 제조하였으며, 안정성을 위해 점증제로 ammonium acryloyldimethyltaurate/VP copolymer를 사용하였다(Table 1).

에멀전 제조에 homo-mixer (T.K. auto homomixer mark II 2.5, Tokushukika, Japan), high-pressure homogenizer (Nano disperser, NLM1000, Ilshin autoclave, Korea), agi-mixer (Overhead stirrer, SL 4000, Global Lab, Korea) 기기를 사용하였다.

Table 1. List of Used Raw Material

Trade Name	INCI Name	Company (Nation)
Sunsoft Q-18Y-C	Polyglyceryl-10 stearate	Taiyo Kagaku Co. (Japan)
Stearic acid	Stearic acid	Palm-Oleo Sdn. Bhd. (Malaysia)
Dermofeel PA-12	Glyceryl stearate citrate	Dr. Straetmans GmbH (Germany)
Inutec SL1	Glycerin and inulin lauryl carbamate	CreaChem BVBA (Belgium)
Eumulgin SG	Sodium stearyl glutamate	BASF (Germany)
Macadamia nut oil	Macadamia ternifolia seed oil	Jan Dekker (Netherlands)
OSLE	Oil soluble licorice (glycyrrhiza) extract	Biospectrum (Korea)
Glycerin	Glycerin	Acid Chem Co. (India)
1,3-Butylene glycol	Butylene glycol	Daicel (Japan)
1,2-Hexanediol	1,2-Hexanediol	Twin Coschem (Korea)
Paester R-20SP	Octyldodecanol	Patech Fine Chemicals Co. (Taiwan)
Cholesterol JP	Cholesterol	Nippon Fine Chemical Co. (Japan)
Dermosoft GMCY	Glyceryl caprylate	Dr. Straetmans GmbH (Germany)
Saskine 50	Ethylhexylglycerin Ammonium	Sachem Co. (USA)
Aristoflex AVC	Acryloyldimethyltaurate/VP Copolymer	Clariant international Ltd. (Switzerland)

*INCI: International Nomenclature Cosmetic Ingredient

2.2. 활성물질 베이스 제조

Butylene glycol을 용매로 하여 oil soluble licorice (glycyrrhiza) extract 5%를 hot plate/magnetic stirring (PA1180, LK Lab, Korea)으로 50 ℃에서 30 min 동안 stirring하여 완전히 용해시킨 후 사용하였다(Table 2).

Table 2. Composition of Active Substance Base

	Ingredients	wt%
Active substance base	Oil soluble licorice (glycyrrhiza) extract	5.0
	Butylene glycol	95.0

2.3. RSM 인자 설정을 위한 나노에멀전 제조

나노에멀전 제조 시 영향을 주는 다양한 변수 중 계면활성제 함량, 콜레스테롤 함량, 오일 함량, 폴리올 함량, 고압 유화 압력, 고압 유화 횟수에 대해 나노에멀전의 입자 크기에 가장 큰 영향을 미치는 요인을 확인하기 위한 기초실험을 진행하였다(Table 3). 유상(oil phase)과 수상(water phase)을 70 ~ 75 °C로 가온하여 용해 및 분산시키고, 유상을 수상에 첨가하면서 homo-mixer로 3,000 rpm으로 3 min 동안 혼합하여 1 차 에멀전을 제조하였다. 제조된 1 차 에멀전을 40 ~ 45 °C까지 냉각 및 여과한 후 고압 유화하여 나노에멀전을 제조하였다(Figure 5).

Table 3. Composition and Process Conditions of Nanoemulsions for Determine RSM Factor (unit: wt%)

Phase	Ingredients	#N1-1	#N1-2	#N1-3
Oil phase	Polyglyceryl-10 stearate	1.0	3.0	5.0
	Cholesterol	0.3	0.3	0.3
	Macadamia ternifolia seed oil	6.0	6.0	6.0
	Glyceryl caprylate	0.1	0.1	0.1
	Ethylhexylglycerin	0.1	0.1	0.1
Water phase	Water	to 100	to 100	to 100
	Butylene glycol	10.0	10.0	10.0
	1,2-Hexanediol	1.0	1.0	1.0
HPH condition	Pressure (bar)	700	700	700
	Cycling number (pass)	3	3	3

A

Phase	Ingredients	#N1-4	#N1-5	#N1-6
Oil phase	Polyglyceryl-10 stearate	3.0	3.0	3.0
	Cholesterol	0.1	0.3	0.5
	Macadamia ternifolia seed oil	6.0	6.0	6.0
	Glyceryl caprylate	0.1	0.1	0.1
	Ethylhexylglycerin	0.1	0.1	0.1
Water phase	Water	to 100	to 100	to 100
	Butylene glycol	10.0	10.0	10.0
	1,2-Hexanediol	1.0	1.0	1.0
HPH condition	Pressure (bar)	700	700	700
	Cycling number (pass)	3	3	3

B

(Table 3. Continued)

Phase	Ingredients	#N1-7	#N1-8	#N1-9
Oil phase	Polyglyceryl-10 stearate	3.0	3.0	3.0
	Cholesterol	0.3	0.3	0.3
	Macadamia ternifolia seed oil	2.0	6.0	10.0
	Glyceryl caprylate	0.1	0.1	0.1
	Ethylhexylglycerin	0.1	0.1	0.1
Water phase	Water	to 100	to 100	to 100
	Butylene glycol	10.0	10.0	10.0
	1,2-Hexanediol	1.0	1.0	1.0
HPH condition	Pressure (bar)	700	700	700
	Cycling number (pass)	3	3	3

C

Phase	Ingredients	#N1-10	#N1-11	#N1-12
Oil phase	Polyglyceryl-10 stearate	3.0	3.0	3.0
	Cholesterol	0.3	0.3	0.3
	Macadamia ternifolia seed oil	6.0	6.0	6.0
	Glyceryl caprylate	0.1	0.1	0.1
	Ethylhexylglycerin	0.1	0.1	0.1
Water phase	Water	to 100	to 100	to 100
	Butylene glycol	2.0	10.0	18.0
	1,2-Hexanediol	1.0	1.0	1.0
HPH condition	Pressure (bar)	700	700	700
	Cycling number (pass)	3	3	3

D

(Table 3. Continued)

Phase	Ingredients	#N1-13	#N1-14	#N1-15	
Oil phase	Polyglyceryl-10 stearate	3.0	3.0	3.0	E
	Cholesterol	0.3	0.3	0.3	
	Macadamia ternifolia seed oil	6.0	6.0	6.0	
	Glyceryl caprylate	0.1	0.1	0.1	
	Ethylhexylglycerin	0.1	0.1	0.1	
Water phase	Water	to 100	to 100	to 100	
	Butylene glycol	10.0	10.0	10.0	
	1,2-Hexanediol	1.0	1.0	1.0	
HPH condition	Pressure (bar)	400	700	1,000	
	Cycling number (pass)	3	3	3	

Phase	Ingredients	#N1-16	#N1-17	#N1-18	
Oil phase	Polyglyceryl-10 stearate	3.0	3.0	3.0	F
	Cholesterol	0.3	0.3	0.3	
	Macadamia ternifolia seed oil	6.0	6.0	6.0	
	Glyceryl caprylate	0.1	0.1	0.1	
	Ethylhexylglycerin	0.1	0.1	0.1	
Water phase	Water	to 100	to 100	to 100	
	Butylene glycol	10.0	10.0	10.0	
	1,2-Hexanediol	1.0	1.0	1.0	
HPH condition	Pressure (bar)	700	700	700	
	Cycling number (pass)	1	3	5	

A : Surfactant content, B : Cholesterol content, C : Oil content, D : Polyol content, E : High-pressure homogenization pressure, F : High-pressure homogenization cycling number.



Figure 5. Manufacturing process of nanoemulsions by high-pressure homogenization method.

2.4. Box-Behnken Design을 이용한 Glabridin 함유 나노에멀전 제조

본 연구에서는 glabridin 함유 나노에멀전 제형 최적화를 위해 반응표면분석법 중 하나인 box-behnken design (BBD)을 이용하였다[35,36]. 비교적 실험횟수가 적은 3-level 실험설계법으로 잘 알려져 있으며, 인자 수의 증가에 비례하여 실험구역이 넓어지지 않는다. 따라서 각 요인의 모든 수준이 극단인 경우 적절한 실험설계로 생각하기 어렵기 때문에 BBD는 최적 값이 실험구역 내에 존재한다는 확신을 가질 때 무리가 없다. 또한 실험구역이 구형이기 때문에 모든 실험 점들이 중심점으로부터 떨어진 거리가 모두 같아서 요인의 수에 따라 회전성을 갖거나 근사회전성을 만족한다[37].

기초실험을 통해 최종적으로 계면활성제 함량, 오일 함량, 고압 유화 압력, 고압 유화 횟수를 RSM 요인으로 선정하였고, 반응 값은 나노에멀전의 입자 크기 (particle size)와 피부 흡수율(skin absorption rate)로 선정하였다(Table 4)[38]. 실험은 중심점 5 회 반복실험을 포함하여 총 29 회 실험이 무작위로 수행되었다(Table 5). 계면활성제상(surfactant phase), 유상 및 수상을 70 ~ 75 °C로 가온하여 용해 및 분산시킨다. 그 후 유상을 계면활성제상에 첨가하면서 homo-mixer로 4,000 rpm으로 10 min 동안 혼합하고, 수상을 첨가하면서 2,000 rpm으로 5 min 동안 혼합하여 1 차 에멀전을 제조하였다. 제조된 1 차 에멀전을 40 ~ 45 °C까지 냉각 및 여과한 후 고압 유화하여 나노에멀전을 제조하였고, 마지막으로 활성물질 베이스를 첨가하여 agi-mixer로 5 min 동안 혼합하는 공정으로 glabridin 함유 나노에멀전을 제조하였다(Figure 6)[39].

Table 4. Variables in Box-Behnken Design for Preparation of Glabridin Nanoemulsions

Factors		Level used, actual (coded)		
		Low (-1)	Medium (0)	High (+1)
Independent variables	A = Surfactant (wt%)	1.0	3.0	5.0
	B = Oil (wt%)	2.0	6.0	10.0
	C = Pressure (bar)	400	700	1,000
	D = Cycling number (pass)	1	3	5
Dependent variables	Y ₁ = Particle size (nm)			
	Y ₂ = Skin absorption rate (%)			

Table 5. Composition and Process Conditions of Glabridin Nanoemulsions Obtained from the Box-Behnken Design (unit: wt%)

Phase	Ingredients	#GN-1	#GN-2	#GN-3	#GN-4	#GN-5
Surfactant phase	Polyglyceryl-10 stearate	1.0	5.0	5.0	1.0	3.0
	Stearic Acid	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
	Glyceryl stearate	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
	citrate					
	Glycerin and					
	Inulin lauryl carbamate	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
	Glycerin	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0
Oil phase	Macadamia ternifolia seed oil	6.0	6.0	2.0	10.0	2.0
	Octyldodecanol	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
	Cholesterol	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
	Glyceryl caprylate	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
	Ethylhexylglycerin	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Water phase	Water	to 100	to 100	to 100	to 100	to 100
	Butylene glycol	6.2	6.2	6.2	6.2	6.2
	1,2-Hexanediol	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
	Sodium stearoyl glutamate	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Active phase	Active substance base	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
HPH condition	Pressure (bar)	700	1,000	700	700	1,000
	Cycling number (pass)	1	3	3	3	3

(Table 5. Continued)

Phase	Ingredients	#GN-6	#GN-7	#GN-8	#GN-9	#GN-10
Surfactant phase	Polyglyceryl-10 stearate	3.0	3.0	1.0	1.0	3.0
	Stearic Acid	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
	Glyceryl stearate citrate	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
	Glycerin and Inulin lauryl carbamate	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
	Glycerin	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0
	Oil phase	Macadamia ternifolia seed oil	6.0	6.0	6.0	6.0
Octyldodecanol		2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
Cholesterol		0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Glyceryl caprylate		0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Ethylhexylglycerin		0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Water phase		Water	to 100	to 100	to 100	to 100
	Butylene glycol	6.2	6.2	6.2	6.2	6.2
	1,2-Hexanediol	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
	Sodium stearoyl glutamate	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Active phase	Active substance base	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
HPH condition	Pressure (bar)	700	700	1,000	700	700
	Cycling number (pass)	3	3	3	5	3

(Table 5. Continued)

Phase	Ingredients	#GN-11	#GN-12	#GN-13	#GN-14	#GN-15
Surfactant phase	Polyglyceryl-10 stearate	1.0	3.0	3.0	3.0	3.0
	Stearic Acid	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
	Glyceryl stearate citrate	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
	Glycerin and Inulin lauryl carbamate	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
	Glycerin	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0
	Oil phase	Macadamia ternifolia seed oil	6.0	6.0	6.0	6.0
Octyldodecanol		2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
Cholesterol		0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Glyceryl caprylate		0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Ethylhexylglycerin		0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Water phase		Water	to 100	to 100	to 100	to 100
	Butylene glycol	6.2	6.2	6.2	6.2	6.2
	1,2-Hexanediol	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
	Sodium stearoyl glutamate	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Active phase	Active substance base	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
HPH condition	Pressure (bar)	400	1,000	700	400	400
	Cycling number (pass)	3	5	3	5	3

(Table 5. Continued)

Phase	Ingredients	#GN-16	#GN-17	#GN-18	#GN-19	#GN-20
Surfactant phase	Polyglyceryl-10 stearate	3.0	5.0	3.0	3.0	3.0
	Stearic Acid	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
	Glyceryl stearate citrate	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
	Glycerin and Inulin lauryl carbamate	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
	Glycerin	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0
	Oil phase	Macadamia ternifolia seed oil	6.0	10.0	6.0	10.0
Octyldodecanol		2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
Cholesterol		0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Glyceryl caprylate		0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Ethylhexylglycerin		0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Water phase		Water	to 100	to 100	to 100	to 100
	Butylene glycol	6.2	6.2	6.2	6.2	6.2
	1,2-Hexanediol	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
	Sodium stearoyl glutamate	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Active phase	Active substance base	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
HPH condition	Pressure (bar)	400	700	1,000	700	700
	Cycling number (pass)	1	3	1	1	5

(Table 5. Continued)

Phase	Ingredients	#GN-21	#GN-22	#GN-23	#GN-24	#GN-25
Surfactant phase	Polyglyceryl-10 stearate	3.0	5.0	5.0	1.0	3.0
	Stearic Acid	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
	Glyceryl stearate citrate	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
	Glycerin and Inulin lauryl carbamate	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
	Glycerin	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0
	Oil phase	Macadamia ternifolia seed oil	2.0	6.0	6.0	2.0
Octyldodecanol		2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
Cholesterol		0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Glyceryl caprylate		0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Ethylhexylglycerin		0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Water phase		Water	to 100	to 100	to 100	to 100
	Butylene glycol	6.2	6.2	6.2	6.2	6.2
	1,2-Hexanediol	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
	Sodium stearoyl glutamate	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Active phase	Active substance base	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
HPH condition	Pressure (bar)	400	400	700	700	700
	Cycling number (pass)	3	3	5	3	3

(Table 5. Continued)

Phase	Ingredients	#GN-26	#GN-27	#GN-28	#GN-29
Surfactant phase	Polyglyceryl-10 stearate	3.0	3.0	3.0	5.0
	Stearic Acid	0.2	0.2	0.2	0.2
	Glyceryl stearate citrate	0.5	0.5	0.5	0.5
	Glycerin and Inulin lauryl carbamate	0.5	0.5	0.5	0.5
	Glycerin	6.0	6.0	6.0	6.0
Oil phase	Macadamia ternifolia seed oil	2.0	10.0	10.0	6.0
	Octyldodecanol	2.0	2.0	2.0	2.0
	Cholesterol	0.3	0.3	0.3	0.3
	Glyceryl caprylate	0.1	0.1	0.1	0.1
	Ethylhexylglycerin	0.1	0.1	0.1	0.1
Water phase	Water	to 100	to 100	to 100	to 100
	Butylene glycol	6.2	6.2	6.2	6.2
	1,2-Hexanediol	1.0	1.0	1.0	1.0
	Sodium stearyl glutamate	0.1	0.1	0.1	0.1
Active phase	Active substance base	4.0	4.0	4.0	4.0
HPH condition	Pressure (bar)	700	700	1,000	700
	Cycling number (pass)	1	5	3	1

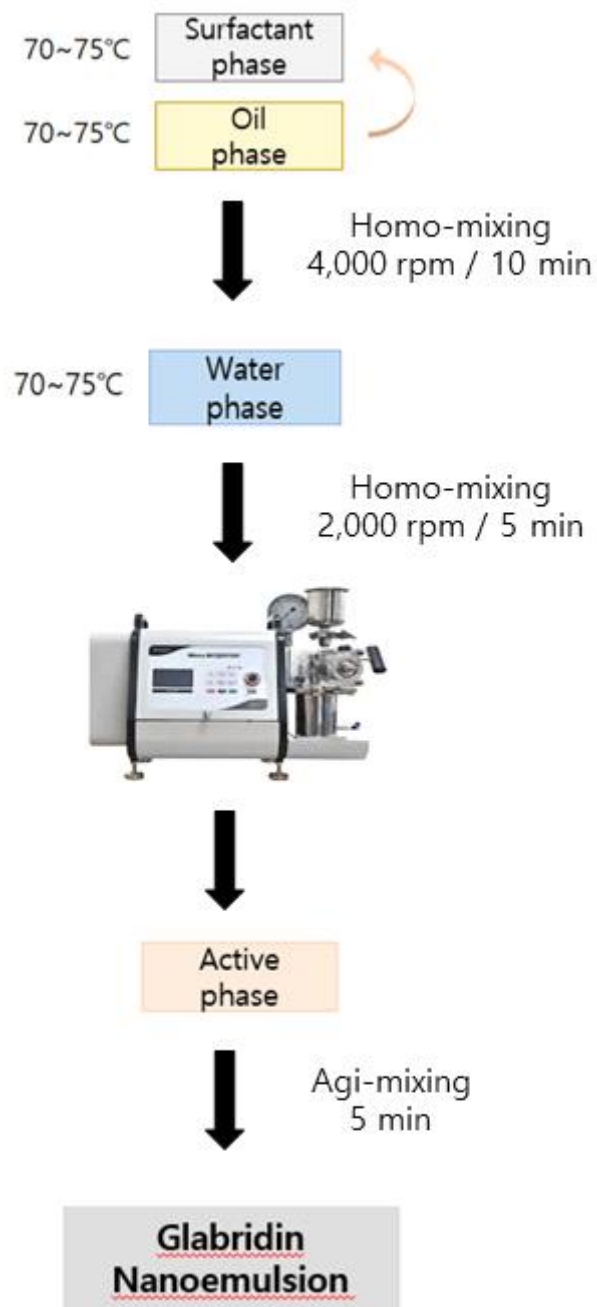


Figure 6. Manufacturing process of glabridin nanoemulsions by high-pressure homogenization method.

2.5. 대조군 제조

최적화된 나노에멀전과의 비교를 위해 대조군으로 에멀전을 제조하였다. 최적화된 조건과 같은 조성에서 물리적 안정성을 위해 점증제로 0.4%의 ammonium acryloyldimethyltaurate/VP copolymer를 첨가하였고 고압 유회 공정은 제외하였다(Table 6).

Table 6. Composition of Glabridin Emulsion (unit: wt%)

Phase	Ingredients	#GE
Surfactant phase	Polyglyceryl-10 stearate	5.0
	Stearic Acid	0.2
	Glyceryl stearate citrate	0.5
	Glycerin and Inulin lauryl carbamate	0.5
	Glycerin	6.0
Oil phase	Active substance base	4.0
	Macadamia ternifolia seed oil	2.0
	Octyldodecanol	2.0
	Cholesterol	0.3
	Glyceryl caprylate	0.1
	Ethylhexylglycerin	0.1
Water phase	Water	to 100
	Butylene glycol	6.2
	1,2-Hexanediol	1.0
	Sodium stearyl glutamate	0.1
	Ammonium Acryloyldimethyltaurate/VP Copolymer	0.4

2.6. 입자 크기, 다분산지수 및 제타전위 측정

입자 크기와 다분산지수(polydispersity index, PDI)는 동적광산란(dynamic light scattering)의 원리로 브라운 운동을 하고 있는 입자들을 레이저로 쏘아 다양하게 산란되는 레이저 광의 강도 변동을 Stokes-Einstein equation (Eq. 1)을 통해 환산하여 측정한다(Figure 6).

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_h} \quad (\text{Eq. 1})$$

여기서 D 는 확산 계수, k_B 는 볼츠만 상수, T 는 온도, η 는 점도, R_h 는 입자 반경을 나타낸다[40].

제타전위(Zeta Potential, ZP)는 전기영동광산란(electrophoretic light scattering)의 원리로 cell의 양쪽에 전기장을 걸어 분산 상태의 입자를 측정하여 분산 안정성을 확인한다(Figure 8)[41]. 동적광산란과 유사하게 레이저가 측정 큐벳을 통해 전송되고 전기장이 입자 현탁액에 적용되어 입자가 하전되면 표면 전하에 대해 반대 전하 부호로 전극을 향해 이동한다. 입자의 움직임은 입자 속도에 비례하는 산란광에서 소위 도플러 이동이라고 하는 주파수의 이동을 유도하며, 이 도플러 이동과 양극 또는 음극을 향한 이동 방향을 사용하여 현탁액에서 입자의 전기영동 이동성과 제타 전위를 측정한다[42]. 전기영동 이동도를 제타 전위로 변환할 때에는 Smoluchowski equation을 사용한다[43].

나노에멀전 및 에멀전의 입자 크기, PDI 및 ZP는 시료를 정제수로 1% 희석하여 25 °C에서 입도분석기(Zetasizer nano ZS, Malvern Instrument Ltd., UK)를 사용하여 측정하였다(N = 3).

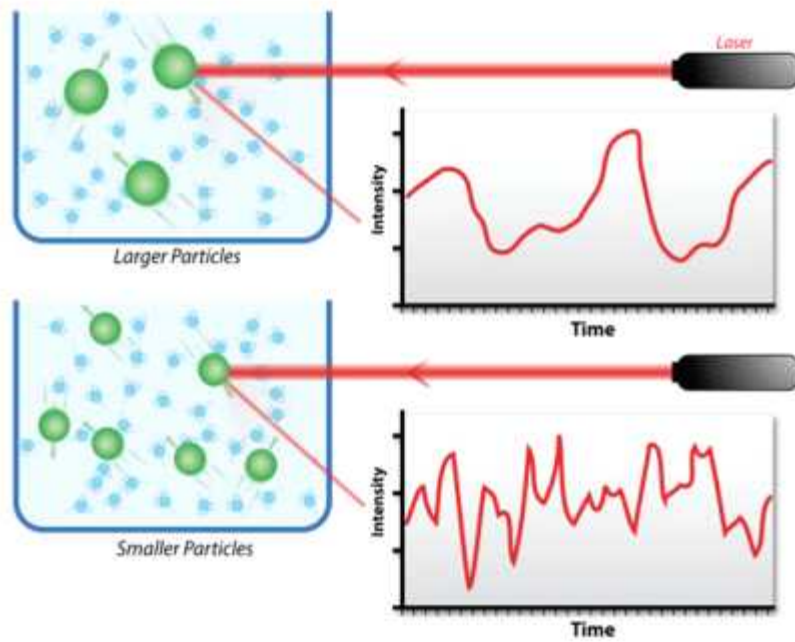


Figure 7. Schematic diagram of dynamic light scattering according to particle size[40].

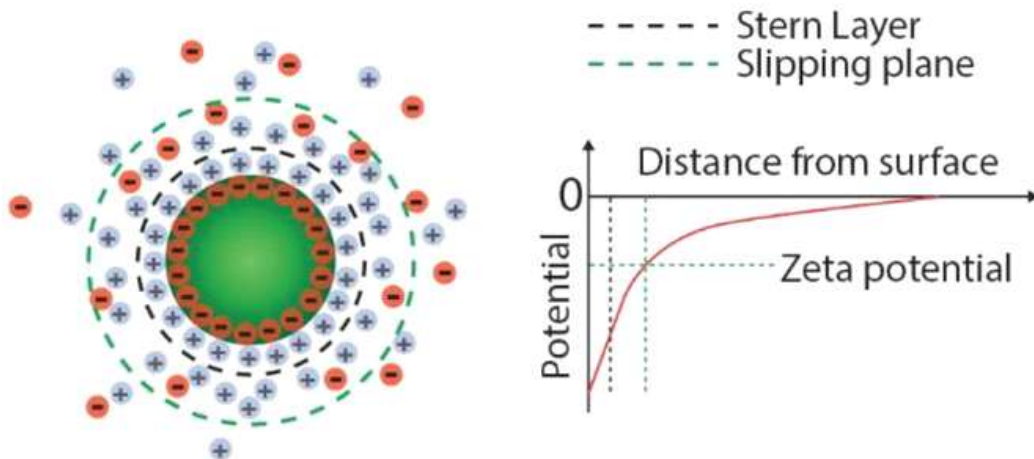


Figure 8. Surface charge and zeta potential of nanoparticles[42].

2.7. 나노에멀전 형상 관찰(TEM)

나노에멀전의 형상을 관찰하기 위해 외부 기관인 한국과학기술연구원(KIST, Korea Institute of Science and Technology, Korea)에 의뢰하였다. 기기는 초저온투과전자현미경(Cryo-TEM, Cryogenic transmission electron microscope, Tecnai F20 G², Thermo Fisher Scientific, USA)을 사용하였다.

2.8. Franz Diffusion Cell을 이용한 Glabridin 나노에멀전의 *In-Vitro* 피부 흡수 시험

Glabridin 나노에멀전의 피부 흡수율을 평가하기 위해 각질층을 모사한 인공피부(Strat-M membrane 25 mm discs, Merck Millipore, USA)를 사용하여 Franz diffusion cell (HDC-6TD, Logan Instruments, USA)로 *in-vitro* 피부 흡수 시험을 수행하였다[44]. Receptor 용액으로는 활성성분의 용해도를 고려하여 isopropanol : polysorbate 20 : water = 50 : 2 : 48 (v/v) 용액을 사용하였다.

Franz diffusion cell에 membrane의 각질층이 위로 향하도록 놓고 그 위에 donor를 고정시켰다. 12 mL의 receptor 용액을 주입하고 magnetic bar를 이용하여 300 rpm 속도로 교반하면서 37 ± 1 °C에서 30 min 동안 안정화하였다. 그 다음 각각의 membrane 표면에 샘플 500 μ L 도포하였다(Figure 9). Receptor 용액은 1, 2, 4, 8, 12, 24 h 간격으로 회수되었으며, 피부 흡수율과 glabridin의 흡수율은 HPLC를 이용하여 정량분석 하였다. 분석 조건 및 방법은 ‘기능성화장품 기준 및 시험방법(식품의약품안전청고시 제2012-89호, 2012. 8. 24. 시행)’을 참고하였다[45].

24 h 경과 후 donor에 남아있는 부분은 isopropanol 10 mL로 희석하였다. 회수한 membrane은 receptor 용액 10 mL로 세척한 후 8 조각으로 세절하여 초음파세척기(JAC-3010, Kodo Technical Research Co., Ltd., Korea)로 1 h 동안 용출시켜 정량분석 하였다.

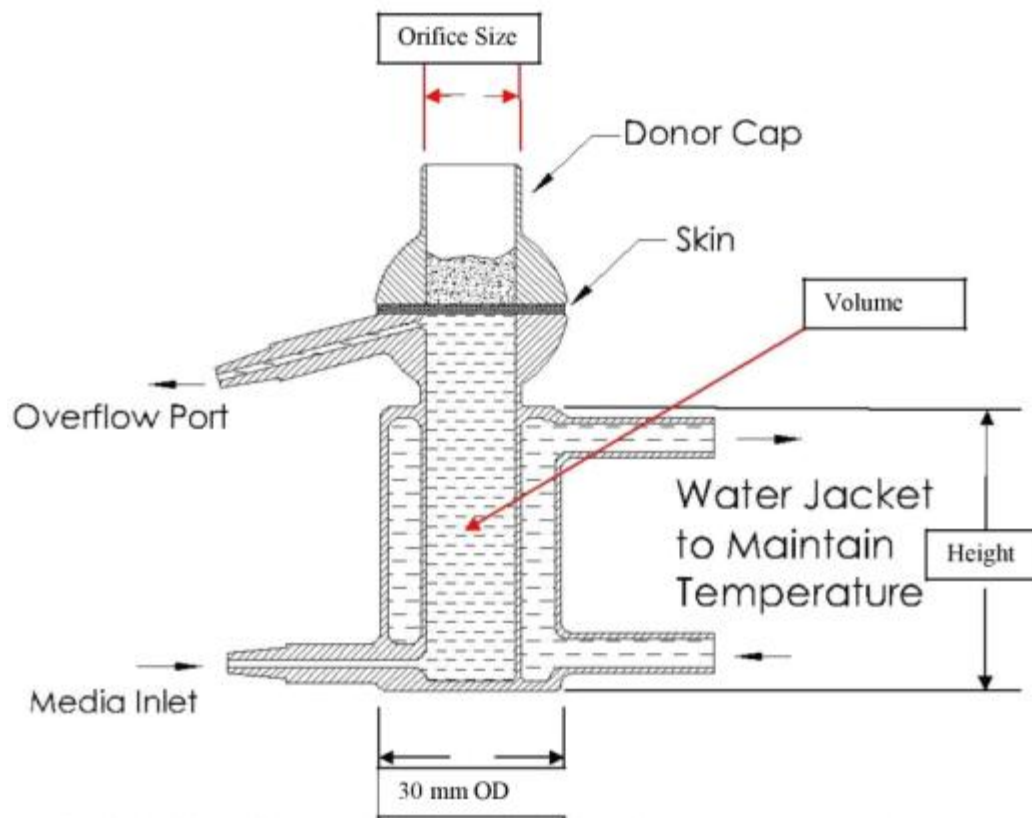


Figure 9. Schematic diagram of Franz diffusion cell[46].

2.9. Glabridin 함량 분석

Glabridin 함량 분석은 HPLC (eAlliance, Waters, USA)를 이용하여 수행하였다. Kromasil C₁₈ column (5 μm, 4.6 × 250 mm, AkzoNobel, Netherlands)을 사용하였으며 column 온도는 40 °C, 샘플 온도는 25 °C로 유지하였다. 이동상으로는 0.02% acetic acid : acetonitrile = 50 : 50 비율로 하여 1.0 mL/min 의 유속으로 흘려주었으며, photodiode array (PDA) detector (2998, Waters, USA)로 282 nm에서 파장을 관찰하였다(Table 7).

Table 7. HPLC Conditions for Glabridin Analysis

System	Condition of HPLC analysis
Column	Kromasil C ₁₈ column, 5 μm, 4.6 × 250 mm (AkzoNobel, Netherlands)
Detector	2998 Photodiode Array Detector (Waters, USA)
Temperature of column and sample	40 °C and 25 °C
Mobile phase	0.02% Acetic acid : Acetonitrile = 50 : 50
Flow rate	1.0 mL/min
Injection volume	20 μL
Wavelength	282 nm
Run time	20 min

2.10. 통계적 검증

반응표면분석법은 Design-Expert version 11 (StatEase, USA)을 사용하여 설계 및 분석하였다. 모든 실험은 3 회 반복 측정하였고, 결과는 평균 \pm 표준편차로 나타내었다. 유의성은 student's *t*-test로 진행하였고, 유의성에 따라 $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ 로 나타내었다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

3.1. RSM 인자 설정을 위한 나노에멀전의 입자 크기 측정

나노에멀전 제조 시 영향을 주는 계면활성제 함량, 콜레스테롤 함량, 오일 함량, 폴리올 함량, 고압 유화 압력, 고압 유화 횟수를 달리하여 나노에멀전을 제조하였고(Table 3), 1 d 후 입자 크기를 측정하였다(Table 8). 입자 크기는 25 °C 에서 148.2 ~ 174.0 nm (surfactant factor), 152.8 ~ 164.7 nm (cholesterol factor), 142.3 ~ 170.8 nm (oil factor), 150.7 ~ 157.6 nm (polyol factor), 136.4 ~ 187.1 nm (HPH pressure factor), 147.7 ~ 188.3 nm (HPH cycling number factor) 범위로 측정되었다. 각각의 계면활성제 함량, 콜레스테롤 함량, 고압유화 압력, 고압유화 횟수 요인의 수준이 증가함에 따라 입자 크기가 작아지는 경향을 나타내는 반면, 오일 함량, 폴리올 함량 요인의 수준이 증가함에 따라 입자 크기가 커지는 경향을 나타내었다(Figure 10).

RSM 인자로 선정하기 위해서는 각각 요인의 수준에 따른 반응 값의 차이가 큰 것이 적합하다. 나노에멀전의 입자 크기에 가장 큰 영향을 미치는 요인을 찾기 위해 추세선의 기울기를 계산한 결과, -12.9 (surfactant factor), -5.95 (cholesterol factor), +14.25 (oil factor), +2.35 (polyol factor), -25.35 (HPH pressure factor), -20.3 (HPH cycling number factor)로 확인되었다. 입자 크기를 감소시키는 요인 중 기울기가 큰 순으로 4 개의 요인(계면활성제 함량, 오일 함량, 고압 유화 압력, 고압 유화 횟수)을 선정하였다.

Table 8. Particle Size of #N1 in Table 3 after 1 d at 25 °C (mean ± SD, N = 3)

Factors	No.	Particle size (nm)	Factors	No.	Particle size (nm)		
S	1.0	#N1-1	174.0 ± 1.2	2.0	#N1-10	152.9 ± 0.5	
	3.0	#N1-2	159.6 ± 1.1	Po	10.0	#N1-11	150.7 ± 0.3
	5.0	#N1-3	148.2 ± 0.9	18.0	#N1-12	157.6 ± 0.7	
Ch	0.1	#N1-4	164.7 ± 1.1	400	#N1-13	187.1 ± 0.3	
	0.3	#N1-5	156.2 ± 1.0	Pr	700	#N1-14	159.4 ± 0.4
	0.5	#N1-6	152.8 ± 0.8	1,000	#N1-15	136.4 ± 0.8	
O	2.0	#N1-7	142.3 ± 0.3	1	#N1-16	188.3 ± 1.2	
	6.0	#N1-8	170.1 ± 1.2	Cy	3	#N1-17	157.0 ± 0.6
	10.0	#N1-9	170.8 ± 0.6	5	#N1-18	147.7 ± 1.0	

S: surfactant, Ch: Cholesterol, O: oil, Po: polyol, Pr: pressure, Cy: cycling number

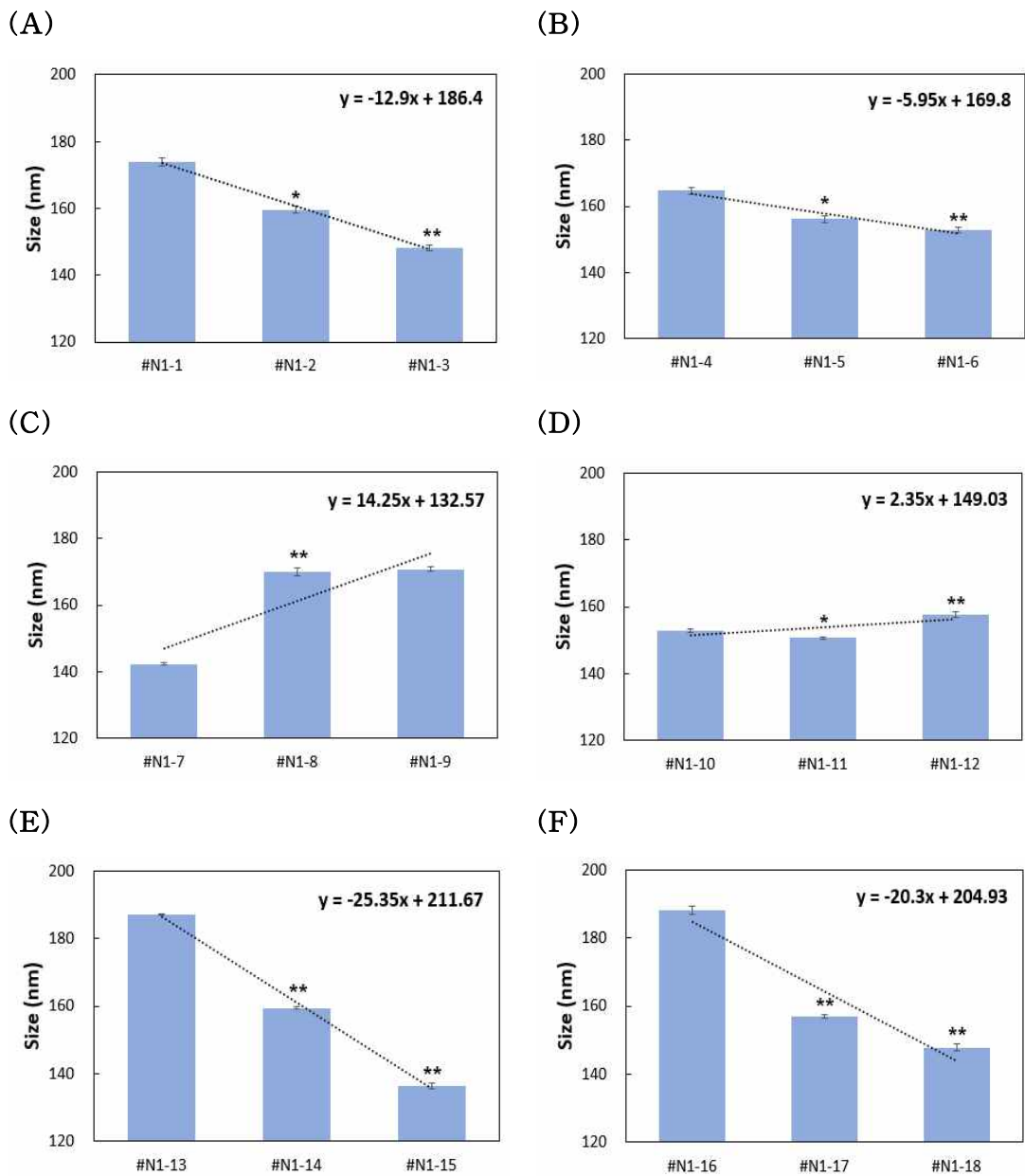


Figure 10. Particle size of #N1 after 1 d at 25 °C according to (A): surfactant content, (B): cholesterol content, (C): oil content, (D): polyol content, (E): HPH pressure, (F): HPH cycling number (N = 3, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

3.2. 나노에멀전 형상 관찰(TEM)

KIST의 초저온투과전자현미경을 사용하여 나노에멀전의 형상을 관찰하였다. #N1-18을 관찰한 결과, 입자의 형태가 구형이며 입자 크기가 200 nm보다 작은 입자들이 분포되어 있음을 확인할 수 있었다(Figure 11).

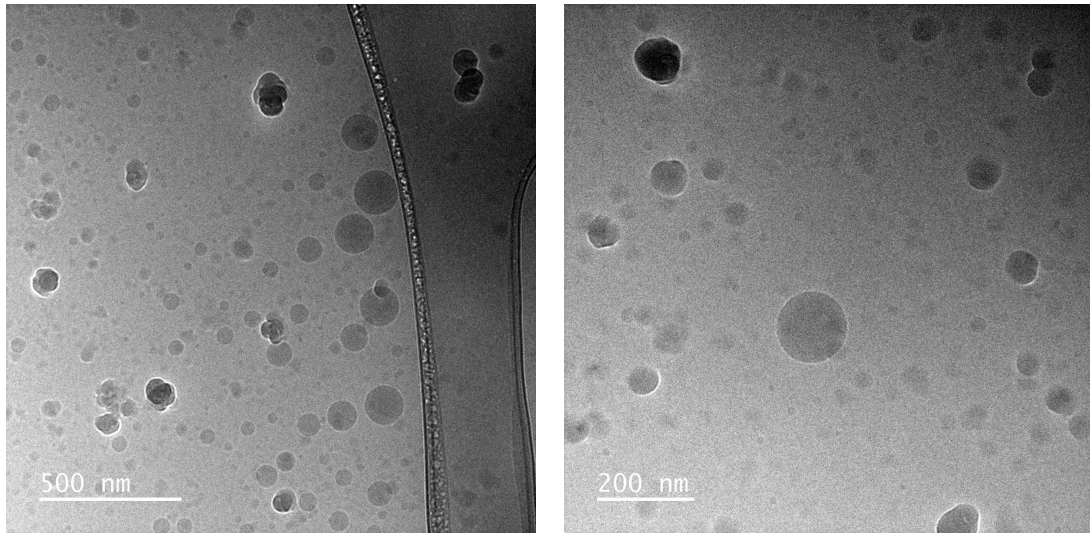


Figure 11. Cryo-TEM images of #N1-18.

3.3. RSM을 이용한 실험계획법

기초실험을 통해 선정된 계면활성제 함량(1.0 ~ 5.0 wt%), 오일 함량(2.0 ~ 10.0 wt%), 고압유화 압력(400 ~ 1,000 bar), 고압유화 횟수(1 ~ 5 pass)의 요인 및 수준으로 BBD를 수행하였다(Figure 12). 제조 1 d 후 입자 크기 및 피부 흡수율을 측정하였다(Table 9). 피부 흡수율은 시간에 따른 상대적인 차이를 비교하기 위한 것으로 실험은 8 h 동안만 진행하였다.

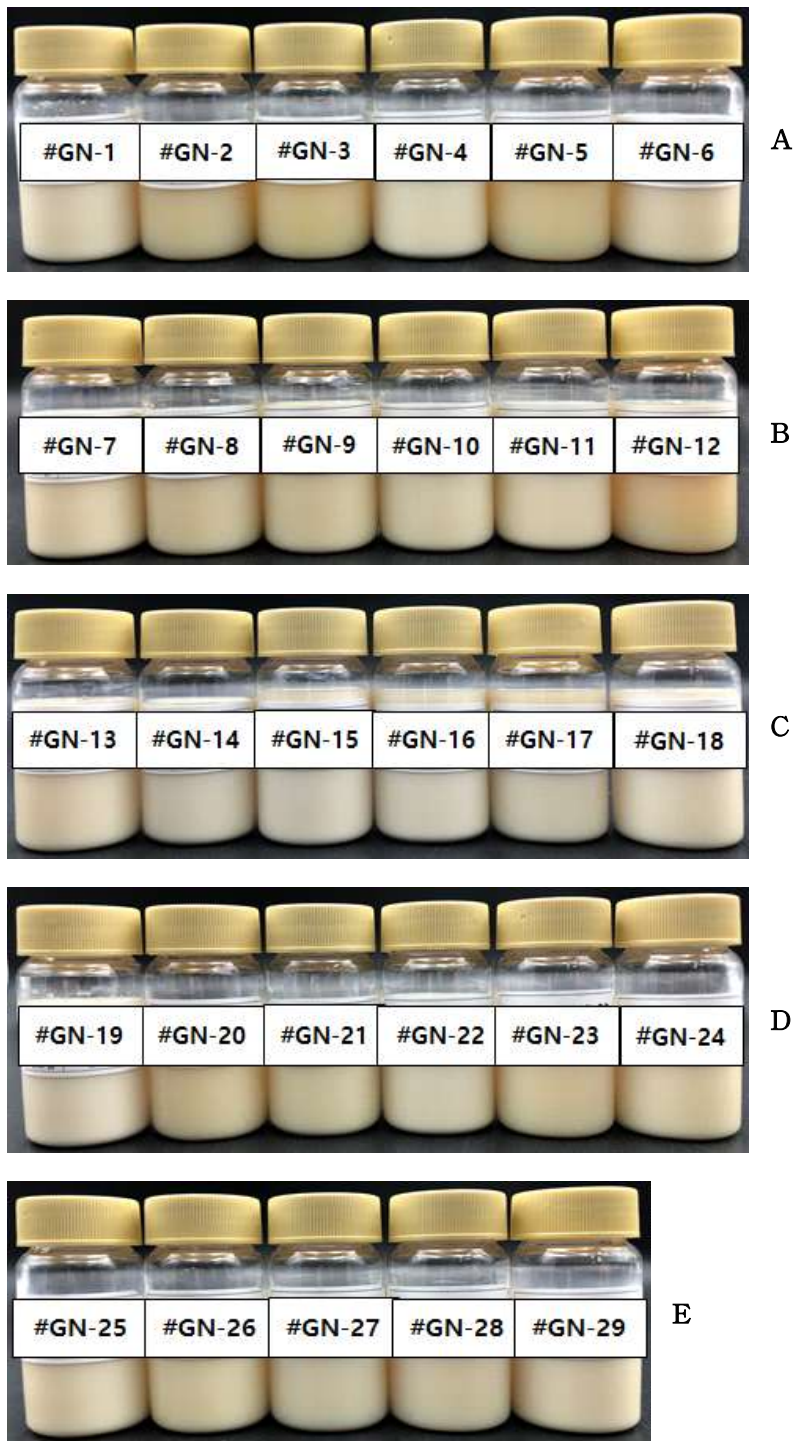


Figure 12. Appearance of #GN after 1 d at 25 °C (A): #GN-1 ~ #GN-6, (B): #GN-7 ~ #GN-12, (C): #GN-13 ~ #GN-18, (D): #GN-19 ~ #GN-24, (E): #GN-25 ~ #GN-29.

Table 9. Box–Behnken Design Experimental Conditions and Results of Glabridin Nanoemulsion

Run	Space type	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4	Response 1	Response 2
		A (wt%)	B (wt%)	C (bar)	D (pass)	Y ₁ (nm)	Y ₂ (%)
1	IBFact	1.0	6.0	700	1	169.3	48.46
2	IBFact	5.0	6.0	1,000	3	127.0	41.18
3	IBFact	5.0	2.0	700	3	162.5	40.40
4	IBFact	1.0	10.0	700	3	160.9	45.53
5	IBFact	3.0	2.0	1,000	3	126.8	45.33
6	Center	3.0	6.0	700	3	149.8	45.79
7	Center	3.0	6.0	700	3	181.1	42.48
8	IBFact	1.0	6.0	1,000	3	141.7	47.56
9	IBFact	1.0	6.0	700	5	150.6	41.19
10	Center	3.0	6.0	700	3	166.4	44.84
11	IBFact	1.0	6.0	400	3	177.7	47.05
12	IBFact	3.0	6.0	1,000	5	116.3	41.01
13	Center	3.0	6.0	700	3	153.3	40.61
14	IBFact	3.0	6.0	400	5	176.6	40.85
15	IBFact	3.0	10.0	400	3	184.8	44.92
16	IBFact	3.0	6.0	400	1	205.7	44.03
17	IBFact	5.0	10.0	700	3	159.4	32.55
18	IBFact	3.0	6.0	1,000	1	161.3	43.03
19	IBFact	3.0	10.0	700	1	183.1	30.27
20	IBFact	3.0	2.0	700	5	167.4	36.01
21	IBFact	3.0	2.0	400	3	245.7	39.26
22	IBFact	5.0	6.0	400	3	211.6	35.49
23	IBFact	5.0	6.0	700	5	139.4	32.62
24	IBFact	1.0	2.0	700	3	169.0	43.96
25	Center	3.0	6.0	700	3	194.6	29.03
26	IBFact	3.0	2.0	700	1	215.1	36.27
27	IBFact	3.0	10.0	700	5	141.8	25.12
28	IBFact	3.0	10.0	1,000	3	137.2	30.23
29	IBFact	5.0	6.0	700	1	193.6	33.02

A: surfactant content, B: oil content, C: HPH pressure, D: HPH cycling number, Y₁: particle size, Y₂: skin absorption rate

3.3.1. 입자 크기(Y_1)에 미치는 영향

계면활성제 함량, 오일 함량, 고압유화 압력, 고압유화 횟수가 나노에멀전의 입자 크기에 미치는 영향을 확인하였다. 이차다항식 모델(quadratic model)이 예측에 적합하였으며, 모형의 p -value (< 0.05)와 F -value는 이차다항식 모델이 유의성을 갖는다는 것을 보여준다(Table 10). 또한 F -value가 크고, p -value가 작은 인자일수록 반응 값에 더 큰 영향을 미친다[47].

Table 10. ANOVA for Quadratic Model of Particle Size

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F -value	p -value	
Model	21462.15	14	1533.01	8.32	0.0002	Significant
A-Surfactant	49.21	1	49.21	0.2670	0.6134	
B-Oil	1186.04	1	1186.04	6.44	0.0237	
C-Pressure	12792.27	1	12792.27	69.42	<0.0001	
D-Cycling number	4641.33	1	4641.33	25.19	0.0002	
AB	6.25	1	6.25	0.0339	0.8565	
AC	590.49	1	590.49	3.20	0.0951	
AD	315.06	1	315.06	1.71	0.2121	
BC	1270.92	1	1270.92	6.90	0.0199	
BD	10.24	1	10.24	0.0556	0.8171	
CD	63.20	1	63.20	0.3430	0.5674	
A^2	306.14	1	306.14	1.66	0.2183	
B^2	131.64	1	131.64	0.7144	0.4122	
C^2	2.80	1	2.80	0.0152	0.9036	
D^2	0.6539	1	0.6539	0.0035	0.9533	
Residual	2579.71	14	184.27			Not significant
Lack of Fit	1156.06	10	115.61	0.3248	0.9321	
Pure Error	1423.65	4	355.91			
Cor Total	24041.87	28				

Glabridin 나노에멀전의 입자 크기에 대해 제안된 수학적 모델 방정식은 Eq. 2와 같다.

$$Y_1 = + 169.04 + 2.02 A - 9.94 B - 32.65 C - 19.67 D - 6.87 A^2 \\ + 4.51 B^2 - 0.6575 C^2 + 0.3175 D^2 + 1.25 AB - 12.15 AC \\ - 8.87 AD + 17.82 BC + 1.60 BD - 3.97 CD \quad (\text{Eq. 2})$$

Y_1 은 나노에멀전의 입자 크기, A는 계면활성제 함량, B는 오일 함량, C는 고압유화 압력, D는 고압유화 횟수를 의미한다. 분산분석 결과, 입자 크기에 가장 큰 영향을 미치는 요인은 고압유화 압력이었으며, 오일 함량, 고압유화 압력, 고압유화 횟수, 오일 함량과 고압유화 압력의 상호작용이 유의미한 영향을 미쳤다 ($p < 0.05$).

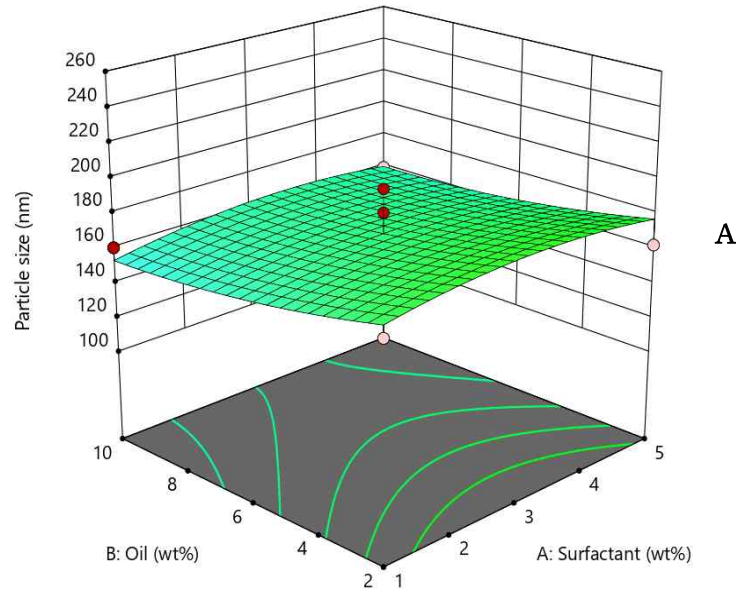
반응 값에 대한 4 가지 요인들의 효과를 시각화하기 위해 실험 수준 내에서 2 가지 요인을 중심점에 고정하고, 나머지 2 가지 요인을 변화시키면서 이차다항식 모델의 3D surface 및 등고선 그래프를 생성하였다(Figure 13-18).

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

Particle size (nm)
● Design points above predicted value
○ Design points below predicted value
116.3 245.7

X1 = A: Surfactant
X2 = B: Oil

Actual Factors
C: Pressure = 700
D: Cycling number = 3



Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

Particle size (nm)
● Design Points
116.3 245.7

X1 = A: Surfactant
X2 = B: Oil

Actual Factors
C: Pressure = 700
D: Cycling number = 3

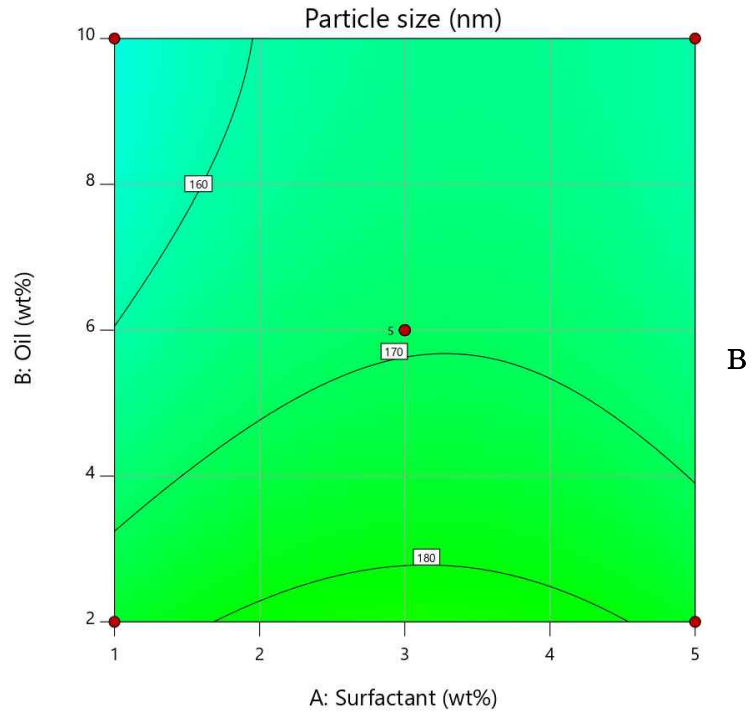


Figure 13. 3D surface model (A) and contour graph (B) for particle size of nanoemulsion depending on surfactant content and oil content.

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

Particle size (nm)

● Design points above predicted value

○ Design points below predicted value

116.3 245.7

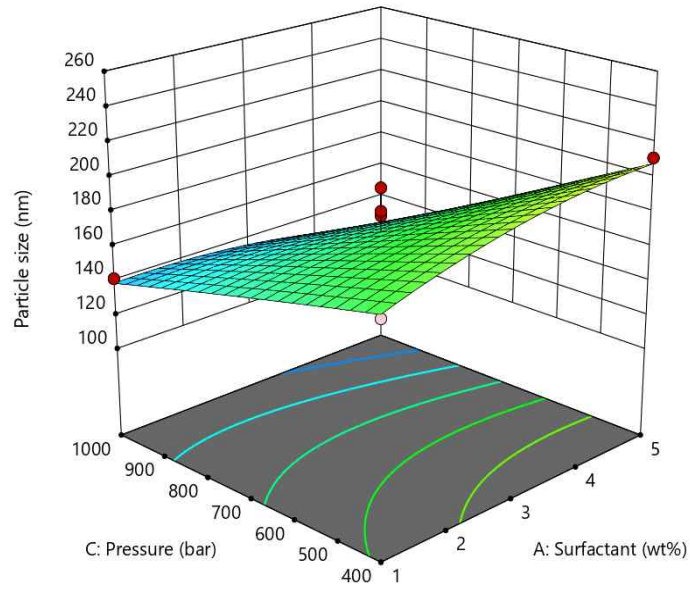
X1 = A: Surfactant

X2 = C: Pressure

Actual Factors

B: Oil = 6

D: Cycling number = 3



A

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

Particle size (nm)

● Design Points

116.3 245.7

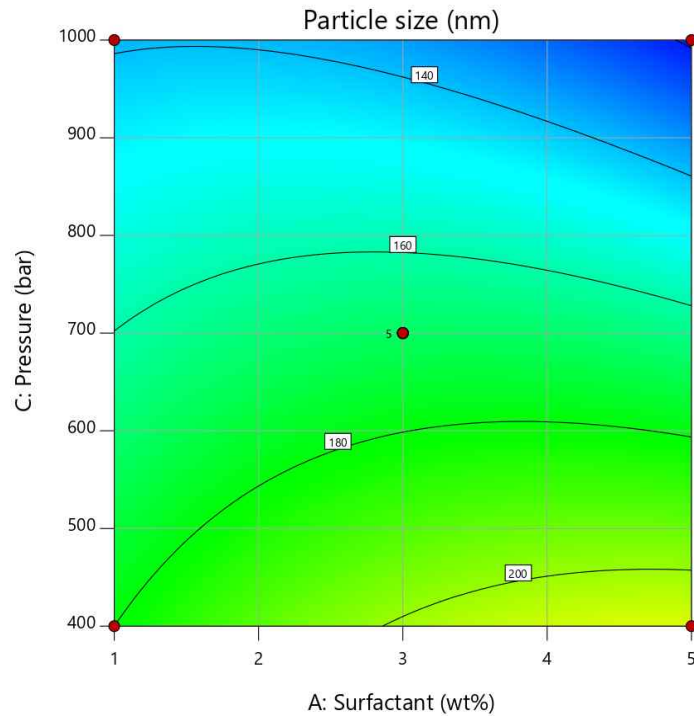
X1 = A: Surfactant

X2 = C: Pressure

Actual Factors

B: Oil = 6

D: Cycling number = 3



B

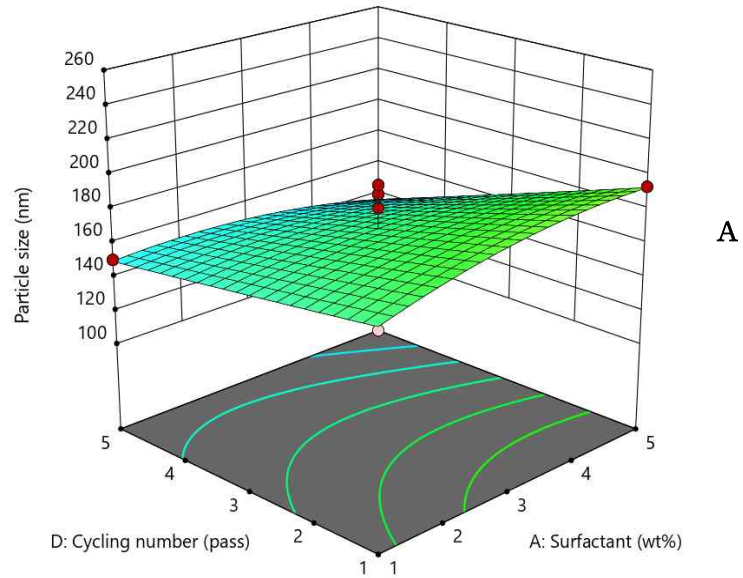
Figure 14. 3D surface model (A) and contour graph (B) for particle size of nanoemulsion depending on surfactant content and HPH pressure.

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

Particle size (nm)
● Design points above predicted value
○ Design points below predicted value
116.3 245.7

X1 = A: Surfactant
X2 = D: Cycling number

Actual Factors
B: Oil = 6
C: Pressure = 700



Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

Particle size (nm)
● Design Points
116.3 245.7

X1 = A: Surfactant
X2 = D: Cycling number

Actual Factors
B: Oil = 6
C: Pressure = 700

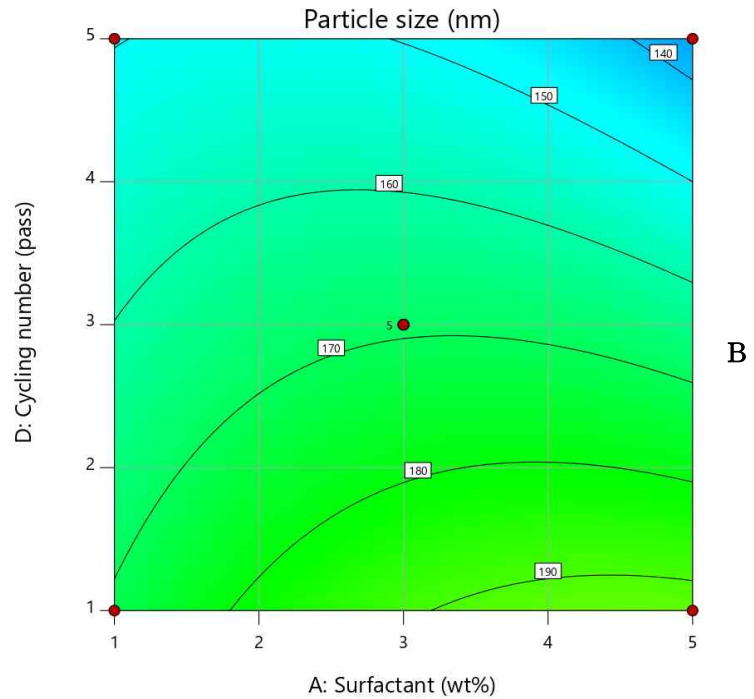


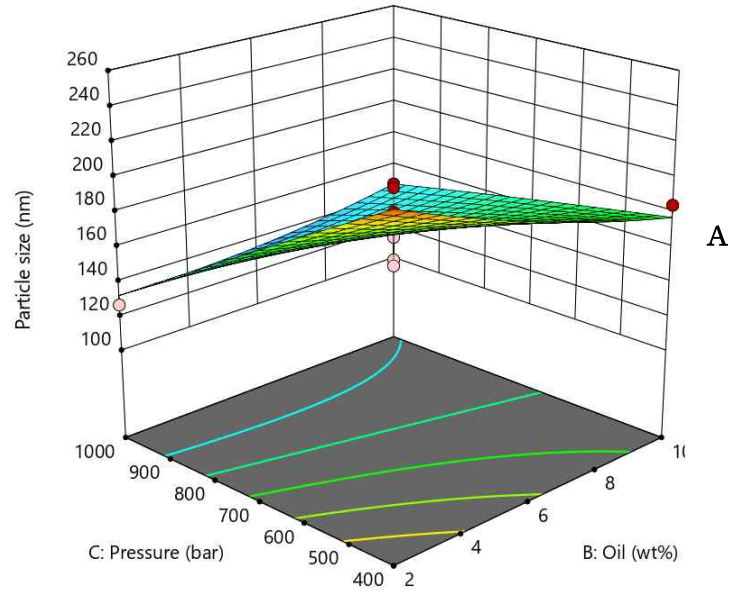
Figure 15. 3D surface model (A) and contour graph (B) of particle size for Glabridin nanoemulsion depending on surfactant content and HPH cycling number.

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

Particle size (nm)
● Design points above predicted value
○ Design points below predicted value
116.3 245.7

X1 = B: Oil
X2 = C: Pressure

Actual Factors
A: Surfactant = 3
D: Cycling number = 3



Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

Particle size (nm)
● Design Points
116.3 245.7

X1 = B: Oil
X2 = C: Pressure

Actual Factors
A: Surfactant = 3
D: Cycling number = 3

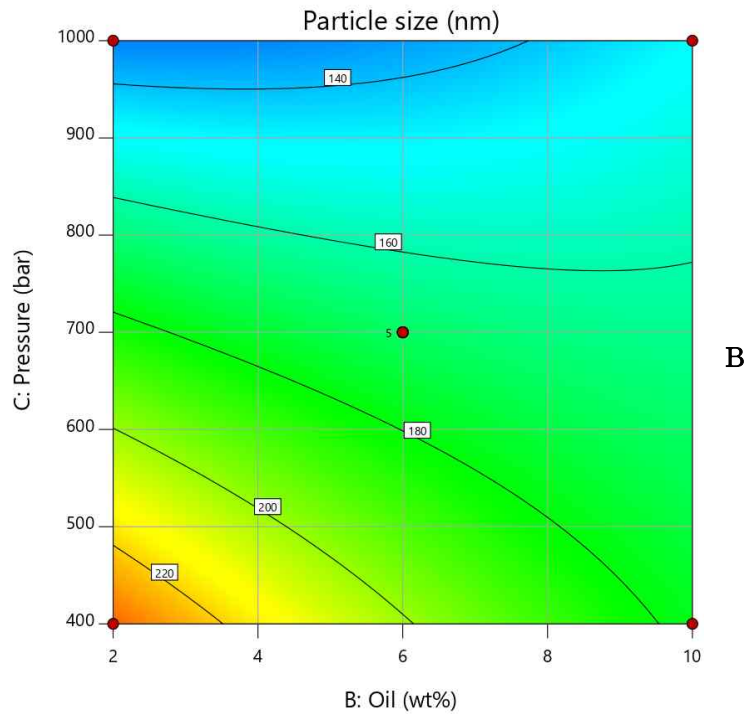


Figure 16. 3D surface model (A) and contour graph (B) for particle size of nanoemulsion depending on oil content and HPH pressure.

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

Particle size (nm)

● Design points above predicted value

○ Design points below predicted value

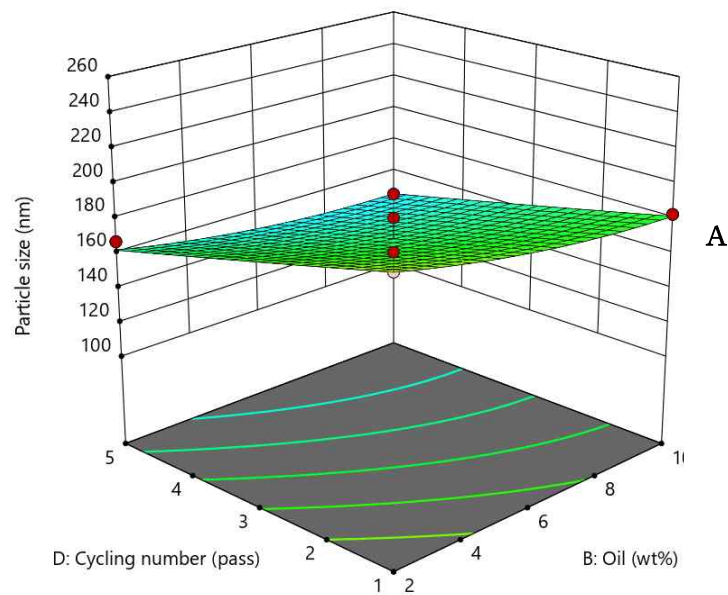
116.3  245.7

X1 = B: Oil
X2 = D: Cycling number

Actual Factors

A: Surfactant = 3

C: Pressure = 700



Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

Particle size (nm)

● Design Points

116.3  245.7

X1 = B: Oil
X2 = D: Cycling number

Actual Factors

A: Surfactant = 3

C: Pressure = 700

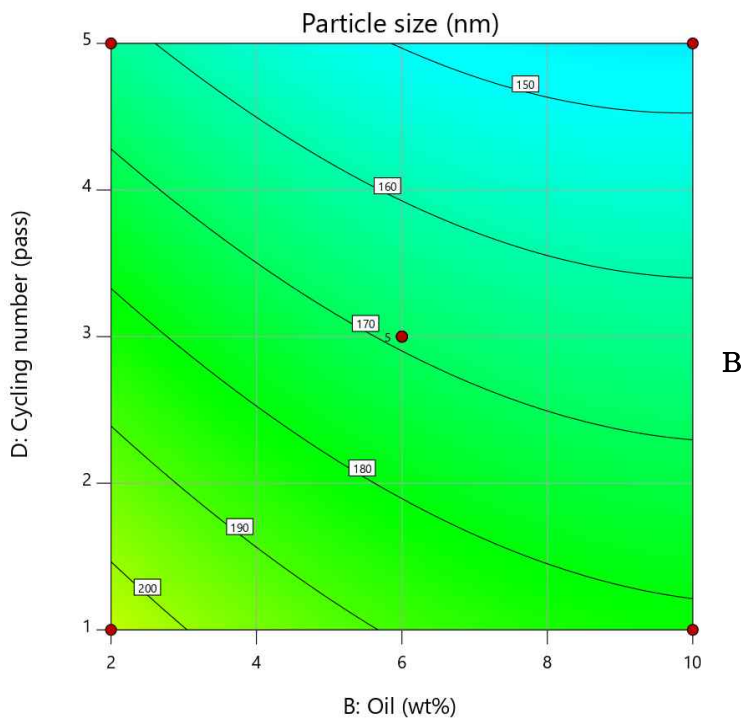


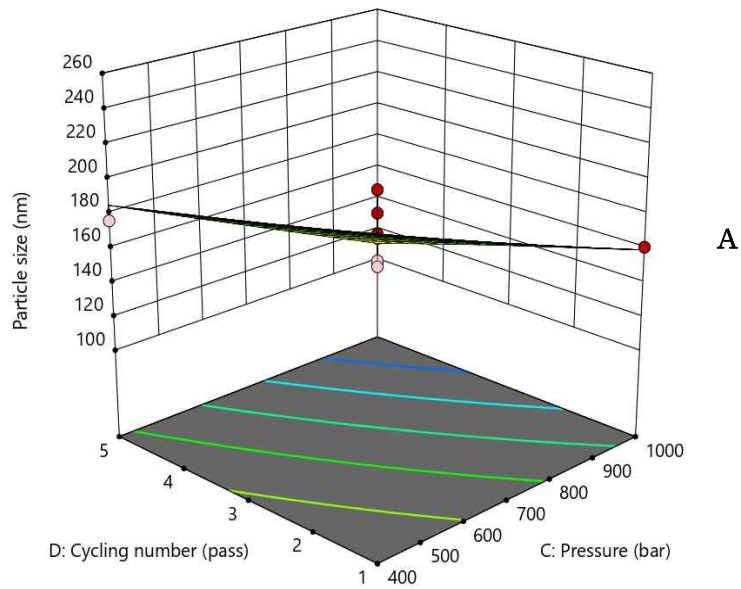
Figure 17. 3D surface model (A) and contour graph (B) for particle size of nanoemulsion depending on oil content and HPH cycling number.

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

Particle size (nm)
● Design points above predicted value
○ Design points below predicted value
116.3 245.7

X1 = C: Pressure
X2 = D: Cycling number

Actual Factors
A: Surfactant = 3
B: Oil = 6



Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

Particle size (nm)
● Design Points
116.3 245.7

X1 = C: Pressure
X2 = D: Cycling number

Actual Factors
A: Surfactant = 3
B: Oil = 6

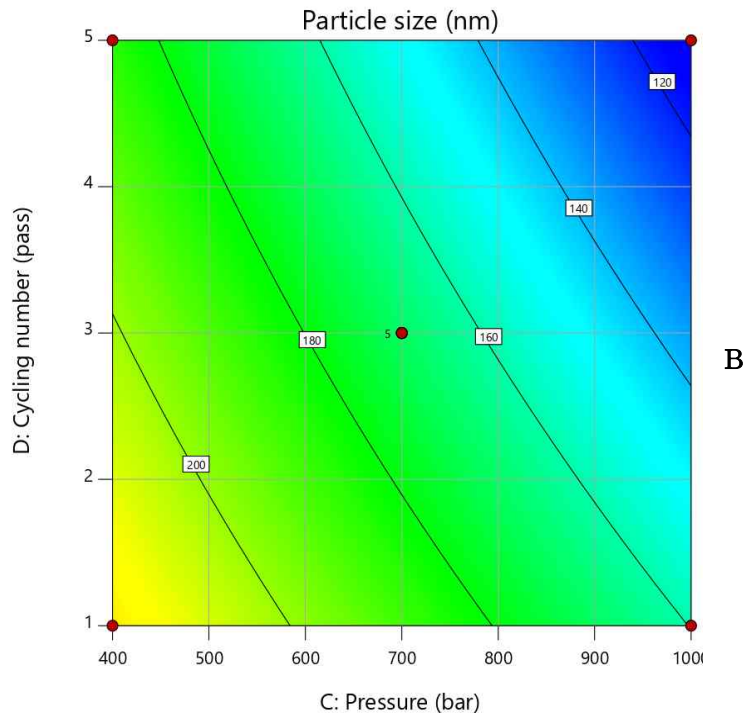


Figure 18. 3D surface model (A) and contour graph (B) for particle size of nanoemulsion depending on HPH pressure and HPH cycling number.

Figure 13은 고압유화 압력과 횡수를 700 bar, 3 pass로 고정하고 계면활성제와 오일의 함량을 변화시켰다. 계면활성제($p > 0.05$)와 오일($p < 0.05$)의 함량이 증가할수록 입자 크기가 증가하는 경향을 나타내었지만, 그 효과는 미미하였다.

Figure 14는 오일 함량을 6.0 wt%, 고압유화 횡수를 3 pass로 고정하고 계면활성제 함량과 고압유화 압력을 변화시켰다. 계면활성제 함량이 증가할수록 입자 크기가 증가하는 경향을 나타내었으나, 고압유화 압력이 증가할수록 입자 크기가 감소하는 경향을 나타내었다.

Figure 15는 오일 함량을 6.0 wt%, 고압유화 압력을 700 bar로 고정하고 계면활성제 함량과 고압유화 횡수를 변화시켰다. 계면활성제 함량이 증가할수록 입자 크기가 증가하는 경향을 나타내었으나 그 효과가 미미하였고($p > 0.05$), 고압유화 횡수가 증가할수록 입자 크기가 감소하는 경향을 나타내었다($p < 0.05$).

Figure 16은 계면활성제 함량을 3.0 wt%, 고압유화 횡수를 3 pass로 고정하고 오일 함량과 고압유화 압력을 변화시켰다. 오일 함량과 고압유화 압력이 증가할수록 입자 크기가 감소하는 경향을 나타내었다($p < 0.05$).

Figure 17은 계면활성제 함량을 3.0 wt%, 고압유화 압력을 700 bar로 고정하고 오일 함량과 고압유화 횡수를 변화시켰다. 오일 함량과 고압유화 횡수가 증가할수록 입자 크기가 감소하는 경향을 나타내었다($p < 0.05$).

Figure 18은 계면활성제 함량을 3.0 wt%, 오일 함량을 6.0 wt%로 고정하고 고압유화 압력과 횡수를 변화시켰다. 고압유화 압력과 횡수가 증가할수록 입자 크기가 급격히 감소하는 경향을 나타내었으며($p < 0.05$), 그래프가 거의 선형에 가깝게 나타났다.

3.3.2. 피부 흡수율(Y_2)에 미치는 영향

계면활성제 함량, 오일 함량, 고압유화 압력, 고압유화 횟수가 나노에멀전의 피부 흡수율에 미치는 영향을 확인하였다. 이차다항식 모델이 예측에 적합하였으며, 모형의 p -value (< 0.05)와 F -value는 이차다항식 모델이 유의성을 갖는다는 것을 보여준다(Table 11).

Table 11. ANOVA for Quadratic Model of Skin Absorption Rate

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F -value	p -value	
Model	808.22	14	57.73	2.70	0.0366	Significant
A-Surfactant	285.09	1	285.09	13.34	0.0026	
B-Oil	88.62	1	88.62	4.15	0.0611	
C-Pressure	0.8856	1	0.8856	0.0415	0.8416	
D-Cycling number	27.85	1	27.85	1.30	0.2727	
AB	22.18	1	22.18	1.04	0.3255	
AC	6.71	1	6.71	0.3140	0.5841	
AD	11.80	1	11.80	0.5523	0.4697	
BC	107.74	1	107.74	5.04	0.0414	
BD	5.98	1	5.98	0.2798	0.6051	
CD	0.3364	1	0.3364	0.0157	0.9019	
A^2	13.87	1	13.87	0.6491	0.4339	
B^2	76.44	1	76.44	3.58	0.0794	
C^2	51.89	1	51.89	2.43	0.1414	
D^2	65.56	1	65.56	3.07	0.1017	
Residual	299.09	14	21.36			Not significant
Lack of Fit	116.79	10	11.68	0.2563	0.9633	
Pure Error	182.30	4	45.58			
Cor Total	1107.31	28				

Glabridin 나노에멀전의 피부흡수율에 대해 제안된 수학적 모델 방정식은 Eq. 3과 같다.

$$\begin{aligned}
 Y_2 = & + 40.55 - 4.87 A - 2.72 B - 0.2717 C - 1.52 D + 1.46 A^2 \\
 & - 3.43 B^2 + 2.83 C^2 - 3.18 D^2 - 2.35 AB + 1.29 AC + 1.72 AD \\
 & - 5.19 BC - 1.22 BD + 0.29 CD \qquad \qquad \qquad \text{(Eq. 3)}
 \end{aligned}$$

Y_2 는 나노에멀전의 피부 흡수율, A는 계면활성제 함량, B는 오일 함량, C는 고압유화 압력, D는 고압유화 횟수를 의미한다. 분산분석 결과, 피부흡수율에 가장 큰 영향을 미치는 요인은 오일 함량과 고압유화 압력의 상호작용이었으며, 계면활성제 함량, 오일 함량과 고압유화 압력의 상호작용, 오일 함량의 이차항이 유의미한 영향($p < 0.05$)을 미쳤다.

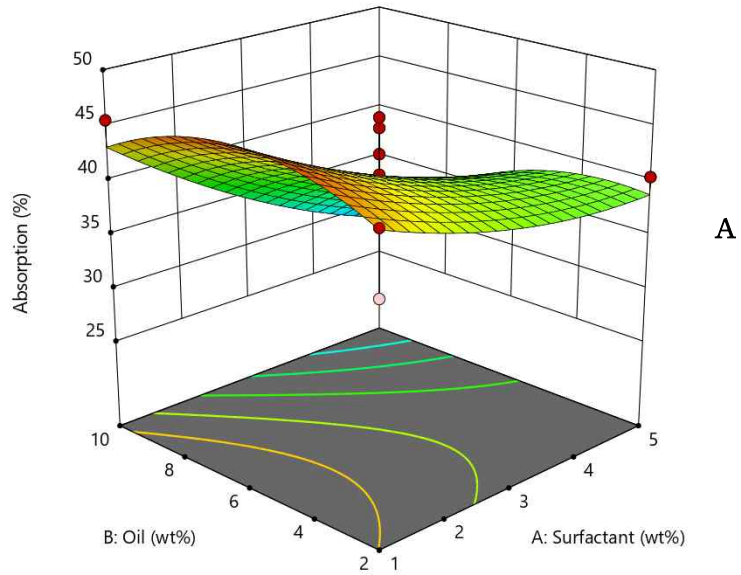
반응 값에 대한 4 가지 요인들의 효과를 시각화하기 위해 실험 수준 내에서 2 가지 요인을 중심점에 고정하고, 나머지 2 가지 요인을 변화시키면서 이차다항식 모델의 3D surface 및 등고선 그래프를 생성하였다(Figure 19-24).

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

Absorption (%)
 ● Design points above predicted value
 ○ Design points below predicted value
 25.12 48.46

X1 = A: Surfactant
X2 = B: Oil

Actual Factors
C: Pressure = 700
D: Cycling number = 3



Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

Absorption (%)
 ● Design Points
 25.12 48.46

X1 = A: Surfactant
X2 = B: Oil

Actual Factors
C: Pressure = 700
D: Cycling number = 3

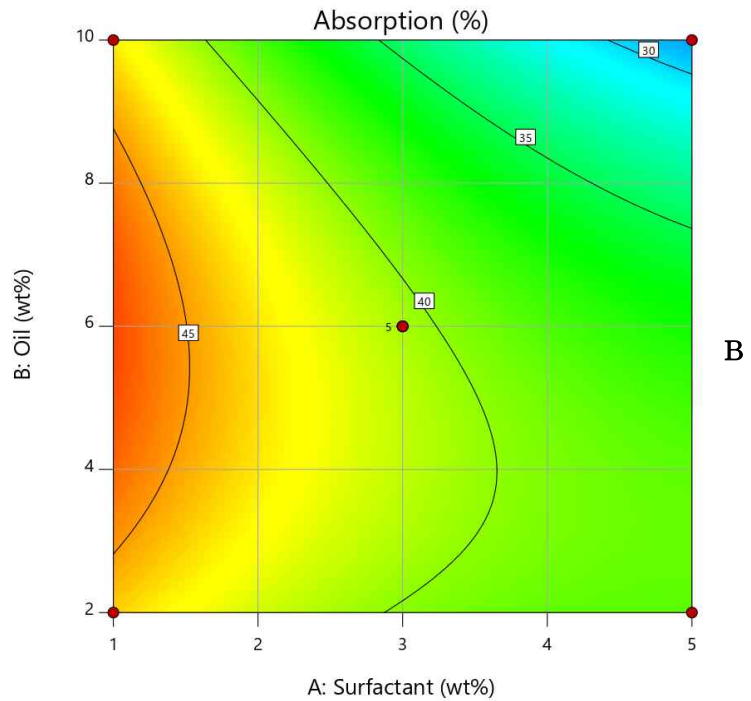


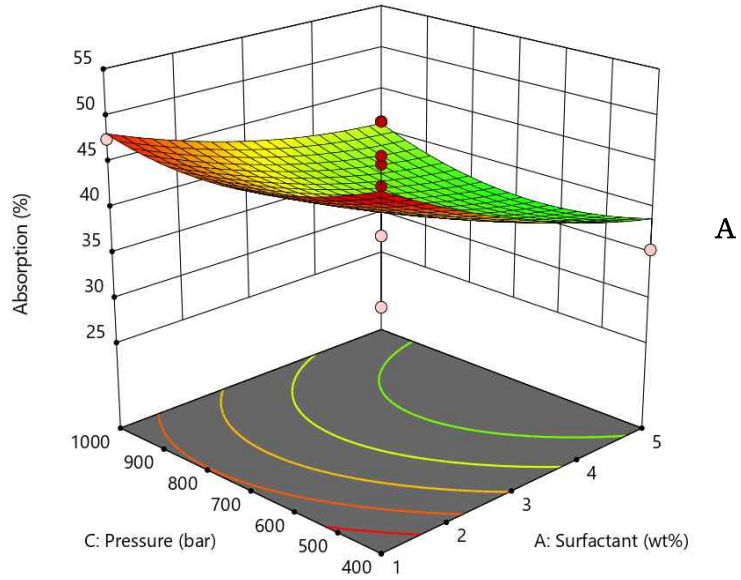
Figure 19. 3D surface model (A) and contour graph (B) for skin absorption rate of nanoemulsion depending on surfactant content and oil content.

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

Absorption (%)
● Design points above predicted value
○ Design points below predicted value
25.12 48.46

X1 = A: Surfactant
X2 = C: Pressure

Actual Factors
B: Oil = 6
D: Cycling number = 3



Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

Absorption (%)
● Design Points
25.12 48.46

X1 = A: Surfactant
X2 = C: Pressure

Actual Factors
B: Oil = 6
D: Cycling number = 3

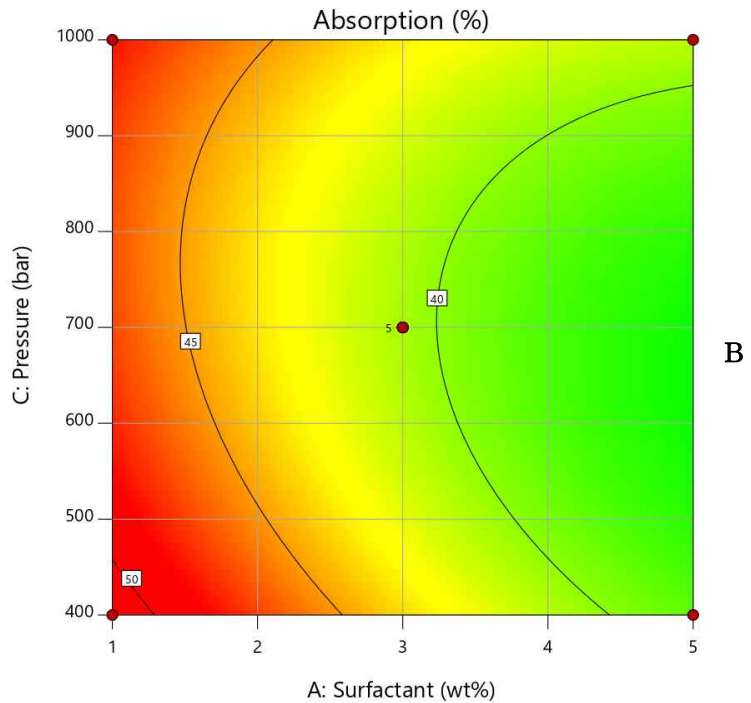


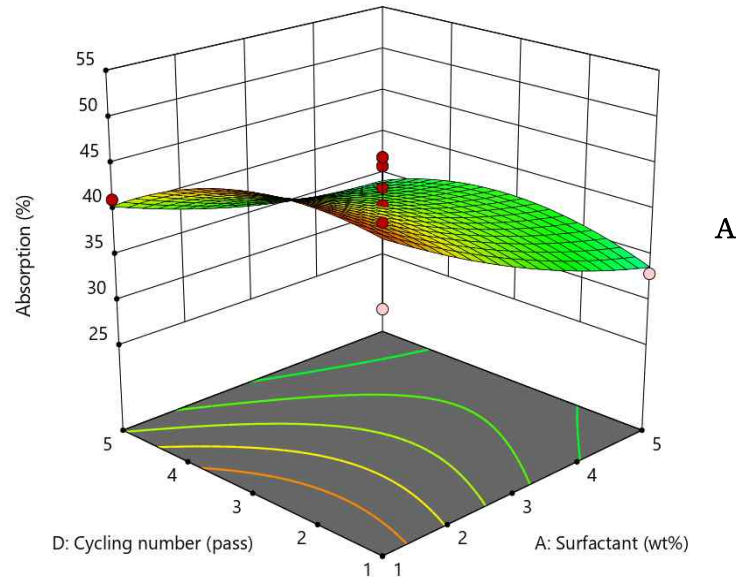
Figure 20. 3D surface model (A) and contour graph (B) for skin absorption rate of nanoemulsion depending on surfactant content and HPH pressure.

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

Absorption (%)
● Design points above predicted value
○ Design points below predicted value
25.12 48.46

X1 = A: Surfactant
X2 = D: Cycling number

Actual Factors
B: Oil = 6
C: Pressure = 700



Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

Absorption (%)
● Design Points
25.12 48.46

X1 = A: Surfactant
X2 = D: Cycling number

Actual Factors
B: Oil = 6
C: Pressure = 700

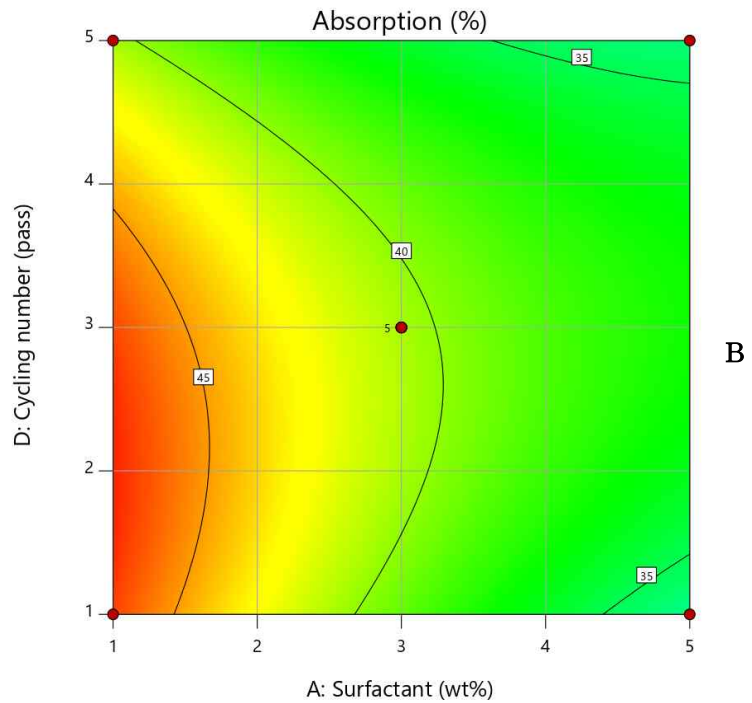


Figure 21. 3D surface model (A) and contour graph (B) for skin absorption rate of nanoemulsion depending on surfactant content and HPH cycling number.

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

Absorption (%)

● Design points above predicted value

○ Design points below predicted value

25.12 48.46

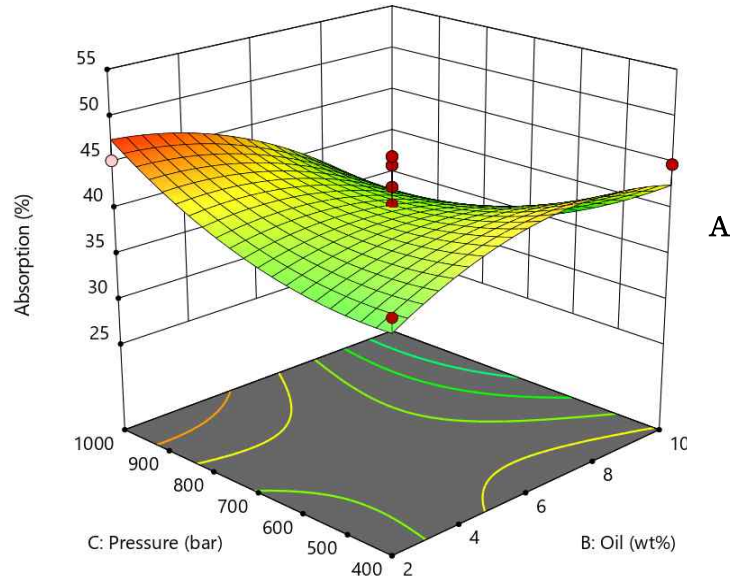
X1 = B: Oil

X2 = C: Pressure

Actual Factors

A: Surfactant = 3

D: Cycling number = 3



Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

Absorption (%)

● Design Points

25.12 48.46

X1 = B: Oil

X2 = C: Pressure

Actual Factors

A: Surfactant = 3

D: Cycling number = 3

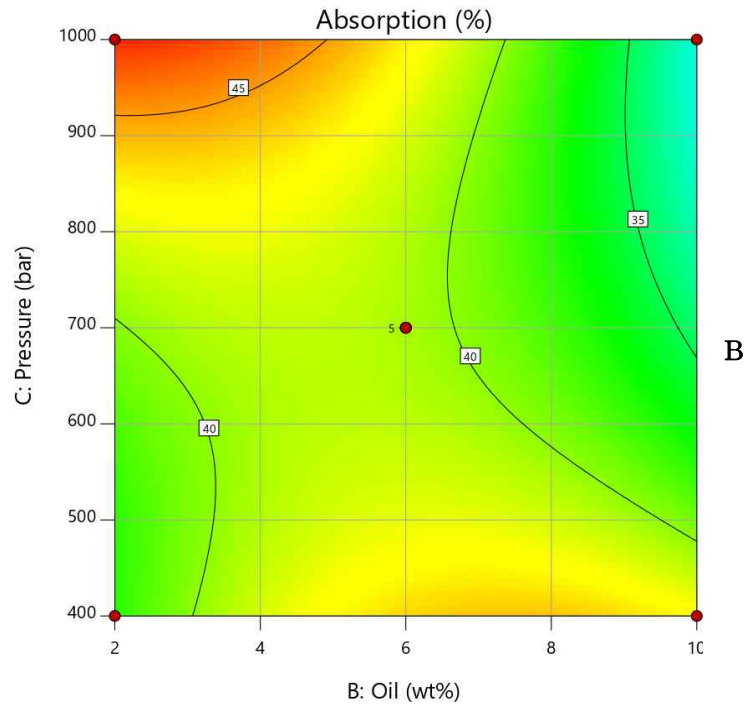


Figure 22. 3D surface model (A) and contour graph (B) for skin absorption rate of nanoemulsion depending on oil content and HPH pressure.

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

Absorption (%)

● Design points above predicted value

○ Design points below predicted value

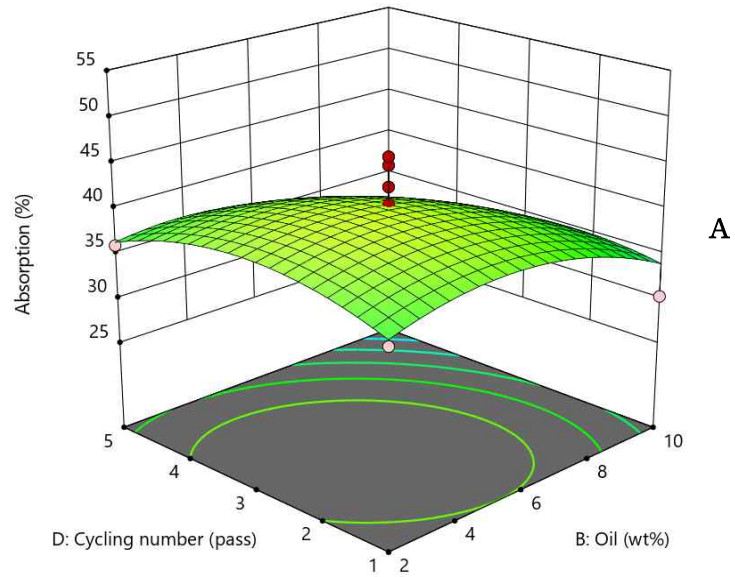
25.12 48.46

X1 = B: Oil
X2 = D: Cycling number

Actual Factors

A: Surfactant = 3

C: Pressure = 700



Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

Absorption (%)

● Design Points

25.12 48.46

X1 = B: Oil
X2 = D: Cycling number

Actual Factors

A: Surfactant = 3

C: Pressure = 700

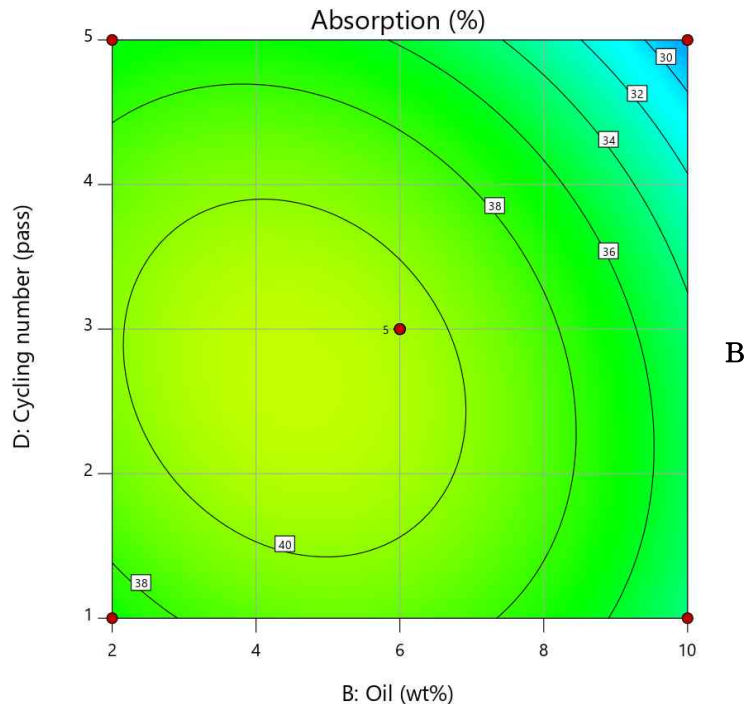


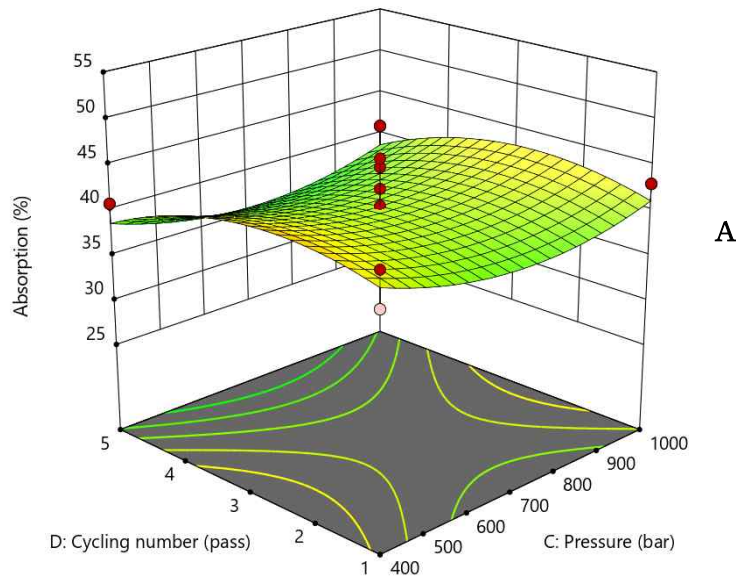
Figure 23. 3D surface model (A) and contour graph (B) for skin absorption rate of nanoemulsion depending on oil content and HPH cycling number.

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

Absorption (%)
● Design points above predicted value
○ Design points below predicted value
25.12 48.46

X1 = C: Pressure
X2 = D: Cycling number

Actual Factors
A: Surfactant = 3
B: Oil = 6



Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

Absorption (%)
● Design Points
25.12 48.46

X1 = C: Pressure
X2 = D: Cycling number

Actual Factors
A: Surfactant = 3
B: Oil = 6

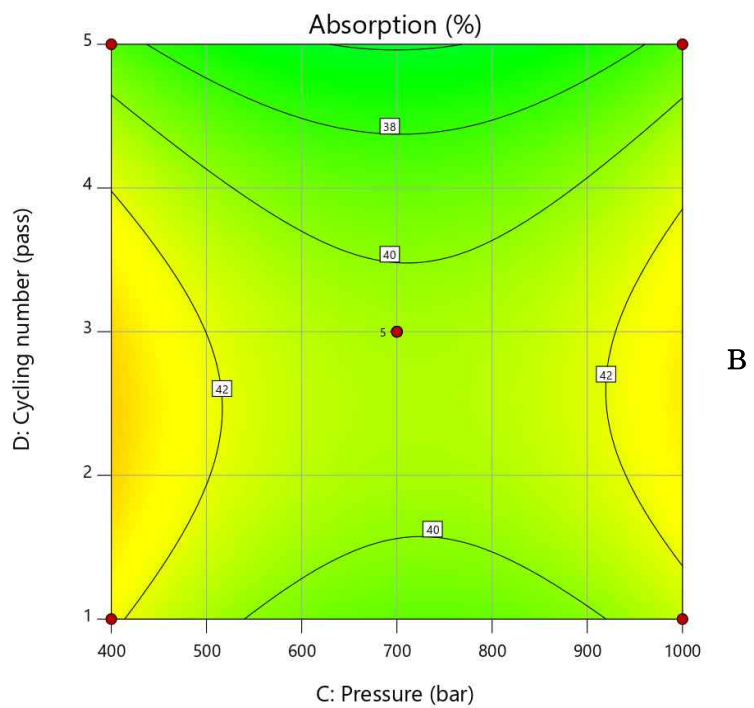


Figure 24. 3D surface model (A) and contour graph (B) for skin absorption rate of nanoemulsion depending on HPH pressure and HPH cycling number.

Figure 19는 고압유화 압력과 횡수를 700 bar, 3 pass로 고정하고 계면활성제와 오일의 함량을 변화시켰다. 계면활성제와 오일의 함량이 증가할수록 피부흡수율이 감소하는 경향을 나타내었다.

Figure 20은 오일 함량을 6.0 wt%, 고압유화 횡수를 3 pass로 고정하고 계면활성제 함량과 고압유화 압력을 변화시켰다. 계면활성제 함량이 증가할수록 피부흡수율이 감소하는 경향을 나타내었고($p < 0.05$), 고압유화 압력이 증가할수록 피부흡수율이 감소하는 경향을 나타내었지만, 그 효과는 미미하였다($p > 0.05$).

Figure 21은 오일 함량을 6.0 wt%, 고압유화 압력을 700 bar로 고정하고 계면활성제 함량과 고압유화 횡수를 변화시켰다. 계면활성제 함량이 증가할수록 피부흡수율이 감소하는 경향을 나타내었고($p < 0.05$), 고압유화 횡수가 증가할수록 피부흡수율이 감소하는 경향을 나타내었지만, 그 효과는 미미하였다($p > 0.05$).

Figure 22는 계면활성제 함량을 3.0 wt%, 고압유화 횡수를 3 pass로 고정하고 오일 함량과 고압유화 압력을 변화시켰다. 오일 함량이 증가할수록 피부흡수율이 감소하는 경향을 나타내었지만, 고압유화 압력이 증가할수록 피부흡수율이 증가하는 경향을 나타내었다.

Figure 23은 계면활성제 함량을 3.0 wt%, 고압유화 압력을 700 bar로 고정하고 오일 함량과 고압유화 횡수를 변화시켰다. 오일 함량과 고압유화 횡수가 증가할수록 피부흡수율이 감소하는 경향을 나타내었다.

Figure 24는 계면활성제 함량을 3.0 wt%, 오일 함량을 6.0 wt%로 고정하고 고압유화 압력과 횡수를 변화시켰다. 고압유화 압력은 피부흡수율에 크게 영향을 미치지 않았으나($p > 0.05$), 고압유화 횡수가 증가할수록 피부흡수율이 감소하는 경향을 나타내었지만, 그 효과는 미미하였다($p > 0.05$).

3.4. Glabridin 함유 나노에멀전 최적화

3.4.1. 최적의 Glabridin 함유 나노에멀전 제조

Box-behnken design 결과를 바탕으로 최소 입자 크기, 최대 피부 흡수율을 목표로 하여 제형 최적화를 수행하였다. 계면활성제 함량 5.0 wt%, 오일 함량 2.0 wt%, 고압유화 압력 1,000 bar, 고압유화 횟수 4 pass를 최적 조건으로 도출하였다(Table 12). 최적화된 조건을 바탕으로 glabridin 나노에멀전을 3 회 반복 제조 후 입자 크기 및 피부 흡수율을 측정하였다. 이때 예측값은 입자 크기 105.6 nm, 피부 흡수율은 48.05% 이었으며, 측정 결과 실험값은 예측값의 95% 신뢰수준 내에 들어오는 것을 확인하였다(Table 13).

Table 12. Optimized Glabridin Nanoemulsion Conditions

Independent variables	Optimum conditions
A-Surfactant (wt%)	5.0
B-Oil (wt%)	2.0
C-Pressure (bar)	1,000
D-Cycling number (pass)	3.5
Dependent variables	Predicted value
Y ₁ -Particle size (nm)	105.6
Y ₂ -Skin absorption rate (%)	48.05

Table 13. Verification of Optimized Glabridin Nanoemulsion

Solution of response	Predicted mean	Std dev	N	SE pred	95% CI low for mean	95% CI high for mean	Data Mean
Particle size (nm)	105.6	13.6	3	15.4	72.5	138.6	111.6
Skin absorption rate (%)	48.05	4.62	3	5.25	36.80	59.30	40.27

Standard deviation (Std dev), Standard Error predicted (SE pred), Confidence Interval (CI)

3.4.2. 최적의 Glabridin 함유 나노에멀전과 에멀전의 안정성 평가

최적 조건으로 제조한 나노에멀전과 대조군으로 사용한 에멀전의 안정성을 평가하기 위해 가속시험을 진행하였다. 45 °C에 보관하면서 1, 7, 14, 21 d 동안 성상, 입자 크기, PDI 및 ZP를 측정하였으며 제조 후 1 d 결과는 다음과 같다 (Table 14).

색상은 옅은 노란색에서 점점 짙은 노란색으로 변하는 것을 확인할 수 있다 (Figure 25). 또한 나노에멀전 색상이 에멀전보다 좀 더 진해 보이는 것은 나노에멀전 입자 크기에 의한 투명감으로 인해 변색 정도가 심한 것으로 보이기 때문이다. 입자 크기는 1 d 후 나노에멀전은 111.6 ± 0.2 nm, 에멀전은 529.6 ± 11.9 nm로 측정되었다. 나노에멀전의 경우 시간이 지남에 따라 Ostwald ripening 현상으로 인한 입자 크기가 증가하는 방향으로의 변화가 예상되었지만 [48], 오히려 입자 크기가 감소하는 것처럼 측정되었다. 변화 값은 13% 이내로 입자가 안정함을 알 수 있었고, 좀 더 장기간의 관찰을 통해 Ostwald ripening rate를 문헌과 비교하면 좋을 것으로 사료된다. 에멀전의 경우 오일 함량 대비 계면활성제 함량이 다소 많은 처방으로 유화 입자가 나노 입자 수준에서 측정되었다. 1 d와 7 d 후의 입자 크기 변동은 희석에 의한 측정 방법에서 오는 오차로, 이는 7 d 후에만 에멀전의 PDI가 감소한 결과와 같은 이유로 보인다.

PDI는 콜로이드 분산 안정성에 대한 척도이며 0.3 미만이면 입자들이 균일하게 분포되어 있음을 나타낸다[49]. PDI는 1 d 후 나노에멀전은 0.247 ± 0.014 , 에멀전은 0.723 ± 0.032 로 측정되었다. 가속시험 후 나노에멀전은 큰 변화 없이 0.3 미만의 값으로 입자가 균일한 상태를 유지하였음을 확인할 수 있다.

ZP는 콜로이드 현탁액 또는 에멀전의 안정성을 확인하는 데 사용할 수 있는 입자 표면 전하의 중요한 지표이다[50]. ZP 값은 분산된 입자의 유착에 대한 고에너지 장벽의 생성을 보장하기 위해 ± 30 mV 이상이어야 한다[51]. ZP는 1 d 후 나노에멀전은 -56.7 ± 1.2 mV, 에멀전은 -75.9 ± 0.5 mV로 측정되었으며, 가속시험 후에도 나노에멀전과 에멀전 모두 ± 30.0 mV 이상으로 안정한 상태를 유지하였다(Figure 26).

Table 14. Appearance, Particle Size, Polydispersity Index, Zeta Potential Data of Optimized Nanoemulsion and Emulsion after 1 d at 45 °C (mean \pm SD, N = 3)

	Appearance	Particle size (nm)	PDI	ZP (mV)
Nanoemulsion	pale yellow	111.6 ± 0.2	0.247 ± 0.014	-56.7 ± 1.2
Emulsion	opaque pale yellow	529.6 ± 11.9	0.723 ± 0.032	-75.9 ± 0.5

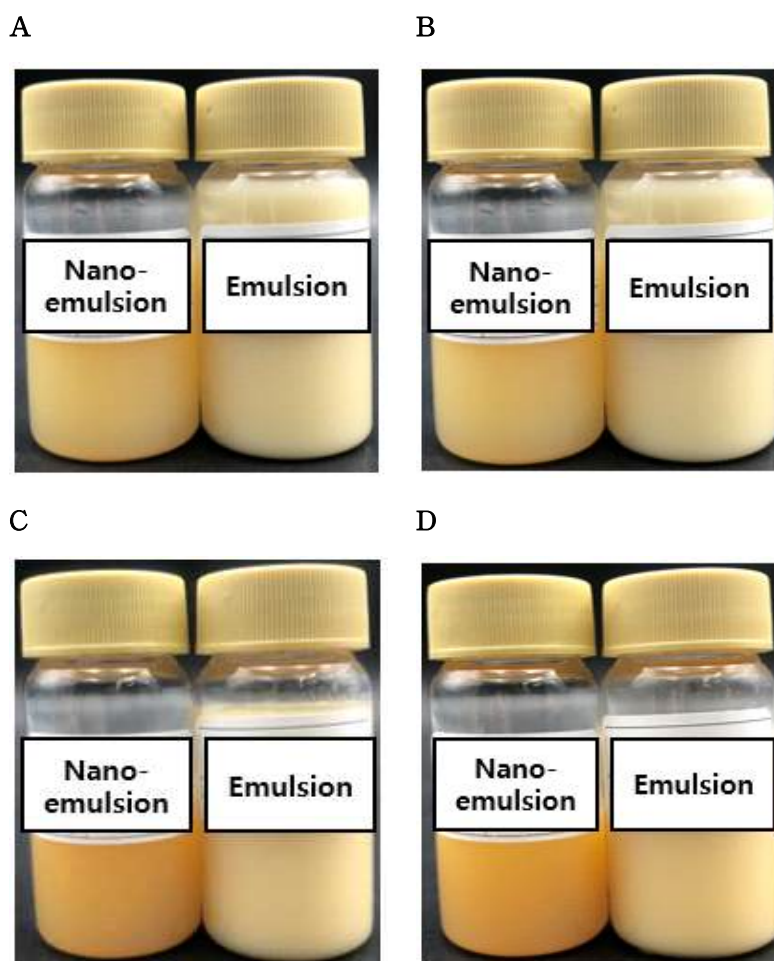


Figure 25. Appearance of optimized nanoemulsion and emulsion at 25 °C after A: 1 d, B: 1 week, C: 2 week, D: 3 week.

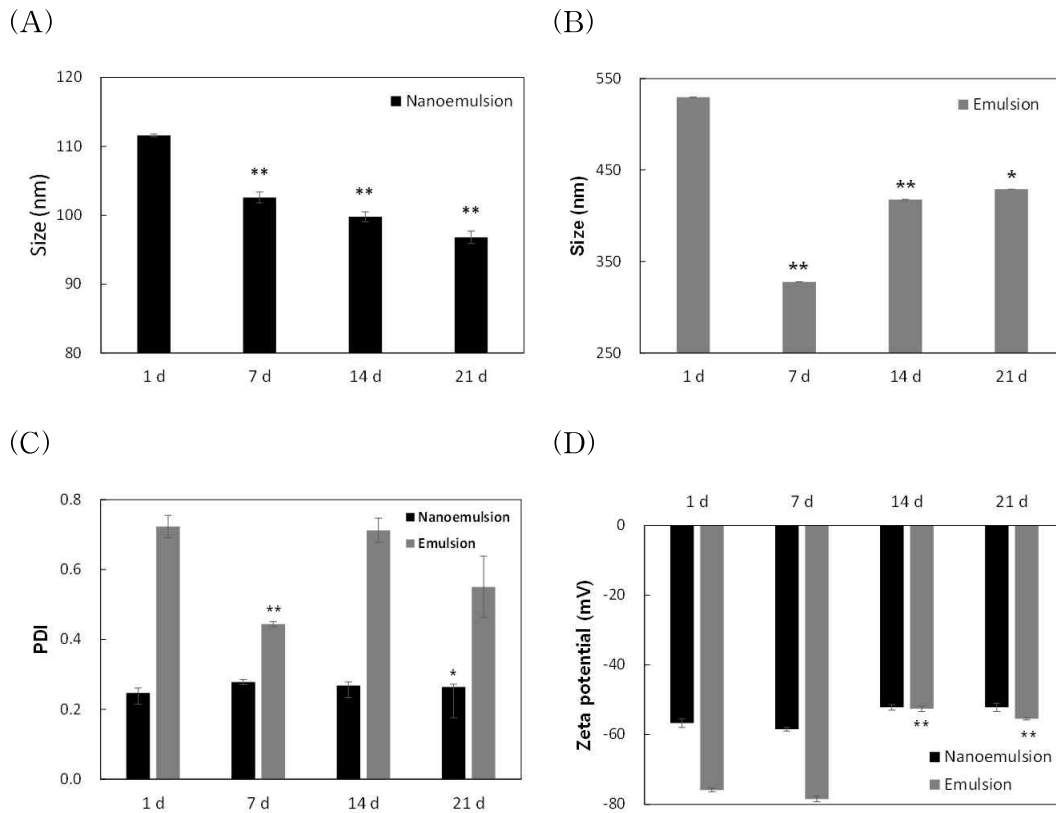


Figure 26. Accelerated test data at 45 °C for 21 d of optimized nanoemulsion and emulsion (A): particle size of nanoemulsion, (B): particle size of emulsion, (C): PDI, (D): ZP (N = 3, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

3.5. Glabridin 함량 분석

OSLE 내 glabridin의 함량을 분석하기 위해 HPLC를 이용하여 정량분석하였다. Glabridin 농도에 따른 calibration curve를 얻었고, OSLE 내 glabridin의 함량이 약 47.1%로 분석되었다. OSLE 내 glabridin의 retention time은 17.253 min이며, standard로써 glabridin의 retention time은 17.247 min으로 유사하게 나타났다(Figure 27, 28).

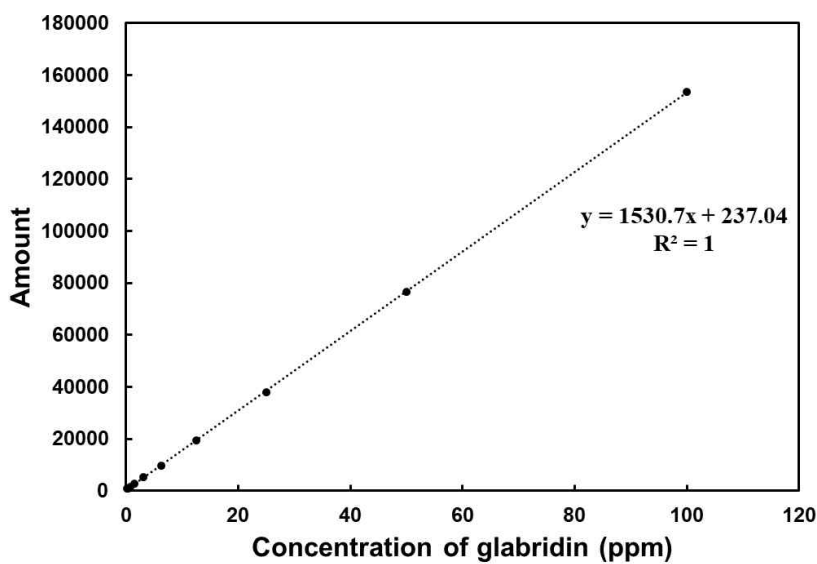


Figure 27. Glabridin calibration curve using HPLC system.

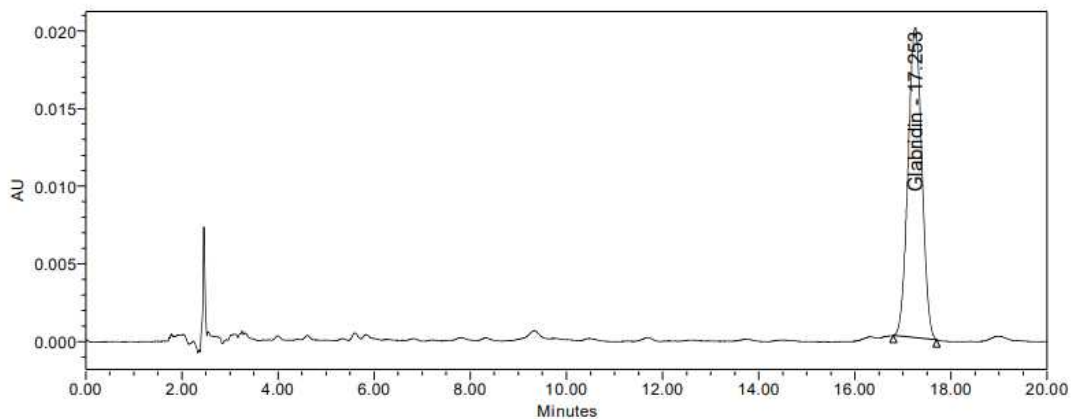


Figure 28. HPLC chromatogram of glabridin.

3.6. Franz Diffusion Cell을 이용한 최적의 Glabridin 함유 나노에멀전의 *In-Vitro* 피부 흡수 시험

나노에멀전과 에멀전의 24 h 동안 피부 흡수율을 비교하기 위해 Franz diffusion cell을 사용하여 37 ± 1 °C에서 1, 2, 4, 8, 12, 24 h 간격으로 실험을 진행하였다.

Glabridin 함유 나노에멀전과 에멀전의 시간별 누적 피부 흡수율을 Table 15에 나타내었다. 나노에멀전과 에멀전 모두 24 h까지 흡수율이 점점 증가하는 경향을 나타내었다(Figure 29). 24 h 후 나노에멀전의 누적 흡수율은 $79.53 \pm 0.23\%$, 에멀전의 누적 흡수율은 $66.54 \pm 1.45\%$ 로 나노에멀전이 에멀전보다 13% 높은 누적 흡수율을 보였다. 이를 통해 나노 크기의 입자가 피부흡수를 향상할 수 있으며, 에멀전은 나노에멀전보다 상대적으로 큰 입자 크기를 갖기 때문에 membrane을 통과하기가 어려워 투과 시간이 느리고 잔류하는 양이 많은 것을 알 수 있었다.

Table 15. Skin Absorption Rate for 24 h of Glabridin Nanoemulsion and Emulsion (mean \pm SD, N = 3, $p < 0.01$, unit: %)

Time (h)	Skin absorption rate (%)	
	Nanoemulsion	Emulsion
1	2.07 \pm 0.04	1.14 \pm 0.00
2	6.67 \pm 0.21	4.25 \pm 0.10
4	17.86 \pm 0.26	12.31 \pm 0.14
8	37.67 \pm 0.33	27.08 \pm 0.14
12	52.22 \pm 0.12	41.04 \pm 1.02
24	79.53 \pm 0.23	66.54 \pm 1.45
Membrane	2.60 \pm 0.02	3.85 \pm 0.12
Donor	10.75 \pm 0.16	23.09 \pm 0.87
Sample	100.00 \pm 0.83	100.00 \pm 2.35

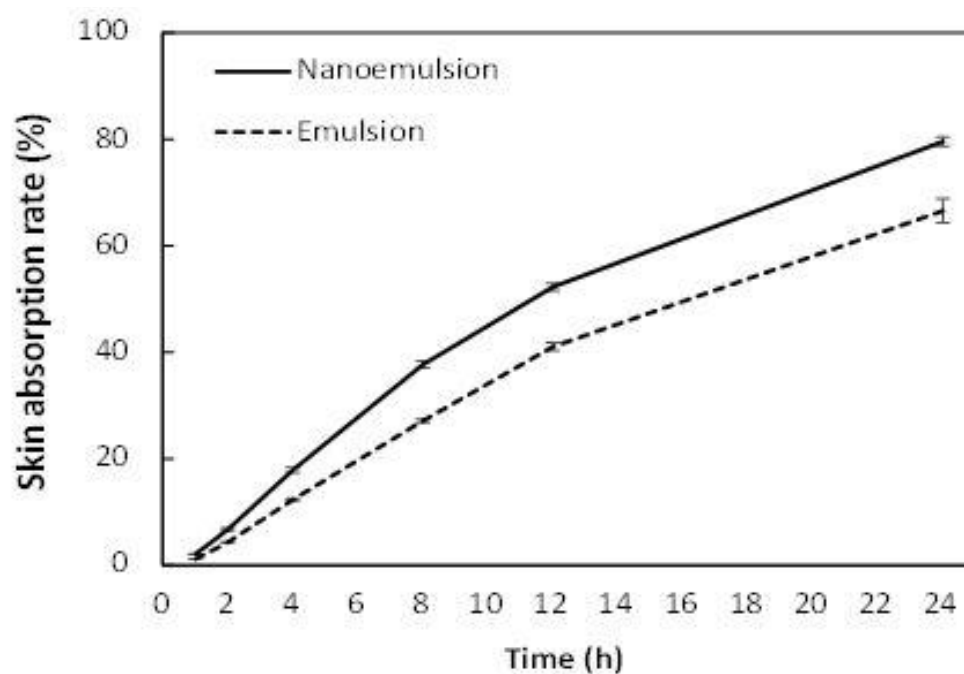


Figure 29. Skin absorption rate for 24 h of glabridin nanoemulsion and emulsion (mean \pm SD, N = 3, $p < 0.01$).

IV. 요약 및 결론

본 연구에서는 미백 고시원료인 유용성감초추출물의 주성분인 glabridin의 피부 흡수 향상을 위해 RSM을 활용하여 나노에멀전 제형을 최적화하였다. 나노에멀전은 HPH 방법으로 제조하였으며, 최종적으로 최적화한 나노에멀전의 피부 흡수율을 평가하였다.

RSM 인자 설정을 위해 나노에멀전 제조 시 영향을 주는 계면활성제 함량(1.0 ~ 5.0 wt%), 콜레스테롤 함량(0.1 ~ 0.5 wt%), 오일 함량(2.0 ~ 10.0 wt%), 폴리올 함량(2.0 ~ 18.0 wt%), 고압유화 압력(400 ~ 1,000 bar), 고압유화 횟수(1 ~ 5 pass)를 달리하여 나노에멀전을 제조하였다. 그 중 입자 크기에 가장 큰 영향을 미치는 인자인 계면활성제 함량, 오일 함량, 고압유화 압력, 고압유화 횟수를 독립변수로 하였고, 나노에멀전의 입자 크기와 피부 흡수율을 반응변수로 하여 BBD를 수행하였다. 제조된 나노에멀전의 입자 크기는 전체적으로 116.3 ~ 245.7 nm, 피부 흡수율은 25.12 ~ 48.46% 범위로 측정되었다.

BBD 결과를 바탕으로 최소 입자 크기, 최대 피부 흡수율을 갖는 제형을 최적화하였으며, 계면활성제 함량 5.0 wt%, 오일 함량 2.0 wt%, 고압유화 압력 1,000 bar, 고압유화 횟수 4 pass를 최적 조건으로 도출하였다.

최적화된 나노에멀전은 입자 크기 105.6 nm, 피부 흡수율 48.05%로 예측되었다. 최적 조건에 따라 제조된 나노에멀전은 입자 크기 111.6 nm, 피부 흡수율 40.27%로 측정되어 예측값의 95% 신뢰수준 내에 들어오는 것을 확인하였다. 최적 조건으로 제조한 나노에멀전의 입자 크기는 111.6 ± 0.2 nm, PDI는 0.247 ± 0.014 , ZP는 -56.7 ± 1.2 mV로 측정되었다. 제형 안정성 확인을 위해 가속 시험을 진행한 결과, 입자 크기는 시간이 지남에 따라 Ostwald ripening 현상으로 인한 입자 크기의 변화가 예상되었지만, 그 변화 값은 13% 이내로 큰 변화를 보이지는 않았다. PDI는 0.247 ~ 0.278 범위로 입자가 균일한 상태를 유지하였고, ZP는 $-58.5 \sim -52.2$ mV 범위로서 정전기적으로 안정한 상태를 유지하였다.

24 h 후 나노에멀전의 누적 흡수율은 $79.53 \pm 0.23\%$, 에멀전의 누적 흡수율은 $66.54 \pm 1.45\%$ 로 나노에멀전이 에멀전보다 13% 높은 누적 흡수율을 보였다.

다. 따라서 지용성 성분인 glabridin을 나노에멀전 제형에 적용함으로써 좀 더 효과적으로 피부에 전달할 수 있으며, 실험계획법을 통해 제형 최적화로 피부 흡수율 향상을 기대할 수 있다. 하지만 최적 조건에서 고압 유회 횟수를 제외한 나머지 요인들이 실험 수준의 중간값이 아닌 최댓값 또는 최솟값을 갖기 때문에, 제형 최적화 도출에 다소 한계점이 있었다고 생각한다.

V. 참고문헌

1. R. S. Moreci and T. Lechler, Epidermal structure and differentiation, *Curr. Biol.*, **30**(4), 144 (2020).
2. E. J. Kim, H. K. Jung, S. J. Kim, Technology for skin rejuvenation and homeostasis by fermented product with micro-needle therapy system, *KSBB*, **25**, 116 (2010).
3. H. Ahmadiashtiani, P. Bishe, A. Baldisserotto, P. Buso, S. Manfredini, S. Vertuani, Stem cells as a target for the delivery of active molecules to skin by topical administration, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 2251 (2020).
4. S. Y. An, J. S. Park, Y. M. Chung, Current applications of biomolecules as cosmetic ingredients, *Journal of the Korea Academia-Industrial Co. Sci.*, **24**(2), 21 (2023).
5. H. J. Kwon, S. R. Han, N. S. Jung, The influence of skin surface temperature on transdermal absorption of active substances and changes in skin condition, *Journal of the Korean Applied Science and Technology*, **36**(1), 299 (2019).
6. W. G. Cho, Transdermal delivery system of effective ingredients for cosmeceuticals, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **37**(2), 97 (2011).
7. M. Hisa, M. Murayama, M. Yasui, Y. Tokuoka, Preparation and in-vitro evaluation of W/O nanoemulsions for the skin permeation of 5-Aminolevulinic acid, *J. Oleo Sci.*, **72**(3), 295 (2023).

8. C. Solans, P. Izquierdo, J. Nolla, N. Azemar, and M. J. GarciaCelma, Nano-emulsions, *Curr. Opin. Colloid Interface*, **10**, 102 (2005).
9. D. J. McClements, Food emulsions: Principles, practices, and techniques, *CRC Press*, **2** (2004).
10. N. Sharma, M. Bansal, S. Visht, P. K. Sharma, G. T. Kulkarni, Nanoemulsion: A new concept of delivery system, *Chronicles of Young Scientists*, **1(2)**, 2 (2010).
11. A. Mohammadi, S. M. Jafari, A. F. Esfanjani, S. Akhavan, Application of nano-encapsulated olive leaf extract in controlling the oxidative stability of soybean oil, *Food Chemistry*, **190**, 513 (2016).
12. Y. J. Jo, S. B. Lee, J. K. Lee, Y. J. Kwon, Preparation of nanoemulsions containing curcumin by high pressure homogenization, *Food Eng. Prog.*, **18(4)**, 341 (2014).
13. N. B. Romes, R. A. Wahab, M. A. Hamid, H. A. Oyewusi, N. Huda, and R. Kobun, Thermodynamic stability, in-vitro permeability, and in-silico molecular modeling of the optimal *Elaeis guineensis* leaves extract water-in-oil nanoemulsion, *Sci. Rep.*, **11(20851)**, 1 (2021).
14. Y. Singh, J. G. Meher, K. Raval, F. A. Khan, M. Chaurasia, N. K. Jain, M. K. Chourasia, Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery, *Journal of Controlled Release*, **252**, 28 (2017).

15. M. J. Hidajat, J. H. Noh, J. B. Park, J. H. Hong, H. H. Kim, and W. T. Jo, Synthesis of ceramide nanoemulsion by high-pressure homogenizer and evaluation of its stability, *Korean Chem. Eng. Res.*, **58**(4), 590 (2020).
16. P. H. Li and B. H. Chiang, Process optimization and stability of D-limonene-in-water nanoemulsions prepared by ultrasonic emulsification using response surface methodology, *Ultrason. Sonochem.*, **19**, 192 (2012).
17. M. Nejadmansouri, S. M. H. Hosseini, M. Niakosari, G. H. Yousefi, and M. T. Golmakani, Physicochemical properties and oxidative stability of fish oil nanoemulsions as affected by hydrophilic lipophilic balance, surfactant to oil ratio and storage temperature, *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.*, **506**, 821 (2016).
18. S. F. Sadeghian, M. Majdinasab, M. Nejadmansouri, S. Mohammad, and H. Hosseini, Effects of natural antioxidants and high-energy fabrication methods on physical properties and oxidative stability of flaxseed oil-in-water nanoemulsions, *Ultrason. Sonochem.*, **92**, 106277, 1 (2023).
19. K. S. Yoon, Cosmetology, ed. G. B. Jo, **1**, *Kuminsa*, Seoul (2021).
20. J. H. Cho, T. Y. Kim, H. Y. Yun, H. H. Kim, Facile depolymerization process of β -glucan through the use of a high pressure homogenizer, *American Journal of Research Communication*, **2**(4) 168 (2014).

21. H. J. Kim, N. H. Jeong, Y. K. Yun, K. S. Park, and K. D. Nam, Preparation and properties of W/O emulsion by D phase emulsification, *J. of Korean Oil Chem. Soc.*, **15**(2), 25 (1998).
22. W. G. Cho, E. H. Kim, B. J. Jeon, Y. K. Cha, and S. K. Park, Stability of nano-emulsions prepared upon change of composition, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **39**(1), 55 (2013).
23. Dispersion catalog, *Ilshinautoclave*, 22 (2020).
24. M. H. Kim, S. U. Kim, Y. U. Kim, and J. H. Kim, Absolute configurations of (\pm)-glabridin enantiomers, *Bull. Korean. Chem. Soc.*, **30**(2), 415 (2009).
25. C. Simmler, G. F. Pauli, and S. N. Chen, Phytochemistry and biological properties of glabridin, *Fitoterapia*, **90**, 160 (2013).
26. D. Y. Choi and K. H. Row, Extraction and separation of glabridin from licorice by reversed phase high performance liquid chromatography, *Anal. Sci. Technol.*, **19**(6), 455 (2006).
27. J. Chen., W. Yu, and Y. Huang, Inhibitory mechanisms of glabridin on tyrosinase, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, **168**, 111 (2016).

28. T. N. Decaestecker, W. E. Lambert, C. H. VenPeteghem, D. Deforce, and J. F. VanBocxlaer, Optimization of solid-phase extraction for a liquid chromatographic-tandem mass spectrometric general unknown screening procedure by means of computational techniques, *J. Chromatogr. A*, **1056**, 57 (2004).
29. D. W. Park, W. S. Choi, and C. H. Lee, Study of optimized extraction conditions for simultaneous anti-inflammatory and antioxidant activity of *Artemisia iwayomogi* using response surface methodology, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **45**(3), 319 (2019).
30. M. A. Roselan, S. E. Ashari, N. H. Faujan, S. M. M. Faudzi, and R. Mohamad, An improved nanoemulsion formulation containing kojic monooleate: Optimization, characterization and *in vitro* studies, *Molecules*, **25**, (2020).
31. B. H. Yoo, C. L. Zuo, S. B. Lee, Optimization on the stability of coconut oil in water emulsion using response surface methodology, *Appl. Chem. Eng.*, **30**(5), 530 (2019).
32. S. D. Ryu, M. G. Heo, K. S. Yoon, Factors affecting physical properties of solid sunscreen using response surface methodology, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **45**(3), 237 (2019).
33. C. W. Hsieh, P. H. Li, I. C. Lu, and T. H. Wang, Preparing glabridin-in-water nanoemulsions by high pressure homogenization with response surface methodology, *J. Oleo Sci.*, **61**(9), 483 (2012).

34. H. J. Kim, T. K. Jung, J. Y. Kim, K. S. Yoon, Stabilization of nanoemulsion using PEG-free surfactant, *KOCS*, **36**(2), 434 (2019).
35. A. Ahad, M. Aqil, K. Kohli, Y. Sultana, M. Mujeeb, Enhanced transdermal delivery of an anti-hypertensive agent via nanoethosomes: Statistical optimization, characterization and pharmacokinetic assessment, *International journal of Pharmaceutics*, **443**, 26 (2013).
36. A. Ahad, M. Aqil, K. Kohli, Y. Sultana, M. Mujeeb, A. Ali, Formulation and optimization of nanotransfersomes using experimental design technique for accentuated transdermal delivery of valsartan, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, **8**, 237 (2012).
37. H. Y. Kim, W. S. Lee, 3-level response surface design by using expanded spherical experimental region, *KJAS*, **25**(1), 215 (2012).
38. C. Daou, H. Zhang, Optimization of processing parameters for extraction of total, insoluble and soluble dietary fibers of defatted rice bran, *J. Food Agric.*, **25**(8), 562 (2013).
39. S. Y. Kim, H. G. An, J. Y. Kim, K. S. Yoon, Evaluation of physical properties of nanoemulsion ampoule as customized cosmetic bases and evaluation of satisfaction according to skin type, *J. Soc. Cosmet Sci. Korea*, **48**(4), 343 (2022).
40. S. E. Shim, Polymer science and technology, *Polym. Korea*, **22**(5), 483 (2011).

41. T. I. Hyeon and K. S. Yoon, Skin absorption and physical property of ceramide-added ethsome, *Journal of the Korean Applied Science and Technology*, **38**(3), 801 (2021).
42. M. M. Modena, B. Ruhle, T. P. Burg, S. Wuttke, Nanoparticle characterization: What to measure?, *Advanced Materials*, **31**(32) (2019).
43. P. Leroy, C. Tournassat, O. Bernard, N. Devau, M. Azaroual, The electrophoretic mobility of montmorillonite. Zeta potential and surface conductivity effects, *J. Colloid Interface Sci.*, **451**(1), 21 (2015).
44. Safety, Guideline for skin absorption: *in vitro* method, Ministry of food and drug safety (2023).
45. Korean Law Information center, [https://www.law.go.kr/administrative_rules/functional-cosmetic-standard-and-testing-method/\(2012-89,20120824\)](https://www.law.go.kr/administrative_rules/functional-cosmetic-standard-and-testing-method/(2012-89,20120824)), (2012)
46. LOGAN Instruments (Franz diffusion cell system), *UMC Scientific Instruments*, (2020).
47. A. Y. Aydar, Utilization of response surface methodology in optimization of extraction of plant materials, *Statistical Approaches With Emphasis on Design of Experiments Applied to Chemical Processes*, **1**(10), 157 (2018).

48. E. Nazarzadeh, T. Anthony pillai, and S. Sajjadi, On the growth mechanisms of nanoemulsion, *J. Colloid Interface Sci.*, **397**, 154 (2013).
49. C. Preetz, A. Hauser, G. Hause, A. Kramer, and K. Mader, Application of atomic force microscopy and ultrasonic resonator technology on nanoscale: Distinction of nanoemulsions from nanocapsules, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **39**, 141 (2010).
50. B. Heurtault, P. Saulnier, B. Pech, J. E. Proust, and J. P. Benoit, Physico-chemical stability of colloidal lipid particles, *Biomater.*, **24**, 4283 (2003).
51. Y. Zhao, C. Wang, A. H. L. Chow, K. Ren, T. Gong, Z. Zhang, and Y. Zheng, Self-nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) for oral delivery of Zedoary essential oil: Formulation and bioavailability studies, *Int. J. Pharm.*, **383**, 170 (2010).

Study on Optimization for Skin Absorption of Nanoemulsion Containing Glabridin

Se-Yeon Kim

Department of Chemistry
The Graduate School
Jeju National University

Abstract

In the cosmetics industry, it is important to develop new materials for functional cosmetics such as whitening, wrinkles, anti-oxidation, and anti-aging, as well as technology to increase skin absorption rate when actually applied to the skin. Therefore, in this study, we tried to optimize the nanoemulsion formulation using RSM, an experimental design method. A nanoemulsion was prepared by a HPH method using glabridin as an active ingredient, and finally, the optimized skin absorption rate of the nanoemulsion was evaluated. Nanoemulsions were prepared by varying the surfactant content (1.0 ~ 5.0 wt%), cholesterol content (0.1 ~ 0.5 wt%), oil content (2.0 ~ 10.0 wt%), polyol content (2.0 ~ 18.0 wt%), HPH pressure (400 ~ 1,000 bar), and the number of HPH (1 ~ 5 pass) as RSM factors. Among them, surfactant content, oil content, HPH pressure, and the number of HPH, which are factors that have the greatest influence on particle size, were used as independent variables, and particle size and skin absorption rate of nanoemulsion were used as response variables. A

total of 29 experiments were randomly conducted, including 5 repetitions of the center point, and the particle size and skin absorption rate of the prepared nanoemulsion were measured. Based on the results, the formulation with the minimum particle size and maximum skin absorption rate was optimized, and the surfactant content of 5.0 wt%, oil content of 2.0 wt%, HPH pressure of 1,000 bar, and the number of HPH of 4 pass were derived as the optimal conditions. The physical properties of the nanoemulsion prepared under optimal conditions, the pH was 6.90 ± 0.01 , the particle size was 111.6 ± 0.2 nm, the PDI was 0.247 ± 0.014 , and the ZP was -56.7 ± 1.2 mV. The skin absorption rate of the nanoemulsion was compared with emulsion as a control. After 24h, the result of the nanoemulsion and general emulsion skin absorption test, the cumulative absorption rate of the nanoemulsion was $79.53 \pm 0.23\%$ and the emulsion was $66.54 \pm 1.45\%$, nanoemulsion was 13% higher than the emulsion.