



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

Tocopheryl Acetate 를 함유한 Nanoemulsion 의 피부흡수 연구

제주대학교 대학원

화 학 과

김 희 주

2021年 2月



Tocopheryl Acetate를 함유한 Nanoemulsion의 피부흡수 연구




指導教授 尹 景 燮

金 熙 珠

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2020年 12月

金熙珠의 理學 碩士學位 論文을 認准함

| | | |
|-------|-------|---|
| 審査委員長 | 李 南 昊 |  |
| 委 員 | 玄 昌 久 |  |
| 委 員 | 尹 景 燮 |  |

濟州大學校 大學院

2020年 12月

A Study on Skin Permeation of Nanoemulsion
Containing Tocopheryl acetate

Hui Ju Kim

(Supervised by Professor Kyung-Sup Yoon)

A thesis submitted in partial fulfillment of the
requirement for the degree of Master of Science

2020. 12.

This thesis has been examined and approved.

Nam Ho Lee

CHANG-GU HYUN

Kyung-Sup Yoon

.....
Date

DEPARTMENT OF CHEMISTRY
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

목 차

| | |
|---|-----|
| List of Tables | iii |
| List of Figures | v |
| Abstract | vii |
| | |
| I. 서론 | 1 |
| 1-1. 각질층과 피부장벽 | 1 |
| 1-2. 나노에멀전 | 2 |
| 1-3. 고압유화방법(High-Pressure Homogenization method, HPH method) | 3 |
| 1-4. 상반전온도유화법(Phase Inversion Temperature method, PIT method) | 5 |
| 1-5. DL- α -tocopheryl acetate (Vitamin E acetate) | 6 |
| | |
| II. 재료 및 방법 | 7 |
| 2-1. 원료 및 기기 | 7 |
| 2-2. 고에너지 방법을 이용한 나노에멀전 제조 | 9 |
| 2-2-1. HPH 나노에멀전의 제조 | 9 |
| 2-2-2. 일부요인배치법을 이용한 HPH 방법 주요인자 확인 | 10 |
| 2-2-3. 완전요인배치법을 이용한 HPH 방법 인자 수준 결정 | 11 |
| 2-2-4. 최대경사법을 이용한 HPH 방법 최적조건 확립 | 12 |
| 2-2-5. Box-Behnken design을 이용한 HPH 나노에멀전 최적화 | 13 |
| 2-3. 저에너지 방법을 이용한 나노에멀전 제조 | 14 |
| 2-3-1. PIT 나노에멀전의 제조 | 14 |
| 2-3-2. 일부요인배치법을 이용한 PIT 방법 주요인자 확인 | 15 |
| 2-3-3. 완전요인배치법을 이용한 PIT 방법 인자 수준 결정 | 16 |
| 2-3-4. 최대경사법을 이용한 PIT 방법 최적조건 확립 | 17 |
| 2-3-5. Box-Behnken design을 이용한 PIT 나노에멀전 최적화 | 18 |
| 2-4. Vitamin E acetate 함유 나노에멀전의 <i>in-vitro</i> 피부흡수시험 | 19 |
| III. 결과 및 고찰 | 21 |

| | |
|---|----|
| 3-1. 고에너지 방법을 이용한 나노에멀전 제조 및 최적화 | 21 |
| 3-1-1. 일부요인배치법을 이용한 HPH 방법 주요인자 확인 | 21 |
| 3-1-2. 완전요인배치법을 이용한 HPH 방법 인자 수준 결정 | 24 |
| 3-1-3. 최대경사법을 이용한 HPH 방법 최적조건 확립 | 28 |
| 3-1-4. Box-Behnken design을 이용한 HPH 나노에멀전 최적화 | 29 |
| 3-1-5. 최적의 HPH 나노에멀전 제조 | 41 |
| 3-2. 저에너지 방법을 이용한 나노에멀전 제조 및 최적화 | 42 |
| 3-2-1. 일부요인배치법을 이용한 PIT 방법 주요인자 확인 | 42 |
| 3-2-2. 완전요인배치법을 이용한 PIT 방법 인자 수준 결정 | 45 |
| 3-2-3. 최대경사법을 이용한 PIT 방법 최적조건 확립 | 48 |
| 3-2-4. Box-Behnken design을 이용한 PIT 나노에멀전 최적화 | 49 |
| 3-2-5. 최적의 PIT 나노에멀전 제조 | 61 |
| 3-3. Vitamin E acetate 함유 나노에멀전의 <i>in-vitro</i> 피부흡수시험 | 62 |
| IV. 요약 및 결론 | 64 |
| V. 참고문헌 | 65 |

List of Tables

| | |
|--|----|
| Table 1. List of used raw materials | 8 |
| Table 2. Experimental conditions for the 2^{6-3} fractional factorial design of HPH method | 10 |
| Table 3. Experimental conditions for the 2^3 full factorial design of HPH method | 11 |
| Table 4. Run table for the steepest ascent method of HPH nanoemulsion | 12 |
| Table 5. Independent variables range of HPH nanoemulsion optimization experiments | 13 |
| Table 6. Experimental conditions for the 2^{6-3} fractional factorial design of PIT method | 15 |
| Table 7. Experimental conditions for the 2^3 full factorial design of PIT method. | 16 |
| Table 8. Run table for the steepest ascent method of PIT nanoemulsion | 17 |
| Table 9. Independent variables range of PIT nanoemulsion optimization experiments | 18 |
| Table 10. Condition of HPLC analysis | 20 |
| Table 11. Experimental matrix for the 2^{6-3} fractional factorial design of HPH method | 21 |
| Table 12 ANOVA of the 2^{6-3} fractional factorial design of HPH method | 22 |
| Table 13. Experimental matrix for the 2^3 full factorial design of HPH method | 24 |
| Table 14. ANOVA of the 2^3 full factorial design of HPH method | 24 |
| Table 15. Results for the steepest ascent method of HPH nanoemulsion | 28 |
| Table 16. Box-Behnken design experiments for HPH nanoemulsion optimization | 29 |
| Table 17. ANOVA for reduced quadratic model | 30 |

| | |
|--|----|
| Table 18. ANOVA for Linear model | 36 |
| Table 19. Optimization HPH nanoemulsion condition | 41 |
| Table 20. Confirmation of HPH nanoemulsion | 41 |
| Table 21. Experimental matrix for the 2^{6-3} fractional factorial design of PIT method | 42 |
| Table 22. ANOVA of the 2^{6-3} fractional factorial design of PIT method | 43 |
| Table 23. Experimental matrix for the 2^3 full factorial design of PIT method | 45 |
| Table 24. ANOVA of the 2^3 full factorial design of PIT method | 45 |
| Table 25. Results for the steepest ascent method of PIT nanoemulsion | 48 |
| Table 26. Box-Behnken design experiments for PIT nanoemulsion optimization | 49 |
| Table 27. ANOVA for quadratic model | 50 |
| Table 28. ANOVA for linear model | 56 |
| Table 29. Optimization PIT nanoemulsion condition | 61 |
| Table 30. Confirmation of PIT nanoemulsion | 61 |

List of Figures

| | |
|--|----|
| Figure 1. Schematic diagram of nanodisperser | 3 |
| Figure 2. Chemical structure of DL- α -tocopheryl acetate | 6 |
| Figure 3. Preparation of HPH nanoemulsion | 9 |
| Figure 4. Preparation of PIT nanoemulsion | 14 |
| Figure 5. Schematic diagram of Franz diffusion cell | 19 |
| Figure 6. Main effect plot for particle size obtained from the 2^{6-3} fractional factorial design of HPH method | 22 |
| Figure 7. Main effect plot for particle size obtained from the 2^3 full factorial design of HPH method | 25 |
| Figure 8. Interaction effect plot for particle size obtained from the 2^3 full factorial design of HPH method | 26 |
| Figure 9. 3D surface model for particle size of HPH nanoemulsion depending on surfactant and HPH pressure | 32 |
| Figure 10. 3D surface model for particle size of HPH nanoemulsion depending on surfactant and HPH cycle | 33 |
| Figure 11. 3D surface model for particle size of HPH nanoemulsion depending on HPH pressure and HPH cycle | 34 |
| Figure 12. 3D surface model for polydispersity index of HPH nanoemulsion depending on surfactant and HPH pressure | 37 |
| Figure 13. 3D surface model for polydispersity index of HPH nanoemulsion depending on surfactant and HPH cycle | 38 |
| Figure 14. 3D surface model for polydispersity index of HPH nanoemulsion depending on HPH pressure and cycle | 39 |
| Figure 15. Main effect plot for particle size obtained from the 2^{6-3} fractional factorial design of PIT method | 43 |
| Figure 16. Main effect plot for particle size obtained from the 2^3 full factorial | |

| | |
|---|----|
| design of PIT method | 46 |
| Figure 17. Interaction effect plot for particle size obtained from the 2 ³ full factorial design of PIT method | 47 |
| Figure 18. 3D surface model for particle size of PIT nanoemulsion depending on co-surfactant and oil | 52 |
| Figure 19. 3D surface model for particle size of PIT nanoemulsion depending on co-surfactant and temperature | 53 |
| Figure 20. 3D surface model for particle size of PIT nanoemulsion depending on oil and temperature | 54 |
| Figure 21. 3D surface model for polydispersity index of PIT nanoemulsion depending on co-surfactant and oil | 57 |
| Figure 22. 3D surface model for polydispersity index of PIT nanoemulsion depending on co-surfactant and temperature | 58 |
| Figure 23. 3D surface model for polydispersity index of PIT nanoemulsion depending on oil and temperature | 59 |
| Figure 24. Permeation profiles of Vitamin E acetate through Strat-M membrane from the emulsion | 62 |
| Figure 25. Remaining amounts of Vitamin E acetate through Strat-M membrane from the emulsion | 63 |

Abstract

A Study of Skin Permeation of Nanoemulsion Containing Tocopheryl acetate

Hui Ju Kim

Department of Chemistry, Graduate School

Jeju National University, Korea

Supervised by Professor Kyung-Sup Yoon

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 intercellular lipids because of their unique small particle size. In this study, for effective skin absorption of Vitamin E Acetate, nanoemulsion prepared by high-energy and low-energy methods was optimized using response surface methodology. As a preliminary experiment, fractional factorial design and full factorial design were performed. Based on the result of the factorial design, the high energy method used the surfactant content (3.0 ~ 9.0 wt%), high pressure emulsification pressure (600 ~ 1,000 bar), and the number of high pressure emulsification (5 ~ 13 pass) as factors and the low energy method was the cosurfactant content (5.2 ~ 7.8 wt%), oil content (13.0 ~ 23.0 wt%), and emulsification temperature (75 ~ 95°C) were used as factors. A Box-Behnken design was performed with the reaction variable as the particle size of the nanoemulsion. HPH and PIT nanoemulsion were optimized according to the response surface methodology

results, and skin absorption rates of the two nanoemulsions were compared. As a result, the final skin absorption rate was $3.84 \pm 0.26\%$ of PIT nanoemulsion and $8.91 \pm 1.57\%$ of HPH nanoemulsion, confirming that the skin absorption rate of HPH nanoemulsion was better.

I. 서론

1-1. 각질층과 피부장벽

피부는 크게 표피, 진피, 피하지방층의 세 부분으로 나뉜다. 표피층 최외각에 존재하는 각질층은 각질세포와 세라마이드, 콜레스테롤 및 지방산 등으로 구성된 세포간 지질이 다층 라멜라 구조를 이루고 있다. 이러한 구조적 특징으로 인해 각질층은 수분 손실을 방지하고 여러 가지 자극으로부터 피부를 보호하는 역할을 한다. 하지만 활성성분의 피부투과 또한 크게 제한하여 약물의 피부전달 장벽으로 작용한다 [1-4]. 활성성분에 대한 피부흡수를 극대화하기 위해서는 이 장벽을 극복해야 한다 [5].

약물의 피부투과는 크게 땀샘, 모낭 등의 피부 부속기관을 이용한 경로와 표피를 통한 경로의 두 가지로 나뉜다[6-8]. 그러나 이들 부속기관은 피부 표면적의 0.1%를 차지하므로 이를 통한 피부 흡수량은 매우 적다. 보통 약물의 투과는 각질층의 세포간 지질을 통하여 이루어지며, 유효성분의 각질층으로의 확산(diffusion), 분배(division)를 통해 침투가 일어난다[2,8,9]. 작은 입자크기 및 넓은 표면적을 보유한 나노에멀전은 유효성분의 피부 침투를 개선하여 약물의 피부전달에 효과적이라고 알려져 있다[10-12].

1-2. 나노에멀전

나노에멀전은 일반적으로 20 ~ 200 nm 범위의 입자크기를 가지며, 일반에멀전과 마이크로에멀전 중간 크기의 에멀전이다[13]. 나노에멀전은 마이크로에멀전과는 달리 열역학으로 불안정하지만[14], 미세 분산된 입자의 브라운 운동에 의해 일반에멀전에서 관찰되는 크리밍, 침전, 응집, 합일 등의 현상이 방지되어 장시간 물리적으로 안정성을 유지한다. 따라서 나노에멀전은 식품, 화장품, 제약 등의 산업에서 약물, 비타민, 향산화제 등의 유용성 활성성분을 캡슐화하고 전달하기 위한 시스템으로 많은 관심을 받아왔다[15-18].

자발적으로 형성되는 마이크로에멀전과 달리 나노에멀전은 별도의 에너지를 가해주어야 생성된다[19]. 나노에멀전은 특수한 공정을 통하여 제조할 수 있는데 그 방법은 크게 고에너지 방법과 저에너지 방법으로 나눌 수 있다. 고에너지 방법은 강력한 파괴력을 생성하는 특수한 기계 장비를 이용하여 나노에멀전을 제조한다. 특히 고압유화기(High-Pressure Homogenizer, HPH)나 초음파처리기(Ultrasonicator)를 이용하는 방법이 가장 널리 사용된다. 반면, 저에너지 방법에서는 에멀전의 조성이나 온도의 변화에 의해 상의 반전을 겪고 낮은 계면 장력 상태를 통과하며 미세 입자를 생성한다. 상반전 온도 유화, 상반전 조성 유화, 자발적 유화 등이 저에너지 방법의 예이다. 이러한 방법은 고에너지 방법보다 훨씬 적은 에너지를 필요로하고 특수한 기계 장치 없이 일반적인 교반기를 이용하여 쉽게 나노에멀전을 제조할 수 있다[20-22].

1-3. 고압유화방법(High-Pressure Homogenization method, HPH method)

HPH 방법은 가장 널리 사용되는 고에너지 방법 중 하나이다. 나노에멀전은 비평형 시스템이기 때문에 화학적 전위 또는 기계 장치로부터의 에너지 입력이 필요하다. 계면활성제를 사용하여 화학적 전위를 만들어 마이크로에멀전과 같은 방식으로 나노에멀전을 생산할 수 있지만 이 방법은 기계적 장치를 사용하여 얻은 나노에멀전에 비해 많은 양의 계면활성제가 필요하다는 단점이 있다[23]. 고압유화는 기계적으로 에멀전의 입자크기를 1 μm 미만으로 줄이고 균일한 조성과 높은 안정성을 가진 에멀전을 생성한다[24]. HPH 방법은 화학적 변화가 없고 작동이 쉬우며 투자 및 운영 비용이 낮아 오늘날 식품, 제약 및 화장품 산업에서 주로 에멀전의 입자크기를 줄이고 안정성을 높이기 위해 널리 사용된다[25-27]. HPH 방법은 고압 펌프를 사용하여 좁은 간극을 통해 유체를 밀어내어 속도를 크게 증가시켜 높은 전단 응력을 통해 유체에 부유하는 입자를 변형시켜 미세입자를 생성한다[27,28].

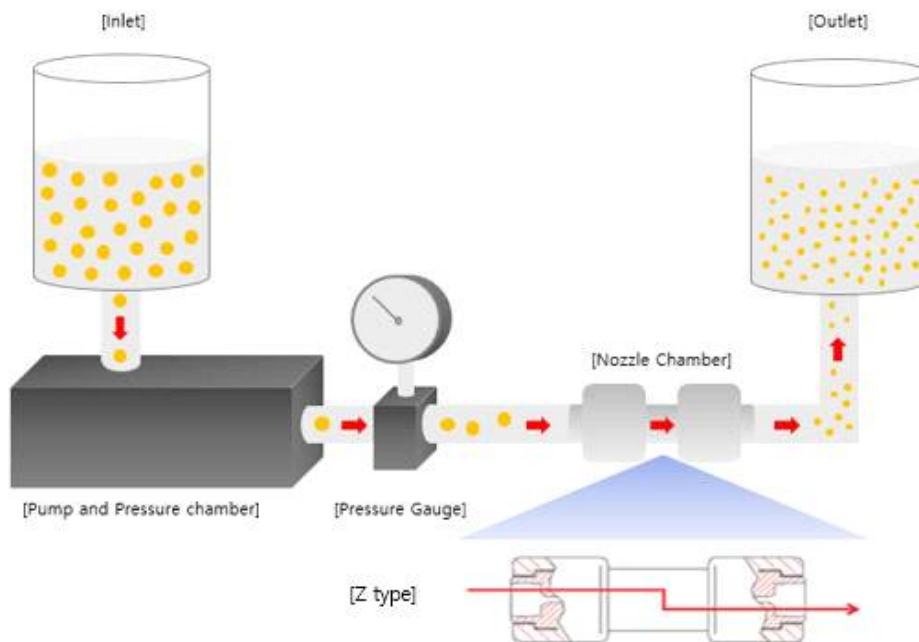


Figure 1. Schematic diagram of nanodisperser [29].

HPH 방법을 통해 나노에멀전을 제조하는 첫 번째 단계는 일반적인 교반기를 사용하여 오일, 물 및 계면활성제를 충분한 시간 동안 혼합하여 일반에멀전을 제조하는 것이다. 두번째 단계에서, 일반에멀전은 나노에멀전으로 전환된다. 여기서 난류, 캐비테이션(cavitation) 및 충돌(impact)의 세 종류의 메커니즘이 액적의 변형에 관여한다[30].

고압유화기에서 고압 펌프는 좁은 간극을 통해 일반에멀전을 밀어내고 분산 에너지는 액체에 난류를 생성하여 크고 작은 소용돌이를 형성한다. 엄청난 수의 소용돌이가 형성되면 입자는 다양한 규모와 강도로 전단력을 겪으며 미세입자를 형성한다. 또 고압 흐름 장치에서는 효과적인 입자 파괴를 위해 정지된 표면에 부유 입자를 충돌시킨다. 가해진 압력으로 인해 유체가 충격판에 충돌할 때 충돌 응력이 생성되어 균일한 나노에멀전이 생성된다. 고압유화 챔버 내 유체 진행 과정에서 유체 압력이 증기압 아래로 떨어지면 유체에 대한 기체의 용해도 증가하게 되고 캐비테이션이 생성된다. 유체가 진행하면서 압력 차이로 인해 기포가 파열되면 그 파괴력으로 인해 유체 입자크기가 감소하게 된다[25,27,30,31].

1-4. 상반전온도유화법(Phase Inversion Temperature method, PIT method)

PIT 방법은 비이온계면활성제의 용해도 또는 곡률이 온도에 따라 달라지는 능력을 사용하여 일정한 조성에서 온도를 변화시켜 나노에멀전을 제조하는 방법이다[18].

저온에서 비이온성 계면활성제는 친수성 머리 부분과 물 사이의 수화력이 더 강하여 유상보다 수상에 더 잘 용해된다. 온도가 올라감에 따라 친수성 머리 부분이 탈수되고 계면활성제의 물에 대한 용해도가 점차적으로 감소하여 친유성으로 변하게 된다. 따라서 고온에서 계면활성제는 수상보다 유상에서 더 잘 용해된다.

저온과 고온 사이에서 온도가 상승함에 따라 비이온계면활성제가 친수성에서 친유성 특성으로 변경되기 전에 친유성 또는 친수성을 나타내지 않는 온도를 지나는데 이 온도를 상반전온도(Phase Inversion Temperature, PIT)라고 한다. 이 온도에서 계면활성제의 용해도는 유상과 수상에서 거의 동일하며 계면활성제 분자의 곡률이 0으로 매우 낮은 계면 장력을 갖는다[14,18,32].

1-5. DL- α -tocopheryl acetate (Vitamin E acetate)

α -tocopherol (Vitamin E)는 지용성 항산화제로 지질 과산화 연쇄 반응에서 지질 라디칼산물에 의한 산화로부터 세포막을 보호한다. 하지만 산화에 민감하여 화장품에서의 사용이 불편하다. 이러한 단점을 극복하기 위해 화장품 제조 시 안정한 Vitamin E ester를 자주 사용한다. Vitamin E의 hydroxyl group은 유기산, 일반적으로 아세트산의 carboxyl group과의 ester화에 의해 산화로부터 보호될 수 있으며, 항산화 활성이 없는 acetate 또는 succinate 유도체와 같은 ester를 형성한다[33-35].

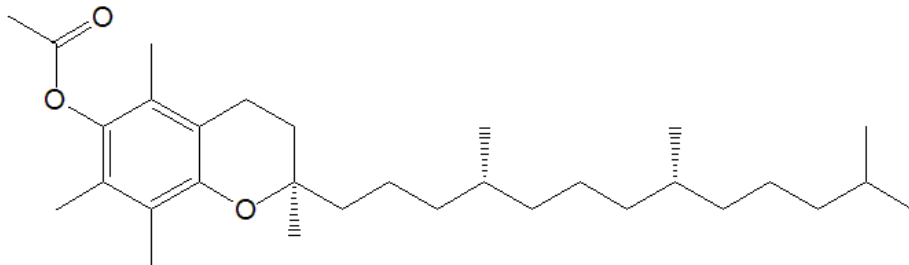


Figure 2. Chemical structure of DL- α -tocopheryl acetate.

DL- α -tocopheryl acetate (Vitamin E acetate, VEA)는 Vitamin E에서 파생된 지용성 물질로 화학적 안정성을 나타내며 화장품에 널리 사용된다. Vitamin E acetate는 피부에 적용 시 피부에 있는 효소가 provitamin E를 active vitamin E로 변환한다. Active vitamin E는 부분적으로 지방 과산화와 관련된 피부 노화 과정에 작용하여 자외선으로부터 피부를 보호하고 노화가 진행되는 것을 지연시킨다[33,35,36].

본 연구에서는 Vitamin E acetate를 유효성분으로 하여 나노에멀전을 제조하였다. 반응표면분석법(Response Surface Methodology, RSM)은 독립변수(X)와 반응변수(Y) 간의 관계 분석을 위한 통계 도구이다. RSM을 사용하여 고에너지 및 저에너지 방법으로 제조한 나노에멀전 입자크기에 어떤 요인이 가장 큰 영향을 미치는지 확인한 후, 결과를 바탕으로 나노에멀전을 최적화하였다. 최종적으로 최적화한 나노에멀전의 피부흡수를 평가하는 것을 목표로 하였다.

II. 재료 및 방법

2-1. 원료 및 기기

본 연구에서 나노에멀전 제조를 위하여 계면활성제로 Sunsoft Q-18Y-C, Eumulgin B1, Eumulgin B2를 사용하였고, 보조유화제로는 Kalcol 6850과 GMS 105를 사용하였다. 오일로 Dekanex 2004 FG, Meadowfoam seed oil을 사용하였으며 1,3-BG, Glycerin 및 1,2-Hexanediol을 폴리올로 사용하였다. 정제수는 증류수 제조기(EXL1 Analysis, VIVAGEN, Korea)를 이용하여 제조된 3차 증류수를 사용하였다 (Table 1).

HPH 나노에멀전을 제조하기 위하여 호모믹서(T.K. auto homomixer mark II 2.5, Tokushukika, Japan)와 고압유화기(NLM1000, Ilshin autoclave, Korea)를 사용하였고, PIT 나노에멀전 제조를 위해 Hot Plate (PA1180, LK Lab, Korea)를 사용하였다. 나노에멀전의 입자크기 및 다분산도 측정을 위해 나노제타사이저 (Nano ZS System, Malven Instrument Ltd., UK)를 사용하였다. Tocopheryl acetate 함유 나노에멀전의 피부흡수율을 분석하는데 HPLC (Waters 2695, Waters, USA)를 사용하였다.

Table 1. List of used raw materials

| INCI Name | Trade Name | Company |
|---------------------------------------|---------------------|--|
| Polyglyceryl-10 stearate | Sunsoft Q-18Y-C | Taiyo Kagaku Co., Ltd. (Japan) |
| Limnanthes Alba (Meadowfoam) seed oil | Meadowfoam seed oil | Kerfoot (UK) |
| Glycerin | Glycerin | KL-Kepong Oleomas Sdn. Bhd. (Malaysia) |
| Butylene glycol | 1,3-BG | Daicel (Japan) |
| 1,2-Hexanediol | 1,2-Hexanediol | Twin Coschem Co., Ltd (Korea) |
| Ceteth-12 | Eumulgin B1 | BASF (Germany) |
| Ceteth-20 | Eumulgin B2 | BASF (Germany) |
| Cetearyl alcohol | Kalcol 6850P | KAO (Japan) |
| Glyceryl stearate SE | GMS 205 | Ilshinwells (Korea) |
| Hydrogenated polydecene | Nexbase 2004 FG | Jan Dekker (Netherlands) |
| Ethylhexylglycerin | Saskin 50 | Sachem (USA) |
| Stearic acid | Stearic acid | Palm Oleo (Malaysia) |
| Cholesterol | Cholesterol JP | Nippon Fine Chem. (Japan) |
| Glyceryl caprylate | Lexgard GMCY | Inolex (USA) |
| DL- α -tocopheryl acetate | Tocopheryl Acetate | Sigma-Aldrich (USA) |

2-2. 고에너지 방법을 이용한 나노에멀전 제조

2-2-1. HPH 나노에멀전의 제조

호모믹서를 사용하여 비이온성 계면활성제인 Sunsoft Q-18Y-C를 포함한 유상과 수상을 75°C 이상으로 가열하여 용해한다. 그 후 온도를 유지하며 수상을 유상에 서서히 첨가하며 2,000 rpm으로 10 min 동안 유화하였다. 1차 유화 후 제조한 에멀전을 45°C로 냉각한 후, 고압유화기를 사용하여 고압유화를 수행하였다.

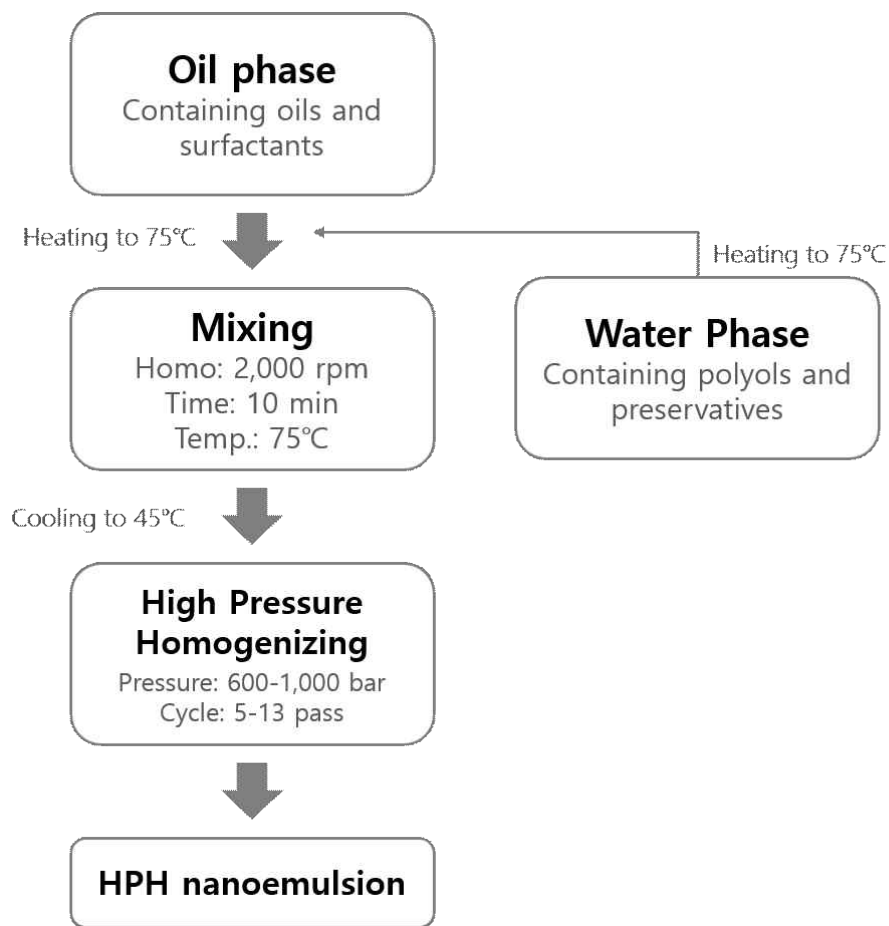


Figure 3. Preparation of HPH nanoemulsion.

2-2-2. 일부요인배치법을 이용한 HPH 방법 주요인자 확인

나노에멀전 제조 시 다양한 공정 변수들이 나노에멀전 형성에 영향을 준다. 요인 배치법을 수행할 때 요인의 수가 증가할수록 실험의 횟수가 급속히 늘어나기 때문에 관심 요인이 여러가지인 경우 일부요인배치법(Fractional factorial design)을 사용하는 것이 효율적이다[37-39].

HPH 나노에멀전 제조 시 작은 입자크기 형성에 영향을 주는 여러 요인들로부터 가장 큰 영향을 미치는 주요인자를 선정하기 위해 일부요인배치법을 사용하였다[38-40]. 본 실험에서는 Design-Expert® Software Version 11 (Stat-Ease, Inc., USA)를 사용하여 HPH 나노에멀전 제조에 영향을 주는 6가지 요인(계면활성제 함량, 오일 함량, 폴리올 함량, VEA 함량, 고압유화 압력, 고압유화 횟수)을 인자로 하고, HPH 나노에멀전의 입자크기를 반응변수로 하여 2^{6-3} 일부요인배치법을 수행하였다(Table 2).

Table 2. Experimental conditions for the 2^{6-3} fractional factorial design of HPH method

| Factor | Minimum | Maximum |
|---------------------|---------|---------|
| A: Surfactant (wt%) | 1.0 | 9.0 |
| B: Oil (wt%) | 1.0 | 9.0 |
| C: Polyol (wt%) | 12.0 | 24.0 |
| D: VEA (wt%) | 1.0 | 5.0 |
| E: Pressure (bar) | 400 | 1,000 |
| F: Cycle (pass) | 3 | 7 |

2-2-3. 완전요인배치법을 이용한 HPH 방법 인자 수준 결정

2^n 완전요인배치법은 2수준인 요인을 n개 선택하여 모든 수준조합에서 랜덤하게 실험하는 방법으로 수준수가 적어 요인 실험의 초기 단계에서 유용하다[37-39]. 앞서 2^{6-3} 일부요인배치법을 통해 주요인자로 선정된 세 가지 요인(계면활성제 함량, 고압유화 압력, 고압유화 횟수)을 인자로 하고 HPH 나노에멀전의 입자크기를 반응변수로 하여 2^3 완전요인배치법을 수행하였다(Table 3).

Table 3. Experimental conditions for the 2^3 full factorial design of HPH method

| Factor | Minimum | Maximum |
|---------------------|---------|---------|
| A: Surfactant (wt%) | 1.0 | 9.0 |
| B: Pressure (bar) | 400 | 1,000 |
| C: Cycle (pass) | 3 | 7 |

2-2-4. 최대경사법을 이용한 HPH 방법 최적조건 확립

완전요인배치법 결과를 바탕으로 최대경사법을 수행하였다. HPH 방법에서 고압유화 압력이 증가할수록 입자크기가 크게 감소하므로 고압유화 압력을 1,000 bar로 고정한 후, 계면활성제 함량과 고압유화 횟수에 따른 HPH 나노에멀전 입자크기의 감소 경향을 확인하였다.

계면활성제 함량을 중심값인 5.0 wt%를 기준으로 3.76 wt%씩 증가시키고, 고압유화 횟수도 중심값인 5 pass를 기준으로 2 pass씩 증가시켜 총 5회의 실험을 진행하였다(Table 4).

Table 4. Run table for the steepest ascent method of HPH nanoemulsion

| Run | Surfactant (wt%) | Cycle (pass) |
|-----|------------------|--------------|
| 1 | 5.00 | 5 |
| 2 | 8.76 | 7 |
| 3 | 12.52 | 9 |
| 4 | 16.28 | 11 |
| 5 | 20.04 | 13 |

2-2-5. Box-Behnken design을 이용한 HPH 나노에멀전 최적화

Vitamin E acetate 함유 HPH 나노에멀전 최적화를 위해 Box-Behnken design을 수행하였다. 요인배치법을 통한 예비실험 결과를 바탕으로 계면활성제 함량, 고압유화 압력, 고압유화 횟수의 3가지를 RSM 인자로 선정하고 HPH 나노에멀전 입자 크기 및 다분산도를 반응변수로 하였다(Table 5). 중심점 5회 반복실험을 포함한 총 17회의 실험이 랜덤으로 수행되었다.

Table 5. Independent variables range of HPH nanoemulsion optimization experiments

| Independent variables | Level | | |
|-------------------------------------|---------|-----------|----------|
| | Low(-1) | Middle(0) | High(+1) |
| A: Surfactant (wt%) | 3.0 | 6.0 | 9.0 |
| B: Pressure (bar) | 600 | 800 | 1,000 |
| C: Cycle (pass) | 5 | 9 | 13 |
| Dependent variables | | | Goal |
| Y ₁ : Particle size (nm) | | | Minimize |
| Y ₂ : PDI | | | Minimize |

2-3. 저에너지 방법을 이용한 나노에멀전 제조

2-3-1. PIT 나노에멀전의 제조

Hot Plate를 사용하여 계면활성제와 오일을 포함한 유상과 수상을 전상온도 이상으로 가열하여 균일하게 혼합하였다. 그 후 온도를 유지하며 수상을 유상에 서서히 첨가하였고, 이후 30℃까지 급속 냉각시켜 나노에멀전을 제조하였다(Figure 4).

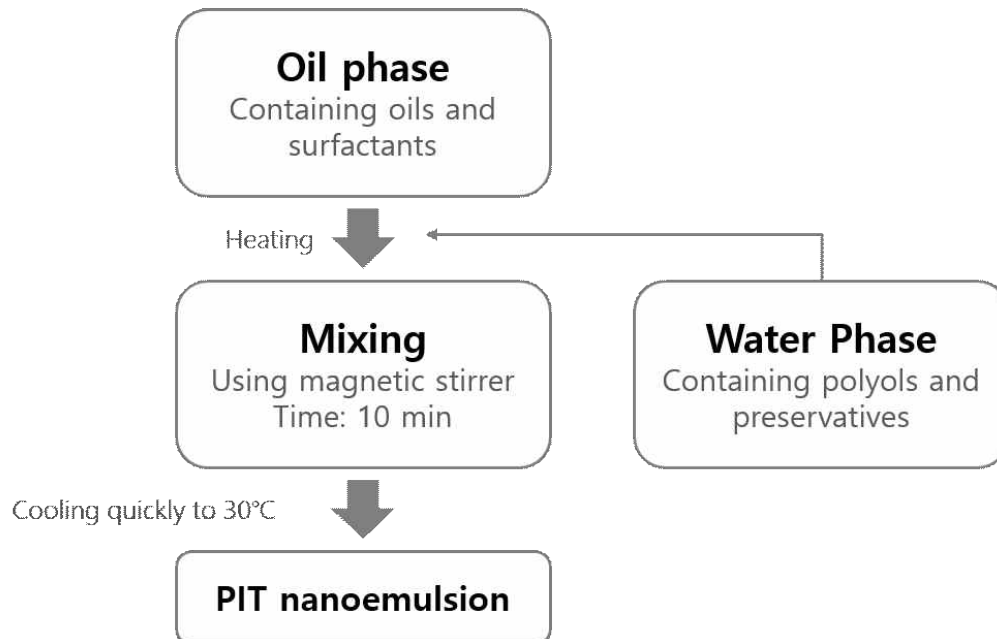


Figure 4. Preparation of PIT nanoemulsion.

2-3-2. 일부요인배치법을 이용한 PIT 방법 주요인자 확인

본 실험에서는 Design-Expert® Software Version 11 (Stat-Ease, Inc., USA) 를 사용하여 PIT 나노에멀전 제조에 영향을 주는 6가지 요인(계면활성제 함량, 보조계면활성제 함량, 오일 함량, VEA 함량, 유화온도, 유화시간) 중 PIT 나노에멀전 입자크기에 가장 큰 영향을 주는 주요인자만을 선별하고자 2^{6-3} 일부요인 배치법을 수행하였다(Table 6).

Table 6. Experimental conditions for the 2^{6-3} fractional factorial design of PIT method

| Factor | Minimum | Maximum |
|------------------------|---------|---------|
| A: Surfactant (wt%) | 8.4 | 12.6 |
| B: Co-Surfactant (wt%) | 5.2 | 7.8 |
| C: Oil (wt%) | 13.0 | 23.0 |
| D: VEA (wt%) | 1.0 | 5.0 |
| E: Time (min) | 5 | 10 |
| F: Temperature (°C) | 80 | 90 |

2-3-3. 완전요인배치법을 이용한 PIT 방법 인자 수준 결정

앞서 2^{6-3} 일부요인배치법을 통해 주요인자로 선정된 세 가지 요인(보조계면활성제 함량, 오일 함량, 유화온도)을 인자로 하고 PIT 나노에멀전의 입자크기를 반응변수로 하여 2^3 완전요인배치법을 수행하였다(Table 7).

Table 7. Experimental conditions for the 2^3 full factorial design of PIT method

| Factor | Minimum | Maximum |
|------------------------|---------|---------|
| A: Co-surfactant (wt%) | 5.2 | 7.8 |
| B: Oil (wt%) | 13.0 | 23.0 |
| C: Temperature (°C) | 80 | 95 |

2-3-4. 최대경사법을 이용한 PIT 방법 최적조건 확립

완전요인배치법을 바탕으로 PIT 방법으로 제조한 나노에멀전의 입자크기가 작아지는 경향을 확인하기 위해 최대경사법을 수행하였다. 실험조건을 Table 8에 나타내었다. 오일 함량을 13.0 wt%로 고정한 후, 보조계면활성제 함량을 5.2 wt% 기준으로 0.65 wt%씩 증가시키고, 유화온도를 67.85℃ 기준으로 9.83℃씩 증가시켜 총 4회의 실험을 진행하였다.

Table 8. Run table for the steepest ascent method of PIT nanoemulsion

| Run | Co-surfactant (wt%) | Temperature (°C) |
|-----|---------------------|------------------|
| 1 | 5.2 | 67.85 |
| 2 | 5.85 | 77.68 |
| 3 | 6.5 | 87.51 |
| 4 | 7.15 | 97.34 |

2-3-5. Box-Behnken design을 이용한 PIT 나노에멀전 최적화

Vitamin E acetate 함유 PIT 나노에멀전 최적화를 위해 Box-Behnken design을 수행하였다. 요인배치법을 통한 예비실험 결과를 바탕으로 보조계면활성제 함량, 오일 함량, 유화온도의 3가지를 RSM 인자로 선정하고 PIT 나노에멀전 입자 크기 및 다분산도를 반응변수로 하였다(Table 9). 중심점 5회 반복실험을 포함한 총 17회의 실험이 랜덤으로 수행되었다.

Table 9. Independent variables range of PIT nanoemulsion optimization experiments

| Independent variables | Level | | |
|-------------------------------------|---------|-----------|----------|
| | Low(-1) | Middle(0) | High(+1) |
| A: Co-surfactant (wt%) | 5.2 | 6.5 | 7.8 |
| B: Oil (wt%) | 13.0 | 18.0 | 23.0 |
| C: Temperature (°C) | 75 | 85 | 95 |
| Dependent variables | | | Goal |
| Y ₁ : Particle size (nm) | | | Minimize |
| Y ₂ : PDI | | | Minimize |

2-4. Vitamin E acetate 함유 나노에멀전의 *in-vitro* 피부흡수시험

Vitamin E acetate 함유 나노에멀전의 피부흡수율을 평가하기 위해 Franz diffusion cell method를 이용하여 *in-vitro* 피부흡수시험을 수행하였다. Membrane으로는 각질층을 모사한 인공 합성막인 Strat-M membrane (Merck Millipore, Billerica MA, USA)을 사용하였고, receptor 용액으로는 활성성분의 용해도를 고려하여 50% ethanol : Polysorbate 20 = 94 : 6 (v/v) 용액을 사용하였다.

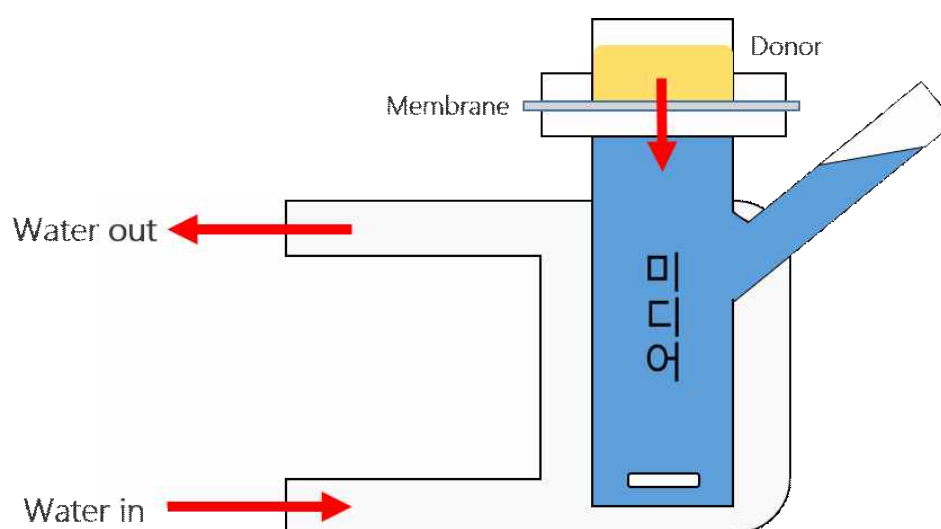


Figure 5. Schematic diagram of Franz diffusion cell.

Franz diffusion cell에 membrane을 고정시킨 후, 12 mL의 receptor 용액을 투여하고 온도를 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 로 하여 30 min 동안 안정화시켰다. 그 후 donor에 500 μL 시료를 가하였다. 1, 4, 8, 24 h 간격으로 피부흡수 시료를 채취하였고, HPLC를 이용하여 Vitamin E acetate의 투과량을 정량분석하였다.

24 h 후 membrane에 남아있는 vitamin E acetate의 양을 측정하기 위해 membrane 수거하여 receptor 용액으로 세척하여 16조각으로 세절하였다. 이후 membrane 조각을 receptor 용액 5 mL에 넣고 60 min간 초음파 세척기 (JAC-3010, Kodo Technical Research Co., Ltd., Korea)를 이용하여 용출시킨 후 HPLC를 이용하여 정량분석하였다(Table 10).

Table 10. Condition of HPLC analysis

| System | Condition |
|---------------------|--|
| Column | Kromasil C18 column, 5 μm, 4.6×250 mm (AkzoNobel, Netherlands) |
| Detector | 2998 Photodiode Array (PDA) Detector (Waters, USA) |
| Flow rate | 1.0 mL/min |
| Mobile phase | Methanol : Isopropanol = 25 : 75 (v/v) |
| Detector wavelength | 284 nm |
| Injection volumn | 10 μL |
| Time | 10 min |

Vitamin E acetate의 피부 흡수율은 다음 식을 사용하여 계산하였다[40].

$$Q = (C_n \cdot V + \sum_{i=1}^{n-1} C_i \cdot S) / A$$

Q는 단위면적당 투과량, C_n : n번째 시료 채취구간에서 결정된 유효성분의 농도, V는 각 Franz diffusion cell의 부피, S는 시료 채취 부피 A는 시료 cell의 표면적이다.

III. 결과 및 고찰

3-1. 고에너지 방법을 이용한 나노에멀전 제조 및 최적화

3-1-1. 일부요인배치법을 이용한 HPH 방법 주요인자 확인

HPH 방법으로 제조한 나노에멀전 최적화를 위해 2^{6-3} 일부요인배치법을 사용하였다. 나노에멀전 제조에 영향을 주는 요인으로 계면활성제(surfactant, SAA) 함량, 오일 함량, 폴리올 함량, VEA 함량, 고압유화 압력, 고압유화 횟수의 6가지를 선정하였다. 랜덤으로 총 8회의 실험이 진행되었고(Table 11), 실험결과를 바탕으로 분산분석을 수행하였다(Table 12).

Table 11. Experimental matrix for the 2^{6-3} fractional factorial design of HPH method

| | Factor 1 | Factor 2 | Factor 3 | Factor 4 | Factor 5 | Factor 6 | Response 1 |
|-----|----------|----------|----------|----------|------------|----------|------------|
| Std | A:SAA | B:Oil | C:Polyol | D:VEA | E:Pressure | F:Cycle | Size |
| | wt% | wt% | wt% | wt% | bar | pass | nm |
| 1 | 1 | 1 | 12 | 5 | 1000 | 7 | 197.4 |
| 2 | 9 | 1 | 12 | 1 | 400 | 7 | 159.6 |
| 3 | 1 | 9 | 12 | 1 | 1000 | 3 | 191.7 |
| 4 | 9 | 9 | 12 | 5 | 400 | 3 | 203.8 |
| 5 | 1 | 1 | 24 | 5 | 400 | 3 | 314.2 |
| 6 | 9 | 1 | 24 | 1 | 1000 | 3 | 109.1 |
| 7 | 1 | 9 | 24 | 1 | 400 | 7 | 229 |
| 8 | 9 | 9 | 24 | 5 | 1000 | 7 | 72.71 |

Table 12. ANOVA of the 2^{6-3} fractional factorial design of HPH method

| Source | SS | df | Mean | F-value | p-value | |
|------------|----------|----|----------|-----------|---------|-------------|
| Model | 38194.82 | 6 | 6365.80 | 42863.76 | 0.0037 | significant |
| A-SAA | 18729.83 | 1 | 18729.83 | 126116.21 | 0.0018 | |
| B-Oil | 862.99 | 1 | 862.99 | 5810.91 | 0.0084 | |
| C-Polyol | 94.46 | 1 | 94.46 | 636.06 | 0.0252 | |
| D-VEA | 1217.96 | 1 | 1217.96 | 8201.05 | 0.0070 | |
| E-Pressure | 14085.97 | 1 | 14085.97 | 94847.05 | 0.0021 | |
| F-Cycle | 3203.60 | 1 | 3203.60 | 21571.26 | 0.0043 | |
| Residual | 0.1485 | 1 | 0.1485 | | | |
| Cor total | 38194.97 | 7 | | | | |

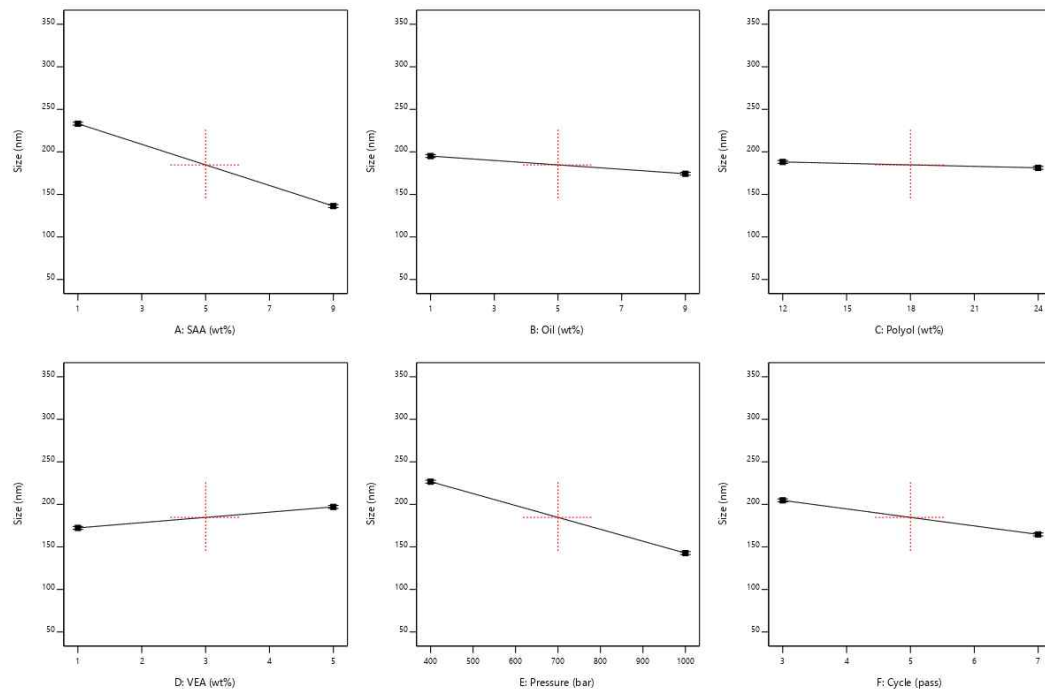


Figure 6. Main effect plot for particle size obtained from the 2^{6-3} fractional factorial design of HPH method.

분산분석 결과 6가지 요인(계면활성제 함량, 오일 함량, 폴리올 함량, VEA 함량, 고압유화 압력, 고압유화 횟수) 모두 HPH 나노에멀전의 입자크기에 유의미한 영향을 나타내었다($p < 0.05$). 계면활성제 함량, 고압유화 압력 및 횟수가 가장 큰 영향을 나타냄을 확인하였고, 그 다음이 VEA 함량, 오일 함량 및 폴리올 함량 순이었다.

인자들의 주효과를 Figure 5에 나타내었다. 그림에서 볼 수 있듯이 주요인자인 계면활성제 함량, 고압유화 압력 및 횟수 그래프는 다른 인자들에 비해 나노에멀전 입자크기가 크게 변화하는 것을 알 수 있다. 위 결과를 바탕으로 계면활성제 함량, 고압유화 압력 및 횟수를 주요인자로 하여 2^3 완전요인배치법을 진행하였다. 일부요인배치법의 결과를 참고하여 나머지 3가지 요인들의 값을 각각 오일 함량 3.0 wt%, 폴리올 함량 18.0 wt%, VEA 함량은 2.0 wt%로 고정하였다.

3-1-2. 완전요인배치법을 이용한 HPH 방법 인자 수준 결정

일부요인배치법 결과를 바탕으로 계면활성제 함량, 고압유화 압력, 고압유화 횟수를 인자로 선정하여 2³ 완전요인배치법을 수행하였다. 세 가지 요인이 반응변수인 HPH 나노에멀전의 입자크기에 미치는 영향을 확인하였다(Table 13).

Table 13. Experimental matrix for the 2³ full factorial design of HPH method

| | Factor 1 | Factor 2 | Factor 3 | Response 1 |
|-----|---------------|-------------|----------|-----------------------|
| Std | A: Surfactant | B: Pressure | C: Cycle | Y ₁ : Size |
| | wt% | bar | pass | nm |
| 1 | 1 | 400 | 3 | 191.3 |
| 2 | 9 | 400 | 3 | 190.9 |
| 3 | 1 | 1000 | 3 | 190.2 |
| 4 | 9 | 1000 | 3 | 140.8 |
| 5 | 1 | 400 | 7 | 185.3 |
| 6 | 9 | 400 | 7 | 178.9 |
| 7 | 1 | 1000 | 7 | 142.9 |
| 8 | 9 | 1000 | 7 | 85.1 |

Table 14. ANOVA of the 2³ full factorial design of HPH method

| Source | SS | df | Mean | F-value | p-value | |
|------------|-----------|----|----------|---------|---------|-------------|
| Model | 10007.615 | 5 | 2001.523 | 150.26 | 0.0066 | significant |
| A-SAA | 1624.5 | 1 | 1624.5 | 121.96 | 0.0081 | |
| B-Pressure | 4389.845 | 1 | 4389.845 | 329.57 | 0.0030 | |
| C-Cycle | 1830.125 | 1 | 1830.125 | 137.40 | 0.0072 | |
| AB | 1260.02 | 1 | 1260.02 | 94.60 | 0.0104 | |
| BC | 903.125 | 1 | 903.125 | 67.80 | 0.0144 | |
| Residual | 26.64 | 2 | 13.32 | | | |
| Cor total | 10034.255 | 7 | | | | |

분산분석 결과 계면활성제 함량과 고압유화 압력, 고압유화 횟수, 계면활성제 함량 순으로 HPH 나노에멀전 제조에 유의미한 영향($p < 0.05$)을 미쳤다. 또 계면활성제와 고압유화 압력의 상호작용, 고압유화 압력과 횟수의 상호작용 또한 HPH 나

노에멀전 제조에 유의한 영향($p < 0.05$)을 미치는 것을 확인하였다(Table 14).

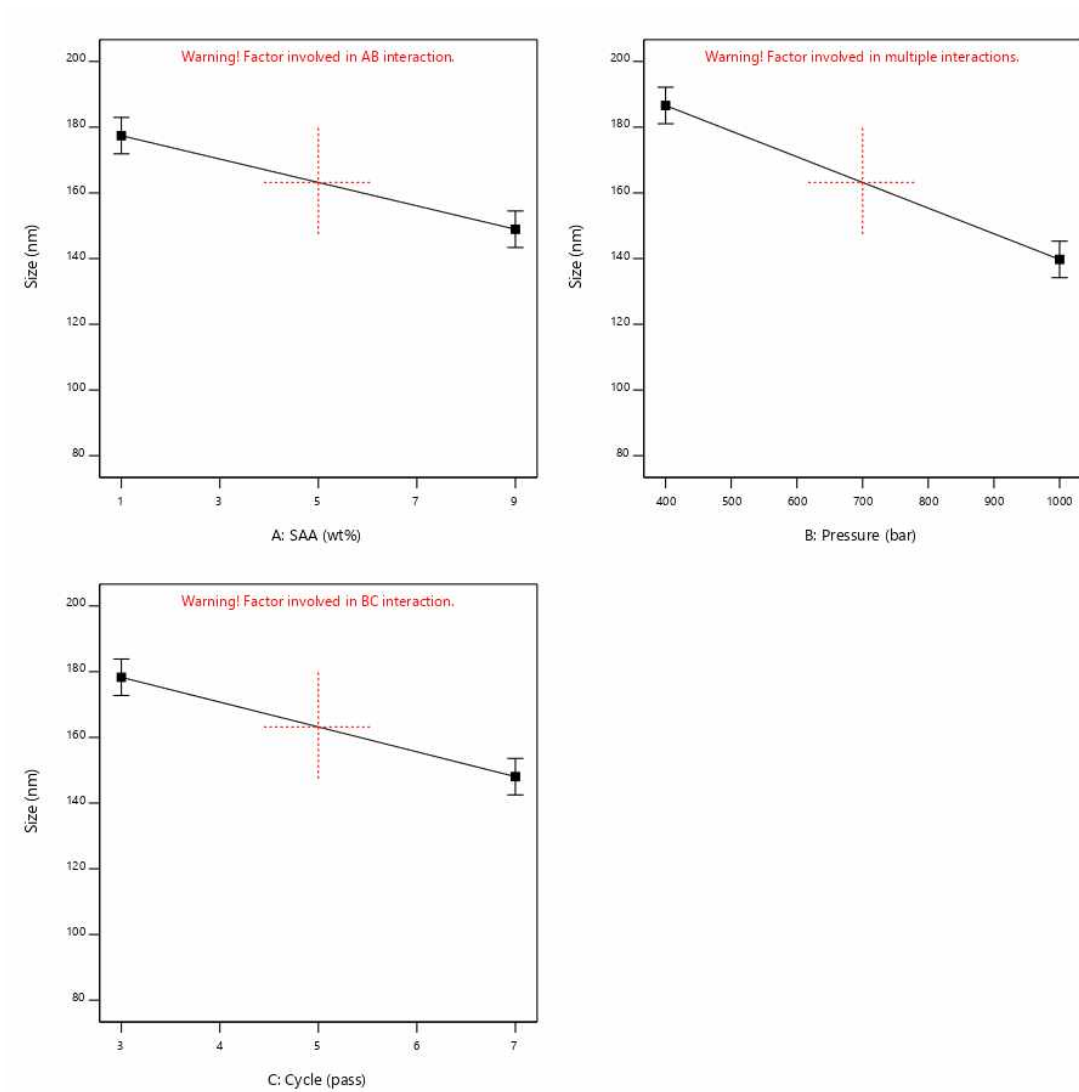


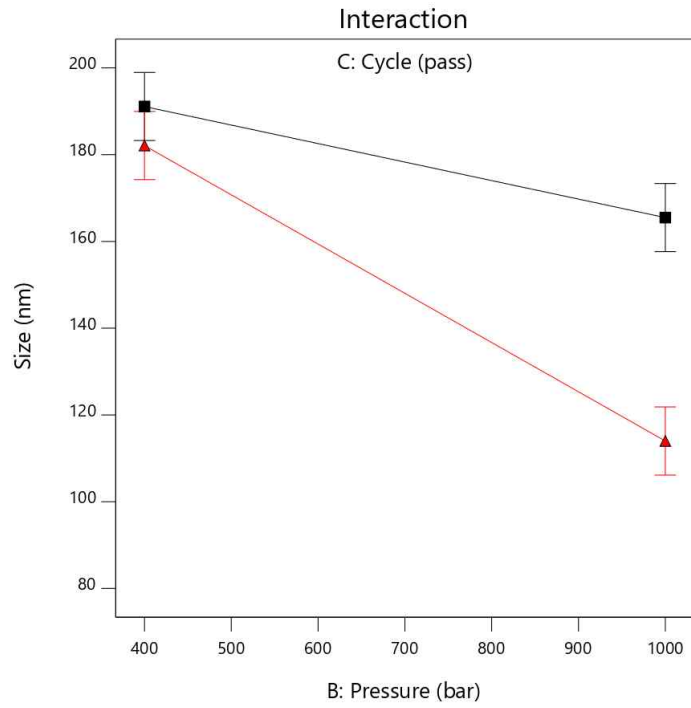
Figure 7. Main effect plot for particle size obtained from the 2^3 full factorial design of HPH method.

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

Size (nm)
X1 = B: Pressure
X2 = C: Cycle

Actual Factor
A: SAA = 5

■ C- 3
▲ C+ 7



Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

Size (nm)
X1 = A: SAA
X2 = B: Pressure

Actual Factor
C: Cycle = 5

■ B- 400
▲ B+ 1000

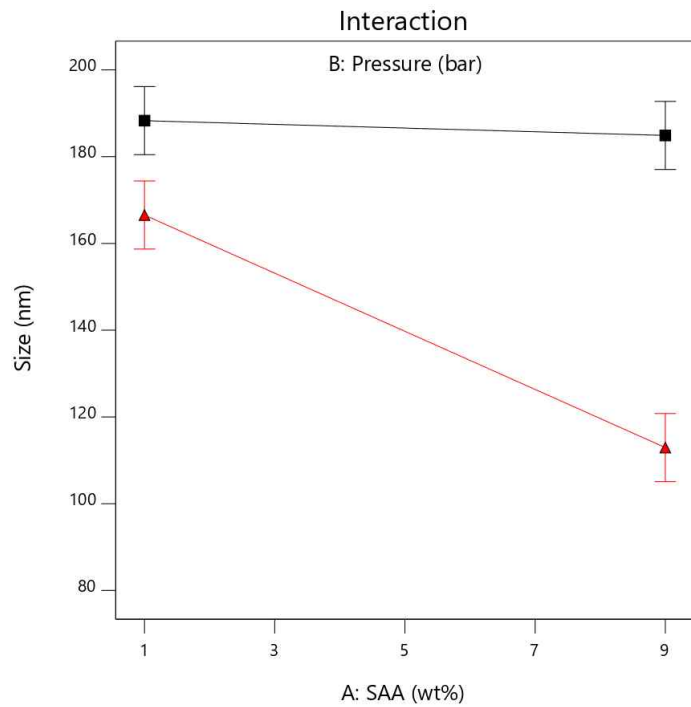


Figure 8. Interaction effect plot for particle size obtained from the 2^3 full factorial design of HPH method.

3가지 주요인자에 대한 주효과 및 상호작용 효과를 그래프로 나타내었다. 그래프에서 볼 수 있듯이 계면활성제 함량, 고압유화 압력 및 횡수가 증가할수록 나노에멀전 입자크기가 감소하는 경향을 보였다(Figure 7). 계면활성제와 고압유화 압력 상호작용 그래프를 살펴보면 고압유화 압력이 1,000 bar일 때, 계면활성제 함량이 증가할수록 나노에멀전 입자 크기가 크게 감소함을 알 수 있다. 반면 고압유화 압력이 400 bar일 경우 계면활성제 함량이 증가하여도 입자크기는 미미하게 감소하였다. 고압유화 압력 및 횡수의 상호작용 그래프를 살펴보면 고압유화 압력이 낮을 때는 고압유화 횡수가 증가하여도 입자크기가 비슷하나 압력이 증가할수록 고압유화 횡수가 많은 쪽이 입자크기가 크게 감소하는 것을 확인하였다(Figure 8).

3-1-3. 최대경사법을 이용한 HPH 방법 최적조건 확립

입자크기가 작아지는 경향을 확인하기 위해 최대경사법을 수행하였다. 완전요인배치법 결과, 고압유화 압력이 증가할수록 입자크기가 크게 감소하므로 고압유화 압력을 1,000 bar로 고정하였다. 계면활성제 함량을 중심값인 5.0 wt%를 기준으로 3.76 wt%씩 증가시키고, 고압유화 횟수도 중심값인 5 pass를 기준으로 2 pass씩 증가시켜 총 5회의 실험을 진행하였다.

계면활성제 함량 및 고압유화 횟수가 증가할수록 나노에멀전의 입자크기는 감소하였으며 계면활성제 함량 20.04 wt%, 고압유화 횟수 13 pass일 때 입자크기는 22.7 ± 0.485 nm로 가장 작은 값을 가졌다(Table 15).

Table 15. Results for the steepest ascent method of HPH nanoemulsion

| Run | Surfactant (wt%) | Cycle (pass) | Size (nm) | PDI |
|-----|------------------|--------------|-------------|-------------|
| 1 | 5.0 | 5 | 111.0±0.723 | 0.206±0.007 |
| 2 | 8.76 | 7 | 87.5±0.439 | 0.239±0.006 |
| 3 | 12.52 | 9 | 56.6±0.396 | 0.256±0.012 |
| 4 | 16.28 | 11 | 37.2±0.557 | 0.270±0.003 |
| 5 | 20.04 | 13 | 22.7±0.485 | 0.297±0.028 |

요인배치법과 최대경사법의 결과를 바탕으로 계면활성제 함량(3.0 ~ 9.0 wt%), 고압유화 압력(600 ~ 1,000 bar), 고압유화 횟수(5 ~ 13 pass)로 RSM 인자 및 수준을 결정하였다.

3-1-4. Box-Behnken design을 이용한 HPH 나노에멀전 최적화

요인배치법을 통한 예비 실험결과를 바탕으로 계면활성제 함량(3.0 ~ 9.0 wt%), 고압유화 압력(600 ~ 1,000 bar), 고압유화 횟수(5 ~ 13 pass)을 인자 및 수준을 선정하였다. Vitamin E acetate 함유 HPH 나노에멀전 최적화를 위해 Box-Behnken design을 수행하였고, 세 가지 인자가 반응변수인 HPH 나노에멀전 입자크기 및 다분산도에 미치는 영향을 확인하였다. 전체 입방체의 중심점 (Center) 5회 반복실험을 포함하여 중심점으로부터 동일한 거리인 요인실험의 중앙점 (IBFact) 12회의 총 17회의 실험을 진행하였다. Box-Behnken design 결과를 Table 16에 나타내었고, 결과 데이터를 바탕으로 분산분석을 수행하였다.

Table 16. Box-Behnken design experiments for HPH nanoemulsion optimization

| | | Factor 1 | Factor 2 | Factor 3 | Response 1 | Response 2 |
|-----|------------|----------|------------|----------|------------|------------|
| Std | Space type | A:SAA | B:Pressure | C:Cycle | Size | PDI |
| | | wt% | bar | pass | nm | |
| 1 | IBFact | 3.0 | 600 | 9 | 155.70 | 0.192 |
| 2 | IBFact | 9.0 | 600 | 9 | 125.30 | 0.243 |
| 3 | IBFact | 3.0 | 1000 | 9 | 118.53 | 0.182 |
| 4 | IBFact | 9.0 | 1000 | 9 | 72.00 | 0.237 |
| 5 | IBFact | 3.0 | 800 | 5 | 144.87 | 0.165 |
| 6 | IBFact | 9.0 | 800 | 5 | 120.70 | 0.225 |
| 7 | IBFact | 3.0 | 800 | 13 | 123.47 | 0.184 |
| 8 | IBFact | 9.0 | 800 | 13 | 84.63 | 0.241 |
| 9 | IBFact | 6.0 | 600 | 5 | 142.50 | 0.221 |
| 10 | IBFact | 6.0 | 1000 | 5 | 109.47 | 0.212 |
| 11 | IBFact | 6.0 | 600 | 13 | 121.20 | 0.194 |
| 12 | IBFact | 6.0 | 1000 | 13 | 85.75 | 0.198 |
| 13 | Center | 6.0 | 800 | 9 | 123.70 | 0.207 |
| 14 | Center | 6.0 | 800 | 9 | 110.03 | 0.202 |
| 15 | Center | 6.0 | 800 | 9 | 111.67 | 0.202 |
| 16 | Center | 6.0 | 800 | 9 | 106.87 | 0.189 |
| 17 | Center | 6.0 | 800 | 9 | 106.40 | 0.204 |

3-1-4-1. 입자크기(Y_1)에 미치는 영향

Box-Behnken design 결과를 통해 세 가지 인자(계면활성제 함량, 고압유화 압력, 고압유화 횟수)가 반응변수인 나노에멀전의 입자크기에 미치는 영향을 확인하였다.

Table 17. ANOVA for reduced quadratic model

| Source | SS | df | Mean | F-value | p-value | |
|----------------|---------|----|---------|---------|---------|-----------------|
| Model | 7156.26 | 8 | 894.53 | 22.69 | 0.0001 | significant |
| A-SAA | 2447.90 | 1 | 2447.90 | 62.10 | <0.0001 | |
| B-Pressure | 3158.14 | 1 | 3158.14 | 80.11 | <0.0001 | |
| C-Cycle | 1313.03 | 1 | 1313.03 | 33.31 | 0.0004 | |
| AB | 65.04 | 1 | 65.04 | 1.65 | 0.2349 | |
| AC | 53.80 | 1 | 53.80 | 1.36 | 0.2763 | |
| BC | 1.46 | 1 | 1.46 | 0.0371 | 0.8520 | |
| A ² | 106.02 | 1 | 106.02 | 2.69 | 0.1397 | |
| B ² | 7.39 | 1 | 7.39 | 0.1876 | 0.6764 | |
| Residual | 315.37 | 8 | 39.42 | | | |
| Lack of fit | 117.17 | 4 | 29.29 | 0.5911 | 0.6885 | not significant |
| Pure error | 198.20 | 4 | 49.55 | | | |
| Cor total | 7471.63 | 16 | | | | |

Table 17의 결과는 축소된 이차다항식(reduced quadratic) 모형이 예측에 적합함을 나타낸다. 모형의 p-value (<0.05)와 F-value는 이 다항식 모형이 시스템을 잘 나타냄을 보여주었다. 나노에멀전 입자크기에 대한 제안된 반응표면모형은 다음과 같다.

$$Y_1 = 112.48 - 17.49A - 19.87B - 12.81C - 4.03AB - 3.67AC - 0.61BC + 5.01A^2 + 1.32B^2$$

Y_1 은 나노에멀전의 입자크기를 의미하고, A는 계면활성제 함량, B는 고압유화 압력, C는 고압유화 횟수를 나타낸다. 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[41].

분산분석 결과에 따라 나노에멀전 입자크기에 가장 큰 영향을 미치는 요인은 계면활성제 함량 및 고압유화 압력이었고, 그 다음이 고압유화 횟수, 계면활성제 함량의 이차항, 계면활성제와 고압유화 압력의 상호작용, 계면활성제와 고압유화 횟수의 상호작용, 고압유화 압력의 이차항, 고압유화 압력과 횟수의 상호작용 순이었다. 그 중에서 계면활성제 함량, 고압유화 압력 및 횟수가 입자크기에 가장 유의미한 영향($p < 0.05$)을 미쳤다.

반응변수에 대한 세가지 인자의 효과를 시각화하기 위해 실험범위 내에서 세가지 인자 중 한 가지를 중심점에 고정하고 나머지 두 가지의 인자를 변화시켜 2차 다항식 모형의 3D surface 및 등고선 그래프를 생성하였다(Figure 9-11).

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

Size (nm)

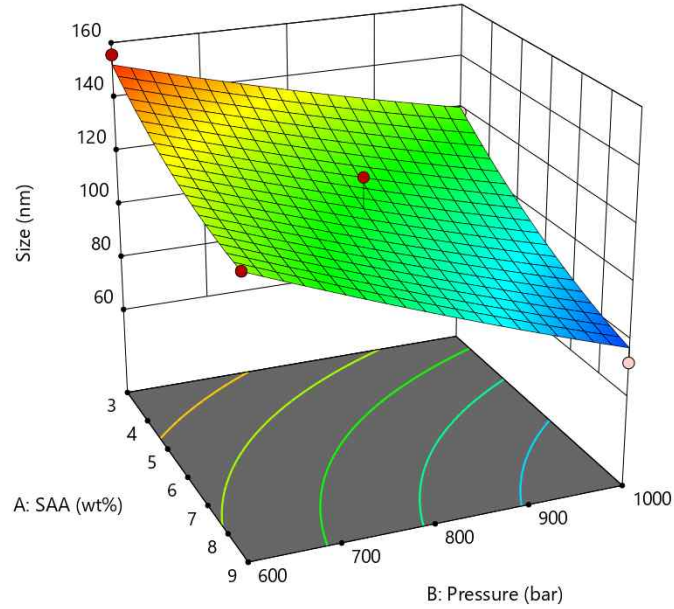
● Design points above predicted value

○ Design points below predicted value

72 155.7

X1 = A: SAA
X2 = B: Pressure

Actual Factor
C: Cycle = 9



Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

Size (nm)

● Design Points

72 155.7

X1 = A: SAA
X2 = B: Pressure

Actual Factor
C: Cycle = 9

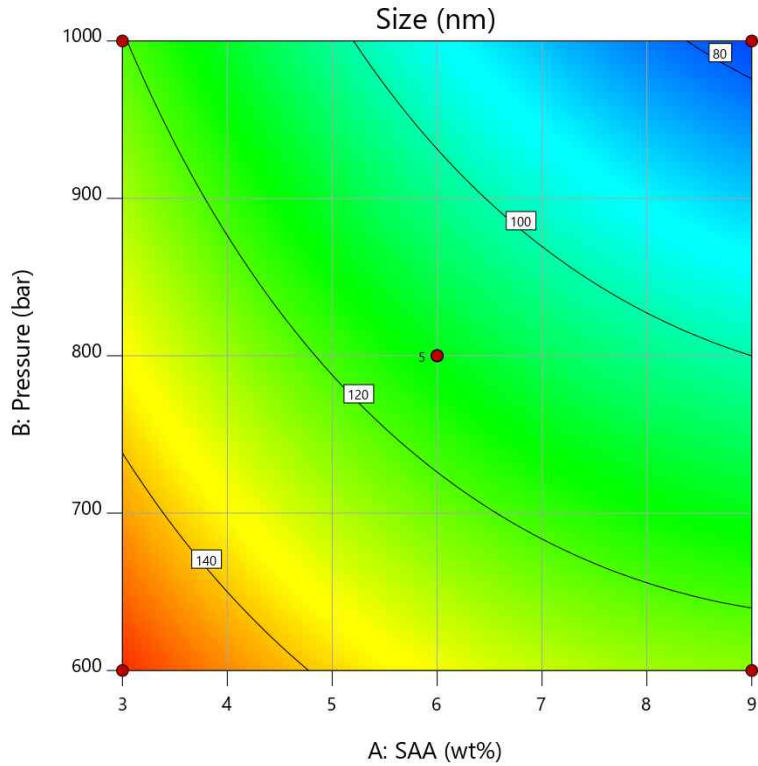


Figure 9. 3D surface model for particle size of HPH nanoemulsion depending on surfactant and HPH pressure.

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

Size (nm)

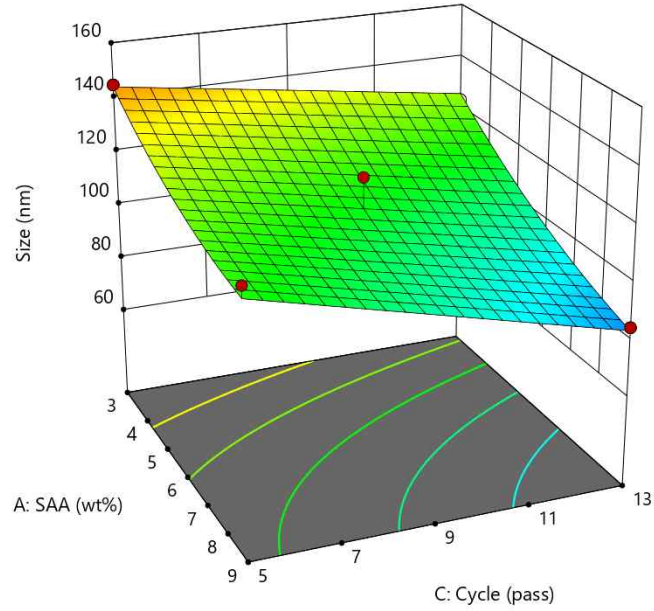
● Design points above predicted value

○ Design points below predicted value

72 155.7

X1 = A: SAA
X2 = C: Cycle

Actual Factor
B: Pressure = 800



Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

Size (nm)

● Design Points

72 155.7

X1 = A: SAA
X2 = C: Cycle

Actual Factor
B: Pressure = 800

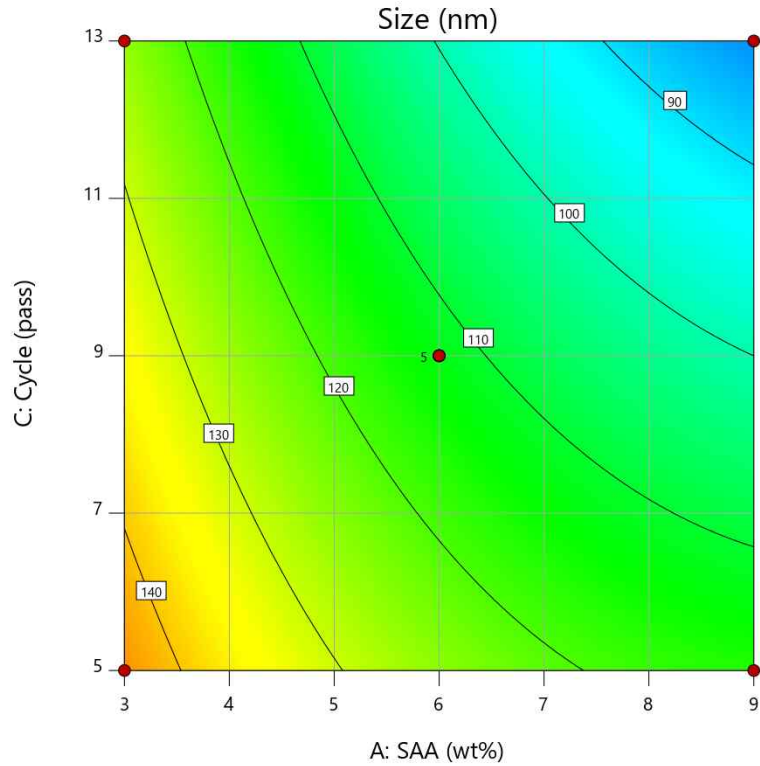


Figure 10. 3D surface model for particle size of HPH nanoemulsion depending on surfactant and HPH cycle.

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

Size (nm)

● Design points above predicted value

○ Design points below predicted value

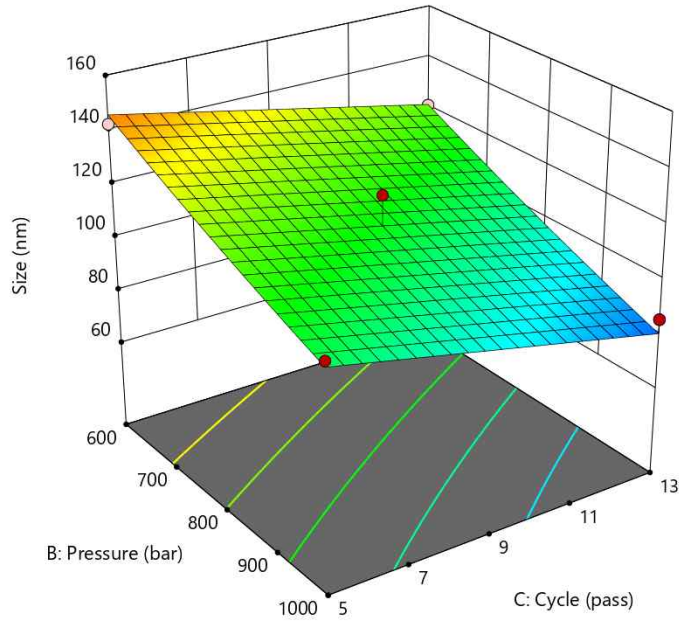
72 155.7

X1 = B: Pressure

X2 = C: Cycle

Actual Factor

A: SAA = 6



Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

Size (nm)

● Design Points

72 155.7

X1 = B: Pressure

X2 = C: Cycle

Actual Factor

A: SAA = 6

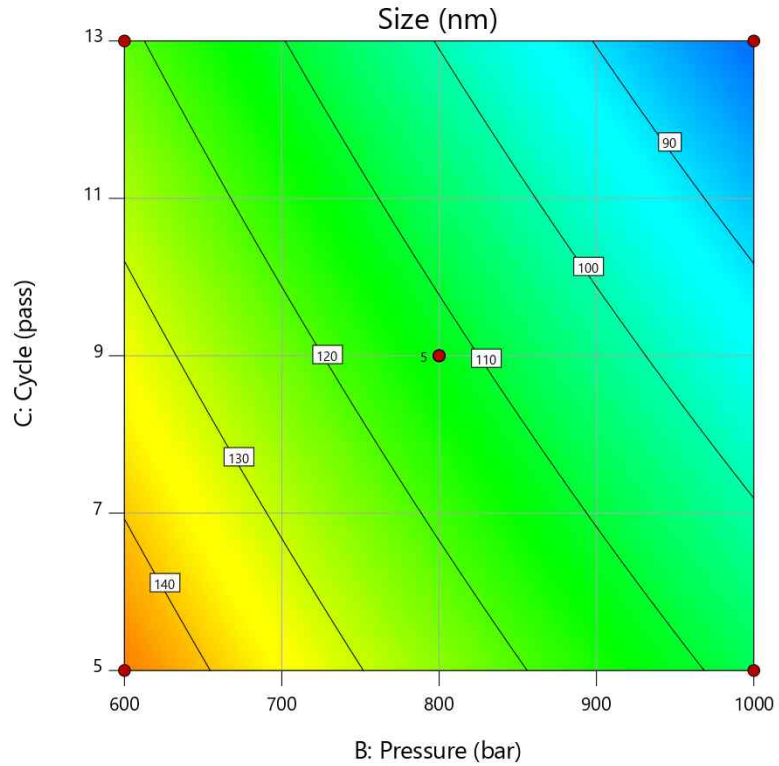


Figure 11. 3D surface model for particle size of HPH nanoemulsion depending on HPH pressure and HPH cycle.

Figure 9는 고압유화 횡수를 9 pass로 고정하고 계면활성제 함량과 고압유화 압력을 변화시켰다. 실험범위 내에서 계면활성제 함량 및 고압유화 압력이 증가할수록 입자 크기가 감소 경향을 보였다($p < 0.05$).

Figure 10은 고압유화 압력을 800 bar로 고정하고 계면활성제 함량과 고압유화 횡수를 변화시켰다. 실험범위 내에서 계면활성제 함량 및 고압유화 횡수가 증가할수록 입자크기가 감소하는 경향을 보였다($p < 0.05$).

Figure 11은 계면활성제 함량을 6.0 wt%로 고정하고 고압유화 압력 및 횡수를 변화시켰다. 고압유화 압력 및 횡수가 증가할수록 입자크기가 감소하였고, 그래프는 거의 선형에 가까운 모형을 나타냈다.

3-1-4-2. 다분산도(Y_2)에 미치는 영향

Box-Behnken design 결과 세 가지 인자(계면활성제 함량, 고압유화 압력, 고압유화 횟수)가 반응변수인 나노에멀전의 다분산도에 미치는 영향을 확인하였다.

Table 18. ANOVA for linear model

| Source | SS | df | Mean | F-value | p-value | |
|-------------|--------|----|--------|---------|---------|-----------------|
| Model | 0.0063 | 3 | 0.0021 | 19.83 | <0.0001 | significant |
| A-SAA | 0.0062 | 1 | 0.0062 | 58.93 | <0.0001 | |
| B-Pressure | 0.0001 | 1 | 0.0001 | 0.5226 | 0.4825 | |
| C-Cycle | 0.0000 | 1 | 0.0000 | 0.0427 | 0.8396 | |
| Residual | 0.0014 | 13 | 0.0001 | | | |
| Lack of fit | 0.0012 | 9 | 0.0001 | 2.75 | 0.1714 | not significant |
| Pure error | 0.0002 | 4 | 0.0000 | | | |
| Cor total | 0.0076 | 16 | | | | |

Table 18의 결과는 선형 (Linear) 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 다분산도에 대한 제안된 반응표면모형은 다음과 같다.

$$Y_2 = 0.206 + 0.0279A - 0.0026B - 0.0008C$$

Y_2 은 나노에멀전의 다분산도를 의미하고, A는 계면활성제 함량, B는 고압유화 압력, C는 고압유화 횟수를 나타낸다.

분산분석 결과에 따라 나노에멀전 다분산도에 가장 큰 영향을 미치는 요인은 계면활성제 함량이었고, 그 다음이 고압유화 압력, 고압유화 횟수 순이었다. 그 중에서 계면활성제 함량이 다분산도에 가장 유의미한 영향($p < 0.05$)을 미쳤다.

반응변수에 대한 세 가지 인자의 효과를 시각화하기 위해 다항식 모형의 3D surface 및 등고선 그래프를 생성하였다(Figure 12-14).

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

PDI

● Design points above predicted value

○ Design points below predicted value

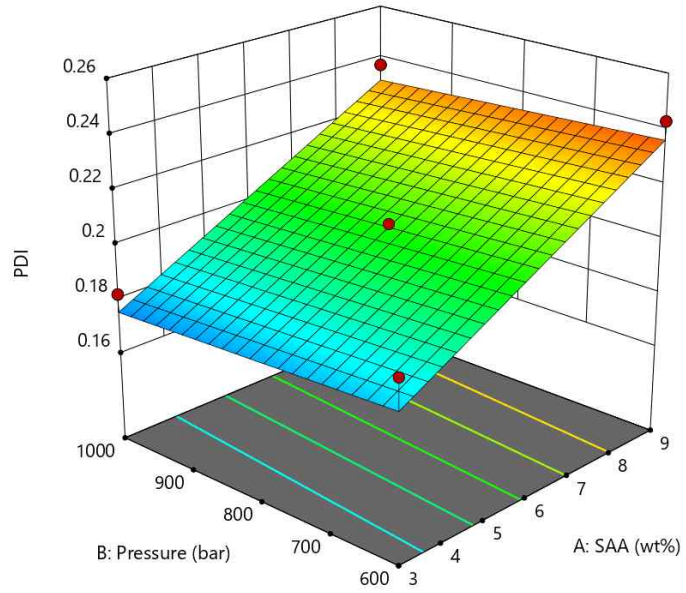
0.165 0.243

X1 = A: SAA

X2 = B: Pressure

Actual Factor

C: Cycle = 9



Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

PDI

● Design Points

0.165 0.243

X1 = A: SAA

X2 = B: Pressure

Actual Factor

C: Cycle = 9

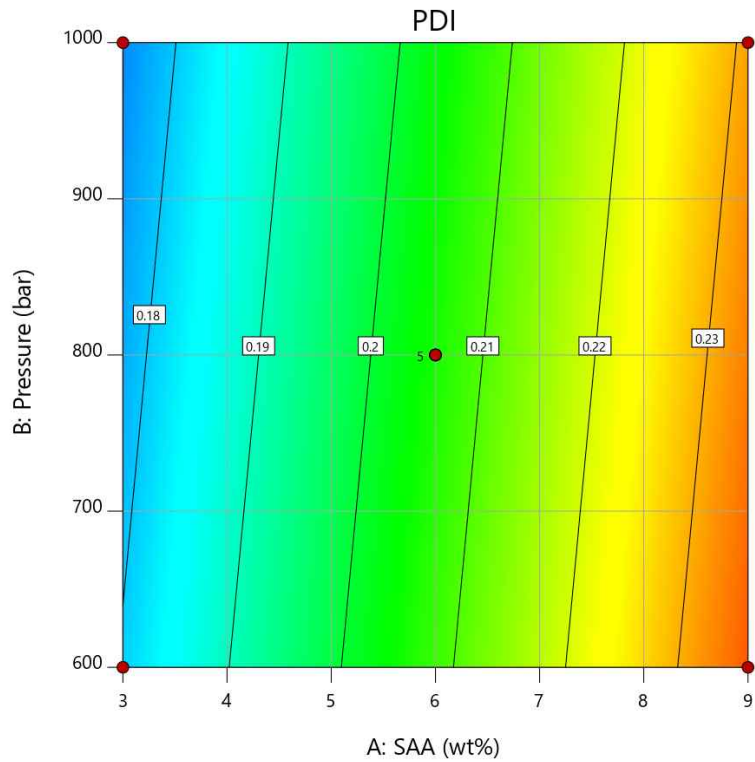


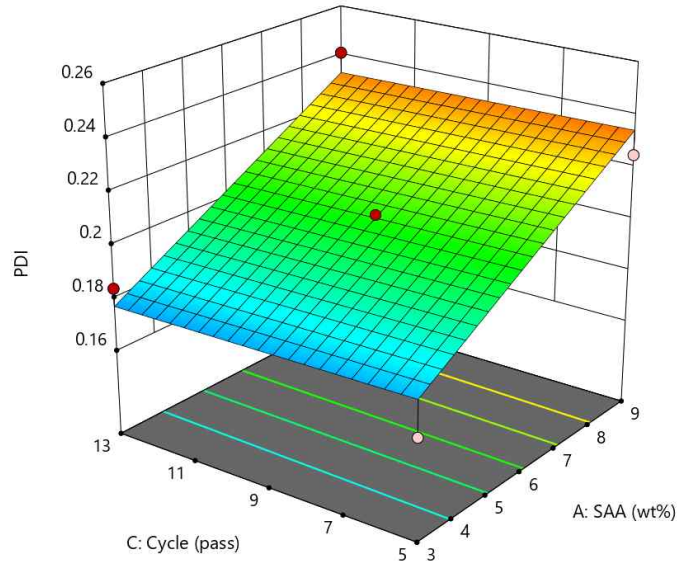
Figure 12. 3D surface model for polydispersity index of HPH nanoemulsion depending on surfactant and HPH pressure.

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

PDI
● Design points above predicted value
○ Design points below predicted value
0.165 0.243

X1 = A: SAA
X2 = C: Cycle

Actual Factor
B: Pressure = 800



Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

PDI
● Design Points
0.165 0.243

X1 = A: SAA
X2 = C: Cycle

Actual Factor
B: Pressure = 800

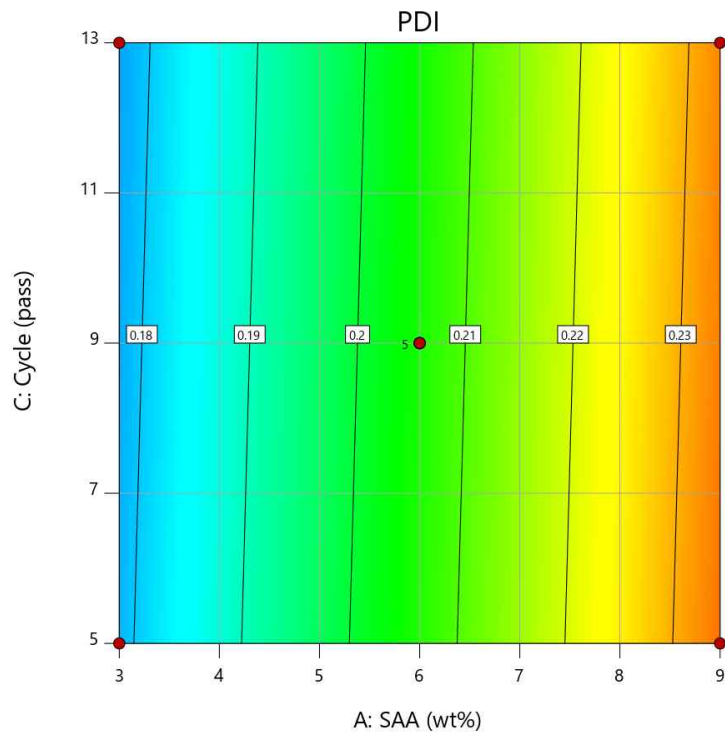


Figure 13. 3D surface model for polydispersity index of HPH nanoemulsion depending on surfactant and HPH cycle.

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

PDI

● Design points above predicted value

○ Design points below predicted value

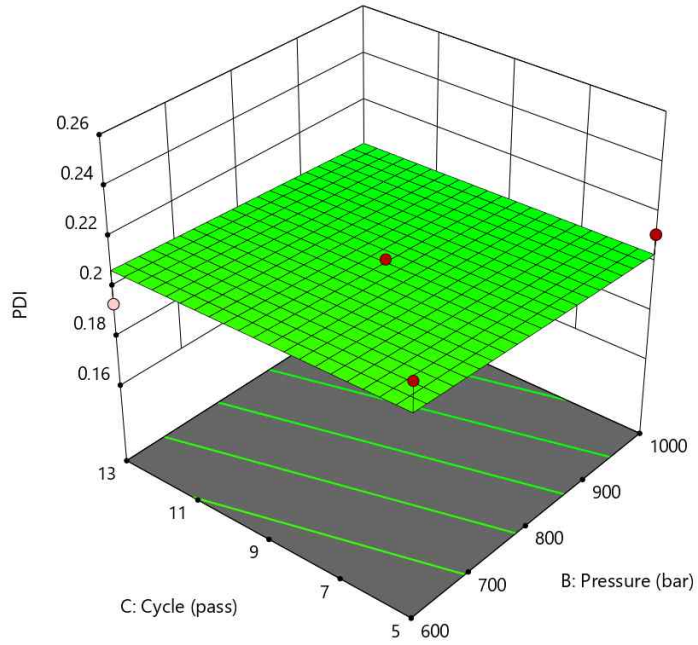
0.165 0.243

X1 = B: Pressure

X2 = C: Cycle

Actual Factor

A: SAA = 6



Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

PDI

● Design Points

0.165 0.243

X1 = B: Pressure

X2 = C: Cycle

Actual Factor

A: SAA = 6

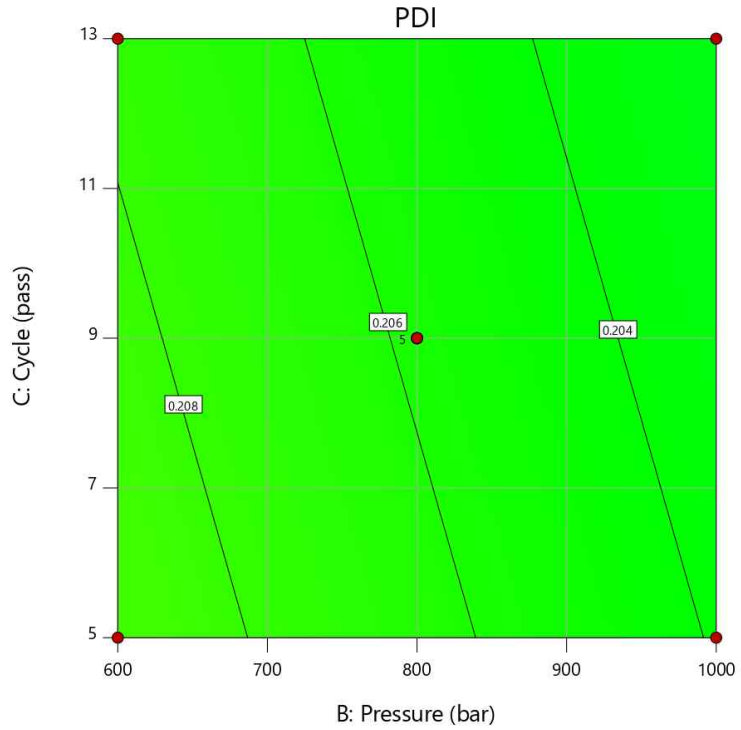


Figure 14. 3D surface model for polydispersity index of HPH nanoemulsion depending on HPH pressure and cycle.

Figure 12는 고압유화 횟수를 9 pass로 고정하고 계면활성제 함량과 고압유화 압력을 변화시켰다. 실험범위 내에서 계면활성제 함량이 증가할수록 다분산도가 급격히 증가하는 경향을 보였다($p < 0.05$). 또 고압유화 압력이 증가할수록 다분산도가 감소하는 경향을 보였으나 그 영향은 미미했다($p > 0.05$).

Figure 13은 고압유화 압력을 800 bar로 고정하고 계면활성제 함량과 고압유화 횟수를 변화시켰다. 실험범위 내에서 계면활성제 함량이 증가할수록 다분산도가 급격히 증가하는 경향($p < 0.05$)을 보였으나, 고압유화 횟수는 다분산도에 큰 영향을 미치지 않았다($p > 0.05$).

Figure 14는 계면활성제 함량을 6.0 wt%로 고정하고 고압유화 압력 및 횟수를 변화시켰다. 고압유화 압력 및 횟수가 증가할수록 나노에멀전의 다분산도가 감소하는 경향을 보였으나 그 효과는 매우 미미하였다($p > 0.05$).

3-1-5. 최적의 HPH 나노에멀전 제조

Box-Behnken design 결과를 바탕으로 Vitamin E acetate 함유 HPH 나노에멀전의 최적화를 수행하였다. Vitamin E acetate 함유 HPH 나노에멀전은 실험범위 내에서 나노에멀전의 입자크기 및 다분산도가 최소값을 가지는 것을 목표로 하였다. 앞에서 언급한 조건을 바탕으로 계면활성제 함량 5.0 wt%, 고압유화 압력 1,000 bar, 고압유화 횟수 13 pass를 최적 조건으로 선택하였다(Table 19).

Table 19. Optimization HPH nanoemulsion condition

| Independent variables | Optimum conditions |
|-----------------------|--------------------|
| A-Surfactant (wt%) | 5.016 |
| B-Pressure (bar) | 1,000 |
| C-Cycle (pass) | 13 |
| Dependent variables | Predicted value |
| Y1-Size(nm) | 89.32 |
| Y2-PDI | 0.193 |

최적 조건을 바탕으로 Vitamin E acetate 함유 HPH 나노에멀전을 제조하였다. 3회 반복 제조하여 나노에멀전의 입자크기 및 다분산도를 측정하였고, 입자크기 및 다분산도가 예상값의 95% 신뢰수준 이내에 들어오는 것을 확인하였다 (Table 20).

Table 20. Confirmation of HPH nanoemulsion

| Solution 32 of 48 | Predicted | Std Dev | n | SE Pred | 95% PI low | Data Mean | 95% PI high |
|----------------------|-----------|---------|---|------------|---------------|--------------|----------------|
| Size | 89.32 | 6.28 | 3 | 6.47 | 74.40 | 92.28 | 104.24 |
| PDI | 0.193 | 0.010 | 3 | 0.008 | 0.175 | 0.206 | 0.211 |

Std Dev (Standard Deviation), SE Pred (Standard Error Predicted), PI (Predictive Interval)

3-2. 저에너지 방법을 이용한 나노에멀전 제조 및 최적화

3-2-1. 일부요인배치법을 이용한 PIT 방법 주요인자 확인

PIT 방법으로 제조한 나노에멀전 최적화를 위해 2^{6-3} 일부요인배치법을 사용하였다. 나노에멀전 제조에 영향을 주는 요인으로 계면활성제 함량(8.4 ~ 12.6 wt%), 보조계면활성제 함량(5.2 ~ 7.8 wt%), 오일 함량(13.0 ~ 23.0 wt%), VEA 함량(1.0 ~ 5.0 wt%), 유화시간(5 ~ 10 min), 유화온도(80 ~ 90°C)의 6 가지를 선정하였다. 나노에멀전의 입자크기를 반응변수로 하여 랜덤으로 총 8 회의 실험이 진행되었다(Table 21).

Table 21. Experimental matrix for the 2^{6-3} fractional factorial design of PIT method

| | Factor 1 | Factor 2 | Factor 3 | Factor 4 | Factor 5 | Factor 6 | Response 1 |
|-----|----------|----------|----------|----------|----------|----------|------------|
| Std | A:SAA | B:Co-SAA | C:Oil | D:VEA | E:Time | F:Temp. | Size |
| | wt% | wt% | wt% | wt% | min | degree C | nm |
| 1 | 8.4 | 5.2 | 13 | 5 | 10 | 90 | 53.79 |
| 2 | 12.6 | 5.2 | 13 | 1 | 5 | 90 | 40.66 |
| 3 | 8.4 | 7.8 | 13 | 1 | 10 | 80 | 58.64 |
| 4 | 12.6 | 7.8 | 13 | 5 | 5 | 80 | 40.92 |
| 5 | 8.4 | 5.2 | 23 | 5 | 5 | 80 | 188.37 |
| 6 | 12.6 | 5.2 | 23 | 1 | 10 | 80 | 203.93 |
| 7 | 8.4 | 7.8 | 23 | 1 | 5 | 90 | 89.23 |
| 8 | 12.6 | 7.8 | 23 | 5 | 10 | 90 | 66.35 |

Table 22. ANOVA of the 2^{6-3} fractional factorial design of PIT method

| Source | SS | df | Mean | F-value | p-value | |
|-----------|-----------|----|-----------|---------|---------|-------------|
| Model | 29,668.62 | 3 | 9,889.54 | 63.19 | 0.0008 | significant |
| B-Co-SAA | 6,705.40 | 1 | 6,705.40 | 42.85 | 0.0028 | |
| C-Oil | 15,653.00 | 1 | 15,653.00 | 100.02 | 0.0006 | |
| F-Temp. | 7,310.22 | 1 | 7,310.22 | 46.71 | 0.0024 | |
| Residual | 626.00 | 4 | 156.50 | | | |
| Cor total | 30,294.62 | 7 | | | | |

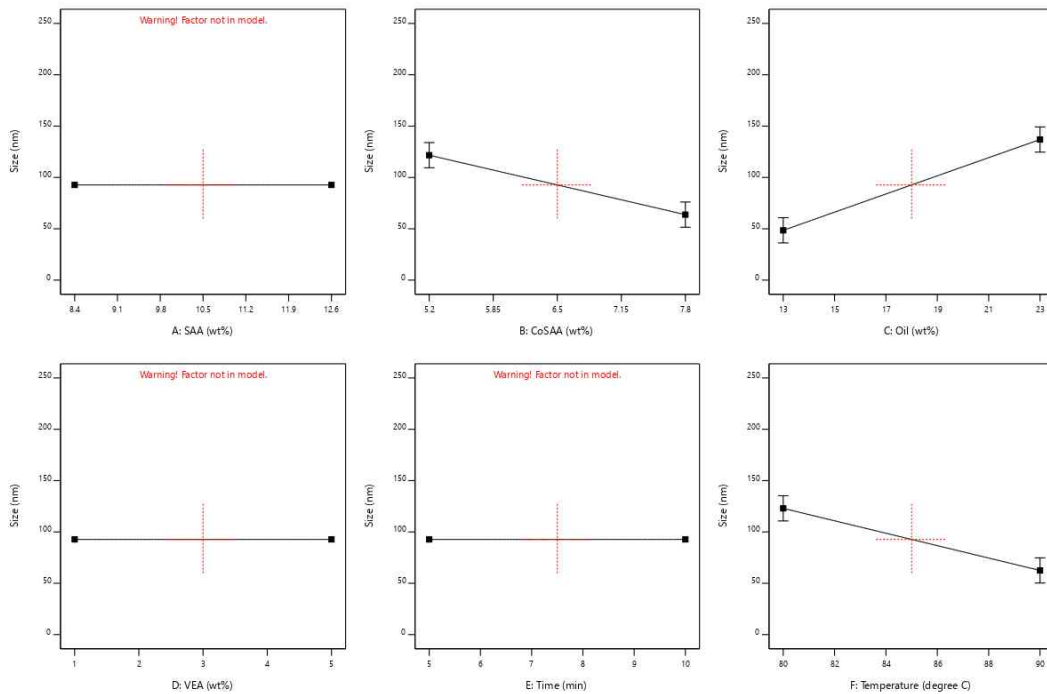


Figure 15. Main effect plot for particle size obtained from the 2^{6-3} fractional factorial design of PIT method.

분산분석 결과 보조계면활성제 함량, 오일 함량 및 유화온도가 가장 유의한 영향 ($p < 0.05$)을 가짐을 확인하였다. 인자들의 주효과를 Figure 15에 나타내었다. 그림에서 볼 수 있듯이 주요인자인 보조계면활성제 및 오일 함량, 유화온도 그래프는 다른 인자들에 비해 나노에멀전 입자크기가 크게 변화하는 것을 알 수 있다. 위 결과를 바탕으로 보조계면활성제 함량, 오일 함량, 유화온도의 세 가지 요인을 주요인자로 하여 완전요인배치법을 진행하였다. 일부요인배치법의 결과를 참고하여 나머지 세 가지 요인들의

값을 고정하였다. 계면활성제 함량 10.5 wt%, VEA 함량 5.0 wt%, 유화시간 10 min으로 고정하여 2³ 완전요인배치법을 수행하였다.

3-2-2. 완전요인배치법을 이용한 PIT 방법 인자 수준 결정

일부요인배치법 결과를 바탕으로 보조계면활성제 함량(5.2 ~ 7.8 wt%), 오일 함량(13.0 ~ 23.0 wt%), 유화온도(80 ~ 95°C)를 인자로 선정하여 2³ 완전요인배치법을 수행하였다. 세 가지 요인이 반응변수인 PIT 나노에멀전의 입자크기에 미치는 영향을 확인하였다(Table 23).

Table 23. Experimental matrix for the 2³ full factorial design of PIT method

| | Factor 1 | Factor 2 | Factor 3 | Response 1 |
|-----|----------|----------|---------------|------------|
| Std | A:Co-SAA | B:Oil | C:Temperature | Size |
| | wt% | wt% | degree C | nm |
| 1 | 5.2 | 13 | 80 | 48.22 |
| 2 | 7.8 | 13 | 80 | 49.86 |
| 3 | 5.2 | 23 | 80 | 165.43 |
| 4 | 7.8 | 23 | 80 | 72.94 |
| 5 | 5.2 | 13 | 95 | 48.39 |
| 6 | 7.8 | 13 | 95 | 49.01 |
| 7 | 5.2 | 23 | 95 | 117.83 |
| 8 | 7.8 | 23 | 95 | 67.66 |

Table 24. ANOVA of the 2³ full factorial design of PIT method

| Source | SS | df | Mean | F-value | p-value | |
|-----------|-----------|----|----------|---------|---------|-------------|
| Model | 11,967.51 | 4 | 2,991.88 | 11.38 | 0.0370 | significant |
| A-Co-SAA | 2,464.02 | 1 | 2,464.02 | 9.37 | 0.0549 | |
| B-Oil | 6,519.68 | 1 | 6,519.68 | 24.80 | 0.0155 | |
| C-Temp. | 358.58 | 1 | 358.58 | 1.36 | 0.3272 | |
| AB | 2,625.23 | 1 | 2,625.23 | 9.99 | 0.0509 | |
| Residual | 788.61 | 3 | 262.87 | | | |
| Cor Total | 12,756.12 | 7 | | | | |

분산분석 결과 오일 함량, 보조계면활성제 함량과 오일 함량 상호작용, 보조계면활성제 함량, 유화온도 순으로 PIT 나노에멀전 입자크기에 영향을 미쳤다. 오일 함량, 보조계면활성제 함량 및 보조계면활성제와 오일 함량의 상호작용이

PIT 나노에멀전에 가장 유의미한 영향($p < 0.1$)을 미쳤다(Table 24).

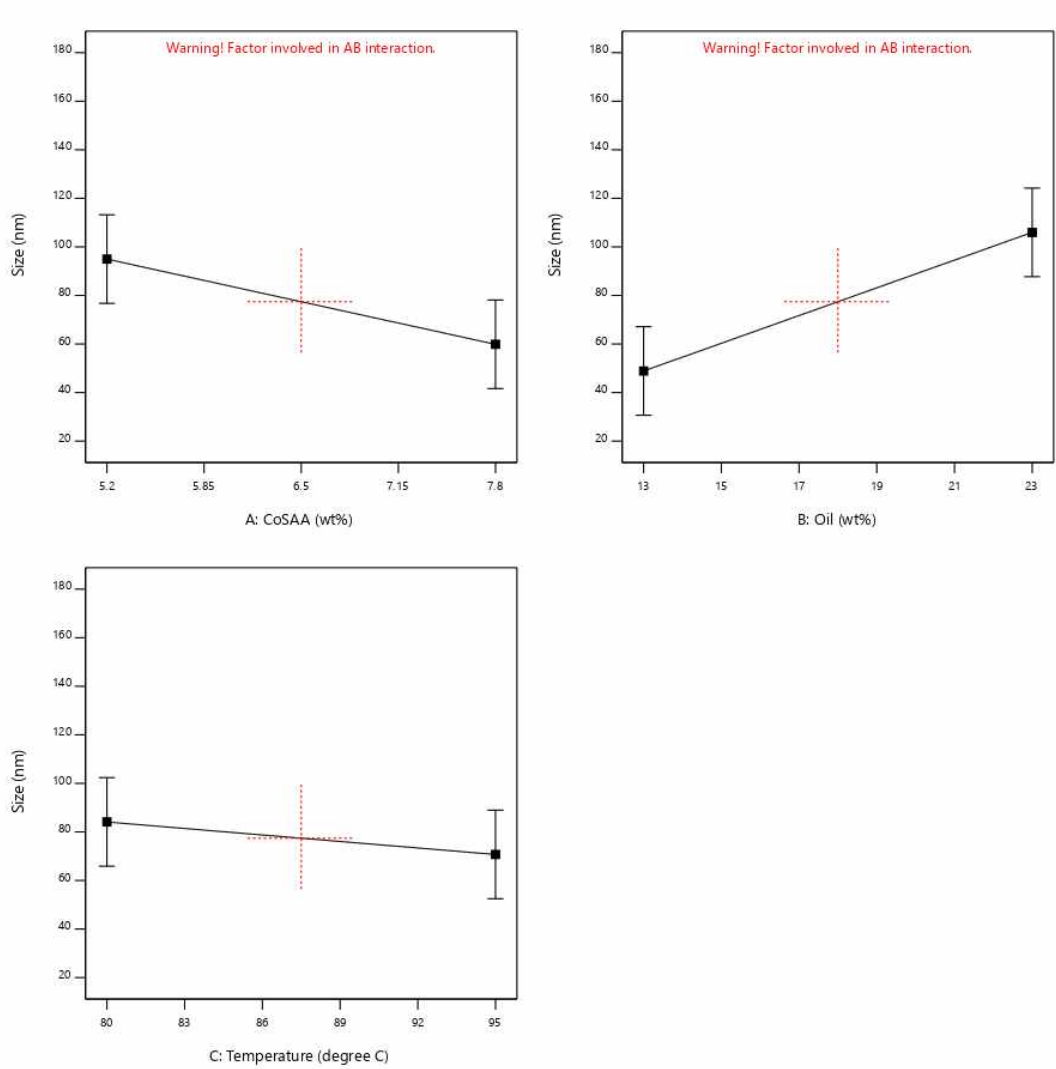


Figure 16. Main effect plot for particle size obtained from the 2^3 full factorial design of PIT method.

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

Size (nm)

X1 = A: CoSAA
X2 = B: Oil

Actual Factor
C: Temperature = 87.5

■ B- 13
▲ B+ 23

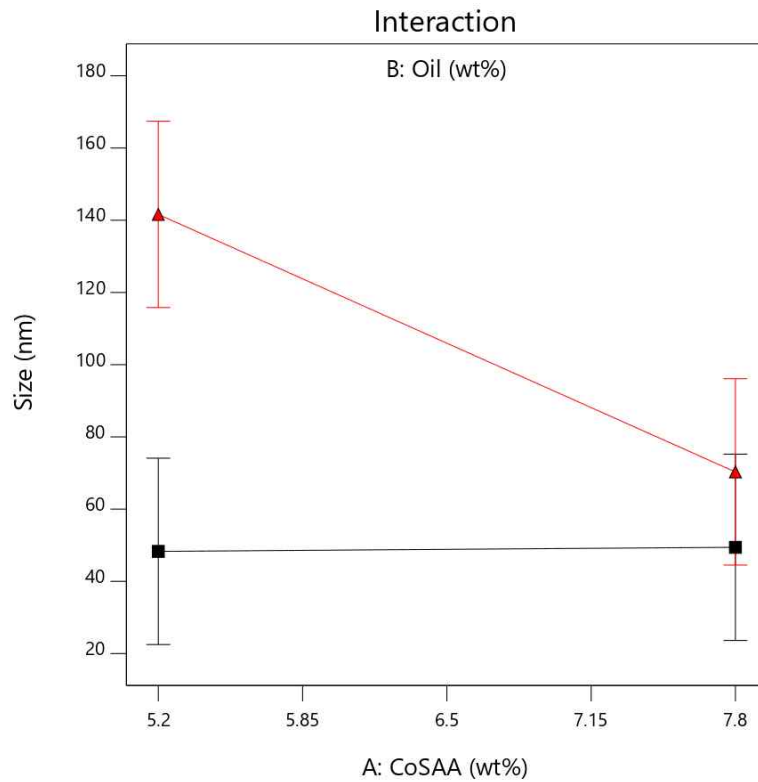


Figure 17. Interaction effect plot for particle size obtained from the 2^3 full factorial design of PIT method.

3가지 인자에 대한 주효과를 Figure 16에 나타내었다. 그래프에서 볼 수 있듯이 보조계면활성제 함량이 증가할수록 오일 함량이 감소할수록 나노에멀전 입자크기가 감소하는 경향을 보였다($p < 0.1$). 실험범위 내에서 유효온도가 증가할수록 입자크기가 감소하는 경향을 보였으나 그 효과는 미미하였다($p > 0.1$). 보조계면활성제와 오일 함량의 상호작용 그래프(Figure 17)를 살펴보면 오일 함량이 13.0 wt%일 때, 보조계면활성제 함량이 증가하여도 입자크기에 큰 영향을 미치지 않는 반면 오일 함량이 23.0 wt%일 때에는 보조계면활성제 함량이 증가할수록 입자크기는 크게 감소하는 것을 확인하였다($p < 0.1$).

3-2-3. 최대경사법을 이용한 PIT 방법 최적조건 확립

PIT 나노에멀전 입자크기 감소 경향을 확인하기 위해 최대경사법을 수행하였다. 완전요인배치법 결과, 오일 함량이 감소할수록 입자크기가 크게 감소하므로 오일 함량을 13 wt%로 고정하였다. 보조계면활성제 함량을 5.2 wt% 기준으로 0.65 wt%씩 증가시키고, 유화온도를 67.85°C 기준으로 9.83°C씩 증가시켜 총 4회의 실험을 진행하였다(Table 25).

Table 25. Results for the steepest ascent method of PIT nanoemulsion

| Run | Co-SAA (wt%) | Temperature (°C) | Size (nm) | PDI |
|-----|--------------|------------------|-------------|-------------|
| 1 | 5.20 | 67.85 | 99.48±1.968 | 0.173±0.009 |
| 2 | 5.85 | 77.68 | 44.50±0.435 | 0.191±0.009 |
| 3 | 6.50 | 87.51 | 47.22±0.722 | 0.237±0.011 |
| 4 | 7.15 | 97.34 | 58.75±1.241 | 0.363±0.011 |

요인배치법과 최대경사법의 결과를 바탕으로 세 가지 인자 (보조계면활성제 함량 (5.2 ~ 7.8 wt%), 오일 함량 (13.0 ~ 23.0 wt%), 유화온도 (75 ~ 95°C))의 수준을 결정하였다.

3-2-4. Box-Behnken design을 이용한 PIT 나노에멀전 최적화

요인배치법을 통한 예비 실험결과를 바탕으로 계보조계면활성제 함량 (5.2 ~ 7.8 wt%), 오일 함량 (13.0 ~ 23.0 wt%), 유화온도 (75 ~ 95°C)를 인자로 선정하였고, Vitamin E acetate 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 26에 나타내었고, 결과 데이터를 바탕으로 분산분석을 수행하였다.

Table 26. Box-Behnken design experiments for PIT nanoemulsion optimization

| | | Factor 1 | Factor 2 | Factor 3 | Response 1 | Response 2 |
|-----|------------|----------|----------|----------|------------|------------|
| Std | Space type | A:Co-SAA | B:Oil | C:Temp. | Size | PDI |
| | | wt% | wt% | degree C | nm | |
| 1 | IBFact | 5.2 | 13 | 85 | 51.21 | 0.225 |
| 2 | IBFact | 7.8 | 13 | 85 | 51.19 | 0.241 |
| 3 | IBFact | 5.2 | 23 | 85 | 199.4 | 0.144 |
| 4 | IBFact | 7.8 | 23 | 85 | 63.23 | 0.202 |
| 5 | IBFact | 5.2 | 18 | 75 | 140.3 | 0.168 |
| 6 | IBFact | 7.8 | 18 | 75 | 57.32 | 0.237 |
| 7 | IBFact | 5.2 | 18 | 95 | 61.26 | 0.140 |
| 8 | IBFact | 7.8 | 18 | 95 | 54.75 | 0.227 |
| 9 | IBFact | 6.5 | 13 | 75 | 47.60 | 0.229 |
| 10 | IBFact | 6.5 | 23 | 75 | 144.33 | 0.222 |
| 11 | IBFact | 6.5 | 13 | 95 | 46.06 | 0.218 |
| 12 | IBFact | 6.5 | 23 | 95 | 72.93 | 0.148 |
| 13 | Center | 6.5 | 18 | 85 | 78.39 | 0.222 |
| 14 | Center | 6.5 | 18 | 85 | 53.50 | 0.153 |
| 15 | Center | 6.5 | 18 | 85 | 56.31 | 0.200 |
| 16 | Center | 6.5 | 18 | 85 | 54.55 | 0.174 |
| 17 | Center | 6.5 | 18 | 85 | 59.05 | 0.212 |

3-2-4-1. 입자크기(Y_1)에 미치는 영향

Box-Behnken design 결과 세 가지 인자(보조계면활성제 함량, 오일 함량, 유화온도)가 반응변수인 PIT 나노에멀전 입자크기에 미치는 영향을 확인하였다.

Table 27. ANOVA for quadratic model

| Source | SS | df | Mean | F-value | p-value | |
|----------------|----------|----|----------|---------|---------|-----------------|
| Model | 28927.65 | 9 | 3214.18 | 25.75 | 0.0001 | significant |
| A-Co-SAA | 6366.43 | 1 | 6366.43 | 51.00 | 0.0002 | |
| B-Oil | 10069.93 | 1 | 10069.93 | 80.68 | <0.0001 | |
| C-Temperature | 2985.71 | 1 | 2985.71 | 23.92 | 0.0018 | |
| AB | 4634.21 | 1 | 4634.21 | 37.13 | 0.0005 | |
| AC | 1461.92 | 1 | 1461.92 | 11.71 | 0.0111 | |
| BC | 1220.10 | 1 | 1220.10 | 9.77 | 0.0167 | |
| A ² | 1049.45 | 1 | 1049.45 | 8.41 | 0.0230 | |
| B ² | 961.31 | 1 | 961.31 | 7.70 | 0.0275 | |
| C ² | 21.51 | 1 | 21.51 | 0.17 | 0.6905 | |
| Residual | 873.74 | 7 | 124.82 | | | |
| Lack of fit | 449.73 | 3 | 149.91 | 1.41 | 0.3619 | not significant |
| Pure error | 424.02 | 4 | 106.00 | | | |
| Cor total | 29801.39 | 16 | | | | |

Table 27의 결과는 이차다항식(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 입자 크기에 대한 제안된 반응표면모형은 다음과 같다.

$$Y_1 = 60.36 - 28.21A + 35.48B - 19.32C - 34.04AB + 19.12AC - 17.46BC + 5.79A^2 + 15.11B^2 + 2.26C^2$$

Y_1 은 PIT 나노에멀전의 입자크기를 의미하고, A는 보조계면활성제 함량, B는 오일 함량, C는 유화온도를 나타낸다. 분산분석 결과에 따라 PIT나노에멀전 입자크기

에 가장 큰 영향을 미치는 요인은 오일 함량이었고, 그 다음이 보조계면활성제 함량, 보조계면활성제와 오일 함량의 상호작용, 유화온도, 보조계면활성제와 유화온도의 상호작용, 오일 함량과 유화온도의 상호작용, 보조계면활성제 함량의 이차항, 오일 함량의 이차항, 유화온도의 이차항 순이었다. 그 중에서 오일 함량, 보조계면활성제 함량, 보조계면활성제와 오일 함량의 상호작용이 입자크기에 가장 유의미한 영향($p < 0.05$)을 미쳤다.

반응변수에 대한 세 가지 인자의 효과를 시각화하기 위해 실험범위 내에서 세 가지 인자 중 한 가지를 중심점에 고정하고 나머지 두 가지의 인자를 변화시켜 2차 다항식 모형의 3D surface 및 등고선 그래프를 생성하였다(Figure 18-20).

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

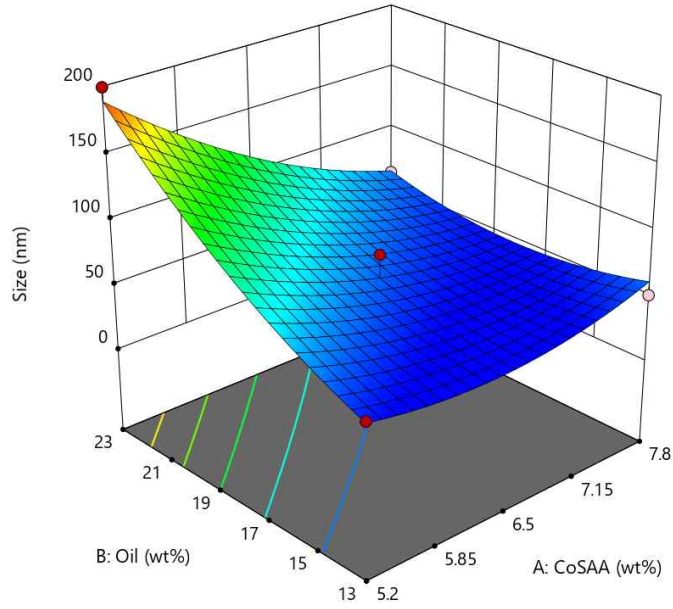
Size (nm)

- Design points above predicted value
- Design points below predicted value

46.06 199.4

X1 = A: CoSAA
X2 = B: Oil

Actual Factor
C: Temperature = 85



Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

Size (nm)

- Design Points

46.06 199.4

X1 = A: CoSAA
X2 = B: Oil

Actual Factor
C: Temperature = 85

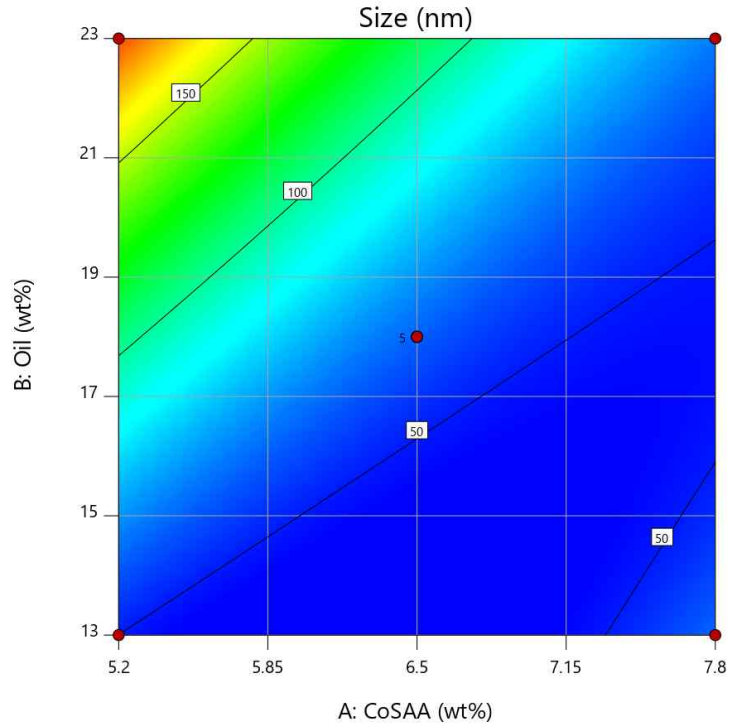


Figure 18. 3D surface model for particle size of PIT nanoemulsion depending on co-surfactant and oil.

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

Size (nm)

● Design points above predicted value

○ Design points below predicted value

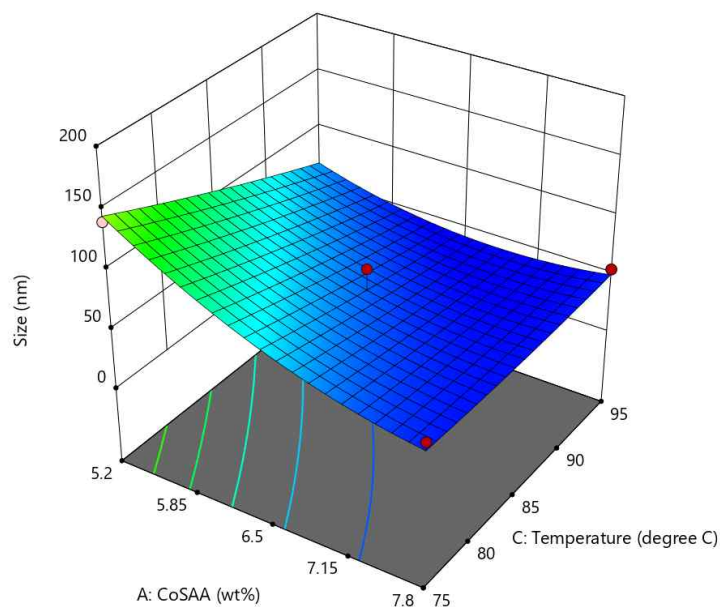
46.06 199.4

X1 = A: CoSAA

X2 = C: Temperature

Actual Factor

B: Oil = 18



Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

Size (nm)

● Design Points

46.06 199.4

X1 = A: CoSAA

X2 = C: Temperature

Actual Factor

B: Oil = 18

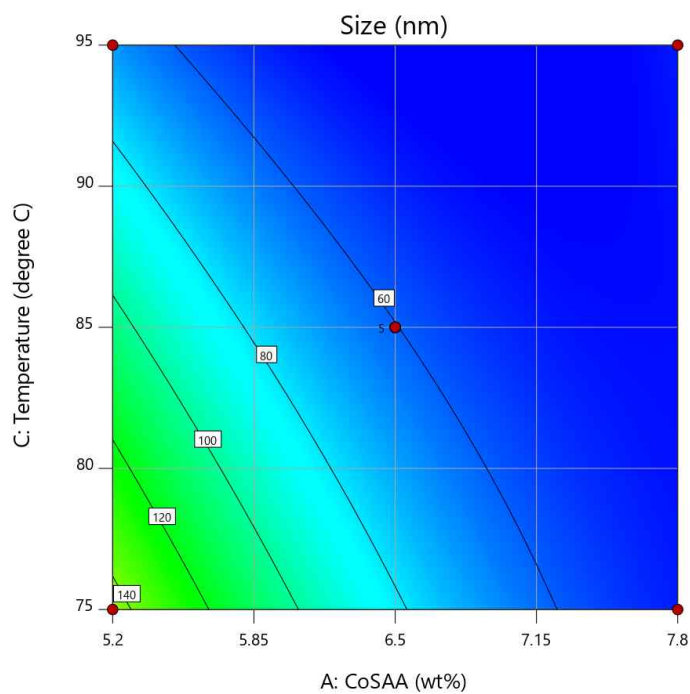


Figure 19. 3D surface model for particle size of PIT nanoemulsion depending on co-surfactant and temperature.

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

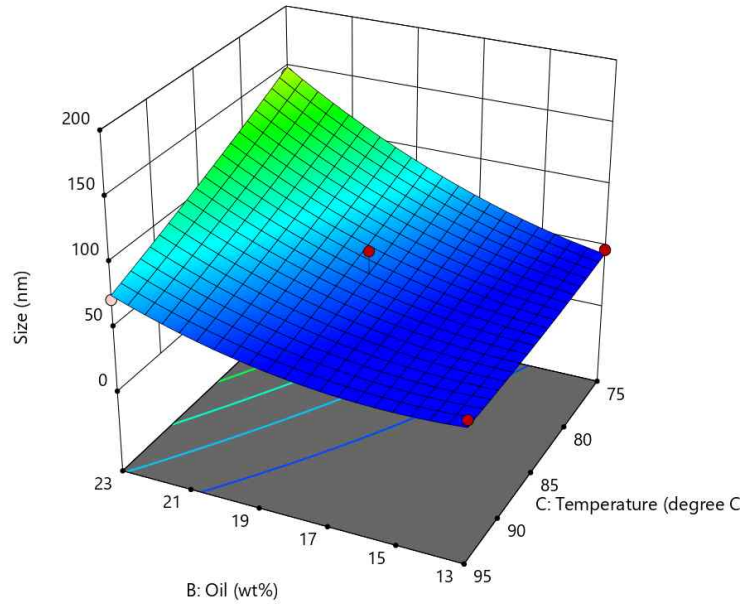
Size (nm)

- Design points above predicted value
- Design points below predicted value

-46.06 199.4

X1 = B: Oil
X2 = C: Temperature

Actual Factor
A: CoSAA = 6.5



Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

Size (nm)

- Design Points

-46.06 199.4

X1 = B: Oil
X2 = C: Temperature

Actual Factor
A: CoSAA = 6.5

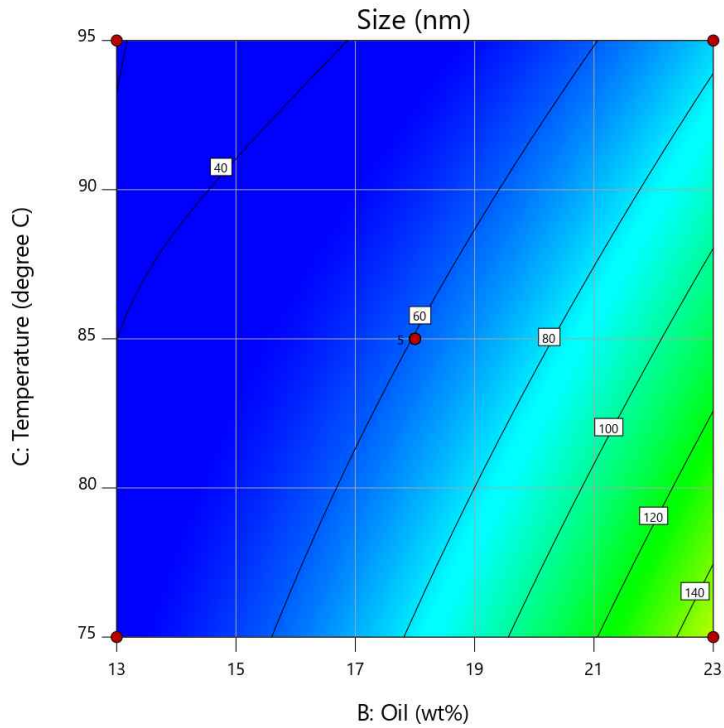


Figure 20. 3D surface model for particle size of PIT nanoemulsion depending on oil and temperature.

Figure 18은 유화온도를 85°C로 고정하고 보조계면활성제 및 오일 함량을 변화시켰다. 실험범위 내에서 오일 함량이 증가할수록 입자크기가 증가하는 경향을 보였다($p < 0.05$). 보조계면활성제 함량이 적을 경우 그 경향성은 더 커졌다($p < 0.05$).

Figure 19는 오일 함량을 18.0 wt%로 고정하고 보조계면활성제 함량과 유화온도를 변화시켰다. 실험범위 내에서 보조계면활성제 함량 및 유화온도가 증가할수록 입자크기가 감소하는 경향($p < 0.05$)을 보였다. 보조계면활성제 함량 7.2 wt% 부근 이상에서는 유화온도가 증가하여도 입자크기가 크게 변하지 않는 것을 확인할 수 있었다.

Figure 20은 보조계면활성제 함량을 6.5 wt%로 고정하고 오일 함량과 유화온도를 변화시켰다. 오일 함량이 증가할수록 입자크기가 증가하는 경향을 보였다 ($p < 0.05$). 또한 오일 함량이 증가할 때 유화온도가 낮아질수록 입자크기가 급격하게 증가하였다.

3-2-4-2. 다분산도(Y₂)에 미치는 영향

Box-Behnken design 결과 세 가지 인자(보조계면활성제 함량, 오일 함량, 유화온도)가 반응변수인 PIT 나노에멀전 다분산도에 미치는 영향을 확인하였다.

Table 28. ANOVA for Linear model

| Source | SS | df | Mean | F-value | p-value | |
|---------------|--------|----|--------|---------|---------|-----------------|
| Model | 0.0134 | 3 | 0.0045 | 8.78 | 0.0019 | significant |
| A-Co-SAA | 0.0066 | 1 | 0.0066 | 13.04 | 0.0032 | |
| B-Oil | 0.0049 | 1 | 0.0049 | 9.56 | 0.0086 | |
| C-Temperature | 0.0019 | 1 | 0.0019 | 3.73 | 0.0756 | |
| Residual | 0.0066 | 13 | 0.0005 | | | |
| Lack of fit | 0.0034 | 9 | 0.0004 | 0.4689 | 0.8412 | not significant |
| Pure error | 0.0032 | 4 | 0.0008 | | | |
| Cor total | 0.0199 | 16 | | | | |

Table 28의 결과는 선형(linear) 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 다분산도에 대한 제안된 반응표면모형은 다음과 같다.

$$Y_2 = 0.198 + 0.029A - 0.025B - 0.015C$$

Y₂은 나노에멀전의 다분산도를 의미하고, A는 보조계면활성제 함량, B는 오일 함량, C는 유화온도를 나타낸다. 분산분석 결과에 따라 나노에멀전 다분산도에 가장 큰 영향을 미치는 요인은 보조계면활성제 함량이고, 그 다음 오일 함량, 유화온도 순이었다. 그 중에서 보조계면활성제 및 오일 함량이 다분산도에 유의미한 영향(p<0.05)을 나타내었고, 유화온도의 영향은 미미하였다(p>0.05).

반응변수에 대한 세가지 인자의 효과를 시각화하기 위해 2차 다항식 모형의 3D surface 및 등고선 그래프를 생성하였다(Figure 21-23).

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

PDI

● Design points above predicted value

○ Design points below predicted value

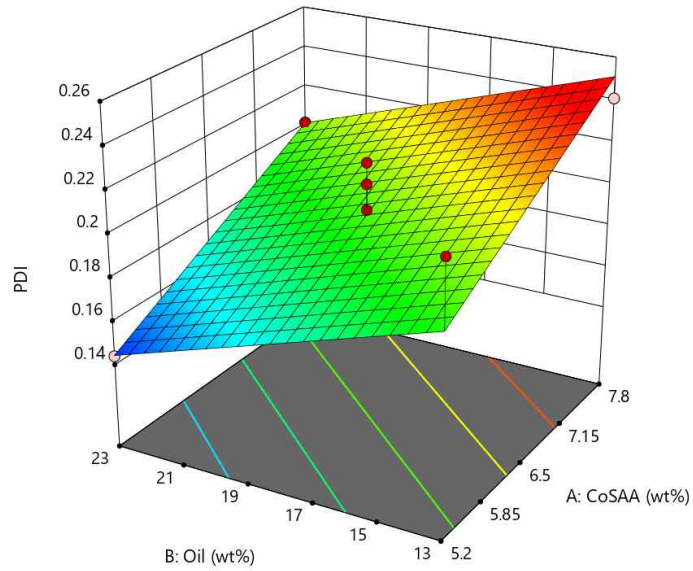
0.14 0.241

X1 = A: CoSAA

X2 = B: Oil

Actual Factor

C: Temperature = 85



Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

PDI

● Design Points

0.14 0.241

X1 = A: CoSAA

X2 = B: Oil

Actual Factor

C: Temperature = 85

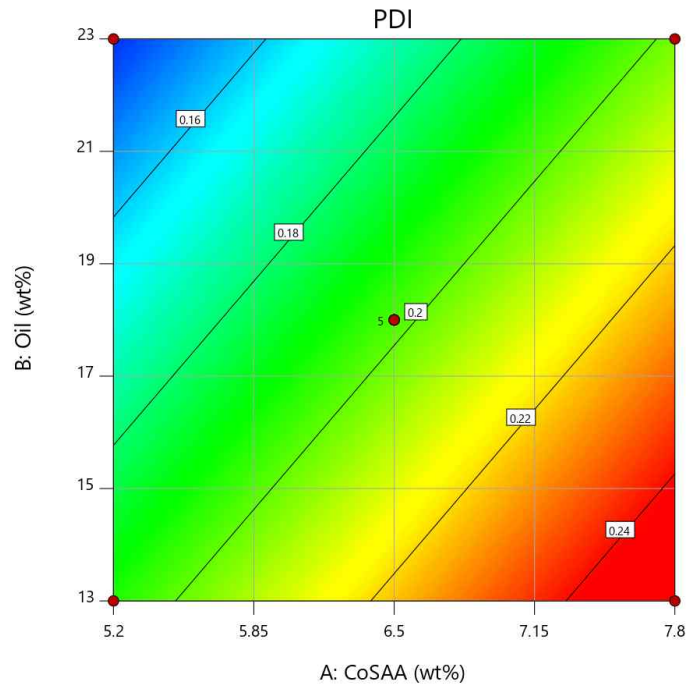


Figure 21. 3D surface model for polydispersity index of PIT nanoemulsion depending on co-surfactant and oil.

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

PDI

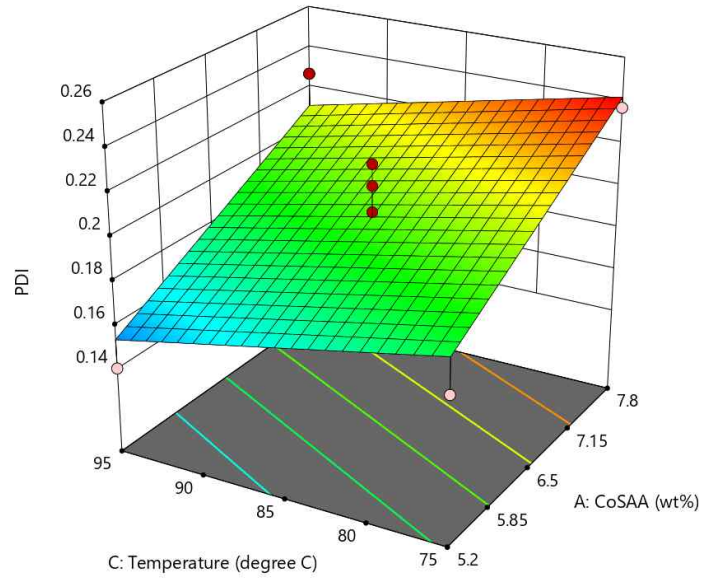
● Design points above predicted value

○ Design points below predicted value

0.14 0.241

X1 = A: CoSAA
X2 = C: Temperature

Actual Factor
B: Oil = 18



Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

PDI

● Design Points

0.14 0.241

X1 = A: CoSAA
X2 = C: Temperature

Actual Factor
B: Oil = 18

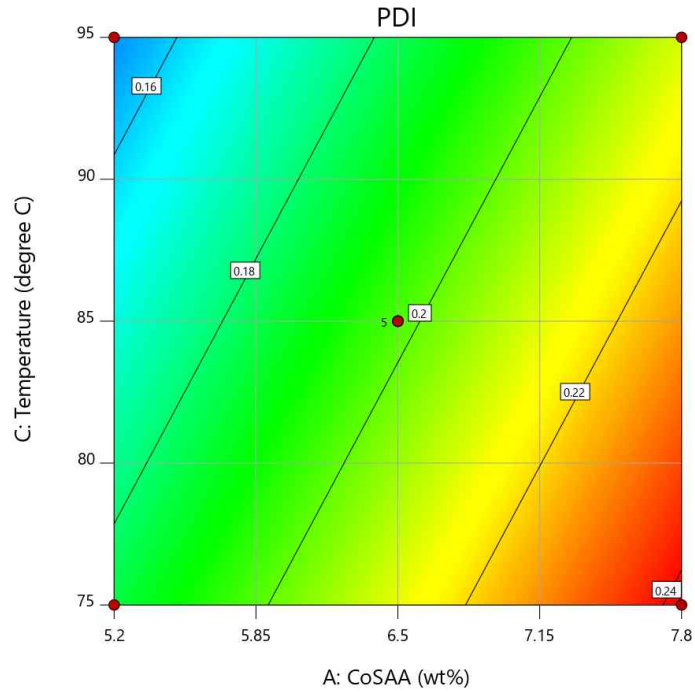


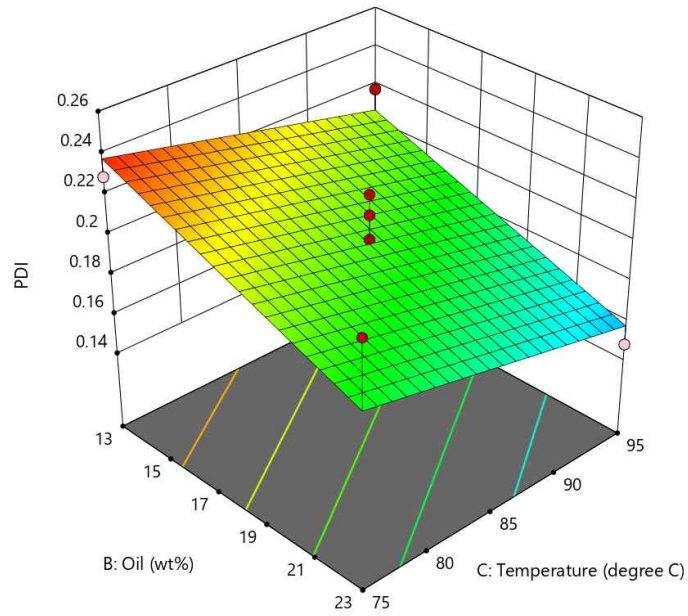
Figure 22. 3D surface model for polydispersity index of PIT nanoemulsion depending on co-surfactant and temperature.

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

PDI
● Design points above predicted value
○ Design points below predicted value
0.14 0.241

X1 = B: Oil
X2 = C: Temperature

Actual Factor
A: CoSAA = 6.5



Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

PDI
● Design Points
0.14 0.241

X1 = B: Oil
X2 = C: Temperature

Actual Factor
A: CoSAA = 6.5

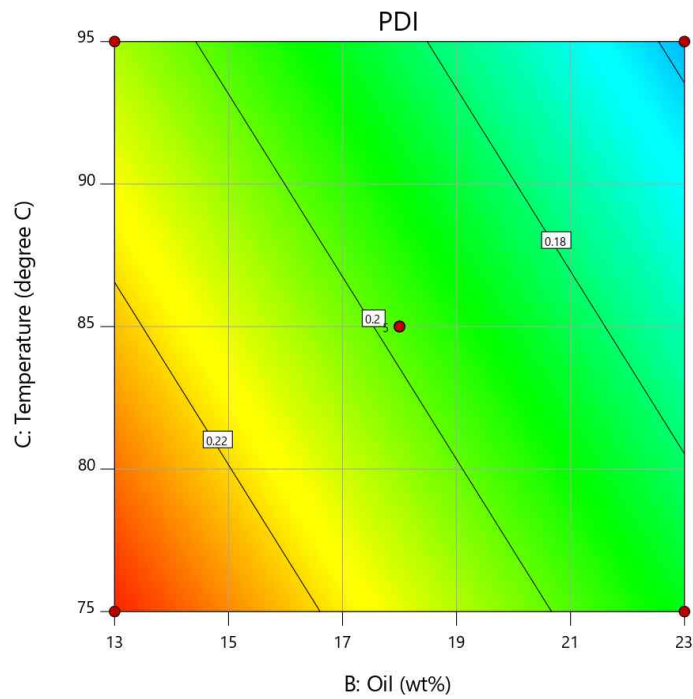


Figure 23. 3D surface model for polydispersity index of PIT nanoemulsion depending on oil and temperature.

Figure 21은 유화온도를 85°C로 고정하고 보조계면활성제 및 오일 함량을 변화시켰다. 실험범위 내에서 계면활성제 함량이 증가할수록, 오일 함량이 감소할수록 다분산도가 증가하는 경향을 보였다($p < 0.05$).

Figure 22는 오일 함량을 18.0 wt%로 고정하고 보조계면활성제 함량과 유화온도를 변화시켰다. 실험범위 내에서 보조계면활성제 함량이 증가할수록 다분산도가 급격히 증가하는 경향($p < 0.05$)을 보였다. 유화온도가 감소할수록 다분산도가 증가하는 경향을 보였으나 그 영향은 미미하였다($p > 0.05$).

Figure 23은 보조계면활성제 함량을 6.5 wt%로 고정하고 오일 함량과 유화온도를 변화시켰다. 오일 함량이 감소할수록 다분산도가 증가하는 경향을 보였고 ($p < 0.05$), 유화온도가 감소할수록 다분산도가 증가하는 경향을 보였으나 유화온도는 PIT 나노에멀전의 다분산도에 크게 유의미한 영향을 미치지 않았다($p > 0.05$).

3-2-5. 최적의 PIT 나노에멀전 제조

Box-Behnken design 결과를 바탕으로 vitamin E acetate 함유 PIT 나노에멀전의 최적화를 수행하였다. Vitamin E acetate 함유 PIT 나노에멀전은 실험범위 내에서 나노에멀전의 입자크기 및 다분산도가 최소값을 가지는 것을 목표로 하였다. 앞에서 언급한 조건을 바탕으로 보조계면활성제 함량 6.25 wt%, 오일 함량 19.98 wt%, 유화온도 95℃를 최적 조건으로 선택하였다(Table 29).

Table 29. Optimization PIT nanoemulsion condition

| Independent variables | Optimum conditions |
|-----------------------|--------------------|
| A-Co-SAA (wt%) | 6.25 |
| B-Oil (wt%) | 19.98 |
| C-Temperature (°C) | 95 |
| Dependent variables | Predicted value |
| Y1-Size | 57.79 |
| Y2-PDI | 0.167 |

최적 조건을 바탕으로 Vitamin E acetate 함유 PIT 나노에멀전을 제조하였다. 3회 반복 제조하여 나노에멀전의 입자크기 및 다분산도를 측정하였고, 입자크기 및 다분산도가 예상값의 95% 신뢰수준 이내에 들어오는 것을 확인하였다(Table 30).

Table 30. Confirmation of PIT nanoemulsion

| Solution 51 of 56 | Predicted | Std Dev | n | SE Pred | 95% PI low | Data Mean | 95% PI high |
|----------------------|-----------|------------|---|------------|---------------|--------------|----------------|
| Size | 57.79 | 11.17 | 3 | 9.56 | 35.18 | 68.41 | 80.40 |
| PDI | 0.167 | 0.009 | 3 | 0.017 | 0.131 | 0.199 | 0.203 |

Std Dev (Standard Deviation), SE Pred (Standard Error Predicted), PI (Predictive Interval)

3-3. Vitamin E acetate 함유 나노에멀전의 *in-vitro* 피부흡수시험

고에너지 및 저에너지 방법으로 제조한 최적의 Vitamin E acetate 함유 나노에멀전의 피부흡수율을 평가하기 위해 Franz diffusion cell method를 이용하여 피부흡수시험을 수행하였다.

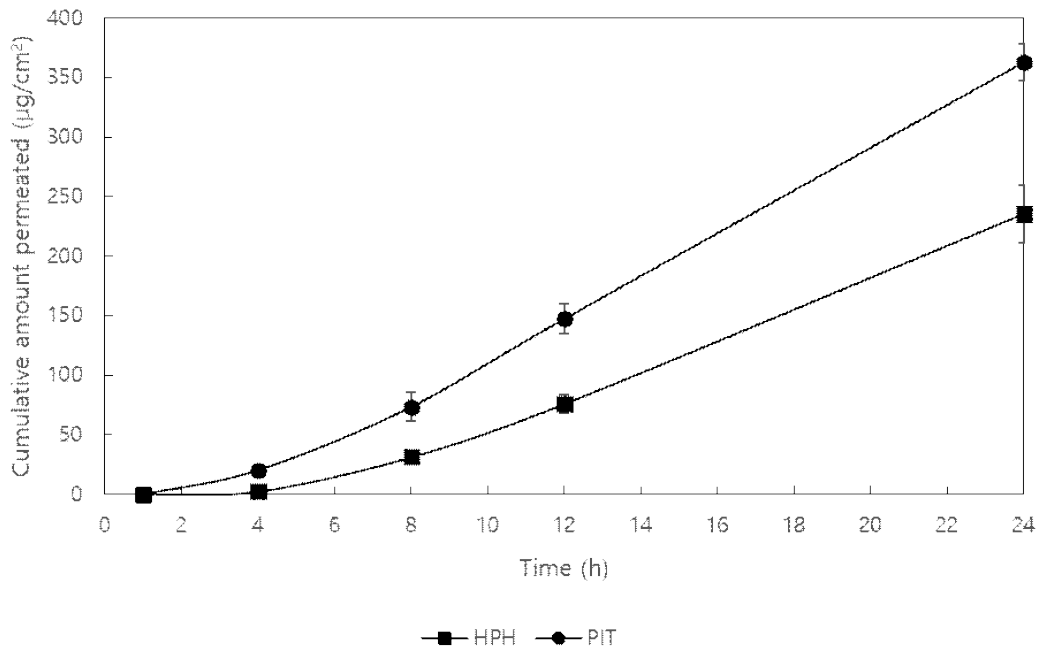


Figure 24. Permeation profiles of Vitamin E acetate through Strat-M membrane from the emulsion (mean±S.D., n=3) ($p < 0.05$). HPH emulsion(■), PIT nanoemulsion(●).

HPH 및 PIT 나노에멀전의 시간별 누적 피부투과량을 정량분석하여 Figure 24에 나타내었다. HPH 및 PIT 나노에멀전 모두 초기 1h까지는 유효성분의 투과가 검출되지 않았고 1h 이후부터 투과량이 점점 증가하는 경향을 보였다. HPH 나노에멀전은 4 h까지도 미미한 투과량을 보였으나 4 h 이후부터 투과량이 눈에 띄게 증가하였다. 24 h까지 두 나노에멀전의 투과량은 계속 증가하였다. Vitamin E acetate 함유 나노에멀전의 24 h 경과 후 누적 투과량은 HPH 나노에멀전 $235.51 \pm 24.54 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, PIT 나노에멀전 $363.27 \pm 15.32 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 으로 PIT 나노에멀전의 더 높은 투과량을 보였다.

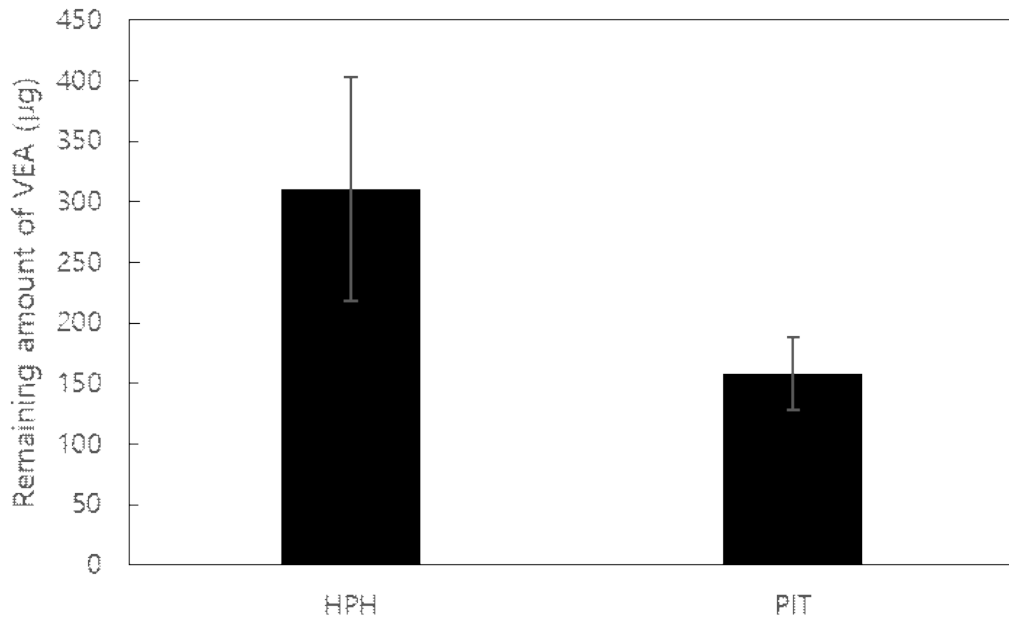


Figure 25. Remaining amounts of Vitamin E acetate through Strat-M membrane from the emulsion (mean±S.D., n=3) (p<0.1).

24 h 이후 membrane에 남아있는 Vitamin E acetate의 양을 정량분석하였다. HPH 나노에멀전의 membrane 잔류량은 $310.53 \pm 92.59 \mu\text{g}$, PIT 나노에멀전의 membrane 잔류량은 $158.11 \pm 29.64 \mu\text{g}$ 이었다(Figure 25). HPH 나노에멀전의 membrane 잔류량이 많은 것을 확인하였다. 이는 PIT 나노에멀전에 비해 상대적으로 입자크기가 큰 HPH 나노에멀전은 membrane 통과가 다소 어려워 입자가 membrane에 잔류하는 시간이 길어져 통과속도가 느려지게 되고 따라서 HPH 나노에멀전의 초기 투과량이 미미함과 동시에 membrane에 잔류하는 양이 많아진 것으로 생각된다.

나노에멀전의 *in-vitro* 피부흡수시험 결과 PIT 나노에멀전의 최종 피부흡수량은 $801.09 \pm 53.71 \mu\text{g}$ (초기 투입량 대비 $3.84 \pm 0.26\%$), HPH 나노에멀전의 최종 피부흡수량은 $727.37 \pm 128.35 \mu\text{g}$ (초기 투입량 대비 $8.91 \pm 1.57\%$)으로 Vitamin E acetate의 피부흡수량은 PIT 나노에멀전이 더 높았으나 실제 초기 투입량 대비 투과효율은 HPH 나노에멀전이 더 우수하였다.(p<0.05). 이는 나노에멀전의 피부흡수에 입자크기 외의 요소 또한 영향을 미침을 나타내는 것으로 생각된다.

IV. 요약 및 결론

본 연구에서는 지용성 활성성분인 DL- α -tocopheryl acetate (Vitamin E acetate)의 효과적인 피부전달을 위해 반응표면분석법을 이용하여 나노에멀전을 최적화하였다. 반응변수를 입자크기로 선정하고 나노에멀전 제조 시 영향을 주는 인자들이 나노에멀전 입자크기 및 다분산도에 미치는 영향을 확인하고 최종적으로 작은 입자크기와 다분산도를 가지는 최적의 나노에멀전을 제조하여 Vitamin E acetate의 피부흡수를 평가하는 것을 목표로 하였다.

HPH 방법에서는 계면활성제 함량(3.0 ~ 9.0 wt%), 고압유화 압력(600 ~ 1,000 wt%), 고압유화 횟수(5 ~ 13 pass)가 입자 크기에 가장 큰 영향을 미쳤다. 계면활성제 함량, 고압유화 압력, 고압유화 횟수가 증가할수록 HPH 나노에멀전의 입자크기는 감소하였으며, 계면활성제 함량이 증가할수록 다분산도가 증가하는 경향을 보였다($p < 0.05$)

PIT 방법에서는 보조계면활성제 함량(5.2 ~ 7.8 wt%), 오일 함량(13.0 ~ 23.0 wt%), 유화온도(75 ~ 95 °C)의 3가지 요인이 가장 큰 영향을 미쳤다. 보조계면활성제 함량 및 유화온도가 증가할수록 오일 함량이 감소할수록 PIT 나노에멀전의 입자크기는 감소하였으며, 인자 간 상호작용도 입자크기에 큰 영향을 미쳤다 ($p < 0.05$). 한편, PIT 나노에멀전의 다분산도는 오일 함량이 증가할수록, 보조계면활성제 함량이 감소할수록 작아지는 경향을 보였다($p < 0.05$)

피부흡수시험 결과 HPH 나노에멀전의 최종 피부흡수율은 $8.91 \pm 1.57\%$, PIT 나노에멀전의 최종 피부흡수율은 $3.84 \pm 0.26\%$ 로 HPH 나노에멀전이 PIT 나노에멀전보다 우수한 피부흡수율을 보이는 것을 확인하였다($p < 0.05$). 이는 나노에멀전 입자크기뿐만 아니라 조성 등과 같은 그 이외의 요소들 또한 피부전달에 큰 영향을 미치는 것으로 생각되며 추후 이에 대한 연구가 필요할 것으로 보인다.

V. 참고문헌

- 1) 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, 1999, 1(1), 22-28
- 2) G. Y. Noh; J. Y. Suh; S. N. Park; “Ceramide-based nanostructured lipid carriers for transdermal delivery of isoliquiritigenin: Development, physicochemical characterization, and in vitro skin permeation studies” Korean journal of chemical engineering, 2017, 34(2), 400-406
- 3) D. D. Kim; “Development of transdermal permeation preparation/promotion and in vitro measurement of transdermal permeation” Formulation Technology Workshop, 1996, 33-46
- 4) J. Y. Chung; H. S. Han; “The recent trend of percutaneous absorption used in cosmetics” Asian Journal of Beauty and Cosmetology, 2014, 12(5), 597-605
- 5) W. G. Cho; “Transdermal Delivery System of Effective Ingredients for Cosmeceuticals” Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea, 2011, 37(2), 97-119
- 6) 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), 2014, 38(6), 694-701
- 7) H. S. Kim; “New technology and product status: Development status of transdermal absorbers”, Formulation Technology Workshop, 1995, 73-82
- 8) W. G. Cho; K. A. Kim; S. I. Jang; B. O. Cho; “Behaviour of nanoemulsions containing Ceramide IIIB and stratum corneum lipids” Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea, 2018, 44(1), 31-37
- 9) P. Thiagarajan; “Nanoemulsions for drug delivery through different routes”

- Research in Biotechnology, 2011, 2(3), 1-13
- 10) S. P. Hong; "Bricks and Mortar: Two Compartment System", The Journal of Skin Barrier Research, 2010, 12(1), 35-40
 - 11) B. S. Kim; Ph. D. Dissertation, Chonbuk National Univ., Chonbuk, Korea 2009
 - 12) W. G. Cho; "Nanoemulsions: A novel vehicle for cosmetics" Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea, 2011, 37(1), 1-21
 - 13) S. L. Ee; X. Duan; J. Liew; Q. D. Nguyen; "Droplet size and stability of nano-emulsions produced by the temperature phase inversion method" Chemical Engineering Journal, 2008, 140(1-3), 626-631
 - 14) 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 & Engineering Chemistry Research, 2013, 52(2), 744-750
 - 15) J. Meyer; R. Scheuermann; H. H. Wenk; "Combining convenience and sustainability: simple processing of PEG-free nanoemulsions and classical emulsions" SÖFW Journal, 2008, 134(6), 54-61
 - 16) W. G. Cho; E. H. Kim; B. J. Jeon; Y. K. Cha; S. K. Park; "Stability of nano-emulsions prepared upon change of composition" Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea, 2013, 39(1), 55-63
 - 17) P. Shah, D. Bhalodia, P. Shelat, "Nanoemulsion: a pharmaceutical review", Systematic Reviews in Pharmacy, 2010, 1(1), 24-32
 - 18) A. Jintapattanakit; "Preparation of nanoemulsions by phase inversion temperature (PIT) method" Pharmaceutical Sciences Asia, 2018, 45(1), 1-12
 - 19) K. Bouchemal; S. Briançon; E. Perrier; H. Fessi; "Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimisation" International Journal of Pharmaceutics, 2004, 280(1-2), 241-251

- 20) A. Gupta; H. B. Eral; T. A. Hatton; P. S. Doyle; “Nanoemulsions: formation, properties and applications” *Soft matter*, 2016, 12(11), 2826–2841
- 21) J. Rao; D. J. McClements; “Stabilization of phase inversion temperature nanoemulsions by surfactant displacement” *Journal of agricultural and food chemistry*, 2010, 58(11), 7059–7066
- 22) E. Akbas; B. Soyler; M. H. Oztop; “Formation of capsaicin loaded nanoemulsions with high pressure homogenization and ultrasonication” *LWT – Food Science and Technology*, 2018, 96, 266–273
- 23) A. M. Shi; D. Li; L. J. Wang; B. Z. Li; B. Adhikari; “Preparation of starch-based nanoparticles through high-pressure homogenization and miniemulsion cross-linking: Influence of various process parameters on particle size and stability” *Carbohydrate Polymers*, 2011, 83(4), 1604–1610
- 24) S. H. Lee; T. Lefèvre; M. Subirade; P. Paquin; “Effects of ultra-high pressure homogenization on the properties and structure of interfacial protein layer in whey protein-stabilized emulsion” *Food Chemistry*, 2009, 113(1), 191–195
- 25) X. Song; C. Zhou; F. Fu; Z. Chen; Q. Wu; “Effect of high-pressure homogenization on particle size and film properties of soy protein isolate” *Industrial Crops and Products*, 2013, 43, 538–544
- 26) F. Patrignani; R Lanciotti; “Applications of high and ultra high pressure homogenization for food safety” *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7, 1132
- 27) S. Zhang; P. Zhang; G. Zhang; J. Fan; Y. Zhang; “Enhancement of anaerobic sludge digestion by high-pressure homogenization” *Bioresource technology*, 2012, 118, 496–501
- 28) M. T. K. Kubo; P. E. Augusto; M. Cristianini; “Effect of high pressure homogenization (HPH) on the physical stability of tomato juice” *Food Research International*, 2013, 51(1), 170–179
- 29) S. J. Yang; Master’s Thesis Dissertation, Jeju National Univ., Jeju, Korea 2020

- 30) M. Nabi; G. Zhang; F. Li; P. Zhang; Y. Wu; X. Tao; S. Bao; S. Wang; N. Chen; J. Ye; J. Dai; “Enhancement of high pressure homogenization pretreatment on biogas production from sewage sludge: a review” *Desalination and Water Treatment*, 2020, 175, 341–351
- 31) K. S. Yoon; “Cosmethology”, *Kuhminsa*, 2019, 124–125
- 32) C. Solans, I. Solé, “Nano-emulsions: formation by low-energy methods” *Current opinion in colloid & interface science*, 2012, 17(5), 246–254
- 33) Z. Nabi; A. Tavakkol; M. Dobke; T. G. Polefka; “Bioconversion of vitamin E acetate in human skin” *Current Problems in Dermatology*, 2001, 29, 175–186
- 34) M. M. Almeida; J. M. P. Alves; D. C. S. Patto; C. R. R. C. Lima; J. S. Quenca Guillen; M. I. R. M. Santoro; E. R. M. Kedor Hackmann; “Determination of tocopheryl acetate and ascorbyl tetraisopalmitate in cosmetic formulations by HPLC” *International journal of cosmetic science*, 2009, 31(6), 445–450
- 35) J. H. Kim; H. J. Yang; B. R. Won; Y. J. Ahn; M. K. Kang; S. N. Park; “Preparation of Vitamin E Acetate Nano-emulsion and In Vitro Research Regarding Vitamin E Acetate Transdermal Delivery System which Use Franz Diffusion Cell” *Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea*, 2009, 35(2), 91–101
- 36) M. Rangarajan; J. L. Zatz; “Effect of formulation on the delivery and metabolism of α -tocopheryl acetate” *Journal of Cosmetic Science*, 2001, 52, 225–236
- 37) Y. B. Lim; S. H. Park; B. J. An; Y. I. Kim; “Practical design of experiments” *Freeacademy*, 2008, 224–247
- 38) C. H. Sim; “Optimization of Process Variables for Insulation Coating of Conductive Particles by Response Surface Methodology” *Korean Chemical Engineering Research*, 2016, 54(1), 44–51
- 39) I. M. Yang; G. T. Oh; C. B. Yu; I. G. Hwang; “design and analysis of

- experiments” Minyoungsa, 2015, 83-264
- 40) H. M. Gwon; W. Hur; S. Y. Lee; “Moisturization and Transdermal Penetration Characteristics of PEG impregnated Aloe vera Gel from DIS Processing” KSBB Journal, 2013, 28(5), 319-326
- 41) L. Quanhong; F. Caili; “Application of response surface methodology for extraction optimization of germinant pumpkin seeds protein” Food Chemistry, 2005, 92, 701-706

감사의 글

길다면 길고 짧다면 짧은 석사과정이 끝났습니다. 힘들기도 했지만 배운 것도 많았던 시간이었습니다.

우선 석사과정 2년간 이 논문이 나올 수 있도록 곁에서 지도해주신 윤경섭 교수님께 감사드립니다. 그리고 학부시절부터 대학원까지 화학이라는 분야에 대해 가르침을 주신 제주대학교 화학과 김용해 교수님, 변종철 교수님, 김덕수 교수님, 강창희 교수님, 김원형 교수님, 이남호 교수님, 현창구 교수님, 임희정 교수님께 감사의 말씀을 드립니다.

2년 동안 실험실에서 동고동락하며 가족보다 더 많은 시간을 함께한 성준오빠, 미선언니, 유연이를 비롯한 저희 화장품제형실험실 식구들에게도 감사드립니다.

그리고 제가 포기하고 싶을 때마다 늘 다독여주고 다시 시작할 힘을 준 가족들에게도 사랑과 감사의 마음을 전합니다.

감사합니다.

2021년 2월
김희주 올림