J. Soc. Cosmet. Scientists Korea
Vol. 35, No. 2, June 2009, 79-89

에멀젼 반전법으로 제조된 쿼세틴을 함유하는 나노에멀젼에 대한 에탄올의 영향

원 보 령 · 강 명 규 · 안 유 진 · 박 수 남†

서울산업대학교 자연생명과학대학 정밀화학과

(2009년 5월 8일 접수, 2009년 5월 26일 수정, 2009년 5월 29일 채택)

The Effects of Ethanol on Nano-emulsions Containing Quercetin Prepared by Emulsion Inversion Point Method

Bo Ryoung Won, Myung Kyu Kang, You Jin Ahn, and Soo Nam Park†

Department of Fine Chemistry, College of Nature and Life Science, Seoul National University of Technology, 172, Gongneung 2-dong, Nowon-gu, Seoul 139-743, Korea

(Received May 8, 2009; Revised May 26, 2009; Accepted May 29, 2009)

요 약: 본 연구에서는 고농도의 쿼세틴을 함유하는 안정한 나노에멀젼의 조성을 찾고 POE (30) hydrogenated castor oil (HCO-30)/오일/쿼세틴/에탄올/물로 이루어진 나노에멀젼에 대한 에탄올의 영향을 연구하였다. 나노에멀젼은 저에너지법인 emulsion inversion point (EIP) 법과 고에너지법인 균질기(homogenizer)를 병합하여 제조하였다. 나노에멀젼에 대한 에탄올과 다른 성분들의 영향을 평가하기 위해 입자 크기, 에멀젼의 형태, 그리고 입자 분포와 같은 물리적 특성을 조사하였다. 나노에멀젼에 대한 쿼세틴의 최적 농도는 0.2 %였다. 계면활성제인 POE (30) hydogenated castor oil (HCO-30) 농도에 따른 나노에멀젼의 입자 크기를 보면, 2.00 %부터는 에멀젼의 입자 크기는 300 nm 이하였으며 HCO-30을 4.75 % 함유하는 나노에멀젼이 가장 안정하고 입자 크기도 172.40 nm로 나타났다. 마지막으로 에탄올 4.00 %를 함유한 나노에멀젼의 입자 크기는 128.15 nm이고 입도 분포 또한 좁게 나타났다. 나노에멀젼의 불안정화 과정은 Ostwald ripening에 의한 것으로 보여진다. 나노에멀젼에 대한 에탄올의 영향을 연구함으로써 소량의 에탄올을 이용하여 약물의 봉입률을 증가시킬 수 있으며, 안정한 나노에멀젼을 만듦으로써 스킨 로션, 에센스 및 향수와 같은 화장품과 제약 등에 응용될 수 있을 것으로 사료된다.

Abstract: The objective of this study was to find out the stable formulation of nano-emulsion containing high concentration of quercetin and to investigate the effect of an ethanol on the nano-emulsion prepared by POE (30) hydrogenated castor oil (HCO-30)/oil/quercetin/ethanol/water system. Nano-emulsion was prepared using emulsion inversion point (EIP) method as low-energy method plus homogenizer as high-energy method. To evaluate effect of ethanol and other components on the nano-emulsion, physical properties such as droplet size, morphology, and size distribution were determined. The optimal quercetin concentration was 0.2 % on the nano-emulsion. The droplet diameter was below 300 nm at the HCO-30 concentration below 2.00 %. Nano-emmulsion containing 4.75 % HCO-30 was the most stable and its mean droplet size was 172.40 nm. Finally, the size of nano-emulsion containing 4.00 % ethanol was 128.15 nm and size distribution was also narrow. The results showed that the breakdown process of this nano-emulsion could be attributed to Ostwald ripening. This study about effect of ethanol on the nano-emulsion showed that loading capacity of drug could be increased by using a small amount of ethanol. As prepared stable nano-emulsion, this study showed that these results could be applied to pharmaceutics, cosmetic including skin-care products, perfume and etc.

Keywords: *nano-emulsion, emulsion inversion point, quercetin, size distribution, Ostwald ripening*

† 주 저자 (e-mail: snpark@snut.ac.kr)

1. 서 론

Miniemulsions[1-5], ultrafine emulsions[6,7], emulsoids[8-10], submicron emulsions[11]과 같은 용어로 사용되는 나노에멀젼은 일반적으로 100 ~ 500 nm 사이의 입자크기를 가지는 에멀젼의 한 유형이다. 열역학적으로 안정한 마이크로에멀젼과 구분하고 입자가 nm 크기임을 나타내기 위해 사용하게 된 나노에멀젼은 구성 성분과 제조 방법에 따라 외관상 투명하거나 반투명하고 역학적으로 안정하여 침전이나 크리밍 현상에 대하여 안정성을 가지고 있다[12-14]. 이러한 특성들을 갖는 나노에멀젼은 화학, 의약품, 그리고 화장품 등에 실질적인 응용이 가능하다.

마이크로에멀젼과 나노에멀젼에는 큰 차이가 있다. 마이크로에멀젼은 나노에멀젼과 같이 외관상 투명하고 입자 크기가 nm이지만 역학적으로 안정하고 낮은 농도의 계면활성제를 사용하여 제조되는 나노에멀젼과는 달리 열역학적으로 안정하고 높은 농도의 계면활성제를 사용하여 제조된다[14]. 높은 농도의 계면활성제를 사용하는 마이크로에멀젼의 경우, 나노에멀젼에서 응용이 가능한 의약품이나 화장품 분야에 적용이 어렵다. 다시 말하면, 나노에멀젼은 낮은 농도의 계면활성제의 사용으로 생체 내 부작용이 적으며, 그 활용 범위가 매우 넓다는 것을 의미한다. 하지만 나노에멀젼과 같은 매우 작은 크기의 에멀젼이 인체 내로 들어가 어떠한 영향을 끼치는지에 대한 연구가 많이 미흡하여 안정성에 대한 검증은 이루어지지 않아 위험성이 제기되기도 하였다[15]. 이 또한 정확한 검증을 하지 못하는 실정이다. 앞으로 나노에멀젼의 응용 범위와 가치는 매우 크기 때문에 나노에멀젼의 안정성에 대한 많은 연구가 이루어져야 할 것이다.

안정한 나노에멀젼을 제조하기 위해서는 외부로부터 에너지 주입이 필요하다. 이러한 나노에멀젼의 제조 방법은 크게 두 가지가 있으며, 그것은 고에너지법(high-energy methods)과 저에너지법(low-energy methods)이다[12]. 고에너지법은 high-shear stirring, high-pressure homogenizers, 그리고 ultrasound generators등을 통한 방법이다[5]. 이 방법은 nm ~ μm 크기의 에멀젼이 얻어지고, 많은 기계적 에너지가 요구되지만 산업적으로 널리 적용되어 왔다. 저에너지법은 유화과정 동안 발생하는 상전이를 사용하는 방법이다. 이러한 상전이를 사용하는 방법은 서로 다른 두 가지 방법이 있다. 첫 번째 방법은 구성성분을 일정하게 유지시키는 반면에 온도를 변화시키는 phase inversion temperature (PIT) method이다[16]. 두 번째 방법은 온도는 일정하게 유지시키면서 구성성분을 변화시키는 emulsion inversion point (EIP) method이다[17]. 이러한 저에너지법의 장점에도 불구하고 대량으로 제조해야 하는 산업 분야에서는 적용이 어려운 단점이 있어 널리 사용되지 않았다. 본 연구에서는 고에너지 방법인 호모믹서와 저에너지 방법인 EIP 법을 변형하여 안정한 나노에멀젼을 제조하였다.

쿼세틴은 가장 풍부하고 일반적으로 연구되는 대표적인 식물성 폴리페놀 화합물이다[18]. 쿼세틴은 다른 플라보노이드와 비교될 정도로 강력한 항산화작용 및 라디칼 소거능을 보이며, 동맥경화증에 강력한 예방효과를 가지고 있는 것으로 알려져 있다[19-23]. 더욱이, 쿼세틴은 항종양제인 독소루비신에 의해 유발되는 심장독성을 저하시키고[24], 간장보호 효과[25], 항혈소판 응집작용[26], 항알러지작용[27], 항염증작용[28] 등과 같은 생리 작용을 한다.

이러한 생리적인 작용을 가지고 있음에도 불구하고 쿼세틴은 물에 대한 용해도가 매우 낮고(3 μg/mL), 위장관 점막에 존재하는 뮤신과 강한 결합을 형성하여 경구투여 시 생체활용률이 매우 낮다[29]. 이러한 단점을 해결하기 위한 방안으로, 시클로덱스티린, 크로스포비돈, 그리고 비이온성 계면활성제 등의 첨가로 쿼세틴의 수용액상에서의 용해성을 향상시킬 수 있다고 보고되었다[29].

일반적으로 에멀젼에서 에탄올의 존재는 에멀젼의 안정성을 강화시킨다. 에탄올은 오일 상과 수용성 용액 사이의 계면장력을 감소시키기 때문이다[30]. 그리고 에탄올이 함유된 에멀젼은 에탄올이 함유되지 않은 에멀젼보다 더 작은 평균 입자 크기를 갖는 입자를 생성하였다[31]. 이와 같이 이전의 연구들은 일반적인 에멀젼에 대한 에탄올의 영향에 국한되어 있었다.

그러므로 본 연구에서는 비이온성 계면활성제(HCO-30)를 이용하여 나노에멀젼을 제조하여 쿼세틴의 용해도를 향상시키고 향후 화장품 응용에 대하여 연구하였으며, 또한 플라보노이드 중에서 항산화 작용 및 라디칼 소거활성이 우수한 쿼세틴을 함유한 나노에멀젼에 에탄올이 에멀젼 안정화와 입자 크기에 어떠한 영향을 미치는가에 대하여 연구하였다

2. 실 험

2.1. 실험 재료

스테아르산(stearic acid; SA), 세틸알코올(cetyl alcohol; CA), 미네랄 오일(mineral oil; MO) 그리고 카프릴

릭/카프릭 트리글리세라이드(caprylic/capric triglyceride; CCT)는 풀무원 건강생활(Pulmuone Heath& Living Co. Ltd., Korea)로부터 공급받았다. 계면활성제로 사용된 POE (30) hydrogenated castor oil (HCO-30)은 Nikkol (Japan)사로부터 구입하였다. 에탄올(EtOH; 99.9 v/v%)은 Aldrich (USA)로부터, 쿼세틴 이수화물(quercetin dehydrate; Q)은 Sigma (USA)로부터 구입하였다.

모든 시약은 시판 특급 시약을 사용하였으며 정제 없이 구입한 그대로 사용하였다. 실험에서 사용된 물은 Millipore Q (Millipore Co., USA)를 이용하여 18.3 MΩ-cm로 통과시킨 3차 증류수(DW)를 사용하였다.

2.2. 나노에멀젼 제조

나노에멀젼 제조 과정에서 구성성분을 오일상, 에탄올상, 그리고 수상의 3가지 상으로 나누었다. 에멀젼 제조에 사용된 구성성분과 조성을 Table 1에 나타내었다.

먼저, 오일상 성분은 스테아르산(SA), 세틸알코올(CA), 카프릴릭/카프릭 트리글리세라이드(CCT), 미네랄 오일(MO), 그리고 POE (30) hydrogenated castor oil (HCO-30)을 비커에 넣는다. 에탄올상의 성분은 에탄올과 쿼세틴으로 이루어지며, 이 두 성분을 바이알에 넣고 마개를 닫는다. 오일상과 에탄올상을 각각 75 ℃에서 균일하게 용해시킨다. 그런 다음, 오일상과 에탄올상을 온도를 유지하면서 빠르게 섞어준다. 마지막으로 위의 혼합성분을 호모믹싱하고 있는 수상에 첨가시킨 후, 3 min 동안 11,000 rpm으로 균질기(X1030D, Ingenieurbüro CAT M Zipperer GmbH, Germany)를 유지시켰다. 수상에 오일상과 에탄올상을 첨가함으로써 균질기를 이용한 기계적 유화법과 변형된 EIP 법을 통한 저에너지 유화법을 동시에 사용하였다[32].

모든 실험은 23 ± 1 ℃에서 수행하였다. 제조된 모든 샘플은 23 ± 1 ℃에서 보관하였다. 본 연구에서 사용되는 모든 % 단위는 w/w%이다.

2.3. 쿼세틴 농도 최적화

광학 현미경과 육안을 통하여 나노에멀젼의 안정성 대한 쿼세틴 함량의 영향을 확인하였다. 나노에멀젼의 상분리는 육안으로 관찰하였고, 에멀젼의 형태는 카메라가 장착된 광학현미경 Leica DM RE (Leica, Germany)을 이용하여 확인하였다.

쿼세틴의 함량은 0.1 ~ 0.5 %로 0.1 % 간격으로 변화를 주었다. 에탄올과 POE (30) hydrogenated castor oil (HCO-30) 함량은 모두 5 %로 고정하였다. 그에 따른 조성을 Table 2에 나타내었다.

Table 1. Components and Formulations of Nano-emulsions Used in This Study

Components	Content (w/w%)	Phase
Stearic acid (SA)	1.00	Oil phase
Cetyl alcohol (CA)	1.00	
Caprylic/capric triglyceride (CCT)	2.00	
Mineral oil (MO)	7.00	
HCO-30	Variable	
Ethyl alcohol (EtOH)	Variable	EtOH phase
Quercetin (Q)	Variable	
Distilled water (DW)	Up to 100	Water phase

2.4. 계면활성제(HCO-30) 농도에 따른 나노에멀젼의 크기와 입도 분포

계면활성제로 사용된 POE (30) hydrogenated castor oil (HCO-30)의 함량에 따른 에멀젼의 크기는 입도분석기 Otsuka ELS-Z series (Otsuka Eletronics, Japan)를 이용하여 측정하였으며, 에멀젼의 안정성은 상분리의 유무를 육안으로 관찰하여 확인하였다.

나노에멀젼에 대한 계면활성제 함량의 영향을 평가하기 위해 HCO-30의 함량을 1 ~ 9 %까지 증가시키면서 입자의 크기 변화와 상분리를 관찰하였다. 평균 입자 크기와 입도 분포 변화를 동시에 확인함으로써 나노에멀젼의 안정성을 확인하였다.

2.5. 나노에멀젼에 대한 에탄올의 영향

나노에멀젼에 대한 에탄올의 영향을 알아보기 위해서 에탄올을 제외한 모든 성분을 Table 4에 나타낸 값으로 고정시켰다. 쿼세틴의 함량은 실험 2.3.의 결과에 따라 0.2 %로 하였다.

에탄올 함량을 1 ~ 15 %까지 증가시키면서 나노에멀젼의 입자 크기와 입도 분포을 관찰하였다.

2.6. 나노에멀젼의 입자 크기와 입도 분포

용액에 분산된 입자는 입자 크기에 의존한 브라운 운동을 하기 때문에 입자에 빛이 조사되었을 경우 얻어지는 광산란은 큰 입자에서는 천천히 작은 입자에서는 빠른 움직임을 나타낸다. 이 움직임을 광자상관법(photon correlation spectroscopy method; PCS)으로 해석함으로써 Stokes-Einstein 식을 이용하여 입자 크기와 입도 분

Table 2. The Formulation of Nano-emulsions by Quercetin Concentrations

	Components	Form. 1	Form. 2	Form. 3	Form. 4	Form. 5
Oil phase	SA	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	CA	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	CCT	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
	LP	7.00	7.00	7.00	7.00	7.00
	HCO-30	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
EtOH phase	EtOH	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
	Q	0.10	0.20	0.30	0.40	0.50
Water phase	DW	79.90	79.80	79.70	79.60	79.50

All the units were w/w%.

포를 구할 수 있다. 식은 아래와 같다.

$$G_2(\tau) = 1 + \alpha|G_1(\tau)|^2$$
$$G_1(\tau) = \exp(-Dq^2\tau)$$
$$d = kT / 3\pi\eta_0 D$$

여기서, $G_2(\tau)$과 $G_1(\tau)$은 각각 2차 자기상관계수와 1차 자기상관계수를 말한다. α는 정수를 나타내고, D는 확산계수, q는 확산 스펙트럼, τ는 상관시간, k는 볼츠만 상수, T는 절대온도, d는 유체역학적 지름, 그리고 η_0는 용매의 점도를 나타낸다[33].

에멀젼 입자 크기와 입도 분포는, 나노에멀젼의 매우 중요한 물리화학적 특성 중 하나로, 빛의 산란을 이용하여 입자 크기를 분석하는 입자 크기 분석기 Otsuka ELS-Z series (Otsuka Eletronics, Japan)를 이용하여 측정하였다. 나노에멀젼 시료는 희석과 같은 전처리 과정 없이 에멀젼 원상태로 측정하였다.

측정 산란각은 165°로 측정하였고 광원은 Ar 레이저를 사용하였으며 에멀젼의 크기는 70번씩 2회 측정하였다. 평균 입자 크기는 누적분석법을 통하여 나타내었고, 입도 분포는 Contin 법으로 해석하여 나타내었다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 쿼세틴 농도 최적화

본 연구에서는 항산화 작용은 뛰어나지만 물에 대한 용해도가 매우 낮은 쿼세틴의 가용화 및 안정성에 대하여 연구하였다. 현미경을 이용한 에멀젼의 형태학적인 연구는 Figure 1에서 볼 수 있듯이, 쿼세틴의 함량이 0.2 % 일 때, 가장 안정한 최적의 에멀젼을 제조할 수 있었다. 쿼세틴 농도 0.3 %부터는 Figure 1(B)에서 볼 수 있

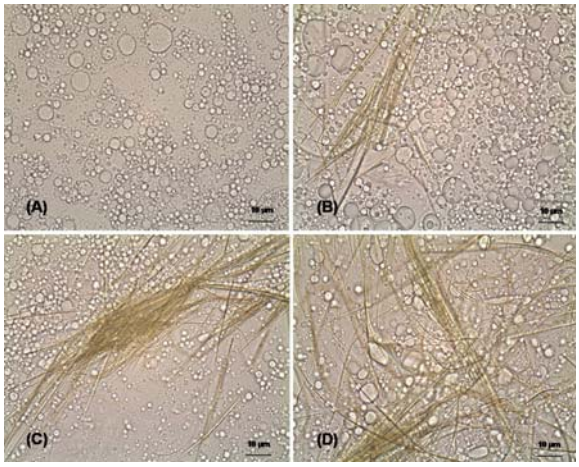

Figure 1. Microscopic image (×1,000) of emulsion by quercetin content. These images were taken at 6 h after preparation of nano-emulsions. Different quercetin content are shown: (A): 0.2 w/w% quercetin, (B): 0.3 w/w% quercetin, (C): 0.4 w/w% quercetin, (D): 0.5 w/w% quercetin.

듯이 막대기와 같은 제형이 나타났으며, 이로 인하여 국소 부분의 점도가 증가되었다(결과 나타내지 않음). 육안으로 에멀젼의 안정성 관찰하였을 때, 0.3 % 이상의 농도에서는 에멀젼의 층분리가 일어남을 확인할 수 있었다. 이러한 결과로부터 막대기와 같은 에멀젼이 상분리를 촉진시킴을 예측할 수 있었다.

쿼세틴은 수용액에서 용해도가 3 μg/mL인 것에 반하여 본 실험에서 제조한 쿼세틴 0.2 %를 함유하는 나노에멀젼은 쿼세틴이 2,000 μg/mL 함입되는 것을 확인할 수 있었다. 이는 수용액에서의 용해도에 비해 670배 증가된 것으로 쿼세틴의 화장품에 응용 가능성을 보여주고 있다.

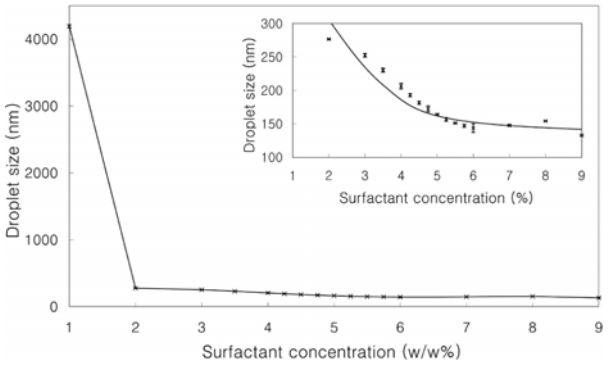

Figure 2. Droplet sizes of emulsion by concentration of surfactants. The size was measured at 3 h after preparation of emulsions.

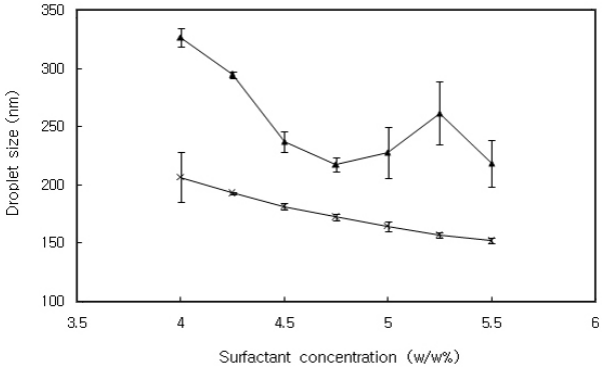

Figure 3. Droplet size of nano-emulsions by concentration of surfactant from 4.00 % to 6.00 % after 1 h and 72 h. (×): after 1 h; (▲): after 72 h.

3.2. HCO-30 농도에 따른 나노에멀젼의 입자 크기와 입도 분포

계면활성제는 물과 오일 성분을 섞어주는 역할을 하는 화장품에서 매우 주요한 성분이지만 피부에 홍반, 가려움 등의 피부 자극을 일으키는 성분이기도 하다. 그러므로 계면활성제는 최대한 적은 양으로 에멀젼의 안정화를 시키는 것이 중요하다.

본 실험에서는 나노에멀젼에 대한 계면활성제(HCO-30)의 영향을 평가하였다. 일반적으로 에멀젼에서는 계면활성제의 비율이 증가할수록 입자의 크기도 감소하는 경향을 보이는데 본 실험에서도 Figure 2와 같이 HCO-30 농도가 증가할수록 입자 크기도 감소함을 보였다. 이는 에탄올을 포함하고 쿼세틴을 함입한 나노에멀젼에서도 일반적 에멀젼의 경우와 마찬가지로 계면활성제의 농도가 증가하면 입자 크기는 점점 작아진다는 것을 확인하였다. HCO-30 농도가 1 %에서는 입자의 크기가 4 μm 이상으로 나타났으며 제조 직후 바로 층분리를 보였다. 이는 HCO-30 1 %로는 10 % 가량의 오일을 안정적으로 함입할 수 없으므로 입자가 매우 크고 불안정하여 크리밍이 일어난 후 합일이 일어났기 때문이다. 그러나 HCO-30 농도 2 %부터는 입자의 크기가 현저하게 감소하여 300 nm 이하의 크기를 보였다. 2 % 이후의 입자 크기를 좀 더 자세하게 관찰하기 위해 Figure 2 상단에 HCO-30 농도 2 ~ 9 %의 그래프를 나타내었다. 2 % HCO-30 에서는 입자의 크기가 276.75 nm로 나노에멀젼을 형성하였지만 하루 후 에멀젼 상부에 젤 타입의 에멀젼이 생성됨으로써 상분리가 이루어져 에멀젼이 안정하지 않음을 알 수 있었다. 높은 농도로 갈수록 입자의 크기는 좀 더 작아지지만 다른 농도와 큰 차이를 보이지 않았다. 그리고 평균 입자 크기뿐만 아니라 입도 분포를 측정하여 입자의 균일성과 안정성을 확인하였다. 특히, 입자 크기 변화의 기울기가 변하는 지점은 HCO-30의 농도가 4.0 ~ 5.5 %로, 이 부분을 자세하게 관찰하였다.

단분산이 아닌 다분산 거동을 보이는 에멀젼에서 누적 데이터를 통한 평균 입자 크기는 에멀젼 안정성에 대한 명확한 설명을 할 수 없었다. 따라서 에멀젼 입자 크기의 분포 특성으로 에멀젼의 안정성을 확인하기 위한 연구가 이루어져 왔다[34]. 본 연구에서도 에멀젼 입자 크기 분포를 통한 에멀젼의 안정성을 확인하였으며 Figure 2에 HCO-30 농도 1 ~ 9 %까지의 나노에멀젼의 입자크기를 나타내었고 입자 크기의 변곡점이 존재하는 HCO-30 농도 4.00 ~ 5.25 %의 입자 크기를 나타내었다. HCO-30 1 %에서는 오일 농도에 비하여 HCO-30의 농도가 매우 낮아 불안정한 에멀젼을 생성하여 입자 크기가 매우 컸으며 제조 직후 바로 층분리가 발생하였다. Figure 3은 에탄올 농도 4.0 ~ 5.5 %까지 1 h 후와 72 h 후의 에멀젼 크기를 비교한 것이다. HCO-30 농도 4.00 %에서는 1 h 후의 입자크기는 206.35 nm에서 72 h 후 326.75 nm로 크기가 120 nm 정도 증가하였고, 4.25 %에서는 192.95 nm에서 294.75 nm로 101.80 nm가 증가하였다. 하지만 HCO-30 농도 4.50 %에서는 181.45 nm에서 237.30 nm로 55.85 nm 증가하였고, 4.75 %는 1 h 후의 입자크기가 172.40 nm에서 72 h 후 217.5 nm로 45.10 nm 증가하였다. HCO-30 농도 5 %부터는 72 h 후의 크기가 1 h 후의 크기보다 60 ~ 100 nm 정도의 증가를 보였으며 입자 분포가 넓어지는 것을 확인할 수 있었다. HCO-30 농도가 4.00 %인 Figure 4(A)를 보면, 제조 1 h 후의 그래프는 지름이 2 μm 입자가 존재하고 입도 분포가 비교적 넓었

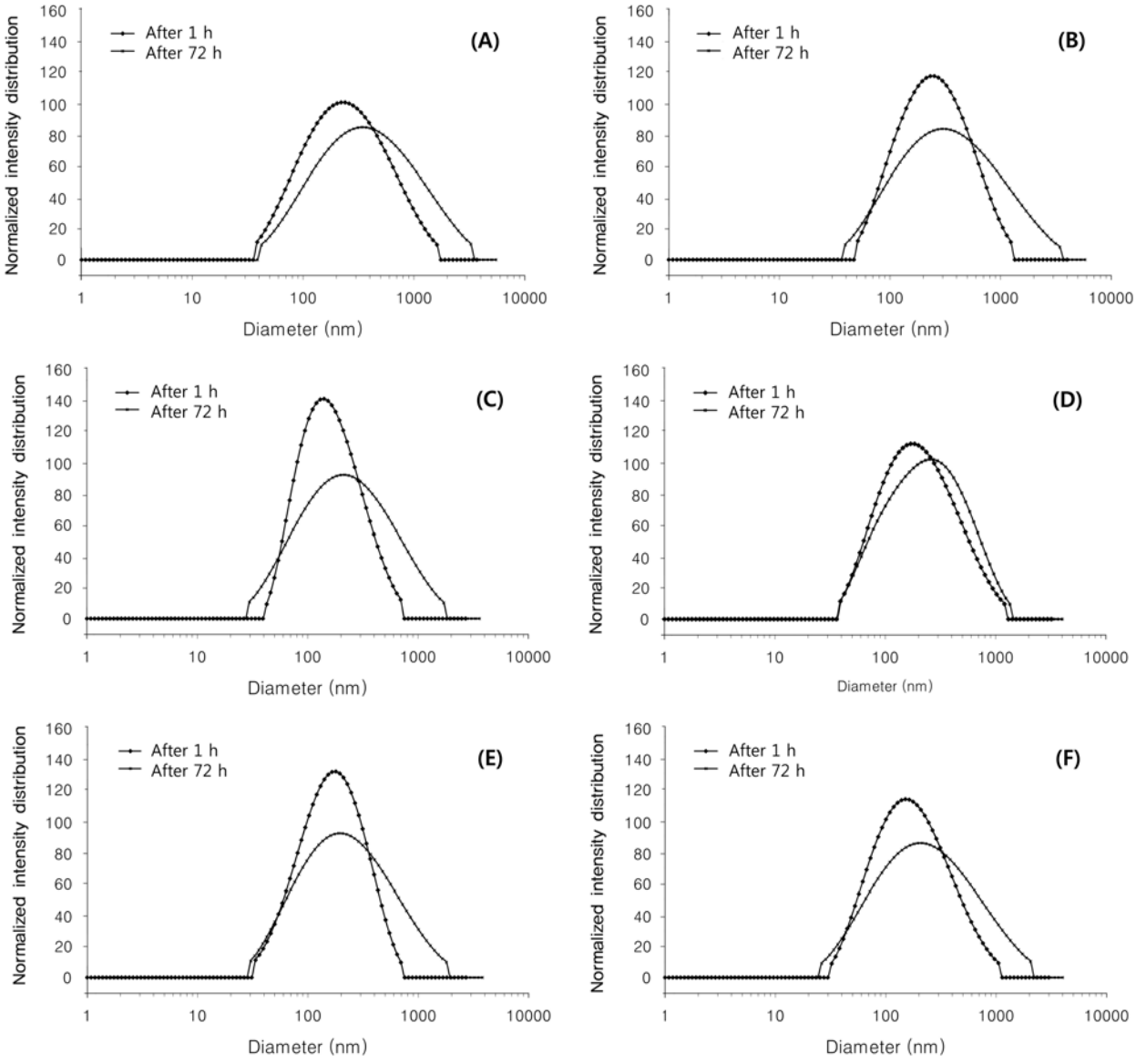

Figure 4. Measurements were performed using a PCS method. Different ethanol concentrations are shown: (A): 4.00 %; (B): 4.25 %; (C): 4.50 %; (D): 4.75 %; (E): 5.00 %; (F): 5.25 %, respectively. (×): after 1 h; (▲): after 72 h.

으며 72 h 후에는 3.5 μm 크기의 입자가 존재하며 분포가 매우 넓어졌다. HCO-30 농도 4.25 %인 Figure 4(B)에서는 입자 크기가 최대 1.5 μm가 존재하며 입도 분포는 4.00 %보다 좁아지는 것을 알 수 있다. 하지만 72 h 후의 입자 분포는 4 %의 분포와 거의 같았다. 4.50 %인 Figure 4(C)는 최대 입자의 크기도 1 μm 이내로 존재하고 입도 분포도 좁으며 최대 피크도 100 nm 부근에 존재하며 그 강도가 가장 크다. 하지만 72 h 후 입자 분포가 약간 넓어짐을 확인할 수 있었다. 4.75 %에서는 제조 1 h 후의 입자 분포는 4.50 %에 비해 분포가 넓고 강도도 약하였으나 72 h 후의 분포가 1 h 후와 거의 같은 분포를 보였다. 5.00 % 이상부터는 입자 크기는 작으나 입도 분포가 넓어지고 최대 피크의 강도가 작아지는 것을 알 수 있다. 이러한 결과로부터 HCO-30의 농도가 4.75 %일 때 제조 직후에는 4.50 %보다 제조 1 h 후 분포가 약간 넓게 분포하지만 매우 안정함을 알 수 있었다. HCO-30 농도 4.75 %가 가장 적은 함량의 계면활성제로 가장 안정한 에멀젼을 생성함을 알 수 있었으며, 이는 에탄올의 함

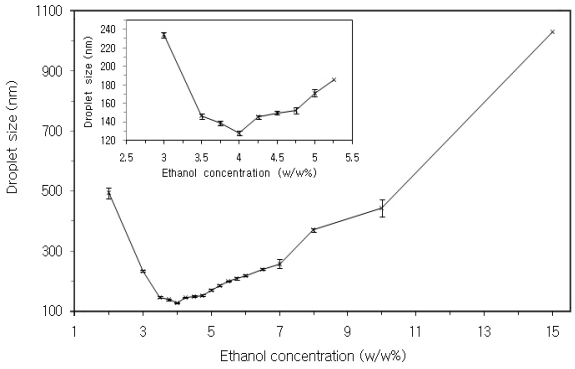

Figure 5. The droplet size as a function of ethanol concentrations. Droplet sizes were measured 4h after preparation.

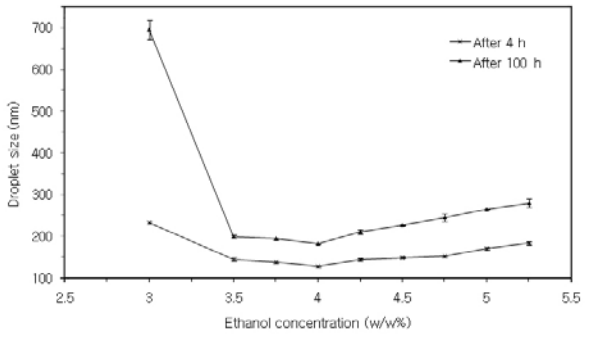

Figure 6. The droplet size as a function of ethanol concentrations. Droplet sizes were measured after 4 h and 100 h. (×): after 4 h; (▲): after 100 h.

량이 5.00 %인 것에도 영향을 받은 것으로 예상된다.

3.3. 나노에멀젼에 미치는 에탄올의 영향

퀴세틴을 함유하는 나노에멀젼의 입자 크기와 안정성에 대한 에탄올의 영향을 평가하였다. 에탄올 함량이 1.00 %는 퀴세틴 0.20 g을 균일하게 용해하지 못하였기 때문에 불안정한 입자가 생성되므로 결과에 나타내지 않았다. Figure 5에 나타나듯이 에탄올 2.00 %에서는 크기가 494.05 ± 17.89 nm로 입도분포가 다소 넓게 나타났으며, 3.00 %부터는 표준편차가 4 nm 이하로 입도 분포가 좁게 나타났다. 에탄올 3.00 %에서는 입자 크기가 234.15 nm이고, 3.50 %는 146.20 nm, 3.75 %는 138.55 nm, 4.00 %에서의 입자크기는 128.15 nm로 가장 작았으며, 4.25 %에서는 145.50 nm, 4.50 %는 149.95 nm, 4.75 %는 152.65 nm, 5.00 %는 171.20 nm, 그리고 5.25 %에서는 185.40 nm로 측정되었다. 에탄올 7.00 %에서는 크기가 258.40 nm, 8.00 %에서는 371.25 nm, 10 %는 444.95 nm, 15 %는 1031.10 nm로 점점 증가하였으며 입도분포 또한 넓어지는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과로부터 4.00 % 이후부터 입자 크기가 증가하고 입도 분포 또한 넓어지는 것을 알 수 있었다. 이는 서론에 명시한 오일상과 수상의 계면장력을 감소시켜 입자를 안정화시킨 영향과 에탄올의 함량이 증가함으로써 오일에 대한 연속상의 용해도가 증가하여 Ostwald ripening이 증가된 에멀젼 불안정화의 영향, 에탄올 농도에 따른 퀴세틴의 용해성의 영향이 있을 것이다. 또한, 에멀젼 외벽을 이루는 HCO-30의 구성 성분 중 산소와 에탄올의 상호작용으로 에멀젼을 안정화하여 입자 크기를 작게 하였지만 그 비율을 넘어서게 되면 에멀젼 표면에 존재하게 되어 입자 크기를 증가시키거나 에멀젼을 불안정화시켜 입자 크기를 증가시키는 것으로 추측된다. 이를 확인하기 위해 현재 연구가 진행되고 있다.

Figure 6에는 제조 4 h 후와 100 h 후의 입자 크기를 비교하였다. 에탄올 3.50 %에서 4 h 후의 크기는 146.20 nm이고 100 h 후의 크기는 200.30 nm로 54.10 nm 증가하였고, 에탄올 3.75 %는 138.55 nm에서 194.55 nm로 56.00 nm 증가하였으며, 4.00 %에서는 4 h 후는 128.15 nm, 100 h 후는 182.50 nm로 54.35 nm 증가하였다. 4.25 %부터는 1 h 후와 100 h 후의 입자 크기 증가량이 증가하는 것을 알 수 있었다.

나노에멀젼의 안정성을 확인하기 위해 입자 크기뿐만 아니라 평균 입자 크기가 작은 3.50 %에서 5.25 %까지의 입도 분포를 나타내었다(Figure 7). 에탄올 3.5 % (Figure 7(A))에서는 최대 피크는 큰 변화를 보이지는 않지만 μm 크기의 입자가 증가함을 볼 수 있다. 4.00 % (Figure 7(B))에서는 평균 입자 크기도 거의 변화가 없으며, 4 h 후와 100 h 후의 입도 분포도 거의 차이가 없음을 확인할 수 있었다.

이러한 결과로부터 에탄올 농도가 4 %일 때 가장 작고 안정한 나노에멀젼을 형성할 수 있음을 알았다. 나노에멀젼에 대한 에탄올의 영향을 연구함으로써 적은 양의 에탄올을 이용하여 약물의 최대로 함입시킬 수 있으며, 작고 안정한 나노에멀젼을 만듦으로써 스킨로션, 에센스 및 향수와 같은 화장품과 제약 등에 응용할 수 있을 것으로 사료된다.

3.4. 시간에 따른 나노에멀젼의 입자 분포와 Ostwald Ripening

0.2 % 퀴세틴, 4.75 % HCO-30, 그리고 에탄올 함량이 4.00 %일 때의 나노에멀젼의 안정성을 알아보기 위하여

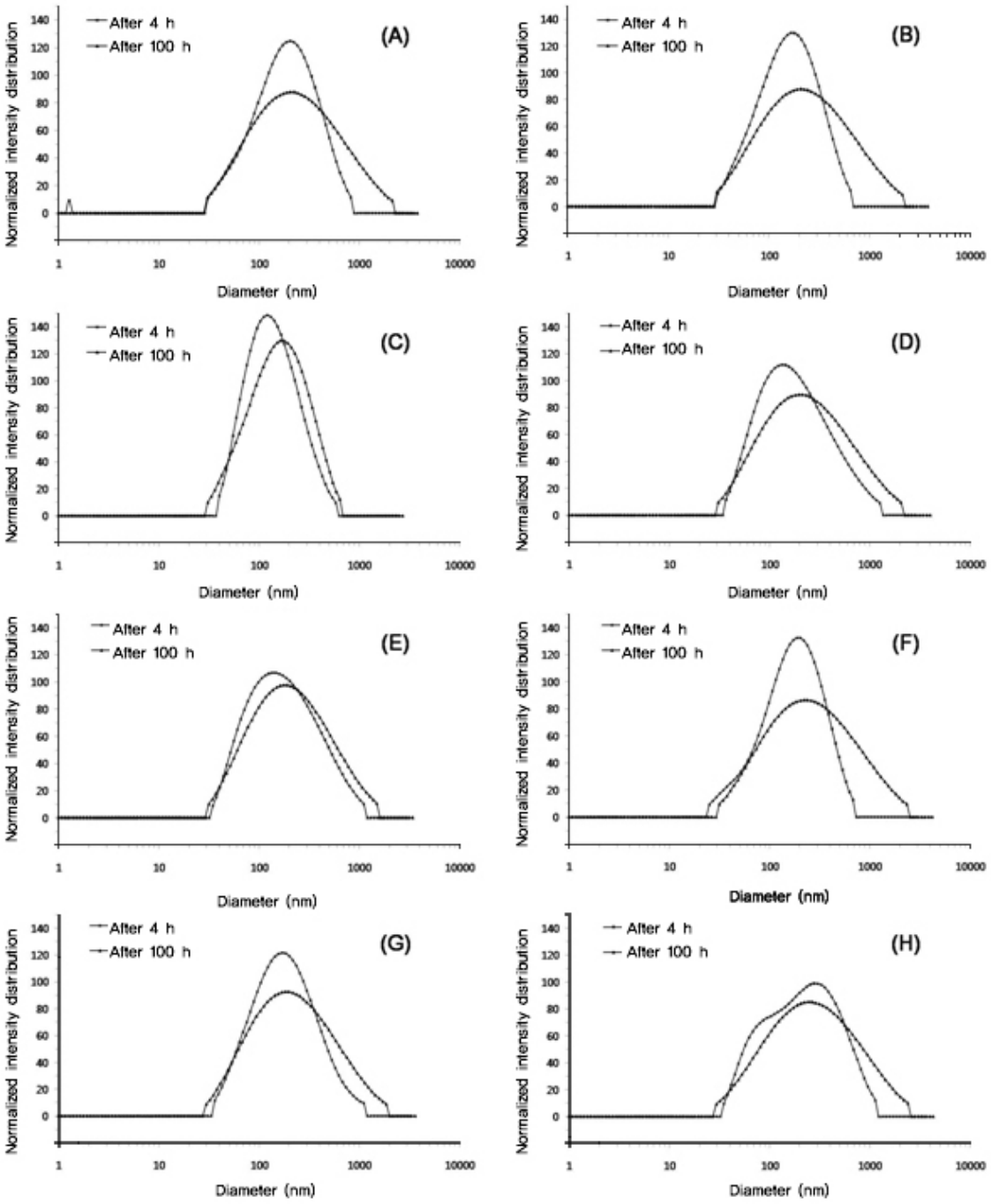

Figure 7. Droplet size distribution of nano-emulsion as a function of ethanol concentrations from 3.50 % to 5.50 %. Measurements were performed using a PCS method. Different ethanol concentrations are shown: (A): 3.50 %; (B): 3.75 %; (C): 4.00 %; (D): 4.25 %; (E): 4.50 %; (F): 4.75 %; (G): 5.00 %, and (H): 5.25 %, respectively. (×): after 4 h; (▲): after 100 h.

입자 분포 변화와 입자 크기 변화를 통한 Ostwald ripening 속도를 관찰하였다. Ostwald ripening은 나노에멀젼에서의 가장 큰 불안정화 요인으로 알려져 있다. Lifshitz-Slezov-Wagner (LSW) 이론에 따르면, Ostwald ripening이 일어난 에멀젼은 시간에 따른 반지름의 세 제곱이 직선을 나타내야 한다[35]. Figure 8은 EIP 법과 균질기

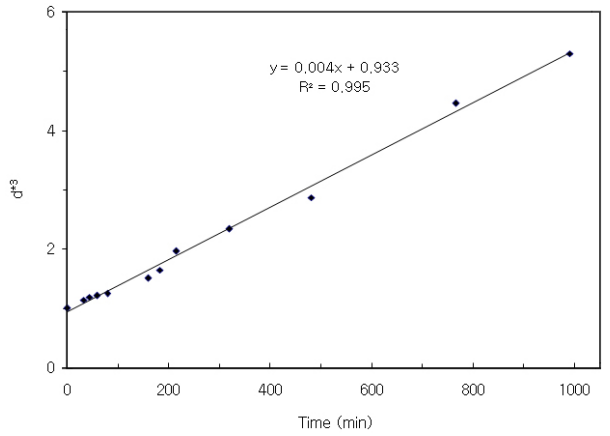

Figure 8. Nano-emulsion d^{*3} as a function of time at 23 ± 1 ℃ in the system oil/HCO-30/quercetin/ethanol/water phase (oil 11.00 %, HCO-30 4.75 %, quercetin 0.20 %, ethanol 4.00 %, and water 80.05 %). d^* represents d/d_0. d_0: the size of nano-emulsion after preparation.

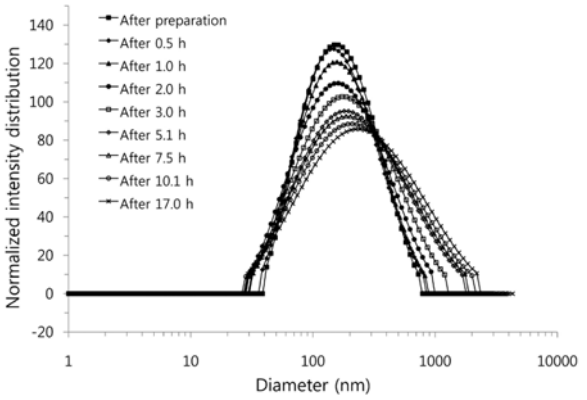

Figure 9. Droplet size distribution of nano-emulsion prepared with 0.20 % quercetin and 4.00 % ethanol as a function of time (oil 11.00 %, HCO-30 4.75 %, quercetin 0.20 %, ethanol 4.00 %, and water 80.05 %). Measurements were performed using a PCS method. Different times are shown: (■): after preparation; (◆): after 0.5 h; (▲): after 1.0 h; (●): after 2.0 h; (□): after 3.0 h; (◇): after 5.1 h; (△): after 7.5 h; (○): after 10.1 h, (×): after 17.0 h, respectively.

를 이용하여 제조한 나노에멀젼의 시간에 따른 지름의 세 제곱의 그래프를 보여준다. Figure 8에서 볼 수 있듯이, 쿼세틴 0.20 %, 에탄올 4.00 % 함유하는 나노에멀젼은 직선의 그래프로 나타나므로 Ostwald ripening이 일어난 것을 확인할 수 있다. Ostwald ripening 속도는 Figure 8의 기울기를 통하여 구할 수 있다. 속도는 3.24×10^{-25} m^3/s로 나타났다. Ostwald ripening은 늦어도 하루 이내에 모두 이루어지기 때문에 본 실험에서는 17 h까지의 측정치를 나타내였다. 이 후로는 Ostwald ripening 이외의 응집과 같은 불안정화 요인으로 입자 크기의 변화가 일어나는 것을 알 수 있었다. 오일 성분의 분리가 일어나지 않았으므로 입자 크기 변화가 합일에 의한 것이 아님을 확인할 수 있었다(~ 30일).

Figure 9는 0.2 % 쿼세틴, 4.75 % HCO-30, 그리고 4.00 % 에탄올을 함유하는 나노에멀젼의 시간에 따른 입도 분포를 나타낸 것이다. 먼저 제조 직후의 분포를 보면, 최소 40 nm에서 최대 800 nm까지 존재하며, 0.5 h에서는 30 ~ 900 nm로 거의 변화가 보이지 않았으며 최대 피크는 150 nm에서 나타난다. 하지만 시간이 지남에 따라 최소 입자 크기는 크게 변화가 없지만 최대 입자 크기는 17.0 h 후, 2500 nm까지 커지게 되며 최대 피크 또한 150 nm에서 300 nm로 점점 오른쪽으로 이동함으로써 크기가 커지는 것을 확인할 수 있다.

나노에멀젼의 안정성을 육안으로 확인하였을 시에는 30 일 동안 합일과 같은 층분리 현상은 일어나지 않았다. 이와 같이 4.00 % 에탄올, 0.20 % 쿼세틴, 4.75 % HCO-30을 포함하는 에멀젼의 크기는 약간 증가하였으나 매우 안정함을 확인할 수 있었다.

4. 결 론

물에 대한 용해도가 낮지만 항산화 작용과 라디칼 소거 활성 및 생리 활성을 가지는 쿼세틴을 화장품에 응용하기 위하여 에탄올을 이용하여 안정한 나노에멀젼을 제조하였다. 나노에멀젼 제조는 EIP 법을 변형하여 사용하였으며 호모믹서를 통한 기계적 방법을 혼합하여 제조하였다. 나노에멀젼의 입자 크기와 입도 분포를 측정하여 쿼세틴의 함량에 따른 나노에멀젼의 안정성을 확인하였으며, 계면활성제의 함량에 따른 나노에멀젼의 크기 변화와 입도 분포를 관찰하였다. 마지막으로 나노에멀젼에 대한 에탄올의 영향을 평가하였다.

쿼세틴 농도가 0.2 %일 때 최적화된 상태를 보였다. 계면활성제인 HCO-30의 영향을 보면, 농도가 증가할수록 나노에멀젼의 입자 크기가 작아졌으나 4.75 % 농도일 때 가장 안정한 에멀젼이 형성됨을 확인할 수 있었다. 에탄올은 농도 2.00 %에서 4.00 %까지는 입자 크기가 감소하였고 4.00 %이상부터는 크기가 증가하였다. 이로써, 에탄올 농도가 4.00 %일 때 가장 안정한 에멀젼이 생성됨을 알 수 있었고 Ostwald ripening 속도가 3.24×10^{-25} m^3/s로 Ostwald ripening에 의한 입자 불안정화가

일어남 수 확인할 수 있었다.

이 연구를 통해서 퀴세틴의 화장품 응용 가능성을 확인하였으며 나노에멀젼에 대한 에탄올의 영향을 연구함으로써 향수, 스킨, 그리고 에센스 등 화장품에의 응용을 기대할 수 있을 것이다.

References

1. J. Ugelstad, M. S. El-Aasser, and J. W. Vanderhoff, Emulsion polymerization: initiation of polymerization in monomer droplet, *Polym. Lett. Ed.*, **11**, 503 (1973).
2. M. S. El-Aasser, C. D. Lack, Y. T. Choi, T. I. Min, J. W. Vanderhoff, and F. M. Fowkes, Interfacial aspects of miniemulsions and miniemulsion polymers, *Colloids Surf.*, **12**, 79 (1984).
3. M. S. El-Aasser, C. D. Lack, J. W. Vanderhoff, and F. Fowkes, The miniemulsification process different form of spontaneous emulsification, *Colloids Surf.*, **29**, 103 (1988).
4. M. S. El-Aasser and C. M. Miller, In polymeric dispersions: principles and applications, ed. Asua, J. M., Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands, 109 (1997).
5. E. D. Sudol and M. S. El-Aasser, In emulsion polymerization and emulsion polymers, P. A. Lovell and M. S. El-Aasser, Eds., John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, United Kingdom, 700 (1997).
6. H. Nakajima, In industrial applications of microemulsions, Eds. C. Solans, H. Kunieda, Marcel Dekker, New York, **66**, 175 (1997).
7. H. Nakajima, S. Tomomasa, and M. Okabe, Premier congress mondial de emulsion, Paris, France, 162 (1993).
8. F. Lachampt and R. M. Vila, A contribution to the study of emulsions, *Am. Perfum Cosmet.*, **82**(1), 29 (1967).
9. F. Lachampt and R. M. Vila, Parfumes cosmetics, *Savons*, **10**, 372 (1967).
10. F. Lachampt and R. M. Vila, Parfumes cosmetics, *Savons*, **12**, 239 (1967).
11. S. Amselem and D. Friedman, Submicron emulsions as drug carriers for topical administration: submicron emulsions in drug targeting and delivery, ed. S. Benita Harwood Academic Publishers, London, 153 (1998).
12. C. Solans, J. Esquena, A. Forgiarini, D. Morales, N. Uso´n, and P. Izquierdo, Nano emulsions: formation and properties: surfactants in solution: fundamentals and applications, Surfactant Science Series, eds. D. Shah, B. Moudgil, K. L. Mittal, Marcel Dekker, New York, 525 (2002).
13. T. F. Tadros, P. Izquierdo, J. Esquena, and C. Solans, Formation and stability of nano-emulsions, *Adv. Colloid Interface Sci.*, **108**, 303 (2004).
14. C. Solans, P. Izquierdo, J. Nolla, N. Azemar, and M. J. Garcia-Celma, Nano-emulsions, *Current Opinion Colloid Interface Sci.*, **10**, 102 (2005).
15. N. Singh, B. Manshian, G. J. S. Jenkins, S. M. Griffiths, P. M. Williams, T. G. G. Maffeis, C. J. Wright, S. H. Doak, T. G. G. Maffeis b, C. J. Wright b, and S. H. Doak b, Nanogenotoxicology: the DNA damaging potential of engineered nanomaterials, *Biomaterials*, **30**, 3891 (2009).
16. L. Marszall, In nonionic surfactants: surfactant science series, ed. M. J. Shick, Marcel Dekker, New York, **23**, 493 (1987).
17. K. Shinoda and H. J. Saito, The effect of temperature on the phase equilibria and the types of dispersions of the ternary system composed of water, cyclohexane, and nonionic surfactant, *Colloid Interface Sci.*, **26**, 70 (1968).
18. C. F. Skibola and M. T. Smith, Potential health impacts of excessive flavonoid intake, *Free Radic. Biol. Med.*, **29**(3), 375 (2000).
19. I. Morel, G. Lescoat, P. Cogrel, O. Serqent, N. Pasdeloup, P. Brissot, P. Cillard, and J. Cillard, Antioxidant and iron-chelation activities of the flavonoids catechin, quercetin and diosmetin on iron-loaded rat hepatocyte cultures, *Biochem. Pharmacol.*, **45**, 13 (1993).
20. P. Knekt, R. Jarvinen, A. Reunanen, and J. Maatela, Flavonoid intake and coronay mortality in Finland: a cohort study, *Br. Med. J.*, **312**, 478 (1996).
21. M. G. Hertog, P. M. Sweetnam, A. M. Fehily, P. C. Elwood, and D. Kromhout, Antioxidant flavonols

and ischemic heart disease in a Welsh population of men: the Caerphilly study, *Am. J. Clin. Nutr.*, **65**, 1489 (1997).
22. C. A. Rice-Evans, N. J. Miller, and G. Paganga, Antioxidant properties of phenolic compounds, *Trends Plant Sci.*, **2**, 152 (1997).
23. P. Mahakunakorn, M. Tohda, Y. Murakami, K. Matsumoto, and H. Watanabe, Antioxidant and free radical-scavenging activity of Choto-san and its related constituents, *Biol. Pharm. Bull.*, **27**, 38 (2004).
24. Y. Sadzuka, T. Sugiyama, K. Shimoi, N. Kinae, and S. Hirota, Protective effect of flavonoids on doxorubicin induced cardio toxicity, *Toxicol. Letters*, **92**, 1 (1997).
25. M. F. Molina, I. Sanchez-Reus, I. Iglesias, and J. Benedi, Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects against ethanol-induced oxidative stress in mouse liver, *Biol. Pharm. Bull.*, **26**, 1398 (2003).
26. X. Dong, G. Z. Zhen-Lun, B. J. Ping, and W. Zhong, Effects of quercetin on aggregation and intracellular free calcium of platelets, *Acta. Pharmacol. Sin.*, **16**, 223 (1995).
27. S. M. Thornhill and A. M. Kelly, Natural treatment of perennial allergic rhinitis, *Altern. Med. Rev.*, **5**, 448 (2000).
28. D. H. Kim, E. A. Jung, I. S. Sohng, J. A. Han, T. H. Kim, and M. J. Han, Intestinal bacterial metabolism of flavonoids and its relation to some biological activities, *Arch. Pharm. Res.*, **21**, 17 (1998).
29. I. K. Chun and E. H. Suh, Solubilization of quercetin, and permeability study of quercetin and rutin to rabbit duodenal mucosa, *Yakhak Hoeji*, **42**, 59 (1998).
30. E. Dickinson and C. M. Woskett, Effect of alcohol on the absorption of casein at the oil-water interface, *Food Hydrocoll.*, **2**(3), 187 (1988).
31. I. Burgaud and E. Dickinson, Emulsifying effects of food macromolecules in presence of ethanol, *J. Food Sci.*, **55**(3), 875 (1990).
32. P. Fernandez, V. Andre, J. Rieger, and A. Kuhnle, Nano-emulsion formation by emulsion phase inversion, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, **251**, 53 (2004).
33. B. J. Berne and R. Pecora, Dynamic light scattering with applications to chemistry, biology and physics, Wiley-Interscience, New York, 15 (1976).
34. C. Goddeeris, F. Cuppo, H. Reynaers, W. G. Bouwman, and G. Van den Mooter, Light scattering measurements on microemulsions: estimation of droplet sizes, *J. Pharmaceutics*, **312**, 187 (2006).
35. W. R. Liu, D. J. Sun, C. F. Li, Q. Liu, and J. Xu, Formation and stability of paraffin oil-in-water nano-emulsions prepared by the emulsion inversion point method, *J. Colloid Interface Sci.*, **303**(2), 557 (2006).