(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0024397
(43) 공개일자 2019년03월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/51 (2006.01) *A61K 31/12* (2006.01)
A61K 36/9066 (2006.01) *A61K 47/14* (2017.01)
(52) CPC특허분류
A61K 9/5123 (2013.01)
A61K 31/12 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0111358
(22) 출원일자 2017년08월31일
심사청구일자 2017년08월31일

(71) 출원인
세종대학교산학협력단
서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)
(72) 발명자
홍근표
경기도 남양주시 별내3로 63, 3709동 605호 (별내동, 쌍용예가아파트)
고상훈
서울시 광진구 광나루로 361, 201동 402호 (군자동, 광진 동양파라곤)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
정성종, 신명용

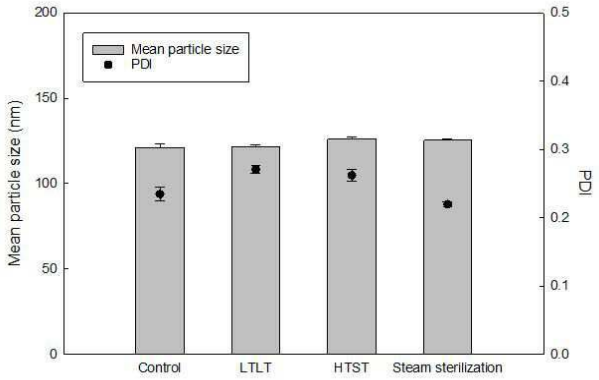
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 발명의 명칭 **열안정성이 향상된 커큐민 나노구조 지질 담체 및 이의 효율적인 안정화 열처리 방법**

(57) 요 약

본 발명은 열안정성이 향상된 커큐민 나노구조 지질 담체(Curcumin Nanostructured Lipid Carrier, Cur_NLC) 및 이의 효율적인 안정화 열처리 방법에 관한 것으로, 본 발명에 따라 유화제로서 스팬(Span) 80와 트윈(Tween) 80을 3:7 내지 5:5의 중량비율로 사용하고, 상기 유화제를 지질의 총 중량에 대하여 15 내지 80 중량%의 양으로 포함하고, 상기 지질이 액체 지질로서 대두유(soybean oil)를 사용하고 고체 지질로서 글리세릴 트리스테아레이트(Glyceryl Tristearate)를 사용함으로써 커큐민 나노구조 지질 담체(Cur_NLC)의 열에 대한 안정성을 향상시킬 수 있다. 또한, 커큐민 나노구조 지질 담체(Cur_NLC)를 HTST (High Temperature Short Time)를 이용하여 살균처리함으로써 커큐민 나노구조 지질 담체(Cur_NLC)를 보다 안정화시킬 수 있다.

대 표 도 - 도2



(52) CPC특허분류
A61K 36/9066 (2013.01)
A61K 47/14 (2013.01)
A61K 9/5176 (2013.01)
A61K 9/5192 (2013.01)

(72) 발명자
조혜은
경기도 부천시 부흥로 49, 2726동 602호 (상동, 백송마을 풍림아이원)
김영은
서울시 송파구 송파대로 111
서석진
서울특별시 노원구 노해로 508, 606동 906호(상계동, 상계주공6단지아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2014M3A7B4051898
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 나노소재기술개발사업
연구과제명 식품나노소재 기준물질 제조, 분석 및 효능 평가 원천기술개발
기 여 율 1/1
주관기관 세종대학교 산학협력단
연구기간 2016.09.01 ~ 2017.08.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

커큐민 나노구조 지질 담체(Curcumin Nanostructured Lipid Carrier, Cur_NLC)로서, 상기 나노구조 지질 담체(Nanostructured Lipid Carrier, NLC)가 유화제로서 소르비탄 모노올리에이트(sorbitan monooleate)와 폴리소르베이트(polysorbate)를 3:7 내지 5:5의 중량비율로 사용하고, 상기 유화제를 지질의 총 중량에 대하여 15 내지 80 중량%의 양으로 포함하고, 상기 지질이 액체 지질로서 대두유(soybean oil)를 사용하고 고체 지질로서 글리세릴 트리스테아레이트(Glyceryl Tristearate)를 사용하는 것을 특징으로 하는 열 안정성이 향상된 커큐민 나노구조 지질 담체(Curcumin Nanostructured Lipid Carrier, Cur_NLC).

청구항 2

하기 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 제 1 항에 따른 커큐민 나노구조 지질 담체(Curcumin Nanostructured Lipid Carrier, Cur_NLC)의 제조방법:

(S1) 대두유(soybean oil), 커큐민(Curcumin), 글리세릴 트리스테아레이트(Glyceryl Tristearate) 및 소르비탄 모노올리에이트(sorbitan monooleate)와 폴리소르베이트(polysorbate)의 3:7 내지 5:5(중량비) 혼합물을 혼합하여 85 내지 95℃에서 5 내지 15분간 가열하면서 교반하여 유상(oil phase)을 수득하는 단계;

(S2) 물을 85 내지 95℃에서 5 내지 15분간 가열하여 수상(aqueous phase)을 준비하고 상기 단계 (S1)에서 수득된 유상(oil phase)에 적가한 다음 85 내지 95℃에서 5 내지 15분간 가열하여 분산액을 수득하는 단계; 및

(S3) 상기 단계 (S2)에서 수득된 분산액을 균질화기를 사용하여 균질화시킨 다음 초음파 분쇄기를 이용하여 재분산시켜 커큐민이 함입된 커큐민 나노구조 지질 담체(Curcumin Nanostructured Lipid Carrier, Cur_NLC)를 제조하는 단계.

청구항 3

제 1 항에 따른 커큐민 나노구조 지질 담체(Curcumin Nanostructured Lipid Carrier, Cur_NLC)를 70 내지 80℃에서 10 내지 20초 동안 HTST (High Temperature Short Time) 열처리하는 것을 특징으로 하는 커큐민 나노구조 지질 담체(Curcumin Nanostructured Lipid Carrier, Cur_NLC)의 안정화 열처리 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 열안정성이 향상된 커큐민 나노구조 지질 담체(Curcumin Nanostructured Lipid Carrier, Cur_NLC) 및 이의 효율적인 안정화 열처리 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 고체 지질 나노 입자 (solid lipid nanoparticle, SLN)는 효율적이고 무독성 운반체 전달 시스템으로서 많은 주목을 받고 있다. SLN은 표적화된 유효물질의 전달, 증가된 안정성 및 혼입된 유효물질의 용해도를 포함하는 다수의 이점을 가지며, HPH(high pressure homogenization)와 같은 간단한 방법으로 제조할 수 있는 이점이 있으나, 봉입 가능한 유효물질의 양에 한계가 있고 보관기간 동안 외부로 쉽게 방출된다는 문제점이 보고된 바 있다(Mehnert W, et al., Adv Drug Del Rev. 2001;47:165-96).

[0003] 이러한 문제점을 개선하기 위하여 최근에는 나노구조 지질 담체(Nanostructured Lipid Carrier, NLC)가 개발되었다. NLC는 2세대 SLN으로서 고체 지질과 액상 지질을 특정 비율로 조합하여 HPH 등의 방법으로 제조되는 분산상태의 용액이다. NLC는 이러한 특징으로 인해 높은 유효물질의 봉입율과 저장 기간 중 유효물질의 방출이나 불안정성을 개선한다는 장점이 있는 바, 차세대 제형으로 주목받고 있다. 이러한 NLC의 합성을 위한 가장 보편적인 방법은 수 중유 에멀젼, 균질화 및 응고 공정을 거칠 수 있다.

[0004] 한편, 커큐민(Curcumin)은 화학식 $C_{21}H_{20}O_6$, 분자량 368.38을 가지는 화합물로서 동인도산의 생강과에 속하는 식물인 강황(Curcuma longa Linn, *Zingiberaceae*)의 뿌리에서 추출되어 인도음식에 널리 사용되어 온 폴리페놀성 분으로 심황(turmeric)의 커큐미노이드(curcuminoid)의 일종이다. 식품첨가물에서는 노란색 색소로서 향신료로 이용되고 있으며, 항종양, 항산화, 항아밀로이드와 항염증작용을 가지고 있다. 이러한 커큐민은 산화에 의한 DNA 손상과 지질과산화를 억제하고, 항산화 작용과 자유라디컬의 청소부 역할을 하며, 77 % 커큐민 I (diferuloylmethane), 17 % 커큐민 II (demethoxycurcumin) 및 3 % 커큐민 III (bis-demethoxycurcumin)와 같은 3가지의 주요성분을 포함하고, 단독 또는 복합으로 암 예방 활성을 가지고 있음이 밝혀졌다(F. Wang et al. Acta Pharm. 67 (2017) 357-371). 그러나, 이러한 커큐민은 생체 이용률이 낮고 분산력이 부족하며 생체 내에서 안정성이 부족하여 그 사용이 제한적이라는 단점이 있다.

[0005] 최근에는 이러한 커큐민의 생체 이용률을 증대시키기 위하여 커큐민을 전달 시스템인 나노구조 지질 담체(Nanostructured Lipid Carrier, NLC)의 지질에 용해시킨 커큐민 나노구조 지질 담체 (Curcumin Nanostructured Lipid Carrier, Cur_NLC)가 개발된 바 있다(Chen Y, et al., Drug Deliv. 2016 May;23(4):1383-92). 그러나, 이러한 커큐민 나노구조 지질 담체 (Cur_NLC)는 열에 대한 안정성이 여전히 낮아 생체 이용률이 저조한 실정이다.

[0006] 이에 본 발명자들은 이러한 커큐민 나노구조 지질 담체(Cur_NLC)의 문제점인 열에 대한 안정성을 보다 증대시킬 수 있는 Cur_NLC을 개발하고자 계속 연구를 진행한 결과, 유화제로서 소르비탄 모노올리에이트(sorbitan monooleate)와 폴리소르베이트(polysorbate)를 일정한 비율로 사용하고, 상기 유화제를 지질에 대하여 특정한 비율로 사용하며, 상기 지질 중 액체 지질로서 대두유(soybean oil)을 사용하고 고체 지질로서 글리세릴 트리스테아레이트(Glyceryl Tristearate)를 사용함으로써 커큐민 나노구조 지질 담체(Cur_NLC)의 열에 대한 안정성을 증대시킬 수 있음을 발견하였으며, 이에 더하여 커큐민 나노구조 지질 담체(Cur_NLC)의 인체 적용을 위한 살균 공정시 HTST (High Temperature Short Time)을 사용할 경우 우수한 안정성을 유지할 수 있음을 발견함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 따라서, 본 발명에서 해결하고자 하는 기술적 과제는 열에 대한 안정성이 증대된 커큐민 나노구조 지질 담체(Curcumin Nanostructured Lipid Carrier, Cur_NLC)를 제공하기 위한 것이다.

[0008] 또한, 본 발명에서 해결하고자 하는 다른 기술적 과제는 상기 열에 대한 안정성이 증대된 커큐민 나노구조 지질 담체(Curcumin Nanostructured Lipid Carrier, Cur_NLC)의 제조방법을 제공하기 위한 것이다.

[0009] 또한, 본 발명에서 해결하고자 하는 또다른 기술적 과제는 상기 커큐민 나노구조 지질 담체(Curcumin Nanostructured Lipid Carrier, Cur_NLC)의 효율적인 안정화 열처리 방법을 제공하기 위한 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기한 기술적 과제를 해결하기 위하여, 본 발명에서는 커큐민 나노구조 지질 담체(Curcumin Nanostructured Lipid Carrier, Cur_NLC)로서, 상기 나노구조 지질 담체(NLC)가 유화제로서 소르비탄 모노올리에이트(sorbitan monooleate)와 폴리소르베이트(polysorbate)를 3:7 내지 5:5의 중량비율로 사용하고, 상기 유화제를 지질의 총 중량에 대하여 15 내지 80 중량%의 양으로 포함하고, 상기 지질이 액체 지질로서 대두유(soybean oil)를 사용하고 고체 지질로서 글리세릴 트리스테아레이트(Glyceryl Tristearate)를 사용하는 것을 특징으로 하는 열 안정성이 향상된 커큐민 나노구조 지질 담체(Curcumin Nanostructured Lipid Carrier, Cur_NLC)를 제공한다.

[0011] 상기한 다른 기술적 과제를 해결하기 위하여, 본 발명에서는 하기 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 커큐민 나노구조 지질 담체(Curcumin Nanostructured Lipid Carrier, Cur_NLC)의 제조방법을 제공한다:

[0012] (S1) 대두유(soybean oil), 커큐민(Curcumin), 글리세릴 트리스테아레이트(Glyceryl Tristearate) 및 소르비탄 모노올리에이트(sorbitan monooleate)와 폴리소르베이트(polysorbate)의 3:7 내지 5:5(중량비) 혼합물을 혼합하여 85 내지 95℃에서 5 내지 15분간 가열하면서 교반하여 유상(oil phase)을 수득하는 단계;

[0013] (S2) 물을 85 내지 95℃에서 5 내지 15분간 가열하여 수상(aqueous phase)을 준비하고 상기 단계 (S1)에서 수득된 유상(oil phase)에 적가한 다음 85 내지 95℃에서 5 내지 15분간 가열하여 분산액을 수득하는 단계; 및

[0014] (S3) 상기 단계 (S2)에서 수득된 분산액을 균질화기를 사용하여 균질화시킨 다음 초음파 분쇄기를 이용하여 재분산시켜 커큐민이 함입된 커큐민 나노구조 지질 담체(Curcumin Nanostructured Lipid Carrier, Cur_NLC)를 제조하는 단계.

[0015] 상기한 또다른 기술적 과제를 해결하기 위하여, 본 발명에서는 상기 커큐민 나노구조 지질 담체(Cur_NLC)를 70 내지 80℃에서 10 내지 20초 동안 HTST (High Temperature Short Time) 열처리하는 것을 특징으로 하는 커큐민 나노구조 지질 담체(Cur_NLC)의 안정화 열처리 방법을 제공한다.

[0016] 본 발명의 하나의 구현예에 따르면, 상기 유화제로서 소르비탄 모노올리에이트(sorbitan monooleate)와 폴리소르베이트(polysorbate)를 사용하며, 각각 스팬(Span) 80과 트윈(Tween) 80을 예로 들 수 있다. 이러한 소르비탄 모노올리에이트(sorbitan monooleate)와 폴리소르베이트(polysorbate)를 혼합하여 사용할 경우 나노구조 지질 담체(NLC)의 평균 입자크기가 작아 가장 적합하며, 특히 소르비탄 모노올리에이트(sorbitan monooleate)와 폴리소르베이트(polysorbate)의 중량비율을 3: 7 내지 5:5, 바람직하게는 4 : 6로 하여 혼합 사용하는 것이 바람직하다.

[0017] 본 발명의 하나의 구현예에 따르면, 상기 지질은 고체 지질(solid lipid)의 매질, 액체 지질(liquid lipid)의 매질 또는 고체 지질과 액체 지질로 이루어지는 혼합 매질이며, 바람직하게는 고체 지질의 매질 또는 고체 지질과 액체 지질로 이루어지는 혼합 매질이며, 보다 더 바람직하게는 고체 지질과 액체 지질로 이루어지는 혼합 매질이다.

[0018] 본 발명의 나노구조 지질 담체(NLC)는 고체 지질과 액체 지질로 이루어지므로, 나노입자의 내부는 고체 지질, 액체 지질, 또는 고체 지질과 액체 지질의 혼합물이 혼재되어 있는 덜 규칙적이고 덜 정렬된 지질 매질 구조를 가지는데, 커큐민은 이러한 지질 매질 구조에 함입되어 있다.

[0019] 본 발명의 하나의 구현예에 따르면, 상기 액체 지질은 대두유 (soybean oil)을 사용하고, 고체 지질로서 글리세릴 트리스테아레이트(Glyceryl Tristearate)를 사용하는 것을 특징으로 한다.

[0020] 상기 대두유는 이중결합이 있는 지방산으로 구성되어 있으며 소수성이 강하여 커큐민의 용해도를 증가시킬 수 있으며, 상기 글리세릴 트리스테아레이트는 나노구조 지질 담체(NLC)의 입자크기를 감소시켜 보다 안정성을 증대시킬 수 있다.

[0021] 본 발명의 바람직한 실시양태에 따르면, 상기 유화제를 지질의 총 중량에 대하여 15 내지 80 중량%의 양으로 포함하고, 지질 대비 유화제의 비율이 15%일 때 평균 입자크기는 커졌으나 입자간 응집 및 침전 현상이 없으며, 지질 대비 유화제 함량을 80%까지 증가시킴으로써 나노구조 지질 담체(NLC) 입자크기를 감소시켜 안정성을 더 증대시킬 수 있다.

[0022] 본 발명에 따른 Cur_NLC의 평균입경은 바람직하게는 1-1000 nm, 보다 바람직하게는 1-700 nm, 보다 더 바람직하게는 1-500 nm이고, 가장 바람직하게는 1-300nm이다.

[0023] 본 발명의 하나의 구현예에 따르면, 본 발명에서는 (S1) 대두유(soybean oil), 커큐민(Curcumin), 글리세릴 트리스테아레이트(Glyceryl Tristearate) 및 소르비탄 모노올리에이트(sorbitan monooleate)와 폴리소르베이트(polysorbate)의 3:7 내지 5:5(중량비) 혼합물을 혼합하여 85 내지 95℃에서 5 내지 15분간 가열하면서 교반하여 유상(oil phase)을 수득하는 단계; (S2) 물을 85 내지 95℃에서 5 내지 15분간 가열하여 수상(aqueous phase)을 준비하고 상기 단계 (S1)에서 수득된 유상(oil phase)에 적가한 다음 85 내지 95℃에서 5 내지 15분간 가열하여 분산액을 수득하는 단계; 및 (S3) 상기 단계 (S2)에서 수득된 분산액을 균질화기를 사용하여 균질화시킨 다음 초음파 분쇄기를 이용하여 재분산시켜 커큐민이 함입된 커큐민 나노구조 지질 담체(Curcumin Nanostructured Lipid Carrier, Cur_NLC)를 제조하는 단계를 포함하는 열 안정성이 향상된 커큐민 나노구조 지질 담체(Curcumin Nanostructured Lipid Carrier, Cur_NLC)의 제조방법을 제공한다.

[0024] 한편, 본 발명에서는 상기 커큐민 나노구조 지질 담체(Curcumin Nanostructured Lipid Carrier, Cur_NLC)를 70 내지 80℃에서 10 내지 20초 동안 HTST (High Temperature Short Time) 열처리하는 것을 특징으로 하는 커큐민 나노구조 지질 담체(Cur_NLC)의 안정화된 열처리 방법을 제공한다.

[0025] 본 발명의 바람직한 실시양태에 따르면, 가열방법 중 스팀 멸균의 경우 캡슐화 효율 및 제타전위에서 그 값이 HTST와 LTLT (Long Temperature Long Time)보다 현저히 낮아져 가장 부적합한 방법으로 판단되었으며, 글리세릴 트리스테아레이트 (GTS)의 XRD 패턴과 비교시 제조 및 살균 과정의 가열단계로 인해 α형 (α-form)에서 더 안정적인 형태의 β형(β-form)으로 구조가 전환된 것이 확인되었다. 또한, 스팀 멸균에서 β-form에 해당되는

피크의 강도가 가장 높게 나타나 가열 온도가 높을수록 더 안정적인 형태를 갖는 것으로 판단된다.

발명의 효과

[0026] 이와 같이, 본 발명에 따라 유화제로서 소르비탄 모노올리에이트(sorbitan monooleate)와 폴리소르베이트(polysorbate)를 3: 7 내지 5:5의 중량비율로 사용하고, 상기 유화제를 지질의 총 중량에 대하여 15 내지 80 중량%의 양으로 포함하고, 상기 지질이 액체 지질로서 대두유(soybean oil)를 사용하고 고체 지질로서 글리세릴 트리스테아레이트를 사용함으로써 커큐민 나노구조 지질 담체(Cur_NLC)의 열에 대한 안정성을 향상시킬 수 있다. 또한, 커큐민 나노구조 지질 담체(Cur_NLC)를 HTST (High Temperature Short Time)를 이용하여 살균 처리함으로써 커큐민 나노구조 지질 담체(Cur_NLC)를 보다 안정화시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0027] 도 1은 본 발명에 따른 나노구조 지질 담체(NLC) 제형의 제조공정을 나타낸 사진이다.

도 2는 가열살균 방법에 따른 커큐민 나노구조 지질 담체(Cur_NLC)의 평균입도 사이즈 및 다분산지수(PDI)의 변화를 나타낸 것이다.

도 3은 가열살균 방법에 따른 커큐민 나노구조 지질 담체(Cur_NLC)의 제타전위의 변화를 나타낸 것이다.

도 4는 가열살균 방법에 따른 커큐민 나노구조 지질 담체(Cur_NLC)의 캡슐화 효율(%)을 나타낸 것이다.

도 5는 가열살균 방법에 따른 커큐민 나노구조 지질 담체(Cur_NLC)의 TEM 이미지를 나타낸 것이다.

도 6은 가열살균 방법에 따른 커큐민 나노구조 지질 담체(Cur_NLC)의 XRD 패턴을 나타낸 것이다.

도 7은 가열살균 방법에 따른 커큐민 나노구조 지질 담체(Cur_NLC)의 DSC(시차 주사 열량측정법 (Differential Scanning Calorimetry) 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0028] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예 등을 들어 상세하게 설명하기로 한다. 그러나, 본 발명에 따른 실시예들은 여러 가지 다른 형태로 변형될 수 있으며, 본 발명의 범위가 하기 실시예들에 한정되는 것으로 해석되어서는 안 된다. 본 발명의 실시예들은 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0029] **<실시예 1> 나노구조 지질 담체(NLC)의 유화제 선별 및 비율 특정**

[0030] (단계 1) 유화제 선별

[0031] 나노구조 지질 담체(NLC)의 안정화에 적합한 유화제를 선별하기 위하여, 하기 표 1에 나타낸 바와 같이 유화제로서 각각 레시틴과 span 80을 사용하여 나노구조 지질 담체(NLC)를 통상의 방법에 따라 제조하여 나노구조 지질 담체(NLC)의 평균 입자크기를 관찰함으로써 육안상 안정성을 평가하였다.

표 1

[0032]

	Repetition	Size (nm)	PDI	Zeta potential (mV)
Lecithin	1	241.9	0.296	-37.04
	2	231.8	0.318	-36.60
	3	230.4	0.300	-37.55
	평균	234.7 ± 6.27	0.305 ± 0.01	-37.06 ± 0.48
Span 80	1	177.2	0.281	-39.21
	2	166.4	0.298	-38.99
	3	161.5	0.296	-38.65
	평균	168.4 ± 8.03	0.292 ± 0.01	-38.95 ± 0.28

[0033] 상기 표 1에서 보듯이, 유화제로서 Span 80을 사용하여 제조한 나노구조 지질 담체(NLC)의 평균 입자크기가 약 100 nm 정도로 레시틴을 사용한 경우보다 작게 나타나서 육안상 유화제로서 Span 80을 사용하는 것이 더욱 안정하다는 것을 확인하였다.

[0034] (단계 2) 유화제 비율조절

[0035] 나노구조 지질 담체(NLC)의 안정화에 적합한 span 80과 tween 80의 비율을 결정하기 위하여, 하기 표 2에 나타낸 바와 같이 span 80과 tween 80의 중량비율에 따른 나노구조 지질 담체(NLC)의 평균 입자크기를 관찰함으로써 육안상 안정성을 평가하였다. 이 때 고체 지질로서 글리세릴 모노스테아레이트(GMS)를 사용하고, 액체 지질로서 올레산(oleic acid, OA)을 사용하였다.

표 2

[0036]

비율	GMS(g)	OA(g)	Span 80(g)	Tween 80(g)	물 (mL)	Size (nm)	PDI
3 : 7.5	0.3	0.12	0.16	0.40	100	108.2	0.260
6 : 4	0.3	0.12	0.06	0.04	100	157.9	0.215
4 : 6	0.3	0.12	0.04	0.06	100	162.5	0.248
2 : 8	0.3	0.12	0.02	0.08	100	158.5	0.228

[0037] 상기 표 2에서 보듯이, span 80과 tween 80의 비율에 따른 나노구조 지질 담체(NLC)의 평균 입자크기에 있어서는 샘플간의 유의적 차이가 나타나지 않았으며, HLB (hydrophile-lipophile balance, 친수성ㅇ친유성 비) 값을 고려하여 span 80과 Tween 80의 중량비율을 4 : 6으로 선정하였다.

[0038] (단계 3) 지질대비 유화제의 첨가량 조절

[0039] 나노구조 지질 담체(NLC)의 안정화에 적합한 지질대비 유화제의 첨가량을 결정하기 위하여, 하기 표 3에 나타낸 바와 같이 지질에 대한 유화제의 첨가량에 따른 나노구조 지질 담체(NLC)의 평균 입자크기 및 다분산지수(polydispersity index, PDI)를 관찰하였다. 이 때 고체 지질로서 글리세릴 모노스테아레이트(GMS)를 사용하고, 액체 지질로서 올레산(oleic acid, OA)을 사용하였다.

표 3

[0040]

비율 (%)	GMS(g)	OA(g)	Span 80(g)	Tween 80(g)	물 (mL)	Size (nm)	PDI
130	0.3	0.12	0.16	0.40	100	108.2	0.260
55	0.3	0.12	0.09	0.14	100	148.2	0.228
25	0.3	0.12	0.04	0.06	100	162.5	0.215
15	0.3	0.12	0.03	0.04	100	155.3	0.245

[0041] 상기 표 3에서 보듯이, 지질대비 유화제의 비율이 15%일 때, 평균 입자크기는 커졌으나 입자간 응집 및 침전 현상이 없음을 확인할 수 있었다.

[0042] (단계 4) 액체 지질 선정

[0043] 나노구조 지질 담체(NLC)의 안정화에 적합한 액체 지질을 선별하기 위하여, 하기 표 4에 나타낸 바와 같은 액체 지질을 사용하여 나노구조 지질 담체(NLC)의 평균 입자크기를 관찰하여 육안상 안정성을 평가하였다. 이 때 유화제로서 Span 80와 Tween 80을 4:6의 중량비율로 사용하고, 고체 지질로서 글리세릴 모노스테아레이트(GMS)를 사용하였으며, 액체 지질의 양은 모두 동일하게 0.6 g 사용하였다.

[0044] 하기 표 4에 나타낸 비율로 각 성분을 혼합하여 가열한 다음 커큐민(curcumin)을 첨가하여 용해시켰다. 녹은 혼합액 1 mL를 원심분리하여 용해된 커큐민만을 메탄올로 희석한 후 흡광도를 측정하여 용해도를 산술하였다.

표 4

[0045]

GMS(g)	Span 80(g)	Tween 80(g)	액체 지질*	지질용해도 (mg/g)	평균 (mg/g)	지질 특징

1.5	0.126	0.189	Oleic acid	9.24	9.11 ± 0.61	지방산
				9.78		
				8.31		
			Castor oil	26.43	23.19 ± 2.31	TG (90% ricinoleic acid) / 식용×
				21.18		
				21.97		
			Olive oil	22.88	23.01 ± 0.80	TG (70% Oleic acid)
				24.05		
				22.1		
			Soybean oil	23.52	22.49 ± 0.75	TG (50% linoleic acid, 20% OA)
				21.74		
				22.22		
			MCT oil	13.53	14.00 ± 0.34	TG (중쇄지방산)
				14.21		
				14.26		

[0046] 상기 표 4에서 보듯이, 커큐민의 지질 용해도 분석 결과, 올레산(Oleic acid)에서 용해도가 가장 낮았으며 캐스터 오일(Castor oil), 올리브유(Olive oil) 및 대두유(Soybean oil)가 모두 유사한 값을 나타내었다. 기존 제형에 사용된 올레산은 글리세롤 골격(back-bone)이 없는 구조로 비교적 친수성이 강하고, MCT 오일의 경우 글리세롤 골격이 있으나 지방산의 탄소수가 상대적으로 적다. 캐스터 오일, 올리브유, 대두유는 이중결합이 있는 지방산으로 구성되어 있어 소수성이 강한 질일수록 커큐민의 용해도를 증가시키는 것으로 판단되었다.

[0047] 그러나, 캐스터 오일은 식용으로 사용이 불가능하며, 올리브유보다 대두유가 소수성이 더 강하여 액체 지질로 대두유를 선택하였다.

[0048] **<실시예 2> 캡슐화 효율(Encapsulation efficiency) 측정**

[0049] (1) 지질 함량에 따른 변화 측정

[0050] 지질 함량에 따른 캡슐화 효율을 측정하였다. 하기 표 5에 나타낸 바와 같이, 물 부피(100 부피%)에 대한 지질 중량(wt%)을 변화시켜 평균 입자 크기를 관찰하였다. 이 때 유화제로서 Span 80와 Tween 80을 각각 4:5.3 및 4:6.4의 중량비율로 사용하고, 고체 지질로서 글리세릴 모노스테아레이트(GMS)를 사용하였으며, 액체 지질로서 올레산(Oleic acid)을 사용하였다.

표 5

[0051]

%(W/V)	GMS(g)	OA(g)	Span 80(g)	Tween 80(g)	물 (mL)	Size(nm)
0.42%	0.3	0.12	0.03	0.04	100	210.4
0.84%	0.6	0.24	0.05	0.08	100	238.4

[0052] 상기 표 5에서 보듯이, 물 부피(100 부피%)에 대한 지질 중량(wt%) 변화에 따른 평균 입자 크기의 변화율이 크지 않아 고농도의 중심 물질이 탑재될 경우에도 지질 함량 증가에 따른 문제가 발생하지 않을 것으로 판단되었다.

[0053] (2) 고체 지질에 따른 변화 측정

[0054] 하기 표 6에 나타낸 바와 같이, 고체 지질의 종류에 따른 평균 입자 크기 및 PDI를 관찰하였다.

표 6

[0055]

고체 지질	Soybean oil (g)	Span 80(g)	Tween 80(g)	물 (mL)	Size (nm)	PDI	ZP(mV)
글리세릴 모노스테아레이트 (Glyceryl Monostearate)	0.24	0.05	0.08	100	208.1	0.322	-18.12
글리세릴 트리스테아레이트 (Glyceryl Tristearate)					125.4	0.229	-15.56
글리세릴 트리팔미테이트 (Glyceryl Tripalmitate)					144.4	0.251	-15.36

[0056] 상기 표 6에서 보듯이, 글리세릴 트리스테아레이트와 글리세릴 트리팔미테이트 및 글리세릴 트리팔미테이트에서 상대적으로 소수성이 약한 글리세릴 모노스테아레이트보다 나노구조 지질 담체(NLC) 입자의 크기가 크게 감소하였다. 그 중에서 입자 크기가 가장 작게 나타난 글리세릴 트리스테아레이트로 고체 지질을 변경하였다.

[0057] (3) 지질 대비 유화제 함량에 따른 변화 측정

[0058] 하기 표 7에 나타낸 바와 같이, 지질 대비 유화제 함량에 따른 평균 입자 크기를 관찰하였다.

표 7

[0059]

지질대비 유화제 (%)	고체 지질 (g)	액체 지질 (g)	Span 80(g)	Tween 80(g)	물 (mL)	Size(nm)	PDI
25%	GMS 0.3	OA 0.12	0.04	0.06	100	162.5	0.248
80%	GTS 0.6	Soybean oil 0.24	0.27	0.40	100	121.1	0.298

[0060] 상기 표 7에서 보듯이, 지질 대비 유화제 함량을 80%까지 증가시킴으로써 나노구조 지질 담체(NLC) 입자크기가 감소하였으며, 안정성이 더 증대됨을 확인할 수 있었다.

[0061] **<실시예 3> 최종 나노구조 지질 담체(NLC) 제조**

[0062] 상기 실시예 1 및 2에서 수득된 결과를 바탕으로 최종 나노구조 지질 담체(NLC)를 제조하였다.

[0063] 구체적으로, 하기 표 8의 조성으로 구성된 유상을 90℃에서 10분간 가온하면서 교반 (450 rpm)하고, 수상인 물도 90℃에서 10분간 가온하였다. 유상에 물을 방울방울 떨어뜨려서 천천히 혼합한 후 10분간 90℃에서 더 가온하면서 교반 (450 rpm)하고, 균질기(Homogenizer)를 이용하여 8000 rpm, 5 min에서 분산시켰다.

[0064] 이어서, 초음파 분쇄기(Ultra-sonicator)를 이용하여 재분산(Power : 30%, Work time/off time : 4 s / 2 s, Time : 5 min)시켜 최종 나노구조 지질 담체(NLC)를 제조하였다. 도 1은 본 발명에 따른 나노구조 지질 담체(NLC) 제형의 제조공정을 나타낸 사진이다.

표 8

[0065]

유상	Glyceryl Tristearate (고체 지질)	0.60 g
	Soybean oil (액체 지질)	0.24 g
	Span 80	0.27 g
	Tween 80	0.40 g
수상	물	100 mL

[0066] **<시험예 1> 가열조건에 따른 커큐민 나노구조 지질 담체(Cur_NLC)의 안정성 평가**

[0067] 하기 표 9에 나타낸 저온장시간 살균법(LTLT, Long Temperature Long Time), 고온단시간 살균법(HTST, High Temperature Short Time) 및 스팀 멸균과 같은 가열방법에 따라 커큐민 나노구조 지질 담체(Cur_NLC)를 가열살균하여 이에 따른 이화학적 특성의 변화를 측정하여 최적의 살균방법을 결정하였다.

표 9

[0068]

가열방법	조건
LTLT (Long Temperature Long Time)	63℃, 30분
HTST (High Temperature Short Time)	75℃, 15초
스팀 멸균(Steam sterilization)	121℃, 15분, 오토글레이브

[0069] (1) 가열살균에 따른 최종 커큐민 나노구조 지질 담체(Cur_NLC)의 평균입자 크기 및 제타전위

[0070] 도 2는 가열살균 방법에 따른 커큐민 나노구조 지질 담체(Cur_NLC)의 평균입도 사이즈 및 다분산지수(PDI)의 변화를 나타낸 것이다. 여기에서 보듯이, 살균 전, 후에 따른 커큐민 나노구조 지질 담체(Cur_NLC)의 평균입도 및 다분산지수(PDI)에는 변화가 나타나지 않았다. 이로부터 나노입자의 크기에 열이 미치는 영향은 미비하다고 판단되었다.

[0071] 도 3은 가열살균 방법에 따른 커큐민 나노구조 지질 담체(Cur_NLC)의 제타전위의 변화를 나타낸 것이다. 여기에서 보듯이, LTLT, HTST 살균 후에는 커큐민 나노구조 지질 담체(Cur_NLC)의 제타전위 값에는 유의적인 차이는 나타나지 않았으며 안정적인 범위에 속하였으나, 스팀 멸균의 경우에는 LTLT, HTST에 비하여 제타전위의 저하가 크게 나타났다. 고온고압의 조건하에 장시간 노출되게 되는 스팀 멸균의 경우, 살균 후 커큐민 나노구조 지질 담체(Cur_NLC) 용액의 pH가 감소하는데, 이는 커큐민 나노구조 지질 담체(Cur_NLC)의 지질이 파괴 및 분해되면서 일어나는 현상으로 판단되며 감소된 pH에 따라 제타전위 역시 감소한 것으로 사료되었다.

[0072] (2) 가열살균 방법에 따른 커큐민 나노구조 지질 담체(Cur_NLC)의 캡슐화 효율(%) 측정

[0073] 도 4는 가열살균 방법에 따른 커큐민 나노구조 지질 담체(Cur_NLC)의 캡슐화 효율(%)을 나타낸 것이다. 여기에서 보듯이, LTLT, HTST 살균 후에는커큐민 나노구조 지질 담체(Cur_NLC)의 캡슐화 효율 (%)에서 유의적인 차이는 나타나지 않았으나, 스팀 멸균의 경우에는 캡슐화 효율이 20%가량 현저히 낮아졌다.

[0074] (3) 가열살균 방법에 따른 커큐민 나노구조 지질 담체(Cur_NLC)의 TEM 이미지(Images)

[0075] 도 5는 가열살균 방법에 따른 커큐민 나노구조 지질 담체(Cur_NLC)의 TEM 이미지를 나타낸 것이다. 여기에서 보듯이, 가열에 의한 커큐민 나노구조 지질 담체(Cur_NLC)의 안정성에는 큰 변화가 없는 것으로 확인되었으나, 스팀 멸균의 경우, 캡슐화 효율 및 제타전위에서 그 값이 HTST, LTLT보다 현저히 낮아져 가장 부적합한 방법으로 판단되었다.

[0076] 이와 같은 실험을 통하여 산업에서 커큐민 나노구조 지질 담체(Cur_NLC)의 적용성을 고려할 시 HTST가 가장 적합한 살균법으로 판단되었다.

[0077] (4) 가열살균에 의한 커큐민 나노구조 지질 담체(Cur_NLC) 안정성 향상 측정

[0078] 가열에 의한 커큐민 나노구조 지질 담체(Cur_NLC)의 안정성 향상의 메커니즘을 규명하였다.

[0079] 도 6은 가열살균 방법에 따른 커큐민 나노구조 지질 담체(Cur_NLC)의 XRD 패턴을 나타낸 것이다. 여기에서 보듯이, 나노구조 지질 담체(NLC) 제조에 사용된 물질 중 고체 지질에 해당하는 글리세릴 트리스테아레이트 (GTS)의 XRD 패턴과 비교시, 제조 및 살균 과정의 가열단계로 인해 α형(α-form)에서 더 안정적인 형태의 β형(β-form)으로 구조가 전환된 것이 확인되었다. 또한, 스팀 멸균에서 β-form에 해당되는 피크의 강도가 가장 높게 나타나 가열 온도가 높을수록 더 안정적인 형태를 갖는 것으로 판단된다.

[0080] 하기 표 10 및 도 7은 가열살균 방법에 따른 커큐민 나노구조 지질 담체(Cur_NLC)의 시차 주사 열량측정법 (Differential Scanning Calorimetry, DSC) 결과를 나타낸 것이다.

표 10

Sample	Melting temperature (°C)	Enthalpy (J/mg)	Relative crystallinity (%)
GTS	62.1±0.3[a]	146.2±7.1[a]	-
BLK_NLC	58.5±0.1[b]	70.0±1.4[b]	47.9±3.9[a]
Cur_NLC	58.9±0.2[b]	67.7±4.5[b]	46.3±3.3[a]
Steam sterilization_Cur_NLC	59.1±0.4[b]	74.5±5.6[b]	51.0±3.8[a]
HTST_Cur_NLC	58.8±0.1[b]	74.2±2.7[b]	50.7±3.8[a]
LTLT_Cur_NLC	59.2±0.2[b]	72.1±5.7[b]	49.3±3.9[a]

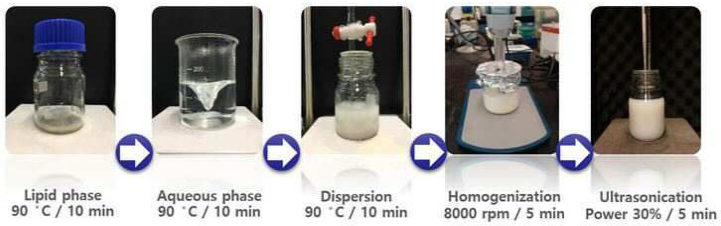
[0081]

[0082] 여기에서 보듯이, 가열살균 후 커큐민 나노구조 지질 담체(Cur_NLC)의 상대적 결정화도와 녹는점이 증가된 것이 확인되었다.

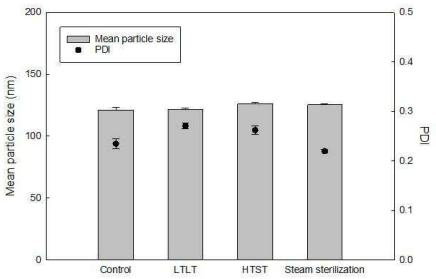
[0083] 이를 통해 커큐민 나노구조 지질 담체(Cur_NLC)를 살균 시 나노입자의 구조가 더 결정도가 큰 β-form으로 변화됨을 알 수 있었다.

도면

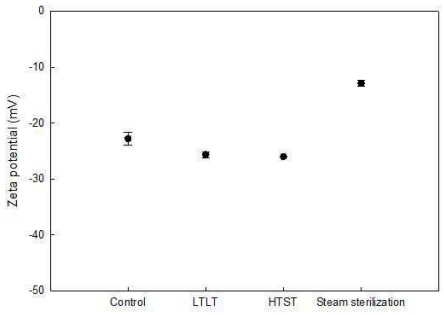
도면1



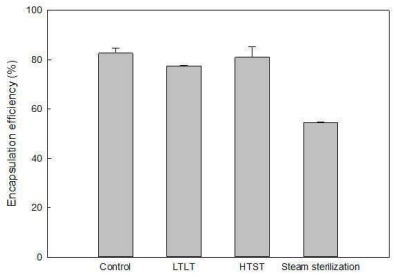
도면2



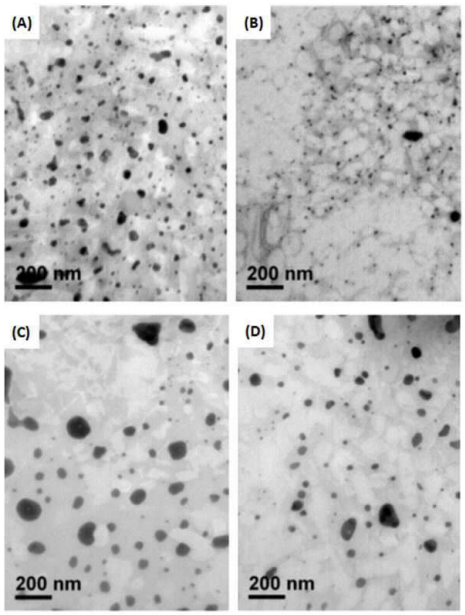
도면3


0
-10
-20
-30
-40
-50
Zeta potential (mV)
Control
LTLT
HTST
Steam sterilization

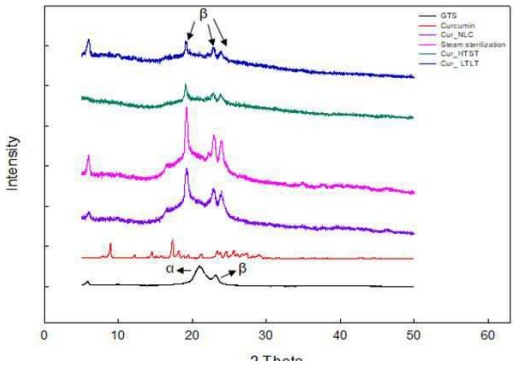
도면4


100
80
60
40
20
0
Encapsulation efficiency (%)
Control
LTLT
HTST
Steam sterilization

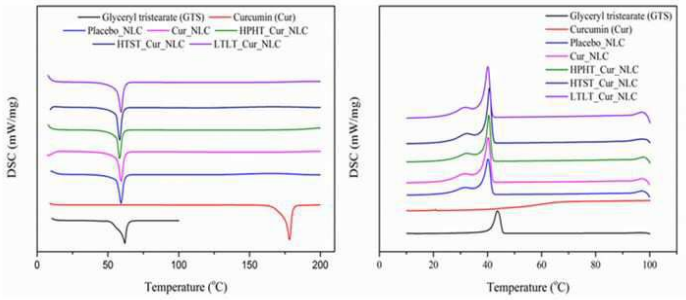
도면5


(A)
200 nm
(B)
200 nm
(C)
200 nm
(D)
200 nm

도면6


β
GTS
Curcumin
Cur_NLC
Steam sterilization
Cur_HTST
Cur_ LTLT
Intensity
α
β
0
10
20
30
40
50
60

도면7


Glyceryl tristearate (GTS)
Curcumin (Cur)
Placebo_NLC
Cur_NLC
HPHT_Cur_NLC
HTST_Cur_NLC
LTLT_Cur_NLC
DSC (mW/mg)
Temperature (°C)
0
50
100
150
200
20
40
60
80