

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2018-0128025 (43) 공개일자 2018년11월30일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) <i>A23K 40/30</i> (2016.01) <i>A23K 10/30</i> (2016.01) <i>A23K 20/158</i> (2016.01) <i>A23K 20/174</i> (2016.01) <i>A23K 50/75</i> (2016.01) <i>A61K 31/355</i> (2006.01) <i>A61K 9/50</i> (2006.01) <i>A61K 9/51</i> (2006.01) (52) CPC특허분류 <i>A23K 40/30</i> (2016.05) <i>A23K 10/30</i> (2016.05) (21) 출원번호 10-2018-7030631 (22) 출원일자(국제) 2017년03월17일 심사청구일자 없음 (85) 번역문제출일자 2018년10월23일 (86) 국제출원번호 PCT/FR2017/050622 (87) 국제공개번호 WO 2017/162963 국제공개일자 2017년09월28일 (30) 우선권주장 16/52592 2016년03월25일 프랑스(FR)		(71) 출원인 아디쎬오 프랑스 에스에이에스 프랑스, 에프-92160 안토니, 플레이스 듀 제너럴 드 골, 10, 안토니 파크 2 (72) 발명자 프레베로드 다미앙 프랑스 03310 네리스 레 뱅 뒤 파비에흐 1 로질리오 베로니크 프랑스 75011 파리 12비스 뒤 고베흐 (74) 대리인 유미특허법인
전체 청구항 수 : 총 20 항		
(54) 발명의 명칭 지용성 활성 성분을 포함하는 나노캡슐, 그 제조 방법 및 그 용도		

(57) 요약

본 발명은, 하나 이상의 오일 형태의 활성 성분, 이온성 계면활성제, 선택적으로 비-이온성 계면활성제 및 친수성 폴리머를 포함하는, 콜로이드 현탁액 또는 건조 형태의 나노캡슐에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 나노캡슐의 제조 방법 및 용도에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

A23K 20/158 (2016.05)

A23K 20/174 (2016.05)

A23K 50/75 (2016.05)

A61K 31/355 (2013.01)

A61K 9/5015 (2013.01)

A61K 9/5161 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

나노캡슐의 콜로이드 현탁액 (colloidal suspension of nanocapsule)으로서,

상기 나노캡슐이 지용성 활성 성분과 이온성 계면활성제를 포함하거나 또는 이들로 구성되는 오일성 분획 (oily fraction)과, 상기 오일성 분획을 둘러싸는 친수성 폴리머를 포함하는, 나노캡슐의 콜로이드 현탁액.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 나노캡슐이 비-이온성 계면활성제를 포함하는, 나노캡슐의 콜로이드 현탁액.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 활성 성분이 비타민 A, 비타민 D, 비타민 E, 비타민 K 및 이들의 유도체 또는 이들의 대사산물, 에센셜 오일, 지방산, 지방 오일 및 이들의 혼합물로부터 선택되는, 나노캡슐의 콜로이드 현탁액.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 활성 성분이 타임 (thyme), 오레가노 (oregano), 로즈마리 (rosemary), 갈릭 (garlic), 카멜리아 (camellia), 머스타드 (mustard), 진저 (ginger), 터메릭 (turmeric), 포도 (grape), 감귤 (citrus fruit), 잠두 (sainfoin), 실유카 (yucca), 머그워트 (mugwort), 신나몬 (cinnamon), 민트 (mint), 정향 (clove), 장과류 (berries), 큐민 (cumin) 및 에키네시아 (Echinacea)의 에센셜 오일들로부터 선택되는, 나노캡슐의 콜로이드 현탁액.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 이온성 계면활성제가 1500 g/mol 이하, 바람직하게는 1000 g/mol 이하의 분자량을 가지는, 나노캡슐의 콜로이드 현탁액.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 이온성 계면활성제가 난(egg) 레시틴 또는 콩 레시틴과 같은 포스파티딜콜린, 또는 헥사데실트리메틸암모늄 브로마이드로부터 선택되는, 나노캡슐의 콜로이드 현탁액.

청구항 7

제2항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 비-이온성 계면활성제가 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌 블록 공중합체, 폴리옥시에틸렌 (EO)-폴리옥시프로필렌 (PO) 블록 공중합체의 블렌드, Tween 80, 지방산, 슈크로스 에스테르 및 이들의 혼합물로부터 선택되는, 나노캡슐의 콜로이드 현탁액.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌 블록 공중합체(들)가

x가 75-85이고, y가 25-35인, 식 $EO_x-PO_y-EO_x$ 의 코폴리머;

x가 55-65이고, y가 35-45인, 식 $EO_x-PO_y-EO_x$ 의 코폴리머; 및

x가 112-123이고, y가 40-50인, 식 $EO_x-PO_y-EO_x$ 의 코폴리머로부터 선택되는, 나노캡슐의 콜로이드 현탁액.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 지방산 및 상기 슈크로스 에스테르가 스테아레이트 및 팔미테이트로부터 선택되는, 나노캡슐의 콜로이드 현탁액.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 폴리머가 키토산, 알기네이트, 펙틴, 전분, 셀룰로스, 카제인 및 이들의 조합물로부터 선택되는, 나노캡슐의 콜로이드 현탁액.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 활성 성분의 함량이 상기 나노캡슐의 건조 중량을 기준으로 5 중량% 이상, 바람직하게는 25 중량% 이상, 더 바람직하게는 50 중량% 이상인, 나노캡슐의 콜로이드 현탁액.

청구항 12

제2항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 비-이온성 계면활성제의 함량이 상기 나노캡슐의 건조 중량을 기준으로 15 중량% 이상인, 나노캡슐의 콜로이드 현탁액.

청구항 13

나노캡슐로서,

오일 형태의, 하나 이상의 활성 성분;

이온성 계면활성제;

선택적으로, 비-이온성 계면활성제; 및

친수성 폴리머를 포함하며,

상기 나노캡슐이 제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 따른 콜로이드 현탁액을 건조시켜 수득가능한 것인, 나노캡슐.

청구항 14

제13항에 있어서,

락토스 상에 흡착된, 나노캡슐.

청구항 15

제13항에 따른 나노캡슐 및 락토스를 포함하는 미세입자.

청구항 16

하기 단계를 포함하는, 제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 따른 콜로이드 현탁액의 제조 방법:

- 지용성 활성 성분과 이온성 계면활성제를 포함하거나 또는 이들로 구성되는 오일성 분획을 적어도 포함하는

제1 상과, 적어도 폴리머 및 선택적으로 비-이온성 계면활성제를 포함하는 제2 수 상 (aqueous phase)을 제조하는 단계로서, 상기 이온성 계면 활성제의 물 농도와 비-이온성 계면활성제의 물 농도가 각각, 상기 계면활성제의 임계 마이셀 농도 (CMC, critical micelle concentration) 이상 내지 100배인, 단계; 및

- 거친 에멀전 (coarse emulsion)을 제조한 다음 고압 하에 균질화 처리하여, 나노캡슐의 콜로이드 현탁액을 제조하는 단계.

청구항 17

제16항에 있어서,

상기 제1 상과 상기 제2 상의 온도가 60 - 70℃ 범위인, 제조 방법.

청구항 18

제14항에 따른 나노캡슐의 제조 방법으로서,

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 따른 나노캡슐의 콜로이드 현탁액을 제16항 또는 제17항에 따른 방법을 수행함으로써 제조한 다음 상기 나노캡슐을 락토스의 존재 하에 분무-건조하는, 제조 방법.

청구항 19

동물 영양에 이용하기 위한, 제13항에 따른 나노캡슐 또는 제15항에 따른 미세입자의 용도.

청구항 20

제19항에 있어서,

단위 동물 (monogastrics)용인, 용도.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 지용성 활성 성분을 포함하는 나노캡슐, 그 제조 방법 및 그 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 비타민, 지방산, 에센셜 오일과 같은 분자들은 제약, 화장품 및 농식품 산업과 같은 다수 기술 분야에서, 특히 동물 영양 분야에서 매우 널리 사용된다. 예를 들어, 비타민 A 및 E는 동물 성장과 건강을 증진하는 사료 제조에 일반적으로 사용된다.

[0003] 이들 분자는 조제 및 보관 뿐만 아니라 이의 사용시, 소수성 특성 및 이의 환경성, 특히 열 및 화학적 취약성으로 인해 캡슐화가 필요하다.

[0004] 비타민 E, 또는 α -토코페롤 (α TOL) 형태로 주로 존재하는 토코페롤 (TOL로 약칭됨)은 본래의 상태에서는 어떠한 소수성 상 또는 액체 상에서의 어떠한 비율로도 오일 같은 친지성의 혼화성인 액체이다. 비타민 E는 극히 불안정하며, 쉽게 산화될 수 있으며, 산화된 상태에서는 대부분의 생물학적 활성을 상실한다. 경구 투여시, 빠르게 산화되어 주로 산화된 비활성 형태로 흡수되기 때문에, 동물에서의 생체이용성은 50%를 넘지 않는다. 또한, 경구 투여시, 비타민 E는 일반적으로 에스테르, 예를 들어, 아세테이트 및 비타민 E 염으로부터 선택되는, 보다 안정적인 유도체 형태로 존재한다.

[0005] 비타민 A는 여러가지 형태로, 특히 에스테르로서 존재하며, 가장 안정한 형태 중 한가지가 레티닐 아세테이트 형태로서, 이는 가축 (가금류, 돼지 및 소)에 의해 가장 흔히 섭취된다. 그러나, 여전히 산화, 온도, 빛, 산에 민감하다. 따라서, 제약 용도 또는 동물 영양학에서, 비타민 A는 첫번째 가혹한 환경, 특히 소화계의 산성 환경과 접하게 되면 바로 매우 빠르게 분해되어, 생체이용가능한 형태의 비타민 A가 되지 못한다.

[0006] 이러한 민감한 활성 성분을 가장 잘 보존하기 위해, 코팅 또는 캡슐화에 의해 활성 성분을 보호할 수 있는 것으로 오랫동안 알려져 있다. 비타민, 특히 비타민 A 및 E를 캡슐화하기 위한 다양한 수단들, 예를 들어 단백질을 이용한 수단들이 개발되었으며, 널리 사용되고 있다.

[0007] 그러나, 생체이용성이 매우 높은 지용성 활성 성분의 포물레이션에 대해서는 여전히 탐구 중에 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명자들은 활성 성분의 흡수, 특히 장 흡수를 높일 수 있는 새로운 포물레이션을 탐구하여 왔다.

[0009] 이들 활성 성분들 대부분은 일반적으로 보호된 형태로 사용되기 때문에, 이들 활성 성분을 유리된 활성 형태로 흡수시킬 수 있는 포물레이션을 개발하는 것 역시 필요하며, 이는 보호된 형태의 가수분해와 흡수가 거의 동시에 이루어져야 한다는 것을 의미한다.

[0010] 본 발명자들은, 이러한 활성 성분을 다량 함유한 나노캡슐로 제형화할 수 있다는 것을 최초로 발견하였으며, 이는 어떠한 유기 용매도 사용하지 않는다는 것을 의미한다는 점에서 청정한 방법에 의한 것이다. 이후, 본 발명자들은, 효율적인 방식으로 활성 성분의 활성 형태, 즉 전술한 요건들을 모두 만족시키는 형태로 방출할 수 있는 나노캡슐을 개발하게 되었다.

과제의 해결 수단

[0011] 이에, 본 발명은 지용성 활성 성분(들)을 높은 함량으로 포함하는 나노캡슐 형태의 포물레이션, 바람직한 구현 예로서 현재 시판되는 포물레이션 보다 생체이용성이 높은 포물레이션에 관한 것이다.

[0012] 본 발명은 또한 상기한 나노캡슐을 수득하기 위한 산업화 가능하며 환경 친화적인 제조 방법을 구현하는 것이다. 또한, 본 발명자들에 의해 개발된 방법은, 보관 조건에 관계없이 경시적인 안정성을 부여하는, 잔류 수분율이 낮은, 바람직하게는 8% 미만인 나노캡슐을 제조한다.

[0013] 활성 성분의 적용 분야에 따르면, 본 발명의 나노캡슐은, 특히 지지체 상에 나노캡슐을 흡착시킴으로써, 취급이 보다 용이한 형태, 예를 들어 미세입자 형태로 제조될 수 있다. 후술한 설명에서, 용어 "입자"는 나노캡슐을 임의의 제공하기 위한 것이며, 예를 들어, 이러한 입자는 본 발명의 나노캡슐을 포함하는 미세입자이다. 활성 성분이 동물 영양용으로 의도된 경우, 나노캡슐은 프리믹스로 혼합하기 위한 우수한 혼합성을 가진 건조 입자로 제형화되는 것이 특히 유리하다. 이 경우, 입자는 300 μm 미만의 평균 크기를 가진 미세 입자이다.

[0014] 본 발명의 다른 과제는 이제 상세하게 설명될 것이다.

[0015] 이하, 본 발명은 보다 구체적으로 비타민 E를 들어 설명하지만, 명백하게도, 본 발명의 범위는 이로 제한되지 않으며, 임의의 지용성 활성 성분 및 이들 성분의 임의 혼합물에도 적용된다.

[0016] 전술한 바와 같이, 본 발명은, 안정적이며 생체이용성이 높을 수 있는, 적어도 지용성 활성 성분을 고 농도로 포함하는 나노캡슐에 관한 것이다. 본 발명의 나노캡슐은 콜로이드 현탁액 형태 또는 상기 현탁액을 건조한 건조 형태일 수 있다.

[0017] 콜로이드 현탁액 형태 또는 건조 형태이든, 나노캡슐은 지용성 활성 성분과 이온성 계면활성제를 포함하거나 또는 이들로 구성된 적어도 오일성 분획과, 상기 오일성 분획을 둘러싼 바람직하게는 친수성 폴리머를 포함한다.

[0018] 본 발명자들은, 예상치 못하게도, 비타민 E를 생체이용가능하게 만들거나 또는 생체이용성을 최소한 높이기 위해, 나노캡슐에 적어도 비-이온성 계면활성제가 추가로 포함되어야 한다는 것을 알게 되었다. 물론, 활성 성분의 적응증(indication)에 따라, 이러한 생체이용성은 요망되지 않거나 또는 심지어 금지될 수 있으며, 그래서 나노캡슐에는 이러한 비-이온성 계면활성제가 존재하지 않을 것이다.

[0019] 전술한 바와 같이, 본 발명의 나노캡슐은 임의의 지용성 활성 성분을 전달할 수 있다. 따라서, 지용성 활성 성분은 하기로부터 선택될 수 있다:

[0020] 지용성 비타민, 예를 들어 비타민 A, D, E, K, 이의 유도체, 특히 에스테르, 예를 들어 아세테이트, 프로피오네이트 또는 숙시네이트, 뿐만 아니라 이의 대사산물, 예를 들어, 레티날, 레티노익산, 25-하이드록시콜레칼시페롤, 1,25 다이하이드록시콜레칼시페롤;

[0021] 카로티노이드;

[0022] 에센셜 오일, 예를 들어, 타임, 오레가노, 로즈마리, 갈릭, 카멜리아, 머스타드, 진저, 터메릭(turmeric), 포도, 감귤(citrus fruit), 잠두(sainfoin), 실유카(yucca), 머그워트(mugwort), 신나몬, 민트, 정향, 장과

류 (berries), 큐민 및 에키네시아 (Echinacea)의 에센셜 오일;

- [0023] 포화, 단일불포화 및 고도불포화 지방산;
- [0024] 지방 오일.
- [0025] 활성 성분이 액체이거나 또는 가열시 액체가 될 가능성이 있을 경우, 이는 자체로 오일 상을 구성할 것이며, 여기에 이온성 계면활성제가 함유될 것이다.
- [0026] 활성 성분이 나노캡슐의 제조 온도에서 액체 상태가 아닐 경우, 이는 지지체로서 사용될 오일, 일반적으로 불활성 오일에 미리 용해시킬 수 있다. 예를 들어, 이 오일이 트리올레인 (triolein)일 수 있다.
- [0027] 본 발명의 나노캡슐의 이점은, 예를 들어, 나노캡슐의 건조 중량에 대해 최소 5 중량% (m/m)에서 50% 이상, 또는 심지어 90% 이상의 범위일 수 있는, 활성 성분의 함량이다. 이러한 함량은 나노캡슐의 목적에 따라 결정될 것이며, 일반적으로 나노캡슐의 건조 중량에 대해 5 중량% (m/m) 이상, 바람직하게는 25% 이상, 더 바람직하게는 50% 이상, 또는 심지어 70% 이상, 심지어 90% 이상이다.
- [0028] 이온성 계면활성제는 바람직하게는 분자량이 1500 g/mol 이하 또는 심지어 1000 g/mol 이하인 것들로부터 선택된다. 1500 g/mol 보다 높을 경우, 나노캡슐을 형성하기 어렵다. 이들 바람직한 계면활성제들 중에서, 난 레시틴 또는 콩 레시틴 또는 헥사데실트리메틸암모늄 브로마이드와 같은 포스파티딜콜린이 포함될 수 있다. 양으로 하전되거나 또는 음으로 하전된 이온성 계면활성제는 폴리머의 전하와 반대되는 전하의 것으로 선택된다.
- [0029] 비-이온성 계면활성제는, 바람직하게는, 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌 블록 공중합체, 폴리옥시에틸렌 (EO)-폴리옥시프로필렌 (PO) 블록 공중합체의 블렌드, Tween 80, 지방산 및 슈크로스 에스테르, 특히 팔미테이트 및 스테아레이트, 및 이들의 임의 혼합물로부터 선택된다. 이러한 정의 프레임워크에서, 바람직한 계면활성제는 식 $EO_x-PO_y-EO_x$ 의 코폴리머 ($x = 75-85$; $y = 25-35$), 식 $EO_x-PO_y-EO_x$ 의 코폴리머 ($x = 55-65$; $y = 35-45$) 및 식 $EO_x-PO_y-EO_x$ 의 코폴리머 ($x = 112-123$; $y = 40-50$), 뿐만 아니라 브랜드 SISTERNA[®] SP70 및 PS750로 시판되는 지방산 및 슈크로스 에스테르로부터 선택된다.
- [0030] 본 발명에 따른 나노캡슐의 수득을 가능하게 해주는 폴리머(들)는 양이온성 폴리머 또는 음이온성 폴리머로부터 선택되며, 폴리머의 전하는 이온성 계면활성제의 전하와 반대된다. 바람직하게는, 이는 천연 기원이며, 따라서 키토산, 알기네이트, 펙틴, 전분, 셀룰로스, 카세인 및 이들의 조합물로부터 선택되는 하나 이상의 폴리머(들)가 바람직하게는 포함될 것이다. 이에, 바람직한 폴리머-이온성 계면활성제 조합물은 키토산과 난 레시틴, 및 알기네이트와 CTAB에 의해 구성된 조합물이다.
- [0031] 본 발명의 바람직한 구현예에 있어서, 전술한 비-이온성 계면활성제의 현탁액내 함량은 나노캡슐의 건조 중량을 기준으로 적어도 15 중량% (m/m)이다.
- [0032] 본 발명의 과제들 중 또 다른 과제는 전술한 콜로이드 현탁액을 건조시킴으로써 수득되는 나노캡슐로 구성된다. 따라서, 이들 나노캡슐은 지용성 활성 성분, 이온성 계면활성제, 선택적으로 비-이온성 계면활성제 및 폴리머, 바람직하게는 친수성 폴리머를 포함하거나 또는 이들로 구성된 오일 분획을 적어도 포함하며, 나노캡슐은 본 발명의 콜로이드 현탁액을 건조시킴으로써 수득가능하다. 건조는 유익하게는 락토스의 존재 하에 수행되며, 본 발명의 나노캡슐이 락토스 상에 흡착된다.
- [0033] 또한, 본 발명은 지지체 상에 흡착된 전술한 나노캡슐을 포함하는 입자를 제공한다. 이 지지체는 예를 들어 락토스와 같은 임의의 비활성 지지체로부터 선택될 수 있다. 바람직한 구현예에서, 이들 입자는 락토스에 흡착된 본 발명의 나노캡슐을 포함하는 미세입자이다.
- [0034] 본 발명의 나노캡슐 제조 방법은, 전술한 콜로이드 현탁액으로 또는 상기한 현탁액의 처리 후 건조한 상태로 존재하던지 상관없이, 본 발명의 또 다른 과제이다.
- [0035] 이에, 나노캡슐의 콜로이드 현탁액의 제조 방법은 하기 단계를 포함한다:
- [0036] - 적어도 지용성 활성 성분과 이온성 계면활성제를 포함하거나 또는 이들로 구성되는 오일성 분획을 적어도 포함하는 제1 상과, 다른 한편으로 적어도 폴리머 및 선택적으로 비-이온성 계면활성제를 포함하는 제2 수 상을 제조하는 단계로서, 이온성 계면활성제의 물 농도와 비-이온성 계면활성제의 물 농도는, 적절한 경우, 이온성 계면활성제(들) 및 비-이온성 계면활성제(들) 각각의 임계 마이셀 농도 (CMC, critical micelle concentration) 이상 내지 100배이고; 활성 성분(들), 이온성 계면활성제, 비-이온성 계면활성제 및 폴리머들은

전술한 정의를 충족시키는 것인 단계;

- [0037] - 거친 에멀전 (coarse emulsion)을 제조한 후 고압 하에 균질화하여, 나노캡슐의 콜로이드 현탁액을 제조하는 단계.
- [0038] CMC 결정은 당해 기술 분야의 당업자들에게 널리 공지된 임의의 기법에 의해, 예를 들어 블레이드 (blade) 또는 고리 표면장력계 (ring tensiometer)에 의해 표면 장력을 측정함으로써, 행해질 수 있다.
- [0039] 활성 성분(들)이 실온에서 액체가 아니거나 또는 점성이 높을 경우, 오일 상 및 수 상을 60-70°C 범위의 온도로 승온시켜, 활성 성분(들)을 용융시킬 수 있다.
- [0040] 거친 에멀전으로 지칭되는 에멀전은 수 상과 오일 상을 단순 교반함으로써 수득된다. 이의 균질화는 이후 고압 하에, 예를 들어, 적어도 6분간, 가압 하에, 바람직하게는 적어도 동가 내지 600 bar의 압력에서 수행된다.
- [0041] 전술한 바와 같이 나노캡슐의 콜로이드 현탁액으로부터 본 발명에 따른 건조한 나노캡슐을 수득하기 위해, 나노캡슐을 락토스의 존재 하에 분무 건조시킨다. 이 방법은 점착성이 아니며 실온에서 보관할 수 있는 입자를 만들어 낸다.
- [0042] 또한, 본 발명은 이러한 나노캡슐의 용도에 관한 것이다. 나노캡슐은 동물 영양, 특히 단위 (monogastric) 동물에서의 동물 영양에 매우 유익하다. 이와 관련하여, 나노캡슐은, 전술한 바와 같이, 입자의 형태로 사용되며, 특히 미세입자의 형태로 사용된다.
- [0043] 본 발명은, α -토코페롤 아세테이트 나노캡슐 (α TAC)의 제조 및 동물 영양에 있어서의 효과를 시험관내 분석 및 생체내 분석으로 기술한 하기 실시예들에서, 예시되며, 본 발명의 이점을 보여준다.

도면의 간단한 설명

- [0044] 도 1은 여러가지 TAC 포물레이션들에서 TAC의 시험관내 생체접근율 (bioaccessibility rate)을 나타낸 것이다.
- 도 2는 여러가지 TAC 포물레이션들의 TOL에서 시험관내 TAC 가수분해율을 나타낸 것이다.
- 도 3은 여러가지 TAC 포물레이션들의 강제-급식 투여 (force-feeding administration) 후 랫에서 혈장내 α TOL 농도 (μ M)를 나타낸 것이다.
- 도 4 및 5는 여러가지 TAC 포물레이션들의 강제-급식 투여 후 수탉에서 혈장내 α TOL 농도 (μ g/ml)를 나타낸 것이다.
- 도 6은 여러가지 TAC 포물레이션들의 식이 투여 후 닭에서 혈장내 α TOL 농도 (μ g/ml)를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0045] 하기 실시예에서, 다양한 파라미터, 특히 비타민 E의 생체이용성을 분석한다.
- [0046] 비타민 E 또는 비타민 E 유도체와 같은 지용성 활성 성분의 생체이용성은, 동물의 일량 사료 (ration)에 존재하는 비타민 E의 농도를 기준으로, 또는 비타민 유도체가 투여되는 경우 동물의 일량 사료에 투입되는 비타민 E 유도체의 비타민 E의 당량으로서 표시되는 농도를 기준으로, 혈액으로 방출되는 비타민 E의 농도로 표시된다. 따라서, 이러한 비타민 E의 생체이용성 표시는 소화 기관을 이동하는 중에 장내 비타민 E 또는 비타민 E의 유도체의 흡수를 고려한다.

[0047] 실시예 1: 본 발명에 따른 나노캡슐의 제조

[0048] 포물레이션

[0049] 본 실시예에서 제조되는 나노캡슐은 레퍼런스 C24, A37 및 C40로 표시된다.

[0050] 이들 물질은 적어도 하기 성분을 포함하는 콜로이드 현탁액으로부터 수득된다:

- [0051] - TAC
- [0052] - 난 레시틴 (Lipoid E80) 및 헥사데실 트리메틸암모늄 브로마이드 (CTAB)로부터 선택되는 이온성 계면활성제,
- [0053] - 나노캡슐 C24 및 A37의 경우, 비-이온성 계면활성제 Lutrol[®]-F68,

[0054] - (양이온성) 키토산 및 (음이온성) 소듐 알기네이트로부터 선택되는 이온성 친수성 폴리머.

[0055] 상기 콜로이드 현탁액은 이후 락토스의 존재 하에 건조시킨다.

[0056] 이들 나노입자의 포물레이션은 아래 표 1에 나타내며, 성분들의 함량은 % (건조물의 m/m)로 표시한다:

표 1

입자	C24			
	A37			
활성 성분	TAC	24	37	39
이온성 계면활성제	Lipoid E80	12	-	10
	CTAB	-	4.5	-
비-이온성 계면활성제	Lutrol [®] -F68	15	23	-
폴리머	키토산	13	-	10
	소듐 알기네이트	-	8.1	
지지체	락토스	36	27.4	41

[0058] 제조

[0059] 나노입자의 제조 방법은 아래 3 단계를 포함한다:

[0060] 나노에멀전을 제조하는 단계,

[0061] 나노캡슐의 콜로이드 현탁액을 제조하는 단계, 및

[0062] 나노캡슐을 건조하는 단계.

[0063] 나노캡슐 C24 및 A37의 제조 프로토콜:

[0064] 나노에멀전을 제조하는 단계:

[0065] 나노캡슐 C24의 경우:

[0066] - 이온성 계면활성제, Lipoid E80를 터빈으로 교반하면서 TAC에 분산시키고, 분산액을 65℃로 승온시켜, 오일 상을 획득한다.

[0067] - 비-이온성 계면활성제 (Lutrol[®] F68)를 물에 용해시키고, 이 용액을 65℃로 승온시켜 수 상을 획득한다.

[0068] 나노캡슐 A37의 경우:

[0069] - 오일 상을 구성하는 TAC를 65℃로 승온시키고, 이온성 계면활성제 CTAB를 오일 상에 분산시킨다.

[0070] - 비-이온성 계면활성제 (Lutrol[®] F68)를 물에 용해시키고, 이 용액을 65℃로 승온시켜 수 상을 획득한다.

[0071] 그런 후, 나노캡슐 C24 및 A37의 경우:

[0072] - 수 상을 오일 상에 교반 하에 첨가하고, Reyneri 터빈을 600 tour/분으로 65℃에서 15분간 이용하여 1차 또는 거친 에멀전을 형성시킨다.

[0073] - 에멀전을 고압 호모게나이저로 이동시키고, 600 bar 압력 하에 6분간 65℃에서 균질화 처리하여, 나노에멀전을 획득한다.

[0074] 나노캡슐의 콜로이드 현탁액의 제조:

[0075] - 상기에서 획득한 나노에멀전을 Lutrol[®] F68 용액으로 /10th 희석한다.

[0076] - 나노캡슐 C24에 키토산 아세트산 용액을 0.05 g/L로, 또는 나노캡슐 A37에 소듐 알기네이트 용액을 1.8 g/L로, 터빈의 구동 하에 첨가하고, 실온에서 2시간 교반하여, 본 발명에 따른, 나노캡슐의 콜로이드 현탁액을 획득한다.

[0077] 나노캡슐의 건조:

[0078] - 나노캡슐을 락토스 상에서 분무-건조하고; 파라미터는 펌프 유속 15%, 유입 온도 150℃, 유속 7 mL/분 및 압

축 공기 유속 500 L/h이다.

[0079] 나노캡슐 C40의 제조 프로토콜:

[0080] 비-이온성 계면활성제는 첨가하지 않고 전술한 나노캡슐 C24의 제조 방법에 따라 나노캡슐 C40을 제조한다.

[0081] 나노캡슐의 특징 규명:

[0082] 나노캡슐은, 제조 방법의 2번의 시기, 즉 폴리머를 첨가하기 전 나노에멀전을 제조하는 1차 시기, 및 나노캡슐을 건조하기 전, 제조 공정을 완료한 2차 시기에, 아래 표 2에 나타난 크기 특징을 나타낸다:

표 2

나노입자	C24	A37	C40
폴리머 첨가 전, 나노액적의 크기 (nm)	219	236	123
건조 전 나노캡슐의 크기 (nm)	355	342	163

[0084] 아래 실시예들은 TAC의 생체이용성을 평가함으로써 본 발명에 따른 TAC 포물레이션들의 이점을 예시해준다.

[0085] 포물레이션의 TAC의 생체이용성은 세포 대사 및 장기 기능에 이용될 장 점막에 의해 흡수되는 TOL의 비율이다. 이러한 생체이용성은 여러가지 요인들의 조합이며, 특히 TAC의 생체접근성, 즉, 혼합된 마이셀에 용해된 포물레이션 (TAC 형태)에 존재하는 비타민 E의 비율, 소화계에서 분비된 카르복시 에스테르 하이드롤라제 (CEH)에 의한 TOL내 TAC의 가수분해이다.

[0086] 실시예 2: 시험관내 분석으로 분석한 TAC 포물레이션에서 TAC의 생체접근성

[0087] 본 검사는 Desmarchelier et al., 2013. Mol. Nutr. Food Res. 2013, 57, 1237-1245에 의해 개시되어 있다.

[0088] 시험관내 분석에서, 장내에서 작용하는 마이셀을 모방함으로써 소화 환경을 재현할 수 있는, 실시예 1의 여러가지 TAC 포물레이션을 포함하는 혼합 마이셀을 제조한다.

[0089] 서로 다른 포물레이션을 포함하는 사료를 시험관내 소화시킨 후, 비타민 E의 생체접근성을 계산한다. 이는 마이셀 상내에서 확인된 HPLC에 의해 측정된 비타민 E와 십이지장 단계 완료 후 수득된 소화물에 존재하는 HPLC에 의해 측정된 비타민 E 간의 비율로 결정한다.

[0090] 본 분석은 3가지 타입의 포물레이션에 대해 수행한다:

[0091] - 실시예 1의 나노캡슐 C24 및 A37: 나노캡슐 A37은 2가지 형태로 검사한다: 락토스 지지체를 가진 분말 형태 (A37); 및

[0092] - 실리카 상에 흡착된 비타민 E 오일로 구성되는, 레퍼런스 프로믹스로 표시되는 제품 (Promix 및 Promix (2)는 동일 제품의 중복제임)

[0093] 결과를 도 1에 나타낸다.

[0094] TAC 나노캡슐 (C24 및 A37)은 프로믹스 제품에 비해 비타민 E의 생체접근성을 증가시킬 수 있으며, 즉 시험관내 소화 종료 시점에, 혼합된 마이셀에 용해된 사료 매트릭스에 함유된 비타민 E의 양을 증가시킬 수 있는 것으로 관찰된다.

[0095] 실시예 3: 시험관내 분석에서 CER에 의한 TOL에서 TAC의 가수분해

[0096] CEH에 의한 비타민 E-아세테이트 (TAC)의 가수분해 프로토콜은 Desmarchelier et al., 2013. Mol. Nutr. Food Res. 2013, 57, 1237-1245에 의해 개시되어 있다.

[0097] 간략하게는, TAC를 포함하는 혼합 마이셀 500 μ l를 30분간 37°C에서 인큐베이션한다. 그런 후, CEH를 30분간 10 U/mL의 농도로 첨가한다. 유리형 토코페롤 (TOL)의 출현을 HPLC로 측정한다.

[0098] 본 분석을 3가지 타입의 포물레이션에 대해 수행한다:

[0099] - 실시예 1의 나노캡슐 C24 및 A37; 및

[0100] - 비타민 E 오일로 구성되는, 레퍼런스 E 프로믹스로 표시되는 제품.

- [0101] 결과를 도 2에 나타낸다.
- [0102] TAC 나노캡슐 (C24 및 A37)은 E 프로믹스 제품과 비교해 TAC에서 TOL로의 변환을 증가시킬 수 있으며, 이로써 흡수에 이용가능한 비타민 E를 다량 생성시킬 수 있다.
- [0103] **실시예 4: 생체내 분석을 통한 랫에서의 TAC 생체이용성**
- [0104] 프로토콜
- [0105] 본 분석은 토코페롤-결핍 사료를 2주간 급식시킨 6주령의 Wistar 수컷 랫을 대상으로 수행한다.
- [0106] 랫은 강제 급식 전날 밤에는 급식시켰다.
- [0107] 5일간 연속하여, 여러가지 TAC 5 mg 수용액을 랫 (n = 10)에 강제-급식시켰다:
- [0108] - Microvit[®] E Promix 50 (실리카 상에 흡착시킨 비타민 E 아세테이트),
- [0109] - 실시예 1의 건조 나노캡슐 C24, 및
- [0110] - 실시예 1의 건조 나노캡슐 A37.
- [0111] 마지막 강제-급식 후 3시간 후, 랫을 안락사시키고, 심장 천공에 의해 혈액을 수집하고, 혈액을 원심분리하여 혈장을 분리하였다. 이중 헥산 추출 후, 혈장내 α-토코페롤 (αTOL) 농도를 HPLC로 측정하였다.
- [0112] 결과
- [0113] 결과를 도 3에 나타낸다.
- [0114] 포몰레이션 C24 및 A37의 강제-급식시 혈장내 αTOL 농도는 각각 26% 및 24%로 나타났으며, 이는 Microvit[®] E Promix 50을 강제-급식한 경우 보다 유의하게 우수하다 (P < 0.001).
- [0115] **실시예 5: 생체내 분석을 통한 수탉에서의 TAC 생체이용성**
- [0116] 프로토콜
- [0117] 본 실험 계획은 Preveraud et al. 2015, British Poultry Science, 56: 1; 94-102에 상세히 기술되어 있다.
- [0118] 간략하게는, ISA Brown 수탉 60마리를 2개의 룬에 개별 케이지에 수용한다. 처리 지정하기 1주일 전에, 수탉에 비타민 E가 결핍된 사료를 공급한다.
- [0119] 수탉 (n = 수탉 10마리/처리)에 여러가지 TAC 수용액을 강제-급식시켰다.
- [0120] 룬 1: 실시예 1의 건조 나노캡슐 C24,
- [0121] TOL 및 TAC, 오일 형태, 블랭크로서.
- [0122] 룬 2: 실시예 1의 건조 나노캡슐 C40,
- [0123] TOL 및 TAC, 오일 형태, 블랭크로서.
- [0124] 캡슐에 담긴 비타민 E 제품을 강제-급식 투여한 후, 혈액 샘플을 강제-급식 후 0, 6, 12, 24, 48 및 96시간에 채혈하였다. 혈액을 원심분리한 다음 혈장을 디캔팅하고, HPLC에 의해 유리형 토코페롤을 측정한다.
- [0125] 결과
- [0126] 결과를 도 4 및 5에 나타내며, 24시간 및 96시간째의 결과를 아래 표 3 및 4에 나타내며, 여기서 혈중 비타민 E의 확산을 TAC 대비 곡선하 면적 (AUC) 및 확산 %로 표시한다.

표 3

Vit E (룬 1)	24h		96h	
	AUC μg/ml/h	%/TAC	AUC μg/ml/h	%/TAC
TAC	206	-	597	-
TOL	307	+49%	1193	+100%
C24	228	+11%	690	+16%

[0128] 포물레이션 C24의 강제-급식시, 포물레이션으로 준비되지 않은 TAC를 강제-급식시킨 경우에 비해 현저하게 높은 혈장내 αTOL 농도가 달성된다.

표 4

Vit E (그룹 2)	24h		96h	
	AUC μg/ml/h	%/TAC	AUC μg/ml/h	%/TAC
TAC	142	-	340	-
TOL	309	+118%	320	+124%
C40	146	+3%	719	+6%

[0130] 포물레이션 C40의 강제-급식시, 포물레이션으로 준비되지 않으며 비-이온성 계면활성제가 첨가되지 않은 제조된 TAC 대조군과 비교해 유의한 차이가 없는 혈장내 αTOL 농도가 달성되었으며, 즉, 생체이용 가능성이 없다.

[0131] 실시예 6: 생체내 분석을 통한 닭에서 TAC의 생체이용성

[0132] 프로토콜

[0133] 1일령 닭에 7일간 토코페롤-결핍 사료를 급식시킨 후 분석 대상으로 조사하며; 실험 전체 기간을 15일로 고정하고, 그 기간 동안 과립 사료를 비타민 E와 혼합하여 서로 다른 처리를 제공한다 (n = 18마리/처리). 그 전에, 닭을 케이지 당 6마리로 그룹으로 배치하였다. 21일령에, 동물을 안락사시키고, 간 샘플을 취하였다. 추출 후, 조직에서 비타민 E를 측정한다.

[0134] 닭에 하기 포물레이션을 급식시켰다:

[0135] - Microvit[®] E Promix 50, E50 (실리카 상에 흡착시킨 비타민 E 아세테이트),

[0136] - 실시예 1의 건조 나노캡슐 C24.

[0137] 캡슐에 수용된 비타민 E를 강제-급식 투여한 후, 강제-급식 후 0, 6, 12, 24, 48 및 96시간에 혈액 샘플을 취하였다. 혈액을 원심분리하여 혈장을 디켄팅하고, 유리형 토코페롤을 HPLC로 측정하였다.

[0138] 결과

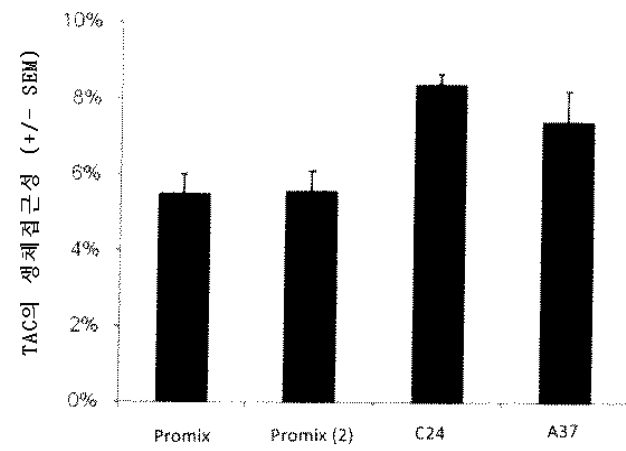
[0139] 그 결과를 도 6에 나타낸다.

[0140] 포물레이션 C24를 강제-급식시킨 경우, E50 제품을 강제-급식한 경우와 비교해, 현저하게 높은 혈장내 αTOL 농도가 달성되었다.

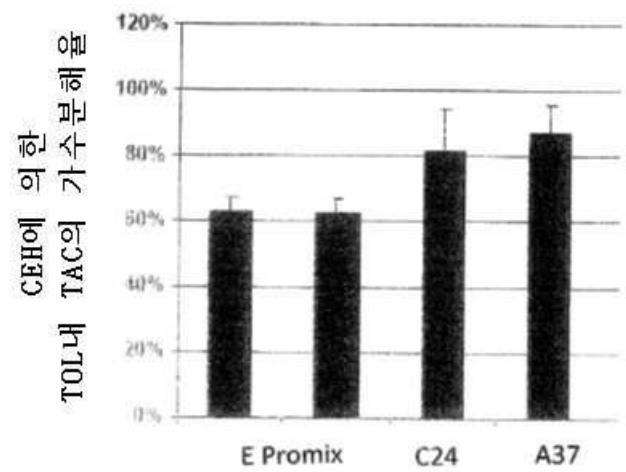
[0141] 포물레이션 C24를 강제-급식시킨 경우, 용량-반응 효과의 우측 기울기 비교에 기초하여, 포물레이션 E50을 섭취시킨 경우 보다 현저하게 높은 간내 αTOL 농도 (+ 24%)가 달성되었다.

도면

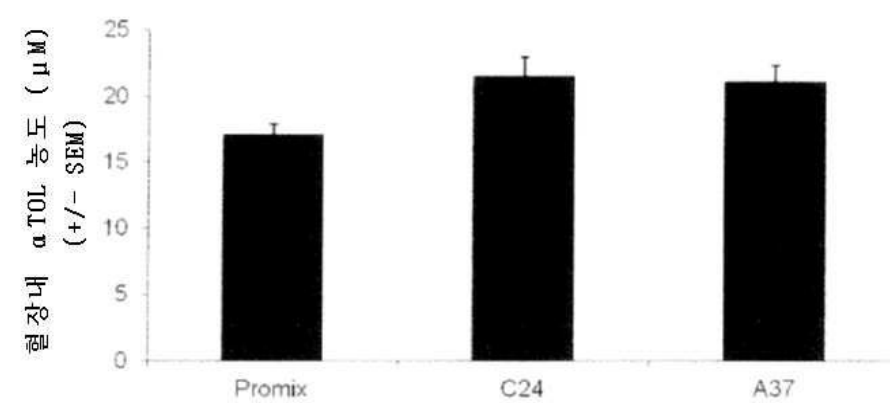
도면1



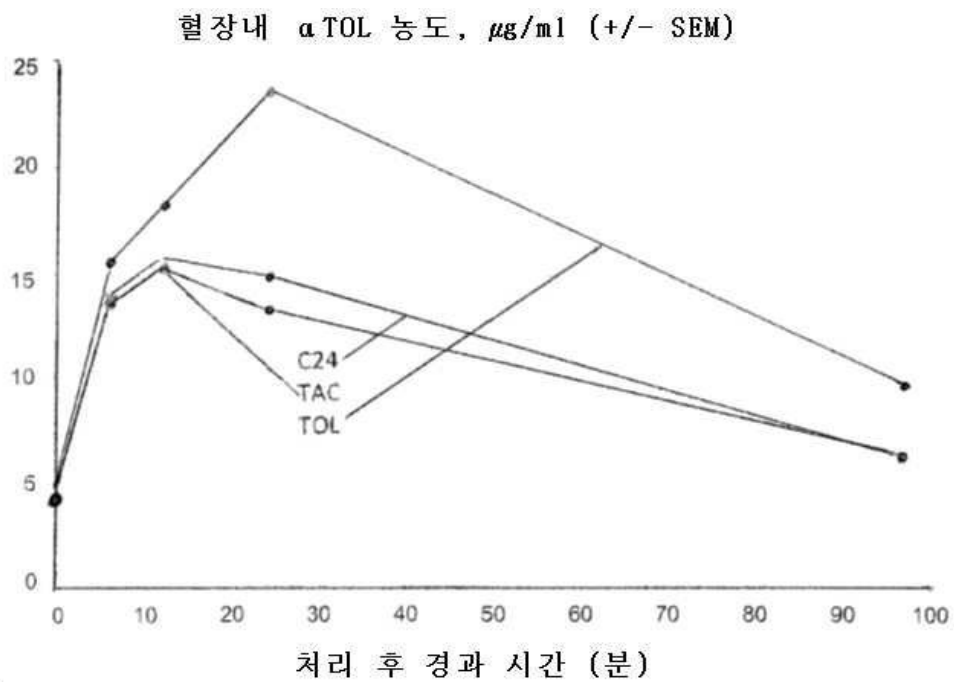
도면2



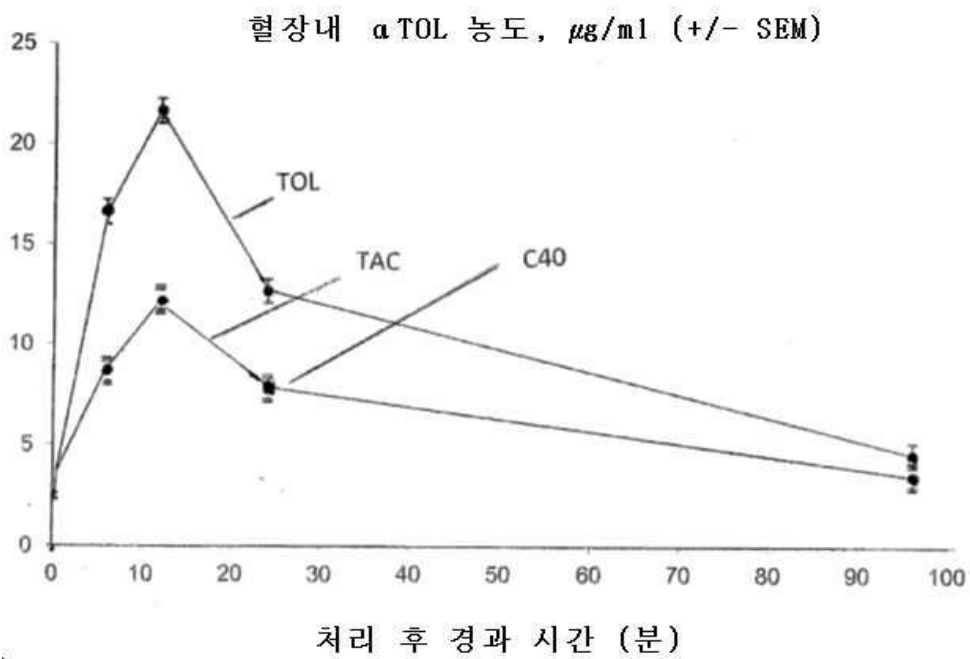
도면3



도면4



도면5



도면6

