



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년01월28일
(11) 등록번호 10-1943211
(24) 등록일자 2019년01월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/50 (2006.01) A61K 36/9066 (2006.01)
A61K 9/107 (2006.01) A61K 9/51 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 9/5015 (2013.01)
A61K 36/9066 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0092714
(22) 출원일자 2017년07월21일
심사청구일자 2017년07월21일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020170064486 A

(73) 특허권자
계명대학교 산학협력단
대구광역시 달서구 달구벌대로 1095, 계명대학교 산학협력관 201호(신당동)
(72) 발명자
김준태
대구광역시 달서구 신당로 55, 209동 1307호(신당동, 성서주공2단지아파트)
박성진
대구광역시 달성군 다사읍 서재로12길 38, 105동 2401호(에코폴리스 동화 아이위시)
코칼리아 가르시아
대구광역시 달서구 달구벌대로 1095 명교생활관 국제동 411 (신당동, 계명대학교성서캠퍼스)
(74) 대리인
특허법인태백

전체 청구항 수 : 총 3 항

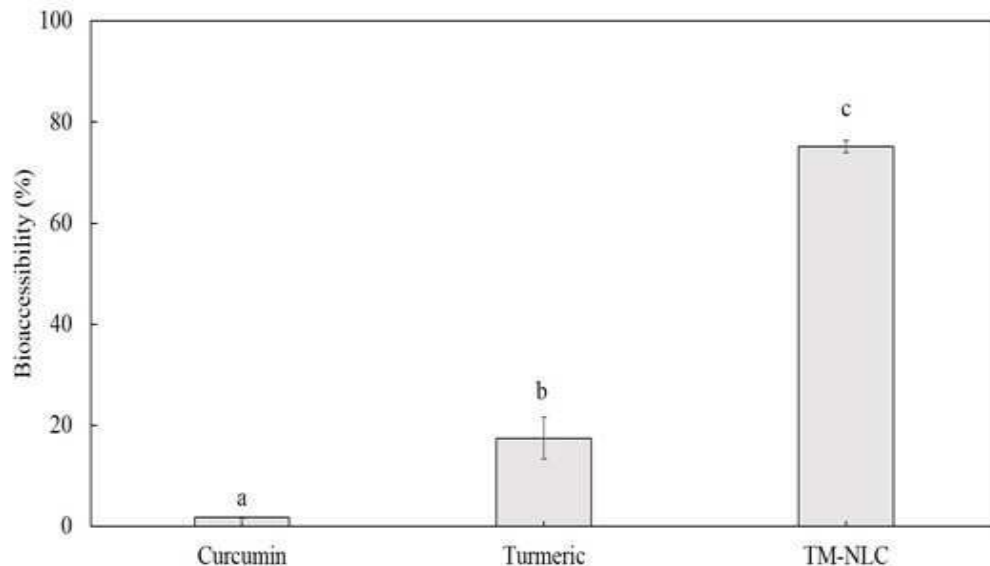
심사관 : 박제현

(54) 발명의 명칭 강황을 포함하는 나노지질전달체 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 나노지질전달체에 포집된 강황을 함유하는 강황 나노지질전달체 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 강황 분말을 캡슐화시킨 지질전달체는 강황 내 커큐미노이드 성분을 위와 같은 산성 조건으로부터 보호하여 장까지 안전하게 전달하고, 장 내에서 효과적으로 방출시켜 강황 분말에 포함된 커큐미노이드의 생체접근율을 향상시키는 효과를 나타내는 것으로 확인됨에 따라, 상기 지질전달체는 강황에 포함된 커큐미노이드의 생체이용율을 개선시킬 수 있는 효과적인 방법으로 이용될 수 있다.

대표도 - 도8



(52) CPC특허분류

A61K 9/107 (2013.01)

A61K 9/5089 (2013.01)

A61K 9/51 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20160709

부처명 농림축산식품부

연구관리전문기관 농림식품기술기획평가원

연구사업명 고부가가치식품기술개발사업

연구과제명 저분자 펜타이드와 커큐민을 이용한 나노식품 제조기술의 산업체 상용화 연구 및 제품개발

기 여 율 1/1

주관기관 계명대학교 산학협력단

연구기간 2016.11.28 ~ 2017.11.27

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

중간사슬지방산(Medium chain triglyceride; MCT) 100 중량부에 대하여, 1 내지 10 중량부의 글리세롤 모노스테아레이트(glycerol monostearate; GMS)와 0.1 내지 5 중량부의 강황 분말이 첨가된 오일상; 및
수상 100 중량부에 대하여, 10 내지 20 중량부의 트윈 80(Tween 80)을 함유하는 수상으로 이루어진 강황을 함유하는 나노지질전달체 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

중간사슬지방산 100 중량부에 대하여, 글리세롤 모노스테아레이트(glycerol monostearate; GMS)을 1 내지 10 중량부로 첨가하여 오일상을 제조하는 단계;

상기 제조된 오일상 총 100 중량부에 대하여, 0.1 내지 5 중량부로 강황 분말을 첨가하여 용해시키는 단계;

상기 강황 분말을 용해시킨 오일상에 수상 총 100 중량부에 대하여, 10 내지 20 중량부로 트윈 80이 포함된 수상을 혼합하여 나노지질전달체를 제조하는 단계; 및

상기 나노지질전달체를 균질화시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 강황 나노지질전달체 제조방법.

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

청구항 6에 있어서, 상기 나노지질전달체를 균질화시키는 단계는 1 내지 5분간 초음파 처리하는 것을 특징으로 하는 강황 나노지질전달체 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 강황을 포함하는 나노지질전달체(TM-NLCs) 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 강황(Curcuma longa L.)은 생강과(Zingiberaceae)의 강황속(Curcuma)으로 분류되는 다년생 식물이며, 열대 아시아가 원산지로서 인도, 중국, 동남아시아 등지에서 재배되어 식용, 약용, 천연 염료로 사용되고 있다. 한방에서는 강황, 울금, 심황을 동일한 것으로 지칭하기도 한다.

[0003] 식용으로서의 강황은 주로 카레에 이용되며 카레의 노란색은 강황의 커큐미노이드(curcuminoid) 성분으로 인한 것으로, 커큐미노이드는 커큐민(curcumin), 비스디메톡시 커큐민(bisdemethoxy curcumin), 디메톡시 커큐민(demethoxy curcumin) 3종의 화합물을 총칭한다. 색소성분인 커큐미노이드 중 대부분을 차지하는 커큐민은 강황에 0.5~6% 정도 함유되어 있다.

[0004] 최근 각종 논문 및 매체에서 커큐미노이드 및 커큐민이 항산화, 항암, 돌연변이, 항염, 치매 예방, 간기능 보호, 콜레스테롤 감소 등 각종 생리 효능을 지닌 것으로 보고되어 졌다. 이런 다양한 효능은 주로 항산화 작용에 의한 것으로, 항산화 작용이란 활성산소로 인한 인체의 손상을 막아주는 것이다,

[0005] 호흡에 의해 체내에 들어온 산소가 대사과정에서 불안정한 형태로 변하면서 독성 성분이 되어 인체의 노화와 질병을 일으키는 데 이것을 활성산소라 하고, 활성산소는 거의 모든 질환과 연관되어, 암, 동맥경화, 허혈성 심장질환, 알츠하이머병, 파킨슨병, 면역부전, 당뇨병, 백내장, 노화 등을 유발시킨다.

[0006] 상기와 같이 강황은 천연물로 다양한 약리작용이 보고되고 있지만, 강황에 함유된 많은 지용성 성분에 의하여 물에 녹지 않기 때문에 산업적인 이용이 제한되고 있다. 특히, 강황에 함유된 지용성 색소성분 커큐민은 다양한 기능성이 보고되고 있으나, 물에 녹지 않는 특성으로 인해 체내 흡수율이 낮으며, 소화과정 또는 빛에 의하여 분해되거나 손실되기 때문에 이를 극복하기 위한 다양한 코팅 기술이 연구되고 있다.

[0007] 현재까지 대부분의 연구는 강황에서 추출된 커큐민에만 집중되고 있으나, 강황에는 커큐민 이외에도 탄수화물, 단백질, 지질, 식이섬유, 비타민, 무기질 및 폴리페놀류의 생리활성 물질이 복합적으로 함유되어 있으며, 커큐민은 강황 전체에 약 5% 정도 함유되어 있기 때문에 강황에서 분리된 커큐민 만으로는 식품산업에 사용되는데 비효율적이다.

[0008] 또한, 강황에 함유된 성분들은 지용성 성분과 수용성 성분이 혼합되어 있기 때문에 두 가지 서로 다른 특성을 가지는 물질들을 모두 포함시켜 캡슐화하는 것은 기술적인 어려움이 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제2017-0064486호(2017.06.09 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명은 강황 내 커큐미노이드와 같은 지용성 유효성분들의 생체접근성을 향상시키고, 수용성 기능성분들을 함께 포함하고 있는 강황 전체를 효과적으로 포집 및 운반할 수 있는 나노지질전달체를 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명은 강황을 함유하는 나노지질전달체 조성물을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 중간사슬지방산에 지질을 첨가하여 오일상을 제조하는 단계; 상기 제조된 오일상에 강황 분말을 첨가하여 용해시키는 단계; 상기 강황 분말을 용해시킨 오일상에 유화제가 포함된 수상을 혼합하여 나노지질전달체를 제조하는 단계; 및 상기 나노지질전달체를 균질화시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 강황 나노지질전달체 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명에 따르면, 강황 분말을 나노 캡슐화시킨 나노지질전달체는 강황을 위액과 같은 산성 조건으로부터 보호하여 소장까지 안전하게 전달하고, 소장 내에서 효과적으로 방출시켜 강황의 생체접근율을 향상시키는 효과를 나타내는 것으로 확인됨에 따라, 상기 나노지질전달체는 강황에 포함된 지용성 커큐미노이드와 수용성 기능성분들을 모두 포함한 강황 전체의 생체이용율을 개선시킬 수 있는 효과적인 방법으로 제공될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 다양한 종류의 액상오일에서 강황 분말에 함유된 커큐민의 용해도를 확인한 결과이다.

도 2는 오일상에서 고상지질 글리세롤 모노스테아레이트를 1 내지 10% (w/w) 첨가에 따른 강황 분말의 용해도를 확인한 결과이다.

도 3은 트윈 80 농도에 따른 강황이 함유된 나노지질전달체의 (a)입자 크기, (b)입자 크기 분산 및 (c)제타 전위를 확인한 결과로, 다른 문자 간에는 $p < 0.05$ 값의 차이를 나타낸다.

도 4(a)는 나노지질전달체에 초음파 처리 시간에 따른 입자 크기 및 PDI를 확인한 결과로, 다른 문자 간에는 $p < 0.05$ 값의 차이를 나타내며, 도 4(b)는 다양한 농도의 트윈 80으로 제작된 강황 나노지질전달체를 4℃에서 24 시간 동안 저장한 후 안정성을 확인한 결과이다.

도 5(a)는 강황 나노지질전달체의 TEM 이미지이며, 도 5(b)는 트윈 80 농도에 따른 강황 나노지질전달체의 캡슐화 효율성을 확인한 결과로, 다른 문자 간에는 $p < 0.05$ 값의 차이를 나타낸다.

도 6은 강황 나노지질전달체를 생체 모방 조건에서 모사 위액 및 소장액에서의 커큐민 방출을 프로파일한 결과로, 도 6(a)는 자극된 위액 조건에서 확인한 결과이며, 도 6(b)는 소장액 결과이다.

도 7은 대조군 강황 나노지질전달체 및 모사 위액(SGM; pH 2.0, 37℃, 2h) 및 모사 소장액(SIM; pH 7.0, 37℃, 2h)에서 강황 나노지질전달체의 입자 크기(a) 및 형태(b) 변화를 확인한 결과로, 다른 문자 간에는 $p < 0.05$ 값의 차이를 나타낸다.

도 8은 모사 소장액에서의 소화 후 커큐민, 강황 및 강황 나노지질전달체의 생물학적 접근성을 소장액의 미셀층의 커큐민 함량으로 확인한 결과로, 다른 문자 간에는 $p < 0.05$ 값의 차이를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 본 발명은 강황을 함유하는 나노지질전달체 조성물을 제공할 수 있다.

[0016] 상기 나노지질전달체는 중간사슬지방산(Medium chain triglyceride; MCT), 옥수수유, 콩기름, 올리브유 및 올레익산으로 이루어진 군에서 선택되는 오일상을 포함할 수 있으며, 보다 바람직하게는 중간사슬지방산일 수 있다.

[0017] 상기 나노지질전달체는 오일상 100 중량부에 대하여, 1 내지 10 중량부의 글리세롤 모노스테아레이트(glycerol monostearate; GMS)를 추가로 더 포함할 수 있다.

[0018] 보다 상세하게 글리세롤 모노스테아레이트가 상기 함량 범위 이하로 포함될 경우 강황 성분의 분산이 일어나지 않고 침전이 발생하며, 상기 함량 범위 이상 포함될 경우 글리세롤 모노스테아레이트의 고체화 특성에 의하여 오일상이 빨리 고체화되는 문제점이 발생할 수 있다.

[0019] 본 발명의 일실시예에 따르면, 몇 종류의 오일에서 강황 분말의 용해도를 확인한 결과, 도 1과 같이 중간사슬지방산(MCT)에서 고함량의 커큐미노이드(59.6 $\mu\text{g/mL}$)가 확인됨에 따라, 오일상으로 MCT가 적합한 것이 확인되었다. 그러나 MCT는 강황 내 친유성 화합물을 용해시켜 노란색 용액을 제조할 수 있으나, 일부 화합물이 침전되는 것이 확인됨에 따라, 1 내지 10% (w/w)의 농도의 글리세롤 모노스테아레이트(GMS)를 첨가한 결과, 도 2a와 같이 GMS 3 내지 5%의 농도에서는 거의 침전이 나타나지 않는 적색-오렌지 혼합물이 생성되는 것을 확인할 수 있었다.

[0020] 또한, 상기 나노지질전달체는 수상 100 중량부에 대하여, 10 내지 20 중량부의 트윈 80(Tween 80)을 함유하는 수상을 추가로 더 포함할 수 있다.

[0021] 보다 상세하게 상기 트윈 80이 상기 함량 범위 이하로 포함될 경우 냉장 저장과정에서 층분리가 발생하는 문제점이 있을 수 있으며, 상기 함량 범위 이상 포함될 경우 층분리와 함께 고함량에 의한 독성이 나타날 수 있다.

[0022] 본 발명의 다른 일실시예에 따르면, 상기 오일상에 1 내지 20% (w / w) 농도의 수성 유화제인 트윈 80(Tween

80)이 포함된 수상을 혼합한 후 초음파 처리(US)를 수행하여 고속 균질화한 결과, 도 3b 및 3c와 같이 농도가 15%인 트윈 80의 경우 작은 직경(282nm)과 균일한 입자 크기 분포 및 제형들 중 가장 큰 제타 전위(-22.75 mV)를 나타내는 것으로 확인되었으며, 제조된 강황을 함유하는 나노지질전달체의 캡슐화 효율성을 확인한 결과, 도 6a와 같이 트윈 80 함량이 증가할수록 효율성이 증가하는 경향이 나타났으며 15% 농도의 트윈 80 제형의 캡슐화 효율성은 93.3%로 나타났다.

- [0023] 보다 상세하게는 상기 나노지질전달체는 강황 및 글리세롤 모노스테아레이트를 포함하는 오일상 및 트윈 80을 포함하는 수상으로 이루어진 강황을 함유하는 나노지질전달체 조성물일 수 있다.
- [0024] 한편, 본 발명은 중간사슬지방산에 지질을 첨가하여 오일상을 제조하는 단계; 상기 제조된 오일상에 강황 분말을 첨가하여 용해시키는 단계; 상기 강황 분말을 용해시킨 오일상에 유화제가 포함된 수상을 혼합하여 나노지질전달체를 제조하는 단계; 및 상기 나노지질전달체를 균질화시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 강황 나노지질전달체 제조방법을 제공할 수 있다.
- [0025] 상기 지질은 글리세롤 모노스테아레이트(glycerol monostearate; GMS)일 수 있으며, 상기 글리세롤 모노스테아레이트는 오일상 총 100 중량부에 대하여 1 내지 10 중량부로 포함될 수 있다.
- [0026] 상기 유화제는 트윈 80일 수 있으며, 상기 트윈 80은 수상 총 100 중량부에 대하여, 10 내지 20 중량부로 포함될 수 있다.
- [0027] 상기 강황 분말은 오일상 총 100 중량부에 대하여, 0.1 내지 5 중량부로 첨가될 수 있다.
- [0028] 상기 나노지질전달체를 균질화시키는 단계는 1 내지 5분간 초음파 처리하는 것일 수 있다.
- [0029] 본 발명의 또 다른 일실시예에 따르면, 강황 분말을 용해시킨 나노지질전달체를 균질화시키는 단계에서 최적의 초음파 처리시간을 확인한 결과, 도 4a와 같이 1분간 초음파(US) 처리된 경우, 입자의 크기가 1553.6nm에서 414.3nm로 현저하게 감소하였으며, 처리 시간이 증가할수록 입자의 크기가 약하게 감소하였으나, 5분 후에는 입자 크기(282 nm)의 변화가 나타나지 않았다. 또한, PDI는 초음파 처리시간과 함께 감소하여 0.28 미만으로 유지되어 균일한 나노지질전달체가 생성된 것을 확인할 수 있었다.
- [0031] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.
- [0033] <실험예 1> 물질
- [0034] 강황(Turmeric) 분말을 Ottogi Co. (Seoul, Korea)에서 구입하였다. 커큐민(Curcumin; $\geq 95\%$ purity), 2,2-디페닐-1-피크릴하이드라질(DPPH), 2,2'-아지노비스-(3-에틸벤조티아졸린-6-설포닉산)(ABTS), 돼지채장 리파제, 돼지 위점막에서 유래된 펩신 및 돼지 채장에서 유래된 판크레아틴은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.
- [0035] 중간사슬지방산(Medium chain triglyceride; MCT) 오일은 NOW Foods Inc. (Bloomington, IL, USA)에서 구입하였으며, 유화제 글리세롤 모노스테아레이트(glycerol monostearate; GMS) 및 트윈 80(Tween 80)은 Daejung Chemicals (Seoul, Korea)에 구입하였다.
- [0036] 모든 화학물질은 분석용 등급을 사용하였다.
- [0038] <실험예 2> 전체 폴리페놀 함량 및 항산화 활성 확인
- [0039] 커큐민과 동일한 농도로 강황 및 커큐민 용액을 준비하였다.
- [0040] 커큐민 함량을 확인하기 위해, 강황 분말을 70% 에탄올에 용해시키고 HPLC를 이용하여 UV 검출기 425 nm에서 커큐민 함량을 확인하였다.
- [0041] 또한, 폴린-시오칼토 (Folin-Ciocalteu) 방법으로 강황 및 커큐민에 포함된 전체 폴리페놀을 확인하였다. 먼저, 시료를 폴린 용액(phenol reagent, Daejung Chemicals) (1:1, v/v)과 혼합하고 2분 후, 10% 소듐 카보네이트를 첨가한 후 혼합하고, 실온에서 1 시간 동안 저장한 후 765nm 흡광도에서 확인하였다.
- [0042] 전체 페놀 함량은 탄닌산 당량/건조 중량($\mu\text{g}/\text{mg}$)으로 나타내었다.
- [0043] 항산화 활성은 기존에 공개된 방법(Rackova, et al., 2009)으로 DPPH 및 ABTS 분석을 수행하여 확인하였다.

- [0044] 먼저, 강황 및 커큐민 시료를 에탄올에 용해시킨 DPPH 및 ABTS 용액에 첨가하고 각각 30 및 6분간 인큐베이션한 후, DPPH는 518 nm에서 ABTS는 734 nm에서 흡광도 감소를 확인하였다.
- [0045] 마지막으로 IC₅₀을 계산하여 자유 라디칼 소거 활성을 확인하였다.
- [0047] <실험예 3> 강황이 포함된 오일상 준비
- [0048] 중간사슬지방산(MCT) 오일 및 강황 분말(1%, w/w)을 자기 교반봉(SMHS-6, Daihan Scientific, Seoul, Korea)으로 70℃에서 500 rpm로 2시간 동안 혼합하였다. 그 후, GMS를 다양한 농도로 첨가하고 70℃에서 500 rpm로 1시간 동안 교반하였다.
- [0050] <실험예 4> 강황을 포함하는 나노지질전달체(TM-NLCs) 준비
- [0051] 2차 증류수 및 트윈 80으로 구성된 수용성 계면활성제 상을 준비하고 오일상에 첨가하기 전에 70℃까지 온도를 상승시켰다. 혼합물은 1분간 5,000 rpm으로 high-speed homogenization (HG-15-A, DAIHAN Co., Seoul, Korea) 수행한 후, 1 내지 9분간 프로브 타입의 초음파파쇄기(Sonic & Materials, Newtown, CT, USA)를 수행하였다. 상기 과정으로 준비된 나노지질전달체를 사용하기 전까지 4℃에서 저장하였다.
- [0053] <실험예 5> 입자 크기, 다분산지수(polydispersity index) 및 제타 전위 확인
- [0054] 강황 함유 나노지질전달체(TM-NLCs)의 평균 입자 직경(Z-average), 크기분포(size distribution; PDI) 및 제타 전위(mV)를 실온에서 제타 전위 및 입자 크기 분석기(ELSZ-1000, Otsuka Electronics Co., Ltd., Osaka, Japan)를 이용하여 동적광산란법(dynamic light scattering; DLS)으로 확인하였다.
- [0055] 나노지질전달체 시료를 증류수(pH 6.5)에 1:9 비율로 분산시켰다. 시료를 ELSZ-1000 장비의 챔버에 직접 주입하고, 정해진 전기장 내 유적 운동의 방향성 및 속도를 측정하여 TM-NLCs의 제타 전위를 확인하였다.
- [0057] <실험예 6> 강황 함유 나노지질전달체(TM-NLCs)의 형태 확인
- [0058] TEM(HT 7700, Hitachi, Tokyo, Japan)를 이용하여 강황 함유 나노지질전달체(TM-NLCs)의 형태를 확인하였다.
- [0059] 시료 방울을 코팅된 구리 격자(Ted Pella, Redding, CA, USA)에 올려놓고 1% 아세트산우라닐(uranyl acetate)을 첨가한 후 실온에서 3분간 인큐베이션하고 초과된 액체를 제거한 후 격자를 건조시켜 100kV 전압 및 80.0K 배율로 이미지를 얻었다.
- [0061] <실험예 7> 캡슐화 효율 확인
- [0062] 강황 함유 나노지질전달체의 캡슐화 효율성을 이미 공개된 방법(Aditya, Chimote, Gunalan, Banerjee, Patankar, & Madhusudhan, 2012; Shete & Patravale, 2013)을 변형하여 확인하였다.
- [0063] 준비된 나노지질전달체 시료를 25℃에서 2시간 동안 70% 에탄올로 분할하고, 상층액을 수집하여 비캡슐화된 중심 물질(자유 커큐미노이드)을 정량분석하였다.
- [0064] 수집된 상층액에 70% 에탄올을 1:9 (v/v) 비율로 혼합하고 HPLC 분석을 수행하였으며, 캡슐화 효율은 하기식을 이용하여 계산하였다.
- [0065] [계산식 1]
- [0066]
$$\text{Encapsulation efficiency} = \frac{\text{Total curcuminoids} - \text{Free curcuminoids}}{\text{Total curcuminoids}} \times 100$$
- [0068] <실험예 8> HPLC 분석
- [0069] UV 흡광도 검출기(operated at 425 nm) 및 ACE5 C18 컬럼(4.6 × 250 mm, 5 μm; Advanced Chromatography Technologies, Aberdeen, UK)을 갖춘 Shimadzu D-20A HPLC (Kyoto, Japan)를 사용하여 시료내 커큐노이드 양을 확인하였다.
- [0070] 이동상으로 아세트나이트릴 및 2% 아세트산(65:35, v/v)을 1.0 mL/min 유속으로 흘려주었으며, 시료는 20 μL 씩 주입하였다.
- [0072] <실험예 9> 모사 위액 및 소장액 준비
- [0073] 공개된 방법(Sarkar, Goh, Singh, & Singh, 2009)을 변형시켜 모사된 위액(SGM)을 준비하였다.

- [0074] 간략하게, 펩신 0.32% (w/v), NaCl 2g 및 HCl (37%) 7 mL을 혼합하고, 1.0 M HCl을 이용하여 pH를 2.0로 조절하였다.
- [0075] 준비된 모사 위액(SIM) (Y. Li, Hu, & McClements, 2011)에 리파제 0.4 mg/mL, 담즙 추출물 용액 0.7 mg/mL, 췌장 0.5 mg/mL 및 750 mM CaCl₂ 용액 1 mL를 혼합하고 0.1 M NaOH를 이용하여 pH를 7로 조절하였다.
- [0077] <실험예 10> 생체 외(in vitro) 분비 확인
- [0078] 이미 공개된 방법(Jain, Swarnakar, Godugu, Singh, & Jain, 2011)으로 투석 주머니(Sigma-Aldrich)를 이용하여 나노지질전달체로부터 커큐민 방출을 평가하였다.
- [0079] 투석 주머니를 증류수에 하룻밤 동안 적시고 TM-NLCs를 가득 채운 후 메탄올 30 mL이 포함된 베이커에 조심스럽게 옮기고 50 rpm으로 37℃에서 0, 2, 4, 6, 8 및 10시간 동안 교반시킨 후, 강황 나노 입자에서 방출된 커큐미노이드를 HPLC 분석으로 확인하였다.
- [0081] <실험예 11> 생체 외(in vitro) 생체접근율(bioaccessibility) 확인
- [0082] 이전에 공개된 방법(Aditya, Aditya, Yang, Kim, Park, & Ko, 2015)을 변형시켜 생체외 리파아제 분해 분석을 수행하여 강황 커큐미노이드의 생체접근율을 확인하였다.
- [0083] 소장액 조건에서 강황 나노지질전달체로부터 분리된 커큐민 및 강황의 생체접근율을 확인하기 위해, 상기 시료들을 교반 수조 내 SGM에 첨가하고 37℃에서 2시간 동안 인큐베이션한 후 다시 SIM에서 인큐베이션하고 최종 결과물을 4℃에서 30분간 10,000 rpm으로 원심분리하여 미셀 상을 수집하였다. 수집된 미셀에 함유된 커큐미노이드의 함량을 HPLC를 수행하여 정량하였다.
- [0084] 하기식을 이용하여 생체접근율은 평균 커큐미노이드 값으로 나타내었다.
- [0085] [계산식 2]
- [0086]
$$\text{Bioaccessibility (\%)} = \frac{\text{Curcuminoids in micelle}}{\text{Total curcuminoids}} \times 100$$
- [0088] <실시에 1> 강황 분말의 항산화 활성 확인
- [0089] 항산화제는 암, 당뇨, 동맥경화 및 관절염을 포함한 만성 질환의 위험성을 낮추는 데 관련이 있으므로 (Devasagayam, Tilak, Boloor, Sane, Ghaskadbi, & Lele, 2004), 강황 및 이의 주요 성분인 커큐민의 항산화 물질 함량 및 효과를 비교하였다(Chakravarty, Chatterjee, Yasmin, & Mazumder, 2009; Rackova, et al., 2009).
- [0090] 그 결과, 표 1과 같이 강황 분말의 폴리페놀 함량이 순수한 커큐민(12.1 µg/g)보다 약 5배(57.7 µg/g) 높은 것을 확인할 수 있었다.
- [0091] 상기 결과로부터 강황 분말에 다양한 커큐미노이드의 폴리페놀, 플라보노이드와 같은 다양한 항산화물질이 존재하는 것을 확인할 수 있었다.
- [0092] 또한, 항산화 활성으로 확인하기 위해, DPPH 및 ABTS 라디칼 소거 방법을 수행하고 IC₅₀으로 나타내었다.
- [0093] 그 결과, DPPH 및 ABTS 소거를 위한 IC₅₀ 값이 전체 강황 분말과 순수한 커큐민에서 각각 33.6 및 48.9 µg/g로 확인되었으며, 상기 결과로부터 전체 강황 분말의 항산화 활성이 순수한 커큐민보다 매우 우수한 것을 확인할 수 있었다.
- [0094] 이러한 강황의 항산화 활성은 커큐민 뿐만 아니라 다른 항산화 성분이 강황에 함유되어 있기 때문인 것으로 확인되었으며(Rackova, et al., 2009), 전체 강황은 분리된 커큐민보다 항암 및 항염증 효과가 더 우수한 것으로 보고되어졌다(Chakravarty, Chatterjee, Yasmin, & Mazumder, 2009).
- [0095] 이에 따라, 강황의 나노지질전달체의 개발은 식품 기능적으로 의의가 있으며, 식품산업적으로 효율적이다.

표 1

Sample	Total polyphenol ¹⁾ ($\mu\text{g/g}$)	DPPH IC ₅₀ ²⁾ ($\mu\text{g/g}$)	ABTS IC ₅₀ ³⁾ ($\mu\text{g/g}$)
Turmeric	57.70 $\pm$ 2.10	33.60 $\pm$ 2.98	48.85 $\pm$ 3.26
Curcumin	12.10 $\pm$ 8.90	192.50 $\pm$ 5.48	100.06 $\pm$ 7.63

¹⁾ Expressed as tannic acid

^{2,3)} Half-maximal inhibitory concentrations in the DPPH and ABTS radical scavenging assays

<실시예 2> 강황을 포함한 나노지질전달체의 제조

1. 강황을 포함한 오일상 제조

지질을 기반으로 한 나노전달체는 수용성이 낮은 화합물 및 불안정한 기능성 물질에 폭넓게 사용되는 나노운반체 시스템으로, 일반적으로 액상 및 고상 오일이 함유된 오일상과 유화제가 함유된 수상으로 구성된다(Solans, Izquierdo, Nolla, Azemar, & Garcia-Celma, 2005).

대부분의 연구에서 β -카로틴 또는 오메가-3 오일과 같은 친유성 및 미량성분의 캡슐화에 초점을 맞추고 있으나(Ezhilarasi, Karthik, Chhanwal, & Anandharamakrishnan, 2013), 일반적으로 식품은 다양한 특성의 물질로 구성된 복합물이며, 특히, 강황은 커큐미노이드뿐만 아니라 단백질, 탄수화물, 지방, 무기질, 비타민, 휘발성 화합물 및 수분을 포함하고 있으므로, 전체 강황 캡슐화를 위한 적절한 오일상의 선택이 필요하다.

따라서, 몇 종류의 오일에서 강황 분말의 용해도를 확인한 결과, 도 1과 같이 중간사슬지방산(MCT)에서 고함량의 커큐미노이드($59.6 \mu\text{g/mL}$)가 확인됨에 따라, 오일상으로 MCT를 사용하였으며, MCT 만을 사용하였을 때는 색소성분의 추출은 가능하지만 다른 성분의 침전이 확인되었다.

상기 문제점을 해결하기 위해, 액상 오일에 고상 지질인 글리세롤 모노스테아레이트(GMS)를 전체 오일상에 대하여 1 내지 10% (w/w)의 농도를 첨하였다.

그 결과, 도 2a와 같이 GMS 3 내지 5%의 농도에서는 거의 침전이 나타나지 않는 적색-오렌지 혼합물이 생성된 반면, 7%를 초과하는 농도에서는 고체화가 확인되었다.

이에 따라, 이후 실험에서 강황을 고체화 없이 적절히 분산시키기 위해 3% 농도의 GMS가 사용되었으며, TEM 분석결과 도 2b와 같이 3% GMS (w/w)를 사용한 시료에서 둥근 물방울 형태가 확인되었다.

GMS는 모노-, 디-, 및 트리글리세리드를 함유하고 있어(Sharma, Shah, Pandya, K Parikh, Bharatiya, N Suhagia, et al., 2015), 오일 내 성분들을 용해시킬 수 있으므로, 오일에 첨가될 경우, GMS가 유화 특성을 나타내기 때문에 강황 화합물의 용해도 및 분산성을 개선시킬 수 있다.

2. 강황 함유 나노지질전달체의 제조 조건 최적화

강황 함유 나노지질전달체(TM-NLCs)를 제조하기 위해, 상기 실시예 2에서 언급된 오일상에 1 내지 20% (w / w) 농도의 친수성 유화제인 트윈 80(Tween 80)을 함유한 수상을 혼합하여 나노지질전달체를 제조하고, 초음파 처리(US) 및 트윈 80 함량에 따른 크기, 분포 및 제타 전위를 측정하여 나노지질전달체의 제조 조건을 최적화 하였다.

그 결과, 도 3a와 같이 트윈 80의 농도가 7.5%까지 증가할수록 입자 직경이 감소하였으며, 이후 농도 증가에서는 직경이 약간 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

한편, 도 3b 및 3c를 참고하면 농도가 15%인 트윈 80의 경우 작은 직경(282 nm)과 가장 균일한 입자 크기 분포 및 제형들 중 가장 큰 제타 전위(-22.75 mV)를 나타내는 것으로 확인됨에 따라, 15% 트윈 80을 제형으로 사용하였다.

트윈 80은 비이온성 계면활성제임에도 불구하고, 나노지질전달체가 모든 경우에서 음성 제타 전위를 나타내는 것은 OH-와 같은 음전하를 띠는 물질이 나노지질전달체 표면에 흡착되어 있기 때문이며(Mun, Decker, & McClements, 2007), 15% 트윈 80을 함유한 나노지질전달체의 제타 전위(-22.75 mV)는 안정화된 시스템으로 충분

히 고려되어 질 수 있다.

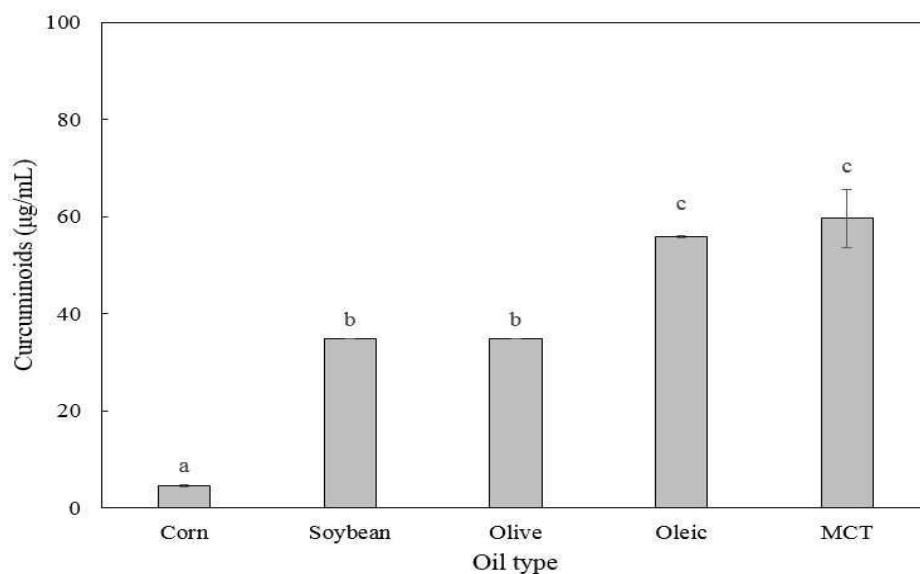
- [0115] 한편, 최적의 초음파 처리시간을 확인한 결과, 도 4a와 같이 1분간 초음파(US) 처리된 경우, 입자의 크기가 1553.6nm에서 414.3nm로 현저하게 감소하였으며, 처리 시간이 증가할수록 입자의 크기가 약하게 감소하였으나, 5분 후에는 입자 크기(282 nm)의 변화가 나타나지 않았다. 또한, PDI는 초음파 처리시간과 함께 감소하여 0.28 미만으로 유지되어 균일한 에멀전이 생성된 것으로 확인되었다.
- [0116] 상기 결과로부터 나노지질전달체 제조에 있어, 최적의 초음파 처리시간은 5분인 것으로 확인되었다.
- [0117] 또한, 다양한 농도의 트윈 80이 함유된 나노지질전달체 시료들을 4℃에서 24시간 동안 저장하고 시각적으로 안정성을 확인하였다.
- [0118] 그 결과, 도 4b와 같이 1, 2.5, 5, 7.5, 10 및 20% 트윈 80이 함유된 시료에서 크림 형성 및 명확한 상 분리가 확인되었다. 반면, 15% 트윈 80을 함유한 시료는 약한 노란색과 광학적으로 불투명하고 균일한 외관을 나타내어 앞서 확인된 입자 크기 및 제타 전위 측정 결과와 일치하는 안정성을 나타내었다.
- [0119] 상기 결과로부터 적절한 유화제의 사용이 필요한 것이 확인되었으며, 유화제가 부족하거나 과량으로 사용될 경우, 불안정한 나노지질전달체가 제조될 수 있다.
- [0120] 앞서 확인된 바와 같이, 15% 트윈 80이 포함된 시료를 5분간 초음파 처리하여 얻은 나노지질전달체의 현미경 분석 결과, 도 5a와 같이 나노입자는 응집 없이 둥근 모양의 균일한 크기를 나타내는 것을 확인할 수 있었다.
- [0122] **<실시예 3> 캡슐화 효율성 확인**
- [0123] 제조된 강황 나노지질전달체의 캡슐화 효율성을 확인한 결과, 도 5b와 같이 트윈 80 함량이 증가할수록 효율성이 증가하는 경향이 나타났으며, 15% 농도의 트윈 80 제형의 캡슐화 효율성은 93.3%로 확인되었다.
- [0124] 상기 결과로부터 상기 제형은 강황 캡슐화에 효과적임이 확인되었다.
- [0125] 트윈 80 첨가뿐만 아니라 사용된 지질의 조합은 강황의 다양한 분획들을 작은 방울 내로 혼입시키는 것을 가능하게 하며, 적절한 농도의 MCT와 GMS의 사용은 강황 분말을 적절하게 포집하고, 친유성 커큐미노이드의 높은 캡슐화 효율에 기여했을 가능성이 높다.
- [0127] **<실시예 4> 생체의(In vitro)에서 강황 함유 나노지질전달체로부터 방출된 커큐미노이드 확인**
- [0128] 캡슐화 시스템의 목적은 위장관 시스템을 지나가는 동안 생리활성 화합물을 보호하고 소장에서 생리활성 화합물을 용해 및 방출시켜 흡수되도록 하는 것이다.
- [0129] 따라서, SGM (pH 2.0) 및 SIM (pH 7.0) 조건에서 상기 실시예에서 제조된 강황 나노지질전달체에서 커큐미노이드의 방출 프로파일을 확인하였다.
- [0130] 그 결과, 도 6과 같이 인큐베이션 10시간 후 SGM에서 강황 나노지질전달체에 캡슐화된 커큐미노이드가 1.8% 방출되었으며, SIM에서 95% 방출된 것으로 나타났다.
- [0131] 상기 결과에서 강황 나노지질전달체는 산성의 위 조건에서는 안정한 반면 장액에서 캡슐화된 강황의 방출이 가능하였으며, 특히 인큐베이션 4시간 후 커큐미노이드 방출이 탁월하게 증가하는 것을 확인할 수 있었다.
- [0132] 상기 강황 나노지질전달체에 의해 방출된 커큐미노이드 양은 보고된 다른 지직기반 나노전달체와 비교하여 소장 내에서 효과적으로 용해되어 커큐미노이드 방출이 가능한 것으로 확인되었다(Aditya, Shim, Lee, Lee, Im, & Ko, 2013).
- [0133] 또한, 커큐민이 알칼리 조건에서 불안정한 것으로 보고되어 짐에 따라(Aditya, Aditya, Yang, Kim, Park, & Ko, 2015; Wahlang, Pawar, & Bansal, 2011), SIM에서 점진적이고 지속적인 커큐미노이드의 방출은 장 내 커큐미노이드의 분해로부터 보호하여 생물학적 이용 가능성을 증가시킬 수 있다.
- [0134] 소화기간 동안 강황 나노지질전달체의 입자 크기 및 형태 변화를 확인하여 생체의 소화기간 동안의 안정성을 확인하였다.
- [0135] 그 결과, 도 7a와 같이 소화기간 동안 강황 나노지질전달체의 입자 크기의 변화는 나타나지 않았으며, 217nm의 평균 직경이 확인되었다.
- [0136] 상기 결과로부터 강황 나노지질전달체의 안정성이 확인되었으며, 이는 산성 pH에서 침전 및 응집 저항성을 나타

내는 트윈 80에 의한 입체적 안정성 때문인 것으로 제안될 수 있다.

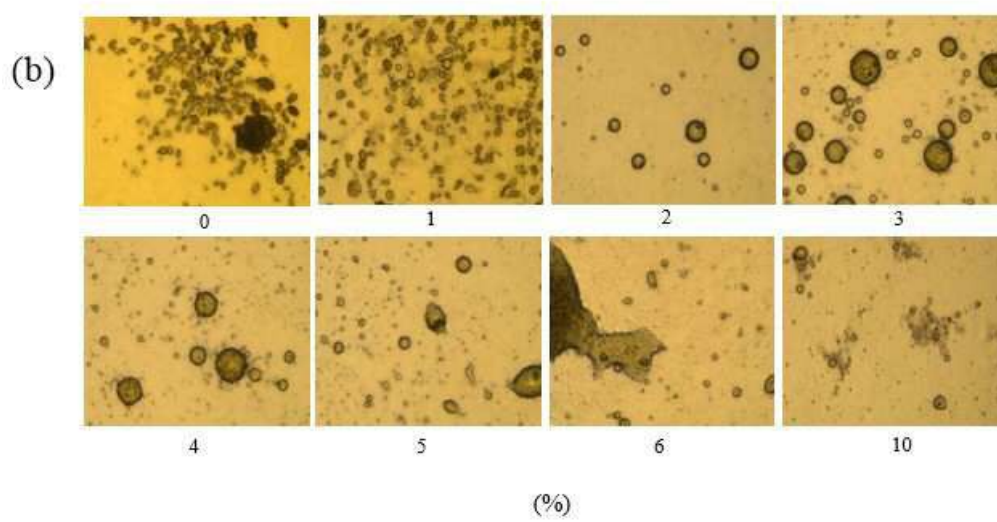
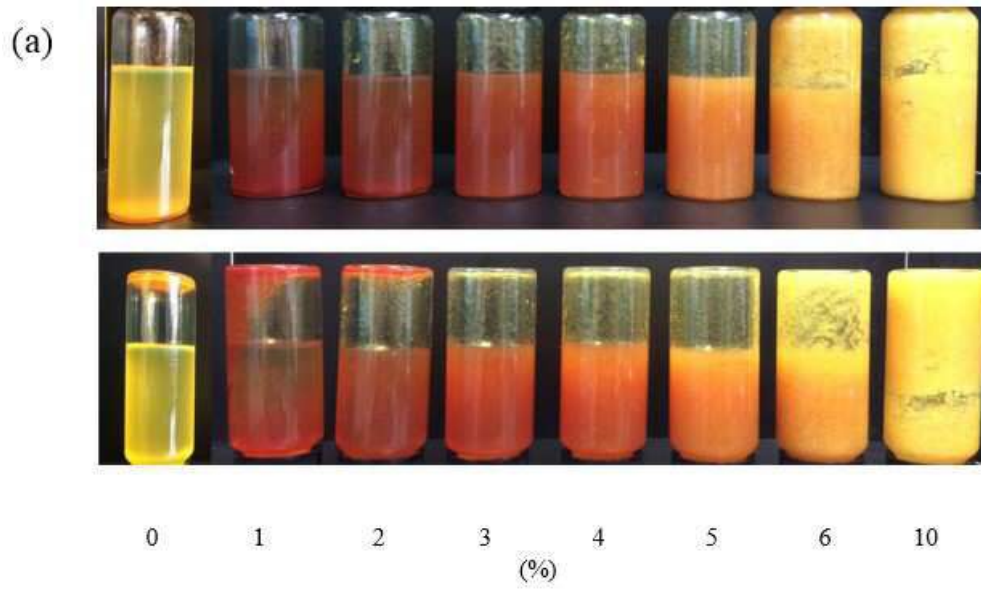
- [0137] 그럼에도 불구하고, 도 7b와 같이 특히, SIM에서 인큐베이션 후 상당한 형태 변화가 확인되었다. 인큐베이션 전 TM-NLCs는 부드러운 둥근 모양이었으나, SGM 노출에 의해 불규칙적인 표면이 확인되었으며, SIM에서 소화 후 혼합된 미셀이 형성되고, 커큐미노이드가 용해됨에 따라, SIM에서 커큐미노이드의 조절방출이 가능해졌다.
- [0138] 소화 후 강황 나노지질전달체의 TEM 이미지는 SIM에서 확인된 생리활성 화합물의 방출과 관련 있다.
- [0140] <실시예 5> 생체 접근율(Bioaccessibility) 확인
- [0141] 캡슐화된 강황의 생체 외 접근율은 커큐미노이드를 전달하기 위한 수단으로 개발된 시스템의 효율성을 확인하여 평가하였다.
- [0142] 커큐민은 친유성으로 낮은 용해도, 광범위한 대사작용 및 나쁜 장 투과도를 나타내기 때문에 낮은 생체접근성이 나타나며(Wahlang, Pawar, & Bansal, 2011), 이러한 문제점을 해결하여 체내 흡수를 증가시키기 위해서는 커큐민 및 다른 강황 화합물을 용해시킬 수 있는 전달 시스템이 필요하다.
- [0143] 전달시스템에 사용되는 지질 상은 커큐미노이드를 수용하고, 장내에서 분해되어 흡수되도록하는 목적이 중요하다.
- [0144] 앞서 제작된 강황 나노지질전달체의 생체접근성을 커큐민 및 강황과 비교하여 확인한 결과, 도 8과 같이 커큐민 및 강황의 생체접근율은 각각 1.7% 및 17%로 확인된 반면, 강황 나노지질전달체는 75%의 생체접근율을 나타내었다.
- [0145] 상기 결과로부터 에멀전 내 캡슐화된 커큐민은 용액 내 커큐민보다 생체접근율을 현저하게 증가시키는 것이 확인되었다.
- [0146] 이러한 생체접근성의 증가는 SIM에서 소화 후 혼합된 미셀의 형성뿐만 아니라, 위를 통과하는 동안의 트윈 80의 보호 작용으로 설명될 수 있으며, 강황 캡슐화를 위한 전달 시스템으로써의 유용성이 입증되었다.
- [0148] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

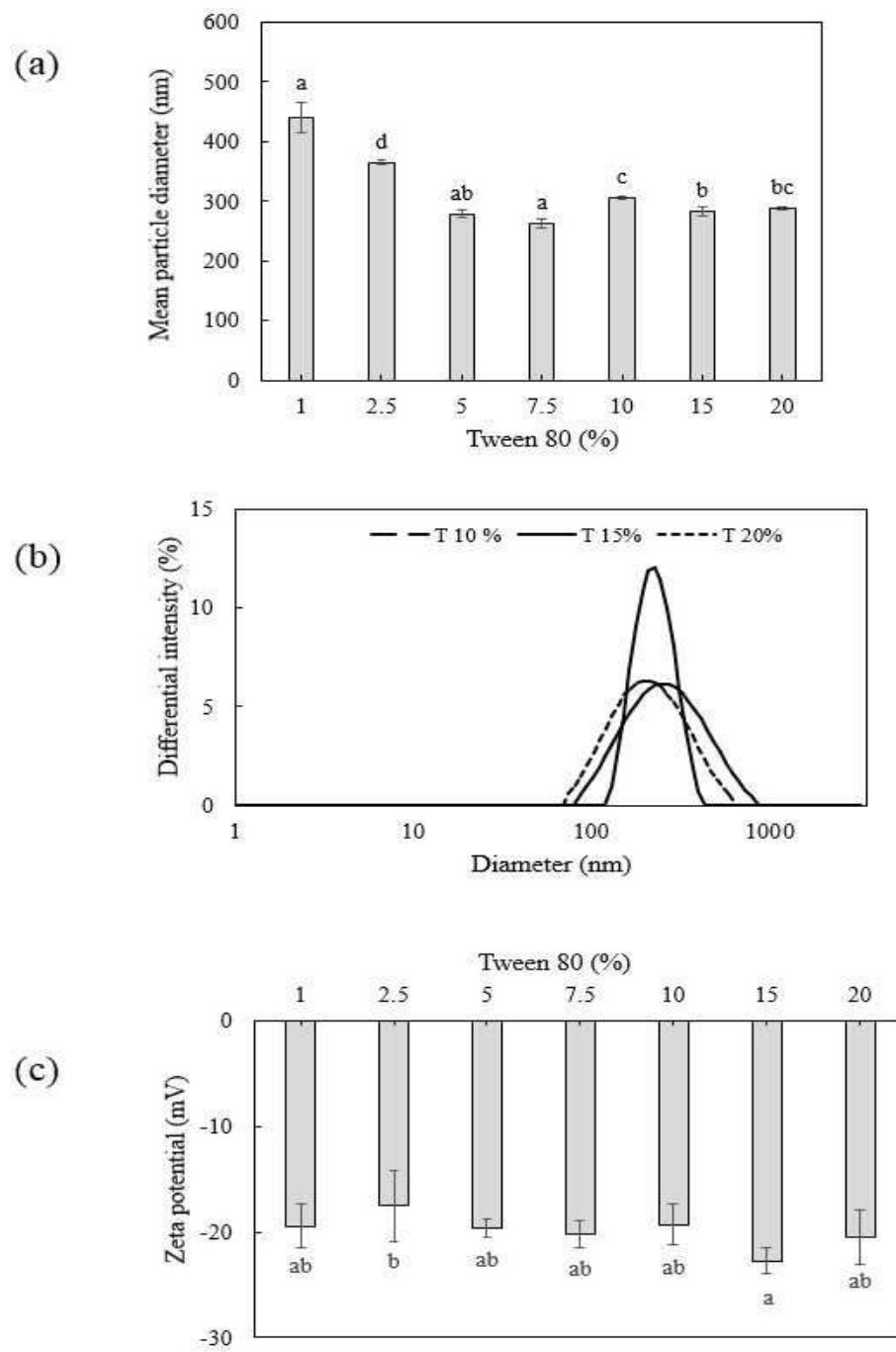
도면1



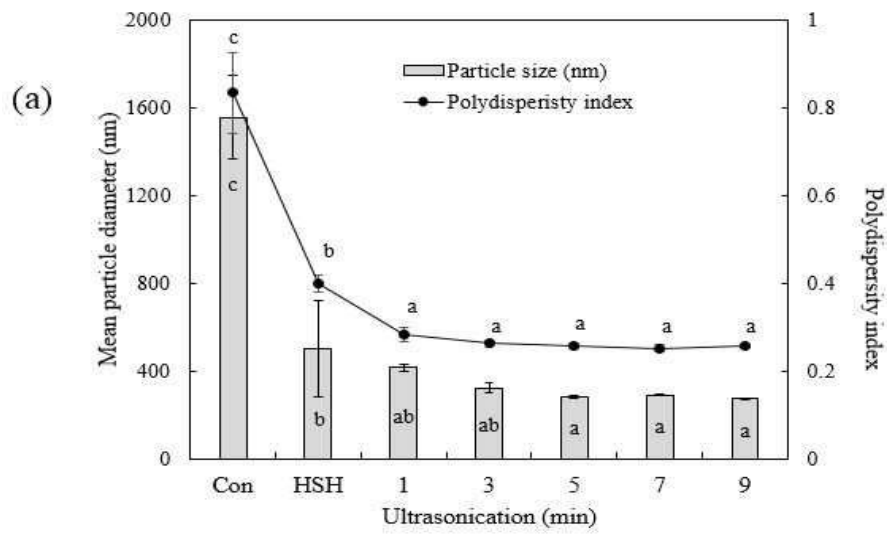
도면2



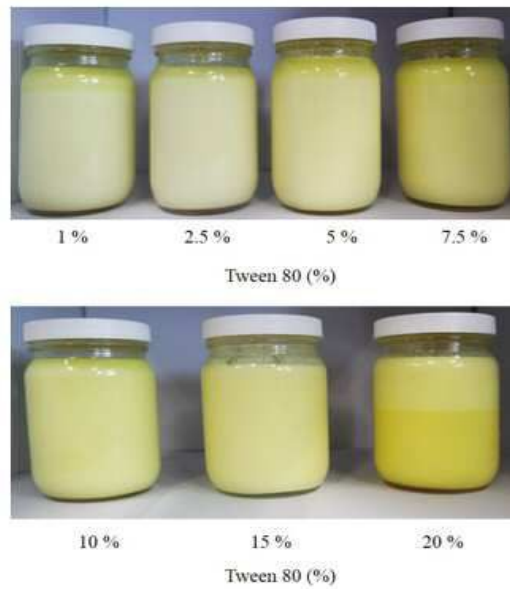
도면3



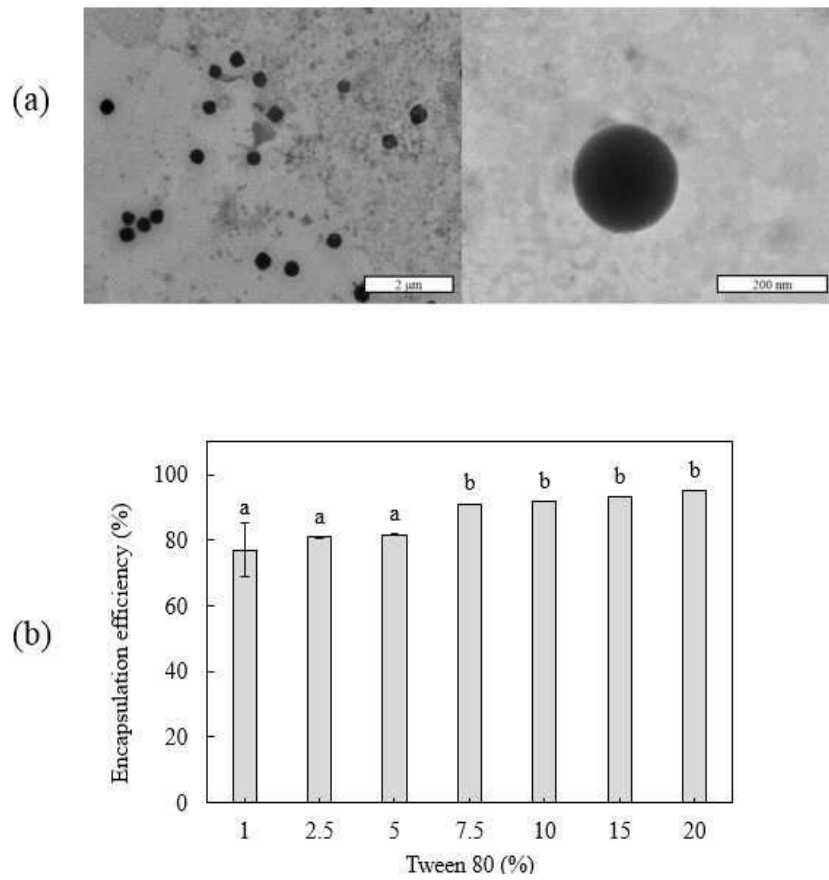
도면4



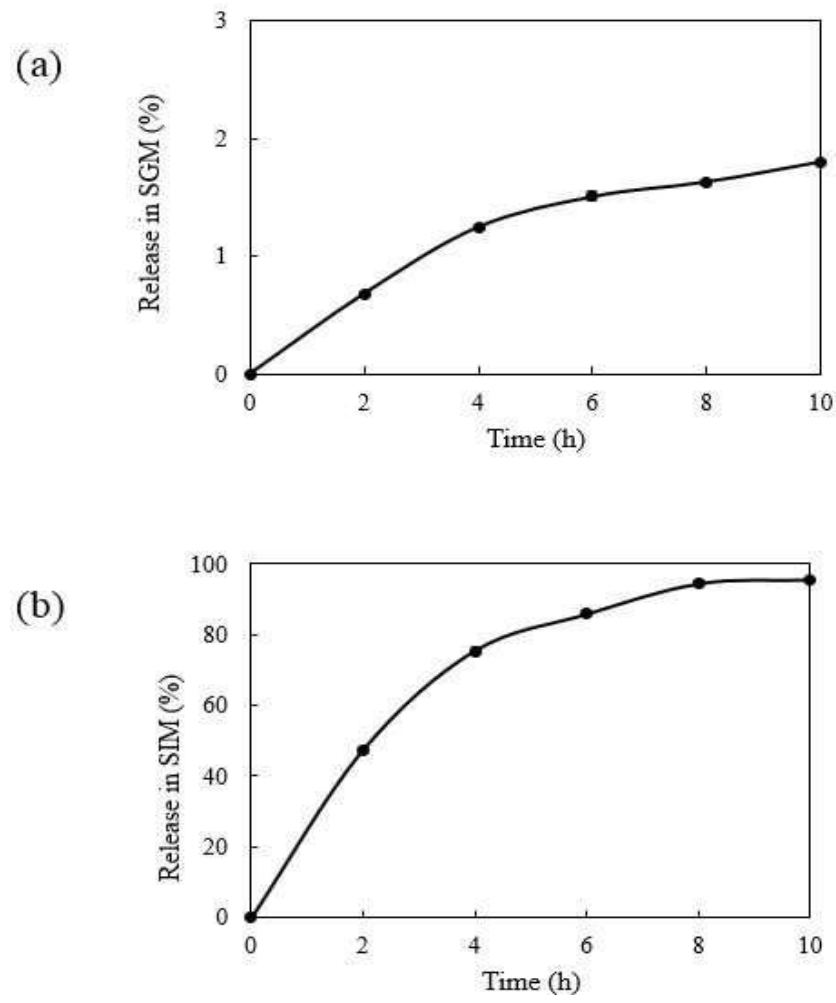
(b)



도면5

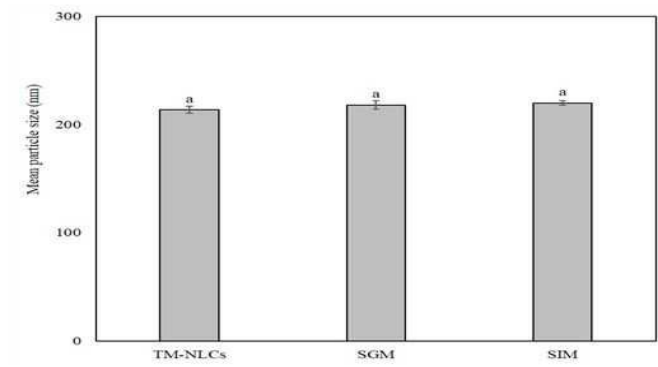


도면6

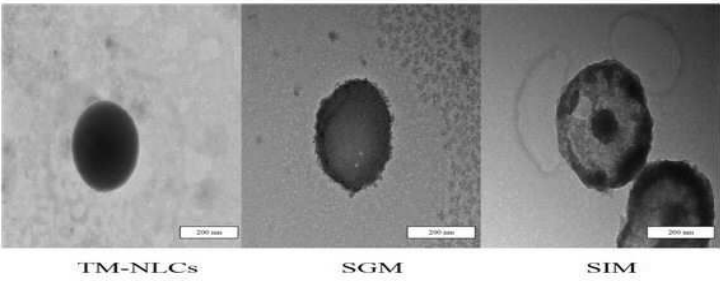


도면7

(a)



(b)



도면8

