

멀티 유화 기술 이용 수분산성의 항산화 효능을 함유한 커큐민의 개발

†이 경 행 · 이 은 현*

한국교통대학교 식품영양학 전공 교수, *미소성 대표

Development of Curcumin with Anti-Oxidation Effect of Water Dispersibility using Multi-Emulsification Technology

†Kyung-Haeng Lee and Eun-Hyun Lee*

Professor, Major in Food and Nutrition, Korea National University of Transportation, Jeungpyeong 27909, Korea

*President, Misosung Co., Cheongju 28171, Korea

Abstract

Curcumin is not soluble in water. Therefore, curcumin emulsion that can dissolve well in water were prepared using multi-emulsification technology, and the antioxidant activities and physical properties of emulsion were measured. Although curcumin was not dissolved in water, it was confirmed to be well dispersed in water when prepared in an aqueous dispersion curcumin emulsion. After dissolving curcumin using water and ethanol as solvents, respectively, the DPPH and ABTS radical scavenging abilities of the filtrate and the curcumin emulsion were measured. Because it was not dissolved in water, activities were not shown. However, when curcumin was dissolved in ethanol, the activities increased as the concentration of curcumin increased. On the other hand, when the curcumin emulsion was dissolved in water, it was found to have abilities. The curcumin emulsion was nano-homogenized and the size and distribution of the emulsified spheres were measured. It was confirmed to be nano-sized as it appeared as 9.083 nm/100%. In the results of the DPPH radical and ABTS radical scavenging abilities of curcumin nano-emulsion, it was confirmed that there was no change in the antioxidant abilities. In conclusion, water-dispersible curcumin prepared using multi-emulsification technology, and it was confirmed to exhibit antioxidant activity and emulsion stability.

Key words: curcumin, solubility, emulsion, antioxidant activity

서 론

강황(*Curcuma longa*)은 생강과에 속하는 식물로 인도를 중심으로 하여 중국, 동남아시아 등에서 많이 재배되고 있으며 향신료로서 또는 식품첨가제뿐만 아니라, 간기능 개선(Shu 등 2009; Tang & Chen 2010), 갑상선 기능회복(Srinivasan 등 2004), 항종양(Huang 등 1988; Huang 등 1997), 항산화(Ak & Gülçin 2008), 항염증(Lubbad 등 2009) 효과를 비롯하여 제 2형 당뇨병 완화(Kowluru & Kanwar 2007), 체중 축적 저해(Ejaz 등 2009), β -amyloid 제거(Ringman 등 2005) 및 관절 통증 완화(Shakibaei 등 2007) 등에 탁월한 효과가 있어 “황금가루”라 불리는 건강 기능 소재이다(Goel 등 2008). 강황의 주 성분인

curcuminoid는 curcumin(약 77%)과 그의 유도체인 demethoxy-curcumin(약 18%), bisdemethoxycurcumin(약 5%)으로 구성되어 있는 polyphenol 화합물이며, 그중 그 함량이 가장 많은 커큐민(curcumin)이 가장 생리적 기능성이 우수한 것으로 알려져 있다(Basnet & Skalko-Basnet 2011).

그러나 커큐민은 생리적 기능성이 우수함에도 불구하고 물에 잘 녹지 않는다는 특성으로 인하여 생체 내 투여 효과가 떨어지며 이에 따라 식품 및 제약으로의 개발이 쉽지 않은 단점을 가지고 있다(Cho KS 2017). 이러한 문제점들을 해결하기 위하여 ethanol 등의 용매에 용해시키거나 식용유지에 용해하여 사용하고자 하였으나, 용매의 사용(Cho KS 2017) 및 수분을 매개로 한 대부분의 식품에 사용이 매우 제

† Corresponding author: Kyung-Haeng Lee, Professor, Major in Food and Nutrition, Korea National University of Transportation, Jeungpyeong 27909, Korea. Tel: +82-43-820-5334, Fax: +82-43-820-5850, E-mail: leekh@ut.ac.kr

한적이라는 문제점을 지니고 있다. 또한 커큐민의 당화 기술을 이용한 수용화 방법도 연구되었는데(Kaminaga 등 2004) 커큐민의 안정한 구조로 인해 반응성이 떨어져 수득율이 낮고 고가의 반응으로 경제성이 낮은 단점을 가지고 있다(Chok KS 2017).

한편, 멀티유화기술은 물에 잘 섞이지 않는 물질 즉 난용성 물질, 계면활성제 및 공계면활성제의 균질한 혼합물로 가벼운 교반으로도 유화물의 형성이 가능한 formulation이다(Bang & Kim 2019). 특히, 나노화시킨 유화물(nano-emulsion)은 일반적으로 200 nm 이하, 바람직하게는 100 nm 이하의 입자크기를 가지는 투명한 에멀전의 제형을 말하는 용어로(Tian 등 2016), 멀티 나노유화의 경우 위와 같은 특성을 이용하여 난용성 시료에 대한 제형연구 등 다양한 활용이 가능하다. 따라서 생리적 기능성을 갖지만 난용성인 커큐민에 대한 멀티유화 및 나노화를 적용시킬 가능성이 고려될 수 있다.

따라서 본 연구에서는 천연물 유래 항산화 물질인 난용성의 커큐민을 멀티유화기술을 이용하여 수분산성을 함유한 커큐민을 제조하고 이들 물질의 항산화 활성과 물리적 특성을 측정하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 수분산성 유화물의 제조

난용성인 커큐민을 수분산성 유화물을 제조하기 위하여 Fig. 1과 같은 공정을 통하여 유화물을 제조하였다. 즉 우선 보조 항산화 역할을 위해 65°C에서 lecithin(20%)과 tocopherol(45%)을 혼합하여 1차 유화를 실시하고 정제유(35%)에 1차 유화액을 혼합하면서 2차 유화를 시켰다. 다음으로 멀티 유화

공정으로 polysorbate(68%)와 물(10%), propylene glycol(18%)을 혼합하여 75°C까지 승온시켰으며 여기에 커큐민(2%)을 서서히 첨가하며 유화를 진행하였다. 커큐민 유화물에 1차 유화물을 첨가하면서 2차 유화를 진행하여 수분산성 커큐민 유화물을 제조하였다. 본 실험에 사용한 커큐민은 Huachengbio사(Hunan, China)의 85% 제품을 사용하였고 lecithin은 SOLAE LLC사(Missouri, USA)의 제품을 사용하였으며, tocopherol은 BASF SE(Berlin, Germany)의 DL- α -tocopherol 96% 제품을 사용하였다. 정제유는 Jarrow Formulas사(CA, USA)의 MCT를 사용하였고, polysorbate는 Lamberti사(Gallarate, Italy)의 Sorbilenne 제품을 사용하였으며, propylene glycol은 Shell Chemical SERAYA PTE Ltd사(Pulau Bukom, Singapore)의 제품을 사용하여 연구를 진행하였다.

2. 커큐민의 수용성 검토

커큐민 및 수분산시킨 커큐민 유화물에 대하여 용해성을 측정하고자 2% 용액이 되도록 물을 첨가하고 magnetic stir를 이용하여 용해시키고 여과지(Whatman No. 2)로 여과하여 색상을 육안으로 확인하였다.

3. 항산화 활성 측정

커큐민을 물과 ethanol을 용매로 하여 0.5, 1.0, 5.0 및 10.0 mg%의 농도가 되도록 용해시킨 후 여과한 여과액과 수분산시킨 커큐민 유화물을 물과 ethanol을 용매로 하여 용해시킨 후 이들 물질들의 항산화 활성을 측정하였다. 항산화 활성 측정은 DPPH radical 소거능법과 ABTS radical 소거능법으로 측정하였다.

DPPH radical 소거능은 Blois MS(1958)의 방법을 이용하여

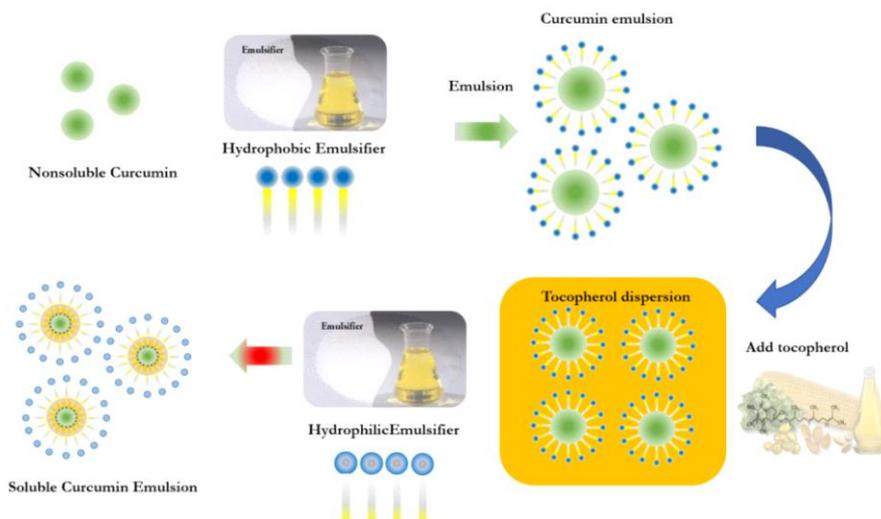


Fig. 1. Method for preparing water-soluble curcumin emulsion.

각각의 농도로 조제한 시료용액 2 mL에 0.2 mM DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, Sigma Chemical Co.) 2 mL를 혼합하여 실온에서 30분 방치시킨 후 원심분리하고 여과한 후 여액을 517 nm에서 흡광도를 측정하고, 다음 식에 의하여 산출하였다.

Electron Donating Ability (EDA, %) =

$$\left(1 - \frac{\text{시료 첨가구의 흡광도}}{\text{무첨가구의 흡광도}}\right) \times 100$$

ABTS radical 소거능 측정은 Re 등(1999)의 방법에 따라 즉 ABTS 시약(2, 2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolone-6-sulfonic acid)) 7.4 mM와 potassium persulfate 2.6 mM를 제조한 후 하루 동안 암소에 방치한 시약을 UV-Vis spectrophotometer에서 흡광도 값이 1.5 이하가 되도록 증류수로 희석 후 희석된 ABTS 시약 1 mL에 각각의 농도로 조제한 시료용액 0.05 mL 첨가하고 상온에서 90분 반응 시킨 후 734 nm에서 흡광도를 측정하였다.

ABTS scavenging ability (%) =

$$\left(1 - \frac{\text{시료 첨가구의 흡광도}}{\text{무첨가구의 흡광도}}\right) \times 100$$

4. 기능성 유화물의 나노화 연구

커큐민의 수분산성 유화물을 나노화시키기 위하여 우선 수분산성 커큐민 유화물을 microfluidizer(Emax Tech Co., Uiwang, Korea)를 이용하여 나노화시켰다. 이때 1,000 bar의 균질압력으로 하여 세차레 microfluidizer에서 순환 처리하였다. 이와 같은 방법으로 나노화 시킨 후 Zetasizer Nono 입도 분석기(Malvern Panalytical, Worcestershire, UK)를 활용하여 유화구 크기 분석을 진행하였다.

5. 나노유화물의 향산화활성 시험

나노화 시킨 유화물에 대한 향산화 활성은 위와 동일한 DPPH radical 소거능법과 ABTS radical 소거능법으로 측정하였다.

6. 유화물의 유화 안정성 시험

커큐민 유화물과 나노 유화물의 유화 안정성에 대하여 Turbiscan(Leanontech, Hanam, Korea)을 활용하여 측정하였다. Turbiscan은 multiple light scattering을 이용한 광학적인 측정 장비이며 분산 안정성을 측정할 수 있는 장비로 안정성지수 (Turbiscan Stability Index)는 14 이하에서 유화물의 안정성이 유지되는 것으로 평가되고 있다. 실험 조건은 커큐민 유화물 및 나노유화물을 2% 수용액으로 제조한 후, 4일간 가혹 조건인 40°C에서 보관하면서 1시간 간격으로 측정하였다.

7. 통계처리

연구 결과 중 향산화 활성 실험의 경우, 3회 반복 측정된 후 SPSS 24.0(IBM Corporation, Armonk, NY, USA)을 이용하여 평균 및 표준편차로 나타내었으며, 그룹 간의 유의성은 ANOVA test로 검증하였으며, 유의성이 나타난 경우 사후 검정 방법으로는 Duncan's multiple range test를 사용하였다. 본 연구에서는 $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

1. 커큐민의 수용성 검토

커큐민 및 수분산시킨 커큐민 유화물에 대하여 용해성을 육안으로 확인한 결과는 Fig. 2와 같다. 커큐민 자체인 원물의 경우, 물에 첨가하여 용해시키고자 하였으나 Fig. 2에서와 같이 전혀 용해되지 않고 여과시 모두 통과되지 못하였으나 수분산 커큐민 유화물의 형태로 제조한 경우, 물에 잘 분산되었으며 여과시켰을 때 모두 통과함을 알 수 있었다.

Cho KS(2017)는 커큐민을 물에 용해시켰을 때 용해도가

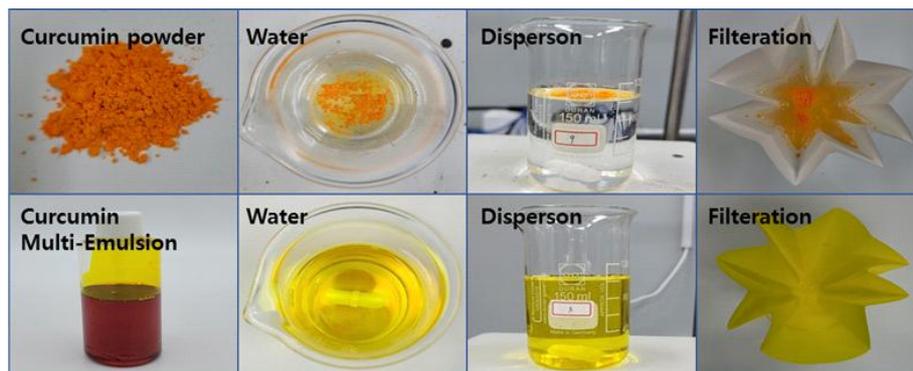


Fig. 2. Confirmation of solubility of curcumin.

0.0006 mg/mL로 물에 거의 용해되지 않는다고 하여 본 결과와 일치하였다.

2. 항산화 활성 측정

커큐민을 물과 ethanol을 용매로 하여 각각 용해시킨 후 여과한 여과액과 제조한 수분산 커큐민 유화물을 동일한 용매로 용해시킨 후 여과한 여과액의 DPPH radical 소거능을 측정된 결과는 Fig. 3과 같다.

Fig. 3A의 경우, 커큐민을 물에 용해시켰을 때 물에 전혀 용해가 되지 않았기 때문에 DPPH radical 소거능이 전혀 나타나지 않았다. 그러나 커큐민을 ethanol에 용해시켰을 때에는 0.5~10 mg%의 농도로 보면 각각 13.22, 23.66, 74.44 및 89.07%로 커큐민의 농도가 높을수록 활성이 증가하였으며 커큐민의 용해성이 중요함을 확인할 수 있었다.

한편, Fig. 3B의 경우, 수분산시킨 커큐민 유화물을 물에 용해시켰을 때 커큐민 원물(Fig. 3A)에서 전혀 나타나지 않았던 DPPH radical 소거능이 증가함을 알 수 있었으며 이때의 DPPH radical 소거능은 ethanol에 용해시킨 원물과 유화물과 유의적인 차이를 보이지 않는 것으로 나타나 물에 용해되지 않았던 커큐민을 수분산 유화물의 형태로 제조하였을 때 커큐민 자체가 가진 활성을 나타낼 수 있을 것으로 판단되었다.

Ak와 Gülçin(2008)은 커큐민의 DPPH radical 소거능을 측정된 결과, 물에 용해가 되지 않기 때문에 ethanol에 용해하여 측정하였으며 DPPH radical 소거능을 가지고 있다고 하여 본 결과와 일치하는 것으로 나타났다.

커큐민을 물과 ethanol을 용매로 하여 각각 용해시킨 후 여과한 여과액과 제조한 커큐민 유화물이 ABTS radical 소거능에서도 효과가 있는지를 측정된 결과는 Fig. 4와 같다.

물에 용해시킨 커큐민의 ABTS radical 소거능이 전혀 발현되지 않았지만, ethanol에 용해시켰을 때에는 커큐민의 농도가 증가할수록 소거능이 증가하여 물에 커큐민이 용해되지 않음을 확인할 수 있었다(Fig. 4A). 커큐민을 수분산시킨 유화물에서는 에탄올에서 커큐민이 보유하고 있던 항산화력이 수용액상에서 발현되었고 농도별로 소거능이 증가하는 것을 확인할 수 있었으며(Fig. 4B) DPPH radical 소거능의 결과와도 일치하는 것으로 판단되었다.

Joung & Han(2018)은 불용성이면서 체내 흡수율이 낮은 커큐민을 가용화시키기 위하여 히드록시프로필메틸셀룰로스(HPMC)를 이용하여 분산성을 개선하고 ABTS radical 소거능을 측정된 결과, 커큐민 함량이 높아짐에 따라 항산화 활성이 높아진다고 하여 실험에 사용한 분산매의 차이는 있으나 커큐민이 갖는 항산화 활성을 나타내는 결과는 일치하는 것으로 커큐민을 분산시킬 수 있는 기술이 접목되어야 할 것으로 판단되었다.

3. 커큐민 유화물의 나노화 및 항산화 활성 측정

커큐민의 수용성 유화물을 이용하여 나노 균질화시키고 Zetasizer Nono 입도 분석기로 유화구의 크기 및 분포도를 측정된 결과, Fig. 5와 같이 커큐민 수용성 유화물의 유화구(a)는 90.8%가 8.935 nm의 크기였으며, 9.2%가 2.662 μ m의 크기였던 것이 microfluidizer를 이용하여 나노화를 진행한 결과(b) 100% 모두 9.083 nm 크기 이내로 나타나 나노화가 되었음을 확인하였다.

제조한 커큐민 나노 유화물도 항산화 활성을 가지고 있는지를 확인하기 위하여 DPPH radical 및 ABTS radical 소거능을 측정된 결과(Fig. 6), DPPH radical 소거능에서는 물에 용

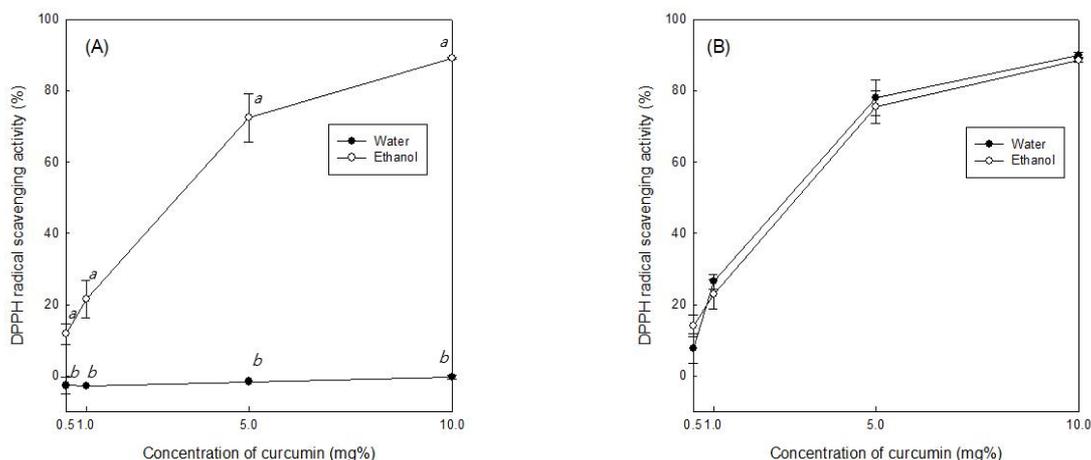


Fig. 3. DPPH radical scavenging activity of curcumin filtrate (A) and curcumin emulsion (B) filtered after dissolving curcumin using water and ethanol as solvents, respectively.

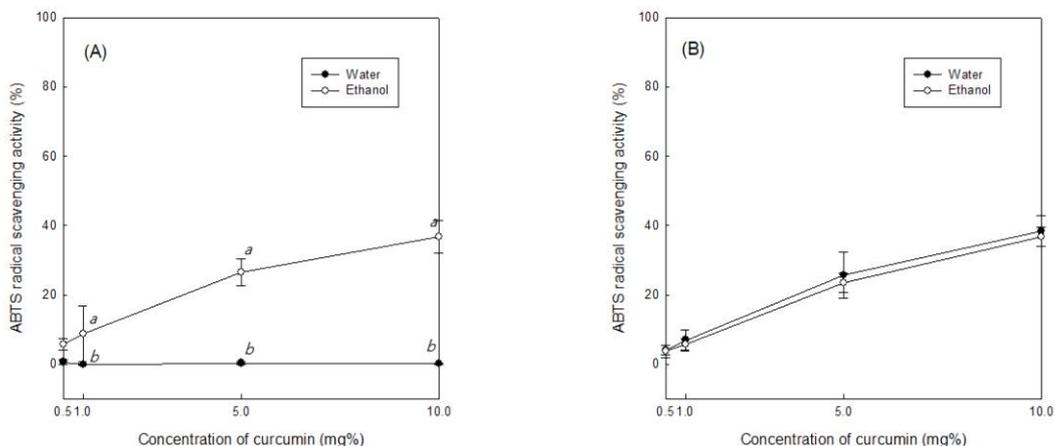


Fig. 4. ABTS radical scavenging activity of curcumin filtrate (A) and curcumin emulsion (B) filtered after dissolving curcumin using water and ethanol as solvents, respectively.

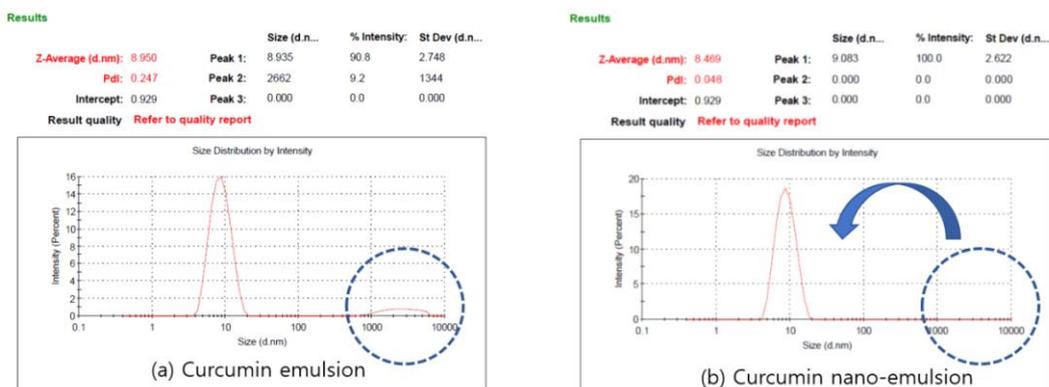


Fig. 5. Emulsion sphere size distribution of curcumin emulsion and nano-emulsion.

해시킨 커큐민 나노 유화물에서가 항산화 활성이 오히려 더 높게 나타났으며 1 및 5 mg% 일때에는 유의적인 차이를 보였다. ABTS radical 소거능에서도 DPPH radical 소거능과 유사하게 커큐민의 농도가 높을수록 활성이 높았으며 ethanol에 용해시켰을 때보다는 물에 용해시켰을때가 농도에 상관없이 높은 활성을 보이기는 하였지만 유의적인 차이를 보이지는 않는 것으로 나타났다. 이 두가지의 항산화 활성실험을 통하여 나노화 공정 이후에도 커큐민 유화물이 갖는 항산화력은 변화되지 않는 것으로 판단되었다.

4. 유화물의 유화 안정성 시험

커큐민 유화물과 나노유화물의 유화 안정성을 측정한 결과는 Fig. 7과 같았으며 안정성 지수(TSI, turbiscan stability index)를 측정한 결과 각각 1.4 및 0.7로 매우 낮은 값을 유지하여 유화 안정성을 갖는 것으로 나타났다.

그러나 Fig. 7에서 보는 것처럼 커큐민 유화물의 trans-

mission 자료를 분석한 결과, Middle T(%)가 시간이 지남에 따라 약간 증가함을 확인하였으며, 이러한 현상을 근거로 판단해 보면 수분산 상태에서 미세한 응집이 발생한 것으로 판단되었다. 그러나 커큐민 나노 유화물의 transmission 자료를 분석한 결과, Middle T(%)가 시간이 지남에 따라 변화가 없음을 확인하였으며, 이러한 현상을 근거로 판단해 보면 안정한 수분산 상태임을 확인할 수 있었다.

요약 및 결론

난용성의 커큐민을 멀티유화기술을 이용하여 수분산성을 함유한 커큐민을 제조하고 이들 물질의 항산화 활성과 물리적 특성을 측정하였다. 커큐민 원물의 경우, 물에 전혀 용해되지 않았지만 수분산 커큐민 유화물의 형태로 제조한 경우, 물에 잘 분산됨을 확인할 수 있었다. 커큐민을 물과 ethanol을 용매로 하여 각각 용해시킨 후 여과한 여과액과 제조한

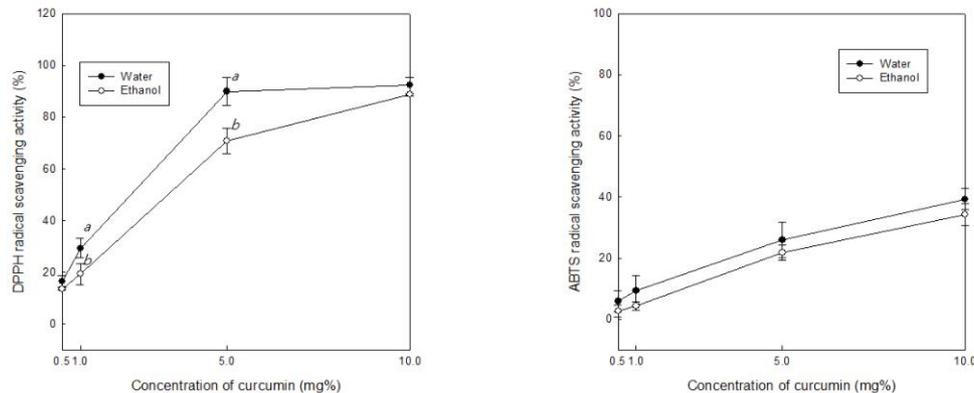


Fig. 6. DPPH radical scavenging and ABTS radical scavenging activities of curcumin nano-emulsion in water and ethanol.

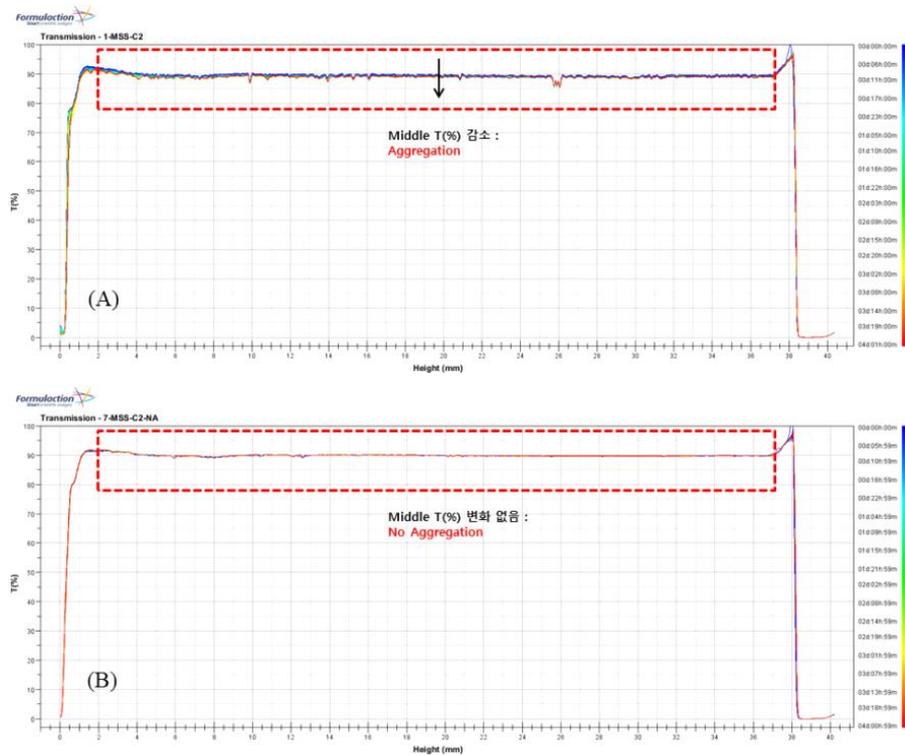


Fig. 7. Emulsion stability of curcumin emulsion(A) and nano-emulsion(B).

수분산 커큐민 유화물의 DPPH radical 소거능과 ABTS radical 소거능을 측정된 결과, 커큐민을 물에 용해시켰을 때 물에 전혀 용해가 되지 않았기 때문에 radical 소거능이 전혀 나타나지 않았으나 커큐민을 ethanol에 용해시켰을 때에는 커큐민의 농도가 높을수록 활성이 증가하였다. 한편, 수분산 시킨 커큐민 유화물을 물에 용해시켰을 때 커큐민 원물에서 전혀 나타나지 않았던 radical 소거능이 증가함을 알 수 있었으며 이때의 radical 소거능은 ethanol에 용해시킨 원물과 유화물과 유의적인 차이를 보이지 않는 것으로 나타났다. 커큐

민의 수용성 유화물을 이용하여 나노 균질화시키고 유화구의 크기 및 분포도를 측정된 결과, 9.083 nm/100%로 나타나 나노화가 되었음을 확인하였다. 커큐민 나노 유화물의 DPPH radical 및 ABTS radical 소거능의 결과에서도 나노화 공정 이후에도 항산화력의 변화는 발생하지 않았고 유화안정성을 지니고 있음을 확인하였다. 결론적으로 난용성의 커큐민을 멀티유화기술을 이용하여 수분산성을 함유한 커큐민을 제조하였으며 항산화 활성과 유화안정성을 나타냄을 확인할 수 있었다.

감사의 글

2020년도 교육부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 지자체-대학 협력기반 지역혁신 사업과 2021년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업입니다(No. 2021R1A6A1A03046418).

References

- Ak T, Gülçin İ. 2008. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. *Chem Biol Interact* 174:27-37
- Bang KH, Kim KS. 2019. Development of trans-cinnamaldehyde self-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS) with superior stability. *J Korea Academia-Ind Coop Soc* 20:555-562
- Basnet P, Skalko-Basnet N. 2011. Curcumin: An anti-inflammatory molecule from a curry spice on the path to cancer treatment. *Molecules* 16:4567-4598
- Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181:1199-1200
- Cho KS. 2017. Chemical synthesis of curcumin analog with enhanced water solubility and its biological activities. Ph.D. Thesis, Cha Univ. Pocheon. Korea
- Ejaz A, Wu D, Kwan P, Meydani M. 2009. Curcumin inhibits adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes and angiogenesis and obesity in C57/BL mice. *J Nutr* 139:919-925
- Goel A, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB. 2008. Curcumin as "Curecumin": From kitchen to clinic. *Biochem Pharmacol* 75:787-809
- Huang MT, Newmark HL, Frenkel K. 1997. Inhibitory effects of curcumin on tumorigenesis in mice. *J Cell Biochem* 67:26-34
- Huang MT, Smart RC, Wong CQ, Conney AH. 1988. Inhibitory effect of curcumin, chlorogenic acid, caffeic acid, and ferulic acid on tumor promotion in mouse skin by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Res* 48:5941-5946
- Joung H, Han YM. 2018. Preparation and characteristics of solid dispersion for water-insoluble ingredient. poster 15-074, *KoSFoST International Symposium and Annual Meeting Busan, Korea*
- Kaminaga Y, Sahin FP, Mizukami H. 2004. Molecular cloning and characterization of a glucosyltransferase catalyzing glucosylation of curcumin in cultured *Catharanthus roseus* cells. *FEBS Lett* 567:197-202
- Kowluru RA, Kanwar M. 2007. Effects of curcumin on retinal oxidative stress and inflammation in diabetes. *Nutr Metab* 4:8
- Lubbad A, Oriowo MA, Khan I. 2009. Curcumin attenuates inflammation through inhibition of TLR-4 receptor in experimental colitis. *Mol Cell Biochem* 322:127-135
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 26:1231-1237
- Ringman JM, Frautschy SA, Cole GM, Masterman DL, Cummings JL. 2005. A potential role of the curry spice curcumin in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 2:131-136
- Shakibaei M, John T, Schulze-Tanzil G, Lehmann I, Mobasher A. 2007. Suppression of NF- κ B activation by curcumin leads to inhibition of expression of cyclo-oxygenase-2 and matrix metalloproteinase-9 in human articular chondrocytes: Implications for the treatment of osteoarthritis. *Biochem Pharmacol* 73:1434-1445
- Shu JC, He YJ, Lv X, Ye GR, Wang LX. 2009. Curcumin prevents liver fibrosis by inducing apoptosis and suppressing activation of hepatic stellate cells. *J Nat Med* 63:415-420
- Srinivasan P, Libbus B, Sehgal AK. 2004. Mining MEDLINE: Postulating a beneficial role for *Curcumin longa* in retinal diseases. *Presented Papers, HLT-NAACL 2004 Workshop: Linking Biological Literature, Ontologies and Databases*. pp.33-40. Boston, Massachusetts
- Tang Y, Chen A. 2010. Curcumin protects hepatic stellate cells against leptin-induced activation *in vitro* by accumulating intracellular lipids. *Endocrinology* 151:4168-4177
- Tian WL, Lei LL, Zhang Q, Li Y. 2016. Physical stability and antimicrobial activity of encapsulated cinnamaldehyde by self-emulsifying nanoemulsion. *J Food Process Eng* 39:462-471

Received 05 October, 2021

Revised 21 October, 2021

Accepted 05 November, 2021