



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

碩士學位論文

# 커큐민 Nanostructured lipid carrier의 제조방법 및 안정성

濟州大學校 大學院

食品工學科

玄 지 은

2020年 2月

# 커큐민 Nanostructured lipid carrier 제조방법 및 안정성

指導教授 千智連

玄 지 은

이 論文을 工學 碩士學位 論文으로 提出함

2019年 12月

玄지은의 工學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 高 榮 煥

委 員 任 尙 彬

委 員 千 智 連



濟州大學校 大學院

2019年 12月

# Preparation and Stability of Curcumin Loaded Nanostructured Lipid Carrier

Ji Eun Hyun

(Supervised by Professor Ji-Yeon Chun)

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement for the degree of  
Master of Engineering

2019. 12.

This thesis has been examined and approved.

Young Hwan Ko, Thesis director, Prof. of Food Science and Engineering Dept.

Sang-Bin Lim, Prof. of Food Science and Engineering Dept.

Ji-Yeon Chun, Prof. of Food Science and Engineering Dept.

Dec. 2019

Department of Food Science and Engineering

GRADUATE SCHOOL

JEJU NATIONAL UNIVERSITY

# CONTENTS

ABSTRACT .....	1
LIST OF FIGURES .....	2
LIST OF TABLES .....	3
1. 서론 .....	4
2. 재료 및 방법 .....	9
2.1. 커큐민 용해도 측정.....	9
2.2. Blank nanostructured lipid carriers (NLC) 제조.....	9
2.3. 커큐민 Nanostructure lipid carriers (NLC) 제조.....	10
2.4. Nanostructure lipid carriers (NLC) 입자특성 관찰.....	10
2.4.1. 입자크기, 제타전위, 입도분포도 측정.....	10
2.4.2. 포집효율 측정.....	10
2.5. 저장온도 및 시간에 따른 저장 안정성.....	11
2.6. 소화 모방 실험.....	11
2.6.1. 모방타액 제조.....	11
2.6.2. 모방위액 제조.....	12
2.6.3. 모방소장액 제조.....	12
2.7. 통계.....	14

<b>3. 결과 및 고찰</b> .....	<b>15</b>
<b>3.1. 커큐민 용해도</b> .....	<b>15</b>
<b>3.2. Blank nanostructured lipid carriers (NLC)</b> .....	<b>17</b>
3.1.2. 수상 유화제 비율에 따른 blank NLC.....	17
3.2.1.1. Tween 80 유화제 비율에 따른 blank NLC 외관.....	17
3.2.1.2. 초고압 균질 횟수에 따른 blank NLC 입자특성.....	20
3.2.2. 유상 유화제의 비율에 따른 blank NLC 외관 및 입자특성.....	22
<b>3.3. 커큐민 함량에 따른 NLC</b> .....	<b>25</b>
3.3.1. 외관 및 포집효율.....	28
3.3.2. 입자특성.....	28
<b>3.4. 커큐민 NLC 저장온도에 따른 안정성 관찰</b> .....	<b>30</b>
3.4.1. 외관.....	30
3.4.2. 입자특성.....	32
3.4.3. 포집효율.....	34
<b>3.5. 커큐민 NLC 소화모방시스템 적용</b> .....	<b>36</b>
3.5.1. 입자크기 및 커큐민 방출.....	36
<b>4. 결론</b> .....	<b>39</b>
<b>국문요약</b> .....	<b>40</b>
<b>REFERENCES</b> .....	<b>43</b>

## ABSTRACT

Curcumin has various of healthy effects but low water solubility and bioavailability and poor chemical stability. A delivery system for nanosstructured lipid carriers (NLC) are produced by mixing solid lipids with liquid lipid, which offer the advantage of improved insoluble drug encapsulation efficiency. In this study, high pressure homogenization method was employed to produce NLC. The formulas of NLC developed by using glycerol tristearate (solid lipid), medium chain triglyceride oil (liquid lipid), Span 80, Tween 80 and water. Characterization of NLC consisted of appearance, diameter, zeta potential, polydispersity index, storage stability at 5°C, 21±2°C, 40°C, 65°C and *in vitro* simulated gastrointestinal. The optimization preparation condition was glycerol tristearate 0.60% (w/v), MCT oil 0.24% (w/v), Span 80 0.3% (w/v), Tween 80 0.3% (w/v) and water 100% (w/v). NLC had particle diameter 91.29 nm, zeta-potential -26.96 mV and polydispersity index 0.22 and encapsulation efficiency 92.62%. During storage for 28 days, NLC maintained particle properties at 5°C and 21°C. Curcumin NLC was decreased encapsulation efficiency 65% even though it maintained particle properties at 40°C. At 65°C, curcumin NLC was also decreased encapsulation efficiency (28.95%) and zeta-potential (-16.88 mV) and polydispersity 0.093 was also decreased but NLC increased diameter of 118.78 nm. In *in vitro* simulated gastrointestinal test, a particle diameter of curcumin NLC was increased (117.11 nm) and curcumin was released (31.72%) in the simulated oral phase. And curcumin NLC maintained its particle diameter and curcumin release% in the simulated gastric phase (2 h). Finally, particle diameter and curcumin released gradually increased over time in the simulated intestinal phase. This resulted in stable curcumin NLC for 28 days at low temperature and room temperature in a storage test. And curcumin NLC was able to maintain curcumin to the intestine under *in vitro* simulated

gastrointestinal test. In this study, it was suggested that NLC was effective to increase the utilization of curcumin and stable storage stability and water solubility and bioavailability.

## LIST OF FIGURES

Figure 1.	Chemical structure of curcumin·····	8
Figure 2.	Nanosturctured lipid carrier·····	9
Figure 3.	<i>In vitro</i> simulated gastrointestinal solution and experimental method·····	14
Figure 4.	Pictorial views of aqueous emulsifiers of blank NLC with different concentrations of Tween 80·····	20
Figure 5.	Pictorial views of blank nanostructured lipid carrier with different concentrations of Span 80·····	24
Figure 6.	(A) Zeta-potential (B) particle diameter, and (C) polydispersity index of blank NLC with different concentrations of Span 80·····	25
Figure 7.	Pictorial views nanostructured lipid carrier with different curcumin concentrations (% w/v)·····	27
Figure 8.	Encapsulation efficiency of nanostructured lipid carrier with different curcumin concentrations·····	28
Figure 9.	Particle diameter and polydispersity index of nanostructured lipid carrier with different curcumin concentrations·····	30
Figure 10.	(a) Zeta-potential, (b) particle diameter, and (c) polydispersity index of curcumin nanostructured lipid carrier at different temperatures during 28 day of storage·····	34
Figure 11.	Encapsulation efficiency of curcumin nanostructured lipid carrier at different temperatures during 28 day of storage·····	36
Figure 12.	Influence of simulated gastrointestinal condition and pH on the particle diameter and curcumin.released of curcumin nanostructured lipid carrier·····	39

## LIST OF TABLES

Table 1. Chemical composition of artificially simulated saliva fluid·····	14
Table 2. Solubility ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) of curcumin in MCT oil and soybean oil··	17
Table 3. Zeta-potential, diameter, and polydispersity index of blank NLC particles with different Tween 80 concentrations and homogenization cycles··········	22
Table 4. Pictorial views of curcumin nanostructured lipid carrier at different temperatures during 28 day of storage··········	32

## 1. 서론

커큐민(curcumin)은 강황(*Curcuma Longae Rhizoma*) 및 울금(*Curcuma Longae Radix*) 등의 뿌리부분에 함유된 노란색을 띤 향신료의 주요성분이며(Jo et al., 2016) 폴리페놀류의 일종으로 분자량은 368.37 g/mol, 녹는점은 183°C이다(Andrea et al., 2018). 인도와 다른 아시아에서 천연색소 및 향신료, 약성분으로 많이 사용되고 있으며(Mahesh et al., 2017). 항염(Selvam et al., 2005), 항암(Fujisawa et al., 2004), 항산화(Ak & Gulcin, 2008), 신경병증성 통증 억제(Kim et al., 2008), 피부경화증 완화, 건선 완화, 피부암을 예방(Balasubramanian & Eckert, 2006; Thangapazhem et al., 2007), antialcoholism(Nanji et al., 2003) 등의 기능을 가지고 있다. 다양한 건강 기능성을 지녔음에도, 커큐민은 물에 잘 녹지 않는 난용성 성분으로 물에 대한 용해도가 11 ng/mol (ambient temperature) 수준이며 또한, 낮은 경구 생체 이용률, 화학적 불안정 및 광분해, 생체에 흡수가 잘 되지 않고, 막투과성이 낮으며, 빠른 대사 및 배출에 관한 어려움이 있다(Hussain et al., 2017). 커큐민의 단점을 보완하고자 마이셀 가용화(Ma et al., 2008), cyclodextrin 복합체(Tonnesen et al., 2002) 형성, 결정변형, 입자크기 감소 등 커큐민을 제형으로 제조하는 연구가 진행되었지만 수용해도(water solubility), 경구 생체 이용률(oral bioavailability)을 향상시키지는 못했다.

나노캡슐화 기술은 나노수준의 다양한 수송체(Bisht et al., 2017)안에 커큐민 포집이 가능하였고, 커큐민을 포집한 나노캡슐들을 다양한 조건의 delivery system에 적용한 연구결과들은 커큐민의 식품가공적성과 생체 내 이용률을 증가시킬 수 있음을 보여 주었다(Gong et al., 2013; Hasan et al., 2014; Ahmed et al., 2012; Bisht et al., 2017; Joung et al., 2016; Pinheiro et al., 2016). 나노캡슐은 입자크기가 작고, 표면적이 넓어 커큐민을 상피세포로 침투 할 수 있도록 가용화시 커큐민의 생체이용률을 증가 시켰다(McClements & Li, 2010; Zou et al., 2015; Sun et al., 2015). 나노수송시스템(nano-carrier system)인 지질 나노입자의 제조 과정에 유기 용매를 사용하지 않고도 약물 캡슐화 효율이 높고, 안정성

도 높다. 식품 등급의 지질 나노입자를 제조하는데 사용된 지질은 비독성 물질이어야 하며, 사용된 지질은 생체 이용률을 결정하는데 중요한 역할 한다(Sun et al., 2015; Behbahani et al., 2019). 1990년대 개발된 Solid lipid nanoparticles (SLN)은 에멀전의 액체지질을 고체지질로 대체하여 상온에서 고체 상태를 유지하는 콜로이드 입자이다. SLN은 물리적 안정성이 우수하여 민감한 약물을 보호한다(Madane & Mahajan, 2014). SLN은 높은 생체 이용률, 우수한 생체 적합성 및 낮은 독성을 갖는다(Yuan et al., 2007). 그러나 SLN은 구조 상 포집 물질을 위한 빈공간이 적어 낮은 약물 포집, 장기 보관 중 고체 지질의 결정화도가 증가하면서 약물의 배출되는 단점을 가지고 있다(Muller et al., 2002; Behbahani et al., 2019). 이러한 SLN을 보완하기 위해 Nanostructured lipid carrier (NLC)의 형태로 개발되었다. NLC는 고체지질에 액체지질을 혼합하여 불완전한 형태의 구조를 형성하게 되어 SNL에 비해 녹는점은 낮아지지만(Jun et al., 2015), 인체 온도에서는 여전히 고체 상태로 존재한다. 액체지질 첨가로 활성 성분의 용해도는 증가하게 되고, 불완전한 형태로 인해 입자 내 포집할 수 있는 양이 증가하게 되고, 또한 저장기간 동안 활성성분의 유출이 최소화 될 수 있다(Varshosaz et al., 2010). 또한 소수성 및 친수성 활성물질 등 광범위한 범위의 물질이 포집될 수 있다. NLC의 유상은 고체지질과 액체지질의 혼합에 따라 다른 타입의 NLC가 존재하게 된다(Muller et al., 2002; Attama et al., 2012). 일반적으로 NLC는 세 가지 형태로 존재하는데 첫째, glyceride의 지방산 사슬 사이의 거리(탄소 사슬의 길이, 포화 및 불포화 결합)에 의해 용해도가 증가하게 되고, 고체 지질과 액체 지질의 혼합으로 인한 결정의 불완전함으로 약물을 포집하는 형태(Fig. 2. Type 1), 둘째, 고체 지질과 액체지질의 특수 혼합물(hydroxyoctacosanylhydroxystearate, isopropylmyristate)을 사용함으로써 가열하여 혼합 후 고체가 되지만 결정화는 되지 않은 상태(Fig. 2. Type 2), 셋째, 고체 지질의 나노입자 안에 액체 나노오일을 함유한(O/F/W)형태 즉 고체지질 매트릭스에 둘러싸여있어, 약물 방출을 연장 할 수 있는 형태(Fig. 2. Type 3)가 존재한다. 그렇기 때문에 유상의 고체지질과 액체지질의 종류 및 구성 비율은 NLC를 제조하는데 중요한 요인이다.

Medium chain triglycerides (MCT, 중쇄지방) 오일은 6-12개의 탄소원자로 구

성된 형태로 코코넛 또는 palm kernel유의 변형(가수분해 및 에스테르화)에 의해 생산되고, 산화에 대한 높은 안정성을 가지고 있다(Tamjidi et al., 2013). 일반적으로 탄소 원자 12개 이상의 Long chain triacylglycerols (LCT) 장쇄지방 보다 소화, 흡수, 대사가 용이하다고 알려져 있다(Jun & Kim, 2014). 또한 MCT 오일은 lipase에 의존하지 않고 소장에서 직접 흡수가 되기 때문에 췌장을 자극하지 않지만, 다른 지방에 비해 열량이 낮고 맛이 없는 단점을 가지고 있다(Park, 2014). 또한 NLC의 물리적 특성은 유화제 종류 및 사용량뿐만 아니라 단일 유화제를 사용하는지, 또는 여러 유화제가 혼합된 유화제를 사용하는지에 따라서 물리적 안정성이 변한다(Tamjidi et al., 2013). 유화제는 Hydrophilic lipophilic balance (HLB)에 따라 친수성과 친유성의 균형을 나타낸다. 비이온성 유화제인 Tween (Polyoxyethylene sorbitan ester)과 Span (Sorbitan monostearate)은 많이 사용되는 유화제로 지용성 성분 입자에 흡착능이 크며 계면장력을 낮춰 입자간의 coalescence를 방지한다(Maria et al., 2018). 비이온성 유화제를 사용하여 제조된 안정화된 입자는 전해질 농도 및 pH, 동결 및 해동에 안정성을 갖는다(Tamjidi et al., 2013).

따라서 본 연구에서는 난용성 물질인 커큐민의 이용률을 높이기 위해서 지질수송체인 NLC에 커큐민을 포집하여 커큐민 NLC를 제조하였다. 이때 커큐민은 MCT 오일에 용해시켜 사용하였으며, 커큐민을 포집하기 위한 최적 NLC 제조를 위해 유화제인 Tween 80 및 Span 80 비율을 달리하였다. 최적 조건으로 제조된 커큐민 NLC의 물리화학적 특성 및 안정성을 관찰하였다.

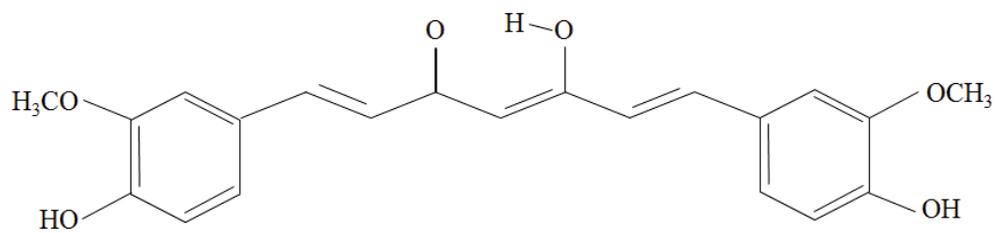
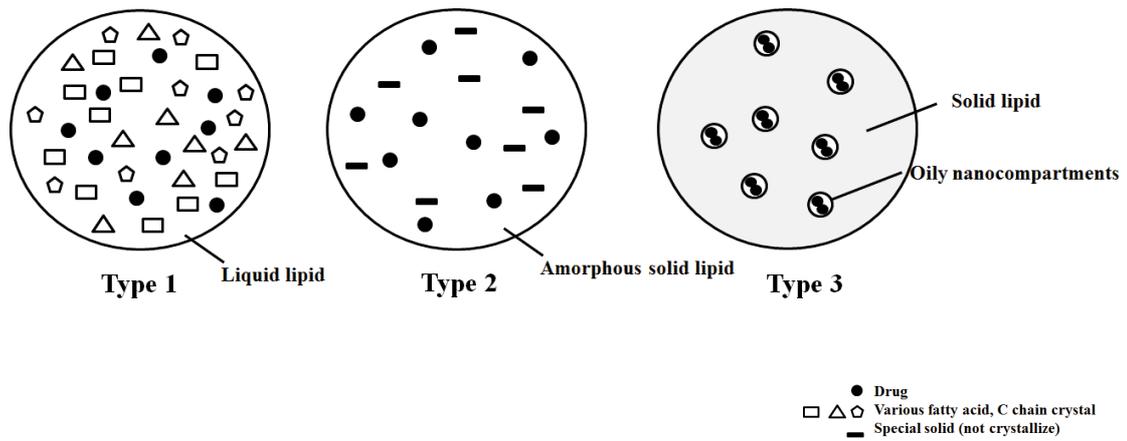


Figure 1. Chemical structure of curcumin.



**Figure 2. Nanostructured lipid carrier** (Type 1: Imperfect structured, Type 2: Structureless, Type 3: Multiple type).

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 커큐민 용해도 측정

커큐민 용해도는 분광광도법을 이용하여 측정하였다. 커큐민 0.1 g을 20 mL medium chain triglyceride oil (MCT, Medifood, Korea)과 soybean oil (Sigma-Aldrich, USA)에 첨가하여 각 온도별 커큐민을 용해시켰다. 실온 ( $21\pm 2^{\circ}\text{C}$ )과  $37\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 에서 정치하여 24 혹은 48시간 동안 용해시켰다. 원심분리기 (1,750 rpm, 10 min,  $20^{\circ}\text{C}$ , Labogene 1248R, GYROZEN, Korea)를 이용하여 용해되지 않은 커큐민을 침전시켜 비 용해된 결정성 커큐민을 제거 한 후, 상등액을 에탄올로 희석하여 UV-Vis 분광광도계로 425 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 이 때 커큐민을 에탄올에 순차 희석한 용액을 측정하고 표준정량곡선을 그린 후 용해된 커큐민을 정량하는데 이용하였다.

### 2.2. Blank nanostructured lipid carrier (NLC) 제조

수상은 증류수 100 mL에 Tween 80을 0.1-5.0% (w/v) 첨가하여 제조하고, 유상은 수상의 증류수 대비 glycerol tristearate 0.60% (w/v), MCT오일 0.24% (w/v), Span 80 0.05-0.40% (w/v) 으로 각각 정량하였다. 유상과 수상은  $80^{\circ}\text{C}$ 에서 350 rpm으로 각각 교반하면서 10분간 가운하였다. 가운한 수상을 유상에 방울방울 떨어뜨리면서 천천히 350 rpm에서 교반하였다. 혼합한 후  $80^{\circ}\text{C}$ 에서 350 rpm으로 10분간 가운 한 후 초고속 균질기(T-25D, IKA, Germany)를 이용하여 8,000 rpm 5분간 균질 하였다. 이어 microfluidization 초고압균질기 (Picomax MN400, Micronox, Seongnam, Korea)를 이용하여 20,000 psi에서 3회 균질 하였다.

### 2.3. 커큐민 Nanostructured lipid carrier (NLC) 제조

수상은 증류수 100 mL에 Tween 80을 0.30% (w/v) 첨가하여 제조하고, 유상은 수상의 증류수 대비 커큐민 0.003% (w/v) glycerol tristearate 0.60% (w/v), MCT오일 0.24% (w/v), Span 80 0.30% (w/v) 으로 각각 정량하였다. 유상과 수상은 80°C에서 350 rpm으로 각각 교반하면서 10분간 가온하였다. 가온한 수상을 유상에 방울방울 떨어뜨리면서 천천히 350 rpm에서 교반하였다. 혼합한 후 80°C에서 350 rpm으로 10분간 가온 한 후 초고속 균질기(T-25D, IKA, Germany)를 이용하여 8,000 rpm 5분간 균질 하였다. 이어 microfluidization 초고압균질기 (Picomax MN400, Micronox, Seongnam, Korea)를 이용하여 20,000 psi에서 3회 균질 하였다.

### 2.4. Nanostructured lipid carrier (NLC) 입자특성 관찰

#### 2.4.1 입자크기, 제타전위, 입도분포도 측정

NLC의 평균 입자크기 및 입자분포도는 dynamic light scattering (DLS)원리에 의하여 DelsaMax Pro (DelsaMax Pro, Beckman Coulter, USA)으로 분석하였다. 제타전위는 electrophoretic light scattering (ELS)원리에 의하여 DelsaMax Pro (DelsaMax Pro, Beckman Coulter, USA)으로 분석하였다. 입자크기는 particle diameter (nm), 제타전위는 zeta-potential (mV), 입자분포도는 polydispersity index로 나타내었다. 3회 반복하여 측정된 값을 평균값으로 산출하였다.

#### 2.4.2. 포집효율 측정(encapsulation efficiency, EE%)

커큐민의 포집효율은 Yu et al. (2016)과 Riaz et al. (2019)의 방법을 변형하여 측정하였다. 먼저 포집되지 않은 커큐민(free 커큐민)을 제거하기 위해 NLC 분산액과 ethyl acetate를 질량비 1:1 (v/v)로 수십초간 vortexing 한 후 원심분리 (4,000 rpm, 10 min, 25°C)하여 상등액을 제거하였다. Free 커큐민을 제거한

NLC 분산액을 메탄올에 희석하여 균질한 후 4°C, 4,000 rpm에서 40분 동안 원심분리하여 중층액을 syringe filter 0.45  $\mu\text{m}$ 로 여과 한 후, UV-Vis 분광광도계 (Epoch<sup>TM</sup>, BioTek Instruments, Inc, Winooski, USA)를 이용하여 423 nm에서 흡광도를 측정하여 포집된 커큐민양을 측정하였다. 포집효율은 (EE%)은 다음 식에 의해 계산하였다.

$$EE\% = \frac{W_e}{W_i} \times 100$$

$W_e$ : 중층액에서 검출된 커큐민의 양

$W_i$ : 초기에 넣어준 커큐민 양

커큐민은 메탄올에 희석 용해된 표준 곡선을 갖는 UV-Vis 분광광도계 (Epoch<sup>TM</sup>, BioTek Instruments, Inc., Winooski, USA)를 사용하여 샘플에 대해 평가되었다.

## 2.5. 저장온도 및 기간에 따른 저장 안정성

커큐민 NLC를 5°C, 상온(21±2°C), 40°C, 65°C의 암소에서 28일 동안 저장하면서 일정 기간마다 NLC 입자특성(입자크기, 제타전위, 입도분포도), 포집효율(%)을 측정하였다.

## 2.6. 소화 모방 실험

### 2.6.1. 모방타액 제조

타액 모방 용액(simulated saliva fluid, SSF)을 제조하기 위해 Mao & McClement (2012) 방법을 이용하여 측정하였다. Mucin 및 다양한 염(Table 1)을 함유한 모의 타액 (pH 6.8)을 제조하였다. pH는 1 N NaOH (Sigma-Aldrich)

를 조절하였다. 모방타액을 37°C로 예열한 후 NLC분산액을 1:1 (v/v) 비율로 혼합 후 37°C, 10분 동안 105 rpm으로 반응시켰다.

### 2.6.2. 모방위액 제조

‘United States Pharmacopeia and National Formulary 200’에 의해 정의된 방법론에 따라 위액 모방용액(simulated gastric fluid, SGF)을 제조하였다. 모방위액은 다음과 같이 제조하였다. 탈이온수 90 mL에 1.0 M 염산 (HCl) 용액 0.7 mL을 넣고, 염화나트륨(NaCl) 200 mg을 녹인후, 펩신 320 mg (porcine stomach mucosa (800-2,500 U/mg), 3.2 mg/mL)을 용해시켰다. 용액의 pH를 1.2로 조정하여 모방위액을 제조 하였다. 모방타액 소화 과정을 마친 시료를 모방위액과 질량비 1:1 (v/v)로 혼합하고 37°C, 2 시간 동안 105 rpm으로 반응하여 5, 10, 30, 60, 90, 120 분에 샘플의 입자특성 및 포집효율을 측정하였다.

### 2.6.3. 모방소장액 제조

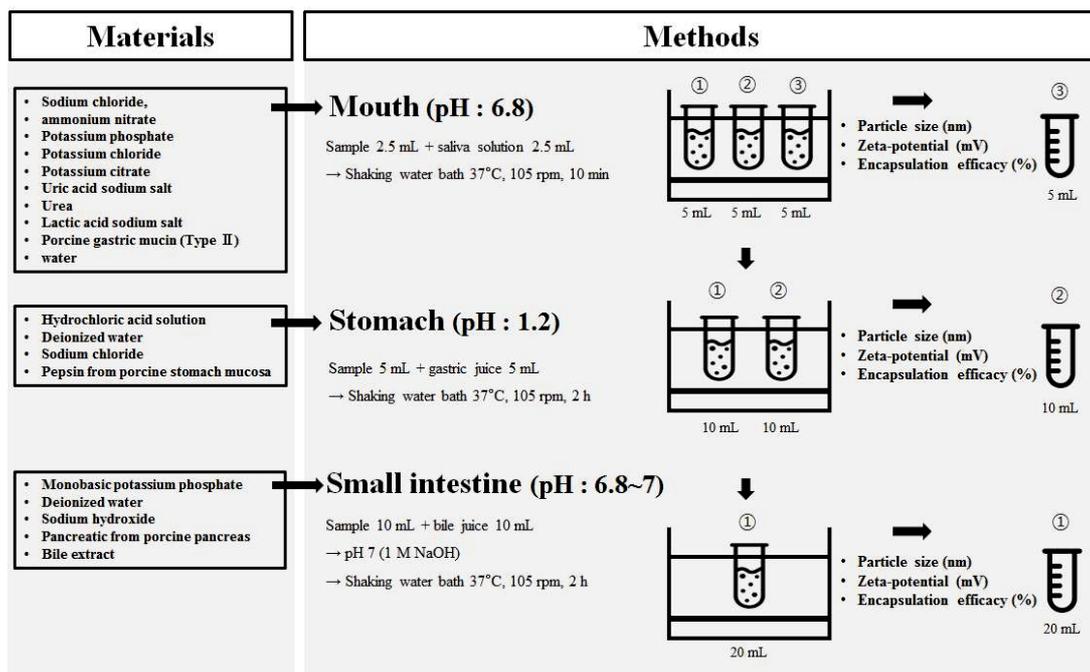
‘United States Pharmacopeia and National Formulary 200’ 방법에 의해 정의된 방법에 따라 모방 소장액(Simulated small intestinal fluid, SIF)을 제조하였다. 탈이온수 75 mL에 680 mg의 monobasic potassium phosphate를 녹이고 0.2 M 수산화나트륨 (NaOH) 7.7 mL을 혼합하였다. Bile extract 240 mg (2.4 mg/mL), pancreatin (porcine pancreas, 10.0 mg/mL) 1.0 g을 녹인 후 pH를  $6.8 \pm 0.1$ 로 조정하였다. 모방위액 소화과정을 마친 시료와 질량비 1:1 (v/v)로 SIF를 혼합하여 pH  $7.0 \pm 0.5$ 로 조정했다. 37°C, 2 시간 동안 105 rpm으로 반응하여 5, 10, 30, 60, 90, 120 분에 샘플의 입자특성 및 포집효율을 측정하였다.

소화과정 중 릴리즈 되는 커큐민은 포집 된 커큐민을 위의 포집효율 측정 방법 (2.4.2)을 활용하여 측정하고 아래 수식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{Curcumin release (\%)} = 100 - \text{Encapsulation Efficiency (\%)}$$

**Table 1. Chemical composition of artificially simulated saliva fluid (Mao & McClement, 2012)**

Chemicals	Chemical formula	Concentration (g/L)
Sodium chloride	NaCl	1.594
Ammonium nitrate	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0.328
Potassium phosphate	KHPO <sub>4</sub>	0.636
Potassium chloride	KCl	0.202
Potassium citrate	K <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> • H <sub>2</sub> O	0.308
Uric acid sodium salt	C <sub>5</sub> H <sub>3</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> • Na	0.021
Urea	H <sub>2</sub> NCONH <sub>2</sub>	0.198
Lactic acid sodium salt	C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub> Na	0.146
Porcine gastric mucin (typeII)	-	30



**Figure 3. *In vitro* simulated gastrointestinal solution and experimental method.**

## 2.7. 통계처리

통계분석은 Minitab ver. 17 (Minitab 17 Inc., State College, Pennsylvania, USA)를 이용하여 분산분석(one-way analysis of variance)을 실시하였고, mean  $\pm$ SD로 나타내었으며 각 측정 평균값 간의 유의성은  $p < 0.05$  수준으로 Tukey's multiple range test를 통하여 실시하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1. 커큐민 용해도

MCT 오일 및 soybean 오일에 대한 용해도는 Table 2에 나타내었다. 커큐민의 용해도는 37°C에서 48시간 MCT 오일에 대해서는 1341,27  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , soybean 오일에 대해서는 657.06  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 측정되었다. 커큐민은 지용성 물질로 물에 대한 용해도가 11  $\text{ng}/\text{mL}$ 이다. 커큐민 용해도에 영향을 미치는 인자는 지질의 분자량 및 극성그룹, 용해 온도, 시간이다(Araiza-Calahorra et al., 2018). Short chain triglyceride (SCT), medium chain triglycerids (MCT), long chain triglycerides (LCT)는 분자 구조 중 극성 구조를 가지게 되는데, 이때 극성 그룹 사이에 dipole-dipole 상호작용으로 인하여 커큐민의 용해도 증가에 유리하게 된다(Araiza-Calahorra et al., 2018). 또한 지질의 depletion 공간의 두께가 증가할수록 커큐민 용해가 증가하게 되는데, 용해도가 증가할수록 지질의 분자량이 감소하게 된다(Ahmed et al., 2012). Soybean 오일은 대표적인 LCT 그룹에 속하며, MCT 오일과 비교하였을 때 같은 용해조건 (온도, 시간)에서 MCT 오일보다 용해도가 낮았다. Joung et al. (2016)의 연구에서는 coconut (mixture of MCT and LCT), MCT, corn (LCT), olive (LCT) 오일의 커큐민 용해도를 측정하여 비교하였는데, 60°C에서 용해하였을 때 MCT, coconut, olive, corn 오일 순으로 용해도가 높았으며, Ahmed et al. (2012)의 연구에서는 커큐민 용해도는 60°C에서 LCT (corn oil) 0.30±0.10 wt%, MCT (Miglyol<sup>®</sup> 812) 0.79±0.2 wt%, SCT (Tributylin, 98%) 2.98±0.18 wt% 으로 분자량이 감소할수록 용해도가 증가하였다. 용해 온도 및 시간이 증가하게 되면 용액과 결정질 분자의 평균 운동 에너지가 증가하게 된다. 이러한 운동에너지의 증가는 용질의 고체 상태를 불안정하게 하고, 용매가 용질을 빠르게 용해시킬 수 있게 한다(Araiza-Calahorra et al., 2018).

**Table 2. Solubilities ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) of curcumin in MCT oil and soybean oil**

Temperature ( $^{\circ}\text{C}$ )	Time (hr)	Solubility ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	
		MCT oil	Soybean oil
21	24	905.0 $\pm$ 5.9 <sup>Ca</sup>	429.9 $\pm$ 50.9 <sup>Bb</sup>
37	24	1284.5 $\pm$ 72.5 <sup>ABa</sup>	622.9 $\pm$ 9.1 <sup>Ab</sup>
21	48	820.5 $\pm$ 35.3 <sup>Ba</sup>	510.3 $\pm$ 39.2 <sup>ABb</sup>
37	48	1341.3 $\pm$ 47.0 <sup>Aa</sup>	657.1 $\pm$ 62.7 <sup>Ab</sup>

Data are expressed as the mean $\pm$ standard deviation (n=3).

<sup>A-C</sup>The means in each column followed by the same letter are not significantly by Tukey's multiple range test at  $p<0.05$ .

<sup>a-b</sup>The means in each row followed by the same letter are not significantly by Tukey's multiple range test at  $p<0.05$ .

## 3.2. Blank nanostructured lipid carrier (NLC)

### 3.2.1. 수상 유화제 비율에 따른 blank NLC

#### 3.2.1.1. Tween 80 유화제 비율에 따른 blank NLC 외관

Tween 80 0.1-4.0% (w/v)를 첨가하여 blank NLC를 제조한 외관을 Fig. 4에 나타내었다. Tween 80 0.1-0.2% (w/v) 첨가하였을 때 지질의 양에 비해 유화제의 양이 적어 고체지질로 추정되는 응집물이 상층액에서 관찰된 것으로 사료되고, 0.5% (w/v) 이상 첨가되었을 때 침전물이 관찰되는 것으로 사료된다. 본 연구에서 사용한 NLC제조 방법은 고온, 고압을 이용한 방법 high-pressure homogenization method (HPH)으로 유기용매를 포함하지 않는 분산 기술로 NLC의 제조공정은 유상을 고온으로 가열 한 후 매우 높은 전단력 하에서 고속 충격 및 감압 팽창에 의해 유체 액적이 나노 입자로 분해하여(Li et al., 2017) 수 상용액에 분산시킨다. 이후 고온의 나노에멀전을 실온으로 냉각시켜 지질의 액적을 결정화 시켜 NLC형태의 입자를 생성하게 된다. 하지만 유상의 고체지질과 액체지질을 균질할 때 고체지질의 용점보다 낮은 온도에서 제조 할 경우 지질의 결정화를 초래한다(Li et al., 2017). 지질의 결정화 및 응고는 임계결정화 온도(critical crystallization temperature, CCT)이상 이 되지 않으면 과냉각 에멀전이 생성된다(Khosa et al., 2018). 이때 유화제에 의해 입자를 형성하지 못한 여분의 지질이 냉각되어 응집물을 이룬 것으로 사료된다.

콜로이드 용액 제조 시 다른 침전물이 발생 할 경우는 유화제가 필요 이상으로 함유하여 유화제끼리 미셀이 형성되기 시작하는 농도를 임계미셀 농도(Critical micell concentration, CMC)라 한다. 유화제의 일정 농도 이상 첨가되는 계면활성제는 물속에서 단독으로 존재하지 못하고 표면으로 이동하거나 미셀이라는 집합체를 형성하여 계의 에너지를 낮춰(Lee & Lee, 2015) 구조를 형성하게 된다. Tween 80은 hydrophile lipophilic balance (HLB) 15로 친수성 유화제이다. 친수성 부분은 물과 접촉하려하기 때문에 구조가 점차 커진 것으로 사료된다. 본 연구에서는 NLC를 제조하였을 때 사용한 고체지질의 glycerol tristearate의 녹는점

은 54.0-72.5°C로 균질 시 80°C이상에서 제조하였으므로 CCT 이상 되어 온도에 의한 결정화가 아닌 지질의 양에 비해 유화제의 농도에 따른 결정화 및 침전물인 것으로 사료된다. 커큐민 NLC제조를 위한 첫 번째 단계로 blank NLC 외관 관찰을 통해 응집물, 침전물이 관찰되지 않았던 Tween 80 농도 0.3% (w/v) 및 0.4% (w/v)를 선택하였다.

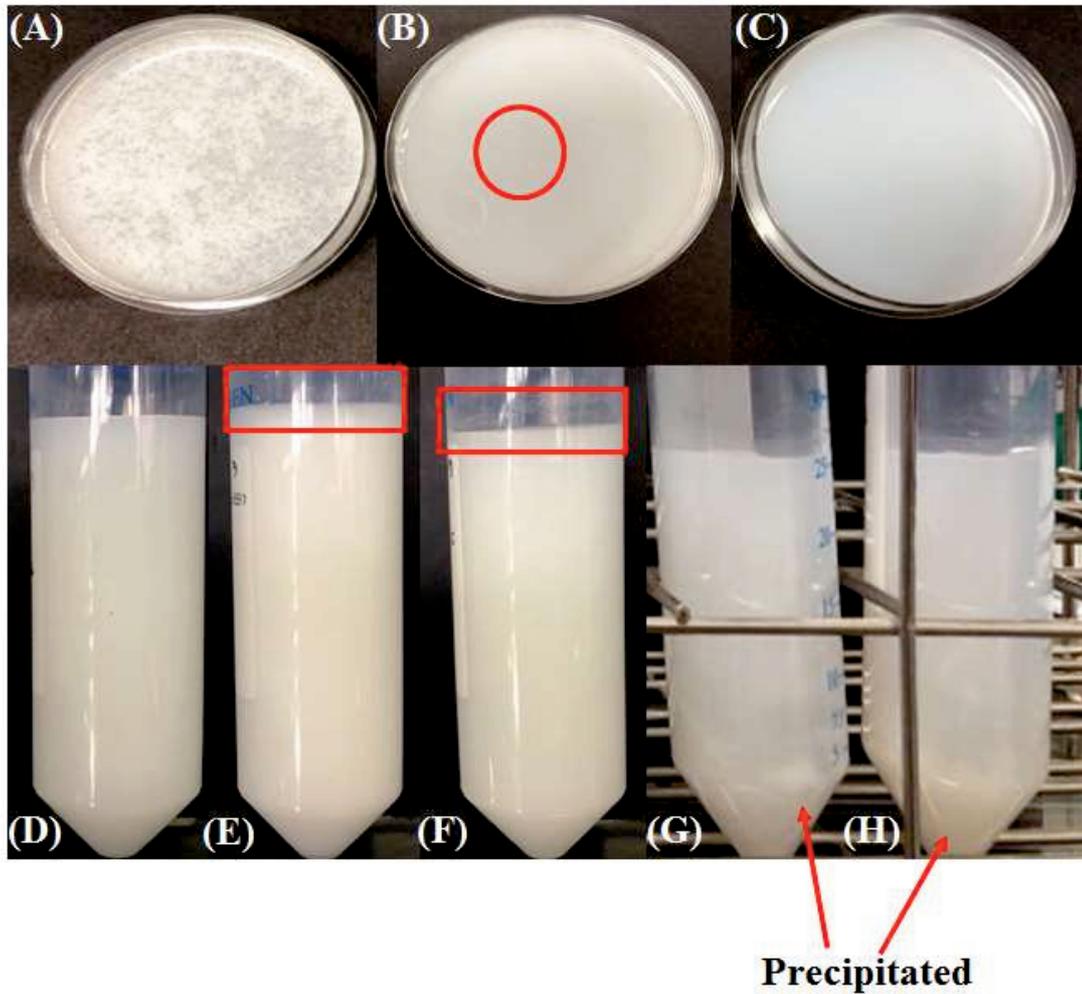


Figure 4. Pictorial views of aqueous emulsifiers of blank NLC with different concentrations of Tween 80. (A) 0.1%, (B) 0.2%, (C) 0.3%, (D) 0.4%, (E) 0.5%, (F) 1%, (G) 2%, (H) 4%.

### 3.2.1.2. 초고압 균질 횟수에 따른 blank NLC 입자특성

안정한 blank NLC 제조를 위한 두 번째 단계로 NLC의 입자크기를 감소시키고 입자분산도를 높이기 위해 초고압 균질 횟수를 달리하여 blank NLC를 제조했다. 첫 번째 단계에서 선택한 0.3 및 0.4% (w/v) Tween 80을 첨가하고, 초고압 균질 횟수 (1회, 2회, 3회)를 달리하여 blank NLC를 제조하고 입자특성을 Table 3에 나타내었다. 제타전위의 절대값은 균질 횟수에 따라 증가하였으나 2회 이후 유의적인 차이가 없다( $p>0.05$ ). 초고압 균질 횟수가 증가 할수록 Tween 80의 같은 첨가량에도 입자크기는 감소하였으나 2, 3회의 유의적인 차이가 없었고( $p>0.05$ ), 입도분포도는 횟수가 증가함에 따라 유의적으로 감소하였다( $p<0.05$ ). 초고압 균질은 유체에 고압을 가하면 유체가 가속되어 발생하는 입자들의 높은 전단력 (shear), 캐비테이션(cavitation), 충격(impact)의 작용이 일어나게 되어 미립화가 된다(Lim et al., 2010). 이때 초고압 균질의 횟수가 증가할수록 반복적으로 입자간의 충돌이 일어나 미립화되어 입자크기는 감소하게 되고, 입자들은 입자크기가 균일해지므로 제타전위의 절대값 또한 증가한 것으로 사료된다. NLC의 입자특성 (입자크기, 제타전위, 입도분포도)은 콜로이드 용액의 안정화에 중요한 요인이다. 입자들은 콜로이드 용액에서 브라운 운동을 하는데 이때 입자의 크기가 작을수록 입자들의 합일(coalescence), 응집(flocculation), 크림링(creaming)에 비교적 안정하다(Chae et al., 2013). 제타전위는 입자의 최외각 경계면과 연속상 사이의 전하를 뜻하며, 콜로이드 입자의 분산상의 특성을 판단하는 요인으로 절대값은 콜로이드 안정도를 나타내어 절대값이 30이상 되었을 때 입자간의 정전기적 반발력으로 인하여 안정한 상태를 유지한다고 판단한다(McClements, 2015; Jo et al., 2014). 입도분포도 0.1-0.25의 범위에서는 단분산상의 균일한 크기로 존재함을 나타내고, 0.5를 초과하면 넓은 크기 분포를 나타내 다분산상을 의미한다(Tamjidiet al., 2013). 입자크기가 다양하게 존재 할 경우 coalescence와 Ostwald ripening 등으로 인한 입자크기가 증가한다(Petsev, 2004). 이러한 이유로 입도분포도를 고려해 초고압 균질의 횟수는 3회로 선정하였다.

**Table 3. Zeta-potential, diameter, and polydispersity index of blank NLC particles with different Tween 80 concentrations and homogenization cycles**

Tween 80 (% w/v)	Homogenization cycle (No) <sup>1)</sup>	Zeta potential (mV)	Particle diameter (nm)	Polydispersity index
0.3	1	-18.90±1.03 <sup>a2)</sup>	173.97±3.21 <sup>b</sup>	0.571±0.000 <sup>a</sup>
	2	-27.97±1.26 <sup>b</sup>	161.70±3.30 <sup>b</sup>	0.351±0.029 <sup>b</sup>
	3	-30.09±2.80 <sup>b</sup>	148.93±3.00 <sup>b</sup>	0.239±0.001 <sup>b</sup>
0.4	1	-15.80±1.69 <sup>a</sup>	207.87±24.95 <sup>a</sup>	0.571±0.000 <sup>a</sup>
	2	-25.98±1.34 <sup>a</sup>	163.07±1.51 <sup>b</sup>	0.325±0.106 <sup>b</sup>
	3	-28.92±1.60 <sup>b</sup>	148.37±2.89 <sup>b</sup>	0.239±0.003 <sup>b</sup>

<sup>1)</sup>Microfluidization (20,000 psi)

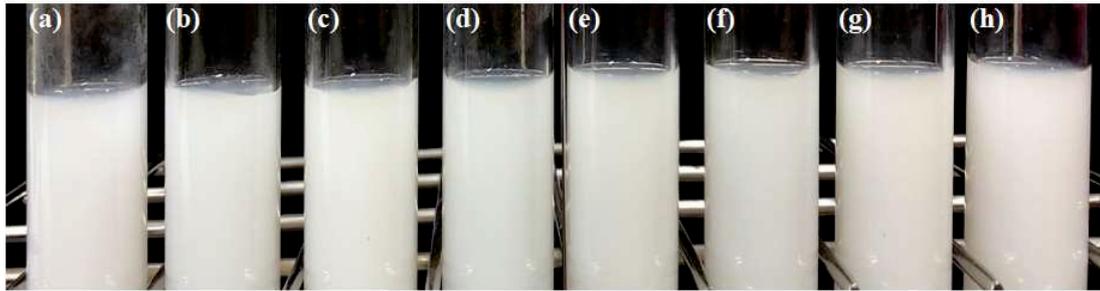
<sup>2)</sup>Data are expressed as the mean±standard deviation (n=3).

<sup>a-b</sup>The means in each column followed by the same letter are not significantly by Tukey's multiple range test at  $p<0.05$ .

### 3.2.2. 유상 유화제의 비율에 따른 blank NLC 외관 및 입자특성

Tween 80을 각 0.3% (w/v)와 0.4% (w/v) 첨가하고, 초고압 균질을 3회, Span 80을 첨가량별로 입자특성은 Fig. 6에 나타내었다. Tween 80 0.3% (w/v), Span 80을 농도 별로 제조 한 blank NLC의 제타전위는 첨가량에 따라 제타전위가 증가하는 경향을 보였으나, Span 80 0.20% (w/v) 이상 첨가하였을 때 제타전위는 유의적으로 차이가 없었다( $p>0.05$ ). Tween 80 0.4% (w/v)의 blank NLC는 Span 80 첨가량에 따른 제타전위 값이 21.31-23.51 mV로 유의적인 차이가 없었다 ( $p>0.05$ ). 입자크기는 Tween 80 0.3% (w/v)인 경우 Span 80의 0.3% (w/v)이상 첨가하였을 때 감소하는 경향을 보였다. Tween 80 0.4% (w/v), Span 80 첨가량에 따라 증가하였다. 입도분포도는 Tween 80 첨가량 0.30% (w/v)인 경우 Span 80 첨가량 0.05-0.40% (w/v) 모두 0.25 이하로 단분산상을 나타내었으며, Tween 80 0.40%, Span 80 첨가량 0.35% (w/v) 이상부터 0.377-0.384의 값으로 다분산상의 값을 나타내었다. 하지만 값들 간의 유의적인 차이가 없었다( $p>0.05$ ). 이를 보아 Tween 80 첨가량 0.4% (w/v)의 blank NLC는 Span 80 첨가하게 될 시 필요 이상의 유화제 첨가로 인한 유화제끼리의 마이셀 구조를 이루어 입자크기와 입도분포도가 점점 증가한 것으로 사료된다.

따라서 MCT 오일을 이용한 blank NLC의 최적조건은 Tween 80 0.3% (w/v), Span 80 0.3% (w/v)로 선택하여 커큐민을 함유한 NLC를 제조하였다.



**Figure 5. Pictorial views of blank nanostructured lipid carrier with different concentrations of Span 80. (a) 0.05%, (b) 0.10%, (c) 0.15% (d) 0.20%, (e) 0.25%, (f) 0.30%, (g) 0.35%, (h) 0.40%.**

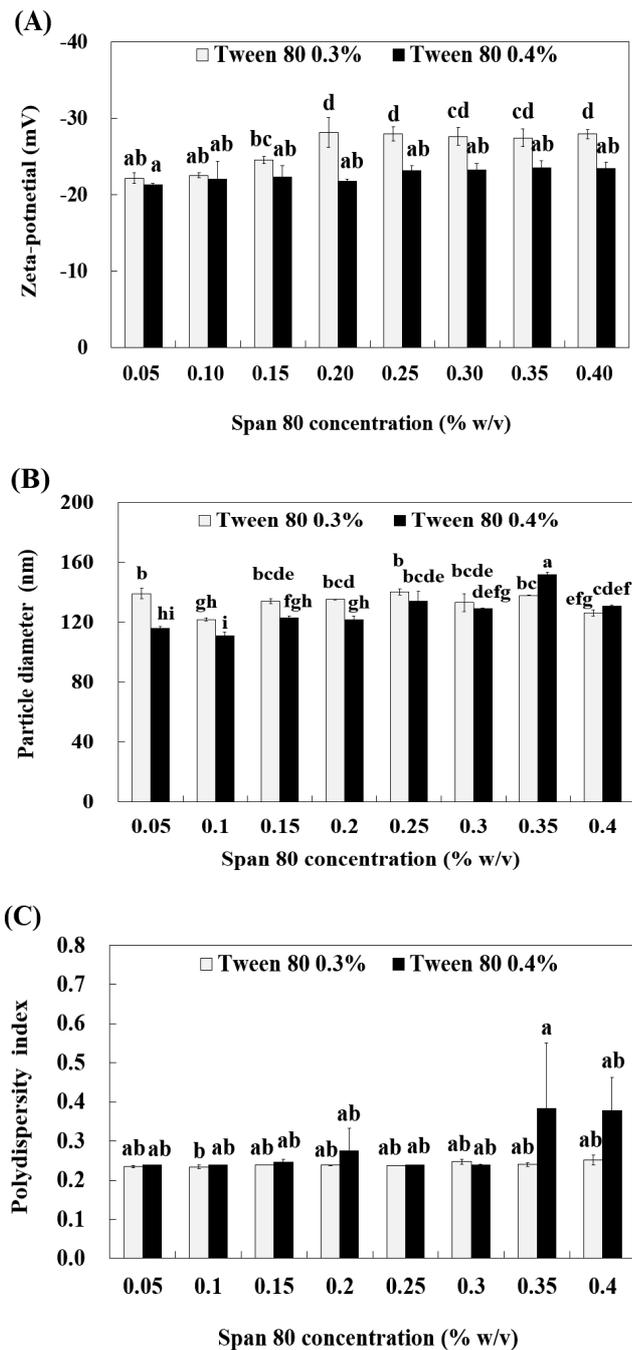
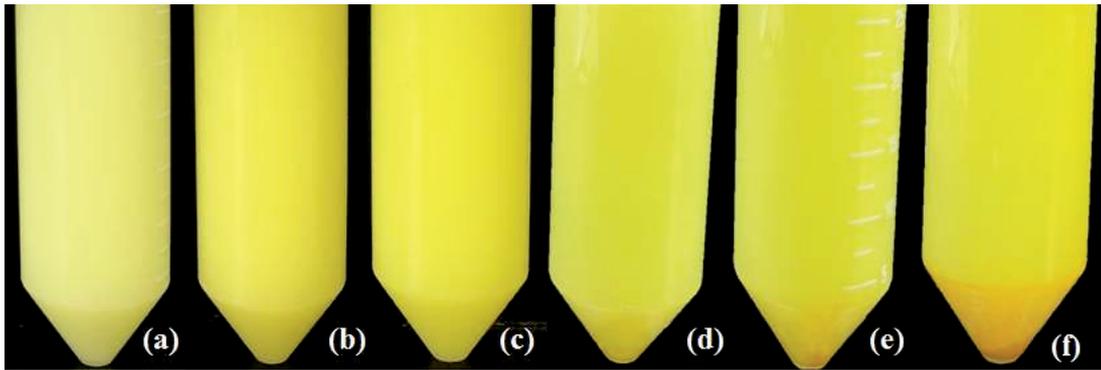


Figure 6. (A) Zeta-potential, (B) particle diameter, and (C) polydispersity index of blank NLC with different concentrations of Span 80. Data are expressed as the mean±standard deviation (n=3). <sup>a-g</sup>The means followed by the same letter are not significantly by Tukey's multiple range test at  $p < 0.05$ .

### 3.3. 커큐민 함량에 따른 NLC

#### 3.3.1. 외관 및 포집효율

커큐민 함량에 따른 커큐민 NLC 외관 및 포집 효율은 Fig. 7과 Fig. 8에 나타내었다. 커큐민 0.001-0.003% (w/v) 첨가하였을 때 94.51-95.88%로 커큐민 포집 함량은 유의적인 차이가 없었고, 0.004% (w/v) 이상 커큐민 첨가 함량이 증가함에 따라 포집함량은 유의적으로 감소하였다( $p < 0.05$ ). 또한 커큐민 함량이 0.004% (w/v) 이상 첨가하였을 때 실온에서 1일 이후 모두 침전물이 관찰되었다. Type 1 (Fig. 2)의 형태의 NLC의 경우 고체 지질 및 액체 지질의 화학구조에 따라 포집 효율이 영향을 받는데 사용 된 지질의 탄소사슬의 다양한 포화상태 및 길이 등을 다양한 glyceride에 의해 혼합하여 결합을 증가시켜 포집효율을 증가 시킬 수 있다(Khosa et al., 2018). 지용성인 포집물질은 액체지질에 용해되어 포집되기 때문에 액체지질의 용해도, 유화제에 따라 포집함량에 영향을 받는다(Tamjidi et al., 2013).



**Figure 7. Pictorial views nanostructured lipid carrier with different curcumin concentrations (% w/v). (a) 0.001%, (b) 0.002%, (c) 0.003%, (d) 0.004%, (e) 0.005%, (f) 0.018%.**

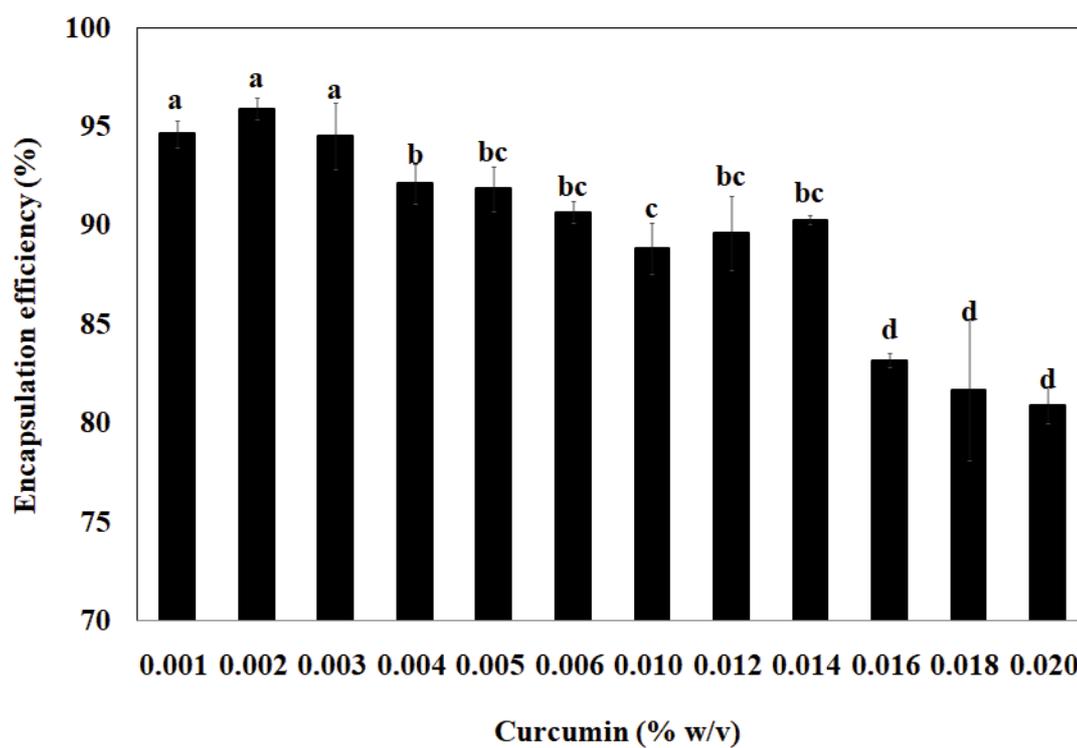


Figure 8. Encapsulation efficiency of nanostructured lipid carrier with different curcumin concentrations.

Data are expressed as the mean±standard deviation (n=3).

<sup>a-d</sup>The means followed by the same letter are not significantly by Tukey's multiple range test at  $p < 0.05$ .

### 3.3.2. 입자특성

커큐민 함량에 따른 입자크기 및 입도분포도는 Fig. 9에 나타내었다. 커큐민 함량에 따른 입자크기의 변화는 경향을 나타내지 않았으며, 118.18-139.83 nm로 경향을 나타내지 않았고, 포집 되지 않은 커큐민의 함량이 증가함에 따라 입도분포도 값은 증가하였다. 이는 포집되지 않은 커큐민으로 인해 다분산상으로 나타난 것으로 사료된다. 커큐민은 지용성 성분으로 NLC의 액체지질의 용해도에 대해 영향을 받는다. 즉 커큐민의 액체지질의 용해도가 증가, 액체 지질의 함량이 증가할수록 커큐민의 포집 함량은 증가 할 것으로 사료된다(Araiza-Calahorra et al., 2018). Blank NLC의 입자크기는 약 133.13 nm로 커큐민은 NLC의 큰 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다.

최적비율 및 제조방법으로 커큐민 NLC를 제조하였을 때 입자특성은 입자크기는 92.29 nm, 제타전위는 -26.96 mV, 입도분포도는 0.221, 포집효율을 92.62%로 측정되었다.

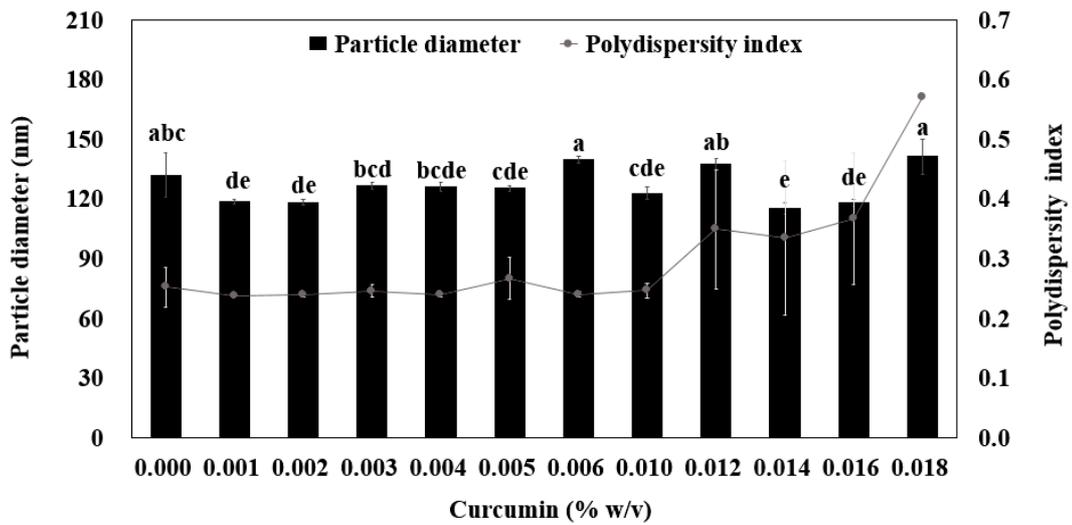


Figure 9. Particle diameter and polydispersity index of nanostructured lipid carrier with different curcumin concentrations.

Data are expressed as the mean±standard deviation (n=3).

<sup>a-e</sup>The means followed by the same letter are not significantly by Tukey's multiple range test at  $p < 0.05$ .

### 3.4. 커큐민 NLC 저장온도에 따른 안정성 관찰

#### 3.4.1. 외관

커큐민 NLC 저장온도에 따른 외관은 Table 4에 나타내었다. 커큐민 NLC 5°C, 21°C, 40°C, 65°C에서 저장한 NLC의 경우 모든 저장온도에서 상 분리는 없었다. 65°C에서 저장한 경우 상 분리는 일어나지 않았으나, 점차 NLC의 포집 효율 (Fig. 11)이 감소하는 결과로 보아 노란색을 띄는 커큐민이 높은 온도에 의해 분해되어 색이 연해지는 것으로 사료된다. 커큐민은 염기성 용매, 산소, 빛에 불안정하여 분해가 일어난다고 알려져 있다. 커큐민이 분해가 되면 4-vinyl guaiacol로 분해가 되고, 최종적으로는 vanillin, guaiacol과 isoeugenol 등 휘발성 페놀 화합물을 초래하고 비교적 친수성이므로 수상으로 이동하게 된다(Kharat et al., 2016). 이에 저장기간 동안 성분들이 가수분해 및 휘발되어(Esatbeyoglu et al., 2015) 커큐민 함량이 감소한 것으로 사료된다.

Table 4. Pictorial views of curcumin nanostructured lipid carrier at different temperatures during 28 day of storage

Storage period (day) Temperature (°C)	0	3	7	14	21	28
5						
21						
40						
65						

### 3.4.2. 입자특성

커큐민 NLC를 온도를 달리하여 28일 저장기간 동안의 입자크기, 제타전위 및 입도분포도는 Fig. 10에 나타내었다. 65°C에서 저장 한 경우 입자크기가 가장 많이 증가하였다. 저장기간 0일에서 28일 동안 91.29 nm에서 118.78 nm로 유의적으로 증가하였다( $p < 0.05$ ). 5°C 및 21°C에서 28일 저장 한 경우 입자크기는 각각 112.54 nm, 100.84 nm로 유의적으로 증가하였다( $p < 0.05$ ). 40°C에서 저장한 경우 저장기간 28일 입자크기는 94.95 nm로 증가하였으나 유의적인 차이가 없었다( $p > 0.05$ ). 온도에 의해 유화제 및 지질의 구조의 변화로 인해 입자크기가 증가하였을 것으로 사료된다. NLC의 고체지질인 glyceryl tristearate의 녹는점은 54.0–72.5°C이다. NLC를 제조할 때 고체지질과 액체지질을 혼합하기 위해 녹는점 이상 온도에서 가열 및 균질을 하게 된다. 이는 고체지질을 가열하여 액체지질과 혼합 및 포집물질을 혼합하고, 유화제 및 수상을 혼합하여 나노입자를 형성하게 되고 균질 과정 중 급격히 냉각시켜 불완전한 나노입자를 형성하게 된다. 하지만 저장과정 중 65°C에서 고체지질은 다시 녹는점 부근이므로, 나노입자구조에 결정화 형태로 유지하지 못할 것으로 사료된다. 또한 NLC는 높은 온도에서 무결정화의 상태로 존재하게 된다(Klucker et al., 2012). 그리하여 커큐민 방출에 영향을 미치는 고체지질이 결정화되지 않고 무결정 상태로 존재하기 때문에 커큐민의 방출이 용이하게 될 것으로 사료된다.

저장온도 21°C, 40°C의 저장기간 28일의 제타전위는 각각 -24.85 mV, -22.63 mV로 유의적으로 감소하였지만, 입도분포도는 두 온도 모두 저장기간 동안 유의적인 차이가 없었다( $p > 0.05$ ). 저장온도 65°C인 경우 제타전위, 입도분포도 모두 저장기간 7일 이후 28일 동안 급격히 감소하였다. 제타전위는 -16.88 mV, 입도분포도 0.093으로 측정되었다. 65°C에서 저장한 경우 커큐민 방출 및 분해되고, 높은 온도로 인한 지질의 산화 등이 진행 중일 것이고, 유화제 및 지질의 높은 온도에서 불안정하므로 제타전위의 절대값과 입도분포도는 감소한 것으로 사료된다.

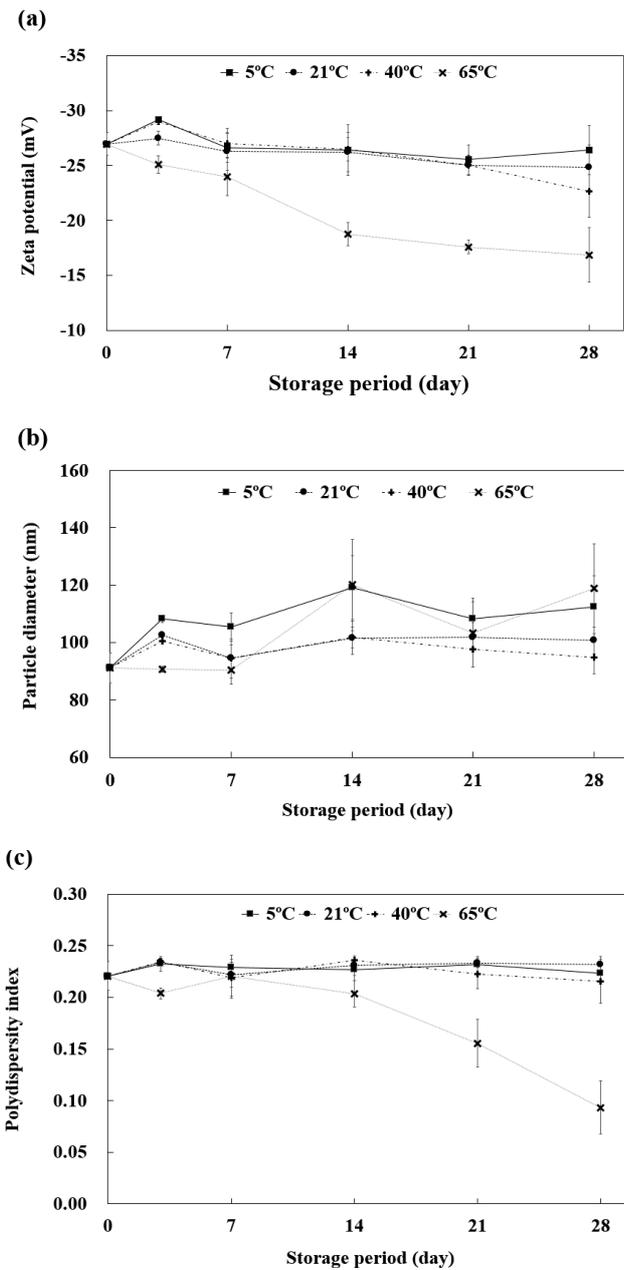


Figure 10. (a) Zeta-potential, (b) particle diameter, and (c) polydispersity index of curcumin nanostructured lipid carrier at different temperatures during 28 day of storage.

Data are expressed as the mean±standard deviation (n=3).

<sup>a-d</sup>The means followed by the same letter are not significantly by Tukey's multiple range test at  $p < 0.05$ .

### 3.4.3. 포집효율

커큐민 NLC를 온도를 달리하여 28일 저장기간 동안의 포집효율은 Fig. 11에 나타내었다. 저장온도 5°C, 21°C에서 저장한 경우 저장기간 28일의 포집효율은 각각 83.52%, 82.02%로 유의적으로 감소하였고, 40°C의 경우 저장기간 14일 이후 급격히 감소하였고, 28일 65.01%로 유의적으로 감소하였다. 65°C의 경우 저장기간 7일 이후 급격히 감소하여 28일 24.75%로 가장 큰 폭으로 감소하였다. NLC의 나노입자의 지질산화 및 지질의 불안정한 상태에서 커큐민은 높은 온도 노출 및 수상으로 노출되게 되어 구조적으로 불안정하여 산화, 가수분해 되어 커큐민의 함량이 감소 된 것으로 사료된다(Esatbeyoglu et al., 2015). 커큐민 NLC를 제조 후 저장하였을 때 5°C, 21°C에서 저장 하였을 때 비교적 안정하다.

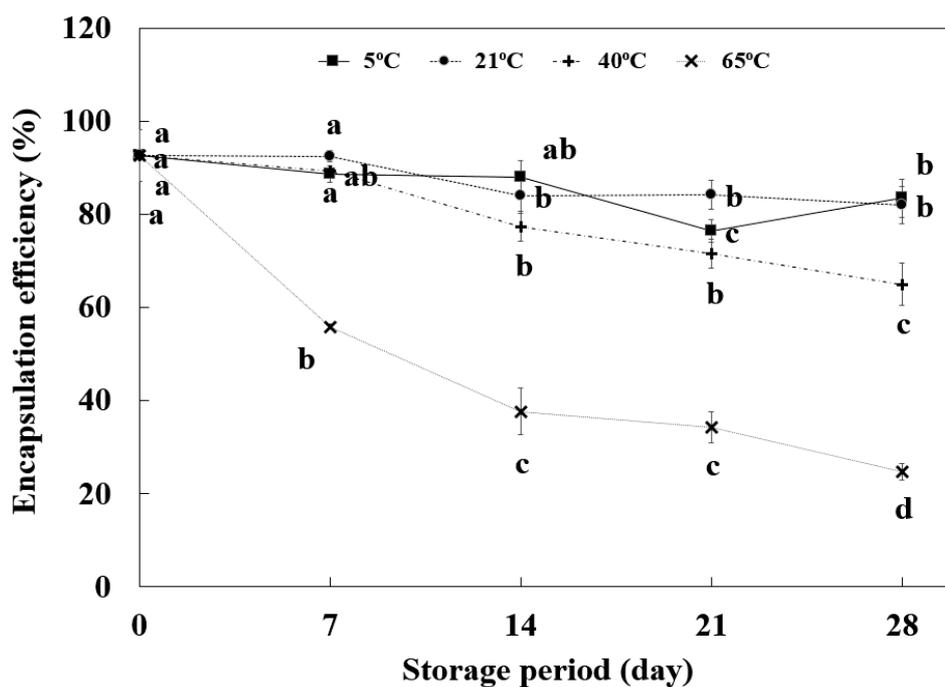


Figure 11. Encapsulation efficiency of curcumin nanostructured lipid carrier at different temperatures during 28 day of storage.

Data are expressed as the mean±standard deviation (n=3).

<sup>a-d</sup>The means followed by the same letter are not significantly by Tukey's multiple range test at  $p < 0.05$ .

### 3.5. 커큐민 NLC 소화모방시스템 적용

#### 3.5.1. 입자크기 및 커큐민 방출

커큐민 NLC를 소화모방시스템에 적용한 후 커큐민 NLC의 입자크기와 커큐민 방출을 Fig. 12에 나타내었다. 커큐민 NLC는 모방타액에서는 입자크기에 대한 변화가 없었으며, 모방위액에서는 165.27-180.83 nm로 증가하였으나, 초기 입자크기와 모방타액을 거친 입자크기와는 유의적인 차이가 없었으며( $p>0.05$ ), 소화시간에 따른 입자크기도 유의적인 차이가 없었다( $p>0.05$ ). 낮은 pH, 펩신에 의한 가수분해 안정성은 NLC를 둘러싸고 있는 비이온성 계면 활성제인 Tween 80에 대한 영향으로 사료된다. 비이온성 유화제는 pH에 대해 많은 영향을 받지 않고, pepsin은 단백질 분해효소로(Aken et al., 2011) 입자가 보다 안정적으로 유지될 수 있던 것으로 사료된다. 모방 장액에서는 소화시간 5분 이후부터 입자크기는 100 nm 이상 증가하였으며, 반응시간에 따라 유의적인 차이로 증가하였으며, 반응 시간 120분에서 445.12 nm로 측정되었다. 담즙 추출물 등 사용된 효소가 계면활성제, 지질층을 가수분해 시켜 유리지방산과 mono-acylglycerols 등이 생성된 것들이 미셀을 형성(Aditya et al., 2014; Park et al., 2017)하여 입자크기가 증가된 것으로 사료된다. pH만 조절 한 경우 pH와 온도를 조절하여 시간은 동일하게 하여 입자크기를 측정하였는데 시간, pH에 따른 입자크기는 큰 변화가 없는 것으로 측정되었다.

모방타액에서는 약 31.72%의 커큐민이 방출되었으며, 모방위액에서는 2시간 동안 커큐민이 36.00-37.73% 방출되었으며, 모방타액에서 측정된 커큐민 양과 유의적인 차이가 없었다( $p>0.05$ ). 모방장액에서는 5분 이후 48.05%로 증가하였으며, 30분 이후에는 74.52%로 증가하였으며, 이후 시간이 지날수록 방출된 커큐민의 양은 증가하면서 2시간 후에는 82%로 증가하였지만 30분 이후로는 유의적인 차이가 없었다( $p>0.05$ ). 또한 효소를 제외한 pH, 온도를 조절하여 방출되는 커큐민의 양을 측정하였을 때, pH가 6.8 이상일 때 커큐민의 방출되었으며, pH가 산성 조건일 때 처음 방출된 커큐민의 양과 유의적인 차이가 나지 않았으며( $p>0.05$ ), pH가 8 이상 되었을 때 커큐민 방출량은 30.91-53.57%로 10분 이후로 유의적으

로 증가하였다( $p < 0.05$ ). 커큐민은 pH에 대한 영향을 많이 받는데 알칼리환경에서는 수상과 유상의 계면에서 산화 및 가수분해 반응이 일어나 bicyclopentadione, ferulic acid, feruloylethane과 같은 반응 생성물을 생성하게 된다. 이런 분해 생성물의 대부분은 비교적 친수성이므로 수상으로 이동하게 되는데 불안정한 상태가 된다. 하지만 평형 상태를 회복하기 위해, 더 많은 커큐민 분자는 유상에서 계면으로 이동하여 분해과정이 계속 될 것이다(Kharat et al., 2017). 산성 pH에서 커큐민은 주로 enolic 구조로 존재하므로 주요 분해 매커니즘은 가수분해보다 산화가 주원인이다. pH의 영향에 의해 커큐민이 방출되기도 하지만, Fig. 12 입자크기를 고려하였을 때 효소에 의해 NLC의 입자크기가 증가하면서 효소 및 pH에 의해 커큐민 방출량이 82%로 증가한 것으로 사료된다. 커큐민은 알칼리 조건에서 빠르게 분해가 되기 때문에 소화기관에서 장까지 커큐민이 유지되기 쉽지 않다.

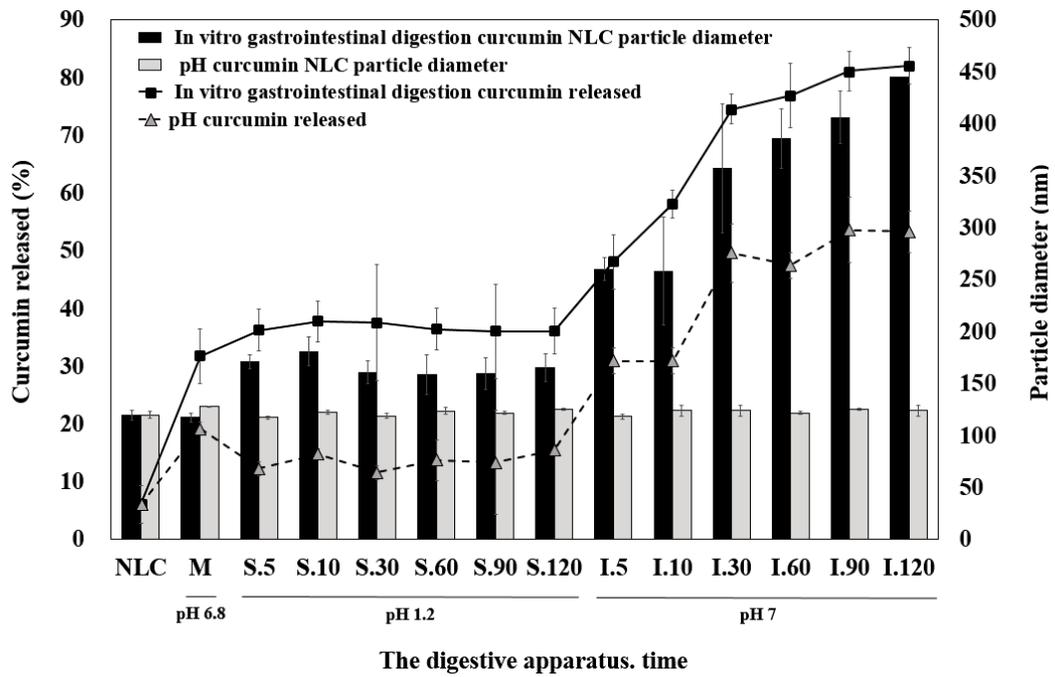


Figure 12. Influence of simulated gastrointestinal conditions and pH on the particle diameter and curcumin released of curcumin nanostructured lipid carrier.

Data are expressed as the mean±standard deviation (n=3).

<sup>a-g</sup>The means followed by the same letter are not significantly by Tukey's multiple range test at  $p < 0.05$ .

## 4. 결론

본 연구에선 난용성 물질인 커큐민의 안정성 및 이용률을 높이기 위하여 커큐민을 포함하는 지질 수송체 nanostructured lipid carrier (NLC)를 제조하기 위한 최적 조건을 확립하고 다양한 특성을 관찰하였다. 커큐민 NLC 제조 최적 배합조건은 수상은 증류수 100 mL, Tween 80 0.30% (w/v), 유상은 커큐민 0.003% (w/v), glycerol tristearate 0.60% (w/v), MCT oil 0.24% (w/v), Span 80 0.30% (w/v)로이며, 초고압 균질법(20,000 psi, 3 number)으로 미세입자화 하였다. 커큐민 NLC는 입자크기는 91.29 nm, 제타전위는 -26.96 mV, 입도분포도는 0.22로 제조되었다. 또한 커큐민 NLC의 환경변화에 따른 안정성을 측정하기 위하여 저장온도를 달리하여 28일 동안 저장안정성을 측정하였는데, 5°C, 상온(21±2°C)에서 비교적 커큐민 NLC가 안정적으로 유지되었으나, 40°C에서는 저장기간 7일 이후 포집효율이 급격히 감소하였고, 65°C에서 저장한 경우 저장시간 7시간 이후로 급격히 포집효율이 감소하였다. 커큐민 NLC가 분산된 용액의 색이 커큐민이 방출되면서 온도 및 산화되어 분해하여 연해졌다. 커큐민 NLC를 소화모방시스템에 적용하여 NLC의 변화를 측정한 결과 커큐민 NLC는 모방타액에서 약 31%의 커큐민이 방출되었고, 모방위액에서는 입자크기 및 방출을 유지하였으며, 모방장액에서 소화시간이 증가할수록 입자크기가 및 커큐민 방출이 증가하였다.

NLC는 커큐민을 가용화를 위한 효과적인 수송체로 수용해도를 증가시켜 다양한 식품에 적용할 수 있을 것으로 기대되며, 또한 생체 이용률 및 커큐민의 저장안정성을 증가시킬 수 있을 것으로 사료된다.

## 국문 요약

본 연구에서는 난용성 물질인 커큐민의 이용률을 높이기 위해서 MCT 오일을 이용한 지질수송체 NLC 최적 제조 최적 비율을 선정하고, 커큐민 NLC를 제조하여 저장 온도에 따른 커큐민 NLC의 안정성(입자특성, 커큐민 포집함량)과, 인체 모델 소화시스템에 적용하였을 때의 입자크기 변화 및 커큐민 방출을 분석하였다. 첫 번째로 NLC에 사용할 액체 지질을 선정해야 하는데 대표적으로 많이 쓰이는 MCT 오일과 soybean 오일을 비교하여 커큐민의 용해도를 측정하였다. MCT 오일은 1341,27  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , soybean 오일은 657.06  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 MCT 오일의 용해도가 높아 MCT 오일을 NLC의 액체 지질로 선정하였다. 커큐민 NLC를 제조하기 앞서 MCT오일을 이용한 안정한 NLC가 제조되어야 한다. NLC는 o/w과 유사하게 오일상이 수상으로 분산되는 형태이기 때문에 처음으로 친수성 유화제인 Tween 80을 이용하였다. Tween 80 0.1-4% (w/v)를 첨가하여 blank NLC를 제조하였을 때 외관을 관찰하였다. 0.3 및 0.4% (w/v)를 제외 한 blank NLC는 응집물 또는 침전물이 관찰되었다. 그리고 안정한 blank NLC를 제조하기 위해 입자크기를 감소시키고 입자분산도를 높이기 위해 초고압 균질 횟수(1회, 2회, 3회)를 달리하여 입자특성을 나타내었다. 초고압 균질 횟수가 증가함에 따라 입자크기 및 입도분포도는 감소하였고, 제타전위의 절대값은 증가하였다. NLC의 입자크기 및 제타전위는 초고속 균질 2회와 유의적인 차이는 없었지만, 입도분포도를 고려해 초고압 균질 횟수는 3회로 선정하였다. 더욱 안정한 NLC를 제조하기 위해 Tween 80 0.3% (w/v) 및 0.4% (w/v)를 첨가 한 후 친유성 유화제인 Span 80을 농도별로 첨가에 따른 blank NLC 입자특성을 측정하였다. 초고압 균질의 횟수가 증가할수록 입자크기 및 입도분포도는 감소하고, 제타전위의 절대값은 증가하였다. Tween 80 0.4% (w/v), Span 80의 첨가량에 따른 제타전위는 유의적인 차이가 없었고, 입자크기는 Tween 0.3% (w/v)의 경우 Span 80의 0.3% (w/v) 이상 첨가하면 감소하였고, Tween 0.4% (w/v)의 경우 Span 80 첨가량에 따라 입자크기는 증가하는 경향을 보였다. 입도분포도는 Span 80 첨가량이 증가함에 따라 증가하였지만 유의적인 차이는 없었다. Tween 80 0.3% (w/v)의 경우

Span 80 첨가량이 증가함에 따라 증가하였지만, 0.2% (w/v) 이상부터 유의적인 차이가 없었고, 0.25이하로 단분산상을 나타내었다. MCT 오일을 이용한 blank NLC 최적조건은 Tween 80 0.3% (w/v)와 Span 80 0.3% (w/v)로 선정하여 커큐민을 함유한 NLC를 제조하여 포집함량과 입자크기 및 입도분포도를 측정하였다. 커큐민 함량은 0.001-0.018% (w/v)를 첨가하여 제조하였으며, 0.004% (w/v) 이상 첨가하였을 때 포집함량은 유의적으로 감소하였으며, 저장 기간 1일 이후 NLC에 침전물이 관찰되었다. 입자크기는 첨가량에 따라 유의적인 차이가 없었으며, 입도분포도인 경우에는 첨가량에 따라 증가하였다. 이는 포집되지 않은 커큐민의 영향인 것으로 사료되었고, 최적 제조조건으로 커큐민 NLC 제조 한 후 저장 온도 (5°C, 21±2°C, 40°C, 65°C)에 따른 안정성 및 인체 소화시스템에 적용하여 입자특성 및 포집함량 및 커큐민 release를 측정하였다. 저장기간동안 외관으로는 상분리 및 응집, 침전물은 생성되지 않았으나 65°C에서 저장한 커큐민 NLC의 경우 색이 점차 연해지는 것으로 관찰되었다. NLC에 사용된 고체지질의 녹는점은 54-72.5°C로 65°C에서는 고체지질의 결정화가 되지 않았을 것으로 사료되고, 또한 온도에 의한 지질의 산화로 구조적으로 불안정화 되어, 저장기간동안의 포집함량을 감소하게 되고 감소할수록 색은 연해지는 경향을 보였다. 포집함량은 5°C, 21±2°C의 커큐민 NLC는 0일에서 28일 동안 92.62%에서 각각 83.52%, 82.02%로 비교적 안정하였으며 40°C는 저장기간 28일 65.01%로 저장기간 7일 이후 급격히 감소하였다. 65°C인 경우 저장시간 7시간 이후 급격히 감소하는 경향을 보였으며, 28일에는 24.75%로 측정되었다. 커큐민은 염기성 용매, 산소, 빛에 불안정하여 분해가 일어나는데 분해가 되면 4-vinyl guaiacol로 분해가 되고, 최종적으로는 vanillin, guaiacol과 isoeugenol 등 휘발성 페놀 화합물을 초래한다(Esatbeyoglu et al., 2015). 이에 저장기간 동안 성분들이 휘발되 커큐민 함량이 감소한 것으로 사료된다. 커큐민 NLC의 입자크기는 91.29 nm로 저장온도 5°C, 21±2°C, 65°C에서 저장한 경우 28일 저장하여 각 112.54 nm, 100.84 nm, 118.78 nm로 유의적으로 증가하였으며 40°C에서 저장한 경우 94.95 nm로 증가하였으나 유의적인 차이가 없었다. 5°C에서 저장한 커큐민 NLC는 28일 저장기간동안 제타전위와 입도분포도는 유의적인 차이가 없었고 21±2°C, 40°C 커큐민 NLC인 경우 0일에서 28일 동안 -26.96 mV에서 각각 -24.85 mV, -22.63 mV

로 유의적으로 감소하였지만 입도분포도인 경우 유의적인 차이가 없었다. 저장온도 65°C인 경우 저장기간 7일 이후 28일동안 급격히 감소하였다. 제타전위는 -16.88 mV, 입도분포도는 0.093으로 측정되었다. 제타전위인 경우 지질담체의 산화 및 커큐민 방출 및 분해에 의해 감소된 것으로 사료된다. 모델 소화시스템 적용 후 입자크기는 모델 위액에서 2시간 동안 입자크기는 유지하였으며 모델 장액에서 lipase 및 담즙 추출물에 의해 입자크기가 증가하였다. 커큐민 방출은 pH, lipase 및 담즙 추출물에 의해 입자크기가 증가하여 커큐민 방출에 영향을 미친 것으로 사료된다.

## REFERENCES

- Aditya NP, Macedo AS, Doktorovova S, Souto EB, Kim S, Chang PS, Ko SH. Development and evaluation of lipid nanocarriers for quercetin delivery: a comparative study of solid lipid nanoparticles (SLN), nanostructured lipid carriers (NLC), and lipid nanoemulsions (LNE). *LWT-Food Sci. Technol.* 59: 115-121 (2014).
- Aggarwal BB, Kumar A, Bharti A. Anticancer potential of curcumin: Preclinical and clinical studies. *Anticancer Res.* 23: 363-398 (2003).
- Ahmed K, Li Y, McClements DJ, Xiao H. Nanoemulsion- and emulsion-based delivery system for curcumin: Encapsulation and release properties. *Food Chem.* 132: 799-807 (2012).
- Ak T & Gulcin İ. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. *Chem. Biol. Interact.* 174: 27-7 (2008).
- Araiza-Calahorra A, Akhtar M, Sarkar A. Recent advances in emulsion-based delivery approaches for curcumin: From encapsulation to bioaccessibility. *Trends Food Sci. Tech.* 71: 155-169 (2018).
- Artiga-Artigas M, Lanjari-perez y, Martin-Belloso O. Curcumin-loaded nanoemulsions stability as affected by the nature and concentration of surfactant. *Food Chem.* 266: 466-474 (2018).
- Attama AA, Momoh MA, Builders PF. Lipid nanoparticulate drug delivery system: a revolution in dosage form design and development. In: Sezer AD, editor. *Pharmacology, Toxicology and Pharmaceutical Science*. InTech (2012)
- Balasubramanian S, Eckert RL. Curcumin suppresses AP1 transcription factor-dependent differentiation and activates apoptosis in human epidermal keratinocytes. *J. Biol. Chem.* 282: 6707-6715 (2006).
- Bisht S, Feldmann G, Soni S, Ravi R, Karikar C, Maitra A, Maitra A. Polymeric nanoparticle-encapsulated curcumin ("nanocurcumin"): a novel

- strategy for human cancer therapy. *J. Nanobiotechnology*. 5: 1-18 (2007).
- Chae KY, Kwon SS, Park SN. A study on nano-emulsion for enhanced transdermal delivery of Hippophae rhamnoides leaf extract. *Appl. Chem. Eng.* 24: 260-265 (2013).
- Esatbeyoglu T, Ulbrich K, Rehberg C, Rohn S, Rimbach G. Thermal stability, antioxidant, and anti-inflammatory activity of curcumin and its degradation product-vinyl guaiacol. *Food Funct.* 6: 887-893 (2015).
- Fujisawa S, Atsumi T, Ishihara M, Kadoma Y. Cytotoxicity, ROS-generation activity and radical-scavenging activity of curcumin and related compounds. *Anticancer Res.* 24: 563-569 (2004).
- Gong C, Wu Q, Wang Y, Zhang D, Luo F, Zhao X, Wei Y, Qian Z. A biodegradable hydrogel system containing curcumin encapsulated in micelles for cutaneous wound healing. *Biomaterials.* 34: 6377 - 6387 (2013).
- Hasan M, Belhaj N, Benachour H, Barberi-Heyob M, Kahn CJ, Jabbari E, Linder M, Arab-Tehrany E. Liposome encapsulation of curcumin: physico-chemical characterizations and effects on MCF7 cancer cell proliferation. *Int. J. Pharm.* 461: 519-528 (2014).
- Heger M, van Golen RF, Broekgaarden M, Michel MC. The molecular basis for the pharmacokinetics and pharmacodynamics of curcumin and its metabolites in relation to cancer. *Pharmacol Rev.* 66: 222-307 (2014).
- Hussain Z, Thu HE, Amjad MW, Hussain F, Ahmed TA, Khan S. Exploring recent developments to improve antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial efficacy of curcumin: A review of new trends and future perspectives. *Mater. Sci. Eng. C.* 77: 1316-1326 (2017).
- Jo YJ, Kim HY, Kwon YJ. Influence of biopolymer emulsifier on the characteristics of curcumin nanoemulsions. *Food Eng. Prog.* 20: 321-327 (2016).
- Jo YJ, Lee SB, Lee JK, Kwon YJ. Preparation of nanoemulsions containing curcumin by high pressure homogenization. *Food Eng. Prog.* 18: 341-347

- (2014).
- Joung OG, Choi MF, Kim JT, Park SH, Park HJ, Shin GH. Development of food-grade curcumin nanoemulsion and its potential application to food beverage system: Antioxidant property and *in vitro* digestion. *J Food Sci.* 81: 745–753 (2016).
- Jun YK, Lim YM, Jin BS. Characteristics of  $\alpha$ -tocopherol-loaded nanostructured lipid carriers and their stabilization effect. *App. Che. Eng.* 26: 659–665 (2015).
- Ahmed K, Yan Li, McClements DJ, Xiao H. Nanoemulsion- and emulsion-based delivery systems for curcumin: Encapsulation and release properties. *Food Chem.* 132: 799–807 (2012).
- Kharat M, Du Z, Zhang G, McClements DJ. Physical and chemical stability of curcumin in aqueous solutions and emulsions: impact of pH, temperature, and molecular, environment. *J. Agric. Food Chem.* 65: 1525–1532 (2017)
- Khosa A, Reddi S, Saha RN. Nanostructured lipid carriers for site-specific drug delivery. *Biomed Pharmacother.* 103: 598–613 (2018).
- Kim CE, Park ES, Jeon YH. Curcumin attenuates chronic constriction nerve injury-induced neuropathic pain in rats. *Korean J. Med. Crop. Sci.* 16: 183–187 (2008).
- Kim MS. The effects of fatty alcohol and fatty acid on the stability of O/W emulsion. MS thesis, Soonsil University, Seoul, Korea (2008).
- Klucker MF, Dalencon F, Probeck P, Haensler J. AF03, an alternative squalene emulsion-based vaccine adjuvant prepared by a phase inversion temperature. *J. Pharm. Sci.* 12: 4490–4450 (2012).
- Lee BH & Lee NM. Effects of surfactant molecules head- and tail-groups on the solubilization of p-chlorobenzoic acid. *J. Korean Chem. Soc.* 59: 379–386 (2015).
- Li Q, Cai T, Huang Y, Xia X, Cole SPC, Cai Y. A review of the structure, preparation, and application of NLCs, PNPs, and PLNs. *Nanomaterials.* 7:

- 1-25 (2017).
- Lim JS, Gang HJ, Yoon SW, Kim HM, Suk JW, Kim DU, Lim JK. Preparation and its stability of a coenzyme Q10 nanoemulsion by high pressure homogenization with different valve type conditions. *Korean J. Food Sci. Technol.* 42: 565-570 (2010).
- Ma Z, Haddadi A, Molavi O, Lavasanifar A, Lai R, Samuel J. Micells of poly(ethylene oxide)-b-poly(epsilon-caprolactone) as vehicles for the solubilization, stabilization, and controlled delivery of curcumin. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 86: 300-310 (2008).
- Madane RG & Mahajan HS. Curcumin-loaded nanostructured lipid carriers (NLC) for nasal administration: design, characterization, and *in vivo* study. *Drug Delivery.* 23: 1326-1334 (2014).
- Mao Y & McClements DJ. Influence of electrostatic heteroaggregation of lipid droplets on their stability and digestibility under simulated gastrointestinal conditions. *Food & Function.* 33: 1025-1034 (2012).
- McClements DJ and Li Y. Structured emulsion-based delivery systems: Controlling the digestion and release of lipophilic food components. *Adv. Colloid. Interface Sci.* 159: 213-228 (2010).
- McClements DJ. Food emulsions: principles, practices, and techniques, third edition, CRC Press, Boca Raton, FL (2015).
- Muller RH, Radtke M, Wissing SA. Nanostructured lipid matrices for improved microemulsification of drugs. *Int. J. Pharm.* 242: 121-128 (2002).
- Nanji AA, Jokelainen K, Tipoe GL, Rahemtulla A, Thomas P, Dannenberg AJ. Curcumin prevents alcohol-induced liver disease in rats by inhibiting the expression of NF-kappa B-dependent genes. *Am. J. Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 284: G321-327 (2003).
- Park SJ, Garcia CV, Shin GH, Kim JT. Development of nanostructured lipid carriers for the encapsulation and controlled release of vitamin D<sub>3</sub>. *Food Chem.* 225: 213-219 (2017).

- Petsev DN. Emulsion: structure stability and interactions. In: Petsev DN, editor, Academic Press, USA (2004).
- Pinheiro AC, Coimbra MA, Vicente AA. In vitro behaviour of curcumin nanoemulsions stabilized by biopolymer emulsifiers—effect of interfacial composition. *Food Hydrocolloids*. 52: 460–467 (2016).
- Sari TP, Mann B, Sharma R, Kumar R, Vikrant, Minaxi. Process optimization for the production of nanoencapsulated curcumin and analysis for physicochemical characteristics and antioxidant mechanism. *IJBRR* 4: 581–586 (2013).
- Selvam C, Jachak SM, Thilagavathi R, Chakraborti AK. Design, synthesis, biological evaluation and molecular docking of curcumin analogues as antioxidant, cyclooxygenase inhibitory and anti-inflammatory agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett*. 15: 1793–1797 (2005).
- Sun Y, Xia Z, Zheng J, Qiu P, Zhang L, McClements DJ, Xiao H. Nanoemulsion-based delivery systems for nutraceuticals: influence of carrier oil type on bioavailability of pterostilbene. *J. Funct. Foods*. 13: 61–70 (2015).
- Sari TP, Mann B, Kumar R, Singh RRB, Sharma R, Bhardwaj M, Athira S. Preparation and characterization of nanoemulsion encapsulating curcumin. *Food Hydrocolloids*. 43: 540–546 (2015).
- Tejada S, Manayi A, Daglia M, Nabavi SF, Sureda A, Hajheydari Z, Gortzi O, Pazoki-Toroudi H, Nabavi SM. Wound healing effects of curcumin: a short review. *Curr. Pharm. Biotechnol*. 17: 1002–1007 (2016).
- Thangapazham RL, Sharma A, Maheshwari RK. Beneficial role of curcumin in skin diseases. *J. Med. Biol*. 595: 343–357 (2007).
- Tamjidi F, Shahedi M, Varshosaz J, Nasirpour A. Nanostructured lipid carriers (NLC): a potential delivery system for bioactive food molecules. *Innov. Food Sci. Emerg. Tech*. 19: 29–43 (2013).
- Tonnesen HH, Masson M, Loftsson T. Studies of curcumin and curcuminoids. XXVII. Cyclodextrin complexation: solubility, chemical and photochemical

- stability. *Int. J. Pharm.* 244: 127-135 (2002).
- van Aken GA, Bomhof E, Zoet FD, Verbee k M, Oosterveld A. Differences in *in vitro* gastric behaviour between homogenized milk and emulsions stabilised by Tween 80, whey protein, or whey protein and caseinate. *Food Hydrocolloids.* 25: 781-788 (2011).
- Zou L, Zheng B, Liu W, Liu C, Xiao H, McClement DJ. Enhancing nutraceutical bioavailability using excipient emulsions: Influence of lipid droplet size on solubility and bioaccessibility of powdered curcumin. *J. Funct. Foods.* 15: 72-83 (2015).

## 감사의 글

저에게 도전한다는 것이 항상 어려워 피하려고 하였습니다. 그래서 막연하고, 힘들 것이라 생각하던 대학원 과정이 끝나간다는 사실이 실감이 나지 않았습니다. 대학교, 대학원 과정들을 되돌아보면 두려운 기억보다는 다양한 경험을 통해서 혼나고, 배우면서 성장할 수 있었던 것이 기억에 남는 것 같습니다. 이 과정 중에 정말 감사한분들이 많았고 이분들 덕분에 제가 여기까지 올 수 있었던 것 같습니다.

우선 부족한 제가 대학교, 대학원 석사과정을 마칠 수 있도록 도와주시고, 항상 아낌없이 조언해주시고, 많은 가르침을 주신 고영환 교수님, 임상빈 교수님, 김현정 교수님, 박은진 교수님, 천지연 교수님께 감사드립니다. 또한 많은 유익한 정보를 전해주시고, 학교생활을 잘 할 수 있도록 도와주신 조만재 선생님, 김효진 선생님, 강유리 선생님, 이재희 선생님께 감사드립니다.

그리고 아무것도 몰랐던 저에게 찾아 볼 때 마다 친절하게 가르쳐 주신 김동신 선배님과 홍동완 선배님 감사합니다. 동기인 윤형 오빠, 효석 오빠, 란 언니, 하정이에게 감사드립니다. 덕분에 학교생활을 항상 즐거웠고, 많은 추억을 만들고, 활기차게 지낼 수 있었습니다. 또한 제가 지칠 때나 행복 할 때 같이 있어주었고, 또한 여러 방면으로 도와주셔서 여기까지 올 수 있었습니다. 그리고 하영, 두리, 은성, 혜윤, 지희, 수아, 민주, 정현에게 감사드리고 도움이 필요할 때 많이 도와주셔서 여기까지 올 수 있었던 것 같습니다.

그리고 항상 내편이 되어주고 이해해준 지원이, 희주, 경은이, 연주, 우준이, 선배님들과 제 자신도 저를 믿지 못할 때 저를 항상 믿어주시고 힘들 때 위로해주신 지도교수님 천지연 교수님께 정말 감사합니다. 마지막으로 항상 제가 하는 일에는 지원해주며 묵묵히 기다려주시고, 할 수 있다고 말씀해주신 가족들에게도 감사한마음을 전합니다.

많은 분들의 도움으로 저는 성장 할 수 있었고, 여러 경험을 할 수 있는 기회를 얻을 수 있었던 것 같습니다. 이 고마움 잊지 않고 간직 하여 더욱 성장하도록 노력하겠습니다.