

Antioxidant effect of Vitamin-C / alginate gel-entrapped liposomes for resistance of DHA autoxidation

한성철, 허은정, 이기영, 김연주¹

전남대학교 물질·생물화학공학과, 응용화학부, 광주보건대학 피부미용과¹

전화 (062) 530-0327, FAX (062) 530-1869

Abstract

The resistance of docosahexaenoic acid (DHA) incorporated L- α -phosphatidyl -choline (PC) liposomes against autoxidation was studied for application to food and cosmetic industry. For the preparation of vitamin-C/calcium alginate gel entrapped DHA-PC-liposomes (AVDLs), DHA incorporated PC bilayer was hydrated with vitamin-C containing calcium alginate solution, and the fraction containing liposome was suspended in CaCl₂ solution. DHA loading efficiency was calculated by TLC scanning method. The morphological examination of AVDLs was performed with transmission electron microscopy (TEM) and lipid peroxidation was measured with an assay for thiobarbituric acid reactive substance (TBARS). DHA loading efficiency was about 17 % of initial loading volume, and when AVDLs containing 0.2 % vitamin C, lipid oxidation was minimized.

서론

DHA는 탄소수가 22개, 이중결합이 6개인 다중불포화지방산 (polyunsaturated fatty acid ; PUFA)중 ω -3계열인 EPA, α -리놀산등과 유사한 물질로 생체 및 생리활성작용에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 잘 알려져 있다¹⁾. 또한 DHA는 정상적인 성장과 발육, 심장혈관 질병, 고혈압, 염증이나 면역 장애, 당뇨병, 그리고 암의 예방과 치료에 있어서 필수적인 것으로 여겨진다²⁾. 그러나 지질은 자연산화하는 특성이 있으며 지질의 산화는 음식이나 첨가물의 품질을 저하시킨다³⁾. 리포솜은 생화학, 물리화학 분야에서 생체막의 모델로서 널리 연구되어 왔으며 수용성 약물과 지용성 약물을 모두 포함할 수 있는 장점을 가지고 있다⁴⁾. Alginate acid는 해양 조류에서 추출한 다당류로서 α -L-gluronic acid와 1,4-결합된 β -D-mannuroic acid의 block 공중합체로 이루어져 있으며, calcium 이온의 존재 하에서 soft hydrogel을 형성한다⁵⁾. 수용성인 vitamin C는 인간이나 일부 포유류의 영양에 필수 요소이며 항산화제로 잘 알려져 있다⁶⁾. 본 실험

에서는 리포솜의 인지질에 DHA를 병합시킨 후 vitamin C가 포함된 alginate 용액으로 수화시키고, CaCl₂ 용액으로 내부의 alginate 용액을 가교결합 시킴으로서 AVDLs를 제조하고 항산화 효과를 평가하였다.

재료 및 방법

재료 DHA는 두산식품(주)에서 공급받아 사용하였으며 PC (from egg yolk)와 sodium alginate (from Kelp, 250 cps)는 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하여 사용하였고 그 외의 시약은 시약등급 이상의 것을 사용하였다.

리포솜의 제조 AVDLs를 제조하기 위하여 100 mg의 PC와 80 μ l의 DHA를 3 mL의 chloroform에 녹인 후 질소가스 하에서 용매를 완전히 제거하여 DHA-PC박막을 제조하였다. 0 ~ 1.0 % (w/v) vitamin C를 녹인 1% (w/v) sodium alginate 용액을 제조한 후 각각 지질이 든 마개가 달린 vial에 10 mL씩 첨가하고 3시간 동안 실온에서 교반하여 지질을 수화시켰으며 균일한 크기의 리포솜을 얻기 위하여 10초 동안 sonication 시켰다. 현탁액은 초원심분리기를 이용하여 100,000 rpm에서 20분동안 원심분리하고 상등액을 제거한 후 50 mM Tris-HCL (pH 7.5) buffer 로 재현탁하는 과정을 3회 반복하여 리포솜에 포함되지 않은 지질과 알지네이트 용액을 제거하였다. 얻어진 분획물은 100 mM CaCl₂ 용액 3 mL를 첨가하여 현탁시킨후 4°C에서 하루동안 정치하여 AVDLs를 제조하였다.

DHA 정량 AVDLs를 chloroform과 methanol이 2 : 1로 혼합된 용액에 녹이고 10초 동안 sonication한 후 원심분리하여 포함된 DHA를 추출하였다. 5 μ l의 시료를 TLC판에 점적한 후 n-hexane : diethyl ether : acetic acid가 80 : 20 : 1 (v/v)로 혼합된 전개용매에 전개하였고, 황산과 methanol이 1 : 18로 혼합된 발색시약으로 발색 시켰다. 발색된 TLC판은 TLC scanning method에 의하여 분석하였다. **TBARS assay.** TBARS assay는 지질의 산화에 의해서 생성된 malondialdehyde (MDA)를 비색 정량하는 방법이다. 먼저, AVDLs를 Edwin N. Frankel등의 방법⁷⁾에 따라 제조된 AVDLs 현탁액 3 mL를 40°C incubator에서 산화시켰다. 산화된 각각의 시료를 0.1 mL 취한 후 10% Trichloroacetic acid (TCA) 1 mL(w/v, in D.W.)와 0.67 % Thiobarbituric acid(TBA), 0.05% Butylated hydroxytoluene (BHT)가 포함된 1 mL메탄올 용액에 가하고 15분 동안 100°C에서 가열하였다. 발색된 용액은 실온에서 냉각한 후 butanol(2:1 v/v)을 첨가하여 남아있는 지방산 및 단백질을 제거하고 10분 동안 15000 rpm에서 원심분리하여 침전물을 제거하였으며 그 후 535 nm에서 흡광도를 측정하였다⁸⁾. MDA의 양을 계산하기 위하여 1.56×10^5 /Mcm의 흡광계수를 사용하였다.

결과 및 고찰

제조된 AVDLs를 TEM을 이용하여 관찰해 본 결과 vitamin C를 포함하지 않은 리포솜은 100 nm이하의 크기를 가지며 vitamin C가 포함된 AVDLs의 경우 이보다 더 큰 리포솜이 형성된 것을 확인할 수 있었다. 제거되지 않은 alginate로 인하여 엉겨붙은 AVDLs(화살표)가 관찰된다(Figure 1). TLC를 사용하여 DHA의 양을 분석하고 적재효율을 계산한 결과 각각의 AVDLs는 초기 봉입량의 약 17 %의 DHA를 포함하고 있는 것으로 나타났다(Figure 2. a). TBARS assay에 의해서 AVDLs의 산화 정도를 평가한 결과 vitamin C를 첨가하지 않은 리포솜은 첨가한 리포솜보다 급격하게 산화되는 것을 알 수 있었다(Figure 2. b). 또한 AVDLs의 경우 3일 까지 산화에 안정한 것으로 나타났다.

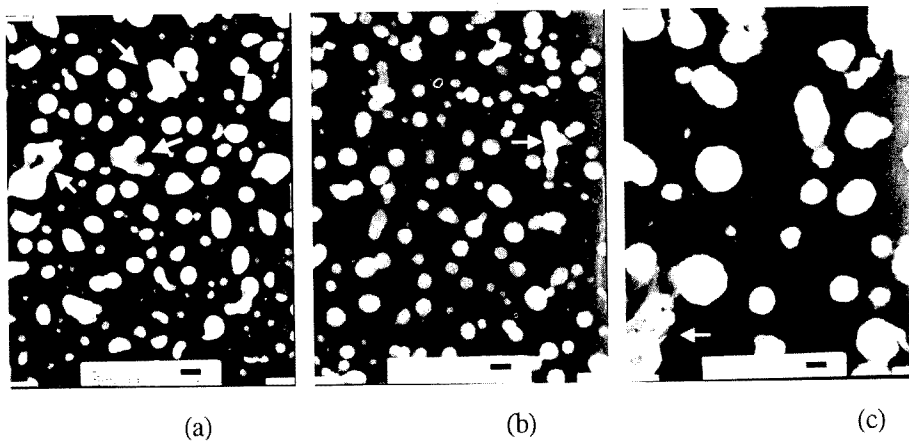


Figure 1. TEM photograph of negatively stained liposomes. (a) only alginate entrapped liposome, (b) alginate-DHA-liposome, (c) AVDLs, 100 nm bar.

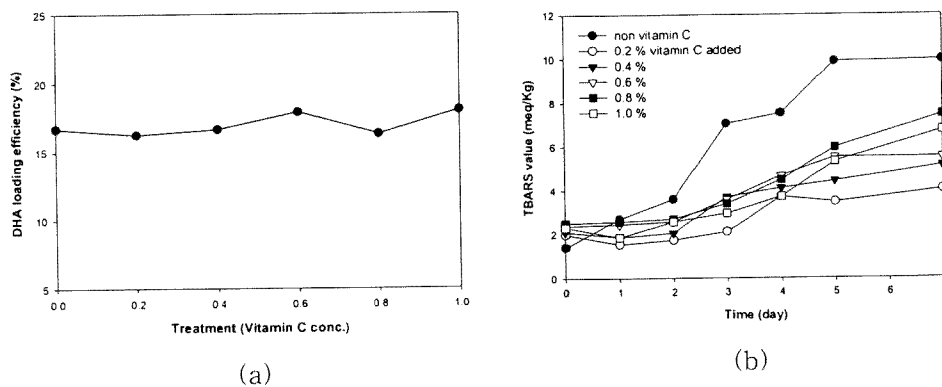


Figure 2. (a) DHA loading efficiency of AVDLs, (b) antioxidant effect of AVDLs at 40°C in air.

요약

DHA의 산화를 방지하기 위하여 vitamin C/alginate 리포솜에 병합시켰다. TEM을 통하여 제조된 AVDLs를 확인할 수 있었고, TLC를 통하여 각각의 AVDLs는 초기 첨가량의 15 ~ 18 % DHA를 함유하고 있음을 확인하였다. TBARS assay에 의해 40 °C에서 AVDLs에 포함된 DHA의 산화정도를 분석한 결과 vitamin C를 포함한 리포솜이 DHA의 산화를 억제하는 것으로 확인되었으며 0.2 % vitamin C를 포함한 AVDLs가 항산화 효과가 가장 큼을 알 수 있었다. AVDLs는 실험에서와 같은 산화조건에서 DHA의 산화를 초기 3일까지는 억제시킴을 알 수 있었다.

참고문헌

1. Hidefumi Yoshii, Takeshi Furuta, Kawasaki, Hiroshi Hirano, Yasuhiro Funatsu, Akira Toyomi, and Suguru Nakayama, "Oxidative Stability of Powdery Tridocosahexaenoin Included in Cyclodextrin and Its Application to Fish Meal Paste" (1977), *Biosci. Biotech. Biochem.*, 61(8), 1376-1378
2. S.P.J. Namal Senanayake, Fereidoon Shahidi, "Lipase-catalyzed incorporation of dicosaheaxenoic acid (DHA) into borage oil: optimization using response surface methodology" (2002), *Food Chemistry*, 77, 115-123
3. Labuza, T.P. "Kinetics of lipid oxidation on foods" (1971). *Crit. Rev. Food Technol*, 2, 355-404
4. 심창구, "생물약제학" (1999), 서울대학교 출판부, 202-203
5. Masayuki Hara, Jun Miyake, "Calcium alginate gel-entrapped liposomes" (2001), *Materials Science and Engineering*, C 17, 101-105
6. M. I. Yousef, G. A. Abdallah and K. I. Kamel, "Effect of ascorbic acid and Vitamin E supplementation on semen quality and biochemical parameters of male rabbits" (2003), *Animal Reproduction Science*, Volume, 76(20), 99-111
7. Edwin N. Frankel, Teresa Satue-Gracia, Anne S. Meyer, and J. Bruge GerMan, "Oxidative stability of fish and algal oils containing long-chain polyunsaturated fatty acids in bulk and in Oil-in-Water emulsions" (2002), *J. Agricultural and Food chemistry*, 50, 2094-2099
8. Felipe Dal-Pizzol, Fábio Klamt, Mônica M.R. Vianna, Nadia Schröder, João Quevedo, Mara S. Benfato, José C.F. Moreira, Roger Walz, "Lipid peroxidation in hippocampus early and late after status epilepticus induced by pilocarpine or kainic acid in Wistar rats" (2000), *Neuroscience Letters*, 291, 179-182