

베타카로틴 함유 알긴산 나트륨 비드의 제조 및 안정성

고광목 · 구자성 · 김영일 · 양재현†

우석대학교 약학대학
(1999년 8월 23일 접수)

Preparation and Stability of Sodium Alginate Beads Containing β -Carotene

Kwang-Mook Go, Ja-Seong Koo, Young-Il Kim and Jae-Heon Yang†

College of Pharmacy, Woosuk University, Chonju 565-701, Korea

(Received August 23, 1999)

ABSTRACT—To protect β -carotene at the stomach and to release rapidly at the intestine we prepared alginate beads containing β -carotene. β -Carotene and alginate solution was homogenized and prepared o/w emulsion was prepared. It was poured into Ca^{2+} solution through syringe needle. The gel was formed spontaneously and alginate beads containing β -carotene were prepared. β -Carotene was incorporated into the beads more than 95%. The release rate of β -carotene was dependent on the concentration of Ca^{2+} , β -carotene and surfactants. However, the concentration of alginate did not affect the release rate of β -carotene. The high concentration of Ca^{2+} slowed down the release rate of β -carotene. The addition of surfactants in the β -carotene beads increased the release rate of β -carotene in the order of Tween 80 > Cremophor > Span 20. The contents of β -carotene and diameter of β -carotene beads did not change significantly at 50°C for 20 days.

Keywords — β -carotene, Sodium alginate, Surfactant, O/w emulsion, Bead, Release pattern

β -Carotene은 vitamin A의 전구체로 녹황색 채소나 과일 에 다량 함유된 carotenoids로서¹⁾ 식품의 착색료로서 이용되고 또한 망막의 기능이나 많은 조직의 상피세포 분화와 증식을 정상적으로 유지시키고 vitamin A 결핍시 오는 제반 증상에 예방 효과가 있다고 알려져 있으며²⁾ vitamin A의 작용은 화학적 형태에 따라 달라진다. 주로 retinol은 생식 과정에 필수적인 물질이고, retinal은 시각 작용을 가지며, retinoic acid나 그 밖의 대사산물은 성장과 분화에 필수적인 인자로 작용한다.³⁾ 그러나 과일 섭취된 retinal, retinol, retinoic acid 등은 *in vivo* 및 *in vitro*에서 많은 급, 만성 독성을 일으킨다는 연구가 보고되어 있으나, β -carotene의 과일 섭취는 무해성으로 피부가 황색으로 변화하는 것 외에 거의 독성이 없다고 보고되어 있다.⁴⁾ 또한 정상 공기의 산소압보다 낮은 분압에서 free radical 및 singlet oxygen에 대하여 항산화 작용을 나타내기 때문에 항암적 활성이 있다고 보고되었다.⁵⁾

알긴산은 Laminaria 속 갈조류와 해초류의 세포벽에서 발견된 친수성의 콜로이드성 음이온 폴리사카라이드로서 광범위한 응용성을 가진 물질로서⁶⁾ 알긴산 나트륨의 용액에 칼

슘 이온을 넣었을 때 2개의 나트륨 이온과 1개의 칼슘 이온의 양이온 교환에 의하여 교차 결합을 형성한다.^{7,8)} 또한 알긴산 자체는 인체에 무해하며, 특히 소화기관에 대해서는 매우 안정한 첨가제라고 할 수 있다.⁹⁾

우선 β -carotene 함유 제제를 개발하는데 있어서 β -carotene의 안정성을 위하여 알긴산 나트륨 비드의 제조과정이 단순해야 한다. 알긴산 나트륨 용액과의 균질화를 통한 유희 직후 Ca^{2+} 과 알긴산 나트륨의 교차결합이 일어나므로, β -carotene의 안정성을 확보할 수 있다. 알긴산 나트륨의 특성상 낮은 pH에서, 즉 위에서는 겔을 형성하므로 β -carotene의 용출을 억제시킬 수 있다.

β -Carotene을 알긴산 용액에 분산시켜 비드를 제조시, 지용성 물질인 β -carotene은 용출 양상이 양호하지 못하므로 생체내에서의 이용률이 크지 않은 문제점이 있다. 그러므로 용출을 증가시켜 생체 이용률을 증가시킬 목적으로, 다양한 계면활성제를 이용하여 비드를 제조하고 각각의 계면활성제가 β -carotene의 용출 향상에 미치는 영향을 연구함으로써 β -carotene 비드 제제의 개발 가능성이 기대된다. 이에 지용성 물질인 β -carotene을 다양한 계면활성제를 이용하여 여러 가지 농도의 알긴산 나트륨의 용액에 분산시킨 후 칼슘 용액에 적가하여 비드를 제조하고 각 비드의 용출양상을 비교하였다.

†본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
Tel : 0652)290-1570, E-mail : jhyang@core.woosuk.ac.kr

실험방법

시약 및 기기

β -Carotene은 Wako사 제품을 사용하였으며, 알긴산 나트륨은 Junsei Chemical 사의 제품을 사용하였고 계면활성제로서 Tween 80 및 Span 20은 Hanawa사, Cremophor는 BASF사의 제품을 사용하였다. 기타 시약은 특급 및 일급 시약을 사용하였다. 기기로서는 자외부 분광광도계(Shimadzu, Model UV-1201), 균질기(Dupont Co. OMNI mixer 17105), 용출시험기(Tokyo Rikakikai Co.) 및 원심분리기(Vision scientific Co.)를 사용하였다.

비드의 제조

알긴산 나트륨 2.0 g을 정제수 100 mL에 가하여 알긴산 나트륨 용액을 제조하고 제조된 알긴산 나트륨 용액에 β -carotene 0.5 g과 계면활성제로서 Tween 80, Span 20 및 Cremophor 등을 각각 전체 양에 대하여 1%가 되게 가한 후 3000 rpm에서 10분간 균질화하여 β -carotene 유제를 제조하였다(Table I). 제조된 유제를 23G의 주사기를 사용하여 자석교반기로 교반하면서 3%의 염화칼슘 용액에 적하하여 β -carotene 비드를 제조하고 비드를 분리하여 정제수로 3회 세척하고 45°C에 건조하였다.

비드내 β -carotene의 함량 측정

건조된 β -carotene 비드 0.5 g을 0.1 M 인산염 완충액 (pH 7.4) 200 mL : isopropanol(1:1) 용액에 용해한 후 여과한 액을 파장 306 nm에서 흡광도를 측정하였다.

제조된 비드의 크기

각 처방에 따른 β -carotene 비드를 제조하고 제조 직후 및 50°C에서 48시간 건조 후의 비드의 크기를 마이크로미터를 이용하여 측정하였다.

용출 시험

시험액으로써 5%의 isopropanol을 함유한 인산염 완충액

(pH 6.8)을 사용하였고, 약물은 β -carotene 100 mg에 해당하는 비드를 취하여 실험하였다. 용출법은 대한약전 제 7개정 의 일반시험법 중 회전검체통법을 사용하였으며 회전수는 100 rpm으로 하였다. 용출액은 정해진 시간에 2 mL 씩을 취하여 여과한 후 파장 306 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 시험 중 채취한 용출액과 동량의 신선한 시험액을 보충하였다.

β -Carotene 비드의 안정성

함량의 변화 - 각 처방에 따른 β -carotene 비드를 제조 후 50°C, 50% 습도 조건에서 저장하면서 20일간 β -carotene의 함량 변화를 관찰하였으며 비드 내에 존재하는 β -carotene의 소실 속도 정수와 반감기를 구하였다.

비드 직경의 변화 - 각 처방에 따른 β -carotene 비드를 제조 후 각각 30개씩의 비드를 취하여 50°C에서 20일간 건조하면서 직경의 변화를 관찰하였다.

결과 및 고찰

β -Carotene 비드의 제조

β -Carotene을 함유한 알긴산 나트륨 비드의 외형을 비교해보면 처방 A, B, C 및 D에 의해서 만들어진 비드는 주황색의 구형 입자이며 비드의 크기는 각 처방에서 차이를 나타내지 않았다.

비드내 β -carotene의 함량 측정

Table II에 제조된 비드에 함유된 β -carotene의 함량을 나타내었다. 모든 처방에서 95% 이상의 높은 함량을 나타냈으며 처방에 따른 유의성 있는 차이는 없었다. β -Carotene은 유성으로 물에 대한 용해도가 극히 낮으므로 제조과정에서 유화상태에서 겔화 되는 비드에 존재하기 때문이라고 생각된다.

제조된 비드의 크기의 측정

각 처방에 의하여 제조된 비드의 크기를 마이크로미터를 이용하여 측정한 결과를 Table II에 나타내었다. 비드의 크기는 제조 직후 계면활성제의 종류에 관계없이 큰 차이를 나

Table I - Formular of β -carotene beads with various surfactants

Rx.	A	B	C	D
β -Carotene	0.5	0.5	0.5	0.5
Sodium alginate	2.0	2.0	2.0	2.0
Tween80	1.0	-	-	-
Span 20	-	1.0	-	-
Cremophor	-	-	1.0	-
Purified water ad.	100.0	100.0	100.0	100.0

Table II - Contents of β -carotene and mean diameter of alginate beads containing β -carotene

	Diameters(mm)		Contents of β -carotene(%)
	Before drying	After drying	
A	3.67 \pm 0.38	1.53 \pm 0.17	96.3 \pm 1.3
B	3.56 \pm 0.45	1.62 \pm 0.20	97.5 \pm 1.2
C	3.42 \pm 0.47	1.57 \pm 0.15	96.4 \pm 1.1
D	3.55 \pm 0.35	1.48 \pm 0.21	95.7 \pm 1.0

타내지 않았으며 건조 2일 후부터는 안정화된 양상을 보였다. 제조 직후 약 3.5 mm 정도의 크기였으며 건조 후 약 1.5 mm를 보였다.

β-Carotene 비드의 용출 양상

β-Carotene은 경구 투여시 위산에 의하여 분해되고 또한 흡수가 불량하므로 알긴산 나트륨을 이용하여 비드를 제조하고 제조된 비드의 용출 양상을 개선시키기 위하여 여러 가지 계면활성제를 이용하여 비드를 제조하고 각 비드의 용출 양상을 비교 검토하였다. Fig. 1은 pH 1.2 용액에서의 β-carotene의 용출 양상을 나타낸 결과이다. 네가지 처방 모두에서 240분 후 20%에 못미치는 낮은 용출 양상을 나타내었다. 알긴산 나트륨의 특성상 산성에서 겔화되므로 β-carotene의 용출이 현저하게 억제된 것으로 여겨진다. 240분 후 비드는 외형상 전혀 변화하지 않았으며 약간의 수분을 함유하기는 하였으나 이것이 용출에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 생각된다. Fig. 2는 pH 6.8 완충액에서의 β-carotene의 용출 양상을 나타낸 결과이다. β-Carotene은 150분까지 서서히 증가되는 용출 양상을 보였으며 그 이후에는 더욱 완만한 용출률의 증가를 보였다. pH 6.8에서는 pH 1.2에서와는 달리 처방에 따른 용출 양상이 다르게 나타났는데 Rx. A에서 가장 높은 양상을 나타냈고 Rx. B, Rx. C의 순으로 높은 용출 양상을 보였으며 계면활성제를 사용하지 아니한 Rx. D에서 가장 낮게 나타냈다. 계면활성제의 존재는 비드내로 침투한 수분에 용해되는 β-carotene의 양에 영향을 미치며 이로 인하여 계면활성제가 β-carotene의 용출에 중요한 인자로 작용할 수 있을 것으로 생각된다. 120분이 지나면서부터 비드는 차차 원래의 형태와 달리 부서지거나 일그러지기 시

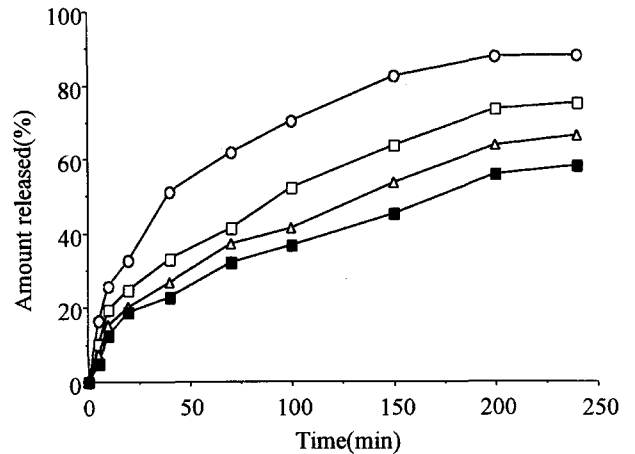


Figure 2—Dissolution profiles of β-carotene from β-carotene beads containing various surfactants at pH 6.8. Key: ○; Tween 80, □; Span 20, △; Cremophor, ■; No surfactant.

작하며 이에 따라 240분까지 지속적인 용출 양상을 보이며 이 과정에서도 계면활성제가 중요한 인자로 작용하는 것으로 생각된다.

알긴산 나트륨은 산에서는 팽윤이 일어나지 않으나 알칼리하에서는 팽윤이 일어나므로, 이러한 알긴산 나트륨의 특성이 용출에 영향을 미치지만 지용성이 큰 β-carotene의 경우는 알칼리하에서도 용출이 잘 이루어지지 않으므로 계면활성제를 이용하여 β-carotene의 용출을 증가시켜 소장에서의 흡수율을 증가시키면 생체 이용율이 증가할 수 있을 것이다.

β-Carotene을 함유한 알긴산 나트륨 비드의 제조과정에서 알긴산 나트륨과 교차결합하는 칼슘 용액의 농도에 따른 용출양상의 변화를 Fig. 3 및 4에 나타냈다. β-Carotene용출에

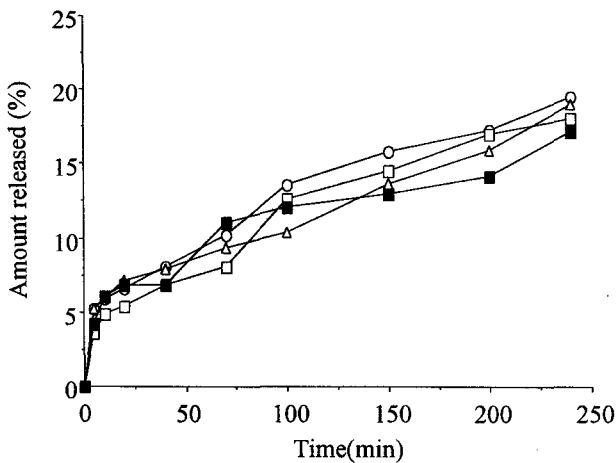


Figure 1—Dissolution profiles of β-carotene from β-carotene beads containing various surfactants at pH 1.2. Key: ○; Tween 80, □; Span 20, △; Cremophor, ■; No surfactant.

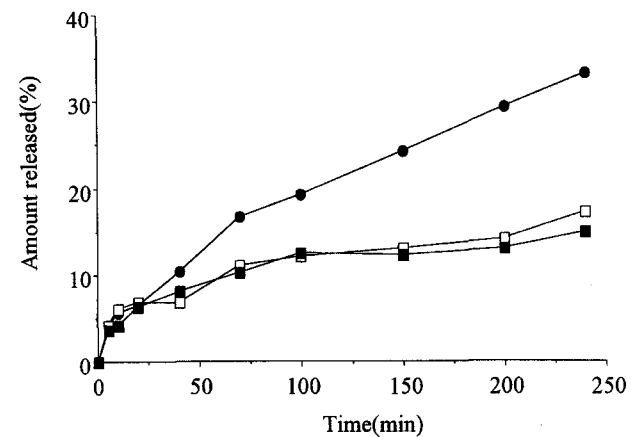


Figure 3—Release profiles of β-carotene from β-carotene beads prepared from various concentrations of calcium at pH 1.2. Key: ○; 1.5%, □; 3.0%, ■; 5%.

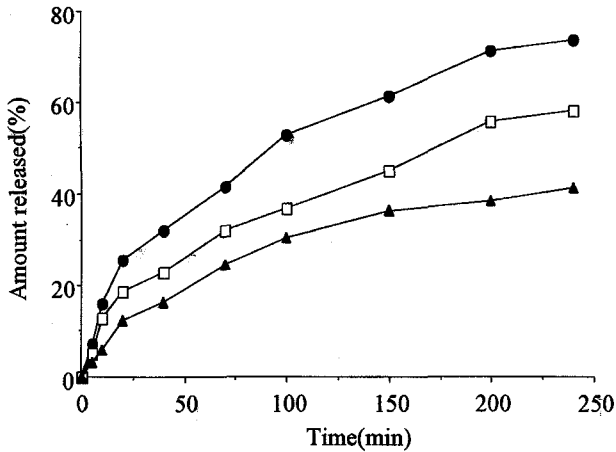


Figure 4—Release profiles of β -carotene from β -carotene beads prepared from various concentrations of calcium at pH 6.8. Key: \circ ; 1.5%, \square ; 3.0%, \triangle ; 5%.

미치는 pH 1.2에서의 칼슘 용액의 농도의 영향을 Fig. 3에 나타내었다. pH 1.2에서의 용출 양상은 1.5% 용액의 경우는 240분 후 30% 이상의 용출률을 보였으나 3%, 5% 용액의 경우는 20% 이하의 낮은 용출률을 보였다. 3%와 5% 용액의 용출률은 큰 차이를 나타내지 않았다. 1.5% 칼슘용액을 사용할 경우 비드의 경도가 약하여 낮은 pH에서는 용출이 진행되는 것으로 판단하여 본 실험에서는 3% 칼슘용액을 사용하였다. β -Carotene 용출에 미치는 pH 6.8에서의 칼슘 용액의 농도의 영향을 Fig. 4에 나타내었다. pH 1.2에서와 달리 240분 후 1.5%에서 50% 이상의 용출률을 보였고 3%와 5%에서도 pH 1.2에서보다 상대적으로 큰 차이를 나타내었다. pH 6.8에서 β -carotene의 용출을 증가시키고 pH 1.2에서의 용출을 억제할 수 있는 3%가 가장 적당한 칼슘 농도였다. β -Carotene을 함유한 알긴산 나트륨 비드는 칼슘용액으로 점적되면 순간적으로 겔화되는데 이 때 칼슘 용액의 농도가 높으면 점적되는 알긴산 나트륨방울 내부까지 교차결합이 확대되는 것으로 추정된다. 칼슘 이온의 농도가 5% 이상이 되면 이 작용이 너무 강하게 되어 비드는 tailing을 형성하게 되어 제조상 문제가 된다.

β -Carotene 비드의 안정성

함량의 변화 - 온도 50°C, 상대습도 50%의 항온항습기에서 20일간 저장하면서 β -carotene의 함량 변화 추이에 관한 결과를 Fig. 5에 나타내었다. 20일 후 약 10% 미만의 함량 변화가 관찰되어 이 조건하에서 안정함을 알 수 있었다. β -Carotene이 겔화된 알긴산 나트륨 비드내에 봉입됨으로써 안정성을 확보할 수 있었던 것으로 판단된다. 또한 기간이 경과함에 따라 일차반응으로 잔존량이 감소되었으므로

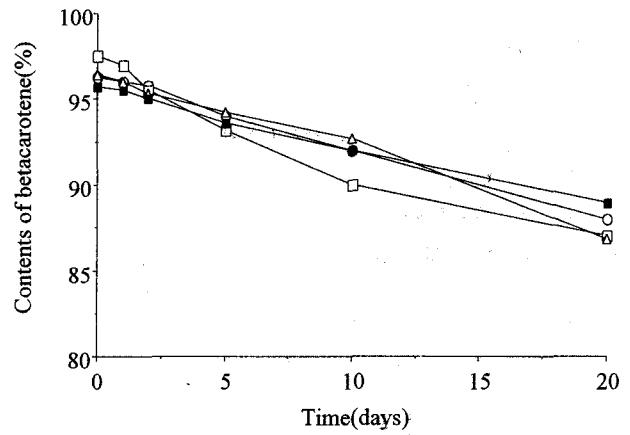


Figure 5—Decomposition profiles of β -carotene beads containing various surfactants at 50°C. Key: \circ ; Tween 80, \square ; Span 20, \triangle ; Cremophor, \blacksquare ; No surfactant.

Table III - Comparison of rate constant and half life of β -carotene beads containing various surfactants at 50°C

Rx.	Rate constant(time ⁻¹)	half life(day)
A	4.71310 ⁻³	147.04
B	5.80210 ⁻³	119.44
C	5.50010 ⁻³	126.00
D	1.87310 ⁻³	369.99

first order reaction 공식에 의하여 소실 속도 정수 및 반감기를 구하여 Table III에 나타내었다. 소실 속도 정수는 Rx. D, Rx. A, Rx. C 및 Rx. B의 순으로 증가하였으며, Rx. A에서의 반감기는 147.04일, Rx. B에서는 119.44일, Rx. C에서는 126.00일 및 Rx. D에서는 369.99일로서 반감기는 Rx. D에서 가장 길었으나 다른 처방 역시 반감기

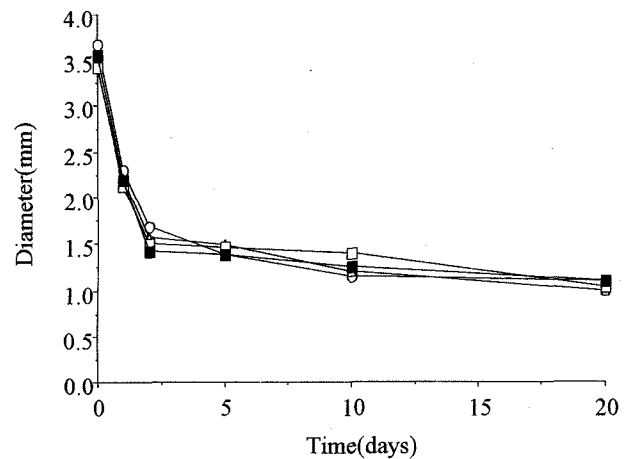


Figure 6—Diameter change of β -carotene beads prepared with various surfactants at 50°C. Key: \circ ; Tween 80, \triangle ; Span 20, \square ; Cremophor, \blacksquare ; No surfactant.

가 길어서 안정함을 알 수 있었다. 특히 Rx. A의 경우 pH 6.8액에서의 용출속도도 빨랐으며 반감기도 약 150일로서 경구투여 및 보존에서 좋은 효과를 기대할 수 있을 것으로 생각이 되었다.

비드 직경의 변화 - 50°C 조건하에서 β -carotene을 함유한 알긴산 나트륨 비드의 직경의 변화를 Fig. 6에 나타내었다. 처음 제조 직후 약 3.5 mm이던 비드는 2일까지 급격히 직경이 감소하였으며 그 이후는 변화가 아주 적게 나타났다. 처방에 따른 유의성 있는 차이는 관찰되지 않았다.

이 결과로 보아 비드는 48시간 건조로서 충분하였으며 그 이후는 크기가 변화하지 않는 것으로 보아 안정성을 확보할 수 있을 것으로 기대된다. 20일간 저장조건 하에서 β -carotene 비드는 함량의 변화가 극히 적었으며 크기도 영향을 받지 아니하여 안정한 제형으로 평가될 수 있을 것이라 사료된다.

결 론

다양한 계면활성제를 첨가한 β -carotene을 함유한 알긴산 나트륨 비드의 제조 조건 및 용출 양상에 미치는 영향 그리고 안정성에 관한 실험을 통하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. β -Carotene을 함유한 알긴산 나트륨 용액을 calcium 용액에 적하하여 만든 비드는 주황색의 구형 입자였다. 크기는 제조 직후 약 3.5 mm이었으며 48시간 건조 후 약 1.5 mm이었다.

2. β -Carotene의 알긴산 나트륨 비드에의 봉입율은 95% 이상으로 우수하였으며 계면활성제의 영향은 없었다.

3. 비드의 제조시 사용한 칼슘의 농도가 높을수록 비드의

용출은 pH 6.8 용출액에서 감소하였으며 3%가 적당하였다.

4. 비드의 제조시 사용한 계면활성제가 β -carotene의 용출에 미치는 영향은 Tween 80을 사용하였을 경우에 용출률이 가장 높았다.

5. β -Carotene을 함유한 알긴산 나트륨 비드 함량 변화 및 크기 변화에서 안정한 것으로 나타났다.

문 헌

- 1) A.R. Mangles, J.M. Holden, G.R. Beecher, M.R. Forman and E. Lanza, Carotenoid content of fruits and vegetables: An evaluation of analytic data, *J. Am. Diet. Assoc.*, **93**, 284-291 (1993).
- 2) H. Ohshima, Vitamins and cancer prevention, *Toxicol.*, **4**, 947 (1983).
- 3) L.S. Goodman and A. Gillman, *The Pharmacological Basis of the Therapeutics*. 6th ed., (1980).
- 4) K. Aoki, Y. Ito and R. Sasaki, β -carotene and chemoprevention of cancer, *Rinsho Kensa*, **31**, 275-278 (1987).
- 5) A. Bendich, The safety of β -carotene, *Nutr. Cancer*, **11**, 207-210 (1988).
- 6) A. Hang and B. Larsen, Quantitative Determination of the uronic acid composition of alginates, *Acta Chem. Scand.*, **16**, 1908 (1962).
- 7) N.C. Cosby, Microencapsulation of single, multiple, zona pellusida-free mous preimplantation embryos in sodium alginate and their development *in vitro*, *J. Repro. Fert.*, **90**, 19-57 (1990).
- 8) A. Haug and O. Smidsrod, The effect of divalent metals on the properties of alginate solutions, *Acta Chem. Scand.*, **19**, 341-347 (1965).
- 9) C. Stancia and J.R. Bennet, Alginate/antacid in the reduction of gastro-esophageal reflux, *Lancet*, **1**, 109-112 (1974).