

## 히알루론산 기반 비타민 D 함유 구강용해필름의 제조 및 특성평가

강서연<sup>1</sup> · 안다연<sup>1</sup> · 한정아<sup>1,\*</sup>  
<sup>1</sup>상명대학교 식품영양학과

### Development and characterization of hyaluronic acid-based orally disintegrating film containing vitamin D

Seo-Yeon Kang<sup>1</sup>, Da-Yeon An<sup>1</sup>, and Jung-Ah Han<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Food and Nutrition, Sangmyung University

**Abstract** An orally disintegrating film (ODF) based on hyaluronic acid (HA) containing vitamin D was developed. The vitamin D content in the ODF was set based on the adequate intake (AI) of vitamin D from 0 to 10 AI (0, 1, 4, 7, and 10AI). The control (0AI) had the highest thickness and showed the longest disintegration time among the samples. The moisture content of the ODFs was significantly lower in those with vitamin D compared to the control. As the amount of vitamin D increased, the water vapor permeability (WVP) of the ODFs decreased, and the opacity significantly increased. The tensile strength was higher in the films containing vitamin D compared to the control films. However, the elongation at the break showed no significant difference among the films. The vitamin D content in the film was reduced by 25.7-44.2% during processing compared to the amount that was originally added. Based on the above results, a new and convenient vitamin D delivery system, an ODF, could be successfully produced.

**Keywords:** ODF; hyaluronic acid; vitamin D; disintegrating time

## 서 론

비타민 D는 칼슘 흡수를 촉진하고 혈청 칼슘과 인산염 농도를 유지함으로써 뼈 건강에 관여하는 것으로 알려져 있다(Gil 등, 2018). 비타민 D는 칼슘 항상성과 뼈 대사의 중심 조절자로서 결핍 시 어린이에게는 구루병, 성인에게는 골연화증, 골다공증 및 근력 약화를 유발한다(Baek 등, 2010). 여러 집단에서 다양한 요인(인구, 연령, 성별 등)으로 비타민 D 결핍이 나타나고 있는데, 특히 4세 미만의 영유아와 65세 이상의 노인, 임산부 혹은 모유 수유 중인 여성, 그리고 햇빛의 노출이 적은 사람에게 높은 비율로 나타난다. 우리나라는 특히 비타민 D 결핍과 부족에 대한 우려가 크다(Pyo 등, 2020). 비타민 D는 체 내에서 합성되는 것으로 알려져 있는데, 피부에 존재하는 7-7-dehydrocholesterol이 태양 UV-B에 의해 조사되어 콜레칼시페롤(비타민 D<sub>3</sub>)로 전환되고, 이후 간과 신장에서 활성화된다(Calton 등, 2015). 그러나, 햇빛에 노출되는 것만으로 충분한 양의 비타민 D를 얻기 어렵기 때문에, 비타민 D가 강화된 식품이나 보충제 등 다른 공급원들로부터 얻을 필요가 있다(Behjati와 Yazdanpanah, 2021). 많은 나라에서 추천하는 비타민 D 섭취량은 하루 400-2000 IU이며(Cupone 등, 2020), 우리나라 국민건강영양조사 자료를 바탕으로 비타민 D 농도와 골밀도를 분석한 연구에서는 20-30 ng/mL 이상을 적정 비타민 D

농도로 보고하고 있다(Choi 등, 2008).

구강용해필름(orally disintegrating film, ODF)은 구강을 통해 효율적인 체내전달이 가능한 새로운 약물전달 시스템으로, 얇은 필름 제형으로 섭취 시 빠르게 분해된다. 특히, 알약이나 캡슐 형태를 삼키는데 어려움을 겪는 사람들에게 생체 활성 화합물을 전달하는데 적절하다는 장점이 있다(Heinemann 등, 2013). 구강용해필름 제조 시 가장 많이 사용하는 필름형성제는 전분(Sartori와 Menegalli, 2016), 젤라틴(Garcia 등, 2018), hydroxypropyl cellulose(Han 등, 2019), 키토산(Bilbao-Sainz 등, 2017), gum (Behjati와 Yazdanpanah, 2021) 등이 있다. 그러나, 이러한 물질들은 필름 제조 시 부서지는 성질로 인해 가소제 첨가가 필수적이며, 생체 이용률 또한 낮은 편이다.

히알루론산(HA; Hyaluronic acid)은 N-아세틸글루코사민과 D-글루루론산의 반복구조로 이루어진 다당류로 피부, 간막, 연골, 세포 외 기질을 구성하는 주요 성분이며, 친수성, 생분해성, 점탄성, 생체 적합성 등의 특성을 가진다(Necas J 등, 2008). 이 때문에 콘택트 렌즈(Singh 등, 2015), 상처 치유용 드레싱(Matsumoto와 Kuroyanagi, 2010), 관절과 골조직 형성을 돕는 윤활제(Je 등, 2021)와 같은 의료 분야나 화장품 분야(Park 등, 2003)에서 널리 사용된다. 또한 보습 기능을 담당하는 인자 중 하나로 표피의 수분 증발을 저해하고 피부의 탄력성을 유지하는데 관여하여(Yang 등, 2021) 피부의 보습력을 증가시키고(Park 등, 2003), 외상으로 인한 상처를 치료하는데 도움이 되는 것으로 보고된 바 있다(Litwiniuk 등, 2016). 히알루론산은 체내에서 합성되는 물질이므로 이를 기반으로 식품을 제조 시 부작용이 없으며, 뛰어난 보습력으로 인해 피부보습 및 피부건강 유지에 도움을 줄 수 있다는 생리활성 2등급의 기능성 원료이다. 본 연구에서는 이러한 히알루론산을 기반소재로 비타민 D를 함유한 구강용해필름 제조의

\*Corresponding author: Jung-Ah Han, Department of Food and Nutrition, Sangmyung University, Seoul 03016, Korea  
Tel: +82-2-2287-5357  
Fax: 82-2-2287-0104  
E-mail: vividew@smu.ac.kr  
Received March 6, 2022; revised April 10, 2022;  
accepted April 21, 2022

최적 조건을 확립하고, 비타민 D 함량에 따른 구강용해필름의 이화학적 특성을 분석하여 비타민 D 공급을 위한 새로운 제형을 개발하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험 재료

히알루론산(Mw 1,200×10<sup>3</sup> Da)은 진우바이오(Jinwoo Bio, Yongin, Korea)에서 제공받았고, 비타민 D 분말(Prescribed for Life, Fredericksburg, TX, USA)과 무수에탄올(Duksan pure chemicals Co., Ltd, Ansan, Korea)을 필름재료로 사용하였다.

### 비타민 D 농도 설정

2020 한국인영양섭취기준에 따르면, 비타민 D의 충분섭취량(Adequate Intake, AI)은 400 IU (10 µg), 상한섭취량(Tolerable Upper Intake Level, UL)은 4000 IU (100 µg)이다. 본 실험에서는 예비실험을 통하여 필름 한 장(2×3 cm<sup>2</sup>)을 섭취 시 비타민 D의 충분섭취량을 만족할 수 있도록 함량을 설정하였고(1 AI), 비타민 D의 함량에 따른 필름 특성의 차이를 확인하기 위해 1AI의 10 배인 상한섭취량을 충족하는 양을 최대(10 AI)값으로 하여 중간 변수를 Table 1과 같이 설정하였다.

### 구강용해필름 제조

예비실험을 통해 필름형성가능 히알루론산의 농도(3%)와 비타민 D 함유 필름형성 가능조건을 찾아 다음과 같이 제조하였다. 우선 히알루론산 용액(3%)과 발효주정(10%)을 증류수에 넣어 100 mL의 용액을 만든 후, 실온에서 1시간 동안 교반하여 히알루론산 용액을 제조하였다. 각 농도의 비타민 D를 증류수(50 mL)에 녹인 후, 상온에서 1시간 동안 stirrer (HS12-06p, Misung Sci., Yangju, Korea)를 이용해 교반하여 비타민 D 용액을 제조하였다. 대조군으로는 히알루론산 용액만을, 실험군으로는 히알루론산 용액과 비타민 D 용액을 혼합한 용액을 실온에서 30분간 lab stirrer (BL1006D, Misung Sci.)와 핸드블렌더(BRAUN, Kronberg, Germany)를 이용하여 균질화 시켰으며, 균질화된 용액은 압조건 25°C에서 7일간 보관하면서 기포를 제거하였다. 제조한 필름 용액은 자동도공기(COAD.411, Ocean Science, Uiwang, Korea)를 이용해 캐스팅한 후, 온도 40°C, 상대습도 50RH%로 설정한 항온항습기(TH-PE-065, Jeio Tech Co., Daejeon, Korea)에서 24시간 동안 건조하였다. 모든 필름은 온도 25°C, 상대습도 50%로 설정한 항온항습기에 넣어 온습도를 유지하며 24시간 동안 보관 후 실험에 사용하였다.

### 필름의 외관과 두께

제조한 필름의 외관은 Garcia 등(2018)과 Farhan과 Hani (2020)의 방법을 참고로 하여 필름의 유연성, 매끄러움, 필름의 균질성(두께 및 색상의 균일성, 불용성 입자의 형성 여부), 필름 형성 능력(캐스팅 및 건조 후 필름의 불연속 구역 부재 여부) 및 관리성(건조 후 필름을 쉽게 분리할 수 있는지)의 다섯 가지 항목을 기준으로 평가하였다. 두께측정은 dial caliper (D15HA, Mitutoyo Co., Kawasaki, Japan)을 사용하여 2×3 cm 크기로 재단한 필름의 상하좌우 및 중앙의 두께를 5회 이상 측정하여 평균값을 제시하였다.

### 필름 봉해 시간

구강용해필름의 봉해 시간은 Steiner 등(2016)의 방법을 참고로

**Table 1. Formula of vitamin D film solution**

Samples	Vitamin D contents in HA solution (g/100 mL)	Calculated vitamin D amount per film (µg/1 ea)
0AI <sup>1)</sup>	0	0
1AI	0.0458	10
4AI	0.1832	40
7AI	0.3206	70
10AI	0.4580	100

<sup>1)</sup>Adequate intake

하여 측정하였다. 3×3 cm로 재단한 필름을 중앙이 2×2 cm로 뜯려있는 틀에 고정시킨 후, 필름 중앙에 혀의 움직임에 가정한 추(지름 1 cm, 무게 10 g)를 놓고 37°C의 증류수 0.9 mL를 동시에 가한 시점부터 추가 필름을 뚫고 2 cm 아래로 떨어지는 시간을 측정하였다.

### 수분함량 및 투습도

수분함량은 시료를 2×2 cm로 재단하여 알루미늄 칭량접시(43 mm, EG-D43-100, SH-Sigma, Suwon, Korea)에 넣고 110°C의 드라이오븐(C-DOD2, Changshin Science, Seoul, Korea)에 24시간 동안 방치한 후 건조 전과 건조 후 무게를 비교하여 계산하였다. 구강용해필름의 투습도(water vapor permeability, WVP)는 Cao와 Song(2019)의 방법에 따라 필름을 3×3 cm로 재단하여 두께를 미리 측정하고, 18 mL의 증류수로 채워진 투습컵의 입구(2×2 cm)에 고정된 후 파라필름으로 밀봉하여 25°C, 상대습도 50%로 설정한 항온항습기(TH-PE-065, Jeio Tech Co.)에 8시간 동안 보관하면서 매 시간 컵의 무게 감소를 측정해 무게 감소율을 아래의 계산식을 통해 산출하였다.

$$WVPR = \frac{\text{Slope}}{\text{Film area}}$$

$$WVP = \frac{WVTR \times L}{\Delta p}$$

이때, slope는 시간에 따른 투습컵의 무게 감소율, film area는 수분 이동이 발생하는 필름의 넓이(m<sup>2</sup>), L은 필름의 평균 두께(mm), Δp는 필름 시료를 사이에 둔 컵 내부와 외부 간 수증기 분압 차이의 보정값이다

### 색도와 불투명도

구강용해필름의 표면의 색도는 색차계(Chroma meter CR-300, Minolta co., Osaka, Japan)를 사용하여 명도 L\* (lightness), 적색도 a\* (redness), 그리고 황색도 b\* (yellowness)값을 측정하였다. 기준값으로는 색 좌표 값이 L=96.90, a=0.24, b=1.97인 표준 백색판을 사용하였고, 필름 시료의 중심을 포함한 총 다섯 부분을 측정 후 평균값을 제시하였다. 광학적 특성 중 구강용해필름의 불투명도는 Oluwasina 등(2019)의 방법을 참고하여 cuvette 크기에 맞게 1×5 cm로 재단한 필름을 자외선 분광광도계(UV-160A, SHMADZU, Kyoto, Japan)를 이용해 측정하였다. 각 필름의 600 nm에서의 흡광률(A<sub>600</sub>)을 측정하고, 이를 필름의 두께(χ, mm)와 함께 다음의 계산식에 대입하여 산출하였다.

$$\text{Opacity}=(A_{600})/\chi$$

**질감 특성**

필름의 기계적 특성을 측정하기 위해 1×7 cm 크기로 절단한 필름의 두께를 dial caliper (D15HA, Mitutoyo Co.)을 이용해 측정하여 초기 단면적( $A_0$ , mm<sup>2</sup>)을 구하였다. ASTM D882-10 (ASTM, 2010)에 따라 texture analyzer (TA-XT2i, Stable Micro Systems, Surrey, UK)을 사용하여 필름의 인장강도(tensile strength)와 연신율(elongation at break)을 측정하였다. 초기 그립 간의 ( $L_0$ )는 50 mm, 그립의 이동 속도는 50 mm/min의 조건에서 최대인장하중( $W_{max}$ , N)과 그립의 이동한 거리( $L$ , mm)를 구해 아래의 식에 대입하여 산출하였다.

$$\text{Tensile strength (MPa)} = (W_{max}) / A_0$$

$$\text{Elongation at break (\%)} = L / L_0 \times 100$$

**필름 내 비타민 D 함량**

필름 내 비타민 D 함량은 고속액체크로마토그래프(Agilent 1200 series, Agilent, Santa Clara, CA, USA)와 질량분석기(API 4000, AB Sciex, Framingham, MA, USA)를 사용하여 분석하였고, 분석용 칼럼은 C<sub>18</sub> (2.1×100 mm, 1.7 μm)을 사용하였다. 필름 시료 5 g을 250 mL 농축 플라스크에 취하여 물 3 mL로 충분히 녹인 후 식품공전에 제시된 방법에 따라 용매를 사용하여 순차적으로 추출한 후 최종 추출물을 메탄올(MeOH) 5 mL로 녹여 이를 0.45 μm membrane filter로 여과하여 시험용액으로 사용하였다. 분석 시, 초산암모늄과 메탄올(5:95)을 혼합한 5 mM 용액을 이동상으로 하였고, 0.25 mL/min 유속으로 칼럼온도 40°C에서 시료를 5 μL 주입하여 분석하였다.

**통계 처리**

모든 실험은 3회 이상 반복 측정하였다. 통계분석은 SPSS statistics 26 (Statistics Package for Social Science, IBM-SPSS Inc. Chicago, IL, USA)을 사용하여 일원배치분산분석(ANOVA)로 분석하였으며, 실험결과는 평균±표준편차로 나타내었다. 각 시료 간의 유의적 차이는  $p < 0.05$  수준으로 Duncan test를 실시하여 유의성을 검증하였다.

**결과 및 고찰**

**외관**

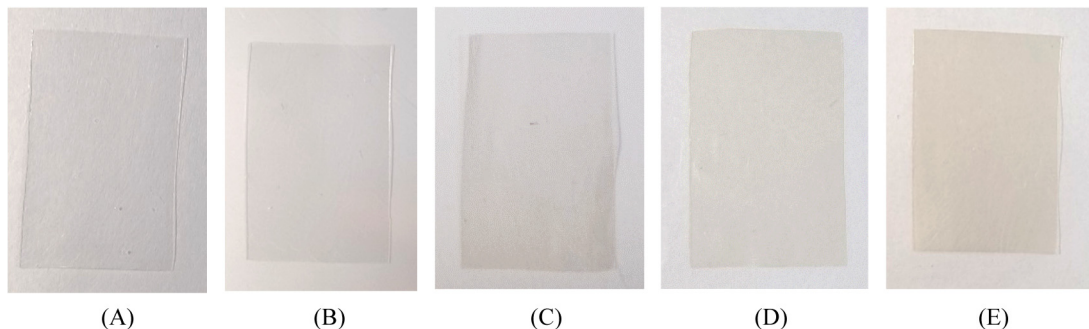
히알루론산 기반 비타민 D 함유 필름의 외관은 Fig. 1에 제시하였다. 비타민 D 함량을 달리한 필름 용액을 캐스팅할 때 각 용

액 모두 퍼지는 현상 없이 캐스팅 직후의 모양이 그대로 유지되었으며, 건조 후에는 전반적으로 투명하였고, 결정이나 용해되지 않은 고형분 없이 균일하며 연속적인 필름이 형성됨을 확인하였다. 건조된 필름을 폴리에스터 바탕지에서 제거할 때 깨지거나 찢어지는 현상 없이 모두 용이하게 떼어낼 수 있었다. 완성된 필름은 전반적으로 투명하며 옅은 노란색을 띠었고, 필름을 접어 구부려도 깨지지 않을 만큼 유연성을 가지는 것을 확인할 수 있었다. 비타민 D 첨가량을 달리했을 때 필름형성과정이나 건조 후 외관 특성에서 함량의 차이 없이 유연성, 부드러움, 균질성이 확인되었다.

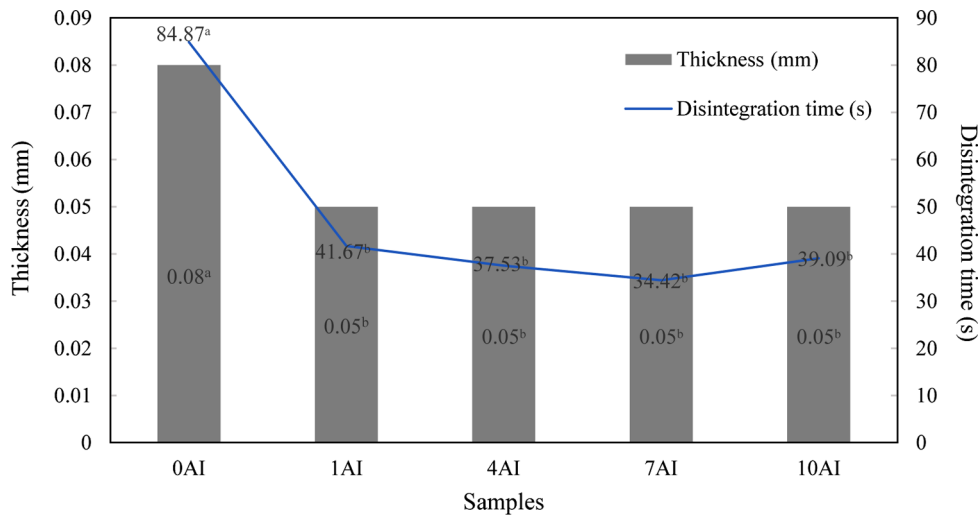
**두께**

필름의 두께는 균일성, 필름 내 성분의 함량과 연관이 있으며, 투습도와 같은 장벽 특성에 영향을 미치기 때문에 필름의 중요한 특성이다(Dixit와 Puthli, 2009; Gutierrez 등, 2015). 본 연구에서 비타민 D를 첨가한 필름의 두께는 0.05 mm로 대조군(0.08 mm)에 비해 유의적으로 얇았는데, 이는 비타민 D 용액(50 mL)을 추가하였기 때문에 필름형성용액의 농도가 낮아져 두께에 영향을 미친 것으로 보인다. 그러나, 비타민 D 함량에 따른 시료간 두께의 유의적 차이는 없었다. Dharmasthala 등(2019)에 따르면, 구강용해필름의 두께는 고분자물질의 농도에 따라 달라진다고 하였고, Mehraj와 Sistla(2022)도 농도가 다른 용액을 같은 양 casting 했을 때 용액의 농도에 따라 필름 두께가 달라진다고 발표하였다. 반면 Zareie 등(2020)은 젤라틴-키토산 기반 가식성 필름 제조 시, 키토산 함량 증가에 따른 필름 두께의 유의적 차이가 관찰되지 않는다고 하여 비타민 D 농도증가에 따른 필름 두께에 차이가 없는 본 연구와 유사한 결과를 보였는데, 이는 첨가한 물질의 크기나 분자량 등의 특성에 따라 농도가 두께에 미치는 영향이 다를 수 있을 것으로 생각된다.

본 연구에서 HA를 기반으로 제조한 필름의 두께는 호화전분 기반 필름의 두께(0.058 mm, Bodini와 Guimarães, 2019; 0.069 mm, Garcia 등, 2018)나 젤라틴 기반의 필름의 두께(0.069, dos Santos Garcia 등, 2020)등과 비슷한 수준이었다. 구강필름은 불편함 없이 구강 점막에 부착되어야 하기에 얇아야 하며, 두께의 균일성에 따라 약물 투여도의 정확성이 영향을 받는다(Pacheco 등, 2021). 그러나 두께가 증가될수록 단위면적당 필름을 통해 섭취할 수 있는 기능성 성분의 함량이 많아질 수 있기 때문에 필름의 종류 및 섭취 목적에 따라 두께를 조절할 필요가 있다(Shin, 2021).



**Fig. 1.** Orally disintegrating film (ODF) based on hyaluronic acid with different contents of vitamin D. (A) 0AI, (B) 1AI, (C) 4AI, (D) 7AI, (E) 10AI.



**Fig. 2.** Thickness and disintegration time of orally disintegrating film (ODF) based on hyaluronic acid containing different amount of vitamin D.

### In vitro 봉해시간

필름의 봉해시간은 Fig. 2에 나타난 바와 같이 비타민 D가 첨가되지 않은 대조군은 84.87 초로 가장 길게 나타났고, 비타민 D 첨가필름은 34.43-41.67초로 대조군보다 유의적으로 짧았으나, 비타민 D 함량에 따른 유의적 차이는 없었다. Steiner 등(2019)에 따르면 봉해시간은 필름두께의 영향을 많이 받는다고 하였다. 이는 필름 표면에 물이 가해질 때 친수성 고분자가 물과 결합하여 겔을 형성하며 필름 전체로 물이 확산되는데, 두께가 두꺼울수록 물과 맞닿는 표면에 형성된 겔이 전체 필름 구조에 영향을 미치는 정도가 작아 봉해 시간이 길어질 수 있기 때문이다. 본 연구에서도 필름형성 용액에서의 히알루론산의 농도가 가장 높아 두껍게 제조된 대조군의 봉해시간이 가장 길게 나타났다. 구강용해 필름의 봉해시간은 구강 내에서 표적 물질의 방출 기간을 나타내는 중요한 특성으로 영국 약전(BP)에서는 구강용해필름의 in vitro 봉해 기준을 3분 이내로 설정한 바 있다(Ministry of Korea Food and Drug Safety, 2011). 본 연구에서 HA를 기반으로 제조한 비타민 D첨가 필름은 모두 BP 봉해 시간 기준을 만족하는 것으로 나타났다.

### 수분함량 및 투습도

구강용해필름의 수분함량과 투습도는 Table 2와 같다. Shin (2021)은 히알루론산을 기반으로 제조한 필름은 동일한 건조시간에서 두께에 따라 수분함량이 증가하는데, 그 이유는 두께가 증가할수록 히알루론산이 물 분자와 더 많은 수소결합을 형성하여 수분의 증발을 막기 때문으로 설명한 바 있다. 수분함량은 필름의 품질 특성에 큰 영향을 미치는 요인으로 건조 중 수분의 손실이 크면 필름이 쉽게 부서질 수 있고, 폴리머 사슬 결합 사이의 공간을 감소시켜 용해 시 수분 침투가 어렵게 되면서 봉해 시간을 지연시킬 수 있으며, 반대로 과도한 수분 함량은 필름 표면의 끈적임을 유발할 수 있다(Borges 등, 2015). 본 실험에서 필름의 수분함량은 대조군이 15.88%로 가장 높았고, 비타민 D 함유 필름의 수분함량은 13.15-14.27%로 비타민 D 함량에 따른 유의적 차이는 나타나지 않았다. 제조한 필름은 모두 깨짐이나 끈적임이 없었고, 적합한 유연성을 갖는 특성을 보였다.

투습도(Water vapor permeability, WVP)는 주변 환경으로 수분이 증발되는 것을 방지하거나 반대로 수분을 끌어들이기도 하는

**Table 2.** Effect of vitamin D content on moisture content and water vapor permeability (wvp) of hyaluronic acid based film

Samples	Moisture content (%) <sup>1,2)</sup>	WVP (g·mm/m <sup>2</sup> ·h·kPa)
0AI	15.88±0.55 <sup>a</sup>	17.29±3.02 <sup>a</sup>
1AI	13.15±1.53 <sup>b</sup>	13.18±3.91 <sup>ab</sup>
4AI	13.32±0.50 <sup>b</sup>	13.52±1.40 <sup>ab</sup>
7AI	13.81±0.43 <sup>b</sup>	11.29±2.45 <sup>b</sup>
10AI	14.27±0.31 <sup>b</sup>	11.49±2.23 <sup>b</sup>

<sup>1)</sup>Data expressed as mean±standard deviation of three replicates.

<sup>2)</sup>Different letters within a column mean significant difference ( $p < 0.05$ ).

등의 특성으로 필름 두께, 온/습도 및 가소제의 종류 및 함량과 같은 여러 변수의 영향을 받는다(Bertuzzi 등, 2007; Salazar 등, 2019). 수분의 이동은 필름의 벽을 통해 일어나고, 필름 양면의 수증기압 차이에 따른 확산에 의해서도 일어나는데(Ha 등, 2007), 친수성 다당류 소제로 만든 식용 필름의 경우 친수성으로 인해 수증기 전달을 방지하는 능력이 제한될 수 있으며(Gutiérrez 등, 2015), 특히 키토산(Aguirre-Loredo 등, 2016), 셀룰로오스(Cazón 등, 2020) 기반필름의 투습도는 필름의 수분함량에 따라 증가한다고 보고되고 있다. 투습도는 가식성 필름의 품질 유지를 위해 가능한 낮게 유지되어야 한다고 알려져 있다(Sharma와 Singh, 2016). 본 실험에서 제조한 필름의 투습도는 대조군인 0AI이 17.29 g·mm/m<sup>2</sup>·h·kPa로 가장 높았으며, 시료군간 비교 시, 7AI와 10AI의 투습도(11.29-11.49 g·mm/m<sup>2</sup>·h·kPa)는 1AI나 4AI의 값(13.18-13.52 g·mm/m<sup>2</sup>·h·kPa)보다 약 16% 낮은 값을 보여 비타민 D 함량증가에 따라 투습도가 감소함을 보였다. 가소제가 없는 필름은 잘 부서지기 쉽기 때문에 필름형성에서 가소제를 첨가하는데, 첨가되는 가소제는 중합체 사슬 사이의 분자간 결합을 감소시켜 필름의 투습도를 증가시킬 수 있다(Guilbert, 2000). 그러나, 본 연구에서 기반물질로 사용한 생체고분자 히알루론산의 경우 가소제 첨가 없이 필름 형성이 가능하며, 생체고분자의 특성상 친수성 성질로 인해 물과 쉽게 상호작용할 수 있기 때문에 투습도가 높아질 수 있으나(Morillon 등, 2002), 비타민 D의 첨가로

**Table 3.** Effect of vitamin D content on optical properties of hyaluronic acid based film

Samples	Opacity <sup>1)2)</sup>	Color value		
		L*	a*	b*
Vitamin D powder		96.3	1.38	10.67
0AI	1.52±0.06 <sup>c</sup>	90.32±0.13 <sup>b</sup>	2.98±0.03 <sup>a</sup>	-5.80±0.09 <sup>d</sup>
1AI	1.65±0.06 <sup>b</sup>	90.32±0.09 <sup>b</sup>	2.99±0.04 <sup>a</sup>	-5.80±0.07 <sup>d</sup>
4AI	1.65±0.10 <sup>b</sup>	90.10±0.32 <sup>b</sup>	2.84±0.04 <sup>b</sup>	-4.94±0.13 <sup>c</sup>
7AI	1.96±0.06 <sup>a</sup>	89.90±0.27 <sup>b</sup>	2.57±0.09 <sup>c</sup>	-3.99±0.14 <sup>b</sup>
10AI	1.86±0.17 <sup>a</sup>	91.52±0.79 <sup>a</sup>	2.02±0.07 <sup>d</sup>	-2.62±0.05 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup>Data expressed as mean±standard deviation of three replicates.

<sup>2)</sup>Different letters within a column mean significant difference ( $p<0.05$ ).

**Table 4.** Effect of vitamin D content on mechanical properties of hyaluronic acid based film

Samples <sup>1)</sup>	Mechanical properties <sup>1)2)</sup>		Vitamin D in film	
	Tensile strength (MPa)	Elongation at break (%)	Amount per film (µg)	Retention rate per film (%)
0AI	84.41±15.58 <sup>b</sup>	6.95±2.35 <sup>ab</sup>	-	-
1AI	103.87±7.98 <sup>ab</sup>	4.71±0.42 <sup>b</sup>	7.43	74.3
4AI	96.20±7.88 <sup>ab</sup>	7.52±1.45 <sup>ab</sup>	22.90	57.3
7AI	97.23±12.03 <sup>ab</sup>	9.07±2.47 <sup>a</sup>	39.68	56.7
10AI	106.60±6.25 <sup>a</sup>	9.43±1.39 <sup>a</sup>	55.78	55.8

<sup>1)</sup>Data expressed as mean±standard deviation of three replicates.

<sup>2)</sup>Different letters within a column mean significant difference ( $p<0.05$ ).

최종 필름의 투습도를 낮추는 효과를 얻을 수 있는 것으로 나타났다.

**광학적 특성**

필름 외관은 소비자 선호도에 영향을 미칠 수 있기 때문에 색도, 불투명도와 같은 광학적 특성은 필름의 중요한 요소이다(Riaz 등, 2018). 비타민 D 첨가 필름의 광학적 특성 결과는 Table 3에 나타내었다. L값은 대조군과 비타민 D 첨가시료간 유의적 차이가 없었으나, 10AI군에서만 유의적으로 높은 값을 보였다. 비타민 D의 첨가량이 증가할수록 a값은 2.98에서 2.02로 감소하였고 b값은 반대로 -5.80에서 -2.62로 점차 증가하였다( $p<0.05$ ). Table 3에 제시한 비타민 D 시료의 색의 특성을(L값 96.3, a값 1.38, b값 10.67) 고려할 때, 필름 색의 변화는 첨가한 비타민 D시료 색의 영향을 받은 것으로 보인다.

불투명도의 경우, 대조군이 1.52로 가장 낮았고, 비타민 D 농도가 높을수록 유의적으로 증가하여 7AI와 10 AI에서 가장 높은 값을 보였다. 이는 b값인 황색도와 유사한 결과로 비타민 D 함량이 늘어남에 따라 불투명도와 황색도 모두 증가한 것으로 보인다. 본 연구에서 제조한 필름의 불투명도 값은 Cao와 Song (2018)이 제조한 카라야 검 필름의 불투명도(1.27)보다 약간 더 높은 값이다. 일반적으로 포장용으로 이용되는 필름에는 투명도가 요구되는 반면, 일부 빛에 민감한 식품의 경우 필름이 빛을 차단하는 역할을 해야하므로 불투명한 필름이 바람직한 경우도 있다. 비타민 D는 빛에 안정한 영양소이므로 구강용해필름 뿐 아니라 가식성 포장필름의 소재로도 유용할 것으로 보인다.

**질감 특성**

비타민 D의 함량을 달리해 제조한 구강용해필름의 질감 특성은 Table 4에 제시하였다. 필름의 최대 인장강도는 필름이 늘어

나는 데 저항할 수 있는 파손되기 전의 최대 응력이다(Salawi와 Nazzal, 2018). 대조군 필름의 인장강도는 84.41 MPa로 Jridi (2014)가 보고한 감오징어 껍질 젤라틴-키토산 필름(40.26-59.4 MPa), dos Santos Garcia(2020)이 보고한 젤라틴-녹말 필름의 인장강도(62.1 MPa)보다 높은 값으로 단단한 필름이 제조되었다. 비타민 D 함량에 따른 차이를 보면 96.20-106.6 MPa의 범위로 유의적 차이가 없었다. Salawi와 Nazzal(2018)은 필름의 두께와 인장강도는 반비례한다고 보고하였는데, 비타민 D 첨가량에 따른 두께의 변화가 없었기 때문에 인장강도 역시 유의적 차이가 없는 것으로 나타났다. 또한, 필름의 질감특성은 주로 필름형성물질의 특성에 의해 결정되므로(Cupone 등, 2020) 필름에 추가되는 활성 소재의 양이 적은 경우 인장강도에 영향을 주지 않을 수 있다(Wang 등, 2021).

필름의 연신율은 4.71-9.43%의 범위로 비타민 D 첨가량이 증가할수록 연신율은 증가하는 경향을 보이는 것으로 나타나 1AI와 7AI, 10AI간에서 유의적 차이를 보였다. HA기반 필름의 연신율은 젤라틴-녹말 필름(1.26-4.76%; Jridi 등, 2014)보다 높고, 사과껍질 필름(10.89-16.14%; Sablani 등, 2009) 보다 낮으며, 편두전분 필름(4.15-7.08%; Baek과 Song, 2019)과 비슷한 값이다. 필름의 연신율 증가는 필름이 잘 늘어나는 것을 의미하며, 필름이 파단될 때의 강도가 낮아진다는 의미로, 필름의 수분함량이 증가할수록 인장강도는 감소하고 연신율은 증가한다는 보고가 있다(Cupone 등, 2020).

**필름 내 비타민 D 함량**

본 연구에서 제조한 필름의 무게는 한 장(2×3 cm<sup>2</sup>)을 기준으로 0.046-0.057 g이었으며, 한 장(평균 0.050 g)에 함유된 비타민 D의 함량을 계산하여 Table 4에 제시하였다. 시료 1AI는 필름 한 장으로 총분섭취량의 1배수(10 µg)를, 10AI는 1AI의 10배인 상한섭취

량(100 µg)을 충족하도록 제조하였으나, 제조된 필름 내 비타민 D 잔존량은 7.43-55.78 µg으로 첨가량의 55.8-74.3%로 나타나 제조과정 중 25.7-44.2%가 손실되는 것으로 나타났으며, 제조 시의 첨가량이 많을수록 손실율도 증가하였다. 이와 관련하여 Cupone 등(2020)도 말토덱스트린을 기반으로 한 비타민 D 함유 구강필름 제조 시 비타민 D<sub>3</sub>가 공기, 열, 습도 및 빛에 민감하여 분해될 수 있으므로 유럽 규정에 따라 20% 과량의 비타민 D<sub>3</sub>를 함유하도록 제조하고 비타민 D<sub>3</sub>의 안정성 향상을 위해 아스코르브산과 토코페롤을 항산화제로 추가했다는 보고가 있다. 손실량을 고려하여 본 실험조건으로 제조 시 충분섭취량은 1AI 필름 1.5장, 상한 섭취량은 10AI 필름 2장을 섭취하도록 제안하는 바이며, 또한 한 장 섭취를 목적으로 제조 시에는 이러한 손실량을 고려하여 초기 첨가하는 비타민 D 함량을 증가시킬 필요가 있을 것으로 보인다.

## 감사의 글

이 성과는 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(NRF-2019R1A2C1002782).

## 요 약

칼슘과 함께 뼈 건강에 필수적이거나, 그 섭취량이 부족하여 문제가 되고 있는 비타민 D를 쉽게 보충할 수 있는 새로운 제형으로 천연 고분자 물질인 히알루론산을 기반으로 한 비타민 D 함유 구강용해필름(orally disintegrating film, ODF)을 개발하고 비타민 D 함량에 따른 필름의 특성을 분석하였다. 첨가량은 2020 한국인 영양소섭취기준의 비타민 D 하루 충분섭취량(400IU: 10 µg)을 기준으로 4, 7배, 그리고 상한섭취량인 10배로 설정하였다. 제조한 필름의 두께는 기반물질의 농도가 가장 높은 대조군이 가장 두꺼웠고, 비타민 D 첨가량에 따른 유의적 차이는 없었다( $p < 0.05$ ). 비타민 D 첨가기간 필름의 수분함량의 차이는 없었으며, 첨가량이 많아질수록 투습도는 다소 감소하는 경향을 보여 소수성 물질인 비타민 D가 영향을 미친 것으로 보인다. 비타민 D의 함량이 높아질수록 필름의 명도는 10AI만 유의적으로 높았으며, 적색도는 감소하고 황색도는 증가하였다( $p < 0.05$ ). 이와 같은 색도특성은 첨가한 비타민 D 시료 자체 색의 영향을 받은 것으로 보인다. 대조군과 비교하였을 때 비타민 D의 증가는 불투명도를 유의적으로 증가시켰으며( $p < 0.05$ ), 7AI와 10AI에서 가장 높은 불투명도를 보였다. 다른 친수성 고분자 필름과 달리 본 연구에서 제조된 히알루론산 기반 필름은 가소제의 첨가 없이도 타 연구의 필름에 비교하여 높은 인장강도(84.40-106.6 MPa)( $p < 0.05$ )와, 비슷한 수준의 연신율(4.71-9.43%)( $p > 0.05$ )을 갖는 질감 특성을 보였다. HPLC/MS 분석을 통해 필름 내의 실제 비타민 D 함량을 분석한 결과, 제조 과정 중 비타민 D의 손실이 발견되었으며 이로 인해 목표섭취량(2020 한국인 영양소섭취기준 비타민 D 충분섭취량)을 충족하기 위해서는 제조 기준의 1.5-2배를 섭취하는 것이 적절할 것으로 보인다. 본 연구에서는 생체물질인 히알루론산을 기반으로 비타민 D를 쉽게 섭취할 수 있는 새로운 제형을 개발하였으며, 비타민 D 첨가로 인한 필름의 특성이 향상되는 결과를 이용하여 구강용해용 뿐 아니라 가식성 포장재 등 다양한 활용이 가능할 것으로 제안하는 바이다.

## References

- Aguirre-Loredo RY, Rodríguez-Hernández AI, Morales-Sánchez E, Gómez-Aldapa CA, Velázquez G. Effect of equilibrium moisture content on barrier, mechanical and thermal properties of chitosan films. *Food Chem.* 196: 560-566 (2016)
- Baek SK, Song KB. Preparation of edible films based on hyacinth bean starch. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 48: 692-697 (2019)
- Baek F, Takiishi T, Korf H, Gysemans C, Mathieu C. Vitamin D: modulator of the immune system. *Curr. Opin. Pharmacol.* 10: 482-496 (2010)
- Behjati J, Yazdanpanah S. Nanoemulsion and emulsion vitamin D<sub>3</sub> fortified edible film based on quince seed gum. *Carbohydr. Polym.* 262: 117948 (2021)
- Bertuzzi MA, Vidaurre EC, Armada M, Gottifredi JC. Water vapor permeability of edible starch based films. *J. Food Eng.* 80: 972-978 (2007)
- Bilbao-Sainz C, Chiou BS, Williams T, Wood D, Du WX, Sedej I, McHugh T. Vitamin D-fortified chitosan films from mushroom waste. *Carbohydr. Polym.* 167: 97-104 (2017)
- Bodini RB, Guimarães JDGL, Monaco-Lourenço CA, de Carvalho RA. Effect of starch and hydroxypropyl methylcellulose polymers on the properties of orally disintegrating films. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 51: 403-410 (2019)
- Borges AF, Silva C, Coelho JF, Simões S. Oral films: current status and future perspectives: I—galenic development and quality attributes. *J. Control. Release* 206: 1-19 (2015)
- Calton EK, Keane KN, Newsholme P, Soares MJ. The Impact of Vitamin D Levels on inflammatory status: A systematic review of immune cell studies. *PLoS ONE* 10: e0141770 (2015)
- Cao TL, Song KB. Active gum karaya/Cloisite Na<sup>+</sup> nanocomposite films containing cinnamaldehyde. *Food Hydrocoll.* 89: 453-460 (2019)
- Cazón P, Vázquez M, Velázquez G. Regenerated cellulose films with chitosan and polyvinyl alcohol: Effect of the moisture content on the barrier, mechanical and optical properties. *Carbohydr. Polym.* 236: 116031 (2020)
- Choi HS, Oh HJ, Choi H, Choi WH, Kim JG, Kim KM, Kim KJ, Rhee Y, Lim SK. Vitamin D insufficiency in Korea: a greater threat to younger generation: the Korea National Health and Nutrition Examination Survey (KNHANES) (2008)
- Cupone IE, Delleria E, Marra F, Giori AM. Development and characterization of an orodispersible film for vitamin D<sub>3</sub> supplementation. *Molecules.* 25: 5851 (2020)
- Dharmasthala S, Shabaraya AR, Andrade GS, Shiram RG, Hebbar S, Dubey A. Fast dissolving oral film of piroxicam: Solubility enhancement by forming an inclusion complex with β-cyclodextrin, formulation and evaluation. *J. Young Pharm.* 11 (2019)
- Dixit RP, Puthli SP. Oral strip technology: Overview and future potential. *J. Control. Release* 139: 94-107 (2009)
- dos Santos Garcia VA, Borges JG, Osiro D, Vanin FM, de Carvalho RA. Orally disintegrating films based on gelatin and pregelatinized starch: new carriers of active compounds from acerola. *Food Hydrocoll.* 101: 105518 (2020)
- Farhan A, Hani NM. Active edible films based on semi-refined κ-carrageenan: Antioxidant and color properties and application in chicken breast packaging. *Food Packag. Shelf Life* 24: 100476 (2020)
- García VAS, Borges JG, Maciel VBV, Mazalli MR, Lapa-Guimaraes JG, Vanin FM, Carvalho RA. Gelatin/starch orally disintegrating films as a promising system for vitamin C delivery. *Food Hydrocoll.* 79: 127-135 (2018)
- Gil A, Diaz JP, Mesa MD. Vitamin D: Classic and novel actions. *Ann. Nutr. Metab.* 72: 87-95 (2018)
- Guilbert S. Edible films and coatings and biodegradable packaging. *Bull. Int. Dairy Fed.* 346: 10-16 (2000)
- Gutiérrez TJ, Tapia MS, Pérez E, Famá L. Structural and mechanical

- properties of edible films made from native and modified cush-cush yam and cassava starch. *Food Hydrocoll.* 45: 211-217 (2015)
- Ha SH, Rhim JW, Kim BY, Baik MY. Characteristics of low molecular weight alginate film prepared with  $\gamma$ -irradiation. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 50: 111-115 (2007)
- Han X, Yan J, Ren L, Xue M, Yuan Z, Wang T, Yan Z, Yin L, Yang L, Qin C. Preparation and evaluation of orally disintegrating film containing donepezil for Alzheimer disease. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 54: 101321 (2019)
- Heinemann RJ, Carvalho RA, Favaro-Trindade CS. Orally disintegrating film (ODF) for delivery of probiotics in the oral cavity—development of a novel product for oral health. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 19: 227-232 (2013)
- Je YR, Bang SR, Kwon LK, Park SJ, Kim CH. Synthesis and characteristic of cross-linked hyaluronic acid hydrogels with putrescine under the neutral pH condition. *Polym. Korea* 45: 601-609 (2021)
- Jridi M, Hajji S, Ayed HB, Lassoued I, Mbarek A, Kammoun M, Souissi N, Nasri M. Physical, structural, antioxidant and antimicrobial properties of gelatin-chitosan composite edible films. *Int. J. Biol. Macromol.* 67: 373-379 (2014)
- Litwiniuk M, Krejner A, Speyrer MS, Gauto A, Grzela T. Hyaluronic acid in inflammation and tissue regeneration. *Wounds* 28: 78-88 (2016)
- Matsumoto Y, Kuroyanagi Y. Development of a wound dressing composed of hyaluronic acid sponge containing arginine and epidermal growth factor. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 21: 715-726 (2010)
- Mehraj S, Sistla YS. Optimization of process conditions for the development of pectin and glycerol based edible films: Statistical design of experiments. *Electro. J. Biotechnol.* 55: 27-39 (2022)
- Ministry of Korea Food and Drug Safety. Drug Approval System in Korea. (2011)
- Morillon V, Debeaufort F, Blond G, Capelle M, Voilley A. Factors affecting the moisture permeability of lipid-based edible films: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 42: 67-89 (2002)
- Necas J, Bartosikova L, Brauner P, Kolar J. Hyaluronic acid (hyaluronan): A review. *Vet. Med.* 53: 397-411 (2008)
- Oluwasina OO, Olaleye FK, Olusegun SJ, Oluwasina OO, Mohallem ND. Influence of oxidized starch on physicochemical, thermal properties, and atomic force micrographs of cassava starch bioplastic film. *Int. J. Biol. Macromol.* 135: 282-293 (2019)
- Pacheco MS, Barbieri D, da Silva CF, de Moraes MA. A review on orally disintegrating films (ODFs) made from natural polymers such as pullulan, maltodextrin, starch, and others. *Int. J. Biol. Macromol.* 178: 504-513 (2021)
- Park SN, Lee HJ, Lee KH, Suh H. Biological characterization of EDC-crosslinked collagen-hyaluronic acid matrix in dermal tissue restoration. *Biomater.* 24: 1631-1641 (2003)
- Pyo JS, Gu JY, Kim TH, Lee JJ, Hwang MS, Kang JS, Kim KM. A study on increased content of vitamin D in different types of mushrooms. *Korean J. Food & Nutr.* 49: 311-315 (2020)
- Riaz A, Lei S, Akhtar HMS, Wan P, Chen D, Jabbar S, Abid M, Hashim MM, Zeng X. Preparation and characterization of chitosan-based antimicrobial active food packaging film incorporated with apple peel polyphenols. *Int. J. Biol. Macromol.* 114: 547-555 (2018)
- Sablani SS, Dasse F, Bastarrachea L, Dhawan S, Hendrix KM, Min SC. Apple peel-based edible film development using a high-pressure homogenization. *J. Food Sci.* 74: 372-381 (2009)
- Salawi A, Nazzal S. The physicochemical, mechanical, and adhesive properties of solvent-cast vitamin E/Soluplus® films. *Int. J. Pharm.* 552: 378-387 (2018)
- Salazar ASS, Cavazos PAS, Paz HM, Fragoso AV. External factors and nanoparticles effect on water vapor permeability of pectin-based films. *J. Food Eng.* 245: 73-79 (2019)
- Sartori T, Menegalli FC. Development and characterization of unripe banana starch films incorporated with solid lipid microparticles containing ascorbic acid. *Food Hydrocoll.* 55: 210-219 (2016)
- Sharma L, Singh C. Sesame protein based edible films: Development and characterization. *Food Hydrocoll.* 61: 139-147 (2016)
- Shin JH. Development and characterization of orally disintegrating film with different thickness containing vitamin C based on hyaluronic acid. Master thesis, Sangmyung University, Seoul, Korea (2021)
- Singh A, Li P, Beachley V, McDonnell P, Elisseeff JH. A hyaluronic acid-binding contact lens with enhanced water retention. *Cont. Lens Anterior Eye* 38: 79-84 (2015)
- Steiner D, Finke JH, Kwade A. Efficient production of nanoparticle-loaded orodispersible films by process integration in a stirred media mill. *Int. J. Pharm.* 511: 804-813 (2016)
- Steiner D, Finke JH, Kwade A. Model-based description of disintegration time and dissolution rate of nanoparticle-loaded orodispersible films. *Eur. J. Pharm. Sci.* 132: 18-26 (2019)
- The Korean Nutrition Society, Dietary Reference Intakes for Koreans (2020)
- Wang H, Ding F, Ma L, Zhang Y. Edible films from chitosan-gelatin: Physical properties and food packaging application. *Food Biosci.* 100871 (2021)
- Yang JE, Seo SA, Kang MC, Yoon DH, Im TJ, Hwang ES, Won KH, Lee TH, Kim SY. Oral administration of *H. syriacus* L. flower ameliorates photoaging and dryness in UVB-irradiated skin. *Korean J. Food Sci. Technol.* 53: 399-407 (2021)
- Zareie Z, Yazdi FT, Mortazavi SA. Development and characterization of antioxidant and antimicrobial edible films based on chitosan and gamma-aminobutyric acid-rich fermented soy protein. *Carbohydr. Polym.* 244: 116491 (2020)