

Colonic Delivery를 위한 펙틴 비드로부터 BSA의 방출 특성

최 춘 순 · ¹박 상 무 · ¹송 원 현 · ¹이 창 문 · † ²이 기 영 · ³김 동 운 · ⁴김 진 철
광주보건대학 식품생명공학과, ¹전남대학교 의공학협동과정, ²화학공학부 및 촉매연구소,
³광양보건대학 보건위생과, ⁴강원대학교 바이오산업공학부
(접수 : 2003. 3. 15., 게재승인 : 2003. 4. 25.)

Release Properties of BSA from Pectin Beads for Colonic Drug Delivery

Choon-Soon Choi, Sang-Mu Park¹, Won-Hyun Song¹, Chang-Moon Lee¹, Ki-Young Lee†²
Dong-Woon Kim³, and Jin-Chul Kim⁴

Department of Food and Life Science, Gwangju Health College, Gwangju 506-701, Korea
¹Interdisciplinary program of Biomedical Engineering, ²Faculty of Chemical Engineering and
The Research Institute for Catalysis, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea
³Department of Health and hygiene, Gwangyang Health College, Gwangyang 545-703, Korea
⁴School of Bio Technology and Bio engineering, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea
(Received : 2003. 3. 15., Accepted : 2003. 4. 25.)

Oral drug delivery system using pectin gel was developed for colon-targeting of peptide drug. BSA(bovine serum albumin)-loaded pectin and pectin-alginate beads were prepared for drug release properties *in vitro*. Morphological studies by electron microscopy indicated that pectin and pectin-alginate beads were spherical in shape and approximately 1.0 mm. In order to find the suitable beads, effects of cross-linking agents (calcium chloride or zinc acetate) and drying temperature of beads were investigated. Drug release decreased with concentration of cross-linking agents and drying temperature. For colonic drug delivery from pectin and pectin-alginate beads, pectin degradable enzymes were added at 5 hrs from the beginning of drug release. After addition of enzymes, drug release was suddenly increased against free enzymes. Therefore, pectin and pectin-alginate beads can be promised as useful drug release carriers for colon-targeted delivery.

Key Words : Pectin, BSA, colon-target, bead

서 론

단백질 약물은 대부분 주사로 투여되고 있으나, 낮은 투과도와 낮은 치료효과 때문에 새로운 약물전달법이 요구된다. 경구 복용은 간편하고 손쉬운 약물전달 경로이지만, 단백질을 분해하는 소화 효소와 낮은 pH에 의해 단백질 약물이 불활성화 되고, 목적 부위에서 불완전하게 흡수되는 단점이 있다. 그러므로, 단백질 약물의 경구복용이 가능한 약물전달법을 개발하는 것이 중요하다(1-3).

대부분 다당들은 생체적합성과 생분해성을 가지고 있어 약물 전달 시스템(Drug Delivery System : DDS)에서 표적 지향성 설계를 위한 제재로 주목을 받고 있다.

이러한 다당 가운데 펙틴은 식물체의 세포막을 구성하는

주요성분으로 사과박이나 감귤류 껍질에서 얻을 수 있고 다양한 메틸에스터(methyl ester)기를 함유하는 폴리갈락투론산(polygalacturonic acid)으로 수용성 음이온 다당이다(4). 펙틴의 주골격은 대부분 α-(1, 4) 결합에 의하여 연결된 D-galactopyranosyluronic acid로 구성되어 있으며, 이 때 uronic acid의 carboxyl기의 일부는 methyl ester를 이루고 있다(5, 6). 이러한 펙틴은 단백질을 포함한 식품 시스템 내에서 증점제 및 안정제로 사용되며, 이밖에도 겔화제, 피막제, 분산제 등의 다양한 기능성을 가지므로 많은 가공식품에 사용되고 있다(7, 8). 또한, 펙틴 다당류는 면역증진활성(9), 항종양 활성(10, 11) 및 항퀘양 효과(12) 뿐만 아니라 다른 생물활성들도 점차적으로 밝혀지고 있어 향후 새로운 활성성분에 대한 기대가 모아지고 있다. 특히, 식이 섬유질인 펙틴은 위나 소장에서 분해 흡수되지 않고, colon 내 미생물에 의해 분해 된다.

따라서, 펙틴을 약물 담체로 이용함으로써 경구 투여용 단백질 약물을 효율적으로 colon으로 전달할 수 있을 뿐만 아

† Corresponding Author : Faculty of Chemical Engineering,
Chonnam Nat'l Univ., Gwangju 500-757, Korea
Tel : +82-62-530-1843, Fax : +82-62-530-1849
E-mail : kilee@chonnam.ac.kr

나라 면역증진 효과, 항종양 활성 및 항궤양 효과도 기대된다.

본 연구에서는 수용성이며 비교적 정량하기 용이한 단백질 약물인 BSA를 펙틴 비드에 포함하여 방출 특성을 조사하였고, 여러 가지 펙틴 분해 효소의 영향과 가교제가 약물 방출에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

시약

펙틴 (Low methoxy : 9%), 알긴산, trizma base는 Sigma chemical Co. (USA)에서 구입하여 사용하였고, calcium chloride, zinc acetate는 Junsei chemical Co. (Japan)에서 구입하였다. 펙틴 분해효소인 pectinase (EC 3.2.1.15 from *Aspergillus niger*), pectin lyase (EC 4.2.2.10 *Aspergillus niger*), pectinesterase (EC 3.1.1.11 *Aspergillus niger*)와 약물인 Bovine serum albumin (BSA)은 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하였으며, 모든 실험 재료는 정제 공정 없이 사용하였다.

BSA를 포함한 펙틴비드 제조

펙틴 비드는 양이온과의 이온결합을 통해 형성하였다(3). 펙틴 3%(w/v)와 BSA 3%(w/v)를 증류수에 용해한 후 1 ml 주사기를 이용하여 미리 제조한 0.1, 0.2, 0.3 M calcium chloride와 zinc acetate 각각의 수용액에 침전시켰다. 형성된 펙틴 비드를 증류수로 세척한 후 건조온도에 따른 약물 방출 거동을 알아보기 위해 각각 25°C, 37°C, 50°C와 동결건조 하였다.

BSA를 포함한 펙틴-알긴산 비드 제조

알긴산 1%(w/v)를 펙틴 3%(w/v) 수용액에 첨가하여 용해한 후 BSA 3%(w/v)를 증류수에 용해한 다음, 1 ml 주사기를 이용하여 0.4, 0.5, 0.6 M calcium chloride와 zinc acetate 수용액에 침전시켰다. 형성된 펙틴-알긴산 비드를 증류수로 세척한 후 37°C에서 건조하였다.

전자현미경을 통한 비드의 관찰

제조한 비드의 형태는 전자현미경 (CH-2, Olympus, Japan)을 이용하여 관찰하였으며, 비드의 크기를 확인하기 위해 objective micrometer (0.01 mm, Japan)를 사용하였다.

비드에 포함된 BSA의 농도 측정

건조한 비드 100 mg을 Tris-HCl buffer (pH 6.8) 5 ml에 분산시킨 후 초음파 처리하여 비드에 포함된 BSA를 용출시킨 후 12,000 rpm에서 15분 동안 원심 분리하여 고형물을 침전시킨 다음 상등액을 취하여 UV-spectrometer (Techne, Specgene FSPECGD, U.K.)을 이용하여 280 nm에서 약물의 흡광도를 측정하여 미리 작성한 검량선에 의해 환산 하였다.

비드의 건조 온도와 가교제 농도, 알긴산 첨가에 따른 BSA 방출 특성

각기 다른 조건(건조 온도, 가교제 농도, 알긴산 첨가)으로

제조된 비드 100 mg을 각각 0.1 M HCl buffer (pH 1.4)와 Tris-HCl buffer (pH 6.8) 10 ml에 분산시킨 후 배양기 (VS-8480SF, Vision, Korea)를 이용하여 37°C에서 방출을 행하였다. 방출된 약물의 농도는 280 nm에서 흡광도를 측정하여 작성된 검량식으로 계산하였다.

효소처리에 의한 BSA 방출 특성

0.3 M 농도의 가교제로 제조된 비드 100 mg을 Tris-HCl buffer (pH 6.8) 10 ml에 분산시킨 후 배양기 (VS-8480SF, Vision, Korea)를 이용하여 37°C에서 방출을 행하면서 colon에 도달될 것으로 예상되는 시간(5시간 경과 후)에 pectolyase, pectinase, pectin lyase, pectinesterase를 각각 22.5 U/mg을 첨가하여 BSA 방출 특성을 조사하였다. 또한, 소화 기관과 유사하게 4시간 동안 pH 1.4 조건에서 그 이후에는 pH 6.8 조건에서 pectinase 22.5 U/mg을 처리하여 방출을 행하였다. 방출된 약물의 농도는 위와 동일한 방법으로 측정하였다.

결과 및 고찰

BSA를 포함한 비드의 제조와 관찰

펙틴의 carboxyl groups과 calcium ion, zinc ion의 양이온 사이의 이온결합을 통하여 비드를 제조하고자 하였다. Calcium 이온의 경우는 noodle과 같이 형성되었다. 이는 펙틴의 에스테르 정도나 아미테이션 정도가 비드 형성에 영향을 미친다는 것을 반증한다. 따라서, carboxyl기를 가지고 있는 알긴산을 첨가하면 비드 형성과 방출 조절에 영향을 미칠 것으로 판단하였다. 알긴산을 첨가한 결과 calcium 이온으로 형성되지 않았던 펙틴과 달리 비드가 형성되었다. 그리고, zinc 이온의 경우는 비드가 잘 형성 되었다. Table 1은 제조한 비드를 건조한 후 전자현미경을 통해 관찰한 결과이다. 가교제의 농도가 높아질수록 비드의 크기는 작았으며, 펙틴-알긴산 비드의 경우 zinc acetate를 가교제로 사용했을 때 입자의 크기가 calcium chloride를 가교제로 사용했을 때보다 더 작았다.

Table 1. Pectin and pectin-alginate beads of mean diameter and shape

Preparation conditions		Mean diameter (mm)	Shape	
Pectin beads	Concentration of calcium chloride	0.1 M	-	
		0.2 M	-	
		0.3 M	-	
	Concentration of zinc acetate	0.1 M	1.0 ± 0.05	Spherical
		0.2 M	0.95 ± 0.05	
		0.3 M	0.9 ± 0.05	
Drying condition	Freeze Drying	2.0 ± 0.05	Spherical	
	25°C	1.0 ± 0.05		
	37°C	1.1 ± 0.05		
Pectin-alginate beads	Concentration of calcium chloride	0.1 M	1.55 ± 0.05	
		0.3 M	1.45 ± 0.05	
		0.6 M	1.3 ± 0.05	
	Concentration of zinc acetate	0.1 M	1.0 ± 0.05	Spherical
		0.3 M	0.9 ± 0.05	
		0.6 M	0.85 ± 0.05	

비드의 건조 온도에 따른 BSA의 방출

Fig. 1은 각기 다른 온도(25°C, 37°C, 50°C, 동결건조)에서 건조한 펙틴 비드로부터 BSA를 방출한 결과이다. 비드를 동결 건조한 경우 6시간에 90% 이상의 약물을 방출하였고, 다른 온도 조건에 비해 가장 빠르게 약물을 방출하였다. 또한, 건조 온도가 높을수록 약물 방출 속도가 빠름을 알 수 있었다. 9시간에 50°C의 경우 약 70%, 37°C의 경우 약 60%이었고, 25°C의 경우 50% 미만의 약물을 방출하였다. 이로써 비드의 건조 온도가 방출 특성을 결정하는데 영향을 미친다는 것을 알 수 있었다.

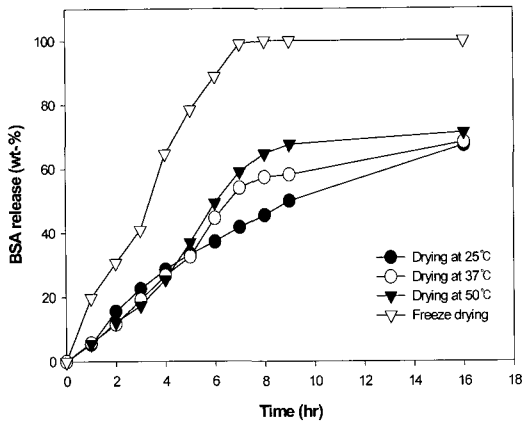


Figure 1. Effect of drying condition on release of BSA from pectin beads at pH 6.8. Pectin beads were cross-linked with 0.2 M zinc acetate.

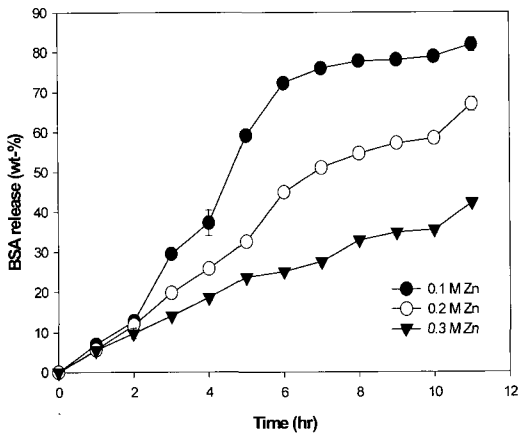


Figure 2. Effect of concentration of zinc acetate on release of BSA from pectin beads at pH 6.8.

가교제의 농도에 따른 BSA의 방출

0.1, 0.2, 0.3 M의 zinc acetate로 가교된 펙틴 비드로부터 BSA를 방출한 결과 가교제의 농도가 낮을수록 약물의 방출량이 높아짐을 알 수 있었다 (Fig. 2). 0.1 M 가교제 농도의 경우 11시간에 80% 이상의 약물을 방출한 반면, 0.3 M 가교제 농도의 경우 약 40% 정도 방출하였다. 이러한 결과는 calcium chloride로 가교하여 제조한 펙틴-알긴산 비드의 경우에서도 유사한 경향을 나타냈다 (Fig. 3). 가교제의 농도가 낮을수록 높은 방출율을 보였다. 또한, 펙틴-알긴산 비드의 제조에 있어서 zinc acetate를 사용한 경우, calcium chloride를

사용하여 제조한 비드보다 약물의 방출률이 비교적 낮음을 알 수 있다 (Fig. 4). 이는 zinc 이온이 펙틴과 알긴산을 동시에 가교하기 때문이라 생각된다. 이러한 결과로 가교제의 농도가 비드의 형성에 영향을 미침으로써 약물의 방출에도 큰 영향을 미친다는 것을 알 수 있었다.

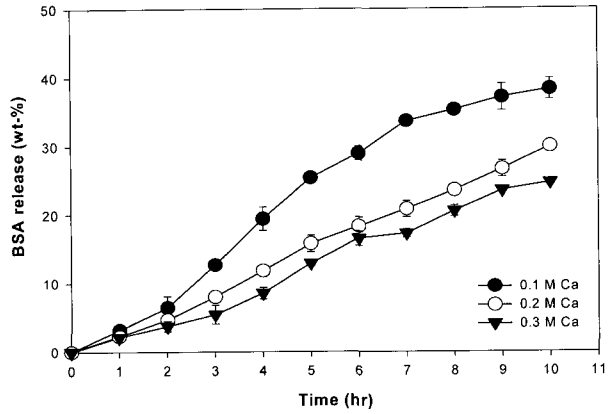


Figure 3. Effect of concentration of calcium chloride on release of BSA from pectin-alginate beads at pH 6.8.

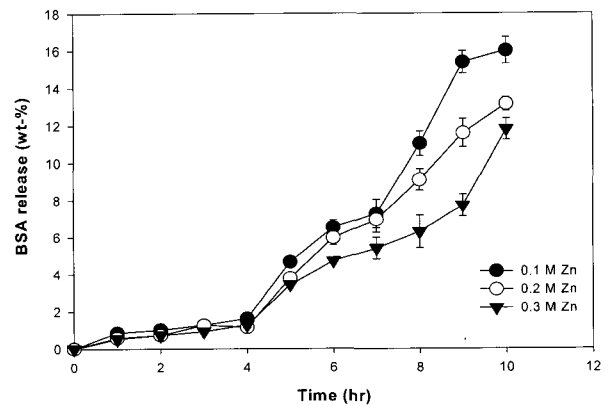


Figure 4. Effect of concentration of zinc acetate on release of BSA from pectin-alginate beads at pH 6.8.

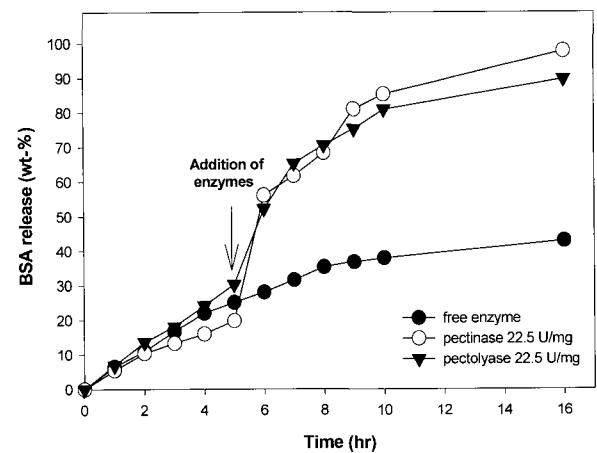


Figure 5. Effect of enzymes on release of BSA from pectin beads cross-linked with 0.3 M zinc acetate at pH 6.8.

효소처리에 의한 BSA의 방출 특성

방출 경과 5시간 후 효소를 처리하여 방출 특성을 조사한 결과, 효소의 분해로 인해 약물의 방출이 효소처리를 하지 않은 비드에 비해 급격하게 일어났으며, 그 중에서도 pectinase가 펙틴 분해에 가장 크게 영향을 미친다는 것을 알 수 있다 (Fig. 5). 펙틴-알긴산 비드는 pectinase와 pectolyase의 첨가 후 가장 급격한 방출을 보였고, pectin lyase는 효소를 첨가하지 않은 비드의 방출과 유사하였다 (Fig. 6). 또한, 소화기관과 유사한 조건으로 5시간 이전에는 pH 1.4 조건으로 그 이후에는 pH 7.4 조건으로 설정하여 방출을 행한지 5시간 후에 pectinase를 첨가하여 방출 특성을 조사한 결과, 4시간까지 낮은 방출률을 나타냈고, 5시간 후부터 효소에 의한 급격한 방출이 일어났다 (Fig. 7). 이러한 결과로, 목적하는 colon에 존재하는 미생물이 분비하는 효소에 의해 펙틴 비드가 분해되어 약물을 효과적으로 방출할 것으로 판단된다.

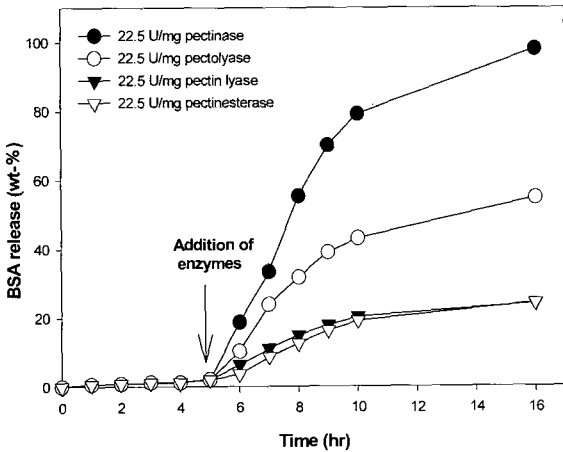


Figure 6. Effect of enzymes on release of BSA from pectin-alginate beads cross-linked with 0.3 M calcium chloride at pH 6.8.

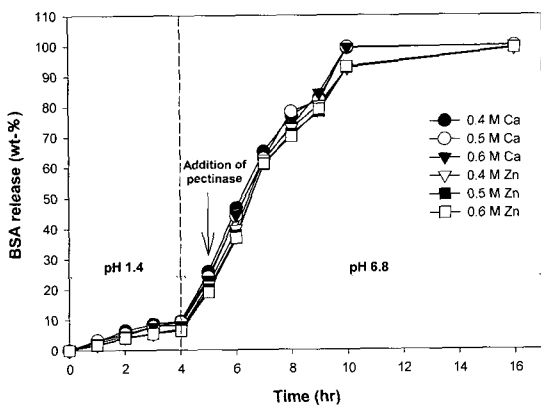


Figure 7. Effect of pectinase on release of BSA from pectin-alginate beads.

요약

경구 투여가 비교적 어려운 단백질 약물을 생체적합성이 우수하고 생분해성을 가진 펙틴을 이용하여 목적하는 colon

에 전달하고자 하였다. 이온결합을 통해 펙틴, 펙틴-알긴산 비드를 제조할 수 있었고, 단백질 약물인 BSA를 포함하여 방출을 행한 결과, 비드의 건조온도가 높을수록 방출률이 높은 경향을 보인 반면, 동결건조된 비드가 가장 높은 방출을 나타냈다. 또한, 가교제의 농도를 높게 처리한 비드일수록 방출률이 낮았다. 경구 투여 후 colon에 도달할 것으로 예상되는 5시간 후에 펙틴 분해효소를 처리한 결과, 효소 처리하지 않은 비드에 비해 급격한 방출이 일어났다. 이러한 결과로 colon내에 존재하는 미생물이 분비하는 효소에 의해 펙틴 비드에 포함된 약물이 방출될 것으로 판단된다. 따라서, 경구로 투여된 펙틴 비드 안의 약물이 소화기관에서 안정하게 통과하고 colon에서 방출되어 효과를 나타낼 것으로 판단된다.

감사

본 연구는 2002년도 광주보건대학 학술연구비 지원에 의하여 수행되었음을 밝히며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Tomlinson, E. and C. Livingstone (1989), Drug delivery (10) therapeutic peptides and proteins, *J. Pharm.* **243**, 646-648.
- Sriamornsak, P. (1998), Investigation of pectin as a carrier for oral delivery of proteins using calcium pectinate gel beads, *Int. J. Pharm.* **169**, 213-220.
- Sriamornsak, P. and J. Nunthanid (1998), Calcium pectinate gel beads for controlled release drug delivery: I. Preparation and in vitro release studies, *Int. J. Pharm.* **160**, 207-212.
- Kelly, R., E. S. Gudo, J. R. Mitchell, and S. E. Harding (1994), Some observations on the nature of heated mixtures of bovine serum albumin with an alginate and a pectin, *Carbohydrate Polymer* **23**, 115-120.
- Aspinall, G. O. (1980), Chemistry of cell wall polysaccharides, *In The Biochemistry of Plants*. J. Preiss, ed., p 480, Academic Press, New York.
- Bacia, A., P. J. Harris, and B. A. Stone (1988), Structure and function of plant cell walls, *In The Biochemistry of Plants*. J. Preiss ed., p 309, Academic Press, New York.
- Dziedzic, J.D. (1991), A focus on gums, *Food Technol.* **45**, 116-132.
- Hwang, J. K., M. J. Choi, and J. T. Kim (1997), Emulsion properties of casein- alginate mixtures, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **26**, 1102-1108
- Bengmark, S. (1998), Immunonutrition: role of biosurfactants, fiber, and probiotic bacteria, *Nutrition* **14**, 585-594.
- Jian-Hwa Guo, G. W. Skinner, W. W. Harcum, and P. E. Barnum (1998), Pharmaceutical applications of naturally occurring water-soluble polymers, *Pharm. Sci. Technol. Today.* **1**, 254-261.
- Harris, P. J. and Ferguson, L. R. (1993), Dietary fibre: its composition and role in protection against colorectal cancer, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **290**, 97-110.
- Ibrahim El-Gibaly (2002), Oral delayed-release system based on Zn-pectinate gel (ZPG) microparticles as an alternative carrier to calcium pectinate beads for colonic drug delivery, *Int. J. Pharm.* **235**, 1-15.