

아민화 젤라틴 - 후코이단 미세캡슐의 제조

고정아¹ · 오운성^{1,2} · 박현진^{1*}

¹고려대학교 생명공학부, ²식품의약품안전청 영양정책과

Preparation and Characterization of Aminated Gelatin-Fucoidan Microparticles

Jung A Ko¹, Youn Sung Oh^{1,2}, and Hyun Jin Park^{1*}

¹School of Life Sciences and Biotechnology, Korea University

²Nutrition Policy Division, Korea Food and Drug Administration

Abstract Aminated gelatin microparticles were prepared with fucoidan at concentrations ranging from 0.5 to 2.0%. In order to acquire a higher primary amino group content regarding gelatin, gelatin was synthesized by using 1,2-ethylenediamine and free amino groups of aminated gelatin microsphere sample uncrosslinked or crosslinked with fucoidan have been determined by using trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) methods. At the smallest fucoidan concentration, the free amino group content of the aminated gelatin microparticles was highest and decreased when fucoidan concentrations were increased. Furthermore, as concentration of fucoidan increased, the release from microparticles decreased. The *in vitro* gastric mucoadhesion of microparticles were evaluated by using fluorescent-labeled microparticles in an isolated and perfused mouse stomach. The gastric mucoadhesion of the aminated gelatin microparticles was significantly improved compared with that of gelatin microparticles.

Keywords: gelatin, fucoidan, microparticles, mucoadhesive

서 론

미세캡슐은 특정 물질을 외부 환경으로부터 보호하거나 원하는 장소 또는 원하는 시점에서 방출시킬 목적으로 피복 물질을 사용하여 마이크로미터 크기의 캡슐로 제조한 것을 말한다. 최근에는 기능성물질, 첨가물 또는 미생물 등을 캡슐화하여 그 효율을 높이며 또한 원하지 않는 맛이나 향을 가진 물질들을 캡슐화하여 제품의 품질을 향상시키는 목적으로도 연구되고 있다(1,2).

젤라틴은 동물의 뼈, 연골, 가죽 등 결합조직의 주요 단백질 성분인 콜라겐의 부분적인 가수분해에 의해 얻어지는 유도단백질로써 생체 적합성이 높고 무독성의 생분해성 특성을 가지고 있어 음식, 제약, 포토그래픽, 화장품 사업등 광범위하게 쓰이고 있다. 젤라틴은 비교적 낮은 온도와 농도에서도 점성을 부여하며, 젤라틴 용액은 냉각될 때 선명하고 탄력성 있는 열가역적 겔을 형성하기 시작하여 미세캡슐의 피복물질로 사용되고 있다(3,4). 그러나 젤라틴은 수용액에서 쉽게 녹아버리기 때문에 그 안정성을 높여주기 위하여 formaldehyde 나 glutaraldehyde와 같은 화학물질과의 crosslinking 방법이 이용되고 있다. 하지만 이들은 독성을 지닌 화학물질이므로 이러한 단점을 보완하기 위하여 genipin(4), chitosan(5) 등과 같은 천연 재료들이 사용되고 있다.

후코이단은 갈색 해조류, 성게알의 젤리층, 해삼 체벽에서 추출한 복합황산다당류로, 혈액응고 등의 기능이 알려져 있으며 일본과 한국에서 식품식품으로 사용되고 있다. 이것은 위암세포인 헬리코박터 파이로리의 정착을 저해시킨다고 입증되었다(6). Shibata 등(7)은 후코이단이 헬리코박터 파이로리 감염을 방지하고 위암 관련 위험요소를 줄여준다고 보고했다. 후코이단의 많은 약리학적 연구에도 불구하고 후코이단에 기초한 delivery system에 관련된 정보는 별로 없다. 따라서 본 실험에서는 젤라틴 미세캡슐의 crosslinking agent로서 후코이단을 사용하였고 젤라틴의 양이온을 증가시켜 위점막 점착성을 향상시킬 목적으로 젤라틴을 변성시켜 아민화 젤라틴을 제조하여 사용하였다.

본 연구에서는 후코이단과 결합한 아민화 젤라틴 미세캡슐을 제조하여 후코이단 농도에 따른 결합정도 및 방출속도 등의 그 특성을 알아보고 위점막에서의 점착력 효과를 알아보고자 하였다. Amoxicillin은 위의 헬리코박터 파이로리 염증의 치료로 널리 쓰이고 있는 항생물질로 본 연구의 약 모델로 사용되었다.

재료 및 방법

실험재료

젤라틴은 어류에서 유래된 분자량이 196 kDa인 것으로 Samchun Pure Chemical Co.(Pyeongtaek, Korea)에서 구입하였다. 후코이단(MW 200 kDa; Organic Sulfate 34.2%)은 Kolon Life Science (Gwacheon, Korea)에서 공급받았으며, olive oil은 Duksan Pure Chemical Co.(Ansan, Korea)에서 구입하였다. 그 밖의 amoxicillin trihydrate, Fluorescein isothiocyanate(FITC), 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid(TNBS) in 5%(w/v) water solution들은 Sigma-Ald-

*Corresponding author: Hyun Jin Park, School of Life Sciences and Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Korea
Tel: 82-2-3290-3450
Fax: 82-2-953-5892
E-mail: hjpark@korea.ac.kr
Received December 30, 2011; revised February 15, 2012;
accepted February 26, 2012

rich(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

아민화 젤라틴의 합성

아민화 젤라틴은 Wang 등(8)의 방법에 따라 준비하였다. 먼저 젤라틴을 phosphate buffer(pH 5.3)에 녹이고, 충분한 양의 1,2-ethylenediamine solution을 넣었다. 그 후 pH 5로 맞춘 후, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride를 넣어 주었다. 만들어진 solution은 37°C에서 한 시간 동안 반응을 시켜 주고 48시간 동안 증류수를 이용한 투석과정을 거친 후 동결건조하였다.

아민화 젤라틴-후코이단 미세캡슐 제조

40 mL의 증류수에 아민화 젤라틴(8 g)을 녹이고 10 mg의 amoxicillin을 가한 뒤 후코이단을 각각 0.5, 1, 1.5, 2%(w/v) 농도로 첨가하였다. 혼합된 용액을 60°C로 예열된 olive oil(40 mL)에 넣어 800 rpm에서 한 시간 동안 교반시켰다. Emulsion은 ice bath를 이용해 빠르게 5°C로 낮추어 주고 5°C의 아세톤 60 mL를 넣어 다시 10분간 stirring 시켰다. 그 후 얻어진 캡슐을 5°C 아세톤으로 씻고 24시간 동안 진공건조 하였다.

미세캡슐의 특성

미세캡슐의 표면과 크기는 scanning electron microscope(SEM)(XL 40, Philips, Eindhoven, The Netherlands)을 이용하여 관찰하였고, sample은 double side sticky tab을 이용하여 aluminium stub에 올려 MSP-1S magnetron sputter coater(Vacuum Device, Tokyo, Japan)로 골드 코팅공정을 거친 후에 15 kV acceleration voltages 조건에서 진행되었다.

미세캡슐의 효율을 측정하기 위하여 약 1 g의 미세캡슐을 50 mL 증류수에 넣고 가열시킨 후 UV spectrophotometer(Shimadzu, 1601PC, Tokyo, Japan)를 이용해 225 nm에서 흡광도를 측정하여 아래의 식에 대입하여 계산하였다.

Loading efficiency (%)

$$= \frac{\text{Calculated amoxicillin concentration}}{\text{Theoretical amoxicillin concentration}} \times 100$$

후코이단 농도에 따른 아민화 젤라틴 미세캡슐의 유리 아미노 그룹 함량

제조된 미세캡슐의 유리아미노산의 함량은 TNBS 방법을 사용하여 측정하였다(8). 3 mg의 미세캡슐을 pH 8.0 borate buffer(3 mL)에 넣고 0.01%(w/v) TNBS solution 0.25 mL를 넣어주었다. 암실 속 40°C에서 2시간 반응 후에 부유물은 filter paper(Watman Cat No. 1004 185, 185 mm φ, Maidstone, England)를 통해 거른 후, 여과액에 1% trichloroacetic acid를 포함하고 있는 DL-valine 용액(40 nM/mL) 0.1 mL를 넣었다. 용액을 다시 40로 조절된 어두운 곳에서 1시간 incubation 한 후 10 mL의 5 M HCl을 첨가하고 UV spectrophotometer(Shimadzu, 1601PC, Tokyo, Japan)를 이용해 335 nm에서 absorbance를 측정 하였다.

젤라틴 미세캡슐의 방출

젤라틴 미세캡슐에서의 방출속도는 다음과 같은 투석방법을 이용하여 분석하였다. 걸리진 미세캡슐을 투석막에 넣어 500 mL의 PBS buffer(pH 7.8)에 담고 200 rpm, 37°C의 조건으로 유지시켜 주었다. 매 시간마다 각각 10 mL의 sample을 추출하여 UV spectrophotometer(Shimadzu, 1601PC, Tokyo, Japan)를 이용해 225 nm

의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

젤라틴 미세캡슐의 위 점막 점착성 측정

미세캡슐의 Fluorescence labeling

미세캡슐의 위 점막 점착성 측정을 위하여 FITC-label된 미세캡슐을 제조하였다. 6 mL의 carbonate buffer(pH 9.4)에 젤라틴 미세캡슐 40 g과 0.4 mL의 FITC 용액(FITC 5 mg/methanol 1 mL) 용액을 넣은 후, 4°C에서 10시간 동안 stirring시켰다. 그 후 원심분리기(5000 rpm, 4°C, 5 min)를 이용해 미세캡슐을 분리하고 FITC 잔여물을 제거하기 위해 증류수로 반복해서 세척하여 4°C에서 보관하며 사용하였다.

위 점막 점착성 측정

미세캡슐의 위 점막 점착성 측정은 Liu 등(9)의 방법을 변형하여 연구하였다. 쥐(ICR, 30 g)의 위를 길이 2 cm, 폭 1 cm의 크기로 잘라 액체질소 가스를 부어 급속 냉동 시킨 후 -80°C에서 30분간 보관 후 4°C에 저장하였다. 샘플을 PBS 용액으로 세척하고 젤라틴 미세캡슐과 아민화된 젤라틴 미세캡슐을 각각 100개씩 위 점막 위에 고르게 분산시킨 후 93% 상대습도와 실온에서 20분간 보관하였다. 그 후 조직을 꺼내어 polyethylene plate에 고정시키고 pH 1.2의 인공위액으로 세 번 세척하고 그 표면에 남아있는 미세캡슐을 모아 5 mL PBS에 녹여 flurospectrophotometer(Shimadzu, 1601PC, Japan)를 이용해 excitation 485 nm, emission 530 nm에서 형광도를 측정하였다.

아민화된 젤라틴 미세캡슐과 위점막과의 점착성이 전기적 상호 작용에 의해 이루어지는 지를 확인하기 위하여 2 mL의 1, 2-ethylenediamine으로 세척하여 위 점막 표면을 중성상태로 만든 후 동일하게 실험을 진행하였으며 3회 반복 실험하였다.

통계처리

본 연구에서의 모든 결과값은 SAS program(SAS Institute Inc., Cary, NC)을 이용하여 분산 분석하였으며, 다중비교법인 Duncan's multiple range test를 사용하여 유의차가 있는 경우에는 $p < 0.05$ 유의수준에서 비교하였다.

결과 및 고찰

아민화 젤라틴-후코이단 미세캡슐의 제조 및 특성

아민화 젤라틴-후코이단 미세캡슐은 젤라틴의 양전하인 amino 그룹과 후코이단의 음전하인 sulfate와의 이온결합으로 이루어졌다. Fig. 1은 젤라틴 미세캡슐의 표면형태를 보여준다. 젤라틴 미세캡슐은 동일한 구 모양과 부드러운 표면을 가지고 있으며 그 크기는 약 50-150 μm였다.

다양한 농도의 후코이단과 결합된 젤라틴 미세캡슐의 수율은 50-71%의 범위를 나타내었다(Fig. 2). 후코이단의 농도가 1%이상 첨가될수록 수율은 감소하는 경향을 보였다.

후코이단의 농도에 따른 젤라틴 미세캡슐의 유리 아미노 그룹의 함량

젤라틴은 amino 그룹의 양전하를 가지고 있고, 후코이단은 sulfate 그룹의 음전하를 가지고 있기 때문에, 젤라틴은 후코이단과 정전기적 상호작용으로 결합하여 미세캡슐을 이루게 된다(10). 따라서 TNBS 방법을 통하여 후코이단과 결합하고 남은 젤라틴의 아미노 그룹의 양을 확인 할 수 있었다.

Fig. 3은 다양한 농도의 fucoidan과 결합한 gelatin의 free amino

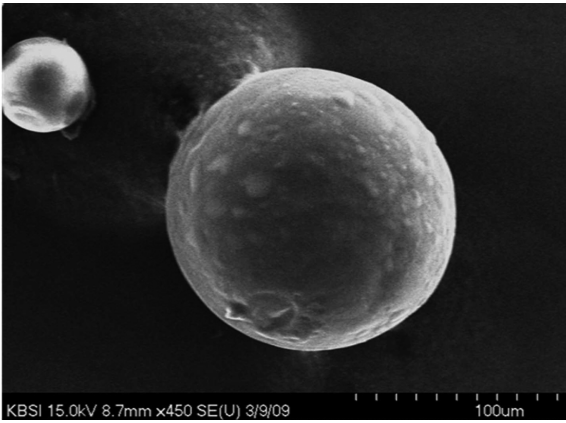


Fig. 1. SEM pictures of aminated gelatin-fucoidan microparticles.

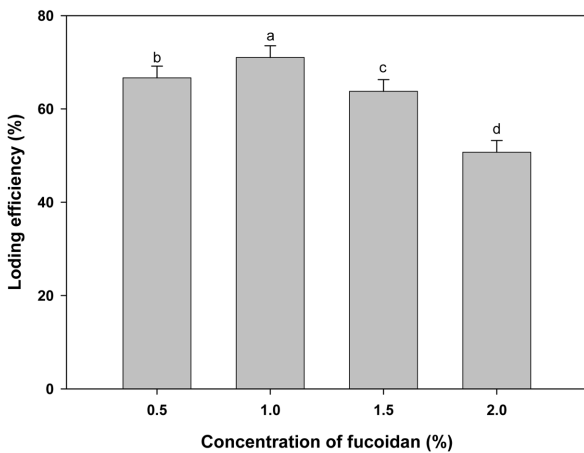


Fig. 2. Encapsulation efficiency of aminated gelatin-fucoidan microparticles.

group을 보여주고 있다. 0.5% 후코이단으로 처리한 젤라틴 미세캡슐은 0.0713으로 가장 높았고 후코이단 2%가 첨가된 젤라틴 미세캡슐은 0.0450로 가장 낮았다. 즉, 후코이단의 농도가 높아질수록 미세캡슐내의 free amino group의 함량이 점차 낮아지게 되는 것으로 보아 후코이단과 젤라틴 사이의 cross-linking이 더 견고하게 이루어졌음을 알 수 있다.

아민화 젤라틴 미세캡슐의 약물 방출

Fig. 4는 후코이단의 농도에 따른 미세캡슐의 방출실험 결과를 보여주고 있다. PBS(pH 7.4)에서 0.5% 후코이단 첨가된 젤라틴 미세캡슐의 경우 5시간 동안 젤라틴 미세캡슐 내 포집물질의 약 92%가 방출되었다. 그리고 cross-linking agent인 후코이단의 농도가 증가할수록 방출속도는 감소하는 것을 볼 수 있었다. 일반적으로 미세캡슐의 결합정도가 높을수록 캡슐로부터 외부로의 core material의 확산이 느려진다. Muvaffak 등(11)은 glutaraldehyde로 결합시킨 젤라틴 미세캡슐의 경우에도 glutaraldehyde의 농도가 증가할수록 캡슐로부터 방출속도는 감소함을 보여주었다. 인공위액 (pH 1.2)에서도 역시 후코이단의 농도가 증가할수록 방출속도가 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 결과적으로 두 경우 모두에서 cross-linking의 정도에 따라 release 결과에 영향을 미치며 그 link가 견고할수록 core material의 방출이 보다 더디게 일어남을 보였다.

그리고 pH 1.2인 인공위액에서 3시간 정도 후에 80% 이상 방

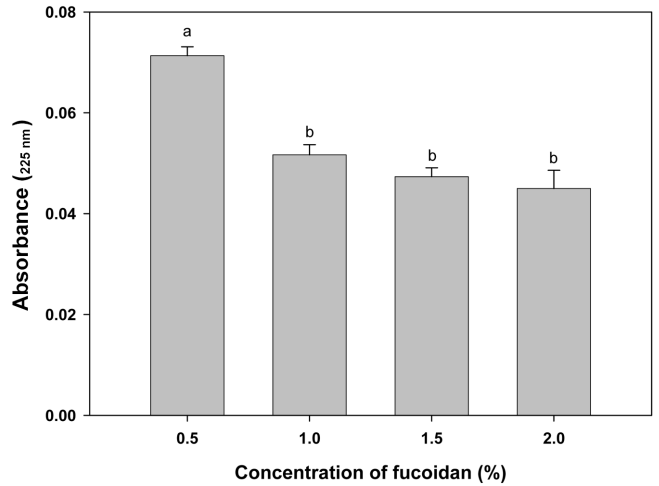


Fig. 3. Absorbance of uncrosslinked amino groups in aminated gelatin microparticles crosslinked different concentration of fucoidan.

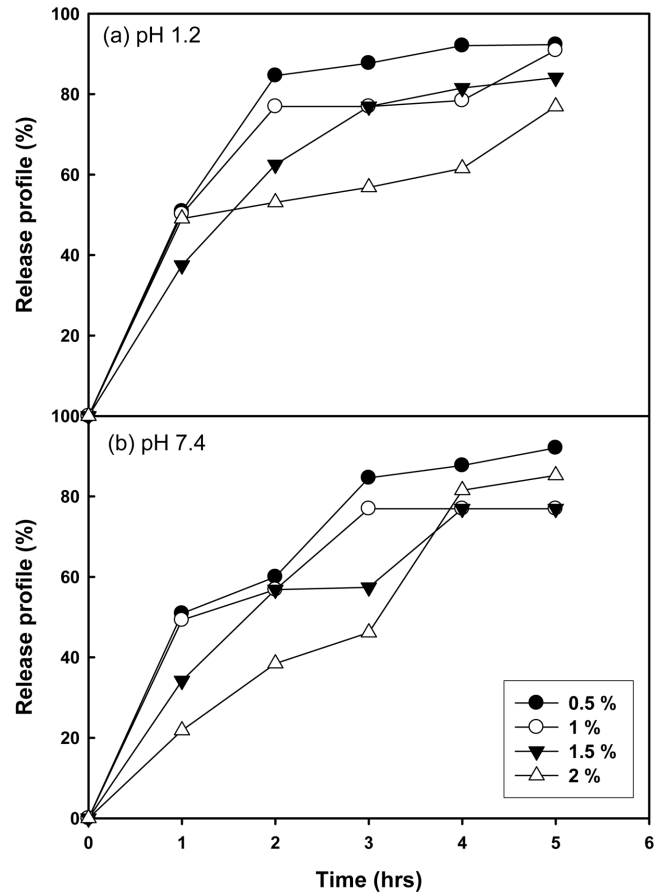


Fig. 4. Release profile from aminated gelatin microparticles crosslinked with different concentration fucoidan. (a), phosphate buffered saline (pH 7.4); (b), simulated gastric fluid (pH 1.2).

출 되었으나 pH 7.4의 PBS 에서는 약 40% 정도 방출되어 인공 위액에서의 방출이 훨씬 더 빠른 것을 볼 수 있었다. 낮은 pH 환경에서는 미세캡슐내의 아미노 그룹간에 강한 정전기적 반발력 때문에 캡슐의 팽창력이 증가하여 높은 pH 환경에서보다 내부의 물질이 방출되기 쉬워진다(8).

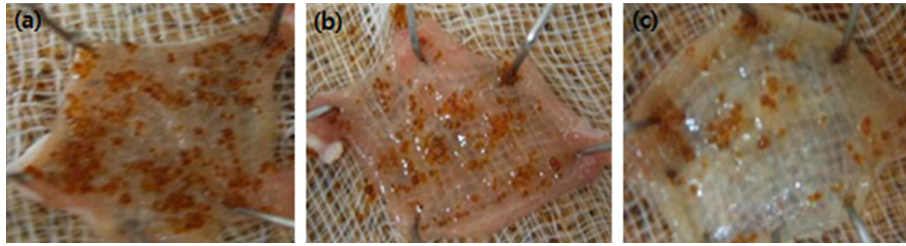


Fig. 5. Pictures of gastric mucoadhesion of microparticles in isolated and perfused rat stomach. (a), Aminated gelatin microparticles; (b), gelatin microparticles; (c), 1,2-ethylenediamine treatment.

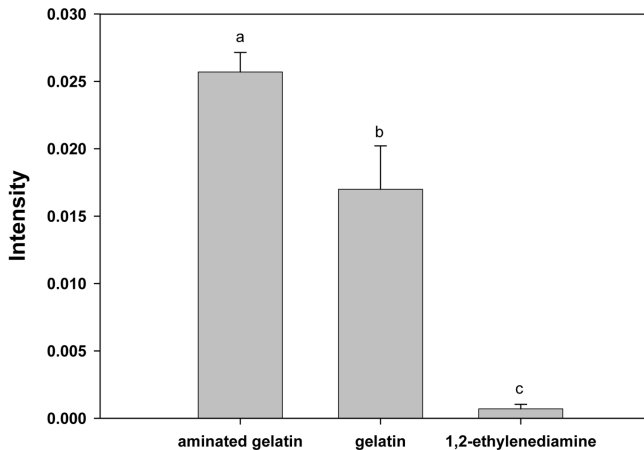


Fig. 6. Fluorescence intensity of gastric mucoadhesion of microparticles in isolated and perfused rat stomach.

미세캡슐의 위 점막점착성

미세캡슐의 위 점막점착성은 fluorescent-labeled 미세캡슐을 제조하여 위점막 표면에 남아있는 미세캡슐의 Fluorescence intensity로 측정하였다. Fig. 5는 쥐의 위 점막에 미세캡슐 100개를 붙인 뒤 그 점착성을 확인한 결과로 아민화 젤라틴 (a)의 경우 젤라틴 미세캡슐 (b)의 경우보다 훨씬 많은 미세캡슐이 남아 있음을 볼 수 있다. (c)는 위점막에 1,2-ethylenediamine을 처리하여 음전하를 띄고 있는 위 점막 표면에 amino group의 양전하를 주어 위 점막 표면을 중성상태로 만들어 아민화된 젤라틴 미세캡슐과 위점막과의 점착성이 전기적 상호 작용에 의해 이루어지는 지를 확인하였다. (c)는 젤라틴이나 아민화된 젤라틴의 경우보다 현저하게 적은 미세캡슐이 남아 있었다. 그리고 남아있는 미세캡슐의 Fluorescence intensity를 측정한 Fig. 6에서 (c)의 형광 흡광도 값이 유의적으로 가장 낮아 중성 상태로 된 위점막에는 미세캡슐이 거의 점착되지 않았음을 알 수 있었으며 젤라틴 미세캡슐의 위점막 점착력은 점막의 negatively charged sialic acid residue와 젤라틴의 amino 그룹사이의 정전기적인 인력에 의한 것임을 확인할 수 있었다.

아민화된 젤라틴의 경우 일반 젤라틴 보다 primarily amino group의 함량이 높기 때문에 더 높은 표면전하 절대 값을 가지게 되고 그만큼 위점막과의 사이에 정전기적 인력도 커져 점착력이 높아진다(12). Fig. 6에서 쥐의 위 점막에 아민화된 젤라틴 미세캡슐이 일반 젤라틴 미세캡슐보다 유의적으로 더 많이 남아 있는 것을 확인할 수 있었다($p < 0.05$). 즉 아민화된 젤라틴의 위 점착력이 일반 젤라틴 미세캡슐보다 높다고 할 수 있다.

요 약

아민화 젤라틴 미세캡슐은 젤라틴의 양이온인 amino 그룹과 후코이단의 음이온인 sulfate 그룹과의 이온결합으로 제조되었다. 후코이단의 농도가 증가할수록 미세캡슐의 유리아미노 그룹의 함량은 감소했으며, 또한 미세캡슐로부터의 방출 속도 역시 후코이단의 농도가 증가함에 따라 감소했고 pH 1.2인 인공위액에서의 방출 속도가 pH 7.4인 PBS 에서보다 더 빠른 것을 알 수 있었다. 아민화 젤라틴 미세캡슐은 일반 젤라틴 미세캡슐보다 유리아미노 그룹의 함량이 높아 음전하를 띄고 있는 위점막에 점착력이 커짐을 알 수 있었다. 본 연구는 아민화 젤라틴 미세캡슐을 제조하고 점착력을 살펴본 것으로서, 본 연구결과를 토대로 amoxicillin을 캡슐화한 아민화 젤라틴 미세캡슐의 헬리코박터 저해능력에 대한 연구도 진행되어야 할 것이다.

문 헌

- Ko JA, Kim WY, Park HJ. Effects of microencapsulated Allyl isothiocyanate (AITC) on the extension of the shelf-life of kimchi. *Int. J. Food Microbiol.* 153: 92-98 (2012)
- Park MH, Kim MJ, Cho WI, Chang PS, Lee JW. Volatile changes in beverages and encapsulated powders containing an *Artemisia* extract during production and storage. *Korean J. Food Sci. Technol.* 43: 271-276 (2011)
- Kim BH, Park JW, Hong JH. Studies on the thermomechanical characteristics of the blend film of chitosan/gelatin. *Korean J. Food Sci. Technol.* 37: 567-573 (2005)
- Liang HC, Chang WH, Lin KJ, Sung HW. Genipin-crosslinked gelatin microspheres as a drug carrier for intramuscular administration: *In vitro* and *in vivo* studies. *J. Biomed. Mater. Res. A* 65: 271-282 (2002)
- Kim JC, Lee HY, Kim MH, Lee HJ, Kang HY, Kim SM. Preparation and characterization of chitosan/gelatin microcapsules containing triclosan. *Colloid Surface B* 52: 52-56 (2006)
- Shibata H, KimuraTakagi I, Nagaoka M, Hashimoto S, Sawada H, Ueyama S, Yokokura T. Inhibitory effect of Cladosiphon fucoidan on the adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric cells. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 45: 325-336 (1999)
- Shibata H, Iimuro M, Uchiya N, Kawamori T, Nagaoka M, Ueyama S, Hashimoto S, Yokokura T, Sugimura T, Wakabayashi K. Preventive effects of Cladosiphon fucoidan against *Helicobacter pylori* infection in Mongolian gerbils. *Helicobacter* 8: 59-65 (2003)
- Wang J, Tauchi Y, Deguchi Y, Morimoto K, Tabata Y, Ikada Y. Positively charged gelatin microspheres as gastric mucoadhesive drug delivery system for eradication of *H. pylori*. *Drug Deliv.* 7: 237-243 (2000)
- Liu Z, Lu W, Qian L, Zhang X, Zeng P, Pan J. *In vitro* and *in vivo* studies on mucoadhesive microspheres of amoxicillin. *J. Control. Release* 102: 135-144 (2005)

10. Shuzhen Z, Huizhen L. Structures and properties of polysaccharide gel from eucheuma gelatinae J. Fish. China 13: 333-338 (1989)
11. Muvaffak A, Gurhan I, Gunduz U, Hasirci N. Preparation and characterization of a biodegradable drug targeting system for anti-cancer drug delivery: Microsphere-antibody conjugate. J. Drug Target. 13: 151-159 (2005)
12. Wang J, Tabata Y, Bi D, Morimoto K. Evaluation of gastric mucoadhesive properties of aminated gelatin microspheres J. Control. Release 73: 223-231 (2001)