

## Evaluation of alginate microspheres prepared by emulsion method for protein delivery system

Ji-Hyun Park<sup>1</sup>, Chang-Moon Lee<sup>2</sup>, Gwang-Yun Kim<sup>3</sup>, Joon-Haeng Rhee<sup>4</sup>, Ki-Young Lee<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Department of Material & Biochemical Engineering, Chonnam National University

<sup>2</sup>Interdisciplinary Program of Biomedical Engineering, Chonnam National University,

<sup>3</sup>Ecobio Inc., Business Incubation Center, Chonnam National University,

<sup>4</sup>Department of Microbiology, Chonnam National University Medical School,

<sup>5</sup>Faculty of Applied Chemical Engineering and The Research Institute for Catalysis, Chonnam National University.

TEL: +82-62-530-0327, FAX: +82-62-530-1849

### Abstract

The purpose of the study is to research the proper conditions to prepare the calcium-alginate microspheres using a emulsion method. The calcium-alginate microspheres were prepared at distinct concentrations (alginate; 1%, 1.5%, 2% (w/v), calcium chloride; 2%, 4%, 8%, 10%(w/v)). The shape of the microspheres prepared was spherical. With increasing alginate and calcium chloride concentration, the mean size of the microspheres decreased gradually. In release test, the amount of ovalbumin released from the calcium-alginate mcirospheres was decreased by the increasing of alginate and calcium chloride concentration. In this study the best result was obtained at a 2% of alginate concentration and 10% of calcium chloride concentration.

### Introduction

Alginate는 *Laminaria* 속 갈조류와 해조류의 세포벽에서 발견된 친수성 콜로이드성 음이온 천연고분자로써 광범위한 응용성을 가진 물질이다.1) 최근 약물 수송체의 개발에 있어 생분해성 천연고분자 물질인 alginate는 생분해성 합성 고분자 물질과 함께 주목받고 있는 연구대상이며 독성이 적어서 생체 적합성이 우수하고 합성 고분자 물질에 비해 경제성이 있는 장점을 가지고 있다.2) 이러한 alginate는 2가 양이온 (특히,  $Ca^{2+}$ )에 의해서 gel화되는 성질을 이용하여 약물을 봉입시킨 미세입자나 지속성 정제의 matrix로 이용되고 있다. Alginate 미세입자는 주로 분무법과 유화법 등을 통해 제조되는데 gel화 과정에서 가교제의 농도, alginate의 농도 등, 여러 가지 요인

에 의해 그 특성이 결정된다. 본 연구는 기존의 유화법을 이용한 alginate 미세입자 기술을 응용한 것으로, alginate 농도와 가교제인 칼슘의 농도에 따라 미세입자를 제조하고 단백질 ovalbumin (OVA)을 봉입하여 약물의 방출특성을 조사함으로써 유화법으로 제조된 alginate 미세입자의 최적 제조 조건과 약물전달체로서의 응용 가능성을 평가하였다.

## Materials and Methods

### *Materials*

Microsphere 제조용 시약으로는 sodium alginate (Sigma Chemical Co., USA), ovalbumin (Sigma Chemical Co., USA), calcium chloride (Sigma Chemical Co., USA)를 사용하였으며, iso-octan (Duksan Pure Chemical Co. Ltd., Korea), Tween 80 (Duksan Pure Chemical Co. Ltd., Korea), isopropyl alcohol (Jin Chemical & Pharma Co. Ltd., Korea)을 사용하였다. 약물인 단백질의 정량을 위해 발색시약으로 Brilliant blue G-250 (Sigma Chemical Co., USA), phosphoric acid (Duksan Pure Chemical Co. Ltd., Korea) 등을 사용하였다.

### *Preparation of calcium-alginate microspheres*

Sodium alginate solution의 농도는 1%, 1.5% 및 2% (w/v)로 10 ml을 각각 제조하였고, ovalbumin 1%를 제조하였다. 제조된 sodium alginate와 ovalbumin을 1:10 (v/v)의 비로 제조된 용액을 direct stirrer를 이용하여 잘 혼합하여 분산상을 제조하고, 소량의 span 80을 포함한 isooctane 40 g에 제조한 용액을 첨가하여 5분간 교반하여 emulsion을 제조하였다. 제조된 emulsion에 준비된 calcium chloride 용액 (2%, 4%, 8%, 10% (w/v))을 생성된 emulsion에 첨가하여 가교시킨다. 3분후 가교가 일어나면 40 ml의 isopropyl alcohol을 가해서 탈수시킴으로써 Ca-alginate microsphere를 제조하였다. 얻어진 particle을 원심분리하고 수차례 isopropyl alcohol로 세척한 다음, 약 24 시간 동안 동결건조 하였다.

### *Characteristics of calcium-alginate microspheres*

제조한 calcium-alginate microsphere의 형태를 관찰하기 위해 시료를 graphite surface에 놓고 Ion-sputter (JEOL, JFC-1100, Japan)를 사용하여 20 mA에서 5분 동안 gold/palladium으로 코팅시킨 후 SEM(scanning electron microscope, JEOL, JSM 5400, Japan)을 이용하여 20 kV 조건에서 관찰하였다. 또한, microspheres의 입자의 크기 분

포를 살펴보기 위해 ELS (electrophotonic light scattering spectrophotometer, Photal, ELS-8000, Osaka, Japan)를 이용하였다.

***Release profiles of ovalbumin from calcium-alginate microspheres***

HCl buffer (0.1 M, pH1.2)와 PBS buffer (0.1 M, pH7.4)를 10 ml씩 각각 튜브에 넣은 후 약물이 loading된 alginate microspheres를 담근 후 37°C에서 방출실험을 행하였다. 약물의 농도 경계층을 제거하기 위하여 200±1 rpm의 일정한 속도로 교반하였고, 방출된 약물의 농도는 Bradford법을 이용하여 분석하였다.

**Results and Discussion**

***Preparation of calcium-alginate microspheres***

제조한 calcium-alginate microspheres는 모두 구형을 이루고 있었으며 (Fig. 1) 입자의 크기는 7-30 µm였다. 입자의 크기는 칼슘의 농도가 증가함에 따라 alginate의 농도가 증가함에 따라 감소하였다(Table 1).

Table 1. Mean size of calcium-alginate microspheres

Concentration of alginate	Concentration of Calcium chloride			
	2%	4%	8%	10%
1%	27.453 µm	21.998 µm	18.254 µm	11.604 µm
1.5%	23.220 µm	21.498 µm	11.584 µm	10.230 µm
2%	21.690 µm	7.852 µm	14.888 µm	12.911 µm

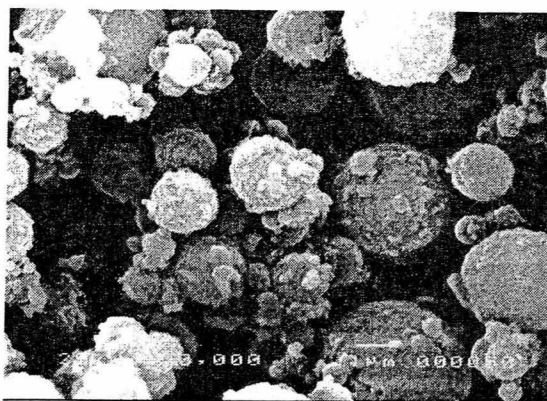


Fig. 1. SEM image of calcium alginate microspheres by emulsion method.

**Release profiles of ovalbumin from calcium-alginate microspheres**

Calcium-alginate microspheres로부터 약물 방출량을 조사한 결과 alginate의 농도가 증가할수록 OVA의 방출량은 적어지는 경향을 보였으며 가교제인 칼슘의 농도가 낮을수록 방출량이 많아지는 경향을 보였다. 가교제 칼슘의 농도가 낮을수록 1시간 까지의 초기 방출량이 많았고, alginate의 농도가 증가할수록 초기 방출량이 감소하는 경향을 보였다. 또한, pH 1.2에서보다 pH 7.4에서의 방출량이 현저히 높았다. 본 연구에 사용된 칼슘의 농도 중 10%(w/v)가 가장 약물전달용 alginate 미세입자를 제조하는데 적합하며, alginate는 시험된 농도 중 2%(w/v)가 가장 적합하였다 (Fig. 2).

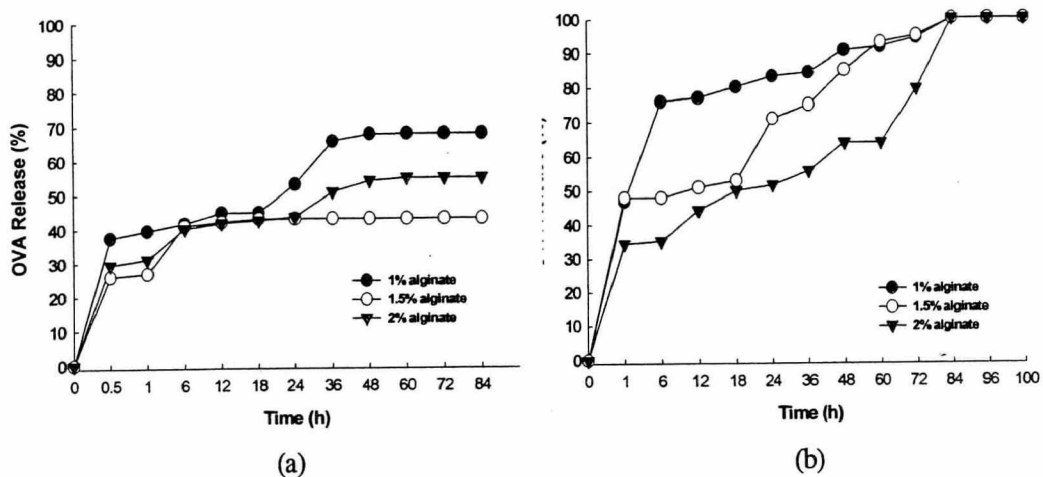


Fig. 2. Release profiles of OVA from calcium alginate microspheres crosslinked with 10%(w/v) of calcium chloride at pH 1.2 (a) and 7.4 (b).

**Summary**

본 연구에서는 유화법을 이용한 alginate 미세입자 제조에 있어서 적절한 alginate 농도와 가교제인 calcium chloride의 농도를 조사하였다. 유화법을 통해 calcium-alginate microsphere는 구형으로 제조되었으며 입자의 크기는 alginate와 가교제의 농도가 증가함에 따라 감소하는 경향을 보였다. 약물방출 경향은 alginate의 농도가 2%(w/v)일 때와 calcium chloride의 농도가 10%(w/v)일 때 가장 좋은 결과를 얻을 수 있었다.

**Acknowledgements**

본 연구는 2004년 지역혁신인력양성사업 연구비의 지원에 의해 연구되었으므로

이에 감사드립니다.

### References

- [1] Mangles. A.R, Holden. J.M, Beecher. GR, Forman. M.R, and Lanza. E (1993) Carotenoid content of fruits and vegetable an evaluation of analytic *J. Am. Diet. Assoc.* 93: 284-291.
- [2] Zheng C.H., Gao. J.Q., Zhang Y.P., and Liang W.Q. (2004) A protein delivery system: biodegradable alginate-chitosan-poly(lactic-co-glycolic acid) composite microspheres *Biochemical Biophysical Research Communications* 323: 1321-1327.