

636
L2938

최	중
연구보고서	

환경친화형 경구용 액상제제 개발을 통한 자동급수기의 문제점 해결

A Solution to a problem of automated water supply system through the development of environmentally affinitive oral liquid state preparation

환경친화형 경구용 액상제제 개발을 통한 자동급수기의
문제점 해결

A Solution to a problem of automated water supply system
through the development of environmentally affinitive oral
liquid state preparation

연구기관

전남대학교

농림부



제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “환경친화형 경구용 액상제제 개발을 통한 자동급수기의 문제점 해결에 관한 연구” 과제 (세부과제 “환경친화형 경구용 액상제제 개발을 통한 자동급수기의 문제점 해결에 관한 연구”)의 최종보고서로 제출합니다.

2001년 10월 11일

주관연구기관명 : 전남대학교

총괄연구책임자 : 이 용 복

세부연구책임자 : 이 용 복

연 구 원 : 심 정 숙

연 구 원 : 김 수 진

연 구 원 : 이 문 석

연 구 원 : 조 혜 영

연 구 원 : 심 영 순

연 구 원 : 허 수 희

협동연구기관명 : -----

요 약 문

I. 제 목

환경친화형 경구용 액상제제 개발을 통한 자동급수기의 문제점 해결

II. 연구개발의 목적 및 중요성

축산형태가 전업화, 규모화, 기계화되어 가면서 질병의 발생이 증가되고 더불어 동물용 의약품의 소비량도 증가되는 추세에 있으며 축사시설도 자동화 추세에 따라 급수 시설이 수동에서 파이프를 통한 자동 급수기 형태로 변화해 오고 있다. 그러나 국내에서 제조된 액상제제는 안정성(역가보존) 및 생체 이용률이 떨어지는 등 문제점이 노출되어 축산 농가로부터 외면당하고 실정이고 산제 또한 급수기내에 이끼가 발생하여 음수통로가 자주 막히게 되는 사례가 많아져 외국의 경구용 액상 제품이 수입되어 절찬리에 팔리고 있는 실정이다.

따라서, 환경친화형 경구용 액상 제제의 개발이 적극 요청되고 있으며 이의 개발로 인해 당면한 축산 자동화의 애로점이 해결될 수 있고 나아가 동 제품의 특허 취득을 통하여 수입대체 효과를 기할 수 있어 축산농가의 소득증대를 도모할 수 있기에 그 개발의 필요성이 절대적이라고 할 수 있다.

III. 연구개발 내용 및 범위

구 분	연구범위	연구내용
1차 년도 (1998)	처방설계 및 제조법 확립	<ol style="list-style-type: none"> 1. 복합비타민 농축유제 제조기술 검토 2. 처방설계 3. 유제의 제조 4. 복합비타민 분리 분석법 확립 5. 유제의 안정성 시험 6. 유제의 제조기술 개량 및 제조 조건 확립 7. 1차년도 연구결과 평가 및 산업화 구상
2차 년도 (1999)	시제품 처방설계 및 규격화	<ol style="list-style-type: none"> 1. 시제품 처방 설계 2. 제 1단계 규격화 연구 3. 제 1단계 제제화 연구 4. 안정성 시험 5. 특허출원
3차 년도 (2000)	비교시험 및 시제품 제작	<ol style="list-style-type: none"> 1. 시제품제조 2. 사양실증시험(안전성 및 비교시험) 3. 제 2단계 규격화 연구 4. 제 2단계 제제화 연구 5. 제조기술 이전 6. 품목제조허가 신청 7. 시제품 생산

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

본 연구에서는 환경친화형 경구용 액상제제를 개발하기 위하여 다량의 유화제를 사용하는 microemulsion이 아닌 소량의 유화제로 유적을 분산시킬 수 있는 유제를 개발하였으며 유화제로써 난황에서 얻은 천연 레시틴만을 사용하여 화학적 합성 유화제 등에 의해 일어날 수 있는 환경파괴의 위험성을 제거하였다.

비타민이 포함되지 않은 유제는 안정성 면에서 우수했지만 복합비타민 유제는 여러 비타민의 다량 첨가와 비타민의 salt형에서 유리되는 이온들로 인해 유적 표면에서 유화제막

이 상대적으로 불안정해지는 경향이 나타났으나 안정성에는 큰 문제가 없었다.

복합비타민 유제에 포함된 비타민의 정량을 위해 개개 비타민의 정량법을 확립하였으며 이를 토대로 함량평가시험 및 비타민의 안정성 시험을 실시하여 만족할 만한 결과를 얻을 수 있었다.

시제품을 제작하는 과정에서 대량생산에 따른 문제점으로 인해 복합비타민 유제의 안정성에 문제점이 발생하여 현재 이를 보완 중에 있으며 상기의 결과들을 바탕으로 특허출원 중에 있다. 아울러, 제조된 소규모 시제품을 이용하여 사양실증실험을 시행한 결과 본 제제는 시판 제제보다도 우수한 생체이용율을 나타내고 있음을 알 수 있었으며 산제에서 나타난 자동급수기의 음수통로가 막히는 문제점을 해결할 수 있었다.

SUMMARY

Water-lipid soluble multivitamin formulations were widely used to reduce the disease and stress for animals as husbandry has made a remarkable progress in recent. But the efficiency of these formulations are far from satisfactory. So, this study was attempted to develop the physically and chemically stable and useful multivitamin o/w emulsion. Multivitamin o/w emulsion composed of water, soybean oil (10%, v/v), vitamin A, D, E, K, B2, B6, B12 and panthenol. To make a stable o/w emulsion, the egg lecithin (2%, w/v) and glycerin (2.5%, w/v) were used for emulsifier and thickening agent, respectively. The oil in water emulsion system was manufactured by microfluidizer and the physical and chemical stability of this emulsion was evaluated. Average particle size and interfacial tension were measured. From the result of interfacial tension tested, critical micelle concentration of the egg lecithin was 0.5% (w/v) and optimal concentration for the preparation of emulsion was 2% (w/v). The mean particle size was about 0.6 μm which was suitable for injections. Short-term accelerated stability, as physical stability study, was tested by centrifuging and freeze-thawing the emulsion samples. The additions of vitamins cause the increment of particle size and reduction of physical stability of emulsion. But it is not an enormous problem for stability of emulsion. Also, we have performed long-period preservation stability test for the vitamins. All vitamins were analysed by HPLC. The result of storage under 4°C and dark demonstrated that all vitamins were maintained stable at least 12 weeks, except for vitamin B12. And also, we found that the bioavailability of the prepared multivitamin o/w emulsion was much higher than that of the available multivitamin emulsion through the field test using poultry and that the problem of automated water supply system could be solved by using the prepared o/w emulsion.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	10
Chapter 2. Methods	12
1. Reagents	12
2. Instruments	12
3. Determination of optimal concentration of emulsifier	13
3.1 Measurement of interfacial tension	13
3.2 Measurement of Particle size	13
4. Preparation of multivitamin emulsion	14
4.1 Contents of multivitamin emulsion	14
4.2 Determination of number of cycles through microfluidizer	16
4.3 Method for emulsion manufacturing	16
5. Physical stability of multivitamin emulsion	17
5.1 Centrifugal test	17
5.2 Freeze-thaw test	17
6. Chemical stability of multivitamin emulsion	18
6.1 Determination of vitamins in multivitamin emulsion	18
6.1.1 Vitamin A palmitate	18
6.1.2 Vitamin E	20
6.1.3 Vitamin D3	22
6.1.4 Vitamin K3	24
6.1.5 Vitamin B2 sodium phosphate	26
6.1.6 Vitamin B6 HCl	28
6.1.7 Vitamin B12	30
6.1.8 Panthenol	32
7. Long period preservation	34
8. Pilot plant and field test	34
8.1 Pilot plant	34
8.2 Field test	34
Chapter3. Results	35
1. Optimal concentration of emulsifier	35
2. Preparation of multivitamin emulsion	38

3. Physical stability of multivitamin emulsion	40
3.1 Centrifugal test	40
3.2 Freeze-thaw test	42
4. Chemical stability of multivitamin emulsion	45
4.1 Analysis of vitamins	45
4.2 Long period preservation	70
5. Pilot plant and field test	70
5.1 Pilot plant	70
5.2 Field test	70
Chapter 4 Discussions	72
Chapter 5 References	73

목 차

제1장 서론	10
제2장 실험 방법	12
제1절 시약	12
제2절 기기	12
제3절 유화제의 최적 농도 결정	13
제1항 계면장력 측정	13
제2항 입자도 측정	13
제4절 복합비타민 유제의 제조	14
제1항 복합비타민 유제의 조성	14
제2항 Microfluidizer 통과 횟수 결정	16
제3항 유제의 제법	16
제5절 복합비타민 유제의 물리적 안정성 측정	17
제1항 Centrifugal test	17
제2항 Freeze-thaw test	17
제6절 복합비타민 유제 중 비타민의 안정성 측정	18
제1항 복합비타민 유제 중 비타민의 정량	18
제1항의 1. 팔미틴산 비타민 A의 분석	18
제1항의 2. 비타민 E의 분석	20
제1항의 3. 비타민 D3의 분석	22
제1항의 4. 비타민 K3의 분석	24
제1항의 5. 인산 비타민 B2 나트륨염의 분석	26
제1항의 6. 비타민 B6의 분석	28
제1항의 7. 비타민 B12의 분석	30
제1항의 8. 판테놀의 분석	32
제7절 장기보존 시험	34
제8절 시제품 제조 및 사양실증 시험	34
제1항 시제품 제조	34
제2항 사양실증 시험	34
제3장 결과	35
제1절 유화제의 최적 농도 결정	35
제2절 복합비타민 유제의 제조	38

제3절 복합비타민 유제의 물리적 안정성	40
제1항 Centrifugal test	40
제2항 Freeze-thaw test	42
제4절 복합비타민 유제 중 비타민의 안정성	45
제1항 복합비타민 유제 중 비타민의 정량	45
제2항 장기보존 시험	70
제5절 시제품 제조 및 사양실증 시험	70
제1항 시제품 제조	70
제2항 사양실증 시험	70
제4장 고찰 및 결론	72
제5장 참고문헌	73

제 1 장 서 론

비타민은 고등동물의 체내에서 전혀 합성되지 않거나 필요한 만큼 합성되지 아니하여 식품으로부터 반드시 섭취해야 한다. 비타민은 소량으로 신체기능을 조절한다는 점에서 호르몬과 비슷하다. 그러나 호르몬은 신체의 내분비기관에서 합성되지만 비타민은 외부로부터 섭취되어야 한다는 점이 전혀 다르다. 그러므로 체내합성 여부에 따라서 어떤 동물에게는 비타민이, 다른 동물에게는 호르몬이 될 수 있다. 비타민의 체내기능은 매우 광범위한데, 대부분은 효소나 또는 효소의 역할을 보조하는 조효소의 구성성분이 되어 탄수화물·지방·단백질·무기질의 대사에 관여한다. 생물체의 생명현상은 생체조직 내에서 일어나는 수많은 연쇄적인 화학반응에 의하여 유지되며, 이 일련의 생화학반응들은 효소라고 하는 유기촉매가 존재할 때 정상적으로 진행될 수 있다. 또, 효소는 화학반응에 직접 참여하는 물질이 아니므로 자신이 도움을 주는 화학반응에 의하여 완전히 소모되지는 않는다. 따라서 비타민의 필요량은 매우 소량으로 충분하지만, 이 소량의 필요량이 공급되지 않을 때 생명현상의 유지에 필요한 체내 영양소의 대사가 지장을 받게 된다. 이러한 이유로 비타민은 사람이나 동물에게 많이 투여되고 있는 실정이다. 유제는 대규모 산업현장에서 만들어지고 있으면, 또한 임상적으로 많이 적용되고 있다. 하지만 이미 개발된 제제는 생체이용율이나 안정성의 측면에서 볼 때 상당히 미흡한 실정이다.

수중유형 유제는 약물운반체로서 리포솜 등에 비해 생분해성, 생적합성, 물리적 안정성 등이 우수하기 때문에 최근 몇 년 동안 더 많은 기대를 받고 있다. 유제는 그 내부에 상당량의 지용성 약물과 수용성 약물을 한꺼번에 운반할 수 있는 능력을 가지고 있으며 또한 약물을 유제로 해서 경구투여하면 흡수가 촉진되어 약물의 생체이용율이 상승되는 효과를 가져오기도 한다. 또한, 유제는 일반적으로 유화제가 포함된 수상에 유상을 섞어서 제조한다. 입자의 크기 안정성, 그리고 체내분포 등의 유제의 특성은 유화제의 특성과 기름과 유화제의 비율로 나타내어진다. 이론적으로 양친성 또는 세제와 같은 분자는 적당한 조건하에서 유화제로 쓰일 수 있다. 실제로 인지질은 보조 유화제를 넣지 않고도 낮은 독성과 생체적합성 때문에 정맥주사용 유제의 유화제로 사용되어지고 있다. 레시틴을 유화제로 사용하는 유제는 적당한 조건 하에서 안정하고 정맥 영양주사제의 에너지원으로 사용되고 있다.

한편, 축산형태가 전업화, 규모화, 기계화되어 가면서 질병의 발생이 증가되고 더불어 동물용 의약품의 소비량도 증가되는 추세에 있으며 축사시설도 자동화 추세에 따라 급수시설이 수동에서 파이프를 통한 자동 급수기 형태로 변화해 오고 있다. 또한, 3D현상에 따른 노동력 부족으로 약제 투여방법이 적은 노동력으로 쉽게 투여할 수 있는 “음수투약”이 증가 추세이나 대부분이 수용성 산제로서 투여하고 있기에 급수기내에 이끼가 발생하

는 비율이 증가하여 음수통로(특히 “니플”-내경 5~6 mm)가 자주 막히게 되는 사례가 많아 양측가의 불편이 초래되고 있다. 뿐만 아니라 약품의 적정 용량 투여가 이루어지지 않고 미수거 약품에 의한 심각한 환경 오염 문제가 발생하고 있다. 현재 비타민 영양제는 국내에 30여 종류가 있으며(산제 : 20여개, 액제 : 10여개) 산제나 액제 모두 투여에 문제점이 있으나 산제의 경우는 보통 물 1ℓ당 1g을 녹여서 자동 파이프라인 급수기를 통하여 투여하고 있으나 부형제(포도당, 유당) 및 지용성 비타민 등에 기인하여 니플이 막히는 경우가 많다. 또한, 정량투여되지 않거나 폐기처분되 환경오염문제를 유발시키고 있다. 액제의 경우는 제조 Know-How가 아직 미미하여 보존력이 떨어지고 생체이용률도 떨어지며 실제 투여시 효과가 미약하고 산제와 마찬가지로 환경오염문제가 발생하고 있는 실정이다. 현재 몇몇 국내회사에서 경구용 액상 제품(주로 비타민 영양제 및 화학 요법제)을 발매하고 있으나 안정성(역가보존) 및 생체 이용률이 떨어지는 등 문제점이 노출되어 축산 농가로부터 외면 당하고 외국의 경구용 액상 제품이 수입되어 절찬리에 팔리고 있다. 따라서, 환경친화형 경구용 액상 제제의 개발이 적극 요청되고 있으며 이의 개발로 인해 당면한 축산 자동화의 애로점이 해결될 수 있고 나아가 동 제품의 특허 취득을 통하여 수입대체 효과를 기할 수 있어 축산농가의 소득증대를 도모할 수 있기에 그 개발의 필요성이 절대적이라고 할 수 있다. 현재 외국 제품 몇 종류가 수입되어 절찬리에 팔리고 있으며 이러한 문제점 등을 해결할 수 있는 생분해성 환경친화형 유제가 조속히 개발된다면 현 축산 자동화 특히 니플을 이용한 약제 공급의 문제점이 해결되어 외화가 절약되고 축산농가의 소득증대를 도모할 수 있으며 환경오염문제를 극복할 수 있을 것으로 사료된다.

본 연구에서는 기존의 제제들이 갖고 있는 문제점을 보완한 환경친화형 복합비타민 유제를 제조한 후 그의 물리적 화학적 안정성을 시험해 보고 실제 산업현장에서 생산하여 사양실증실험을 행함으로서 환경오염을 방지하고 축산 자동화 특히 급수기가 막히는 문제점을 해결하기 위하여 시도되었다.

제2장 실험 방법

제1절 시약

Soybean oil (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.), egg phosphatide (Asahi Chemical Industry Co. Ltd., Charlotte, NC, U.S.A.), ethanol (Oriental Chemical Industries, Seoul, Korea), glycerin (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.)은 복합비타민 수중유형 유제를 만들기 위해 쓰였다.

Acetonitrile, methanol (Fisher Scientific., Fair Lawn, NJ, U.S.A.)은 HPLC를 이용한 정량을 위해 쓰였다. HPLC에 사용되는 물은 18 M Ω -cm resistance Milli Q (Millipore Co., Milford, MA, U.S.A.)를 통과 한 후 사용하였다. Silicon wax (Superior[®], Paul Marienfeld KG, Bad Mergentheim, Germany)는 원심분리 실험을 위해 쓰였다. 기타 다른 시약들은 모두 특급 또는 1급 시약을 사용하였다. 그리고, 이동상의 구성성분들은 0.45 μ m-membrane filter로 여과하여 사용하였다.

제2절 기기

실험장비로는 filtration system (Millipore Co., Milford, MA, U.S.A.), 화학천칭 (MettlerAJ100, Mettler-Toledo AG, Greifensee, Switzerland), 탁상용 혼합기 (G560, Scientific Industries Inc., Bohemia, NY, U.S.A.), pH meter (Model 7, Corning, Medfield, Massachusetts, U.S.A.), circulator (VS-1901W, VISION Scientific Co, Ltd., Seoul, Korea), homogenizer (PT-MR 3100, POLYTRON[®], Kinematica AG, Littau, Switzerland), microfluidizer (EmulsiFlex-B3, AVESTIN Inc., Ottawa, Canada), du Noüy tensiometer (Educational Tensiometer K6, Krüss, Hamburg, Germany), dynamic light scattering analyzer (Autosizer Lo-C, MALVERN Instruments, Worcestershire, U.K.)와 correlator (Model K7032CN, MALVERN Instruments, Worcestershire, U.K.),

microcentrifuge (H-31, Kokusan Inc., Tokyo, Japan), automated hemocytometer (Coulter[®] STKS, Coulter Electronics Inc., Northwell, England), plain capillary tube (I.D. 1.1~1.2 mm, J Chase Instruments Co., Norcross, Georgia, Germany) 등을 사용하였다.

또한 실험에 사용되는 HPLC의 구성은 다음과 같다.

- 1) Pump (Model LC-10ADvp, Shimadzu, Tokyo, Japan)
- 2) UV detector (Model SPD-10A, Shimadzu, Tokyo, Japan)
- 3) Fluorescence detector (Model RF10A_{NL}, Shimadzu, Tokyo, Japan)
- 3) Column oven (Model CTO-10Avp, Shimadzu, Tokyo, Japan)
- 4) Integrator (SCL 10Avp, Shimadzu, Tokyo, Japan)
- 5) Injector (Model 7725i, Rheodyne, Cotati, CA, U.S.A.)
- 6) Reversed phase C₁₈ column (4.6×150 mm analytical column, 5 μm particle size, Nucleosil 100-5[®], Waters Co., Milford, MA, U.S.A.; 3.9×150 mm, 4 μm particle size, Nova-Pak[®], Waters Co., Milford, MA, U.S.A.; 250×4.6 mm, 5 μm particle size, AQUA[™], Phenomenex, Torrance, CA, U.S.A.)

제3절 유화제의 최적 농도 결정

제1항 계면장력 측정

레시틴이 각각 0.01, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2 및 5% (w/v) 함유한 수상 40 ml를 준비하고 여기에 유상으로서 soybean oil 40 ml를 조심히 부은 후 계면에 담긴 du Noüy tensiometer의 백금-이리듐 환을 분리시키는데 필요한 힘을 계면장력으로 환산하였다. 또한 계면장력에 비타민이 미치는 영향을 알아보기 위해 유상과 수상에 각각 지용성 비타민과 수용성 비타민을 넣어서도 측정해 보았다.

제2항 입자도 측정

계면장력 측정결과에 따라 레시틴을 0.01, 0.1, 0.5, 1, 2 및 5% (w/v) 함유하게 하여 공유제와 비타민 유제를 제조한 후 dynamic light scattering analyzer를 이용하여 입자도를 측정하였다. 검체를 3차 증류수로 약 200배 희석하고 기름방울이 깨어지지 않게 약하게 흔들 후 가능한 빨리 측정하여 최적의 유화제 농도를 알아보고자 하였다.

제4절 복합비타민 유제의 제조

제1항 복합비타민 유제의 조성

복합비타민 유제의 유화제로는 난황 레시틴(2% w/v)을 사용하였으며 후화제로서 glycerin(2.5% w/v)을 사용하였다. 복합비타민 유제에 사용되는 비타민으로서는 비타민 A, D3, E, K3, B2, B6, B12 및 panthenol을 사용하였으며 조성은 Table 1에 나타내었다.

Table 1. Composition of multivitamin emulsion

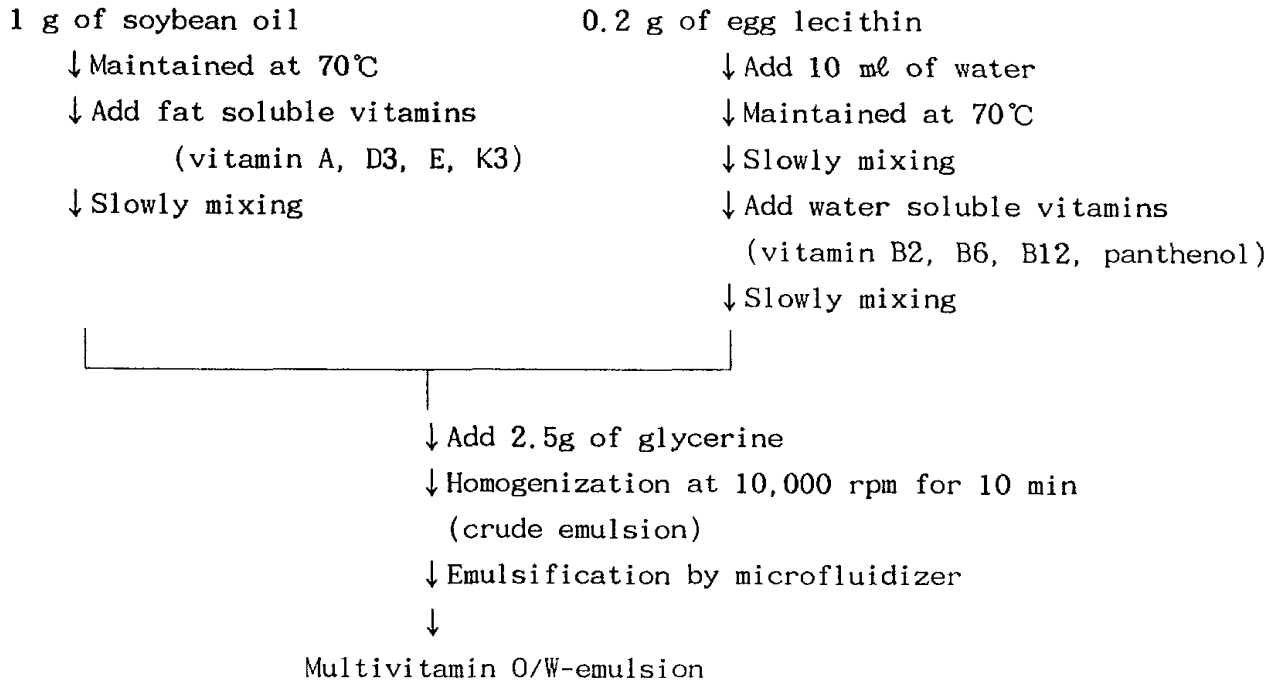
조 성		합 량(1 L중)
Emulsifier	Egg lecithin	20g
Thickening agent	Glycerin	25g
Vitamins	Vitamin A (retinol palmitate)	10,000,000 IU
	Vitamin D3 (cholecalciferol)	2,000,000 IU
	Vitamin E ((+)- α -tocopherol)	15,000 IU
	Vitamin K3 (menadione)	2,000 mg
	Vitamin B2 (riboflavin sodium phosphate)	4,000 mg
	Vitamin B6 (pyridoxine HCl)	500 mg
	Vitamin B12 (cyanocobalamin)	20 mg
	D-Panthenol (D-pantothenyl alcohol)	2,400 mg

제2항 Microfluidizer 통과 횟수 결정

Microfluidizer를 이용한 고압분산법에 따라 우선 먼저 10,000 rpm에서 10분간 homogenizer를 이용하여 crude 유제를 제조하고, 제조한 유제를 18 psi 유입압력, 3,000 psi 적용압력 하에서 비타민이 첨가된 유제와 첨가되지 않은 유제를 microfluidizer에 통과시켜 가장 안정한 유제를 제조할 수 있는 통과 횟수를 결정하였다.

제3항 유제의 제법

1 g의 soybean oil을 70℃로 유지한 상태에서 지용성 비타민을 넣고 서서히 녹여 유상으로 하였다. 0.2 g의 lecithin에 10 ml의 물을 가하고 70℃를 유지시켰다. 때때로 저어서 lecithin이 모두 녹도록 한 후 여기에 수용성 비타민을 가해 수상으로 하였다. 유상과 수상을 70℃를 유지한 상태에서 혼합하고 여기에 0.25 g의 glycerin을 첨가하였다. 이 혼합액을 10,000 rpm에서 10분간 homogenization하여 제조한 crude emulsion을 제2항의 실험결과에 따라 microfluidizer에 통과시켜 유제로 만들었다.



제5절 복합비타민 유제의 물리적 안정성 측정

제1항 Centrifugal test

제조된 복합비타민 유제의 creaming 비율을 알기 위해 plain capillary tube에 복합비타민 유제를 채우고 그 끝을 silicon wax로 단단히 봉인한 후 centrifuge를 이용하여 5000, 7000 및 10000 g에서 원심분리시켰다. 원심분리 시간에 따른 영향을 알아보기 위해 10분과 30분 동안 원심분리시킨 후 automated hemocytometer를 이용하여 creaming 분율을 구하였다.

제2항 Freeze-thaw test

제조된 복합비타민 유제를 -40°C에서 12시간 얼린 후 4°C에서 12시간 동안 녹이는

cycle을 0, 1, 2, 3, 및 6회 실행한 후 유제의 입자도 변화를 측정했다. 그리고 측정시간에 따른 측정오차를 알아보기 위해 녹인 직후, 20, 40, 60분 후의 입자도를 측정하였다.

제6절 복합비타민 유제 중 비타민의 안정성 측정

제1항 복합비타민 유제 중 비타민의 정량

복합비타민 유제 중 비타민의 안정성을 알아보기 위하여 장기보존실험을 하였다. 시간이 지남에 따라 비타민의 소실 또는 분해 정도를 알아보기 위하여 우선 유제에 첨가되는 개개 비타민들의 분석법을 확립하였다. 비타민의 분석은 모두 HPLC를 이용하였으며 이 결과를 이용하여 유제 중 비타민의 안정성을 시험하였다.

제1항의 1. 팔미틴산 비타민 A의 분석

표준품으로서 retinol palmitate 100 mg을 정확히 취한 후, 10 ml의 갈색 플라스크에 옮겼다. 여기에 blank emulsion을 가하여 정확히 10 ml로 한 후 이것을 강하게 30 분간 흔들어서 stock solution으로 하였다. Stock solution에서 일부를 취하여 blank emulsion으로 희석하여 각각 10, 6, 4, 2, 1, 및 0.5 mg/ml의 농도가 되도록 1 ml씩 만들었다. 이때 serial dilution 하지 않고 직접 stock solution에서 취하여 원하는 농도로 만들었다. (stock solution에서 각각 1, 0.6, 0.4, 0.2, 0.1 및 0.05 ml을 취하고 여기에 blank emulsion 0, 0.4, 0.6, 0.8, 0.9 및 0.95 ml을 각각 넣었다). 이 용액에 ethanol을 넣어 500배 희석 후 HPLC에 주입하여 얻은 피크 면적을 비교하여 검량선을 구하였다. 분석의 재현성을 확보하기 위해서 stock solution으로부터 HPLC에 주입하는 조작을 1일 4회 연속 4일간 실험하여 일내 및 일간 변동계수를 구하였다. 검체를 위와 같이 전처리하여 HPLC에 주입하여 여기에서 구해진 피크 면적을 검량선 식에 대입하여 검체 중의 retinol palmitate의 농도를 구하였다. 이때, 실험시 빛에 의한 영향을 피하기 위하여 빛의 접촉을 최대한 줄였다.

Table 2. HPLC conditions for the determination of retinol palmitate.

Parameter	Condition
Column	Reverse phase C ₁₈ column (3.9×150 mm, 4 μm particle size, Nova-Pak [®] Waters Co., Milford, MA, U.S.A.)
Mobile Phase	Methanol 100%
Flow Rate	1 ml/min
Detector	UV/VIS detector, 265 nm (SPD-10A, Shimadzu Corp., Tokyo, Japan)
Temperature	Ambient
Injection Volume	50 μl

제1항의 2. 비타민 E의 분석

표준품으로서 (+)- α -tocopherol 600 mg을 정확히 취한 후, 10 ml의 갈색 플라스크에 옮겼다. 여기에 blank emulsion을 가하여 정확히 10 ml로 하였다. 이것을 강하게 30 분간 흔들고 methanol 10 ml을 가해(pool 자체를 2배 희석) stock solution으로 하였다. Stock solution에서 일부를 취하여 methanol로 2배 희석된 blank emulsion으로 희석하여 각각 30, 20, 10, 4, 2 및 1 mg/ml의 농도가 되도록 만들었다. 이때 serial dilution 하지 않고 직접 stock solution에서 취하여 원하는 농도로 만들었다(stock solution에서 각각 0.9, 0.6, 0.3, 0.12, 0.06 및 0.03 ml를 취하고 여기에 blank emulsion 0, 0.3, 0.6, 0.78, 0.84 및 0.87 ml를 각각 넣는다). 이 용액에 methanol을 넣어 250배 희석 후 HPLC에 주입하여 얻은 피크 면적을 비교하여 검량선을 구하였다. 분석의 재현성을 확보하기 위해서 stock solution으로부터 HPLC에 주입하는 조작을 1일 4회 연속 4일간 실험하여 일 내 및 일간 변동계수를 구하였다. 검체를 위와 같이 전처리하여 HPLC에 주입하여 여기에서 구해진 피크 면적을 검량선 식에 대입하여 검체 중의 (+)- α -tocopherol의 농도를 구하였다. 이때, 실험시 빛에 의한 영향을 피하기 위하여 빛의 접촉을 최대한 줄였다.

Table 3. HPLC conditions for the determination of (+)- α -tocopherol.

Parameter	Condition
Column	Reverse phase C ₁₈ column (3.9×150 mm, 4 μ m particle size, Nova-Pak [®] Waters Co., Milford, MA, U.S.A.)
Mobile Phase	Methanol 100%
Flow Rate	1 ml/min
Detector	UV/VIS detector, 265 nm (SPD-10A, Shimadzu Corp., Tokyo, Japan)
Temperature	Ambient
Injection Volume	50 μ l

제1항의 3. 비타민 D3의 분석

표준품으로서 cholecalciferol 15 mg을 정확히 취한 후, 30 ml의 갈색 플라스크에 옮겼다. 여기에 blank emulsion과 메탄올을 각각 15 ml씩 가해 정확히 30 ml로 하였다. 이것을 강하게 수분간 흔들어서 stock solution으로 하였다. Stock solution을 일부 취하여 메탄올로 2배 희석된 blank emulsion을 가하여 각각 100, 80, 60, 40, 20 및 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도가 되도록 만들었다. 이 용액을 다시 메탄올로 50배 희석하고 즉시 HPLC에 주입하여 얻은 피크 면적을 비교하여 검량선을 구하였다. 분석의 재현성을 확보하기 위해서 stock solution으로부터 HPLC에 주입하는 조작을 1일 4회 연속 4일간 실험하여 일내 및 일간 변동계수를 구하였다. 검체를 메탄올로 100배 희석하여 HPLC에 주입하고 여기에서 구해진 피크 면적을 검량선 식에 대입하여 검체 중의 cholecalciferol 농도를 구하였다. 이때, 실험시 빛에 의한 영향을 피하기 위하여 빛의 접촉을 최대한 줄였다.

Table 4. HPLC conditions for the determination of cholecalciferol.

Parameter	Condition
Column	Reverse phase C ₁₈ column (3.9×150 mm, 4 μm particle size, Nova-Pak [®] , Waters Co., Milford, MA, U.S.A.)
Mobile Phase	Methanol:water=95:5 (v/v)
Flow Rate	1 ml/min
Detector	UV/VIS detector, 265 nm (SPD-10A, Shimadzu Corp., Tokyo, Japan)
Temperature	Ambient
Injection Volume	50 μl

제1항의 4. 비타민 K3의 분석

표준품으로서 menadione 75 mg을 정확히 취한 후, 30 ml의 갈색 플라스크에 옮겼다. 여기에 blank emulsion 15 ml를 가하였다. 여기에 에탄올 15 ml를 가하고 강하게 수분간 흔들어서 stock solution으로 하였다. Stock solution을 일부 취하여 에탄올로 2배 희석된 blank emulsion으로 희석하여 각각 5, 3, 2, 1, 0.5 및 0.1 mg/ml의 농도가 되도록 만들었다. 이 용액을 다시 메탄올로 500배 희석하고 즉시 HPLC에 주입하여 얻은 피크 면적을 비교하여 검량선을 구하였다. 분석의 재현성을 확보하기 위해서 stock solution으로부터 HPLC에 주입하는 조작을 1일 4회 연속 4일간 실험하여 일내 및 일간 변동계수를 구하였다. 검체를 에탄올로 2배 희석 후 다시 메탄올로 500배 희석하여 HPLC에 주입하고 여기에서 구해진 피크 면적을 검량선 식에 대입하여 검체중의 menadione 농도를 구하였다. 이때, 실험시 빛에 의한 영향을 피하기 위하여 빛의 접촉을 최대한 줄였다.

Table 5. HPLC conditions for the determination of menadione.

Parameter	Condition
Column	Reversed phase C ₁₈ column (4.6×150 mm analytical column, 5 μm particle size, Nucleosil 100-5 [®] , Waters Co., Milford, MA, U.S.A.)
Mobile Phase	Methanol:water=70:30 (v/v)
Flow Rate	0.8 ml/min
Detector	UV/VIS detector, 265 nm (SPD-10A, Shimadzu Corp., Tokyo, Japan)
Temperature	Ambient
Injection Volume	50 μl

제1항의 5. 인산 비타민 B2 나트륨염의 분석

표준품으로서 riboflavin sodium phosphate 400 mg을 정확히 취한 후, 40 ml의 갈색 플라스크에 옮겼다. 여기에 blank emulsion을 가하여 정확히 40 ml로 하였다. 이것을 강하게 수분간 흔들어서 stock solution으로 하였다. Stock solution을 일부 취하여 blank emulsion으로 희석하여 각각 10, 8, 6, 4, 2, 1 및 0.5 mg/ml의 농도가 되도록 만들었다. 이 용액을 13000 rpm에서 10분간 원심분리 후 하층만을 취하여 증류수로 80배 희석하고 HPLC에 주입하여 얻은 피크 면적을 비교하여 검량선을 구하였다. 분석의 재현성을 확보하기 위해서 stock solution으로부터 HPLC에 주입하는 조작을 1일 4회 연속 4일간 실험하여 일내 및 일간 변동계수를 구하였다. 검체를 13000 rpm에서 10분간 원심분리 후 하층을 증류수로 80배 희석하여 HPLC에 주입하고 여기에서 구해진 피크 면적을 검량선 식에 대입하여 검체 중의 riboflavin sodium phosphate의 농도를 구하였다. 이때, 실험시 빛에 의한 영향을 피하기 위하여 빛의 접촉을 최대한 줄였다.

Table 6. HPLC conditions for the determination of riboflavin sodium phosphate.

Parameter	Condition
Column	Reverse phase C ₁₈ column (3.9×150 mm, 4 μm particle size, Nova-Pak [®] Waters Co., Milford, MA, U.S.A.)
Mobile Phase	0.05 M ammonium acetate:acetonitrile=890:100 (v/v)
Flow Rate	1 ml/min
Detector	UV/VIS detector, 361 nm (SPD-10A, Shimadzu Corp., Tokyo, Japan)
Temperature	45°C
Injection Volume	50 μl

제1항의 6. 비타민 B6의 분석

표준품으로서 pyridoxine HCl 20 mg을 정확히 취한 후, 10 ml의 갈색 플라스크에 옮겼다. 여기에 blank emulsion을 가하여 정확히 10 ml로 하고 이것을 stock solution으로 하였다. Stock solution에서 일부를 취하여 blank emulsion으로 희석하여 각각 2000, 1000, 500, 300, 100 및 50 μg /ml의 농도가 되도록 만들었다. 이 용액을 증류수로 500배 희석 후 HPLC에 주입하여 얻은 피크 면적을 비교하여 검량선을 구하였다. 분석의 재현성을 확보하기 위해서 stock solution으로부터 HPLC에 주입하는 조작을 1일 4회 연속 4일간 실험하여 일내 및 일간 변동계수를 구하였다. 검체를 물로 500배 희석하여 HPLC에 주입하고 여기에서 구해진 피크 면적을 검량선 식에 대입하여 검체 중의 pyridoxine HCl의 농도를 구하였다. 이때, 실험시 빛에 의한 영향을 피하기 위하여 빛의 접촉을 최대한 줄였다.

Table 7. HPLC conditions for the determination of pyridoxine HCl.

Parameter	Condition
Column	Reversed phase C ₁₈ column (250×4.6 mm, 5 μm particle size, AQUA™, Phenomenex, Torrance, CA, U.S.A.)
Mobile Phase	0.01 M H ₃ PO ₄
Flow Rate	1 ml/min
Detector	Spectrofluorometric detector excitation 290 nm, emission 400 nm (RF10A _{NL} , Shimadzu Corp., Tokyo, Japan)
Temperature	Ambient
Injection Volume	20 μl

제1항의 7. 비타민 B12의 분석

표준품으로서 cyanocobalamin 1 mg을 정확히 취한 후, 20 ml의 갈색 플라스크에 옮겼다. 여기에 blank emulsion을 가하여 정확히 20 ml로 하였다. 이것을 강하게 수분간 흔들어 stock solution으로 하였다. Stock solution을 일부 취하여 blank emulsion으로 희석하여 각각 40, 30, 20, 15, 10 및 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도가 되도록 만들었다. 이 용액을 13000 rpm에서 10분간 원심분리 후 하층만을 취하여 증류수로 40배 희석하고 HPLC에 주입하여 얻은 피크 면적을 비교하여 검량선을 구하였다. 분석의 재현성을 확보하기 위해서 stock solution으로부터 HPLC에 주입하는 조작을 1일 4회 연속 4일간 실험하여 일내 및 일간 변동계수를 구하였다. 검체를 13000 rpm에서 10분간 원심분리후 하층만을 증류수로 40배 희석하여 HPLC에 주입하고 여기에서 구해진 피크 면적을 검량선 식에 대입하여 검체 중의 cyanocobalamin의 농도를 구하였다. 이때, 실험시 빛에 의한 영향을 피하기 위하여 빛의 접촉을 최대한 줄였다.

Table 8. HPLC conditions for the determination of cyanocobalamin.

Parameter	Condition
Column	Reverse phase C ₁₈ column (3.9×150 mm, 4 μm particle size, Nova-Pak [®] , Waters Co., Milford, MA, U.S.A.)
Mobile Phase	0.05 M ammonium acetate:acetonitrile=890:100 (v/v)
Flow Rate	1 ml/min
Detector	UV/VIS detector, 361 nm (SPD-10A, Shimadzu Corp., Tokyo, Japan)
Temperature	45 °C
Injection Volume	50 μl

제1항의 8. 판테놀의 분석

표준품으로서 D-pantothenyl alcohol 100 mg을 정확히 취한 후, 20 ml의 갈색 플라스크에 옮겼다. 여기에 blank emulsion을 가하여 정확히 20 ml로 하였다. 이것을 강하게 수분간 흔들어서 stock solution으로 하였다. Stock solution을 일부 취하여 blank emulsion으로 희석하여 각각 5, 3, 2, 1, 0.5 및 0.1 mg/ml의 농도가 되도록 만들었다. 이 용액을 다시 3차 증류수로 100배 희석하고 즉시 HPLC에 주입하여 얻은 피크 면적을 비교하여 검량선을 구하였다. 분석의 재현성을 확보하기 위해서 stock solution으로부터 HPLC에 주입하는 조작을 1일 4회 연속 4일간 실험하여 일내 및 일간 변동계수를 구하였다. 검체를 3차 증류수로 100배 희석하여 HPLC에 주입하고 여기에서 구해진 피크 면적을 검량선 식에 대입하여 검체 중의 panthenol의 농도를 구하였다. 이때, 실험시 빛에 의한 영향을 피하기 위하여 빛의 접촉을 최대한 줄였다.

Table 9. HPLC conditions for the determination of panthenol.

Parameter	Condition
Column	Reversed phase C ₁₈ column (4.6×150 mm analytical column, 5 μm particle size Nucleosil 100-5 [®] , Waters Co., Milford, MA, U.S.A.)
Mobile Phase	Acetonitrile:water=3:97 (v/v)
Flow Rate	1.0 ml/min
Detector	UV/VIS detector, 210 nm (SPD-10A, Shimadzu Corp., Tokyo, Japan)
Temperature	45°C
Injection Volume	50 μl

제7절 장기보존 시험

제조된 복합비타민 유제를 4℃, 암소에서 보관하면서 1주, 4주, 8주 및 12주가 경과하는 동안 검체의 일부를 취하여 개개 비타민의 분석 조건에 따라 HPLC로 비타민의 함량을 측정하여 제조 후 발생할 수 있는 역가의 저하 등을 알아보려고 하였다.

제8절 시제품 제조 및 사양실증 시험

제1항 시제품 제조

실험실적으로 제조된 복합비타민 유제의 대량생산에 의한 시제품 제조 가능성을 점검해 보기 위하여 (주)우성양행의 대용량 microfluidizer를 이용하여 동일 처방의 시제품을 250 liter 제조하였으며 제조된 시제품 유제의 안정성 및 비타민의 안정성을 제5절과 제6절에 나타낸 방법에 따라 측정하였다.

제2항 사양실증 시험

제조된 시제품의 축산 현장에의 적용성을 검토하고 자동급수기의 문제점을 해결할 수 있는지를 평가하기 위하여 전남대학교 농과대학 부속농장에 의뢰하여 양계를 이용한 사양실증 시험을 행하였다.

제3장 결과

제1절 유화제의 최적 농도 결정

난황레시틴은 비이온성 유화제로 쓰였다. 난황레시틴의 농도와 계면장력과의 관계를 Figure 1에 나타내었다. 난황레시틴의 농도가 0.01%에서 0.1%까지는 계면장력이 크게 변화하지 않다가 0.1%부터 0.5%까지는 급격히 감소되었다. 그 이후에는 레시틴의 농도에 따라서 크게 변화하지 않았고 일정해짐을 알 수 있었다. 이러한 결과로부터 난황레시틴의 임계미셀농도는 0.5%임을 알 수 있었다. 또한 임계미셀농도 값을 실제 유제를 만들었을 때와 비교를 위해 유화제의 농도에 따라 유제를 제조하고 그 입자도를 측정해 보았다. Figure 2에서 보듯이 레시틴의 농도가 높아질수록 입자도가 점점 줄어들다가 2%에서는 일정해 짐을 알 수가 있었다. 레시틴의 농도가 증가할수록 계면막은 점점 더 단단해져서 막의 물리적, 전기화학적 안정화에 기여하여 유화를 하는 과정에서 주위의 기름방울과의 반발력을 생성시켜 입자는 더 작아지는 것으로 사료되었다. 또한 작은 크기의 기름 방울은 저장 과정에서 안정화에 기여함을 알 수 있었다. 아울러, 비록 임계미셀농도는 0.5%이지만 유제의 최적화를 위해서는 2% 이상의 레시틴이 필요함을 알 수 있었다. 따라서, 최적의 유화제 농도는 2%로 하였다.

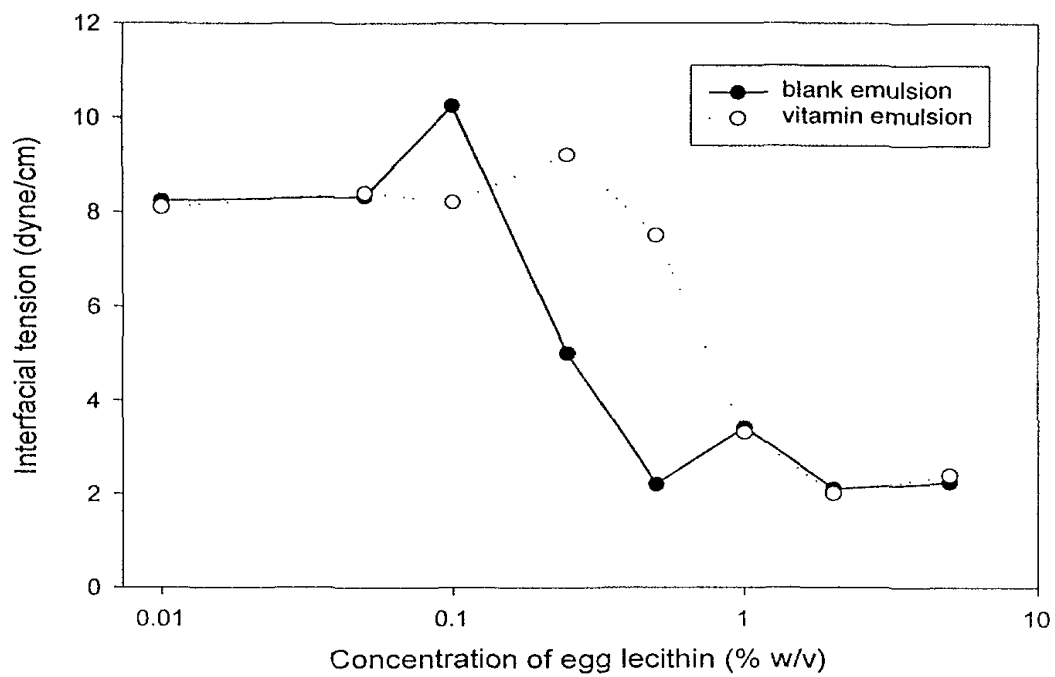


Figure 1. Interfacial tension of egg lecithin between soybean oil and water system.

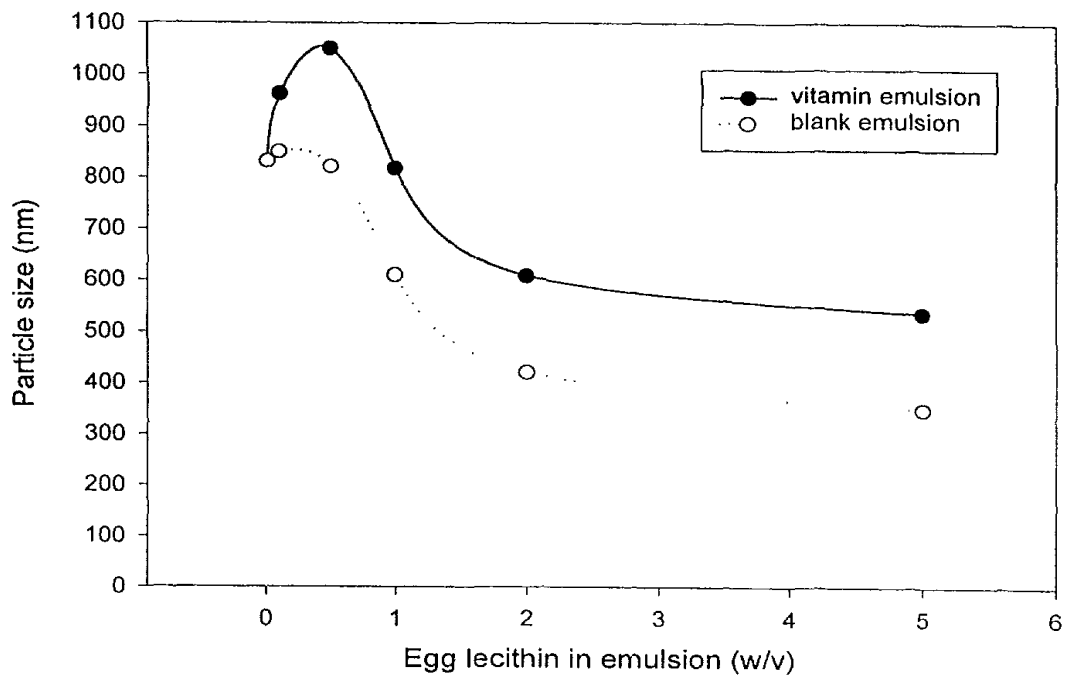


Figure 2. Effect of egg lecithin on particle size of blank and multivitamin emulsion.

제2절 복합비타민 유제의 제조

입자의 크기와 분포는 유제의 안정성이나 조직분포 등에 중요한 역할을 한다. 크기가 작고 안정한 유제를 만들기 위해서는 그만큼의 커다란 전단력이 필요하기 때문에 microfluidizer를 이용하여 복합비타민 유제를 만들었다. 예상대로 유제의 입자 크기는 microfluidizer를 통과하는 횟수에 의존함을 알 수 있었다. 기름방울은 전단력을 받아 깨어지고 곧이어 수상에 존재하는 유화제의 지용성 부분에 닿게 되어 유제의 기름방울은 figure 3에서 보듯이 통과횟수가 증가함에 따라 점점 줄어들었다. 공유제의 경우에는 통과횟수가 증가하면 할수록 계속 입자의 크기가 줄어들어 11회부터는 일정하게 크기가 유지됨을 알 수 있었다. 반면에 비타민 유제의 경우는 7회까지는 계속 크기가 줄어들다가 9회부터는 갑자기 커져서 일정해짐을 알 수 있었다. 이는 microfluidizer로부터 과잉의 힘에 계속 노출되어 오히려 계면막의 파괴로 이어진 것으로 추측되어진다. 그렇기 때문에 복합비타민 유제의 제조시 microfluidizer 통과 횟수를 7회로 정하였고 그때 얻어진 평균 입자 크기는 620 nm였다.

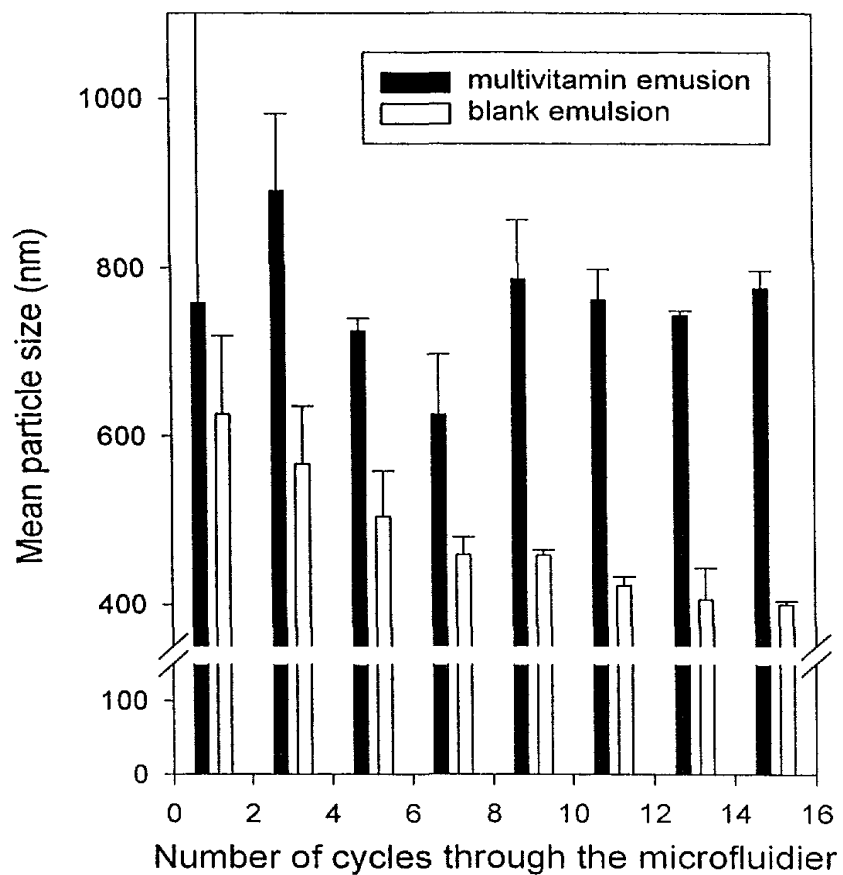


Figure 3. Average particle size of blank and multivitamin emulsion as the function of cycles through the microfluidizer. Each value presents the mean \pm S.D. (n=3).

제3절 복합비타민 유제의 물리적 안정성

제1항 Centrifugal test

제조된 복합비타민 유제와 공유제의 안정성을 비교하기 위해 원심분리기를 이용하여 3000, 5000, 7000 및 10000 rpm에서 10분과 30분 동안 원심분리시켜 다음 Figure 4와 같은 결과를 얻었다. 복합비타민 유제의 제조시 공유제보다 비타민 유제의 입자 크기가 가 더 크던 것에 비추어 볼 때 예상했던 것처럼 비타민 유제가 공유제보다 같은 회전수에서 creaming 비율이 더 큰 것을 알 수 있었다.

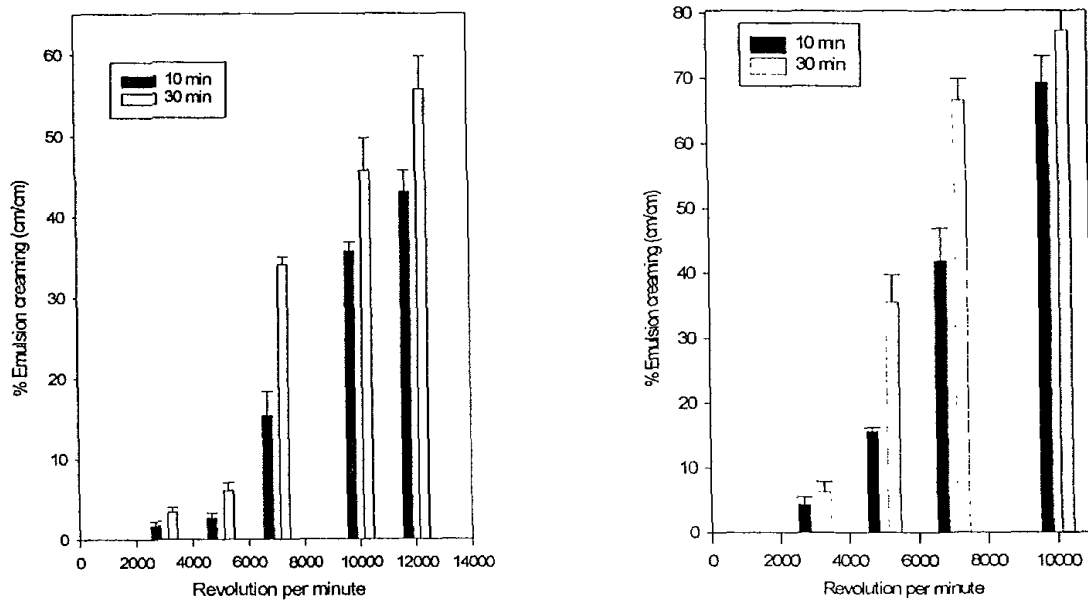


Figure 4. Blank emulsion (left) and multivitamin emulsion (right) creaming as the function of the speed and time of centrifugation. Each value presents the mean \pm S.D. (n=3).

제2항 Freeze-thaw test

Freeze-thaw cycle을 1, 2, 3, ..., 6회 실행하는 동안의 제조된 복합비타민 유제의 particle size의 변화를 측정했다. 그리고 녹인 후, 0, 20, 40 및 60분 후의 particle size도 측정하였다. 이로부터 유제에 상기 비타민들이 첨가되어도 유제의 안정성에는 큰 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다.

※ Freeze-thaw cycle: -40°C 에서 12시간 동안 열리고 4°C 에서 12시간 보관하여 유제의 안정성을 시험하는 방법이다.

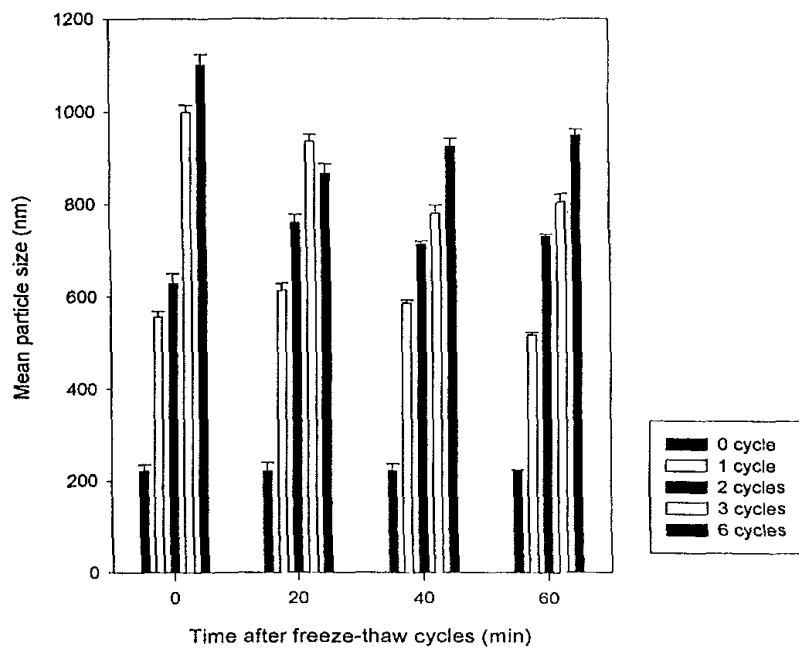


Figure 5. Physical stability of blank emulsion at various freeze-thaw cycles. Each value presents the mean \pm S.D. (n=3).

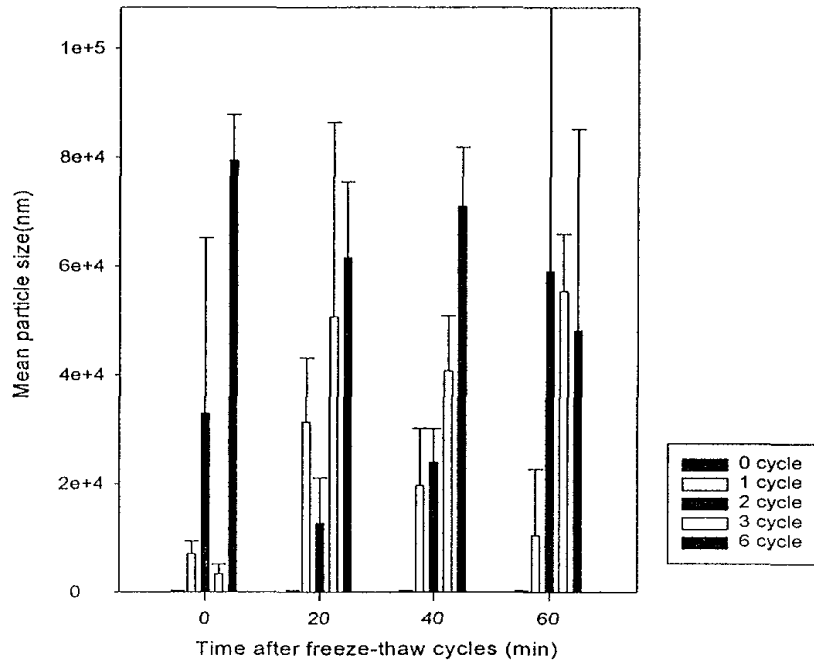


Figure 6. - Physical stability of multivitamin emulsion at various freeze-thaw cycles. Each value presents the mean \pm S.D. (n=3).

제4절 복합비타민 유제 중 비타민의 안정성

제1항 복합비타민 유제 중 비타민의 정량

비타민의 안정성과 제조된 유제의 기준 및 시험방법을 확립하기 위해서는 우선 각 비타민에 대한 분석법의 확립이 필요하였다. Figure 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 및 14에 나타내었듯이 비타민 각 성분들은 제시된 HPLC 조건하에서 상호 간섭현상 없이 잘 분리되었으며 figure 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 및 22에서 알 수 있듯이 각 비타민은 검량선 작성 농도 범위에서 양호한 직선성을 나타냄을 알 수 있었다. 또한 각 비타민은 검량선 작성 농도 범위에서 시료의 일간 변동계수가 모두 20% 이내로 나타나 본 HPLC 분석 방법의 재현성이 확보됨을 알 수 있었으며, 비타민의 안정성을 시험하는데 충분한 정확성과 감도를 지니고 있음을 알 수 있었다. 이로부터, 제조된 비타민 유제의 기준 및 시험방법을 작성할 수 있었다.

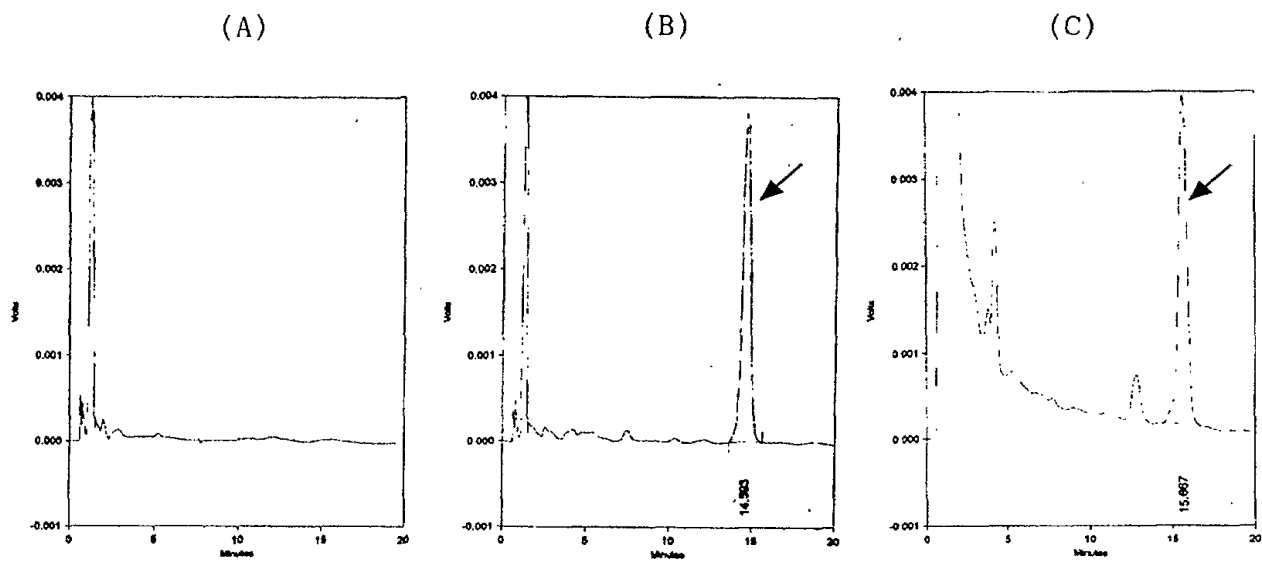


Figure 7. HPLC chromatograms of blank emulsion (A), spiking vitamin A palmitate (retinol palmitate) (8 ug/ml) in blank emulsion (B) and multivitamin emulsion (C).

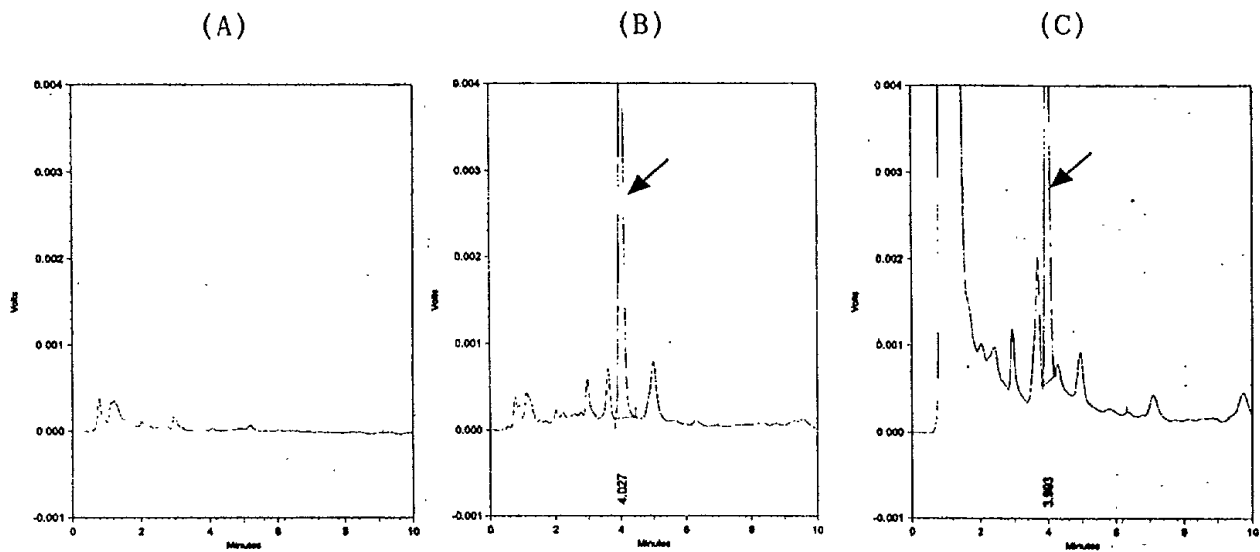


Figure 8. HPLC chromatograms of blank emulsion (A), spiking vitamin E ((+)- α -tocopherol) (40 ug/ml) in blank emulsion (B) and multivitamin emulsion (C).

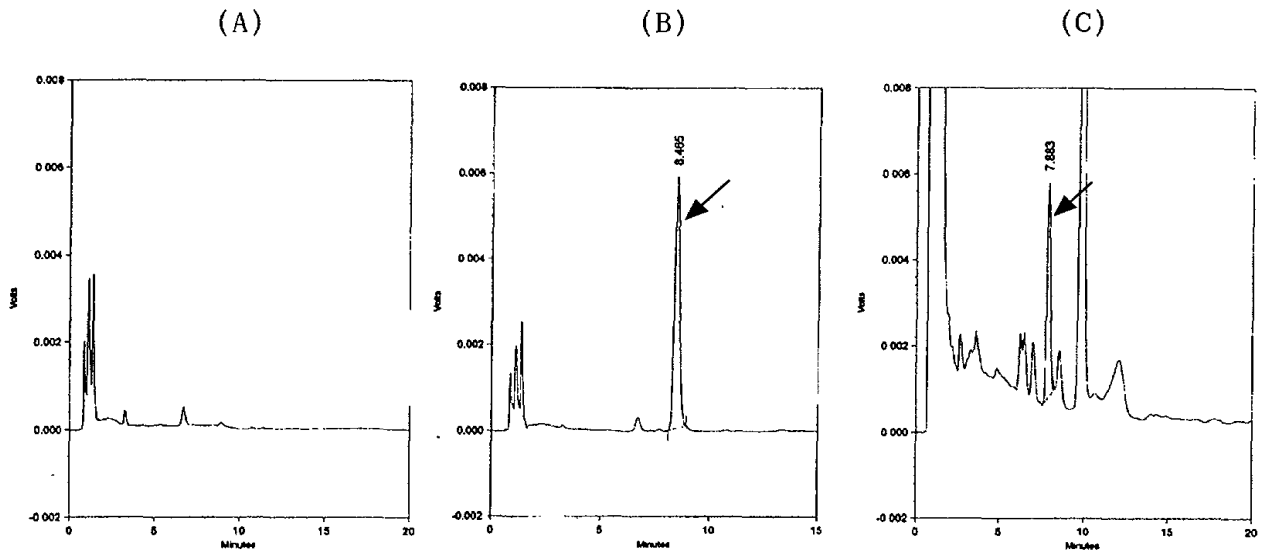


Figure 9. HPLC chromatograms of blank emulsion (A), spiking vitamin D3 (cholecalciferol) ($8 \mu\text{g}/\text{ml}$) in blank emulsion (B) and multivitamin emulsion (C).

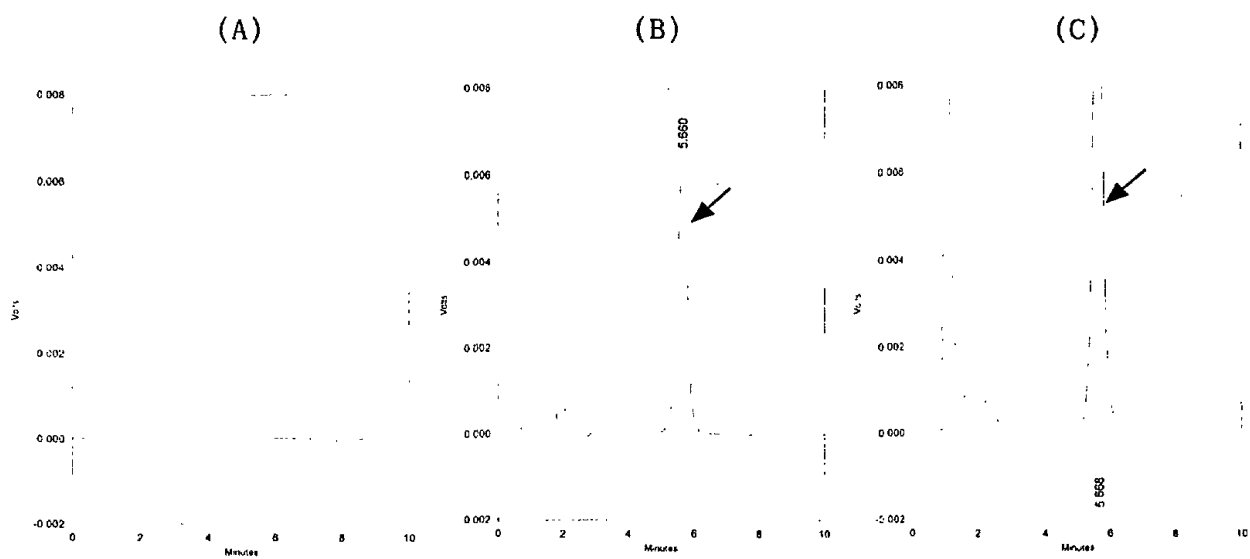


Figure 10. HPLC chromatograms of blank emulsion (A), spiking vitamin K3 (menadione) ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) in blank emulsion (B) and multivitamin emulsion (C).

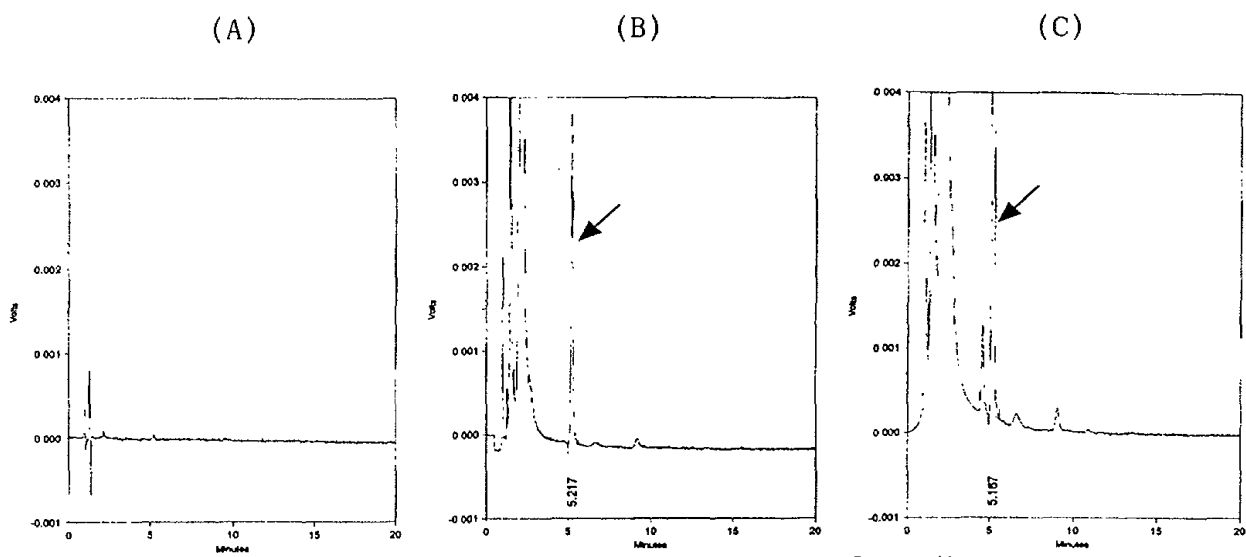


Figure 11. HPLC chromatograms of blank emulsion (A), spiking vitamin B2 (riboflavin sodium phosphate) (12.5 ug/ml) in blank emulsion (B) and multivitamin emulsion (C).

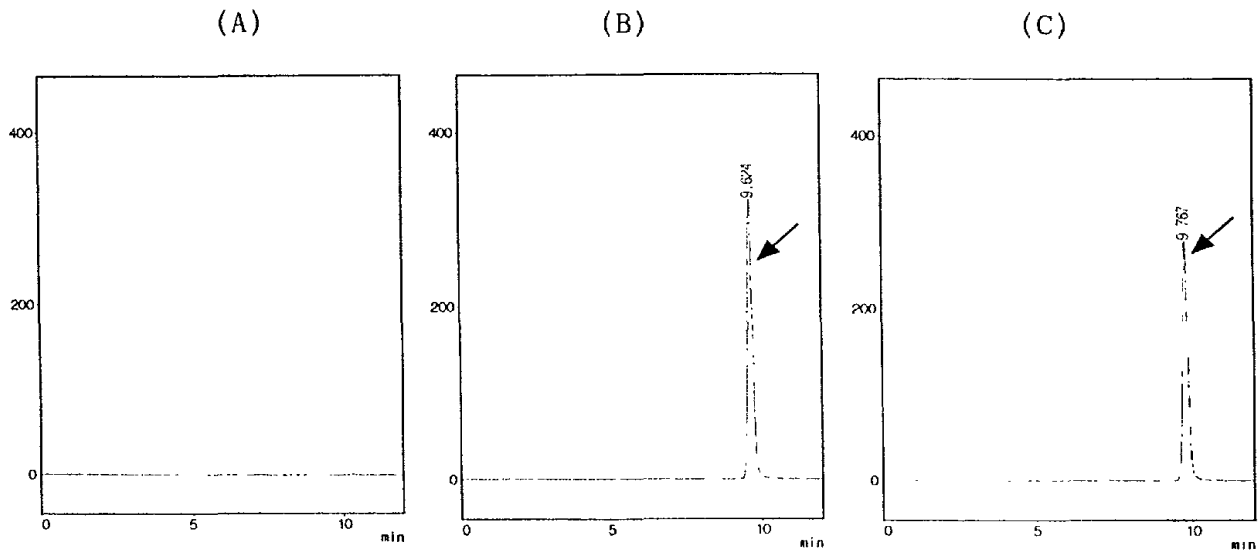


Figure 12. HPLC chromatograms of blank emulsion (A), spiking vitamin B6 (pyridoxine HCl) (1 ug/ml) in blank emulsion (B) and multivitamin emulsion (C).

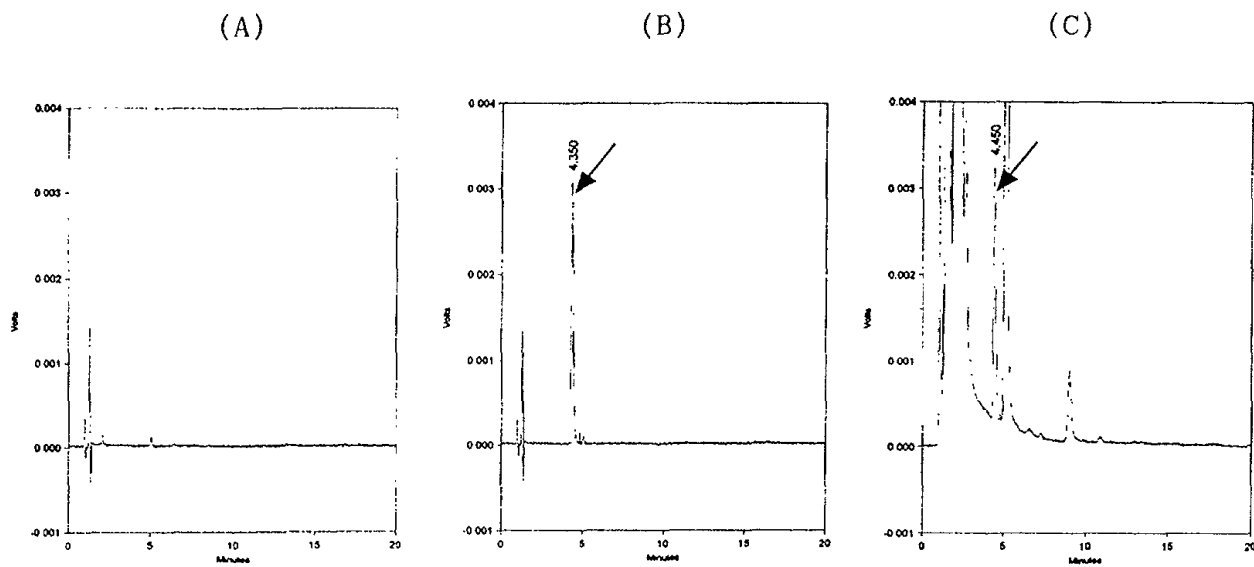


Figure 13. HPLC chromatograms of blank emulsion (A), spiking vitamin B12 (cyanocobalamin) ($0.5 \mu\text{g/ml}$) in blank emulsion (B) and multivitamin emulsion (C).

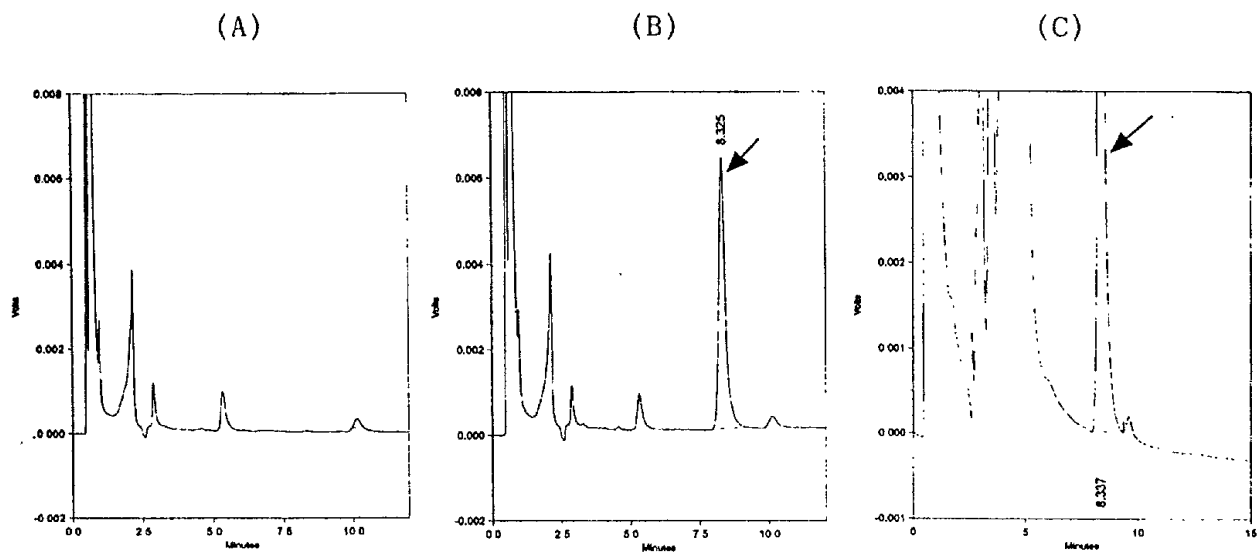


Figure 14. HPLC chromatograms of blank emulsion (A), spiking vitamin panthenol (pantotheyl alcohol) ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) in blank emulsion (B) and multivitamin emulsion (C).

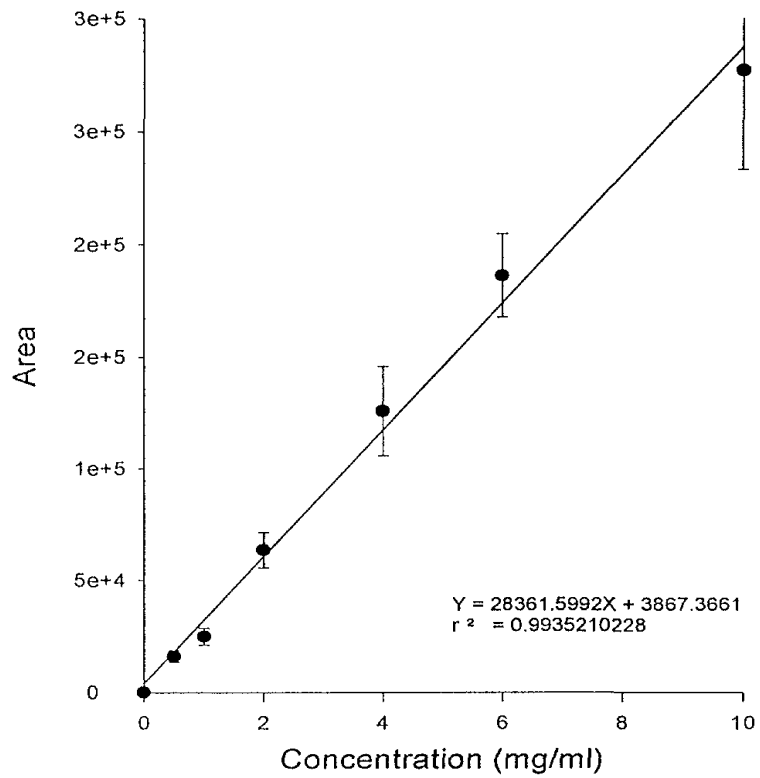


Figure 15. Calibration curve of retinol palmitate.

Vertical bar and solid line represent the standard deviation of the mean and the linear regression, respectively.

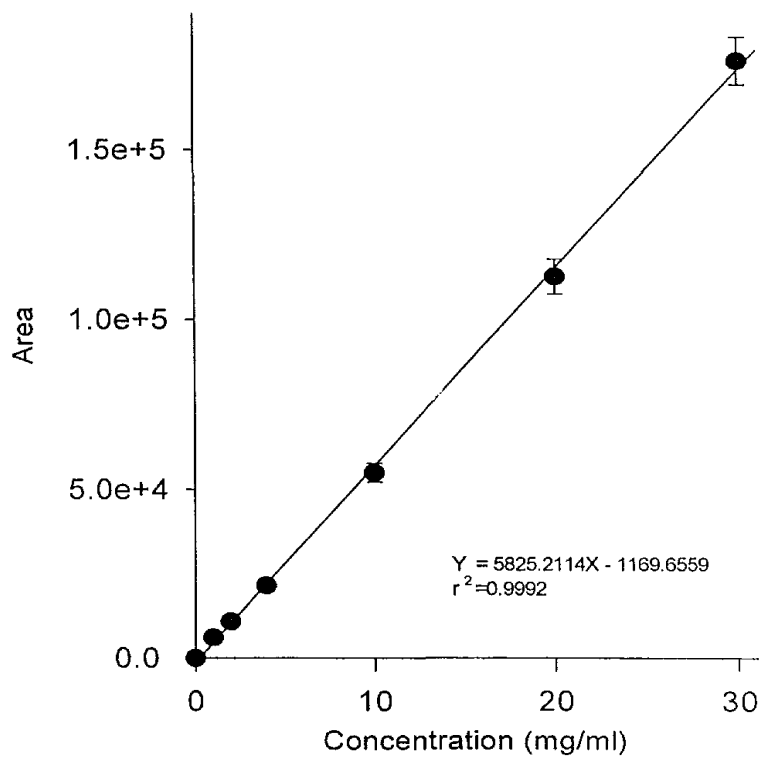


Figure 16. Calibration curve of (+)- α -tocopherol.

Vertical bar and solid line represent the standard deviation of the mean and the linear regression, respectively.

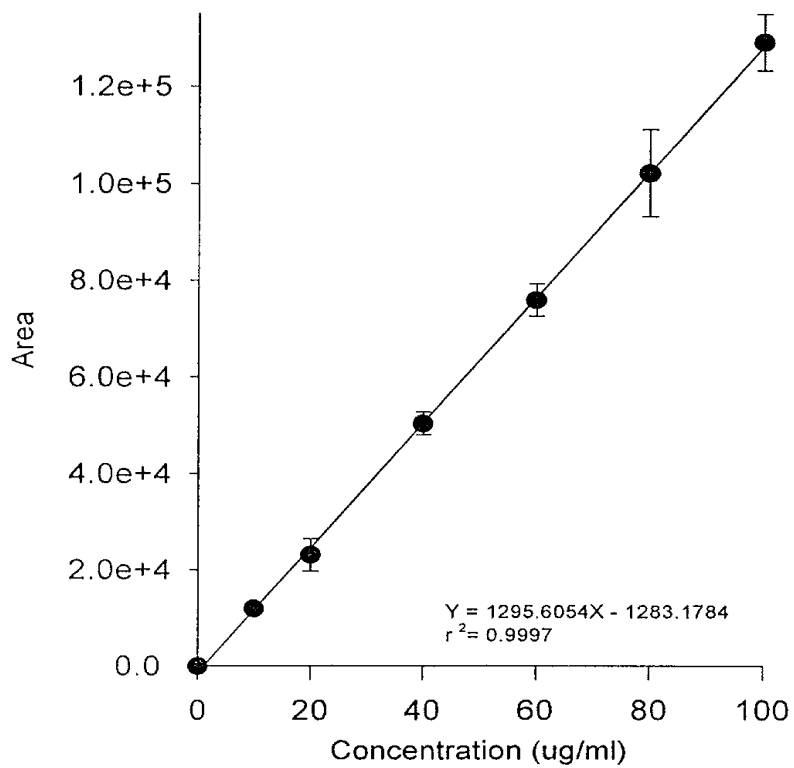


Figure 17. Calibration curve of cholecalciferol.

Vertical bar and solid line represent the standard deviation of the mean and the linear regression, respectively.

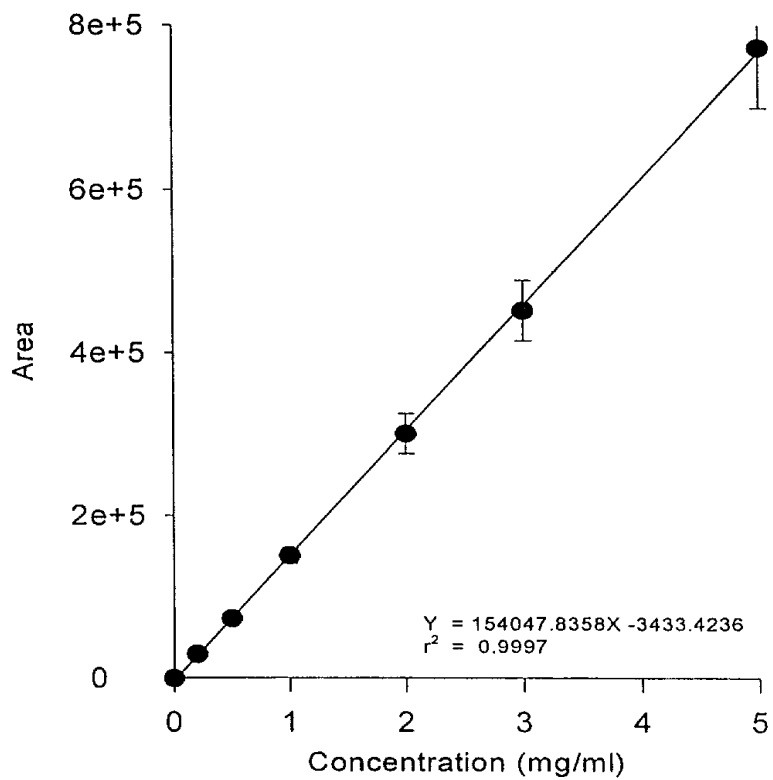


Figure 18. Calibration curve of menadione.

Vertical bar and solid line represent the standard deviation of the mean and the linear regression, respectively.

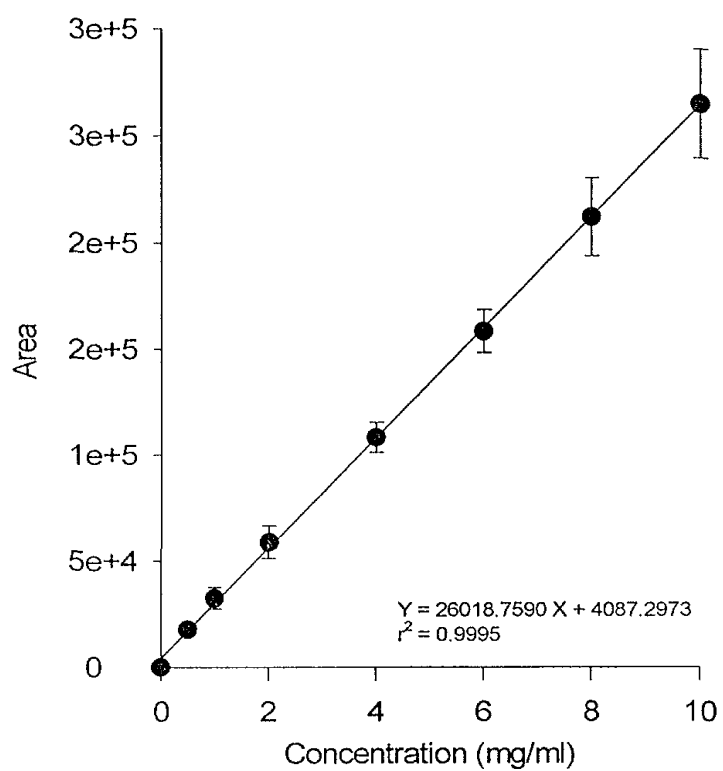


Figure 19. Calibration curve of riboflavin sodium phosphate.

Vertical bar and solid line represent the standard deviation of the mean and the linear regression, respectively.

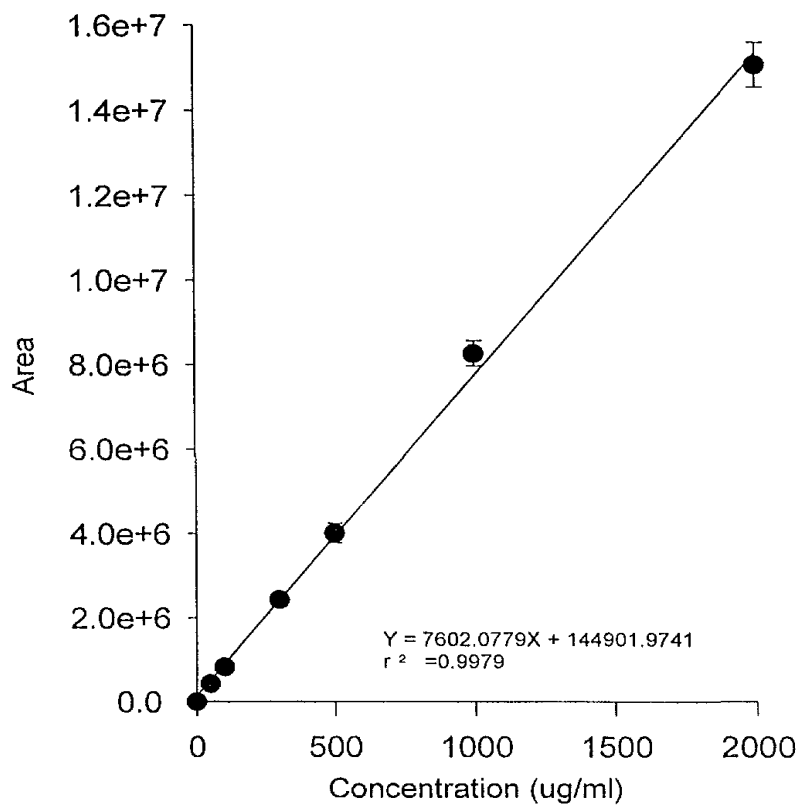


Figure 20. Calibration curve of pyridoxine HCl.

Vertical bar and solid line represent the standard deviation of the mean and the linear regression, respectively.

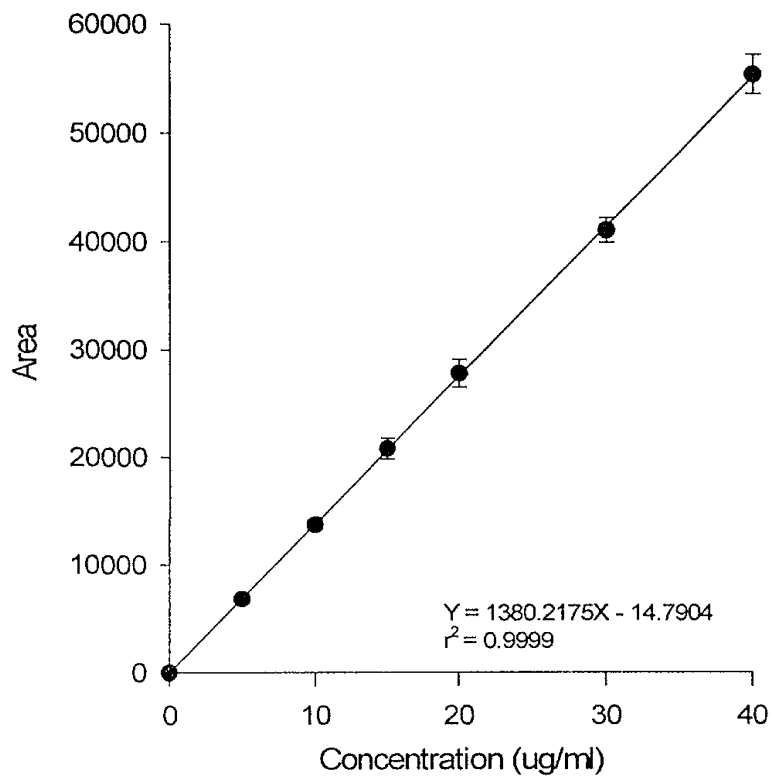


Figure 21. Calibration curve of cyanocobalamin.

Vertical bar and solid line represent the standard deviation of the mean and the linear regression, respectively.

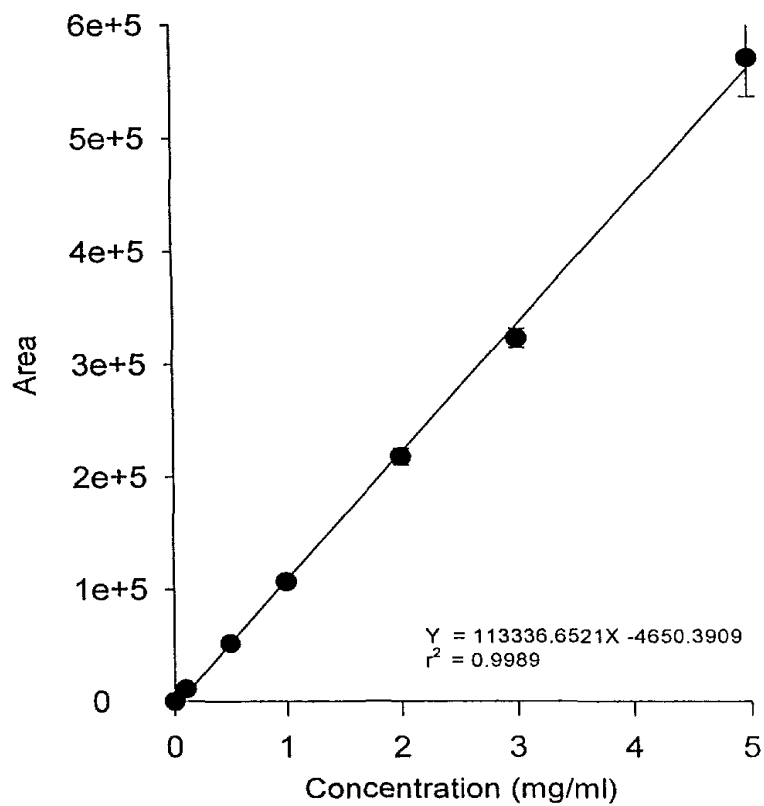


Figure 22. Calibration curve of panthenol.

Vertical bar and solid line represent the standard deviation of the mean and the linear regression, respectively.

Table 10. Reproducibility data of retinol palmitate.

Inter-day DATA (area)					
conc. (mg/ml)	MEAN	S.D.	C.V. (%)	Found (mg/ml)	Accuracy (%)
0	0.00	0.00			
0.5	15414.25	2855.50	18.53	0.41	-18.57
1	24667.50	3015.25	12.22	0.73	-26.66
2	63750.75	8449.09	13.25	2.11	5.57
4	129694.25	24471.97	18.87	4.44	10.91
6	189533.25	23164.17	12.22	6.55	9.11
10	295461.75	49059.28	16.60	10.28	2.81

Intra-day DATA (area)					
conc. (mg/ml)	MEAN	S.D.	C.V. (%)	Found (mg/ml)	Accuracy (%)
0	0.00	0.00			
0.5	16663.50	2292.89	13.76	0.45	-9.76
1	25514.50	3998.12	15.67	0.76	-23.67
2	62416.50	7621.84	12.21	2.06	3.22
4	116176.75	15776.43	13.58	3.96	-1.00
6	179973.75	10800.83	6.00	6.21	3.49
10	245287.75	24487.58	9.98	8.51	-14.88

Table 11. Reproducibility data of (+) α -tocopherol.

Inter-day DATA (area)					
conc. (mg/ml)	MEAN	S. D.	C. V. (%)	Found (mg/ml)	Accuracy (%)
0	0.00	0.00			
1	5831.25	1088.73	18.67	1.20	20.18
2	10756.75	1053.62	9.79	2.05	2.37
4	21030.75	1593.78	7.58	3.81	-4.72
10	54914.50	1871.54	3.41	9.63	-3.72
20	110950.50	6673.62	6.01	19.25	-3.76
30	173961.00	4814.91	2.77	30.06	0.21

Intra-day DATA (area)					
conc. (mg/ml)	MEAN	S. D.	C. V. (%)	Found (mg/ml)	Accuracy (%)
0	0.00	0.00			
1	6480.00	307.31	4.74	1.31	31.32
2	10939.00	787.31	7.20	2.08	3.93
4	22337.25	1714.95	7.68	4.04	0.88
10	55550.50	3578.68	6.44	9.74	-2.63
20	114362.25	892.65	0.78	19.83	-0.83
30	177094.25	8620.43	4.87	30.60	2.01

Table 12. Reproducibility data of cholecalciferol.

Inter-day DATA (area)					
conc. (ug/ml)	MEAN	S. D	C. V. (%)	Found (ug/ml)	Accuracy (%)
0	0.00	0.00	0.00		
10	11941.50	944.93	7.91	10.21	2.07
20	22576.75	4435.69	19.65	18.42	-7.92
40	51663.75	2313.19	4.48	40.87	2.17
60	75748.00	1931.32	2.55	59.46	-0.91
80	100888.00	7166.14	7.10	78.86	-1.43
100	130181.75	4105.71	3.15	101.47	1.47

Intra-day DATA (area)					
conc. (ug/ml)	MEAN	S. D	C. V. (%)	Found (ug/ml)	Accuracy (%)
0	0.00	0.00			
10	12149.25	702.80	5.78	10.37	3.68
20	21940.00	4122.08	18.79	17.92	-10.38
40	50084.75	2917.75	5.83	39.65	-0.88
60	75559.50	4548.60	6.02	59.31	-1.15
80	105405.50	10702.96	10.15	82.35	2.93
100	129402.50	7712.78	5.96	100.87	0.87

Table 13. Reproducibility data of menadione.

Inter-day DATA (area)					
conc. (mg/ml)	MEAN	S. D.	C. V. (%)	Found (mg/ml)	Accuracy (%)
0	0.00	0.00	0.00		
0.2	29300.00	3667.16	12.52	0.21	6.24
0.5	74330.25	2499.68	3.36	0.50	0.96
1	146670.25	7209.22	4.92	0.97	-2.56
2	295799.25	13191.51	4.46	1.94	-2.88
3	475852.00	20081.74	4.22	3.11	3.71
5	792344.25	97296.25	12.28	5.17	3.32

Intra-day DATA (area)					
conc. (mg/ml)	MEAN	S. D.	C. V. (%)	Found (mg/ml)	Accuracy (%)
0	0.00	0.00			
0.2	28436.75	3221.41	11.33	0.21	3.44
0.5	73061.50	4213.05	5.77	0.50	-0.69
1	153817.00	9380.77	6.10	1.02	2.08
2	307912.00	31054.25	10.09	2.02	1.05
3	431369.50	33643.38	7.80	2.82	-5.92
5	742574.75	15008.04	2.02	4.84	-3.15

Table 14. Reproducibility data of riboflavin sodium phosphate.

Inter-day DATA (area)					
conc. (mg/ml)	MEAN	S. D.	C. V. (%)	Found (mg/ml)	Accuracy (%)
0	0.00	0.00			
0.5	16754.25	1872.48	11.18	0.49	-2.63
1	31999.25	3444.20	10.76	1.07	7.28
2	57901.75	10476.20	18.09	2.07	3.41
4	106830.00	7656.89	7.17	3.95	-1.28
6	156116.00	12160.61	7.79	5.84	-2.62
8	205774.25	16826.30	8.18	7.75	-3.11
10	258857.75	22926.14	8.86	9.79	-2.08

Intra-day DATA (area)					
conc. (mg/ml)	MEAN	S. D.	C. V. (%)	Found (mg/ml)	Accuracy (%)
0	0.00	0.00			
0.5	18176.75	1995.05	10.98	0.54	8.30
1	32624.75	6200.68	19.01	1.10	9.68
2	58300.25	4140.68	7.10	2.08	4.18
4	108076.50	7328.14	6.78	4.00	-0.08
6	159805.25	7194.90	4.50	5.98	-0.25
8	214730.25	19781.72	9.21	8.10	1.20
10	266741.75	28322.44	10.62	10.09	0.95

Table 15. Reproducibility data of pyridoxine HCl.

Inter-day DATA (area)					
conc. (ug/ml)	MEAN	S.D.	C.V. (%)	Found (ug/ml)	Accuracy (%)
0	0.00	0.00			
50	425978.50	13690.55	3.21	36.97	-26.05
100	844514.25	42040.34	4.98	92.03	-7.97
300	2521171.25	77097.43	3.06	312.58	4.19
500	4040290.50	319267.15	7.90	512.41	2.48
1000	8430785.50	244512.41	2.90	1089.95	8.99
2000	15273297.25	649172.70	4.25	1990.03	-0.50

Intra-day DATA (area)					
conc. (ug/ml)	MEAN	S.D.	C.V. (%)	Found (ug/ml)	Accuracy (%)
0	0.00	0.00			
50	434351.25	52506.68	12.09	38.08	-23.85
100	810032.25	22481.75	2.78	87.49	-12.51
300	2342547.25	114868.99	4.90	289.08	-3.64
500	4026817.50	125456.38	3.12	510.64	2.13
1000	8102730.50	201119.93	2.48	1046.80	4.68
2000	14877293.25	149731.60	1.01	1937.94	-3.10

Table 16. Reproducibility data of cyanocobalamin.

Inter-day DATA (area)					
conc. (ug/ml)	MEAN	S. D.	C. V. (%)	Found (ug/ml)	Accuracy (%)
0	0.00	0.00			
5	6614.50	333.01	5.03	4.80	-3.94
10	13567.50	337.23	2.49	9.84	-1.59
15	20214.25	975.13	4.82	14.66	-2.29
20	27877.75	1706.70	6.12	20.21	1.04
30	40743.50	1603.95	3.94	29.53	-1.57
40	54668.00	1523.13	2.79	39.62	-0.95

Intra-day DATA (area)					
conc. (ug/ml)	MEAN	S. D.	C. V. (%)	Found (ug/ml)	Accuracy (%)
0	0.00	0.00			
5	6932.50	616.05	8.89	5.03	0.67
10	13852.25	608.37	4.39	10.05	0.47
15	21458.75	532.59	2.48	15.56	3.72
20	28254.25	1496.37	5.30	20.48	2.41
30	41576.75	665.87	1.60	30.13	0.45
40	56381.75	1975.74	3.50	40.86	2.15

Table 17. Reproducibility data of panthenol.

Inter-day DATA (area)					
conc. (mg/ml)	MEAN	S. D.	C. V. (%)	Found (mg/ml)	Accuracy (%)
0	0.00	0.00	0.00		
0.1	10335.50	1124.19	10.88	0.13	32.22
0.5	51323.25	3427.25	6.68	0.49	-1.23
1	107712.00	3410.56	3.17	0.99	-0.86
2	217283.75	6374.51	2.93	1.96	-2.09
3	323529.50	6273.78	1.94	2.90	-3.48
5	579923.50	39708.51	6.85	5.16	3.16

Intra-day DATA (area)					
conc. (mg/ml)	MEAN	S. D.	C. V. (%)	Found (mg/ml)	Accuracy (%)
0	0.00	0.00			
0.1	11543.00	588.89	5.10	0.14	42.88
0.5	53138.25	1907.18	3.59	0.51	1.98
1	107603.25	3604.13	3.35	0.99	-0.96
2	218614.25	8007.65	3.66	1.97	-1.50
3	320882.25	10977.40	3.42	2.87	-4.26
5	570341.00	31290.13	5.49	5.07	1.47

제2항 장기보존 시험

제조된 복합비타민 유제를 4°C, 암소에서 보관하고 제조직후, 4주, 8주 및 12주에 걸쳐 검체를 소량 채취하여 위에서 확립한 HPLC 분석법을 이용하여, 시간이 지남에 따라 검체 중에서 소실되는 비타민의 추이를 관찰하였다. 그 결과 비타민 B12를 제외하고는 적어도 12주까지는 대부분의 비타민들이 함량규정 범위 내에 들어 있음을 알 수 있었으며 이로부터 복합비타민 유제 중의 비타민은 최소한 12주까지는 안정함을 알았다.

제5절 시제품 제조 및 사양실증 시험

제1항 시제품 제조

대량 생산을 위한 시제품의 제조 가능성을 알아보기 위하여 (주)우성양행의 대용량 microfluidizer를 이용하여 제조된 시제품의 안정성을 측정한 결과 유제의 안정성이 급격히 저하하는 현상이 나타남을 알 수 있었다. 이의 원인으로는 pre-emulsification 과정이 균일하게 유지되지 않았거나 대용량 microfluidizer를 이용한 제조과정 중의 sample loading이 일정하지 않았기에 나타나는 현상으로 사료되어 이를 시정하는 연구를 계속 추진 중에 있다.

제2항 사양실증 시험

제조된 시제품 유제를 이용하여 양계장에서 사양실증시험을 수행한 결과 시판품과는 달리 자동급수기의 막힘 현상은 전혀 나타나지 않았으며 양계의 발육상태가 즉, weight gain이 시판품 보다 상대적으로 크게 나타남을 알 수 있었다.

Table 18. Stability in long period preservation. Change of vitamins in multivitamin emulsion.

Analyte	Content	1 week	4 weeks	8 weeks	12 weeks
B2	90 - 115%	99.94	116.62	105.83	105.29
	3.6 - 4.6 mg/ml	3.9976	4.4648	4.2331	4.2118
B12	90 - 115%		87.3755	80.32	76.75
	18 - 23 ug/ml		17.4751	16.0649	15.3503
A	90 - 130%	125.99	107.48	108.94	103.01
	4.95 - 7.15 mg/ml	6.9297	5.9116	5.9917	5.6654
E	90 - 120%	101.02	103.58	93.014	101.09
	9 - 12 mg/ml	10.1018	10.3577	9.3014	10.1094
D3	90 - 130%			87.94	90.00
	45 - 65 ug/ml			43.9683	44.9992
K3	90 - 120%			109.64	92.08
	1.8 - 2.4 mg/ml			2.1927	1.8416
Panthenol	90 - 115%			101.025	102.72
	2.16 - 2.76 mg/ml			2.4246	2.4654
B6	90 - 115%				
	450 - 575 ug/ml				

제4장 고찰 및 결론

복합비타민 유제를 제조하고 평가한 결과 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. 고용량의 비타민이 유제에 들어가고 또, 비타민의 분해 등에 의해 복합비타민 유제는 비타민이 들어있지 않은 것에 비해 더 불안정하였다. 즉, 공유제에 비하여 복합비타민 유제는 입자 크기나 안정성에서 공유제보다 불안정한 면을 가지고 있었다. 하지만 이것은 단순히 수치상의 문제일 뿐 실제로 복합비타민 유제를 실제 사용하는데 있어서는 문제가 나타나지 않음을 알 수 있었다.

2. 복합비타민 유제에 포함되는 비타민의 보존시험 결과 대부분의 비타민은 유제 중에서 적어도 3개월 이상은 어느 정도 안정한 모습을 보였다. 이것은 첨가되는 비타민들이 산화를 서로 억제하여 나타난 결과라고 생각되어 진다. 이것으로 볼 때 적어도 유통과정중의 비타민의 분해에 의한 약효의 감소는 회피할 수 있을 것으로 사료되었다.

3. 시제품 제조와 사양실증 시험 결과, scale-up하는 과정의 pre-emulsification의 균질화와 sample loading의 문제점이 해결되면 대량생산을 위한 공법이 확립될 수 있어 실제 생산현장에 적용시킬 수 있을 것으로 사료되며 제조된 환경친화형 복합비타민 유제는 기존의 시판품에서 나타난 자동급수기의 니플이 막히는 문제점을 완전히 해결할 수 있었으며 그 생체 이용률도 기존 제품보다도 뛰어나 그 효력이 확보된 가격이 저렴한 수입대체 가능 제제임을 알 수 있었다.

제5장 참고문헌

1. I. J Oh, M. Y. Lee, Effect of PVP on the physical stability of O/W emulsion, *J. Kor. Pharm. Sci.*, **27(4)**, 287-293 (1997).
2. F. Liu, D. Liu, Amphipathic polyethylene glycol stabilized emulsions (O/W): physical characterization and in vivo distribution, *Int. J. Pharm.*, **125**, 73-80 (1995).
3. P. Grolier, S. Agoudavi,, V. Azais-braesco, Comparative bioavailability of diet-, oil- and emulsion-based preparations of vitamin A and β -carotene in rat, *Nut. Res.*, **15(10)**, 1507-1516 (1995).
4. T. Julianto, K. H. Yuen, A. M. Noor, Improved bioavailability of vitamin E with a self emulsifying formulation, *Int. J. Pharm.*, **200**, 53-57 (2000).
5. M. Gallarate, M. E. Carlotti, M. Trotta, S. Bovo, On the stability of ascorbic acid in emulsified systems for topical and cosmetic use, *ibid*, **188**, 233-241 (1999).
6. Y. V. Pathak, A. Rubinstein, S. Benita, Enhanced stability of physostigmine salicylate in submicron o/w emulsion, *ibid*, **65**, 169-175 (1990).
7. T. Yamaguchi, K. Nishizaki, S. Itai, H. H. Hayashi, H. Ohshima, Physicochemical Characterization of parenteral lipid emulsion: influence of cosurfactants on flocculation and coalescence, *Pharm. Res.*, **12(9)** (1995).
8. U. T. Lashmar, J. Beesley, Correlation of an oil in water emulsion with manufacturing procedures and stability, *Int. J. Pharm.*, **91**, 59-67 (1993).
9. M. W. Lovell, H. W. Johnson, P. K. Gupta, Stability of a less-painful intravenous emulsion of clarithromycin, *ibid*, **118**, 47-54 (1995).
10. P. Prinderre, P. Piccerelle, E. Cature, G. Kalantzis, J. P. Reynier, J. Joachim, Formulation and evaluation of o/w emulsions using experimental design, *ibid*, **163**, 73-79 (1998).

11. J. Han, S. S. Davis, C. Washington, Physical properties and stability of two emulsion formulations of propofol, *ibid*, **215**, 207-220 (2001).
12. O. Sommerburg, L.Y Zang and F.J.G.M. Kuijk, Simultaneous detection of carotenoids and vitamin E in human plasma, *J. Chromatogr. B*, **695**, 209-215 (1997).
13. F. Zonta and B. Stancher, High-performance liquid chromatography of fat-soluble vitamins, *ibid.*, **246**, 105-112 (1982).
14. C. Leray, M. Andriamampandry, G. Gutbier, J. Cavadenti, C. K. Soyer, C. Gachet and J. P. Cazenave, Quantitative analysis of vitamin E, cholesterol and phospholipid fatty acids in a single aliquot of human platelets and cultured endothelial cells, *ibid J. Chromatogr. B*, **696**, 33-42 (1997).
15. M. M. D. Zamarreno, A. S. Perez, C. G. Perez and J. H. Mendez, High-performance liquid chromatography with electrochemical detection for the simultaneous determination of vitamin A, D₃ and E in milk, *J. Chromatogr.*, **623**, 69-74 (1992).
16. H. Iwase, Determination of nicotinamide and pyridoxine in an elemental diet by column-switching high-performance liquid chromatography with UV detection, *ibid.*, **625**, 377-381 (1992).
17. M. J. Esteve, R. Farre, A. Frigola and J. M. G. Cantabella, Determination of vitamin B₆(pyridoxamine, pyridoxal and pyridoxine) in pork meat and pork meat products by liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, **795**, 383-387 (1998).
18. C. J. Argoudelis, Simple isocratic high-performance liquid chromatographic method for the separation of the six vitamers of vitamin B₆, *J. Chromatogr. B*, **424**, 315-323 (1988).
19. S. K. Sharma and K. Dakshinamurti, Determination of vitamin B₆ vitamers and pyridoxic acid in biological samples, *ibid.*, **578**, 45-51 (1992).
20. M. Huong and B. Nguyen, Direct determination of D-panthenol in pharmaceutical

- preparations by ion-pair chromatography, *J. Chromatogr.*, **303**, 291-295 (1984).
21. J. Dalbacke and I. Dahlquist, Determination of vitamin B₁₂ in multivitamin-multimineral tablets by high-performance liquid chromatography after solid-phase extraction, *ibid.*, **541**, 383-392 (1991).
 22. A. Astier and F. J. Baud, Simultaneous determination of hydroxocobalamin and its cyanide complex cyanocobalamin in human plasma by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. B*, **667**, 129-135 (1995).
 23. N. S. Sosnowska, K. Blitek and I. W. Wojtulewicz, Determination of menadione sodium hydrogen sulphite and nicotinamide in multivitamin formulations by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.*, **357**, 227-232 (1986).
 24. A. J. Apeek, J. Schrijver and W. H. P. Schreurs, Fluorimetric determination of menadione sodium(vitamin K₃) in animal feed and premixes by high-performance liquid chromatography with post-column derivatization, *ibid.*, **301**, 441-447 (1984).
 25. R. A. P. Hughes and D. H. Calam, Determination of vitamin D₃ in cod-liver oil by high-performance liquid chromatography, *ibid.*, **246**, 95-104 (1982).
 26. A. Benmoussa, C. Delaurent, J. L. Lacout, P. R. Loiseau and M. Mikou, Determination of cholecalciferol and related substances by calcium phosphate hydroxyapatite and calcium phosphate fluoroapatite high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, **731**, 153-160 (1996).
 27. E. Barna and E. Dworschak, Determination of thiamine(vitamin B₁) and riboflavin(vitamin B₂) in meat and liver by high-performance liquid chromatography, *ibid.*, **668**, 359-363 (1994).
 28. C. Lavigne, J. A. Zee, R. E. Simard and C. Gosselin, High-performance liquid chromatographic-diode-array determination of ascorbic acid, thiamine and riboflavin in goats' milk, *J. Chromatogr.*, **410**, 201-205 (1987).
 29. A .L. Anaya and M. Mayersohn, Quantification of riboflavin, riboflvin

5'-phosphate and flavin adenine dinucleotide in plasma and urine by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. B*, **423**, 105-113 (1987).