

## pH 및 온도에 동시에 민감한 생분해성 하이드로젤의 합성 및 특성

신문식, 강형석, 박태관<sup>†</sup>, 양지원

한국과학기술원 화학공학과, 한국과학기술원 생물공학과<sup>†</sup>

전화 (042) 869-3964, 팩스 (042) 869-3910

### Abstract

pH- and thermo-sensitive hydrogels containing maleilated chitosan(MC) and N-isopropylacrylamide(NIPAAm) were prepared and characterized for their swelling behavior, biodegradability and drug release profiles. The hydrogels exhibited a typical pH-sensitivity due to the carboxylic acid groups of maleilated chitosan. The change of ratio of NIPAAm to MC in weight did not affect on either lower critical solution temperature(LCST) or EWC significantly. The pH sensitivity of the hydrogel, however, depended on the amounts of carboxylic acid groups of MC. MC was degradable up to 80% weight reduction in 2 hours. The *in vitro* drug release profiles were established both in buffer solution pH 1.4 and pH 7.4. Only a negligible amount of indomethacin was released at pH 1.4 in 6 hours, while at pH 7.4 more than 90% of the total drug in the hydrogel was gradually released over ca. 5 hours.

### 1. 서론

chitin은 게나 새우등과 같은 갑각류의 껍질로부터 얻어지는 다당류로 셀룰로오스 다음으로 많은 양이 자연에 존재하며 종래에는 이용되지 않고 있던 생물자원이었으나 1970년대에 들어서 폐수처리분야에 응용<sup>1)</sup>된 이래 지속해서 그 응용범위가 넓어지고 있다. 특히 chitin을 탈아세틸화하여 얻어지는 chitosan은 생체적합성과 무독성, 제산작용, 중앙억제 작용등의 약리작용을 나타내고 있기 때문에 1990년대 들어서 약물전달체<sup>2)</sup>, 혈액응고방지제<sup>3)</sup> 및 인공피부<sup>4)</sup>등의 의료용 재료로서 연구가 활발히 진행되고 있다.

pH 민감성 하이드로젤은 음이온성 또는 양이온성 고분자 network로서 외부 pH에 따른 팽윤특성이 다른 점을 이용하여 약물전달에 유용하게 사용되고 있다. N-isopropylacrylamide (NIPAAm)는 gel을 형성할 경우 32℃부근에서 그 부피가 불연속적으로 변하는 특이한 열역학적 성질을 가지게 되어 온도 민감성 하이드로젤의 합성에 많이 쓰이고 있다.

본 연구에서는 pH에 민감한 maleilated chitosan<sup>5)</sup> (MC)을 합성하여 온도 민감성 물질인 NIPAAm과 crosslinking시킴으로써 하이드로젤을 합성하고 pH 및 온도 변화에 따른 팽윤 특성을 알아보았다. 또한 MC의 생분해성을 조사하였으며 마지막으로

pH 변화에 따른 indomethacin의 방출특성을 알아보았다.

## 2. 재료 및 방법

### 2-1 Maleilated chitosan (MC) 합성 및 stock solution 제조

chitosan 1g을 maleic anhydride와 함께 formamide 용매조건에서 60°C에서 5시간동안 반응시킨 후 메탄올에 침전시킨 후 정제를 위해 침전물을  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 를 첨가하여 용해시킨 후 여과시켰다. 여과된 용액에 1N HCl를 첨가하여 다시 침전시킨 후 세척액이 중성이 될 때까지 세척해 준 후 메탄올과 에테르로 세척하였다. 이후 40°C하에서 진공펌프로 24시간 건조시켰다. 건조된 MC 1g을 pH 7.4 phosphate 완충용액 40ml에 용해시킨 후 4°C에서 보관하였다.

### 2-2 하이드로젤 합성

본 연구에서 하이드로젤은 monomer로 쓰이는 NIPAAm과 MC가 여러 물분율로 구성될 수 있도록 NIPAAm과 MC stock solution양을 조절하여 섞은 후 free-radical copolymerization의 방법으로 합성하였다. 합성된 하이드로젤 내에 포함된 MC와 NIPAAm의 조성은 Table 1에 나타내었다.

### 2-2 하이드로젤의 팽윤 및 수축 실험과 함수율 측정

건조된 하이드로젤을 여러 온도조건에서 다양한 pH범위의 완충용액에 담그고 일정시간동안의 팽윤된 하이드로젤의 중량을 하이드로젤 표면의 물기를 여과지로 닦아준 후 측정하였다. MC-NIPAAm2.25 하이드로젤을 pH 1.4와 pH 7.4 완충용액에 교대로 넣어준 후 같은 방법으로 하이드로젤의 중량 변화를 측정하였다.

### 2-3 Lysozyme에 의한 MC 분해실험

MC의 생분해성을 알아보기 위해 MC 185mg을 50ml의 pH 7.0 phosphate 완충용액에 용해시킨 후 10mg의 lysozyme을 첨가하여 일정 시간마다 1ml씩 분취하여 GPC로 분자량을 측정하였다.

### 2-4 약물방출실험

메탄올에 indomethacin을 포화상태로 용해시킨 후 이 용액에 MC-NIPAAm 2.25 하이드로젤을 24시간 담가놓았다. 건조된 하이드로젤을 37°C에서 pH 7.4와 pH 1.4의 완충용액 100ml에 담근 후 일정시간마다 100 $\mu$ l씩 분취한 후 같은 양의 새로운 완충용액을 넣어주었다. 방출된 indomethacin의 농도는 파장 265nm에서 UV spectrophoometer를 사용하여 측정하였다

## 3. 결과 및 고찰

### 3-1 MC 구조 분석

합성된 MC의 구조는 NMR과 IR로 확인하였으며 maleic anhydride의 치환도는  $^1\text{H}$  NMR 이용하여 확인한 결과 1.0으로 반응성이 큰 아민기에 치환되었다.

### 3-2 pH 및 온도 변화에 따른 하이드로젤의 팽윤 특성

pH 및 온도변화에 따른 함수율의 변화 결과를 Fig 1, 2, 3에 각각 나타내었다. MC-NIPAAm1.35 (Fig.1), MC-NIPAAm1.8, MC-NIPAAm2.25 (Fig.2) 모두 온도 변화에 따른 함수율의 변화가 비슷한 양상으로 나타났으며 pH 3과 pH 4에서 가장 큰 함수율의 변화를 보여주었다. 이것은 산성영역에서는 MC의 카르복실기가 protonation이 되어 소수성이 증가하나 pH 3부터는 deprotonation이 일어나 하이드로젤을 친수성으로 만들어 함수율이 높아지게 되기 때문이다. 한편 NIPAAm의 LCST인 32°C를 넘어서면 하이드로젤이 소수성으로 변하므로 함수율이 작아지게 된다. 하지만 염기 조건에서는 이온화된 MC의 카르복실기가 우세하여 친수성을 크게 띠게 됨으로 32°C 이상에서의 함수율의 감소가 산성역에서 보다 작아지게 된다. 반면에 MC의 양을 적게 함유하고 있는 MC75-NIPAAm2.25의 경우 pH 민감성은 감소한 반면 모든 pH 범위에서 PNIPA gel과 비슷한 경향의 온도에 따른 함수율변화를 보여주었다. 한편 MC성분은 하이드로젤의 부피상 전이온도에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 이것은 MC의 카르복실기가 NIPAAm의 사슬과 다른사슬에 존재하기 때문이라 판단된다. pH 변화에 따른 팽윤, 수축실험에서는 전형적인 pH 의존성 하이드로젤에서 나타나는 그래프를 얻었다.

### 3-3 lysozyme에 의한 MC의 생분해성 측정

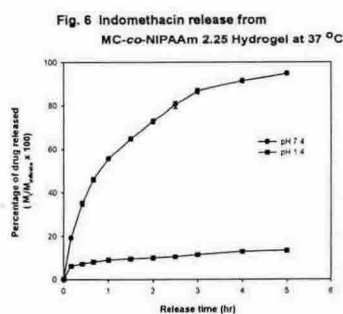
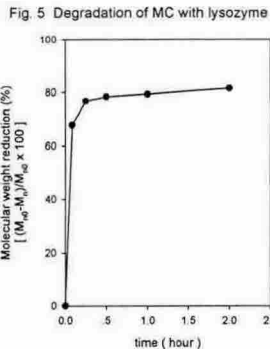
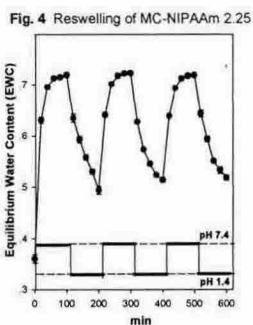
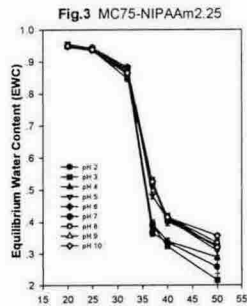
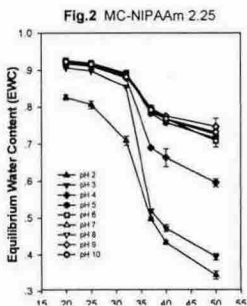
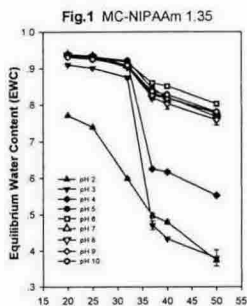
MC의 lysozyme에 의한 생분해도를 측정한 결과 2시간 이내에 초기 무게의 80%정도 분해되었다. 이러한 결과부터 MC또한 chitin과 마찬가지로 생분해성을 가지고 있음을 확인하였다.

### 3-4 약물방출실험

indomethacin의 약물방출결과 그림에서 보여지듯이 pH 1.4에서 미량의 약물만이 방출된 반면 pH 7.4에서는 총 약물의 90%이상이 4~5시간 이내에 방출되었다. 음식물이 소장에도달하는 시간이 약 5시간정도로 알려져있으므로 제조된 하이드로젤은 indomethacin을 소장에만 제어 전달하는데 적합한 결과를 얻었다.

## 4. 요약

pH 및 온도에 동시에 민감한 하이드로젤을 maleilated chitosan과 N-isopropylacrylamide를 이용하여 합성하였으며, 합성된 하이드로젤은 NIPAAm의 양에 관계없이 비슷한 pH 민감성을 나타내었으며 부피상 전이온도는 모두 NIPAAm의 LCST의 온도인 32°C부근에서 나타났다. 반면에 MC의 양을 소량 첨가한 하이드로젤은 그만큼 pH의 민감성이 떨어졌다. lysozyme에 의한 MC의 생분해는 2시간이내에 80%가 분해되었다. 또한 indomethacin을 이용한 약물방출 실험에서는 제조된 하이드로젤이 방출제어형 약물전달체로서 좋은 결과를 보인 제형으로 관찰되었다.



**Table 1.** Composition of Hydrogel

Gel code	Maleilated Chitosan (mg)	NIPAAm (g)
MC-NIPAAm 1.35	375	1.35
MC-NIPAAm 1.8	375	1.8
MC-NIPAAm 2.25	375	2.25
MC75-NIPAAm 2.25	75	2.25

## 5. 참고문헌

1. R. A/ A. Muzzarelli, "Natural Chelating Polymers", Pergamon Press, Oxford, 1973
2. Seiichi Tokura and Norio Nishi " NOVEL DRUG DELIVERY SYSTEM BY CHITIN DERIVATIVE " (1995), Macromol. Symp. 99, 201
3. Riccardo A. A. Muzarelli and Giovanni Giacomelli, "The Blood Anticoagulant Activity of N-Carboxymethylchitosan Trisulfate" (1987) 87
4. Ching-Hua Su, Chi-Shu Sun, Shan-ei Juan, Ching-Hong Hu, et al. " Fungal mycelia as the source of chitin and polysaccharides and their applications as skin substitutes" (1997), Biomaterials, 18, 1169
5. L. A. BERKOVICH, M. P. TSYURUPA, and V. A. DAVANKOV, "The Synthesis of Crosslinked Copolymers of Maleilated Chitosan and Acrylamide" (1983), J. Poly. Sci. Part A. Poly. Chem. 1281