

p-Aminosalicylic acid를 포함하고 있는 Chitin, Chitosan-Microsphere의 용출특성

임정수·김공수·신재섭*·김경호**

Dissolution properties of Chitin or Chitosan Microsphere Containing p-Aminosalicylic Acid

Jeoung-Soo Lim, Kong-Soo Kim, Jae-Sup Shin* Kyoung-Ho Kim**

- Abstract -

The Applicability of chitin or chitosan microsphere as means to achieve sustained release of p-aminosalicylic acid(PAS) has been examined. The microsphere of chitin or chitosan containing PAS were prepared by coacervation in acidic aqueous system in range of pH 2.0~4.0. The dissolution test of PAS from polymeric drug system was carried out in vitro test. The dissolution rate of PAS from the microsphere with chitin was significantly lower than that from the microsphere with chitosan. The dissolution rate of PAS from the microsphere was decreased with increasing of concentration of chitin and chitosan. The sustained release of PAS from the microsphere was more effective at pH 1.2 than pH 6.8.

1. 서론

Chitosan은 새우나 게와 같은 갑각류와 갑오징어 뼈속에 많이 함유되어 있는 chitin을 탈 아세틸화하여 쉽게 얻을 수 있으며, 이들은 모두 아미노 당류로 이루어진 다당류의 일종으로 우수한 생체적합

성과 생분해특성을 가진 천연고분자로서 많은 연구자들의 관심이 집중되고있다.

Chitin 및 chitosan은 약물의 전달체¹⁻³⁾ 혈액응고 방지제⁴⁻⁵⁾ 및 식물첨가제⁶⁾ 등을 비롯하여 효소의 정제⁷⁾ 및 인공위장막등^{8, 9)}으로서의 활용성이 다양하다.

최근에는 확산, 화학반응 및 용해성등의 성질을 이용하여 약물의 용출을 지속적으로 방출시키려는 시스템(controlled drug release system)에 대하여 많은 관심을 기울이고 있으며, 고분자물질로 보호 피막을 형성한 미소입자로 된 microsphere 또는 microcapsule 이 약물의 제어방출 시스템에 이용되고 있다.

이와같은 약물전달체로 이용되는 고분자 재료로서는 gelatin, cellulose, dextrin과 같은 천연고분자

<접수: 1989년 월 일>

충북대학교 화학공학과

Dept. of Chemical Eng., Chung buk University.

*충북대학교 화학과

*Dept. of Chemistry, Chung buk University.

**삼영전자 삼송연구소, 재료연구소, Mat. Res. Lab.,
Institute of Sam Song, Sam Young Electronics Co.

물질 외에도 polyamide, polyamino acid 등의 합성 고분자물질등이 있으며 계면중합등의 화학적방법, 피복용 고분자용액의 용해성을 이용하는 물리화학적 방법과 기계적인 방법이 이용되고 있다.

특히, Sawayamagi 등¹⁰⁻¹¹⁾ 은 phenytoin, ketoprofen 등의 약물을 혼합하여 ground mixture를 만들어 방출특성에 관한 연구를 보고하였고, Kawahima¹²⁾와 Hou 등¹³⁾ 은 indomethacin 또는 theophylline 등의 약물을 chitosan으로 코팅한 granule의 용출지연성에 관하여 발표한 바가 있다. 저자등¹⁴⁾은 chitin 및 chitosan 과 p-aminosalicylic acid(PAS)의 physical mixture와 ground mixture에 있어서 약물과 고분자 화합물사이에 상호작용성을 X-선 회절분석 및 시차열분석법으로 조사하였으며, PAS의 용출특성을 비교검토한 바 있다.

본 연구에서는 폐결핵 치료약으로 쓰이고 있는 PAS와 chitin 또는 chitosan을 용매에 대한 용해특성을 이용한 coacervation method로 microsphere를 제조하여 인공위액 및 인공장액과 유사한 pH 1.2, pH 6.8인 용액중에서 용출특성에 관하여 관찰하였다.

2. 실험

2-1 시료 및 기기

Chitin과 chitosan은 미국 Sigma 제 일급시약을 사용하였고, p-aminosalicylic acid는 일본 Kasei 제 1급시약을 사용하였다.

기타 시약은 일급시약을 정제하지 않고 사용하였으며, CH₃COOH-ClCH₂COOH 및 NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ 혼합용액으로부터 완충용액을 만들어 pH를 조절하였다.

그리고 전자현미경(Hitachi, S-570)을 사용하여 microsphere의 표면구조형태를 관찰하였고 용출실험장치(Cecil Instrument, ABMTM project 2329)를 사용하여 방출되는 약물의 농도를 측정하였다.

2-2 Microsphere의 제조

3g의 PAS-Na염을 증류수 9ml에 녹인 용액에 chitin 1g을 포름산 80ml에 녹인 용액 또는 chitosan

1g을 10%-CH₃COOH 용액 80ml에 녹인 용액을 각각 12ml, 24ml, 36ml씩을 가하여 chitin / PAS 및 chitosan / PAS 무게비율이 1/20, 1/10, 1/5이 되도록 하고, mechanical stirrer를 사용하여 30분 동안 고속(r.p.m: 850)으로 교반하면서 혼합하였다.

혼합용액에 완충용액을 10ml씩 가하여 pH 2.0 및 pH 4.0로 조절하고 dioxane 10ml씩을 첨가한 후 30분간 교반을 계속하였다. 이 때 형성된 coacervate를 여과하고 증류수로 충분히 씻어준 다음, freeze drying한 후 다시 dioxane으로 씻고 40℃에서 48시간동안 진공건조하였다.

2-3 용출실험

2-3-1 검량선의 작성

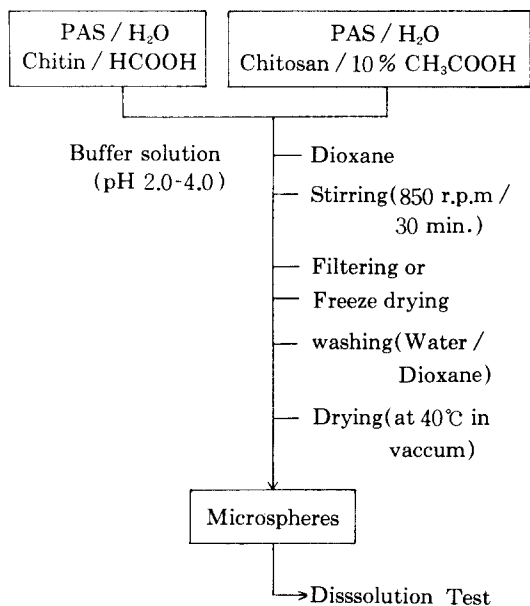
완충용액으로 pH 1.2 및 pH 6.8인 용액에 40mg의 PAS를 녹여 2.5, 5, 10, 20, 40μg/ml의 농도로 각각 희석시켰다. 시료용액의 U.V-Vis 분광광도계를 사용하여 흡수스펙트럼을 조사하였으며 각 시료용액을 최대흡수파장 300nm에서 흡광도를 측정하여 검량선을 작성하였다.

2-3-2 용출속도측정

PAS 1g을 함유하고 있는 chitin 또는 chitosan과 형성한 microsphere 시료일정량을 취하여 용출실험장치에 넣어 pH 1.2 및 6.8로 조절된 완충용액 500ml를 채운 다음, 37±0.1℃에서 200r.p.m의 회전속도로 교반하였다. 일정한 시간마다 용출실험장치로부터 5ml씩을 피펫으로 정확하게 취하여 완충용액으로 묽힌 후 U.V-Vis, 분광광도계로 300nm에서 PAS의 함량을 정량하였다. 용출실험용액은 같은량의 완충용액을 즉시 첨가해서 전체부피가 일정하게 유지되도록 하였다.

3. 결과 및 고찰

Chitin은 포름산에 녹이고 chitosan은 10%-CH₃COOH 용액에 각각 녹인 용액과 PAS 수용액을 일정량씩 취하여 chitin / PAS 및 chitosan / PAS의 무게비율이 각각 1/5, 1/10 및 1/20이 되도록 혼합하고 pH를 조절한 후, dioxane 분산매중에



Scheme 1. Preparation of microspheres with chitin and chitosan.

서 균일하게 교반하여 PAS의 입자표면이 chitin 또는 chitosan의 얇은 막으로 코팅된 미립자의 microspheres를 scheme 1.에서와 같은 공정으로 제조하였다.

이 때 PAS 수용액과 chitin 또는 chitosan 용액의 혼합계에 dioxane을 일정량 가하였을 때 pH 2.0~4.0 범위에서는 입자가 현탁된 분산상을 형성하였으나 pH 5.0 이상에서는 현탁 입자가 완전히 용해되었다.

또한, chitosan-PAS가 형성한 microsphere는 여과하기 곤란하여 freeze drying한 후, 증류수 및 dioxane으로 충분히 씻어주고 40°C이하에서 진공건조하였다.

제조한 microsphere 표면구조형태를 전자현미경으로 조사하여 PAS, chitin과 chitosan의 표면구조형태와 비교관찰한 바는 Fig.1과 Fig.2에서와 같다.

여기에서 보는 바와 같이, PAS는 구형과 막대모

Table 1. Preparation and characterization of the microsphere.

Polymers	Polymer / PAS	pH	yield(%) ^{a)}	diameter(μm)
Chitin	1 / 10	2	96.4	0.82μm~2.06μm
		4	97.5	-
Chitosan	1 / 10	2	94.3	-
		4	95.0	-

$$a) \text{ yield}(\%) = \frac{\text{total weight of microsphere obtained}}{\text{total weight of polymer and drug used}}$$

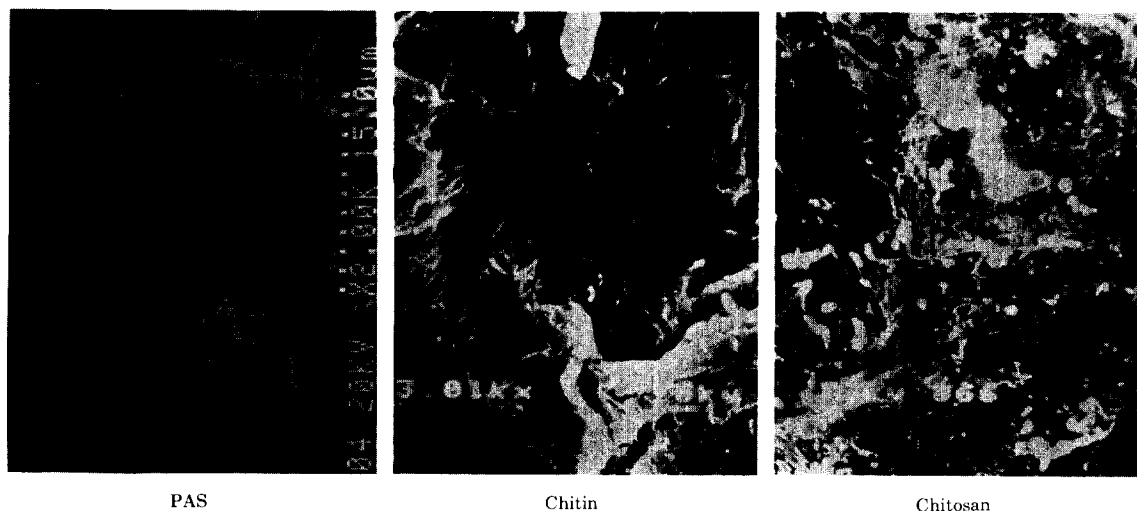


Fig 1. Scanning electron micrograms of PAS, chitin and chitosan.

양의 결정형태를 하고 있고 chitin과 chitosan은 표면에 돌출된 라멜라층의 표면구조형태가 서로 다른 모양을 보여주고 있다.

한편, PAS를 포함하고 있는 chitin-PAS 또는 chitosan-PAS의 microsphere의 경우에는 PAS 입자표면에 chitin, chitosan의 얇은 막으로 코팅된 구형표면구조형태도 볼 수 있다.

PAS를 포함하는 chitin-PAS, chitosan-PAS microsphere를 제조한 결과는 Table 1에 나타내었다.

Table 1에서 보는 바와 같이 polymer / PAS의 무게비 1 / 10이 되도록 하고 pH를 2.0 또는 4.0로 조절한 다음, dioxane 분산매 중에서 coacervation method로 microsphere를 제조한 결과, chitin-PAS microsphere는 96.4~97.5%, chitosan-PAS microsphere는 94.3~95.0%의 수율로 얻어졌으며, microsphere의 입자크기와 수율은 고분자 matrix의 종류에 따라 큰 차이가 없었다.

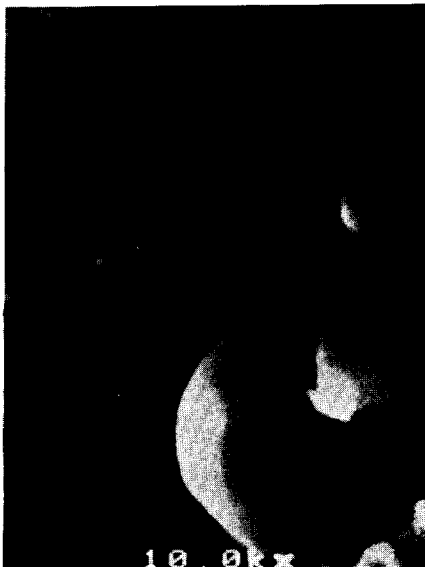
pH 1.2 또는 6.8로 각각 조절된 PAS가 수용액의 U.V-Vis. 스펙트라를 조사한 바는 Fig.3에서 보는

바와 같이, 230~330nm 파장영역에서 흡수가 일어났다. pH 1.2에서는 270nm, 300nm에서 각각 흡수가 일어났고, pH 6.8에서는 300nm에서 최대흡수가 일어났다.

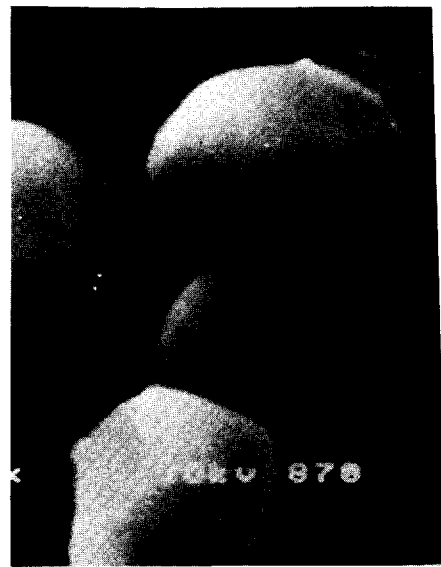
최대흡수파장 300nm에서 일정한 농도의 시료용액의 흡광도를 결정하여 검량선을 작성한 결과는 Fig.4에서와 같다.

여기에서 얻은 직선의 방정식은 pH 1.2에서는 $y = 0.81x + 0.2513 (r^2 = 0.9980)$ 이었고, pH 6.8에서는 $y = 0.097x + 0.0011 (r^2 = 0.9973)$ 이었다. Chitin 또는 chitosan과 PAS의 혼합비율을 달리하여 pH 2.0와 4.0에서 microsphere를 제조해서 약물의 전달체로서의 응용성을 검토하기 위하여 인공위액(pH 1.2) 및 인공장액(pH 6.8)에서의 용출특성을 시험한 결과는 Fig.5 및 Fig.6에서와 같다.

일반적으로 pH를 달리하여 제조된 microsphere로부터 PAS의 용출특성을 검토해 본 결과, pH 1.2인 용액에서는 pH 2.0 및 4.0에서 제조된 chitin-PAS microsphere의 용출지연효과가 pH에 관계없이 상당히 크며 pH 6.8인 용액중에서 용출지연효과



Chitin-PAS microsphere



Chitosan-PAS microsphere

Fig 2. Scanning electron micrograms of chitin-PAS and chitosan-PAS microspheres.

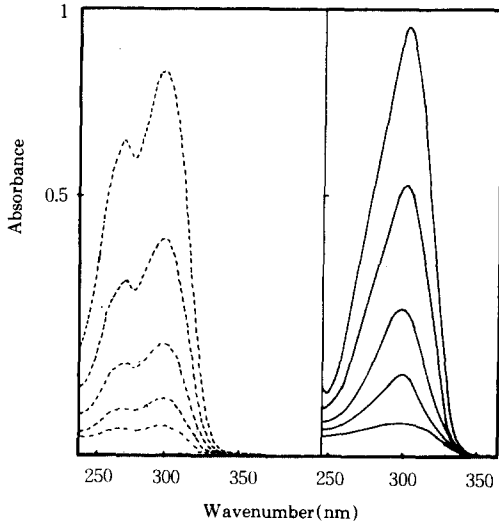


Fig 3. U.V-Vis, spectra of p-aminosalicylic acid(PAS) in aqueous solution.
 ----: pH 1.2 —: pH 6.8

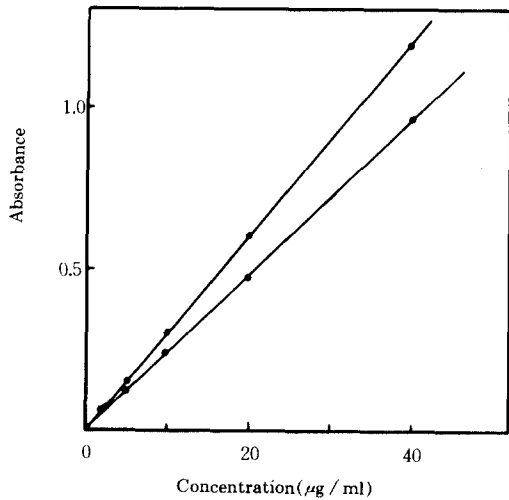


Fig 4. Calibration curve for p-aminosalicylic acid in pH 1.2 and pH 6.8 (Absorbance at 300nm).
 ○: pH 1.2, ●: pH 6.8

가 다소 저하되는 경향을 보여 주었다. pH 2.0와 4.0에서 제조된 chitin-PAS microsphere는 pH 변화에 따라 큰 영향을 받지 않으며 chitosan-PAS에 비

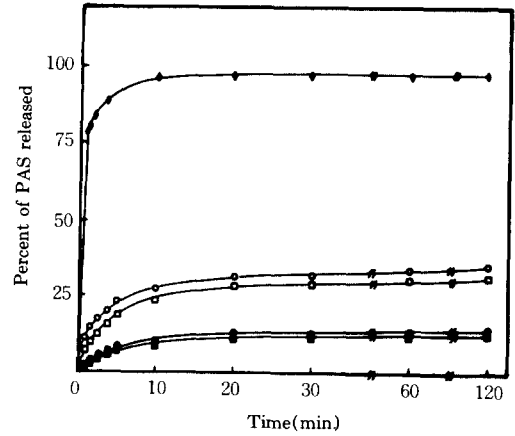


Fig 5. Dissolution of PAS from microspheres with chitin and chitosan in disintegration medium (pH=1.2) at 37°C.
 Weight ratio (chitosan / PAS)=1 / 10
 Weight ratio (chitin / PAS)=1 / 10
 ◆: intact PAS
 ○: pH 2.0 (chitosan) ●: pH 2.0 (chitin)
 □: pH 4.0 (chitosan) ■: pH 4.0 (chitin)

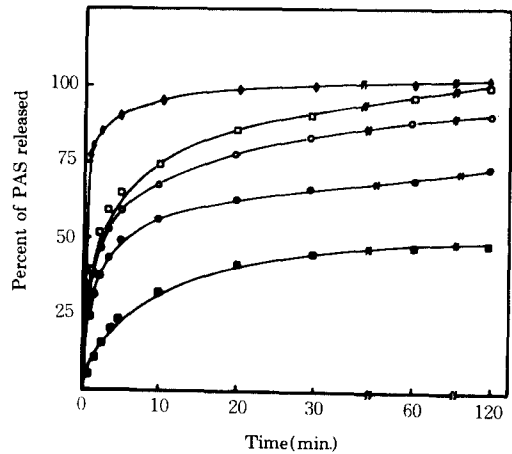


Fig 6. Dissolution of PAS from microspheres with chitin and chitosan in disintegration medium (pH6.8) at 37°C.
 Weight ratio (chitosan / PAS)=1 / 10
 Weight ratio (chitin / PAS)=1 / 10
 ◆: intact PAS
 ○: pH 2 (chitosan) ●: pH 2 (chitin)
 □: pH 4 (chitosan) ■: pH 4 (chitin)

교하였을 때 좋은 용출지연성을 보여주었다.

한편, pH 2.0 및 4.0에서 제조된 chitin-PAS microsphere 는 pH 1.2에서 2시간동안 10% 정도가 용출되었고, chitosan-PAS microsphere의 경우는 25% 정도가 용출되었다. 또한, pH 6.8인 용액에서는 chitin-PAS의 경우는 pH 4.0에서 보다 pH 2.0에서 제조한 것이 용출성이 크고 chitosan-PAS의 경우에는 pH 2.0에서 보다 pH 4.0에서 제조한 것이 용출성이 크게 나타났다.

이상에서 보는 바와 같이, chitosan-PAS가 chitin-PAS microsphere에 비하여 용출성이 훨씬 크고, pH 1.2에서 보다 pH 6.8인 용액중에서 각각 3배이상의 용출율을 나타내었는데 이와같은 용출특성은 chitin 또는 chitosan과 PAS 분자간의 상호작용력과 수용액중에서의 팽윤도 및 용해도차의 영향 때문이라고 해석할 수 있다.

Chitin / PAS 또는 chitosan / PAS의 무게비율을 달리하여 제조한 microsphere의 용출거동을 실험한 바는 Fig.7 및 Fig.8에 나타내었다.

그림에서 보는 바와 같이, chitosan / PAS의 비가 1/20~1/5인 범위에서 고분자 matrix가 증가됨에 따라 용출지연효과가 증대되었고, chitin-PAS microsphere 경우에는 chitin / PAS의 비율에 따라 큰 차이를 보여주지 않고 있다.

또한 pH 1.2인 용액에서 보다는 pH 6.8인 용액에서 비교적 용출이 잘 일어나서 시간에 따라 계속적으로 용출율이 증가되는 경향을 나타내었고, chitin-PAS 무게비율이 1/20~1/5인 범위에서는 25~40%의 PAS가 용출되었다.

특히, chitosan / PAS의 비가 1/10 이상에서는 2시간 동안에 거의 100%가 모두 용출되었으며, 1/5의 경우에는 시간에 따라 서서히 용출되어 2시간 동안에 75% 정도가 용출되었다. 이와 같이 chitin / PAS 및 chitosan / PAS의 비율을 1/20~1/5인 범위에서 고분자 matrix가 증가됨에 따라 PAS의 용출특성이 다른 것은 PAS 입자표면에 형성된 피막층의 두께에 따라 막의 팽윤성과 막을 통과하여 확산되는 약물의 방출효과에 영향을 주기 때문임을 예측할 수 있다.

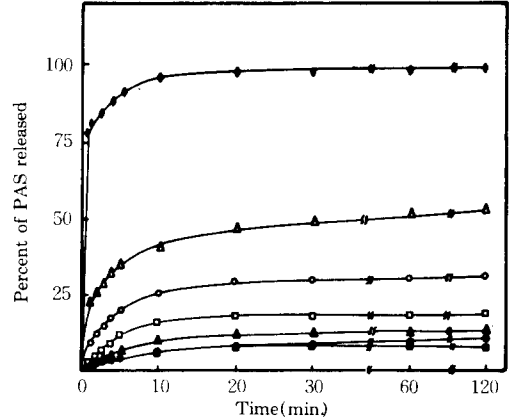


Fig 7. Dissolution of PAS from microspheres with chitin and chitosan (pH=4.0) in disintegration medium (pH=1.2) at 37°C.

Weight ratio (chitosan / PAS)	Weight ratio (chitin / PAS)
□: 1 / 5	■: 1 / 5
○: 1 / 10	●: 1 / 10
△: 1 / 20	▲: 1 / 20
	◆: 0 (intact PAS)

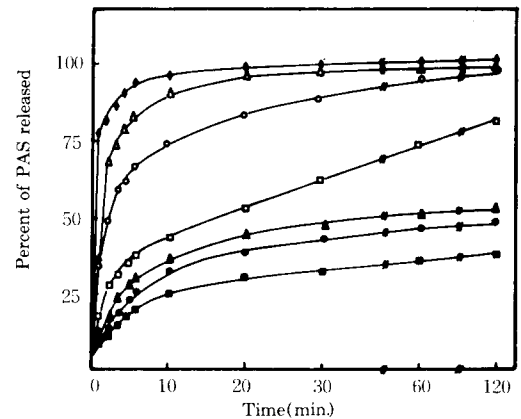


Fig 8. Dissolution of PAS from microspheres with chitin and chitosan (pH=4.0) in disintegration medium (pH=6.8) at 37°C.

Weight ratio (chitosan / PAS)	Weight ratio (chitin / PAS)
□: 1 / 5	■: 1 / 5
○: 1 / 10	●: 1 / 10
△: 1 / 20	▲: 1 / 20
	◆: 0 (intact PAS)

4. 결 론

천연고분자물질인 chitin 및 chitosan을 고분자 지지체로 해서 폐결핵 치료제로 쓰이고 있는 PAS를 일정한 비율로 혼합하고, 용액의 pH를 조절하여 만든 microsphere중 포함하고 있는 약물의 용출특성에 관하여 실험하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. pH 2.0~4.0로 조절된 H₂O-dioxane 분산계에서 0.82~2.06 μ m 범위의 입도크기의 chitin-PAS 및 chitosan-PAS microsphere를 각각 96.4~97.5%, 94.3~95.0%의 수율로 얻었다.

2. pH 4.0에서 고분자/PAS 무게 비율을 1/10으로 하여 제조된 chitin-PAS microsphere는 pH 1.2에서 10%, pH 6.8에서는 40% 정도의 PAS가 용출되었고 chitosan-PAS microsphere는 pH 1.2에서 25%, pH 6.8에서는 거의 100%가 용출되었으며, chitin-PAS microsphere가 pH 1.2인 용액에서 PAS의 용출지연효과가 가장 좋았다.

3. 고분자/PAS의 무게 비율이 1/20~1/5인 범위에서 고분자물질의 무게 비율의 증가에 따라 pH 1.2에서는 용출율이 큰 차이가 없었으나, pH 6.8에서는 용출율이 3배 이상으로 증가되었으며 시간에 따라 용출율이 증가되는 현상을 보여주었다.

참 고 문 헌

- 1) W.M. Hos, S. Miyazari and M. Takeda, *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 3986(1985).
- 2) Y. Sawayanagi, N. Nambu and T. Nagai *Chem. Pharm. Bull.*, **30(7)**, 2057(1983).
- 3) Y. Kawashima, S.Y. Lim, A.K.T. Handa and H. Takenada, *Chem. Pharm. Bull.*, **33(5)**, 2107(1985).
- 4) R.A.A Muzzalelli, F. Tanfani and M. Emanuelli, *Carbohydr. Res.*, **126**, 225(1984).
- 5) R.J. Wistler and M. Kosik, *Arch. Biochem. Biophys.*, **142**, 106(1971).
- 6) W.A. Bough, *Food Product Development*, **11**, 90(1977).
- 7) R. Bloch and M.M. Burger, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **58**, 13(1974).
- 8) L.A. Buttington and E.S. Sterven, *J. Am. Chem. Soc.*, **101**, 5159(1979).
- 9) S.J. Wisniewski and S.W. Kim, *J. Membr. Sci.*, **6**, 299(1980).
- 10) Y. Sawayamagi, N. Nambu and T. Nagai, *Chem. Pharm. Bull.*, **31(6)**, 2064(1963).
- 11) I.B. Koh, S.C. Shin and Y.B. Lee, *J. Kor. Pharm. Bull.*, **16(1)**, 36(1986).
- 12) Y. Kawashima, T. Handa, A. Kasai, H. Takenaka and S.Y. Lim, *Chem. Pharm. Bull.*, **33(6)**, 2469.
- 13) W.M. Hou, S. Miyajaki, M. Takada and T. Komai, *Chem. Pharm. Bull.*, **33(6)**, 3986(1985).
- 14) K.H. Kim, K.S. Kim, J.S. Lim, J.S. Shin and K.H. Chung, *Polymer(Korea)*, **12(1)**, 56(1986).