

Chitosan-g-Poly(4-vinyl pyridine) 공중합체막을 통한 인슐린의 투과 특성

김 공 수 · 강 석 호 · 김 수 종 · 임 정 규*

충북대학교 공과대학 공업화학과

*(주)럭키 생활용품연구소

(1994년 1월 17일 접수, 1994년 5월 17일 채택)

Permeation Properties of Insulin through Chitosan-g-Poly(4-vinyl pyridine) Membrane

Kong Soo Kim, Seog Ho Kang, Soo Jong Kim, and Jeong Kyu Lim*

Dept. of Industrial and Eng. Chem., Chungbuk Nat'l Univ., Cheongju 360-763, Korea

*Lucky Ltd. Household Goods Res. Inst., Cheongju 360-290, Korea

(Received January 17, 1994, Accepted May 17, 1994)

요 약: Chitosan-g-Poly(4-vinyl pyridine)공중합체막을 제조하였으며 Chitosan-g-Poly(4-vinyl pyridine)공중합체막과 아크릴아마이드를 사용하여 glucose oxidase를 포함하는 chitosan/acrylamide 복합막을 제조하였다. Chitosan-g-poly(4-vinyl pyridine)공중합체막의 함수율과 인슐린의 투과량은 용액의 pH가 감소함에 따라 증가하였고, 복합막의 인슐린 투과량은 글루코오스의 농도가 증가할수록 증가하였다.

Abstract: Chitosan-g-poly(4-vinyl pyridine)membranes were prepared by crosslinking reaction using glutaraldehyde and glucose oxidase immobilized chitosan/acrylamide composite membranes were fabricated by chitosan-g-poly(4-vinyl pyridine) copolymer and acrylamide. Water content and permeability of insulin through chitosan-g-poly(4-vinyl pyridine)membranes increased with decreasing the pH of the medium. Permeability of insulin through chitosan/acrylamide composite membranes increased with increasing the concentration of glucose.

1. 서 론

고분자 물질을 사용하여 체내에서 약물의 방출속도를 조절하려는 약물전달시스템에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다[1-6]. 단백질과 같은 분자량이 큰 물질은 고분자물질이 충분히 팽윤된 뒤에도 대부분의 고분자물질을 통과하기에는 어렵고 매우 느리게 확산될 것이라고 생각되었다. 그러므로 수년 동안 약물방출시스템에 대해서는 단지 저분자량

(<600)의 약물에 대해서만 많은 연구[2, 7]가 되어왔다.

인슐린의 조절된 방출은 당뇨병환자 치료에 있어서도 중요한 요인으로 간주되었고 이 분야에 있어서도 최근에 많은 연구[8, 9]가 보고되고 있으며, poly(hydroxy methacrylate), poly(acrylamide) 및 poly(vinyl alcohol)과 같은 hydrogel들이 인슐린의 방출을 조절하기 위한 고분자재료로 많이 연구되고 있다 [10, 11]. Glucose oxidase를 사용하여 글루코오스

를 gluconic acid로 변화시킴으로써 혈액내의 글루코오스 변화에 따라 투여되는 인슐린의 양을 조절할 수 있다는 사실은 Brownlee와 Cerami[1], Heller [2] 등에 의하여 증명되었고, Kim[3-5], Horbett [6]와 Ishihara[10] 등에 의해서도 연구되었다.

당뇨병 치료를 위한 이상적인 인슐린의 투여방법은 혈액내의 글루코오스의 농도변화에 따라 필요한 양만큼의 인슐린을 투여하여야 한다. 이러한 시스템은 글루코오스 농도와 인슐린의 방출속도 사이에 연속적인 자동제어 기능이 요구되는데, 최근에 Kim [3-5] 등은 이러한 전달시스템에 대하여 보고하였다. 그러나 현재 당뇨병 치료에 유용하게 사용되고 있는 인체에 직접 인슐린을 주사하는 방법[11]은 혈액내의 글루코오스 농도에 심한 변화를 발생시켜 그로인한 합병증을 유발하고 혈액내의 글루코오스 농도 변화에 따라 적절한 양의 인슐린을 투여하지 못한다는 단점이 있다.

양친매성 고분자막을 통한 인슐린의 투과속도는 막의 팽윤도에 의하여 조절될 수 있다고 보고되었으며[12], 글루코오스 농도의 변화에 따라 인슐린의 투과를 조절할 수 있는 고분자막의 제조에 관한 연구[10-13]도 많이 보고된 바 있다. 이러한 고분자막들은 glucose oxidase가 고정화된 막과 nicotinamide를 가지고 있는 redox 고분자 또는 3차 아민기를 가지고 있는 고분자 전해질로 이루어져 있다. 일반적으로 3차 아민기를 가지고 있는 고분자는 매개물의 pH가 낮아짐에 따라 3차 아민기가 양성자화되고 고분자의 친수성이 증가된다고 알려져 있다.

본 연구의 목적은 pH 변화에 가역적이고 외부의 글루코오스 농도에 의존하면서 인슐린을 방출할 수 있는 고분자막을 개발하는데 있으며, 기존에 제시된 연구 보고를 바탕으로 당뇨병 치료에 사용되는 인슐린의 투여 방법을 개선하려는 데 있다. 체내에서 독성이 적고 생분해성이 좋은 chitosan과 분자구조에 3차 아민기를 가지고 있는 4-vinylpyridine(4-VP)을 사용하여 합성된 chitosan-g-poly(4-VP)공중합체를 이용하여 막을 제조하고, 또한 이 공중합체막과 acrylamide를 사용하여 만든 chitosan/acrylamide 복합막을 제조하여 pH 변화와 용액내의 글루코오스 농도에 따른 인슐린의 투과 특성을 연구하였다.

2. 실험

2.1. 시약

Acrylamide(Hayashi제), N, N'-methylene bis acrylamide(Aldrich제), N, N, N', N'-tetramethylethylene diamine(TCI제) 및 ammonium persulfate는 각각 1급 시약을 구입하여 사용하였고, 인슐린은 녹십자제약의 Protaphane Beef(100IU/ml)를 사용하였으며, glucose oxidase(Sigma제, Type II Aspergillus niger), 글루코오스(Fluka제) 및 글루탈알데히드(Waco제)를 사용하였다.

Chitosan-g-poly(4-VP)공중합체는 이전에 보고한 방법[14]으로 합성하여 사용하였으며, 인슐린의 투과실험에는 그래프트율이 35%인 공중합체를 선택하여 사용하였다.

2.2. Chitosan-g-Poly(4-VP) 공중합체막의 제조

그래프트율이 35%인 chitosan-g-poly(4-VP)공중합체 0.12g을 2.5 wt.%의 초산용액에 충분히 팽윤시켜 가교제로서 글루탈알데히드를 각각 5mol%, 10mol%, 15mol%씩 가한 다음, 가교제가 들어있는 용액을 유리판 위에 붓고 약 50°C로 유지된 진공오븐에서 24시간 건조시켜 Chitosan-g-poly(4-VP)공중합체막을 얻었다. 그리고 미반응의 글루탈알데히드를 제거하기 위하여 증류수로 여러 번 세척하고 증류수에 보관하여 실험에 사용하였다.

2.3. Chitosan/Acrylamide 복합막의 제조

Acrylamide 0.2g, N, N'-methylene bis acrylamide 22mg, N, N, N', N'-tetramethylethylene diamine 0.06ml을 증류수 2ml에 녹인 후, glucose oxidase 10mg을 넣고 완전히 녹을 때까지 교반하였다. 여기에 증류수에 녹인 ammonium persulfate 2ml(100mg/20ml)을 첨가하고 약 3분 동안 교반하였다. 이 용액을 실리콘 고무링이 장치된 유리판 위에 붓고 acrylamide 겔이 형성될 때 앞에서 제조한 chitosan-g-poly(4-VP)공중합체막을 acrylamide 겔의 중심에 올려 놓고 균일한 상태로 유지하였다. 그리고 상온에서 3일 동안 redox 중합하여 glucose oxidase를 포함하면서 한쪽은 chitosan막이고 다른 한쪽은 acrylamide막으로 된 복합막을 제조하였다.

2.4. 함수율 측정

Chitosan-g-poly(4-VP) 공중합체막을 각각 다른 pH의 완충용액에 침적시켜 평형에 도달한 후, 막 표면의 물기를 거름종이로 제거하고 습윤상태에서 무게를 측정하였다. 이 막을 다시 진공오븐에서 일정

한 무게로 될 때까지 건조시킨 다음 아래의 식을 사용하여 함수율을 구하였다.

$$\text{Water content (\%)} = \frac{\text{wt. of swollen membrane} - \text{wt. of dry membrane}}{\text{wt. of dry membrane}} \times 100$$

2. 5. Chitosan-g-Poly(4-VP) 공중합체막의 인슐린 투과 특성

Chitosan-g-poly(4-VP) 공중합체막을 일정한 pH의 완충용액에 충분히 팽윤시킨 다음 실리콘 고무로 packing시켜 Fig. 1의 투과실험 장치에 부착시켰다.

투과장치의 한쪽 방에 pH가 일정한 100ml의 완충용액을 넣고, 다른 한쪽 방에는 인슐린 11.35mg을 완충용액 100ml에 녹인 용액을 넣었으며 농도의 분극이나 boundary resistance를 방지하기 위하여 자석식 교반기를 사용하여 교반하였다. 이때 반응온도는 37°C를 유지하였다. 그리고 일정 시간마다 투과한 시료용액을 각각의 pH 용액에서 3ml씩 취해서 UV 분광광도계를 사용하여 인슐린을 정량하였다. 또한 시간에 따른 농도 변화량을 측정하고 다음식을 사용하여 공중합체막의 투과계수(P)를 구하였다. [15]

$$P = \frac{-d}{A \left(\frac{1}{V_1} + \frac{1}{V_2} \right)} \ln \left[\left(1 + \frac{V_1}{V_2} \right) \frac{C_1}{C_0} \frac{V_1}{V_2} \right]$$

V_1, V_2 : 각 셀(cell)의 부피(cm^3)

C_1 : t초 후의 진한 용액의 농도

C_0 : 초기농도

d : 막의 두께(cm)

A : 막의 투과면적(cm^2)

2. 5. Chitosan/Acrylamide 복합막의 인슐린 투과 특성

Chitosan/Acrylamide 복합막을 Fig. 1의 투과실험 장치에 앞서와 같은 방법으로 부착시키고 한쪽 방에는 pH 7.0의 인산염 완충용액을 넣고, 다른 한쪽 방에는 pH 7.0로 조절된 완충용액 100ml에 11.35mg의 인슐린을 녹인 용액을 넣는다. 그리고 복합막 내에 glucose oxidase가 고정된 쪽에 글루코오스를 10mg 첨가한 후, 일정 시간마다 투과한 시료용액을 3ml씩 취하여 글루코오스의 농도 변화에 따른 인슐린의 투과량을 UV 분광광도계를 사용하여 정량하였다.

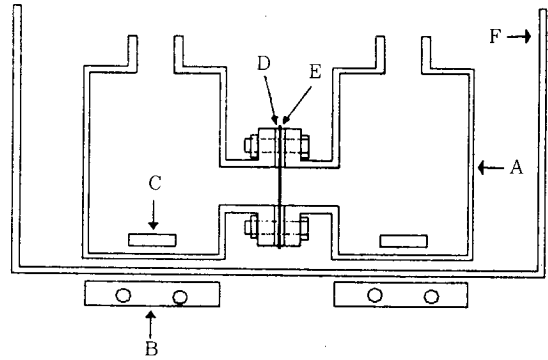


Fig. 1. Apparatus for insulin permeability measurement.

- (A) glass compartment (B) magnetic stirrer
(C) magnetic bar (D) silicone rubber
(E) membrane (F) water bath

3. 결과 및 고찰

그라프트율이 10%, 15%, 35% 및 78%인 chitosan-g-poly(4-VP) 공중합체를 각각 5% 글루탈알데히드로 가교시킨 다음 pH의 변화에 따른 함수율을 측정하였다[14]. Chitosan-g-poly(4-VP) 공중합체막의 그라프트율에 따른 함수율을 측정된 결과는 Fig. 2에 나타내었다.

그라프트율이 증가할수록 또한 pH가 낮아질수록 함수율이 증가하였는데, 이러한 결과는 그라프트율이 증가할수록 공중합체에 치환된 3차 아민기가 많아지고 이러한 아민기가 용액의 pH가 낮아질수록 양성자화되어 친수성이 증가하기 때문이라고 생각된다.

또한 chitosan-g-poly(4-VP) 공중합체막의 가교제의 양에 따른 함수율을 측정된 결과는 Fig. 3에 나타내었다. 그라프트율이 35%인 chitosan-g-poly(4-VP) 공중합체를 각각 5mol%, 10mol%, 15mol%의 글루탈알데히드 용액으로 가교시킨 후, pH의 변화에 따라 함수율을 측정된 결과 가교제의 양이 많을수록 공중합체의 가교도가 증가되기 때문에 팽윤도가 상대적으로 떨어지게 되어 함수율이 낮아졌다. 특히 pH 4~6 범위에서는 함수율의 변화가 크고 pH 4 이하, pH 6 이상에서는 함수율의 변화가 거의 없었다.

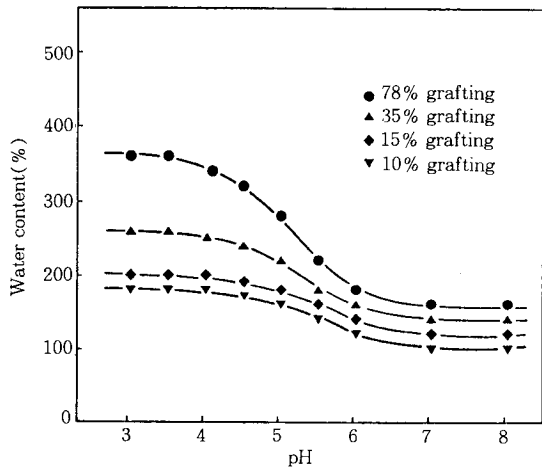


Fig. 2. pH dependence of water content of chitosan-g-poly(4-VP).

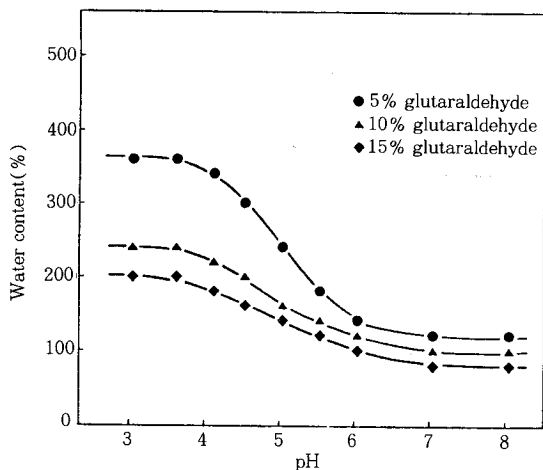


Fig. 3. pH dependence of water content of chitosan-g-poly(4-VP).

Fig. 4는 그래프트율이 35%인 chitosan-g-poly(4-VP) 공중합체막의 pH의 변화에 따른 흡수율을 측정된 결과이다. 이 실험은 공중합체를 pH 4의 완충용액 속에서 swelling시킨 다음 다시 pH 7의 완충용액에 옮겨 deswelling 시키는 조작을 반복하였다.

Fig. 4에서 보면 pH변화에 따라 흡수율이 가역적으로 변하는 것을 관찰할 수 있는데, 이러한 결과는 pH 4에서는 chitosan의 아민기와 공중합체에 치환된 3차 아민기가 protonation되어 친수성이 증가하다가 pH 7에서는 다시 deprotonation이 일어나서

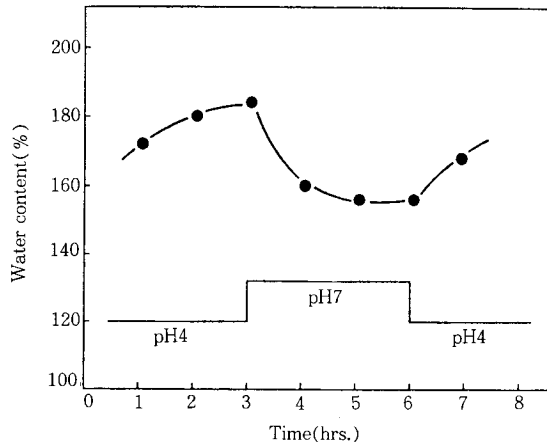


Fig. 4. Swelling dynamics chitosan-g-poly(4-VP) membrane.

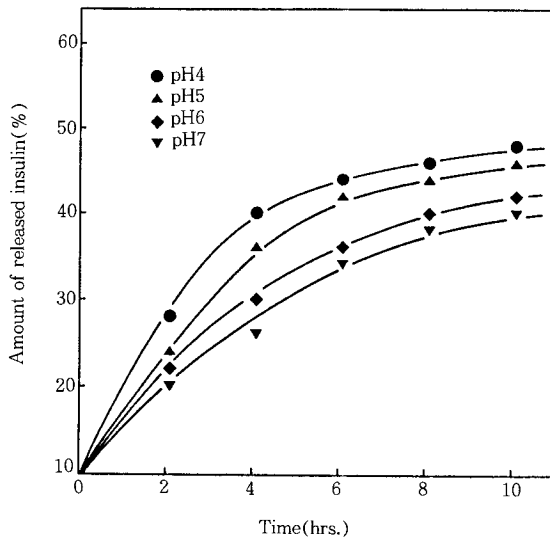


Fig. 5. Release profiles of insulin through chitosan-g-poly(4-VP) membrane.

친수성이 감소하였기 때문이라고 생각된다.

pH변화에 따른 인슐린의 투과율을 Fig. 5에 나타내었다. pH가 4~5에서 인슐린의 투과율이 커지는 것을 알 수 있었고, 방출 초기부터 약 4시간까지는 투과율이 급격히 증가하는 burst effect를 관찰할 수 있었으며 그 이후에는 방출되는 시간에 따라 완만하게 증가하는 경향을 나타냈다. 또한 pH 6~7에서는 pH 4~5에서보다 인슐린의 투과율이 작았는데, 이것은 용액의 pH가 낮은 경우에는 chitosan의 친수성이

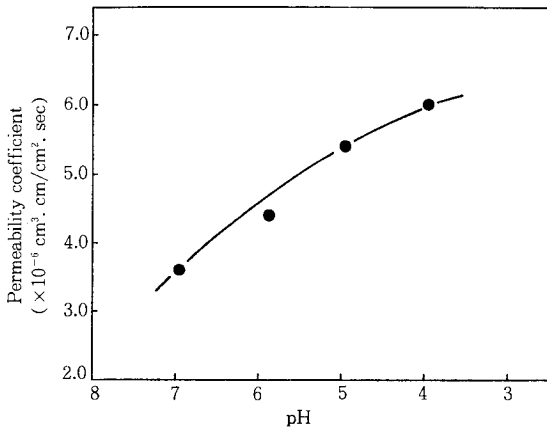


Fig. 6. Effect of pH on the permeation of insulin through chitosan-g-poly(4-VP) membrane.

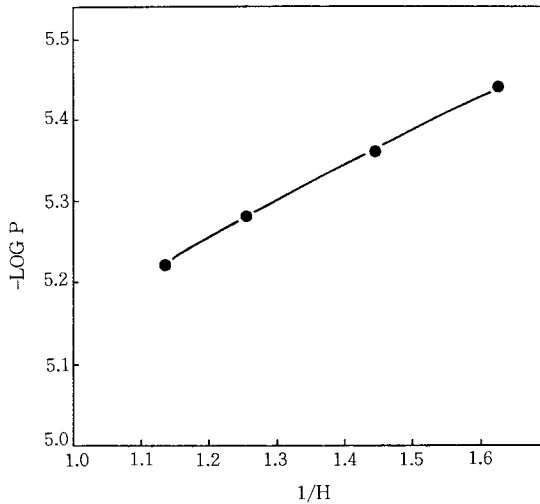


Fig. 7. Relation between permeation coefficient and water content.

증가하고, 막내의 free water 영역이 커짐에 따라 함수율도 증가하기 때문으로 해석할 수 있다.

pH의 변화에 따른 인슐린의 투과계수를 Fig. 6에 나타내었고, 공중합체막의 함수율(H)과 막 투과계수(P)의 관계를 Fig. 7에 나타내었다. 용액의 pH가 낮아질수록 투과계수가 급격히 증대되었는데, 이와 같은 결과도 용액의 pH가 낮아질수록 공중합체의 친수성의 증가에 기인하는 것이다.

Yasuda 등[16]은 고분자 사슬 사이에 상호작용이 생기지 않고, 팽윤된 고분자막 내에 있는 free water

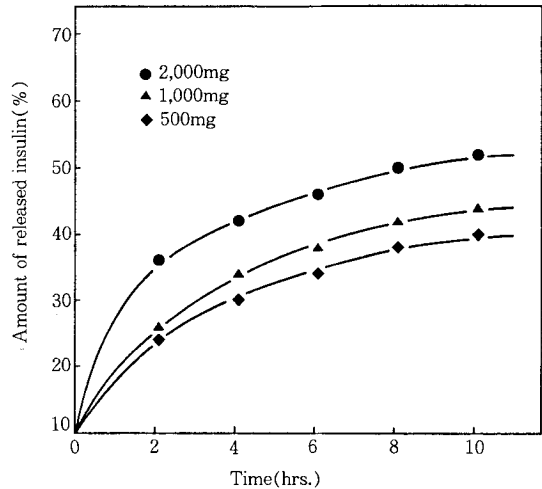


Fig. 8. Release profiles of insulin through chitosan/acrylamide composite membrane.

영역을 통하여 용질이 투과된다면 막 투과계수의 logarithm과 함수율의 역수(1/H)는 선형관계가 성립한다는 결과를 제시하였는데, 본 실험에 사용한 공중합체막도 이들의 결과와 잘 일치하고 있음을 보여주고 있다.

이러한 이론을 기초로 하면, 실험에 사용한 공중합체막을 통하여 투과되는 인슐린은 공중합체막과 상호작용없이 막내에 형성되는 free water영역을 통하여 투과된다는 것을 알 수 있었고, 공중합체막의 함수율을 조절함으로써 인슐린의 방출량을 적당히 조절할 수 있을 것으로 생각된다.

용액의 글루코오스 농도를 변화시켰을 때 복합막의 인슐린의 투과율을 Fig. 8에 나타내었다. 글루코오스의 농도가 증가함에 따라 방출되는 인슐린의 양은 증가하였는데, 이러한 결과는 glucose oxidase와 글루코오스 사이의 효소반응에 의해 첨가된 글루코오스가 글루콘산으로 전환되어 용액의 pH가 낮아지는데 기인한다. 용액내의 pH가 낮아짐에 따라 막내의 함수율이 증가하고 방출되는 인슐린의 양이 증가하였다.

이와같이 glucose oxidase를 포함하고 있는 복합막은 글루코오스 농도에 따라 인슐린의 방출량을 조절함으로써 혈액 내의 글루코오스의 농도변화에 따라 인슐린의 양을 제어할 수 있는 약물전달시스템으로서의 응용성이 기대된다.

4. 결 론

Chitosan에 4-vinyl pyridine을 그래프트시킨 chitosan-g-poly(4-VP) 공중합체막과 glucose oxidase를 고정화시킨 chitosan/acrylamide 복합막을 사용하여 인슐린 방출 특성을 실험한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Chitosan-g-poly(4-VP) 공중합체의 그래프트율이 증가할수록 함수율이 증대되었으며, pH 4~6범위에서 급격한 함수율의 변화가 일어났다. 또한 pH의 변화에 따라 가역적으로 변화였다.

2. 인슐린의 투과율은 pH 변화에 따른 공중합체막의 함수율과 밀접한 관계가 있으며, 막내의 free water영역을 통하여 투과된다는 것을 알 수 있었다.

3. Glucose oxidase를 포함하고 있는 chitosan/acrylamide 복합막의 인슐린 방출량은 용액 내의 글루코오스 농도에 따라 조절될 수 있다.

참고문헌

1. J. Heller, *J. Controlled*, **8**, 111(1985)
2. M. Brownlee and A. Cerami, *Science*, **206**, 1190 (1979)
3. S. Sato, Y. Jeong, J. C. McRea, and S.W. Kim, *Pure Appl. Chem.*, **56**, 1323(1984)
4. S. Y. Jeong, S. W. Kim, M. J. D. Eenink, and J. Feijin, *J. Controlled Release*, **1**, 57(1984)
5. S. Sato, Y. Jeong, J. C. McRea, and S. W. Kim, *J. Controlled Release*, **1**, 57(1984)
6. J. Kost, T. A. Horbett, B. D. Ranter, and M. Sigh, *J. Biomed. Mater. Res.*, **19**, 1117(1984)
7. R. Langer, *Science*, **249**, 1527(1990)
8. J. H. Kim, J. Y. Kim, Y. M. Lee, and K. Y. Kim, *J. Appl. Polym. Sci.*, **44**, 1823(1992)
9. T. Chandy and C. P. Sharma, *J. Appl. Polym. Sci.*, **46**, 1159(1992)
10. K. Ishihara, M. Kobayashi, N. Ishimaru, and I. Shinohara, *Polym. J.*, **16**, 625(1984)
11. J. L. Chiasson and F. Ducros, *Diabetes Care*, **7**, 331(1984)
12. K. Ishihara, M. Kobayashi, and I. Shinohara, *Polym. J.*, **16**, 647 (1984)
13. R. Langer, *Chem. Eng. Commun.*, **6**, 1(1990)
14. K. S. Kim, J. K. Lim, S. H. Cho, and S. J. Kim, *Polymer(Korea)* **17**, 222(1993)
15. C. Y. Sung and M. S. Jun, *J. Appl. Polym. Sci.*, **27**, 3133(1982)
16. H. Yasuda, C. E. Lamaze, and L. O. Ikenberry, *Makromol. Chem.*, **118**, 19(1968)