

생분해성 고분자로의 물의 유입속도 측정

박은석[†] · 지상철

성균관대학교 약학대학
(1995년 7월 20일 접수)

Determination of the Water Uptake Rate into Biodegradable Polymer

Eun-Seok Park[†] and Sang-Cheol Chi

College of Pharmacy, Sung Kyun Kwan University

(Received July 20, 1995)

A new method to study water uptake into biodegradable polymer was developed. Polymer was gently mixed with the tritiated buffer and the radioactivity level of the polymer due to water uptake was measured by liquid scintillation counting. The rate of water uptake was estimated from the plot of the amount of water in the device as a function of time. The technique used in this study is particularly useful for estimating water uptake of biodegradable polymers which were difficult to study by other techniques such as weight gain used for hydrogel.

Keywords—Water uptake, Liquid scintillation counting, Biodegradable polymer

생분해성 고분자는 생체에서 분해되어 소실되는 특징 때문에 최근 implantable 제형의 개발 및 연구에 종사하는 많은 사람들로부터 관심의 대상이 되어 왔다.¹⁻³⁾ 이들을 이용한 매트릭스 형태의 implantable 제형으로부터의 약물의 방출 양상은 주로 체액 및 효소에 의한 고분자의 분해와 고분자내로 유입된 체액에 대한 대상 약물의 용출 및 약물의 고분자에서의 확산운동을 규명함으로써 예측이 가능하다. 특히, 생분해성 고분자의 내부로 유입된 체액은 loading된 약물 및 고분자의 용해 또는 분해를 가속화시키고, 고분자 device에 공극 및 채널을 형성시켜 약물의 확산운동 등을 변화시킬 수 있으므로 체액의 유입속도(uptake rate)는 대상 고분자로 제조한 약물의 방출 양상을 예측하는데 중요한 인자로 인식되어 왔다.^{4,5)} 체액의 유입속도는 보통 *in vitro*에서 물의 고분자내로의 유입속도를 통하여 평가할 수 있는데 이의 정량을 위하여 일정한 부피 및 표면적을 갖는 고분자 device를 제조하여 이를 일정 시간 물에 soaking시킨 후 유입된 물에 의하여 늘어난 device의 무게로부터 이를 평가하는 방법이 이용되어 왔다.^{6,7)}

하지만 이 방법은 고분자의 미세한 중량변화를 감지

하는데 어려움이 있고 또한 생분해성 고분자인 경우에는 고분자 자체 분해에 기인한 중량의 감소 때문에 사용할 수가 없는 단점이 있다. 또 다른 방법은 염료가 함유된 물에 고분자 device를 soaking시킨 후 유입된 염료의 정량을 통하여 고분자내의 물의 양을 간접적으로 정량하는 방법이 있으나⁸⁾ 이 방법은 사용한 염료와 고분자간의 상호작용의 가능성이 있으며 또한 고분자 표면에 흡착되는 염료를 효과적으로 제거할 수 없는 경우에 순수하게 고분자내로 유입된 물의 양을 정확히 정량 하는데 어려움을 유발할 수 있다.

본 연구의 목적은 생분해성 고분자내로의 물의 유입속도를 효과적으로 평가할 수 있는 새로운 방법을 개발하여 이로 제조한 매트릭스 형태의 implantable 제형으로부터의 약물 방출의 기전 규명에 도움을 주고자 하는 것이다.

실험방법

시약

지방산 dimer(fatty acid dimer, 이하 FAD라 함)와 세바신산(sebacic acid, 이하 SA라 함)의 공중합체

[†]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

인 Poly(FAD:SA)(50:50 w/w, 이하 PFS라 함)는 미국의 Nova Pharmaceutical Corp.(Baltimore, MD, USA)으로부터 제공받았으며, tritiated water(100 mCi/ml)는 ICN Biochemicals에서 구입하여 방사능 함유 완충액의 제조에 사용하였다. Tetrahydrofuran과 scintillation cocktail인 Scintiverse LC[®]는 Fisher Scientific Co.에서 구입하여 사용하였다. 완충액 제조를 위한 초순수는 실험실에서 역삼투수를 정제하고 여과하여 사용하였으며 기타 시약은 특급 시약을 사용하였다.

기기 및 장치

pH 측정기(Orion Research Digital pH/millivoltmeter model 611), Orbital shaker(Lab-Line) 및 liquid scintillation system(Beckman, Model LS 8100)을 사용하였다.

방사능 함유 완충액의 제조

1 $\mu\text{Ci/ml}$ 의 tritium을 함유하는 pH 1-9의 완충액은 100 mCi/ml tritium water를 미리 준비한 0.1 N 염산액(pH 1.0) 및 0.1 M 인산염 완충액(pH 3.0, 5.0, 7.4 및 9.0)을 사용하여 순차적으로 희석하여 각각 500 ml씩 제조하였다. 제조한 최종 완충액의 방사능 값을 liquid scintillation counter를 사용하여 측정하여 이의 제조가 적절하게 시행되었음을 확인하였다.

원판형 고분자 Device의 제조

일정한 부피 및 표면적을 갖는 원판형 고분자 device는 melt casting technique을 이용하여 다음의 방법으로 제조하였다: 고분자를 테프론 처리된 유리판에서 hot plate를 사용하여 63°C에서 녹인 후 이 용융된 고분자를 0.1 cm 두께의 틀로 둘러싸고 다른 테프론 처리된 유리판으로 덮은 후 2 kg 무게로 두 유리판을 압착하면서 온도를 자연 상태에서 실온으로 떨어뜨려 내부의 용융되었던 고분자를 고형화시키고 형성된 고분자 필름을 원형으로 잘라내었다. 각 batch의 device의 무게, 반경 및 두께를 마이크로메타를 사용하여 측정하였으며 이들의 평균값(\pm 표준편차)은 각각 28.67(\pm 0.22) mg, 0.41(\pm 0.004) cm, 0.10(\pm 0.003) cm ($n=10$)이었으며 device의 평균 부피 및 표면적은 각각 0.053 cm³ 및 1.314 cm²이었다.

고분자 Device로 유입된 물의 정량

모든 실험은 실온(22~25°C)중 pH 1, 3, 5, 7.4 및 9 완충액에서 실행하였다. 먼저 각각의 고분자 device를 방사능 값이 1 $\mu\text{Ci/ml}$ 인 완충액 20 ml을 함유하고 있는 바이알에 넣었다. 이 바이알들은 진탕기를 사용하여

100 rpm으로 전 실험과정 중 진탕하였다. Device는 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 및 7일 후에 각각의 바이알로부터 제거한 후 흡착지를 사용하여 표면에 흡착된 완충액을 제거하였고 건조된 device는 1 ml의 tetrahydrofuran을 가지고 sonication시켜 완전히 녹였다.

이렇게 얻어진 투명한 액에 scintillation cocktail을 가하여 vortex mixer로 혼합한 후 이 용액의 방사능 값을 liquid scintillation counter를 사용하여 측정하였다.

측정된 방사능 값은 tritium 표준액을 사용하여 작성한 quench correction curve를 이용하여 보정한 후 1 $\mu\text{Ci}=2.2 \times 10^6$ 의 관계식과 기지의 완충액의 방사능 값(1 $\mu\text{Ci/ml}$)으로부터 device로 유입된 물의 양으로 환산하였다. Tritium이 함유된 완충액들과 tritium이 함유되어 있지 않은 완충액들을 각각 바이알에 취하여 대조 시료로 사용하였다. 각각의 pH에서의 모든 실험은 3회씩 실시하였다.

Quench Correction Curve의 작성

Scintillation counter로 부터 얻어지는 데이터는 시료의 방사능 값과 sample matrix 등과 같은 시료의 물리적인 특성 및 사용 기기에서 기인되는 quenching이 관여되는 수치이기 때문에 이 수치에 관여된 quenching 정도에 대한 보정이 요구된다. 사용한 scintillation system은 시료의 quenching을 H number로 표시해 주는 program이 내장되어 quenching을 보정하기 위해서 이미 dpm 값 및 H number를 알고 있는 tritium 표준용액의 cpm 값을 측정하여 구한 counting efficiency, cpm/dpm와 H number간의 직선적인 관계식, 즉 counting efficiency=slope \times (H number)+(Y-intercept)를 이용하여 각 시료의 counting efficiency를 구한 후 이를 이용하여 시료의 cpm 값을 dpm 값으로 전환시켜 주었다.

Polymer Device로의 물의 유입속도 평가

각 pH 조건에서 고분자 device로 유입된 물의 양의 시간에 대한 관계로부터 물의 고분자 device로의 유입속도를 구하였다.

결과 및 고찰

Quench correction curve(Fig. 1)는 시료측정시 항상 새로 작성하여 사용하였는데 기울기와 절편의 값은 1%이내의 표준편차(절편 0.9%, 절편 0.45%, $n=6$)를 보여 높은 재현성을 보여주었다. 일반적으로 poly-anhydride는 불안정한 anhydride 결합이 쉽게 가

수분해되기 때문에 물이 이 고분자의 내부로 유입되는 속도에 비하여 고분자의 분해속도가 빨라 표면부식을 나타낸다고 알려져 있다.⁹⁾

하지만, 본 실험에 사용한 고분자인 PFS는 가수분해에 의하여 비교적 가용성인 SA가 유리되면 잔존하는 난용성 FAD가 아직 분해되지 않은 device 표면에 흡착되면서 공극과 채널이 분포된 다공층을 형성하여 완전한 표면부식을 나타내지 않음이 관찰되었다.¹⁰⁾ 생성된 다공층의 공극과 채널에는 일정량의 물이 채워지게 되며 이 양상은 SA가 완전히 유리되어 device가 난용성 FAD로만 형성되어 더 이상의 물의 흡수가 일어나지 않을 때까지 계속되며, 특별히 실온의 pH 9.0 인 산염 완충액 (0.1 M)에서 50%의 SA가 유리되는데 약 10일이 걸린다고 알려져 있다.^{10,11)}

이에 따라 본 실험은 SA의 고갈에 따라 다공층의 수분함유력이 포화되어 물의 자유로운 유입이 제한될 수 있는 실험상의 잘못을 배제하기 위하여 실온에서 초기 7일까지만 실시하였다. Fig. 2는 각 pH조건에서 device에 유입된 물의 양을 시간에 대해 플롯한 것으로서, 각 pH에서의 물의 유입은 zero-order kinetics에 의하여 잘 설명되고 있으며 초기 7일까지 유입되는 물의 양이 계속 증가하는 양상을 통하여 SA의 유리가 지속적으로 일어나 새로운 다공층이 형성되고 있다고 사료된다. 이 플롯으로부터 구한 각 pH에서의 물의 유입속도는 Table I에 나타내었는데 pH 7.4 및 pH 9.0에서 각각 3.95×10^{-4} 및 16.03×10^{-4} ml/day로 pH 1~5의 약 1.0×10^{-4} ml/day에 비하여 각각 4배 및 16배의 빠른

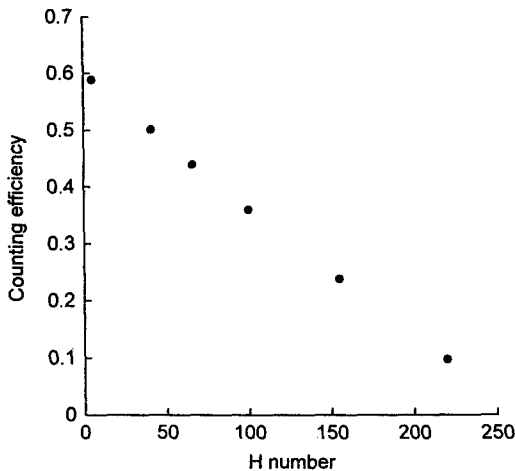


Figure 1—Quench correction curve obtained using tritium standards (n=6).

유입속도를 보여주고 있다. 이는 polyanhydride가 알칼리성 pH 조건에서 가수분해 산물인 diacid들이 이온화된 형태로 존재하기 때문에 산성 pH 조건에 비하여 더 빨리 분해가 된다는 사실과 일치되는 결과로서 물의 유입속도가 고분자의 가수분해 속도와 비례함을 보여주고 있다. 3회의 실험 결과는 최고 10% 미만의 표준편차를 나타내 매우 뛰어난 재현성을 보여줌으로써 방사능이 함유된 완충액을 이용한 고분자로의 물의 유입속도를 측정하는 이 방법이 유의성이 있음을 보여주고 있다. 본 실험에 사용한 고분자의 중량 감소가 너무 크기 때문에 기존의 중량변화 측정법으로는 상대적으로 미세한 수분 함유량 변화의 감지가 불가능하다고 사료되어 두 방법의 비교 실험을 통한 유의성 검증은 생략하였다.

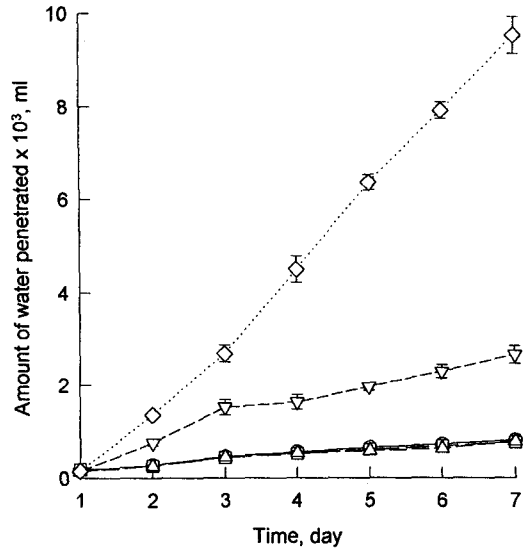


Figure 2—Water uptake profiles of polyanhydride disk shaped devices at various pH conditions at room temperature. Results are expressed as the mean±S.E. of three devices.

Key : ○; pH 1.0, □; pH 3.0, △; pH 5.0, ▽; pH 7.4, ◇; pH 9.0

Table I—Zero-order Water Uptake Rate Constants (k) of Disk Shaped Polyanhydride(PFS) Devices at Various pH Conditions at Room Temperature

pH	$10^4 \times k$ (ml/day)
1.0	1.08 ± 0.0056
3.0	0.96 ± 0.063
5.0	0.96 ± 0.036
7.4	3.95 ± 0.237

*Mean±S. D., n=3

감사의 말씀

본 연구를 위하여 PFS를 제공하여 주신 Dr. M. Maniar께 감사를 드립니다.

문헌

- 1) J. Heller, Polymers for controlled parenteral delivery of peptides and proteins, *Adv. Drug Del. Rev.*, **10**, 163-204 (1993).
- 2) A. Domb, A. Shimon, J. Shah and M. Maniar, Degradable polymers for site specific drug delivery, *Polym. Adv. Tech.*, **3**, 279-292 (1992).
- 3) D.H. Lewis, Controlled Release of Bioactive Agents from Lactide/Glycolide Polymers: In *Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems*, M. Chasin and R. Langer(Ed.), Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 1-41 (1990).
- 4) R. Baker, *Biodegradable Systems in Controlled Release of Biologically Active Agents*, John Wiley & Sons, New York, pp. 84-131 (1987).
- 5) R.S. Langer and N.A. Peppas, Present and future applications of biomaterials in controlled drug delivery systems, *Biomaterials*, **2**, 201-214 (1981).
- 6) K. Avgoustakis and J.R. Nixon, Biodegradable controlled release tablets: II. Preparation and properties of poly(lactide-co-glycolide) powders, *Int. J. Pharm.*, **99**, 239-246 (1993).
- 7) T.H. Nguyen, K.J. Himmelstein and T. Higuchi, Some equilibrium and kinetic aspects of water sorption in poly(orthoester)s, *Int. J. Pharm.*, **25**, 1-12 (1985).
- 8) C. Shih, T. Higuchi and K.J. Himmelstein, Drug delivery from catalysed erodible polymeric matrices of poly(orthoester)s, *Biomaterials*, **5**, 237-240 (1984).
- 9) M. Chasin, A. Domb, E. Ron, E. Mathiowitz, R. Langer, K. Leong, C. Laurencin, H. Brem and S. Grossnab, Polyanhydrides as Drug Delivery Systems: In *Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems*, M. Chasin and R. Langer(Ed.), Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 43-70 (1990).
- 10) E.-S. Park, Investigations into the mechanism of drug release from biodegradable polyanhydride devices, *Ph.D. Thesis*, Medical University of South Carolina (1994).
- 11) A. Domb and M. Maniar, Absorbable biopolymers derived from dimer fatty acids, *J. Polymer Sci.*, **31**, 1275-1285 (1993).