한국생물공학회지 제 10권 제 4호
Korean J. Biotechnol. Bioeng.
Vol. 10. No. 4. 461-467(1995)

Poly(DL-lactide)로 피막된 키토산 유도체 매트릭스에서의 약물방출

†차 월 석 · 나 재 운 · 이 동 병
조선대학교 공과대학 화학공학과

Drug Release by Poly(DL-lactide) Coated Chitosan Derivatives Matrices

Wol-Suk Cha†, Jae-Woon Na and Dong-Byung Lee
Department of Chemical Engineering, Chosun University, Kwangju 501-759, Korea

ABSTRACT

In this study, the release experiments of drug were operated in the phosphate buffer solutions of pH 7.4 and pH 1.2 by using drug carriers(chitosan, chitosan hydrochloride, and sulfonated chitosan)coated by poly(DL-lactide) with prednisolone for delivery drug. The release time of drug was more delayed in pH 7.4 than in pH 1.2. The release time of according to the kinds of drug carrier was delayed in the order of chitosan, sulfonated chitosan, and chitosan hydrochloride. In short, the formulation allows biodegradable coated monolithic polymeric matrices to suppress the burst effect of the drug release mechanism, which led to the sustained release pattern.

서 론

키틴[poly(1→4)-2-acetamido-2-deoxy-D-glucan]은 다당류의 일종으로 셀룰로오스 다음으로 풍부한 천연고분자이다(1). 그러나 가공성의 난점을 보이는 등 용해성과 화학적 성질상의 문제점으로 인해 대부분 폐기되어 왔으나 최근에 이르러 이러한 단점을 극복하는 한편 그 활용성을 높이기 위한 노력이 다각도로 연구되고 있다. 특히 키틴의 N-acetyl group을 탈아세틸화하여 amino group으로 치환된 키토산[poly β-(1→4)-2-amino-2-deoxy-D-glucan]은 용해성의 증가 및 기능성의 향상으로 식품공업, 의약 및 의료공업, 섬유, 농축산, 폐수처리 등에 이르기까지 연구 및 응용이 여러 각 분야에서 활발히 진행되고 있다(2-4).

† Corresponding Author

약물전달시스템(drug delivery system)에서 방출속도 제어불능의 경구투여 약물은 부작용 및 독성을 일으키는 과잉치료혈중농도(therapeutic plasma level)를 초래하며 급격한 약효의 하락은 치료를 더욱 어렵게 한다(5, 6). 이러한 문제들을 해결하는데 방출조절형 의약이 필요하게 되었고 키토산 유도체는 생체적합성, 생분해성, 무해성 등의 특성(7)을 지니고 있어 이 분야의 전망이 밝다고 할 수 있으며 최근 연구동향은 다음과 같다. Miyazaki 등(8)은 indomethacin과 papaverine hydrochloride로 키토산 granules를 만들어 방출 지속성 제제에 관한 연구를, Sawaynagi 등(9)은 키틴과 키토산을 manitol, lactose, potato starch 등과 혼합하여 tablet형 제제로서의 이용을 시도하였다. 저자 등(10, 11)은 키틴 및 키토산을 이용하여 경피흡수형 제제와 경구투여 제제인 tablet형 고분자 매트릭스를 제조하여 그 사용 가능성을 보고한 바 있다.

본 연구에서는 전보(11)의 결과를 토대로 하여 생체분해성 물질인 poly(DL-lactide)로 고분자 매트릭스 위에 피막을 형성하게 하는 새로운 약물전달시스템을 제시하였다. 이 제형의 목적은 높은 약물 방출속도를 유지하면서 급속한 약물의 방출속도 변화를 나타내는 문제점을 제거하기 위하여 피막을 입힌 키토산, 술폰화키토산 및 키토산·염을 고분자 매트릭스(coated monolithic polymeric matrix)로 이용하였으며, 모델약물로는 항류마티스 치료제인 prednisolone을 사용하였다. 따라서 고분자 매트릭스의 약물 방출 특성을 살펴 보기 위하여 인산염 완충용액(phosphate buffer solution ; 이하 PBS라 칭함)에서 생체분해성 고분자 피막이 약물의 방출거동에 미치는 영향과 pH를 변화시킨 약물의 방출거동을 비교 검토함으로서 지속적이고 조절된 제형으로서의 사용 가능성을 고찰하였다.

재료 및 방법

시약 및 기기

본 실험에서 사용한 시약은 chlorosulfonic acid (Aldrich Chem. Co.), dimethylformamide(Juncei Chem. Co.), poly(DL-lactide)(Polysciences Co.), dimethyl sulfoxide(Yakuri Pure Chem. Co.) 등이며, 모델 약물로는 prednisolone(Aldrich Chem. Co.)을 사용하였다. 기타의 시약들은 특급 또는 일급 시약을 사용하였다. 그리고 pyridine(Juncei Chem. Co.)은 KOH로 전 처리한 다음 나트륨 wire를 넣고 환류한 후 단순증류하여 사용하였다. 구조분석은 FT-IR spectrophotometer(Bruker IFS66)를, 방출된 약물농도분석는 UV spectrophotometer (Shimadzu UV-2101pc)를 사용하여 측정하였다.

키토산 유도체 합성

수산계 폐기물인 게, 새우 등으로부터 얻은 rude 키틴 물질을 Hackman 방법(12)에 의해 단리하여 순백색의 키틴을 제조하였으며 약물전달체로 사용된 키토산 유도체의 합성 경로는 Fig. 1에 나타내었다.

키토산 합성(13)

키틴 분말시료 40g을 47%－수산화나트륨 400ml 수용액으로 110℃에서 1시간 동안 탈아세틸화 반응을 한 후 증류수로 세척하였다. 이와 같은 과정을 3회 반복하여 탈아세틸화도를 높였다. 반응 후 증류수로 충분히 씻어 알칼리를 제거하고 무수에탄올, 무수에테르 등의 순서로 처리하여 80℃에서 진공건조(4mmHg)하였다. 수득율 : 73%, mp : 88° (dec).

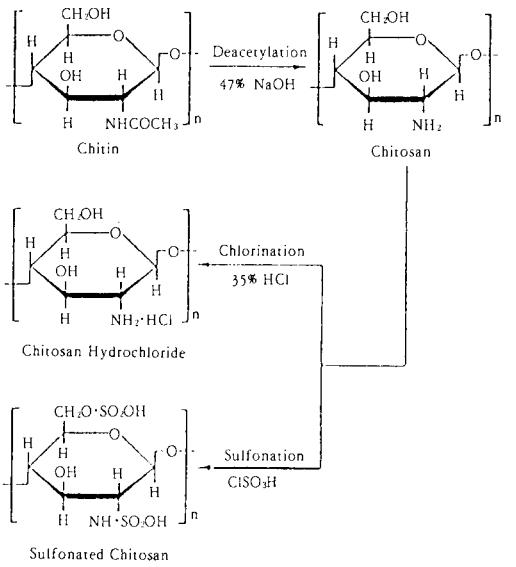

Fig. 1. Synthetic route of chitosan derivatives.

키토산·염 합성(14)

키토산 6g을 2%－초산 320ml에 용해시킨 후에 과량의 35%－염산 수용액을 가하여 키토산의 염산염을 석출시켜 여과한 후 여액중에 Cl-이온이 검출되지 않을 때까지 무수메탄올로 처리한 다음 진공건조(4mmHg)하였다. 수득율 : 82%, mp : 102° (dec).

술폰화키토산 합성(15)

피리딘 100ml와 클로로술폰산 16.8ml을 약 5℃에서 혼합시킨 용액에 피리딘 60ml에 키토산 10g을 분산시킨 고분자용액을 서서히 dropping funnel을 이용하여 적가한 후 95℃에서 90분 동안 환류 반응시켰다. 이 반응물을 증류수 400ml에 주가하여 얻은 rude products를 2.5N－수산화나트륨 수용액과 에탄올로 처리하였으며 셀룰로오스 투석 튜브(Sigma Co. 250-7U)에서 3일 동안 투석한 후에 무수에탄올 240ml로 처리하여 70℃에서 진공건조(4mmHg)하였다. 수득율 : 30%, mp : 95°(dec).

탈아세틸화도의 측정(16)

키토산을 0.7%－무수초산에 용해하여 만든 얇은

Table 1. Composition of coated monolithic matrices forming solution.

Drug carriers*(gr) I, II, III	Prednisolone(gr)	10% Acetic acid(ml)	Thickness(㎜)	
			Matrix	Coating
0.3	0.2	5.0	2.08±0.01	0.07±0.01
0.6	0.2	5.0	2.09±0.01	0.07±0.01
1.0	0.2	5.0	2.10±0.01	0.07±0.01

* Drug carriers; I : chitosan, II : chitosan hydrochloride, III : sulfonated chitosan

필름을 0.1N-수산화나트륨 수용액에 6시간 동안 담그었다가 증류수에 8일간 방치한 후 건조시켜 FT-IR spectrum으로 분석하고 1655㎝$^{-1}$의 amide I peak와 3450㎝$^{-1}$의 -OH 결합을 측정하여 탈아세틸화도를 다음 식(1)에 의거하여 구하였다.

$$\%N-acetyl=(A_{1655}/A_{3450})\times 100/1.33 \quad (1)$$

고분자 매트릭스의 제조

키토산, 술폰화키토산, 키토산·염의 약물전달체를 각각 10%-초산용액에 12시간 동안 팽윤시켜 prednisolone을 가하여 교반한 다음 이 고분자용액을 캐스팅하여 60℃에서 24시간 동안 건조하였다. 건조된 고분자 매트릭스의 반지름은 6.30㎜, 두께 2.09±0.01㎜였으며 그 조성은 Table 1과 같다.

고분자 매트릭스의 피막방법

피막 재질로는 poly(DL-lactide)를 사용하였다. Poly(DL-lactide)는 poly alanine의 유사물질로서 생체 내에서 효소의 작용에 영향을 거의 받지 않고 젖산(lactic acid)의 형태로 분해되는 무해한 생체분해성 고분자(17)이다. Poly(DL-lactide)를 약물이 분산된 고분자 매트릭스를 피막하기 위해서 dip coating 방법을 사용하였다. Poly(DL-lactide)를 클로로포름에 녹인 후 이 용액에 고분자 매트릭스를 매달아 클로로포름의 액면이 낮아짐에 따라 고분자 매트릭스 표면이 피막이 형성되도록 하였다. 피막용 고분자용액은 클로로포름 10ml에 poly(DL-lactide) 1g을 녹여 만들었으며 피막은 1분간에 3회 처리하였다. 이때 피막의 두께는 0.07±0.01㎜였다.

방출속도측정

Fig. 2와 같이 방출 실험장치를 한 후 37.0±0.5℃에서 pH 1.2와 pH 7.4의 PBS 1000ml에 대한 약물의 방출속도를 측정하였으며 교반속도는 100rpm (USP 용출시험규격)을 유지하였다. Sample 용액은 1회에 5ml씩 처음 1시간 동안은 10분마다, 그

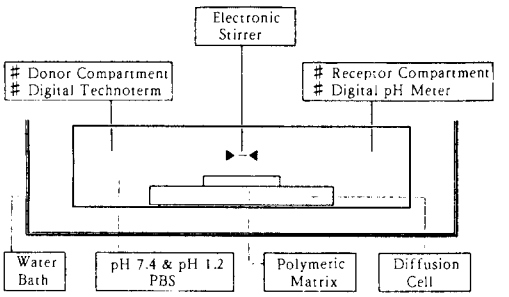

Fig. 2. Schematic diagram of the apparatus for determining release rate.

이후에는 1시간 간격으로 채취하여 약물의 농도를 측정하였으며 sample 용액을 꺼낸 직후에 동량의 PBS을 보충하였다. 방출된 약물의 농도는 파장 242nm에서 UV spectrophotometer를 사용하여 측정하였다.

결과 및 고찰

키토산 유도체들의 구조확인

수산계 폐기물인 게, 새우 등으로부터 Hackman 방법(12)에 의해 제조한 키틴을 탈아세틸화시켜 키토산을 합성하고 이로부터 술폰화키토산과 키토산·염을 합성하여 그 합성여부를 IR spectrum으로 확인하였다. Fig. 3과 4에 나타낸 바와 같이 키틴의 특성피크인 CH_3 wagging 흡수가 952㎝$^{-1}$에서, C=O 결합 stretching 흡수가 1655㎝$^{-1}$에서 나타났으나 키토산에서는 비교적 약하게 관측되었다. 키틴의 1550㎝$^{-1}$의 NH bending 흡수피크만 키토산의 1552㎝$^{-1}$에서 남아있어 키토산이 합성되었음을 확인할 수 있었으며 그리고 식(1)에 의해 산출한 탈아세틸화도는 84%였다. 탈아세틸화에 따른 C=O와 NH 결합 사이에 작용하는 수소결합력의 차이에 의해 키틴의 3250㎝$^{-1}$과 3090㎝$^{-1}$의 NH stretching

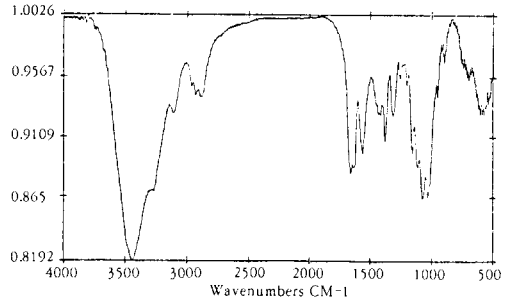

Fig. 3. FT-IR spectrum of chitin.

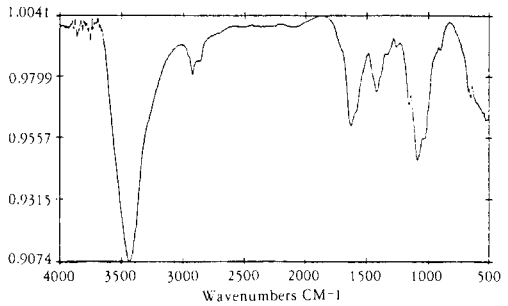

Fig. 4. FT-IR spectrum of chitosan.

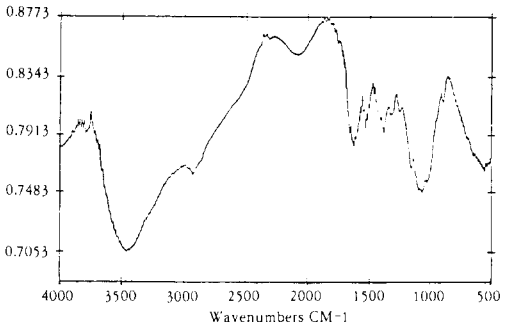

Fig. 5. FT-IR spectrum of chitosan hydrochloride.

에 의한 흡수피크가 키토산의 경우에는 매우 약하게 나타났다. 키토산으로부터 키토산·염을 합성한 IR spectrum(Fig. 5)에서 특성피크인 NH_3 흡수가 1527cm^{-1}에서 stretching, 2105cm^{-1}에서 broad하게 나타났다. 또한 술폰화키토산(Fig. 6)의 특성피크인 S=O 결합의 흡수가 1260cm^{-1}에서, C-O-S 결합의 흡수가 706cm^{-1}에서 나타난 것으로 보아 술폰화키토산이 합성되었음을 확인하였다.

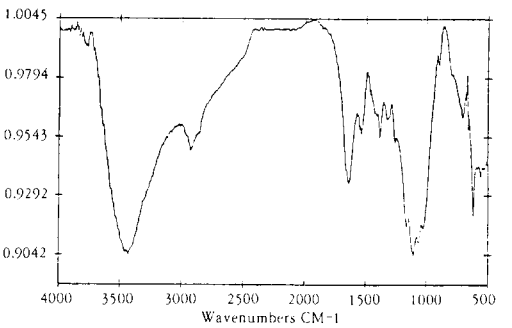

Fig. 6. FT-IR spectrum of sulfonated chitosan.

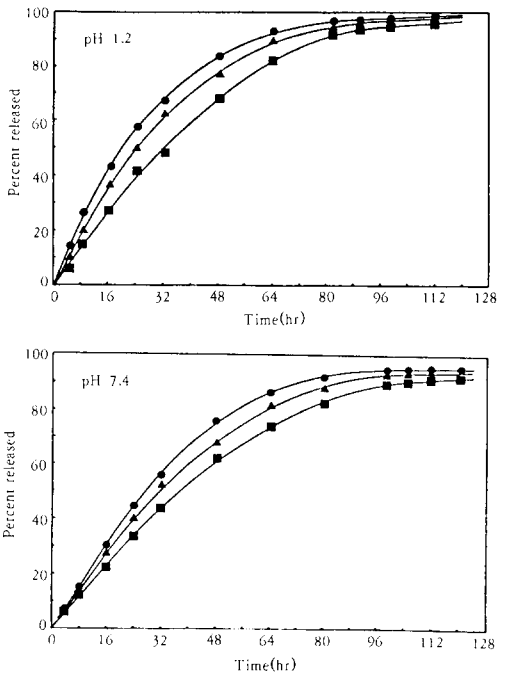

Fig. 7. Effects of chitosan on the dissolution of prednisolone(0.2g) from chitosan matrix coated by poly(DL-lactide) at pH 1.2 and pH 7.4:[chitosan;0.3g(●), 0.6g(▲), 1.0g(■)].

약물전달체가 약물 방출에 미치는 영향

방출실험에서 모델약물로 사용된 prednisolone의 함유량을 0.2g으로 동일하게 하고 약물 전달체의 함유량을 각각 0.3g, 0.6g 및 1.0g으로 변화시킨 (Table 1) 약물 방출거동은 다음과 같았다. Fig. 7은 키토산 약물전달체의 함유량 증가에 따른 지속적

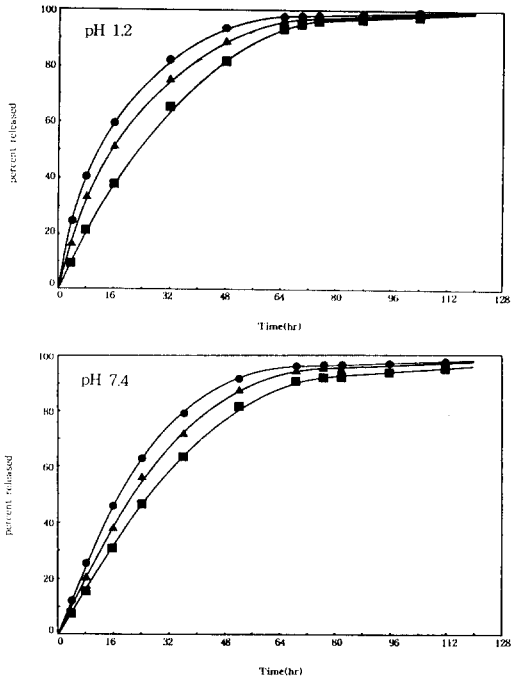

Fig. 8. Effects of chitosan hydrochloride on the dissolution of prednisolone(0.2g) from chitosan hydrochloride matrix coated by poly(DL-lactide) at pH 1.2 and pH 7.4: [chitosan hydrochloride; 0.3g(●), 0.6g(▲), 1.0g(■)].

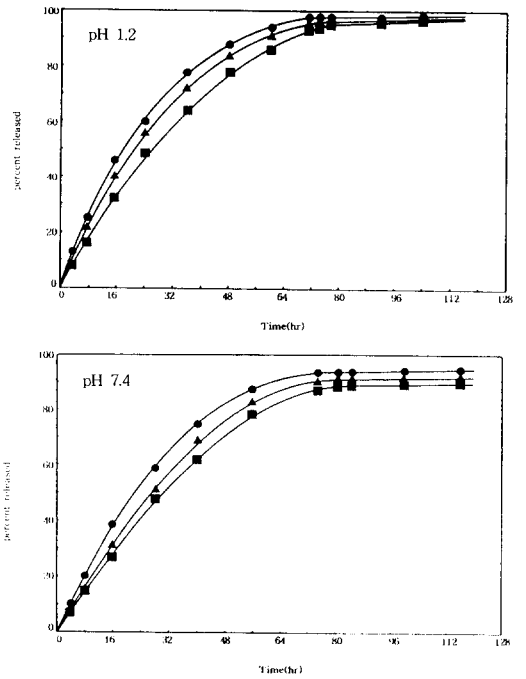

Fig. 9. Effects of sulfonated chitosan on the dissolution of prednisolone(0.2g) from sulfonated chitosan matrix coated by poly(DL-lactide) at pH 1.2 and pH 7.4:[sulfonated chitosan; 0.3g(●), 0.6g(▲), 1.0g(■)].

인 약물 방출시간을 plot한 것으로 PBS가 pH 1.2일 때 82, 90, 99시간, pH 7.4일 때 99, 105, 112시간으로 각각 나타났다. Fig. 8은 키토산·염 약물전달체의 함유량 증가에 따른 약물 방출시간을 plot한 것으로 pH 1.2일 때 65, 70, 75시간, pH 7.4일 때 69, 77, 82시간으로 각각 나타났다. Fig. 9는 술폰화 키토산 약물전달체의 함유량 증가에 따른 약물 방출시간을 plot한 것으로 pH 1.2일 때 71, 74, 78시간, pH 7.4일 때 75, 81, 85시간으로 각각 지연되었다. 세 가지 pattern 모두가 약물전달체의 함유량이 증가함에 따라 약물 방출거동이 느린 것은 단위 부피당 차지하는 약물의 함유량이 상대적으로 낮아져 방출속도가 떨어졌음을 의미한다.

pH가 약물 방출에 미치는 영향

경구투여 방법의 경우에 약물은 pH 1.2인 위를 지나 pH 7.4인 장을 지나므로 pH 1.2와 pH 7.4에 대하여 약물 방출실험을 하였다. pH 변화에 따른 약물 방출거동은 pH 1.2보다 pH 7.4에서 더 지연되었는데 그 이유는 약물전달체가 pH 7.4 PBS에서 보다 pH 1.2 PBS에서 용해도와 팽윤성이 크기 때문이라고 생각된다. 또한 약물 방출속도는 키토산·염이 가장 높았고 그 다음이 술폰화키토산, 키토산의 순서를 나타내었다. 이와 같이 pH에 따른 영향이 크므로 체내의 위 또는 장의 부위에서 약물의 방출속도가 달라질 수 있음을 보였다.

생체분해성 고분자 막이 약물 방출에 미치는 영향

전보(11)에 보고되었던 키토산 유도체 매트릭스(monolithic polymeric matrix)에서의 약물 방출속도는 초기에 과량의 약물이 방출되었다. 이에 반해 피막된 고분자 매트릭스(coated monolithic polymeric matrix)는 초기 약물의 과량 방출 량이 poly(DL-lactide) 피막에 의하여 현저히 줄어들었으며 약물의 방출시간도 지연되었다. 즉 생체분해성 고분

Table 2. The comparison of linearly released time range form for monolithic and coated monolithic matrices.

		Linearly released time range(hr)											
		Monolithic matrix**						Coated monolithic matrix					
PBS		pH 1.2			pH 7.4			pH 1.2			pH 7.4		
Amount of chitosan derivatives		0.3	0.6	1.0	0.3	0.6	1.0	0.3	0.6	1.0	0.3	0.6	1.0
Drug carriers*	I	40	48	54	46	52	58	82	90	99	99	105	112
	II	32	37	42	36	41	46	65	70	75	69	77	82
	III	37	41	44	40	46	50	71	74	78	75	81	85

* Drug carriers ; I : chitosan, II : chitosan hydrochloride, III : sulfonated chitosan

** The values shown in the parentheses are from the reference 11

자로 매트릭스에 피막을 함으로써 약물의 방출속도의 변화를 줄일 수 있었다. 상기의 결과는 poly(DL-lactide)가 lactic acid로 분해되면서 점차 막으로써의 기능을 잃기 때문인 것으로 생각된다. 위의 두 경우에 있어서 약물의 방출시간 범위를 비교한 결과를 Table 2에 나타내었다.

결과적으로 이러한 제형들은 생체분해성 고분자로 피막된 제제는 고분자 피막이 녹는 kinetics와 약물이 고분자 매트릭스을 투과하는 kinetics를 조합한 것이므로 초기의 급격한 약물 방출속도의 변화를 줄이면서 sustained release pattern을 나타내었다. 따라서 in vivo 실험을 통해 위·장내체류가 장기간 확인된다면 본 실험에서 제조한 피막형 고분자 매트릭스는 하루 이상 위·장내에 머무르면서 서서히 약물을 방출하는 장시간용 경구제제로 응용될 수 있으리라 기대된다.

요 약

본 연구에서는 약물 전달체(키토산, 키토산·염, 술폰화키토산)에 prednisolone을 분산시켜 제조한 고분자 매트릭스를 poly(DL-lactide)로 피막을 형성시킨 후 pH 1.2와 pH 7.4 인산염 완충용액에서 약물 방출실험을 하였다. 약물 방출시간은 pH 1.2에서 보다 pH 7.4에서 더 지연되었으며 약물 전달체의 함유량이 증가함에 따라 약물의 방출시간도 지연되었다. 피막된 고분자 매트릭스의 종류에 따라 지연된 약물의 방출시간은 키토산의 경우가 가장 길었으며, 술폰화키토산, 키토산·염의 순서였다. Monolithic 고분자 매트릭스에 비해 2배 정도의 약물의 방출지연성을 보인 피막된 monolithic 고분자 매트릭스가 방출조절형 제제로서 더 바람직한 것으로 관찰되었다. 이러한 제형들은 초기 급격한 약물 방출속도의 변화를 억제하는 sustained release pattern 제제임을 확인할 수 있었다.

감 사

본 연구는 1994년도 조선대학교 학술연구지원비에 의하여 수행된 것의 일부이며 본 연구를 지원하여 주신 조선대학교에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. M. L. Wolform, R. K. Madison and M. J. Cron(1952), *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 1491.
2. C. Jeuniaux(1964), *Arch. Intern. Physiol. Biochem.*, **72**(2), 329.
3. R. A. A. Muzzarelli(1977), Chitin, p. 46, Pergamon, N. Y.
4. K. Kuridac(1981), 化學の 領域, **35**, 927.
5. R. H. Guy and J. Hadgraft(1987), *Drug Parameters Important for Transdermal Delivery*, Vol. III, 4~5, CRC press, Florida.
6. P. K. Noonan and L. Z. Bend(1982), *Intern. J. Pharm.*, **12**, 331.
7. P. Johson and J. G. Lioyd-Jones(1984), *Drug Delivery Systems*, p. 107, Ellis Horwood, England.
8. S. Miayzaki, K. Ishii and T. Nodai(1981), *Ibid.*, **29**, 3067.
9. Y. Sawayanagi, N. Nambu and T. Nagi (1983), *Ibid.*, **31**, 2064.
10. S. I. Kim and J. W. Na(1993), *J. Korean*

Chem. Soc., **37**(5), 527.
11. W. S. Cha, S. I. Kim, J. W. Na and D. B. Lee (1995), *J. Korean Ind. & Eng. Chem.*, **6**(1), 8.
12. C. Rouget(1859), *Comp. Rend.*, **48**, 792.
13. G. W. Rigby(1936), U. S. Patent, 2,072,771.
14. Y. M. Kim and K. S. Chio(1985), *Polymer*, **9**, 427.
15. M. L. Wolfrom and T. M. Shen Han(1959), *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 1764
16. T. Sannan, K. Kurita, K. Ogura and Y. Iwakura(1978), *Polymer*, **19**, 458.
17. M. C. Gupta and V. G. Deshmulch(1983), *Polymer*, **24**, 827.