

생분해성 Microgel로부터 약물을 담지한 Microsphere의 제조 및 그의 생분해성

김 공 수[†] · 강 석 호 · 김 정 목

충북대학교 공과대학 화학공학부
(1998년 3월 26일 접수, 1998년 5월 18일 채택)

Preparation and Biodegradability of Microsphere Prepared from Biodegradable Microgel

Kong Soo Kim[†], Seok Ho Kang, and Jeong Muk Kim

Dept. of Chem. Eng., Chungbuk Nat'l. Univ., Cheongju 361-763, Korea
(Received March 26, 1998; accepted May 18, 1998)

요 약: Poly(caprolactone diol)을 기초로하여 합성한 microgel을 이용하여 bovine serum albumine (BSA)를 담지한 생분해성 microsphere를 용매증발법으로 제조하였다. 교반속도, microgel의 농도, 폴리비닐알콜의 농도등이 microsphere의 입도분포에 주는 영향을 조사하였다. Microsphere의 크기는 교반속도가 증가함에 따라 감소하였으나, 염화메틸렌 내의 microgel의 농도가 증가함에 따라서는 거의 비례적으로 증가하는 경향을 나타내었다. 100 unit/mL의 효소용액에서 microsphere의 생분해성에 관하여 조사한 결과, 3시간이 경과한 후에 microsphere의 표면에 작은 세공들이 나타나기 시작하였으며, 24시간 후에는 세공이 발달하고 크랙이 발생하기 시작하였다. 그리고 36시간이 경과한 후에는 microsphere의 구형이 일그러짐을 관찰할 수 있었다.

Abstract: Biodegradable microsphere containing bovine serum albumine (BSA) as a model drug were prepared with the microgel based on poly(caprolactone diol) by a modified solvent evaporation method. The influence of the stirring speed, the concentration of microgel and the concentration of poly(vinyl alcohol) on microsphere characteristics was investigated. The size of microsphere was decreased with increasing the mixing rate but increased with increasing the concentration of microgel in methylene chloride. The biodegradability of microsphere in 100 unit/mL of lipase solution was investigated. A lot of small pores appeared on the surface of microsphere after 3 hours of incubation time and the pores and cracks were developed with increasing the incubation time and microsphere lost their own shape after 36 hours of incubation time.

Key words: Microgel, Microsphere, Biodegradable Polymer, Biodegradability

1. 서 론

약물을 인체에 직접 투여하였을 경우 체내에 흡수된 약물이 분배에 의해 작용부위에 도달하여 치료효과를 나타내며, 다른 부위에 분포된 약물은 효과와는 관계없이 배설되어 실제 약물의 효능이 떨어지고, 이로 인한 부작용이 발생하는 원인이 되고 있다. 또한 약효를 발휘할 수 있는 혈중 약물농도를 유지하기 위하여 여러 번 투여해야 하는 번거로움이 있으며 약물투여시의 고통도 간과할 수 없는 문제점이 되고 있다. 이러한 문제점을 개선하기 위하여 지난 20여년 동안 발전되어 온 것이 약물전달시스템 (drug delivery system) [1-4]이다.

이러한 약물전달시스템은 약물의 효과를 증가시키고, 부작용을 감소시킬 뿐만 아니라, 여러번 투여하는 번거로움을 없애기 위하여 생분해성 및 생체적합성이 좋은 고분자를 약물과 화학결합을 시키고, 이에 targeting moiety를 달아 작용부위에 도달해서야 약효를 발휘하는 표적지향 시스템 (targeted 또는 site-specific system) [5]과 생분해성 고분자를 담체로 하여 약물을 담지한 입자 또는 캡슐을 제조하여 약물의 방출속도를 조절하는 방출조절 시스템 (controlled release system) [6-9]으로 대별된다. 약물방출 조절시스템은 현재 학술적 연구의 차원을 넘어서 실용화되고 있는 단계에 있으며

이러한 시스템의 단점으로는 제조방법에 따라 조금 차이는 있지만 약물의 방출속도가 일정해야 하는데, 초기 또는 일정기간이 지난 후에 약물이 급격히 방출되는 문제점이 있어 이를 해결하기 위한 연구 [10,11]가 많이 진행되고 있다.

최근에 Vincent Lenaerts 등 [6]은 가교된 아밀로오스를 이용하여 theophylline을 담지한 tablet을 제조하여 고분자의 가교도에 따른 약물의 방출특성을 조사하였으며, 또한 Kawaguchi 등 [12]은 함입제를 담지한 poly(hydroxybutyrate) microsphere를 제조하여 약물의 친유성 및 고분자의 분자량 등과 같이 약물의 방출속도에 영향을 주는 인자들을 조사하여 약물의 방출속도를 효과적으로 조절할 수 있는 방법에 관하여 연구하였다. Microsphere 제조공정에 관한 연구로서 Hora 등 [13,14]은 약물을 담지한 microsphere를 O/W형태의 용매증발법으로 제조하였으나, 이러한 제조방법은 수용성 약물을 담지하는데 있어서 효율이 떨어지는 단점을 가지고 있다. 이러한 단점을 개선하기 위하여 Ruiz 등 [15,16]은 유기 상분리 또는 W/O/W 형태의 2차 에멀전을 만들어 용매증발법으로 microsphere를 제조하였다. 이러한 제조 방법은 수용성 약물 뿐만 아니라 백신에도 응용 [17,18]할 수 있다.

본 연구에서는 생분해성 및 생체적합성이 좋은 poly(caprolactone diol)을 기초로 하여 합성한 microgel을 이용하여 W/O/W형태의 2차 에멀전을 만들어 용매증발법 [19]으로 약물 (BSA)를 담지한 microsphere를 제조하였다. Microsphere를 제조함에 있어 안정제로 사용된 폴리비닐알콜의 농도, 교반속도, 그리고 microgel의 농도에

[†] 주 저자 (e-mail : kimks@cbucc.chungbuk.ac.kr)

다른 microsphere의 입자형태 및 크기를 관찰하였고, 리파아제 용액 내에서 시간에 따른 microsphere의 생분해성을 실험하였다.

2. 실험

2.1. 시약

본 연구에서는 poly(caprolactone diol)과 pyrane 화합물 그리고 가교제로 1,2,6-hexane triol를 이용하여 합성한 microgel을 사용하였다. 그리고 모델 약물로 사용한 bovine serum albumin (BSA)는 Calbiochem-Novabiochem Co.에서 구입하여 사용하였고, 분산 안정제로 사용된 폴리비닐알코올은 분자량이 31000~50000인 Aldrich 사제 1급시약을 사용하였다. 에멀전을 형성시키기 위하여 사용한 homogenizer는 IKA제 ULTRA TURRAX T₈을 사용하였으며, 생분해성 실험에 사용한 리파아제는 46 unit/mg protein Sigma제를 구입하여 사용하였다. 그리고 염화메틸렌 등 기타 유기 용매는 정제하여 사용하였다.

2.2. Microsphere의 제조

전보[20]에서와 같은 방법으로 합성한 poly(caprolactone diol)을 기초로 한 microgel로부터 W/O/W형태의 2차 에멀전을 이용하여 용매증발법으로 microsphere를 제조하였다. Microgel 0.4 g을 염화메틸렌 5 mL에 용해시키고, BSA 0.17 g을 증류수 1 mL에 용해시켰다. 각각의 용액을 혼합하여 1분간 초음파 발생장치 (20 kHz, 300 W)를 사용하여 분산시켜 (W/O)형태의 1차 에멀전을 만들었다. 1차 에멀전 용액을 안정제로 사용된 4 wt % 폴리비닐알코올 용액 70 mL에 가한 후, homogenizer를 사용하여 W/O/W형태의 2차 에멀전을 형성시키고, 염화메틸렌이 모두 증발할 때까지 15000 rpm으로 약 3시간 정도 교반하였다. 형성된 microsphere를 4000 rpm에서 원심분리를 사용하여 분리하고 증류수로 여러 차례 세척한 후, 상온에서 진공 건조하였다. Microsphere 제조공정을 Scheme 1에 나타내었다.

2.3. Microsphere의 특성 시험

Microsphere의 특성을 시험하기 위하여 건조한 microsphere를 금속 스테트 위에 올려 놓고 금으로 진공증착하여 주사전자현미경 (SEM, Hitachi S570)을 사용하여 microsphere의 크기 및 형태를 관찰하였다.

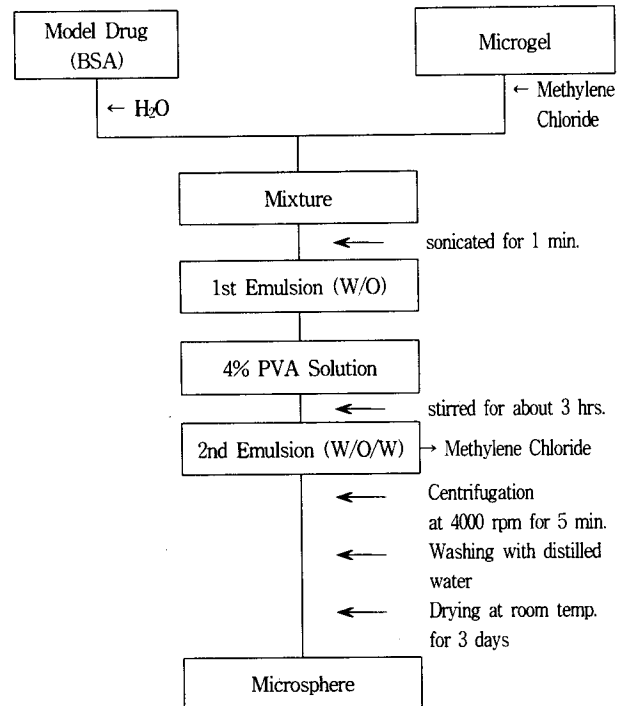
2.4. Microsphere의 생분해성

pH 7.4의 인산염 완충용액 30 mL에 리파아제 (40 unit/mg protein)을 가하여 100 unit/mL 리파아제 용액을 제조하였다. 이 용액에 0.02 g의 microsphere를 넣고 37 °C에서 60 rpm으로 교반하면서 0, 3, 24, 36시간마다 일정량의 microsphere를 채취하여 상온에서 진공건조한 후, 주사전자현미경을 사용하여 microsphere의 크기 및 형태를 관찰하여 생분해성을 조사하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. Microsphere의 제조

Microsphere의 크기에 미치는 안정제의 영향에 대해서 현재 2가지 상반된 연구결과가 발표되고 있는데, Heya 등[21]은 안정제의 농도가 증가함에 따라 microsphere의 크기가 증가한다고 주장하였고, Soriano 등[22]은 안정제의 영향을 받지 않는다고 주장하였다. 본 연구에서는 전보[20]에서와 같은 방법으로 합성한 poly(caprolactone diol)을 기초로 한 microgel을 사용하여 Table 1에서와 같이 microgel의 농도, 폴리비닐알코올의 농도 및 교반속도 등을 변



Scheme 1. The schematic diagram for the preparation of microsphere from microgel based on poly(caprolactone diol).

Table 1. Preparation of the Microsphere by a Solvent Evaporation Method

Code No.	Conc. of microgel (g/L)	Mole % of HT	Conc. of BSA (wt %)	Conc. of PVA (wt %)	Stirring speed (rpm)
A-1	10				
A-2	20				
A-3	30	22.1	10	3.0	9,000
A-4	50				
B-1				2.0	
B-2				3.0	
B-3	50	22.1	10	4.0	9,000
B-4				5.0	
C-1					6,000
C-2					9,000
C-3	50	22.1	10	3.0	15,000
C-4					22,000

화시키면서 용매 증발법으로 microsphere를 제조하였다. 이 때 안정제가 microsphere의 입자 크기에 미치는 영향을 조사하기 위하여 2차 에멀전 형성시 안정제로 사용하는 폴리비닐알코올의 농도를 1 wt %에서 5 wt %로 변화시켜가며 microsphere의 형성과정을 주사전자현미경으로 관찰한 결과를 Figure 1에 나타내었다. 폴리비닐알코올의 농도가 1 wt %일 경우에는 microsphere가 형성되지 않았는데, 이는 폴리비닐알코올의 낮은 농도로 인해 유효력이 너무 낮아 폴리비닐알코올이 안정제로서의 역할을 하지 못한 것으로 사료된다.

그리고 폴리비닐알코올의 농도가 2 wt %일 경우에는 Figure 1에서 보는 바와 같이 비교적 큰 microsphere가 생성되었으나, 3, 4 wt

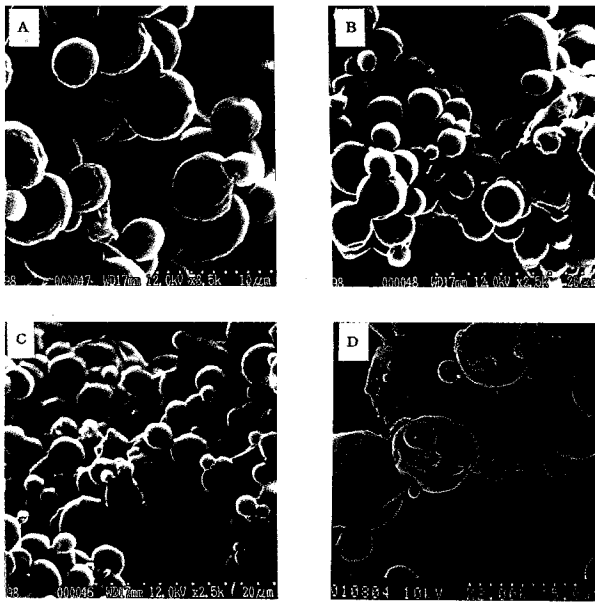


Figure 1. Scanning electron micrographs of microsphere prepared at different concentration of poly(vinyl alcohol). (A) 2% (B) 3% (C) 4% (D) 5%

의 경우에는 microsphere의 입자크기에 큰 변화가 없음을 관찰할 수 있었다. 이러한 현상은 안정제의 농도가 3 wt %까지 증가함에 따라 유효력과 안정성이 증가하여 입자의 크기가 작아지는 것으로 생각된다. 그러나 3~4 wt %에서는 microsphere의 크기의 변화가 거의 없었으며, 5 wt % 이상인 경우에는 용액의 점성이 너무 높아 유효력을 감소시켜 1차 에멀전 용액이 수용액상으로 제대로 분산되지 않아 그림에서 보는 바와 같이, 구멍이 뚫린 형태의 불완전한 microsphere가 얻어졌다.

2차 에멀전 방법으로 microsphere를 제조하는 경우에 입자의 크기에 가장 결정적인 영향을 주는 인자로는 일반적으로 2차 에멀전 형성시의 교반속도이다. 따라서 교반속도를 6000, 9000, 15000, 22000 rpm으로 변화시켜가며 입자의 크기 변화를 관찰하여 그 결과를 Figure 2에 나타내었다. 그림에서 보는 바와 같이, microsphere의 입자 크기는 교반속도가 증가함에 따라 거의 비례적으로 작아지는 경향을 관찰할 수 있었다. 이러한 경향은 교반속도가 증가함에 따라 2차 에멀전 형성시 생성되는 미셀의 크기가 작아짐으로써 microsphere의 크기가 작아지는 것으로 생각된다. 따라서 이의 결과로부터 교반속도를 변화시킴으로써 microsphere의 입자 크기의 조절이 가능함을 알 수 있었다.

염화메틸렌에 용해된 microgel의 농도가 microsphere의 입자크기에 미치는 영향을 조사하기 위하여 microgel의 농도를 10 g/L에서부터 80 g/L까지 변화시켜가며 microsphere의 입자크기를 관찰하여 그 결과를 Figure 3에 나타내었다. 그림에서 보는 바와 같이, microgel의 농도가 증가함에 따라 microsphere의 크기가 거의 비례적으로 증가함을 관찰할 수 있는데 예를 들면, microgel의 농도가 50 g/L일 때의 microsphere의 크기는 10 g/L일 때보다 약 2배 정도 큰 값을 보여주고 있다. 즉, microgel의 농도가 5배 정도 클 경우에 microsphere의 크기는 약 2배 정도 증대함을 의미한다. 따라서 microgel의 농도를 변화시켜 microsphere의 크기를 조절할 수 있으며, 이러한 현상은 염화메틸렌에서의 microgel의 농도와 점도의 영향에 기인한다. 염화메틸렌에서의 microgel 농도가 증가함에 따라 기름상의 점도가 증가하여 유효력을 감소시킴으로써 에멀전 형성시

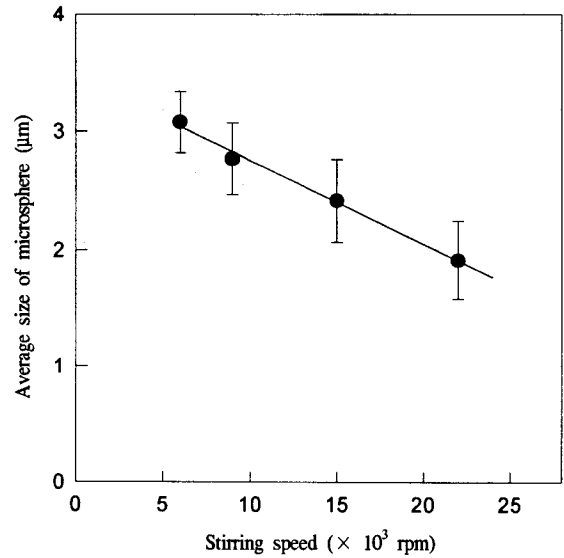


Figure 2. The effect of stirring speed on the size of microsphere at 4 wt % of PVA and 50 g/L of microgel in methylene chloride.

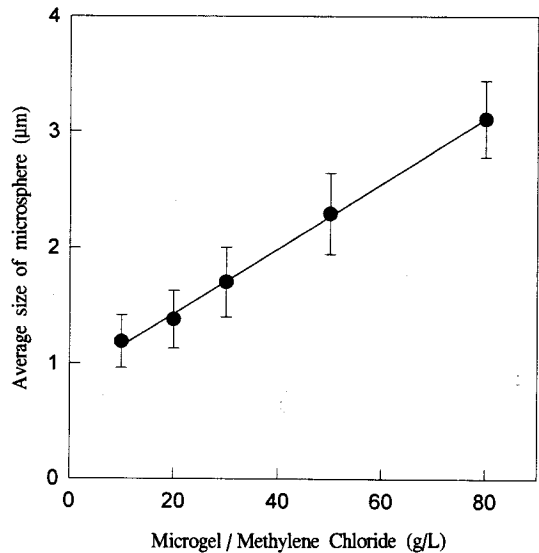


Figure 3. The effect of the concentration of microgel on the size of microsphere at 4 wt % of PVA and 15,000 rpm.

생성되는 미셀의 크기가 증가하여 microsphere의 크기가 증대하는 것으로 사료된다.

3.2. Microsphere의 생분해성

Microsphere 0.4 g을 100 units/mL 리파아제 용액 (pH 7.4 phosphate buffer) 30 mL가 담겨진 시험관에 넣고, 이를 37 °C로 고정된 항온조에서 60 rpm으로 진탕하면서 0, 3, 24, 36시간마다 일정량의 microsphere를 채취하여 상온에서 진공 건조하였다. 주사전자현미경을 이용하여 microsphere의 생분해성을 관찰한 결과를 Figure 4에 나타내었다.

Figure 4(A)는 초미립자 (0.1 μm 이하)의 microgel로부터 제조한

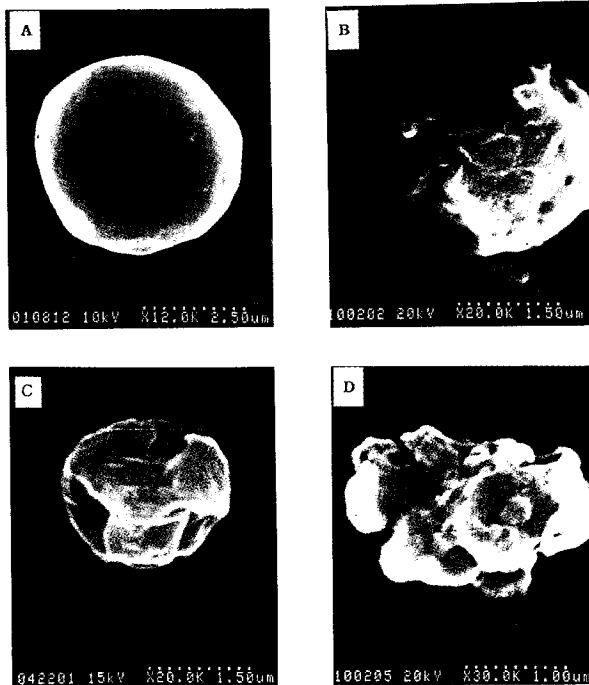


Figure 4. Scanning electron micrographs of the microsphere after incubation in 100 unit/ml of lipase solution at 37 °C. (A) untreated, (B) 3 h, (C) 24 h, (D) 36 h

microsphere의 전자주사현미경 사진으로 표면에 아주 미세한 세공이 분포되어 있다. Figure 4(B)~(D)는 microsphere의 생분해가 일어나는 과정을 단계별로 나타내고 있다. 그림에서 보는 바와 같이, 약 3시간이 경과한 후에 microsphere의 표면에 많은 세공이 나타나는 것으로 보아 생분해가 서서히 일어남을 관찰할 수 있었으며, 24시간 후에는 생분해가 더욱 진행되어 microsphere의 표면에 세공의 형성이 발달하고 크랙이 발생됨을 관찰할 수 있었다. 그리고 36시간 이후에는 생분해가 일어나 구형의 microsphere가 이그리진 형태를 하고 있음을 관찰할 수 있었다. 이와 같이 poly(caprolactone diol)을 기초로 한 microgel로부터 제조한 microsphere는 리파아제 용액 중에서 시간이 경과함에 따라 생분해 현상이 현저하게 일어남을 알 수 있다.

4. 결 론

본 연구에서는 poly(caprolactone diol)을 기초로 하여 합성한 microgel로부터 BSA를 담지한 microsphere를 제조하고 이의 생분해를 조사하였다. 안정제로 사용한 폴리비닐알코올의 농도를 1 wt %에서 5 wt %로 변화시켜가며 microsphere를 제조한 결과, 1 wt %일 경우에는 폴리비닐알코올의 유효력이 너무 낮아 microsphere가 형성되지 않았으며, 3~4 wt %로 증가하는 경우에는 입자크기가 거의 변화가 없었으나 구형의 microsphere를 얻을 수 있었다. 그러나 폴리비닐알코올의 농도가 5 wt %의 경우에는 구멍이 뚫린 형태의 불완전한 microsphere가 얻어졌다. 입자 크기는 교반속도가 증가함에 따라 거의 비례적으로 작아지는 경향을 나타내었으나, microgel의 농도가 증가함에 따라서는 microsphere의 입자 크기가 증가하였다.

100 unit/mL 효소 용액 (pH 7.4)에서 microsphere의 생분해성을 관찰한 결과, 3시간이 경과하면서 microsphere의 표면에 세공이 발생하기 시작하였으며, 24시간이 되었을 때에는 세공이 발달하고 입

자 표면에 크랙이 발생하였고, 36시간 이후에는 구형의 형태가 파괴됨을 관찰할 수 있었다.

참 고 문 헌

- Patrick Sinko and Joachim Kohn, "Polymeric Delivery System", ed. Magda A. El-Nokaly, David M. Piatt, 18~41, American Chemical Society, Washington, DC(1993).
- Hirota Endoh, Takeo Kawaguchi, Toshinobu Seki, Tetsuya Hasegawa and Kazuhiko Juni, *Chem. Pharm. Bull.*, **39**, 458 (1991).
- S. Kohjiya, Y. Ikeda, S. Yamashita, and S. Yamashita, *Reactive Polymers*, **15**, 165(1991).
- Per Artursson, Peter Edman, Timo Laakso, and Ingvar Sjöholm, *J. Pharm. Sci.*, **73**, 1507(1984).
- Masayuki Yokoyama, Shohei Inoue, Kazunori Kataoka, Nobuhiko Yui, Teruo Okano, and Yasuhisa Sakurai, *Makromol. Chem.*, **190**, 2041(1989).
- Vincent Lenaerts, Yves Dumoulin, and Mircea Alexandru Mateescu, *J. Controlled Release*, **15**, 39(1991).
- Nazih Ammoury, Hatem Fessi, J. P. Devissaguet, F. Puisieux, and S. Benita, *J. Pharm. Sci.*, **79**, 763(1990).
- Neil B. Graham and Jianwen Mao, "Chemical Aspects of Drug Delivery System" ed. D. R. Karsa and R. A. Stephenson, 52~64, The Royal Society of Chemistry (1996).
- Yasuaki Ogawa, Hiroaki Okada, Masaki Yamamoto, and Tsugio Shimamoto, *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 2576(1988).
- Yutaka Nishioka, Syojiro Kyotani, Hisashi Masui, Masashi Okamura, Masako Miyazaki, Kazuchi Okazaki, Saburo Ohnishi, Yasutake Yamamoto, and Kenichi Ito, *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 3074(1989).
- Toshinobu Seki, Takeo Kawaguchi, Hirota Endoh, Kozo Ishikawa, Kazuhiko Juni, and Masahiro Nakano, *J. Pharm. Sci.*, **79**, 985(1990).
- Takeo Kawaguchi, Akiko Tsugane, Kumiko Higashide, Hirota Endoh, Tetsuya Hasegawa, Hiromi Kanno, Toshinobu Seki, Kazuhiko Juni, Shoji Fukushima, and Masahiro Nakano, *J. Pharm. Sci.*, **81**, 508(1992).
- Hora, M. S., Rana, R. K., and Nunberg, J. H., Tice T. R., Gilley R. M. and Hudson M. E., *Pharm. Res.*, **7**, 1190(1990).
- Jailil, R. and Nixon, J. R., *J. Microencapsulation*, **7**, 297(1990).
- Ruiz J. M., Busnel J. P. and Benoit J. P., *Pharm. Res.*, **7**, 928(1990).
- Ogawa Y., Yamamoto M., Okada H., Yashiki T., and Shimamoto T., *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 1095(1988).
- O'Hagan D. T., Jeffery H. and Davis, S. S., *Int'l. J. Pharm.*, **103**, 37(1994).
- Alonso M. J., Cohen S., Park, T. W., Siber G. R., and Langer R., *Pharm. Res.*, **10**, 945(1993).
- Smadar Cohen, Toshio Yoshioka, Melissa Lucarelli, Lena H. Hwang, and Robert Langer, *Pharmaceutical Research*, **8**, 713(1991).
- K. S. Kim and N. B. Graham, *Polymer(Korea) submitted*, 1998.
- Heya T., Okada H., Tanigawara Y., Ogawa Y., and Toguchi H., *Int'l. J. Pharm.*, **69**, 69(1991).
- Isabel Soriano, Carmen Evora, and Matias Llabres, *Int'l. J. Pharm.*, **142**, 135(1996).