

온도감응성 키토산 중성용액을 이용한 약물송달시스템

김호정[†] · 이화정¹ · 구영순¹

식품의약품안전청, ¹이화여자대학교

(2008년 6월 23일 접수 · 2008년 7월 12일 수정 · 2008년 7월 15일 승인)

Temperature-Sensitive Drug Delivery System of Acetaminophen Using Neutral Chitosan Solution

Kim, Ho-Jeong[†], Lee, Hwa-Jeong¹ and Koo Young-Soon¹

Pharmaceutical Safety Bureau, Korea Food and Drug Administration, 194 Tongilro, Eunpyung-Gu, Seoul 122-704, Korea

¹College of Pharmacy, Ewha Womans University

(Received June 23, 2008 · Revised July 12, 2008 · Accepted July 15, 2008)

ABSTRACT – In the present study, chitosan-glycerophosphate sodium salt solution as a thermosensitive system (TSS) was used to formulate a temperature-sensitive drug delivery system (TSDDS) containing acetaminophen (AAP). The optimized TSS was prepared by measuring gelation temperature, gelation time and rheological properties of TSS. The optimized gelation temperature and time of TSS were 36°C and 100 seconds, respectively. The viscosity of TSS was also suitable for maintaining gel structure at 37.2°C. The release profiles of TSDDS in PBS/pH 7.4 with various apparatuses and mass loss of TSDDS were investigated. The time required to release 50% of AAP from TSDDS ($t_{50\%}$) was 120 min with the formation of pore on the surfaces, which was 2 times longer than that from AAP-chitosan gel. In addition, TSDDS was degraded approximately 80% within 4 hr and then degraded slowly for 20 hrs. In conclusion, AAP-TSS (TSDDS) formulated in this study might be suitable for some specific uses such as subcutaneous injection and rectal formulation.

Key words – Temperature-sensitive drug delivery system, Chitosan, Acetaminophen

온도감응성(thermosensitivity)을 나타내는 약물송달시스템 (temperature sensitive drug delivery system, 이하 TSDDS)은 상온에서는 액상이므로 다루기가 쉽고, 피하, 뼈, 근육, 치주, 뇌 등으로 광범위한 적용이 가능하고, 생체 내에 투여된 후 겔을 형성함으로써 생체이용률을 높일 수 있으며 혈중 약물 농도를 지속시켜 빈번한 투여가 필요 없는 등 약물의 방출 제어가 가능하다.^{1,2)}

Chenite 등³⁻⁶⁾은 양이온성 다당류인 키토산 용액이 단일 음이온기를 갖는 glycerol-, sorbitol-, fructose- 또는 glucose-phosphate salts (polyol 또는 sugar-phosphate salt)를 첨가함에 따라 pH에 의존적으로 온도감응성이 있는 키토산 용액으로 변화하는 것을 보고하였다. 이 때 키토산-글리세롤 인산나트륨 용액 (이하 C/GP 용액)에 뼈 단백질을 단순히 혼합한 다음 랫트의 흉근에 피하 주사하였을 때 체내에서 겔을 형성하여 지속적으로 뼈 및 연골이 형성되었다.

C/GP 용액 조제에 사용한 키토산은 2-amino-2-deoxy-D-

glucose (β -D-glucosamine)이 직쇄상으로 $\beta(1 \rightarrow 4)$ 결합을 한 호모다당(homopolysaccharide)으로서 리소자임(lysozyme)에 의해 생체 내에서 분해되고,⁷⁾ 생체적합성(biocompatibility)이 우수하며,⁸⁾ 점막부착성(mucoadhesiveness)이 있는⁹⁾ 생고분자로서 최근 제약, 의료 및 식품공업 분야에서 사용되고 있다.¹⁰⁾

본 연구에서는 이 C/GP용액 및 모델약물로서 아세트아미노펜 (이하 AAP)을 이용하여 TSDDS를 제조하였으며, TSDDS를 피하주사 및 직장 투여 등의 약물흡수실험에 앞서 방출시험 및 분해시험 등의 체제학적 평가를 하였다. TSDDS의 제조에 사용된 키토산의 물리학적 성질에 따른 체내 적용에 적당한 겔화온도, 겔화시간 및 유동학적 성질 등을 검토하여 최적의 temperature sensitive system (이하 TSS)를 제조하였으며, 방출시험으로서 cell method 및 dialysis sac method 등의 적용을 시도하였다.

실험 방법

시약

아세트아미노펜은 한국안센(한국, 서울)에서 제공받아 사

[†]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
Tel : 02)3156-8009, E-mail : hojkim@kfda.go.kr

용하였으며 키토산은 Showa Chemical(일본, 동경)에서 구입하였다. 초산, 메탄올, 인산일수소칼륨 및 수산화나트륨은 Wako Pure Chemical(일본, 오사카)에서, 폴리에틸렌글리콜 4000 (PEG 4000)은 Kanto Chemical(일본, 동경)에서 구입하였다. 글리세롤인산나트륨(glycerol phosphate disodium salt) 및 아세트니트릴 및 메탄올(HPLC grade)는 Sigma(미국, 미주리, 세인트루이스) 및 Merck(독일, 프랑크푸르트)에서 각각 구입하였다. 그 외 모두 시약은 1급 또는 특급을 사용하였다.

온도감응성 약물전달시스템 (TSDDS) 제조

키토산의 분자량, 탈아세틸화도 및 TSS의 pH에 의한 겔화온도를 측정하여 제조된 여러 TSS들을 가지고 생체 적용에 적합한 겔화온도, 겔화시간 및 유동학적 성질을 측정하여 최적의 TSS를 도출하였다.

TSS는 분자량 및 탈아세틸화도를 미리 측정한 키토산 적당량을 각각 취하여 0.1 mol/L 초산 100 mL을 넣어 용해시켜 2.2% 키토산 용액을 조제한 다음 이 용액 약 10 g을 정확하게 칭량하여 45% 글리세롤인산나트륨 용액 (GP용액)을 소량씩 넣으면서 충분히 혼화하여 최종 농도가 키토산은 2.0%, 글리세롤인산나트륨은 8.0%가 되도록 TSS를 제조하였다.³⁾

겔화온도¹¹⁾는 TSS 약 12 mL을 각각 취하여 concentric cylinder (C 27)에 넣고 oscillatory mode의 rheometer (MCR 300, Physica, 독일)를 사용하여 elastic modulus (G') 및 loss modulus (G'')를 측정하였다. 진동수는 1.0 Hz, 측정횟수는 1회/초 등의 조건에서 온도를 1°C/분 씩 상승시키면서 20°C에서 70°C 범위에서 측정하였다. 겔화온도는 용액상태의 G' 와 겔상태의 G' 의 중간 G' 값을 나타내는 온도로서 하였다.

겔화시간¹²⁾은 TSS 12 mL을 각각 취하여 concentric cylinder (C27)에 넣고 oscillatory mode의 rheometer로 시간 변화에 따른 G' 및 G'' 를 측정하여 G' 가 G'' 보다 크게 되는 시점으로 하였다. 진동수는 1.0 Hz, 측정횟수는 1회/초 및 온도는 37.2°C 등의 조건에서 측정하였다.

최적의 TSS 일정량을 취하여 아세트아미노펜 (이하 AAP)의 최종 농도가 2.5%가 되도록 AAP를 첨가하여 TSDDS를 제조하였다.

TSDDS로부터의 약물 방출실험

TSDDS의 방출실험 대조군으로서 AAP-키토산 겔 (이하 AAP-C겔)을 사용하였다. AAP-C겔은 GP를 첨가하지 않고 AAP를 2.2% 키토산 용액과 혼합하여 AAP의 농도가 2.5%

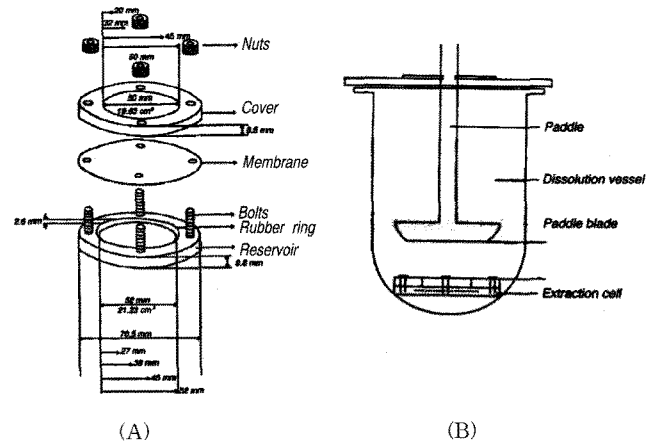


Figure 1—Diagram of cell method. (A); Extraction cell, (B); Paddle over extraction cell.

가 되도록 하여 제조하였다. TSDDS 및 AAP-C 겔의 방출 실험은 cell method¹³⁾ 및 dialysis sac method¹⁴⁻¹⁶⁾를 준용하여 수행하였다.

Cell method는 TSDDS 및 AAP-C 겔 약 2 g을 각각 정확하게 칭량하여 Figure 1(A)의 extraction cell에 넣고, 체내의 겔화와 같은 조건으로 하기 위하여 cell을 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 의 항온·습습기에 약 2분간 방치한 후, (B)의 방출실험 용기에 cell을 넣어 방출실험을 수행하였다.

Dialysis sac diffusion method는 TSDDS 및 AAP-C 겔을 방출용매로 전 처리한 cellulose membrane tube에 1 mL 씩 각각 넣고 양끝을 집게로 막은 다음 방출실험 용기에 넣고 대한약전 용출시험법 패들법에 따라 수행하였다.

방출용매로 pH 7.4인 PBS 500 mL를 사용하였고, 온도는 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 로, 회전속도는 50 rpm으로 하였다. 미리 정한 시간에 시료를 취하고, UV 254 nm에서 흡광도(UV-2101 PC, Shimadzu)를 측정하여 AAP의 양을 구하였다.

TSDDS의 표면 관찰

TSDDS의 방출실험 후 표면 변화와 형태가 약물 방출에 미치는 영향을 검토하기 위하여 방출실험 전후의 TSDDS의 표면을 scanning electron microscope (SEM, JEOL Model JSM 5200, JEOL Ltd.)로 촬영하였다. Cell method 방출실험 후 6시간에 TSDDS를 취하여 동결 건조하고, 완전히 건조시킨 다음 금증착기에 넣고 진공도 0.5 Torr 및 6~7 mA의 조건에서 7분간 casting 한 겔의 위쪽 표면을 순금·플라티늄(1:1)으로 피복하고 가속전압 10 kV에서 100배의 배율로 관찰하며 촬영하였다. 사진에서 고분자의 표면 특성을 살펴 피고 방출에 미치는 영향을 평가하였다.

TSDDS의 *In vitro* 분해실험

TSDDS 약 2g을 Figure 1(A)의 extraction cell에 넣어 미리 무게를 측정한 후 방출실험을 하였다. 방출실험 시작 후 4, 8, 12 및 24시간에 cell에서 시료를 꺼내어 증류수로 세척하고 동결 건조하였다. 완전히 건조된 후 무게를 측정하여 분해되고 남아 있는 부분의 중량 %를 다음 식으로부터 계산하였다.

$$\% \text{ 잔존량 (Mass remaining)} = \frac{M_f}{M_i} \times 100$$

여기에서 M_i 는 원래의 무게를, M_f 는 분해된 후 남아있는 무게를 나타낸다.¹⁷⁾

결과 및 고찰

TSDDS 제조

최적의 TSS는 키토산 (중량 평균분자량 731,775, 탈아세틸화도 99%)을 GP농도가 약 45%가 되도록 하고, pH를 약 7.1로 중성화하여 제조하였다. 제조된 TSS는 생체 내 겔화에 적합한 겔화온도(30~36°C)를 가졌으며, 투여에 적합한 점도를 보였다(Table I).

온도 변화에 따라 TSS가 겔화되는 것은 크게 3가지 기전에 의한 것으로 보고되어 있다.^{4,5,18)} 첫째, GP가 염기염이므로 정전기적 반발력을 감소시켜 키토산 사슬간의 수소결합을 증가시키고, 둘째, 키토산의 NH_4^+ 기 및 GP의 PO_4^{3-} 사이의 정전기적 결합이 생긴다. 셋째, GP의 글리세롤기가 키토산을 둘러싸고 있는 물에 영향을 주어 키토산의 사슬이 온도 의존적으로 수화 또는 탈수반응이 일어나도록 하고, 이 수화 또는 탈수반응 및 주변 물의 구조는 온도 의존적으로 키토산 분자간의 소수결합을 강하게 한다. 겔화온도 이하에서는 키토산과 물분자 사이의 강한 결합으로 키토산 사슬간에 결합을 일어나지 않도록 하여 액상으로 존재하고, 반면 열을 가하면 물분자는 GP의 글리세롤 반응기에 의하여 둘러싸이게 되고, 차례로 키토산 분자간에 결합이 일어나 겔을 형성하게 된다.

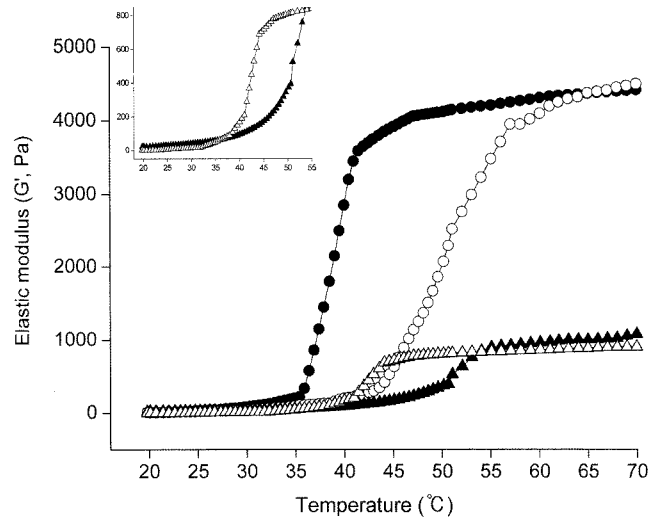


Figure 2—Effect on temperature on the viscoelastic properties of TSS prepared with various chitosans. Insert shows the properties of chitosan A and B up to 55°C. ▲; chitosan A, △; chitosan B, ○; chitosan C, ●; chitosan D.

겔화온도는 G' 및 G'' 값을 측정하여 용액상태의 G' 와 겔상태의 G' 의 중간 G' 값을 나타내는 온도로 하였다(Figure 2).¹¹⁾ 이 수치는 elastic modulus (G'), loss modulus (G'') 및 phase angle δ ($\tan \delta = G''/G'$) 값으로 겔화온도를 설명하여 겔화온도 이하에서 G' 값은 0에 가깝고, G'' 는 G' 보다 약간 크며 δ 값은 80~90°사이에 있다. 겔화가 시작되면 G' 및 G'' 값이 모두 증가되면서 G' 가 G'' 에 비하여 큰 값을 나타내며 탄성을 보인다. 동시에 δ 값 및 $\tan \delta$ 값은 현격한 감소가 일어난다. 여기서 G' 는 에너지를 가하였을 때 에너지를 축적한 후 deformation cycle 마다 다시 회복되는 에너지의 단위로서 점탄성(viscoelastic property)이 있는 물질 중의 고체 같은 성분(solid-like component)의 특성을 나타내며, G'' 는 cycle 마다 소실되는 에너지로서 점탄성을 정량하여 물질 중의 액체 같은 성분(liquid-like component)의 특성을 반영한다. $\tan \delta$ 는 물질의 전반적인 점탄성을 나타내는 수치로 $\tan \delta$ 값이 1보다 작은 것은 고체의 성질을 가지고 있다는 것을 의미한다.

겔화시간은 G' 값이 G'' 값보다 크게 되는 시점이며, 체내에

Table I—Characteristics of Chitosans and Gelation Temperatures of TSS Prepared from Chitosan A, B, C and D

Chitosan	Molecular weight (Mw)	Polydispersity (Dp)	Number-average molecular weight, (Mn)	Degree of deacetylation (DDA) (%)	Gelation temperature (°C)
A	217,695	3.38	64,286	80	56
B	255,232	3.56	71,519	91	36
C	895,968	2.94	304,190	85	42
D	731,775	4.77	153,393	99	36

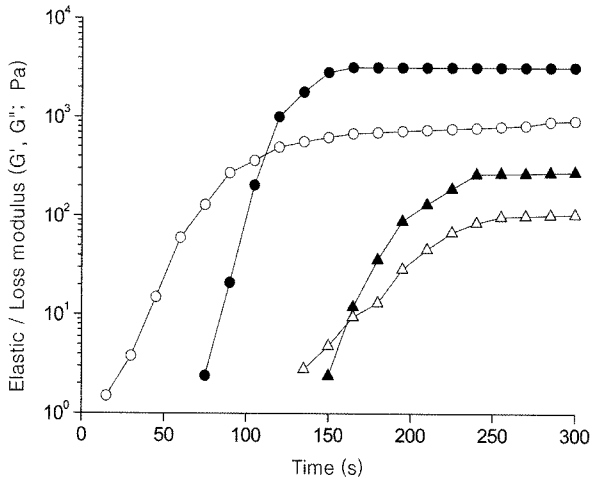


Figure 3—Effect on time on the viscoelastic properties of TSS prepared with chitosan B and D. ▲; Elastic modulus (B), △; Loss modulus (B), ●; Elastic modulus (D), ○; Loss modulus (D).

투여되었을 때 겔화가 일어나는 시간을 예측할 수 있어 중요하다.¹²⁾ TSS(B)의 경우 겔화가 약 160초에 일어났으나 TSS(D)는 이보다 더 빠른 약 100초에 일어나, 키토산 분자량이 겔화시간에 영향을 주었다. 즉, 키토산 분자량은 겔화 온도에 영향을 주지 않았으나 겔화시간에는 영향을 주었다 (Table I 및 Figure 3). 이것은 분자량이 큰 키토산의 경우 키토산 분자간의 소수결합 및 수소결합 반응기가 더 많아 결합을 신속하고 강하게 하기 때문이라고 사료된다.⁵⁾

TSDDS로부터의 약물 방출 및 분해

TSDDS 및 AAP-C 겔의 방출실험은 cell method 및 dialysis sac method를 준용하여 행하였다. 이 결과는

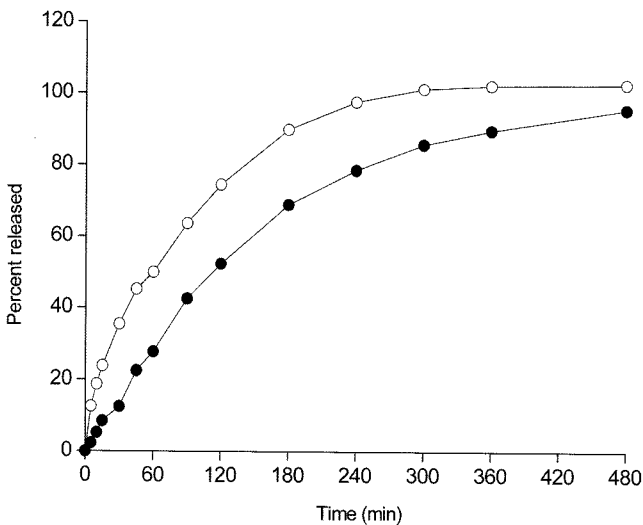


Figure 4—Release of AAP from TSDDS and AAP-chitosan gel using a cell method. ●; TSDDS, ○; AAP-chitosan gel.

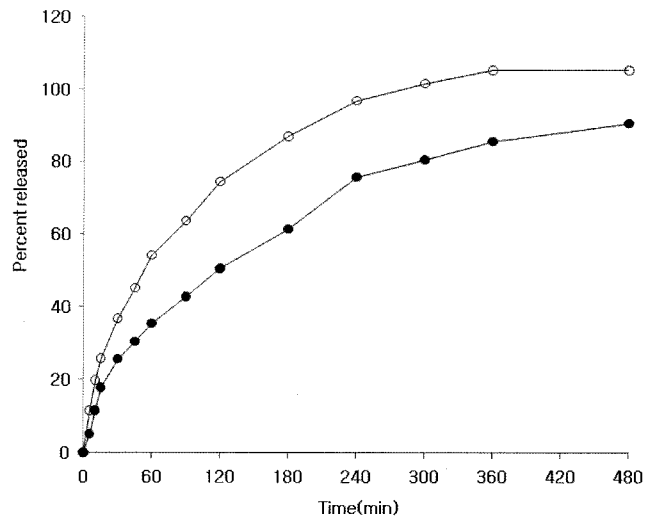


Figure 5—Release of AAP from TSDDS and AAP-chitosan gel using a dialysis sac method. ●; TSDDS, ○; AAP-C gel.

Figures 4 및 5에 나타내었다. 두 가지 방법 모두에서 TSDDS의 t_{50%}는 약 120분으로 AAP-C 겔의 약 60분 보다 약 2배 느리게 나타났으며, 4시간에 TSDDS는 약 80%, AAP-C 겔은 전부 방출되어 TSDDS 및 AAP-C 겔 모두 전반적으로 초기 방출속도가 빨랐다. 그러나 TSDDS는 4시간 이후에도 지속적인 방출 양상을 보이는데 이는 37°C에서 키토산과 GP와의 반응으로 분자간 결합(수소결합 및 소수결합)으로 형성된 겔이³⁻⁵⁾ AAP 주위를 둘러싸게 되어 AAP의 확산에 대한 장애물 역할을 하여 방출이 지속화되는 것으로

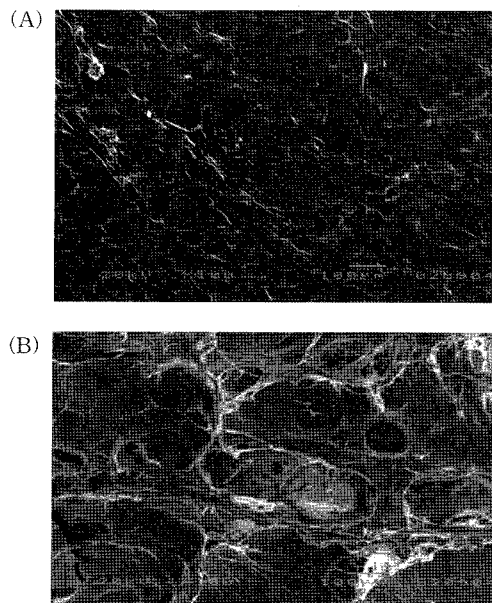


Figure 6—Scanning electron micrographs of TSDDS before and after dissolution test (X 60). (A), 0 hr; (B), 8 hr.

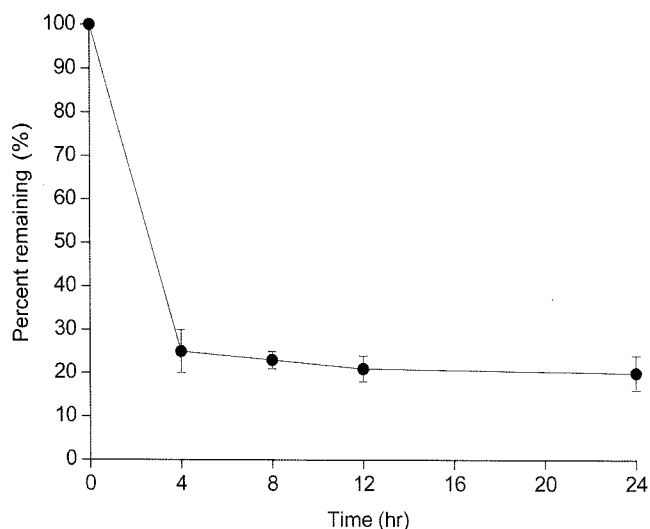


Figure 7—Mean *in vitro* mass loss profile of TSDDS in pH 7.4 phosphate buffer solution (n=6). Each bars represent mean±S.D..

사료된다. AAP-C 겔의 경우에도 방출실험 용매의 확산으로 인해 pH가 상승하면 키토산이 고형화되어 약물방출이 지속될 것으로 예상되지만 키토산 고형화 보다 초기의 burst release가 먼저 일어나 초기 AAP 방출이 빠른 것으로 사료된다.⁴⁾

Cell method로 방출실험 후 TSDDS의 겔 표면을 SEM으로 관찰한 결과 pore가 형성되어 있음을 알 수 있었다 (Figure 6).

또한, pH 7.4인 PBS에서 분해 실험한 결과, TSDDS는 처음 4시간에 대부분이 분해되어 처음 무게의 약 80%가 분해되었고, 다음 20시간 동안에 약 5%정도 분해되었다 (Figure 7). 히드로겔로부터 약물의 방출은 pore size, 분해정도, 크기, 친유성 (hydrophobicity), 약물의 농도 및 히드로겔과 봉입된 약물의 결합 등에 의해 영향을 받는다.¹⁹⁾ 특히, 키토산과 같이 분해되는 히드로겔 경우의 전형적인 방출양상은 초기에는 확산에 의한 방출이 일어나고, 이후에는 확산과 분해의 복합적인 기전에 의해 방출이 일어난다.²⁰⁾

위의 결과들로부터 TSDDS에서 AAP 방출은 4시간 후에 75~81% 정도이고, TSDDS의 분해는 처음 4시간에 80%인 것을 볼 때, TSDDS으로부터의 약물 방출은 pore를 통한 확산, 분해 및 AAP의 물리화학적 성질 등에 의해 영향을 받는 것으로 사료된다.²¹⁾

결 론

키토산을 glycerophosphate sodium salt로 중성화시킨 용액(C-GP용액)으로 제조하고, 겔화온도, 겔화시간, 유동학적

성질을 측정하여 최적의 temperature sensitive system (TSS)를 제조하였으며 아세트아미노펜을 봉입하여 체내 적용에 적합한 TSDDS를 제조하였다. TSDDS의 방출실험 및 분해실험을 하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 최적의 TSS는 키토산(중량평균분자량 731,775, 탈아세틸화도 99%)을 45% GP로 pH 약 7.1로 중성화하여 제조하였으며, TSS는 생체투여에 적합한 겔화온도(30~36°C)와 점도를 보였으며, 유동학적 성질을 측정한 결과 37.2°C에서 겔 구조를 유지함을 확인하였다. 이 때 겔화온도는 키토산의 탈아세틸화도 및 TSS의 pH에 영향을 받았으며 키토산의 분자량은 겔화시간에 영향을 주었다.

2. TSDDS의 $t_{50\%}$ 는 약 120분으로 AAP-키토산겔의 약 60분 보다 2배 느렸으며 TSDDS 표면에 pore가 생성되었다. 분해실험 결과 처음 4시간에 대부분이 분해되어 처음 무게의 약 80%가 분해되었고, 다음 20시간 동안에 약 5%가 분해되었다.

감사의 말씀

이 논문은 보건장학회의 지원에 의해 연구되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 1) M. Malmsten and B. Lindman, Self-assembly in aqueous block copolymer solutions, *Macromolecules*, **25**, 5440-5445 (1992).
- 2) B. Jeong, Y. H. Bae and S. W. Kim, Drug release from biodegradable injectable thermosensitive hydrogel of PEG-PLGA-PEG triblock copolymers, *J. Control. Release*, **63**, 155-163 (2000).
- 3) A. Chenite, C. Chaput, D. Wang, C. Combes, M. D. Buschmann, C. D. Hoemann, J. C. Leroux, B. L. Atkinson, F. Binette and A. Selmani, Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels *in situ.*, *Biomaterials*, **21**, 2155-2161, (2000).
- 4) E. Ruel-Gariepy, A. Chenite, C. Chaput, S. Guirguis and J. C. Leroux, Characterization of thermosensitive chitosan gels for the sustained delivery of drugs, *Int. J. Pharm.*, **203**, 89-98 (2000).
- 5) A. Chenite, M. Buschmann, D. Wang, C. Chaput and N. Kandani, Rheological characterisation of thermogelling chitosan/glycerol-phosphate solutions, *Carbohydr Polym.*, **46**, 39-47 (2001).
- 6) J. Wu, Z. Su and G. Ma, Thermo- and pH-sensitive hydrogel composed of quaternized chitosan/glycerophosphate, *Int. J. Pharm.* **315**, 1-11 (2006).
- 7) H. Struszyk, D. Wawro, Niekraszewicz., C. J. In Brine, P.

- A. Sandford and J. P. Zikakis, *Advances in chitin and chitosan*, Elsevier Applied Science, London, pp. 580 (1991).
- 8) N. V. Majeti and R. Kumar, A review of chitin and chitosan applications, *React. Funct. Polym.*, **46**, 1-27 (2000).
 - 9) I. Henriksen, K. L. Green, J. D. Smart, G. Smistad and J. Karisen, Bioadhesion of hydrated chitosans; an *in vitro* study, *Int. J. Pharm.*, **145**, 231-240 (1996).
 - 10) N. V. Majeti and K. Ravi, A review of chitin and chitosan applications, *React. Funct. Polym.*, **46**, 1-27 (2000).
 - 11) K. Edsman, J. Carlfos, R. Petersson, Rheological evaluation of poloxamer as an *in situ* gel for ophthalmic use, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **6**, 105-112 (1998).
 - 12) D. S. Jones, Dynamic mechanical analysis of polymeric systems of pharmaceutical and biomedical significance, *Int. J. Pharm.*, **179**, 167-178 (1999).
 - 13) Pharmaceutical Technical Procedures in European Pharmacopeia 3rd ed. Supplement, pp. 85-86 (2000).
 - 14) H. Tomida, M. Shinohara, N. Kuwada and S. Kiryu, *In vitro* release characteristics of diclofenac and hydrocortisone from Pluronic F-127 gels, *Acta. Pharm. Suec.*, **24**, 263-272 (1987).
 - 15) M. Yamazaki, S. Itoh, T. Yasui, S. C. Khee, H. Samon and K. Tanabe, Effect of temperature on the release of commercially available acetaminophen suppository, *Yakuzaigaku*, **54**, 227-231 (1994).
 - 16) N. Avoyagi, N. Kaniwa and M. Uchiyama, Inter-laboratory reproducibility of release tests for suppositories, *Drug. Devel. Ind. Pharm.*, **21**, 176-183 (1996).
 - 18) A. Bilia, V. Carelli, G. D. Colo and Nannipieri, E., *In vitro* evaluation of a pH-sensitive hydrogel for control of GI drug delivery from silicone-based matrices, *Int. J. Pharm.*, **130**, 83-92 (1996).
 - 19) P. He, S. S. Davis and L. Illum, *In vitro* evaluation of mucoadhesive properties of chitosan microspheres, *Int. J. Pharm.*, **145**, 231-240 (1992).
 - 20) R. Baker, In: *Controlled Release of Bioactive Materials*, Academic, New York, pp. 15 (1986)
 - 21) B. Jeong, Y. H. Bae and S. W. Kim, Drug release from biodegradable injectable thermosensitive hydrogel of PEG-PLGA-PEG triblock copolymers, *J. Control. Release*, **63**, 155-163 (2000).