Journal of Dental Hygiene Science Vol. 10, No. 2 pp. 79~83 (2010)

한국치위생과학회
THE KOREAN SOCIETY OF DENTAL HYGIENE SCIENCE

케토롤락과 치자엑스 가수분해물이 함유된 하이드로겔제의 물성 및 생체 부착성

김미정†
전주비전대학 치위생과

Property and Bio-adhesiveness in Hydrogel Material with Content of Ketorolac and Gardeniae Fructus Hydrolysis Products

Mi-Jeong Kim†
Department of Dental Hygiene, Vision University of Jeonju, Jeonju city 560-760, Korea

Abstracts This study manufactured hydrogel, which was contained NSAIDs(non-steroidal anti-inflammatory drugs) Ketorolac tromethamine and hydrolyzed products of gardeniae fructus extract, and experimented viscosity, surface tension, tensile strength and bio-adhesiveness by using hairless mouse. Thus, it was performed in expectation for being probably able to develop as effective auxiliary agent of periodontal disease after non-surgical or surgical periodontal treatment. As a result, the following conclusions were obtained. 1. Out of KGE and KGH gel materials, the content of ketorolac tromethamine was 1.02~0.97%. The content of geniposide was 0.34% in KGE gel A and C. However, it got lower to 0.11% in KGH gel B and D. The content of genipin wasn't shown in KGE gel A and C, but was shown with 0.13% in KGH gel B and D. 2. As for viscosity according to temperature in gel material, the gel, which used independently Carbopol 940 as gel inoculant, maintained the higher viscosity than the gel, which added Poloxamer 407. The surface tension in each material showed 34.77~40.58 dyne/cm at 37. As for tensile strength in material, KGH gel B was shown the higher tensile strength in about 3.5 times compared to the control group. 3. As for bio-adhesiveness, the back-skin upper part(epidermis) and abdomen skin were shown to be 50.62 N in KGH gel B, thereby having indicated higher value in about 5 times compared to control group. The back-skin lower part(dermis) and abdomen skin were shown to be 35.93 N in KGH gel B, thereby having indicated higher value in about 3.5 times compared to control group.

Key words Bio-adhesiveness, Hydrogel, Hydrolysis products

서 론

치주염은 치주조직에 광범위하게 나타나는 염증성 질환으로 치주결합조직, 치주인대 및 치조골이 치태내 세균에 의해 파괴되어 결국에는 치아를 상실하게 된다[1]. 치태세균은 다수의 염증 mediator를 유리하게 되고 호중구의 흐름을 증가시켜 치태세균과 반응하여 염증을 형성한다. 치주질환의 치료방법은 치석제거술과 치근활택술(Scaling and Root Planing:SRP)같은 비외과적 치주치료와 치주수술 등 외과적 치주치료로 구분되며 이러한 치주치료 후 임상부착수준의 증진, 치주낭 깊이의 감소 및 치은염 지수가 감소되었다는 보고가 있다[2]. 보조적으로 치주치료 후 국소약물송달시스템을 이용하여, 치주낭이 형성된 부위에 직접 항생제를 주입하는 방법이 있으며[3,4] 이러한 보조적인 방법은 치주질환치료에 효과적으로 적용되고 있다. 최근의 임상연구에서는 비스테로이드성 소염진통제계의 약물들이 치주염 환자들의 치조골 소실을 억제한다고 보고하고 있다[5]. 이들 비스테로이드성 소염진통제계 약물 중에서 특히 ketorolac tromethamine은 치주염에 나타나는 특징적인 현상인 치조골이 파괴되는 것을 저지하는 효과가 뛰어나고 진통작용을 나타내며 항염증 효과를 가지고 있는 약물 로[6,7] 수용성, 점막무자극성 및 무미 등의 특성을 가지고 있어 치주염 치료제로 가장 적합한 약물이라고 할 수 있다[8]. 치주낭의 내측은 열구상피로 되어 있으며 구강점막을 통한 약물 수송은 일반 피부보다 약물의 흡수가 비교적 용이 하다고 볼 수 있으나[9] 구강은 타액이 존재하여 항상 젖어 있어 구강에 적용되는 제제는 타액과 열구액에 의해 제형이 용해되어 흘러내리거나 희석되어 치료효과가 지속되기 어렵고, 일정량의 약물투여가 곤란한 점이 있다. 이러한 단점을 극복하기 위하여 필름형성

†Corresponding author
Tel: 063-220-4101
Fax: 063-220-4109
E-mail: kimmj@jvision.ac.kr

약물함유층으로 구강상피에 부착되어 약물을 전달하는 하이드로겔 제제가 적합한 것으로 알려져 있다[10].

하이드로겔 제제는 물과 접촉하였을 때 팽윤되며 친수성 폴리머로 생체적응력이 우수하고 약물투과도의 조절능력을 지니므로 약물송달체로서의 활용성이 높다.

치자(Gardeniae Fructus)는 꼭두서니과(Rubiaceae)에 속하는 치자나무(*Gardenia jasminoides* Ellis)의 열매로서 한방에서 황달, 간질환 및 소염제로 사용되어 왔다[11]. 주성분으로는 iridoid glycoside인 geniposide와 gardenoside를 비롯하여 crocin, genipiodisic acid, shanzhiside, genipin 등을 함유하고 있다[12]. 성 등[13]은 치자의 주성분인 geniposide를 가수분해 하여 생성된 genipin이 생체조직과 교차결합을 일으키는 것으로 보고하였다.

따라서 본 연구는 치자엑스 주성분 중 가장 많이 함유된 geniposide를 β-glucosidase를 사용하여 genipin으로 전환시켜 지용성을 증가시킴으로서 피부투과를 촉진시키며 소염진통제인 ketorolac tromethamine을 첨가하여 치주낭에 부착성과 약물 흡수성이 높은 하이드로겔제를 제조한 다음 점도측정, 표면장력 및 생체부착성 실험을 통하여 치주질환치료제 개발을 위한 기초 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

1. 시약 및 기기

Ketorolac tromethamine(이하 KT)은 동국제약에서 공급받아 사용하였고, 치자(Gradeniae Fructus)는 시중에서 구입하여 사용하였으며, geniposide, genipin 및 β-glucosidase 표준품은 Sigma Chemical Co.,(U.S.A) 제품을 사용하였다. Carbopol 940과 poloxamer 407은 BASF Co., 에서 구입하여 사용하였으며, 기타 시약은 특급 및 일급 시약을 사용하였다.

사용된 기기로는 KT와 치자의 분석을 위해 HPLC (M920, Youngin Co., Korea), 점도측정을 위해 Viscometer (Brook Lab, Inc.,), 표면장력시험을 위해 Surface tension tester(Model 3010, yoshida, Co., Japan), 생체부착성 실험을 위해 Instron material testing machine (Canton, Massachusetts)을 사용하였다.

2. 실험동물

Hairless mouse(웅성, 25±5 g, Charles River Lab., USA)와 S.D계 랫트(웅성, 200±20 g, 대한실험동물센터, Korea)를 분양받아 사용하였으며, 사육실 온도는 25±1, 습도 55±10%를 유지하였고, 명암은 12시간 주기로 하였다. 고형사료와 물은 자유롭게 먹도록 하였다.

3. Ketorolac tromethamine이 함유된 치자 하이드로겔의 제조

KT 함유 치자 하이드로겔의 제조(이하 KGE gel)는 KT를 정제수에 용해시키고 따로 치자엑스 분말을 정제수에 녹인 후 위의 용액에 가해주고 Propylene glycol, Labrosol, Ethanol를 순차적으로 가하여 혼합한 후 Carbopol 940을 넣어 팽윤시키고 냉장고에서 4로 24시간 반응시킨 다음, Triethanolamine을 가하여 pH 7.0으로 하여 gel을 제조하였다. KT함유 치자 가수분해물 하이드로겔의 제조(이하 KGH gel)는 먼저 치자엑스 분말과 β-glucosidase를 50℃에서 2시간 반응시킨 다음 KT용액에 가하고 이하 KGE gel과 동일한 방법으로 제조하였다[14](Figure 1).

4. 점도측정시험

KGE 및 KGH gel 제의 점도를 비교하기 위하여 Brook-Field Viscometer를 사용하여 50, 37, 20 및 4℃에서 점도를 측정 비교하였다.

5. 표면장력시험

KGE 및 KGH gel 제의 표면장력을 비교하기 위하여 Surface tensiometer를 사용하였으며, 시료 측정값의 평균

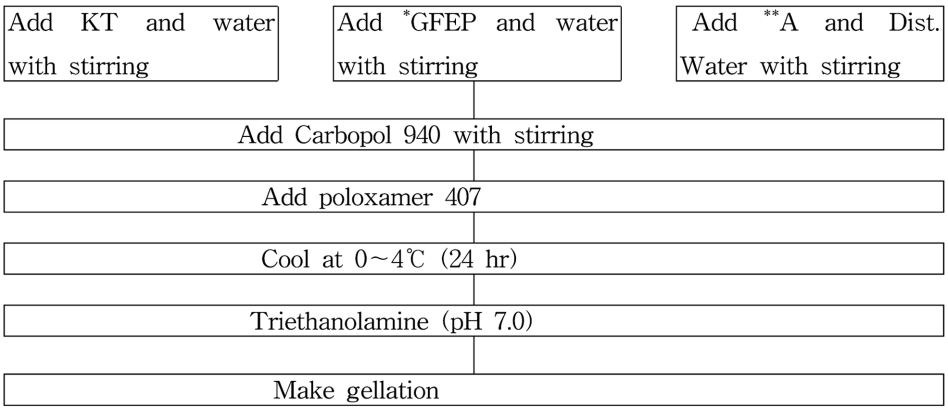

Fig. 1. Preparation procedure of formulations of ketorolac tromethamine hydrogels containing gardeniae fructus extracts or its hydrolysis products
***GFEP : Gardeniae Fructus Extract Powder, **A : Propylene glycol, Labrosol, Ethanol**

(X)을 (1)식에 대입하여 측정장치중의 한계계수(Y)를 구하였고, 다시 (2)식을 통하여 표면장력값을 산출하였다.

$$Y = 72.75/X \quad (1)$$

$$\text{표면장력값(dyne/cm)} = X \cdot Y \quad (2)$$

X= 읽은 눈금의 평균값

Y= 한계계수

6. 생체 부착성 시험

KGE 및 KGH gel 제제의 생체조직과의 부착성을 비교하기 위하여 무균실에서 Hairless mouse 등피부를 넓이 30로 절개하여 KGE 및 KGH gel 1 g을 등피부 상부(표피층) 20 mm부위에 도포하고, 동일 hairless mouse 배피부를(진피층) 넓이 30 mm로 절개하여 gel 도포부위에 양피부면 10 mm씩 노출되도록 부착하였다. 다른 Hairless mouse 등피부를 넓이 30 mm로 절개하여 KGE 및 KGH gel 1 g을 등피부 하부(진피층) 20 mm 부위에 도포하고, 동일 Hairless mouse 배피부를(진피층) 넓이 30 mm로 절개하여 gel 도포부위에 역시 10 mm씩 노출되도록 부착한 후 무균실에서 일주일간 보관한 후 Instron material testing machine을 사용하여 생체부착부위에 작용하는 힘(N)으로 구하였다.

결과 및 고찰

1. KGE 및 KGH gel 제제

하이드로겔제는 물과 접촉하였을 때 팽윤되며 그 구조내에 물을 함유할 수 있는 폴리머로 화학결합, 이온성 상호작용, 수소결합 및 소수성상호작용 같은 결합력에 의해 교차결합 되는 친수성 폴리머로 생체적응성이 우수하고 약물투과도의 조절력을 가지고 있어 약물송달체로 활용성이 높다. 만성치주염의 증상으로 나타나는 치주낭내에 하이드로겔제를 적용함으로써 약물의 침투효과를 기대하여 겔제를 제조하였다. KT의 용해도는 실온에서 물에 500 mg/ml 이상이며, pKa는 수용액에서 3.54이다. KGE gel 제조는 gel 화제로 Carbopol 940을 사용하였으며, Triethanolamine을 가하여 pH 7.0으로 조정하여 일정한 점도를 유지하였다(Table 1. A, C). KGH gel의 제조는 먼저 치자엑스분말에 β-glucosidase를 가하여 주성분을 가수분해 시킨 다음 gel 기제에 가해 주었다(Table 1. B, D).

2. 주성분의 함량

Gel 제제의 KT 함유량은 각 제제에서 0.97~1.02로 나타났다.

KGE gel A, C의 Geniposide 함유량은 0.34% 이었으나, Genipin은 검출되지 않았고, KGH gel B, D의 Geniposide 함유량은 0.11%인 반면, Genipin의 함유량은 0.13%로 나타나 치자의 Geniposide가 가수분해되어 Ggenipin으로 변화되는 것을 알 수 있었다(Table 2).

Table 1. Formulas of ketorolac tromethamine hydrogels containing gardeniae fructus extracts or its hydrolysis products

	Formulations			
	A	B	C	D
KT	1.0	1.0	1.0	1.0
*GFEP	1.0	-	1.0	-
**GFEP(HP)	-	1.0	-	1.0
Carbopol 940	1.0	1.0	1.0	1.0
Poloxamer 407	-	-	10.0	10.0
Propylen glycol	20.0	20.0	10.0	10.0
Labrasol	10.0	10.0	10.0	10.0
Ethanol	10.0	10.0	10.0	10.0
Triethanol amine	2.0	2.0	2.0	2.0
Dist. Water	q.s	q.s	q.s	q.s
β-glucosidase	-	370 unit	-	370 unit
Total	100.0	100.0	100.0	100.0

*GFEP: Gardeniae Fructus Extract Powder
**GFEP(HP): Gardeniae Fructus Extract (Hydorlysis products)

Table 2. Comparison of contents of ketorolac tromethamine, geniposide and genipin in

Formulations	Concentration (%)		
	KT	geniposide	genipin
A	1.02	0.34	-
B	1.01	0.11	0.13
C	0.98	0.34	-
D	0.97	0.11	0.13

*KGE and **KGH hydrogels
*KGE : ketorolac tromethamine containing gardeniae fructus extracts (A, C)
**KGH : ketorolac tromethamine containing hydrolysis products of gardeniae fructus extracts (B, D)

3. 점도

KGE 및 KGH gel 제제의 레올로지를 검토하기 위하여 점도 측정결과를 비교해본 결과 온도별로 큰 차이를 나타내었는데 KGE gel A 와 KGH gel B의 경우 50°C에서 16,666 및 13,540 cps인 반면 20°C에서는 36,720 및 29,400 cps로 높아졌고, KGE gel C와 KGH gel D의 경

Table 3. Viscosity of KGE and KGH hydrogels under various temperatures by spindle number RV 5 of Brookfield viscometer(Factor : 400)

Formulations	Viscosity (cps)			
	50°C	37°C	20°C	4°C
A	16,666	25,200	36,720	40,000
B	13,540	20,040	29,400	35,800
C	9,250	12,150	15,666	19,933
D	13,160	17,850	21,750	27,740

우 50℃에서 9,250 및 13,160 cps인 반면 20℃에서는 15,666 및 21,750 cps로 나타남으로써 KGE gel A와 KGH gel B에 비해서 비교적 낮은 점도를 나타내었으며, 이는 Carbopol 940을 단독으로 사용한 gel이 Poloxamer 407을 추가한 것보다 더 높은 점도를 나타냈다(Table 3).

4. 표면장력

KGE 및 KGH gel제의 표면장력을 비교해보면 온도별로 상당한 차이를 보여주었는데 KGE gel A와 KGH gel B의 경우 37℃에서 40.58 및 38.06 dyne/cm인 반면, 20℃에서는 46.57 및 43.88 dyne/cm로 나타났고 KGE gel C와 KGH gel D의 경우 37℃에서 34.77 및 37.62 dyne/cm인 반면, 20℃에서는 38.18 및 39.59 dyne/cm로서 KGE gel A와 KGH gel B에 비하여 약간 낮은 수치를 보여주었는데 역시 Carbopol 940 단독 사용 gel에 비해서 Poloxamer 407을 추가한 gel이 상대적으로 낮은 표면장력을 나타냈다(Table 4).

따라서, 체온에서 gel제제를 도포할 경우 비교적 원활하게 약물을 도포할 수 있을 것으로 사료된다.

5. 생체 부착성

KGE 및 KGH gel제를 Hairless mouse 등피부 상부(표피층)와 배피부, 등피부 하부(진피층)와 배피부에 도포한 후 그 도포부위 피부의 생체부착력을 단위면적당 작용하는 힘(N) 값으로 구하였다. 등피부 상부(표피층)와 배피부의 생체부착력은 대조군의 경우 10.36 N이었는데 비해 KGH gel B, D의 경우 각각 50.62 및 47.49 N으로 나타나 KGE gel A, C에 비하여 훨씬 높은 성적을 보여주었다. 한편 등피부 하부(진피층)와 배피부의 생체부착력은 대조군의 경우 8.31 N 이었는데 KGE gel A, C의 경우 각각 18.42 및 15.46 N으로써 2배 정도 높아졌고, KGH gel D에서는 22.63 N이었으며, KGH gel B에서는 35.93 N으로 나타나 가장 높은 수치를 보여주었다 (Table 5). KGH gel B에서 대조군에 비해 5배 정도 높은 생체부착력(N)을 나타낸 것은 가수분해물 제제 중에 형성된 Genipin이 생물학적 세포조직을 고정하기 위해 효과적인 교차결합제로 작용할 수 있을 것으로 사료된다.

치주낭은 치주염의 특징적인 증상으로 하부 치조골을 파괴시키는 과정에서 중요한 역할을 하고 있으며, 형성된 치주낭은 회복하기가 어려우며, 회복된다 하더라도 오랜 시간이 걸리고 또 재발하기가 쉽다. 따라서 적절한 비외과적, 외과적 치주치료와 함께 치주낭에 직접 하이드로겔 제제를 질환부위에 적용함으로써 치료의 보조효과를 기대하였다.

이상의 실험결과를 통해 Ketorolac tromethamine과 치자엑스 가수분해물을 복합하여 하이드로겔 제제로 제조할 경우 Ketorolac tromethamine의 우수한 항염작용과 함께 Geniposide가 지용성이 높은 Genipin으로 전환되어 피부투과도를 촉진시키고, 구강점막의 부착성을 증가시켜 치주낭 부위에 투여할 경우 항염 및 진통 효과, 치조골의 재흡수 억제를 가져올 수 있을 것으로 사료되며 비외과적, 외과적 치주치료 후 효과적인 보조치주염치료제로 개발할 수 있을 것으로 기대된다.

그러나 본 실험의 제한점으로는 구강상피가 아닌 Hairless mouse 등피부를 이용하여 실험을 하였기 때문에 약물전달시스템에서 다소 차이가 있을 것으로 보이며 계속적인 연구방법을 개발해야 할 것으로 본다.

Table 4. Surface tension of KGE and KGH hydrogels under various temperature

Formulations	Surface Tension (dyne/cm)			
	50	37	20	4
A	35.29±1.56	40.58±0.96	46.57±1.78	54.57±1.89
B	35.14±1.89	38.06±1.57	43.88±0.76	50.26±0.96
C	31.52±1.45	34.77±1.55	38.18±0.86	42.67±1.88
D	34.96±1.75	37.62±1.56	39.59±0.68	44.88±1.19

Each data represents the mean±SD from 5 experiments

Table 5. Adhesion of hairless mouse skin after treatment with KGE and KGH hydorgels

Formulations	Load at Break (N)	
	Back(*EPD) : Belly	Back(**END) : Belly
Control	10.36±1.22	8.31±1.42
A	37.19±0.98	18.42±1.20
B	50.62±1.06	35.93±1.09
C	15.92±1.02	15.46±1.15
D	47.49±1.30	22.63±1.31

Each data represents the mean±SD from 5 experiments
*EPD : Epidermic layer
**END : Endodermic layer

요 약

소염진통제인 Ketorolac tromethamine에 치자엑스 복합제제를 혼합하여 4종의 하이드로겔을 제조한 다음 주성분의 확인, 점도, 표면장력, 인장강도 및 생체부착성 실험을 통해 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. KGE 및 KGH gel 제제 중 Ketorolac tromethamine의 함량은 1.02~0.97%이었고, Geniposide의 함량은 KGE gel A와 C에서 0.34%이었으나, KGH gel B와 D에서 0.11%로 낮아졌고, Genipin의 함량은 KGE gel A와 C에서는 나타나지 않았으나, KGH gel B와 D에서 0.13%로 나타났다.
2. Gel 제제의 온도에 따른 점도는 gel 화제로 Carbopol 940을 단독으로 사용한 gel이 Poloxamer 407을 추가한 gel보다 더 높은 점도를 유지하였으며, 각 제제에서의 표면장력은 37℃에서 34.77~40.58 dyne/cm를 나타냈다. 제제의 인장강도는 KGH gel B에서 대조

군에 비하여 3.5배 정도 높은 인장강도를 나타냈다.

3. 생체부착성은 등피부 상부(표피층)와 배피부의 경우 KGH gel B 에서 50.62 N으로 나타나 대조군에 비해 5배 정도 높은 수치를 나타내었고, 등피부 하부(진피층)와 배피부의 경우 KGH gel B의 에서 35.93 N으로 나타나 대조군에 비해 3.5배 정도 높은 수치를 나타냈다.

참고문헌

1. Song KB et al.: The relationships between periodontal indices and oral hygiene behaviour and knowledge about periodontal disease after periodontal treatment. J Korean Academy of Dental Health 26(1): 101-115, 2002.
2. Baek YR et al.: The effects of vitamin-C containing neutraceutical on periodontal wound healing as an adjunct to non-surgical or surgical periodontal treatment. J Korean Acad Periodontol 39(2): 157-166, 2009.
3. Larsen T: In vitro release of Doxycycline from Bioabsorbable materials and acrylic strips. J Periodontol 61(1): 30-34, 1990.
4. Minabe M et al.: Application of a local drug delivery system to periodontal therapy: 1. Development of collagen preparations with immobilized tetracycline. J Periodontol 60(2): 113-117, 1988.
5. Williams RC et al.: Altering the progression of human alveolar bone loss with the non steroidal anti-inflammatory durg flurbiprofen. J Periodontol 60(9): 485-490, 1989.
6. Buckley MMT, Brogden RN: Ketorolac, A review of its pharmacodynamic and Pharmacokinetic properties and therapeutic potenital. Drug 39(1): 86-109, 1990.
7. Grandos-Soto V et al.: Evidence against the participation of μ-and -opioid receptors in the analgesic activity of ketorolac in rats. J Pharm Pharmacol 47(6): 514-517, 1995.
8. Jeffcoat MK et al.: A comparison of topical ketorolac, systemic flurbiprofen, and placebo for the inhibition of bone loss in adult periodontitis. J Periodontol 66(5): 529-337, 1995.
9. Chun MK, Kwak BT, Choi HK: Preparation of buccal patch composed of carbobol, poloxamer and hydroxypropyl methylcellulose. Arch Pharm Res 26(11): 973-978, 2003.
10. Nam HG, Lee CH, Shin YH: Effect of skin penetration enhancer on the drug release from indomethacin-soft hydrogel. J Kor Pharm Sci 32(1): 35-40, 2002.
11. Akao T, Kobashi K, Aburada M: Enzymatic studies on the animal and intestinal bacterial methabolism of geniposide. Biol Pharm Bull 17(12): 1573-1576, 1994.
12. Kawata Y et al.: Formation of nitrogen containing metabolites from geniposide and gardenoside by human intestinal bacteria. Planta Med 57(6): 536-542, 1991.
13. Sung HW et al.: In vitro surface characterization of a biological patch fixed with naturally occurring crosslinking agent. Biomaterials 21(13): 1353-1362, 2000.
14. Kim MJ : Skin permeation and periodontits alleviation effect of hydrogel containing ketorolac tromethamine and hydrolysis products of gardeniae fructus. J of Dental Hygiene Science 5(3): 113-117, 2005.

(Received March 18, 2010; Revised April 14, 2010; Accepted April 15, 2010)