

## 백당으로 가교된 폴리아크릴산 하이드로겔의 *In vitro* 점막부착력 평가

이재휘 · 김선영 · 이은석 · 이민석 · 김형수 · 최영욱\*

중앙대학교 약학대학

(2006년 2월 22일 접수 · 2006년 3월 13일 승인)

### *In vitro* Mucoadhesion Evaluation of Poly(Acrylic Acid) Hydrogel Crosslinked with Sucrose

Jaehwi Lee, Sun Young Kim, Eun Seok Lee, Min Suk Lee, Hyung Soo Kim and Young Wook Choi†

College of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea

(Received February 22, 2006 · Accepted March 13, 2006)

**ABSTRACT** – Poly(acrylic acid) (PAA) was identified to possess good mucoadhesive properties ensuring its application to extend the retention times of the formulations at the oral cavity, intended route of administration using the polymer. In the noncross-linked state, PAA will swell and become eroded owing to the presence of salivary flow from the site of application. The formation of cross-links between the polymer chains will allow swelling but prevents the erosion of the dosage form. In the current study, cross-linking was achieved by esterification of the PAA chains with sucrose. The density of cross-linking was modified by changing sucrose concentration and the duration of cure time. The cross-linking density of the polymer hydrogel was assessed by equilibrium swelling studies. The mucoadhesion testing method allowed a comparative study of the hydrogels prepared. An inverse relationship between equilibrium swelling and peak detachment force showed that increased PAA chain density per unit area enhanced the mucoadhesive interaction.

**Key words** – Hydrogel, Poly(acrylic acid), Sucrose, Swelling, Mucoadhesion

구강점막을 통한 약물의 전달효율을 높이기 위해서는 제제의 점막부착력의 증대가 매우 증대한 요소가 된다. 제제의 점막부착력 증대를 통해 약물 또는 약물전달 시스템의 타액에 의한 세척(washout) 효과와 이후의 약물 또는 제제의 삼킴 현상이 상당부분 억제될 수 있다. 점막부착(mucoadhesion)은 물질의 생체 점막표면, 특히 점막표면을 덮고 있는 점액질에 대한 부착력을 표현하는 용어이며 점막부착 현상은 대개 연체나 물의 존재 하에 일어난다.<sup>1)</sup> 지금까지 구강점막부착성 제제의 제조에 사용된 점막부착력이 보고된 고분자물질들로는 Carbopol 934P, 카르복시메틸셀룰로오스나트륨, 히드록시프로필셀룰로오스, 히드록시에틸셀룰로오스 등이 있다.

하이드로겔은 물과의 접촉에 의해 팽윤하여 3차원 네트워크 구조 내에 상당량의 물을 체류시킬 수 있는 고분자 구조물을 칭한다. 본 연구에서는 약물의 구강점막 수송을 위한 점막부착성 하이드로겔 제조에 450 kDa의 직쇄상 폴리아크릴산(polyacrylic acid)을 사용하였다. 폴리아크릴산은 그 자체가 점막부착성이고,<sup>2)</sup> 가교제를 사용하여 하이드로겔을 제

조할 수 있으며 점막부착성 정제, 젤 제제 및 용액제의 설계에 꾸준히 사용되어져 왔다.<sup>3,4)</sup> 폴리아크릴산이 가교되지 않은 상태로 구강 내로 투여되면 타액 등에 의해 고분자는 용이하게 팽윤하지만 곧 침윤되어 약물수송체로서의 능력을 상실하게 된다. 따라서 적용부위로부터 폴리아크릴산의 팽윤은 그대로 유지하면서도 폴리아크릴산으로 제조한 제제의 침윤손실을 억제하기 위해서는 고분자 체인을 가교하여 하이드로겔 상태로 만드는 것이 필요하다.

폴리아크릴산 하이드로겔은 아크릴산 모노머로부터 free radical polymerization을 통해 폴리아크릴산을 합성하고 이로부터 가교제를 첨가하여 하이드로겔을 합성하는 것으로 알려져 있으나 이 방법은 free radical polymerization에 필수적으로 사용되어지는 initiator의 사용을 배제하기 어려워 최종 산물에 잔류하게 되는 문제점이 있다. 따라서 본 연구에서는 고분자 형태인 폴리아크릴산을 출발물질로 사용하여 solvent casting 방법을 통해 하이드로겔을 제조하였으며 이 경우 최종 산물에 아크릴산 모노머나 initiator의 잔류를 방지할 수 있다.

폴리아크릴산의 가교제로는 methacrylic ester 및 polyol 등이 사용될 수 있으며 본 논문에서는 글리세롤의 primary

\*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
Tel : 02)820-5609, E-mail : ywchoi@cau.ac.kr

alcohol group이 폴리아크릴산과 용이하게 esterification 함에 착안하여 백당을 가교제로 사용하는 것을 시도하였다. 백당과 같은 탄수화물을 가교제로 사용하면 생체적합성이 증대되며 pH 또는 가수분해 효소의 존재 등 적용부위의 환경에 따라 생분해성 하이드로겔을 제조할 수도 있다.<sup>5)</sup>

생체의 조건에서 어떠한 물질의 점막부착성은 그 물질의 점탄성 거동, 분광학적 특성 및 기계적 기법 등에 의해 평가될 수 있으며 각 평가법의 특징은 Kellaway에 의해 보고된 적이 있다.<sup>6)</sup> 이들 중 처음의 두 방법은 잠재적인 점막부착성 물질과 점액을 구성하는 당단백질 용액의 상호작용을 조사하는 것이고, 기계적 기법은 점막상피세포 표면을 덮고 있는 점액물질에 대한 하이드로겔의 부착력을 인장력(tensile) 또는 전단력(shear stress) 측정을 통해 평가한다. 본 연구의 목적은 폴리아크릴산 하이드로겔의 점막부착력에 미치는 가교제의 농도와 그에 따르는 하이드로겔의 팽윤도와 제조방법, 특히 경화 처리시간(cure time)의 영향을 자체 제작한 점막부착력 측정장치(Figure 1)를 이용하여 기계적 기법으로 평가하는 것이다. 본 연구를 통해 구강점막 등의 투여경로로 약물을 전달할 때 충분한 점막부착력과 약물 탑재 능력을 갖춘 하이드로겔 조성을 선택할 수 있을 것으로 판단된다.

## 실험 방법

### 시약 및 기기

폴리아크릴산(분자량 450,000)은 BF Goodrich & Co. (미국)에서, 백당은 Sigma-Aldrich사(미국)로부터 구입하였다. 이 밖의 시약과 용매는 특급 또는 1급을 사용하였다. McIlvaine 구연산 완충액(pH 7.4)은 1.9 g/L의 무수구연산과 인산나트륨 12수화물( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) 65 g/L를 함유하였다.

### 백당으로 가교된 폴리아크릴산 하이드로겔의 제조

폴리아크릴산을 물과 아세톤의 혼합용매(25:75, v/v)에 용해시킨 후 증류수에 용해시킨 백당 용액을 Table I에서 정해진 양만큼 가하였다. 물과 아세톤의 혼합용매로 최종 용량을 150 mL로 맞추는 다음 8시간 동안 교반 하면서 가교반응을 시켰다. 가교반응을 시킨 후 물로 3회 세척하였다. 이 용액 15 g을 1 cm의 내경을 갖고 있는 유리로 만든 원형 틀에 부었다. 유리로 만든 원형틀은 실리콘 고무로 만든 매트 위에 올려 놓았고 실리콘 고무 매트와 유리로 만든 원형틀의 경계면은 백색 왁스를 녹여서 막아 고분자 용액이 흘러나오는 것을 방지 하였다. 감압건조기(40°C)에서 고분자 용액을

**Table I—Sucrose : Poly(acrylic acid) (PAA) Ratios of Hydrogels Cured at 90°C**

g Sucrose/ g PAA	Formulation Code			
	Cure time 4 h	Cure time 3 h	Cure time 2 h	Cure time 1 h
0.050	1 A	1 B	1 C*	1 D*
0.075	2 A	2 B	2 C	2 D*
0.100	3 A	3 B	3 C	3 D*
0.130	4 A	4 B	4 C	4 D*
0.150	5 A	5 B	5 C	5 D

Asterisk (\*) shows that the degree of cross-linking was insufficient to prevent dissolution in pH 7.4 buffer solution.

24 시간 동안 건조시켜 유리상의 건조 하이드로겔 디스크를 얻었다. 이 건조 하이드로겔 디스크를 90°C에서 2-4 시간 동안 건조기에서 경화(cure) 처리하여 최종의 유리상 하이드로겔 디스크를 얻었다.

### 백당으로 가교된 폴리아크릴산 하이드로겔의 팽윤시험

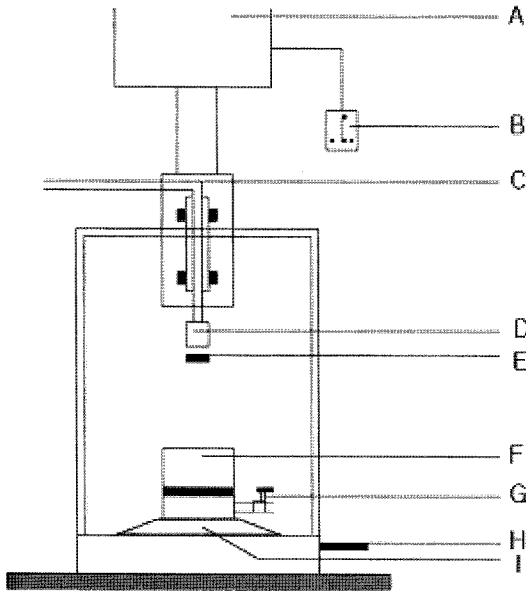
Table I의 조성으로 제조된 하이드로겔의 팽윤도는 McIlvaine 구연산 완충액(pH 7.4)을 사용하여 실온(약 20°C)에서 측정하였다. 제조된 하이드로겔 디스크를 200 mL의 완충액이 담겨진 비이커에 가해 팽윤시켜가면서 팽윤시작 후 0, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 90, 120, 150 및 180 분의 정해진 시간에 하이드로겔을 취하여 화장지로 표면에 부착된 수분을 제거한 후 하이드로겔의 중량을 측정하여 하이드로겔의 팽윤도를 다음의 식을 사용하여 구하였다.

$$\text{Swelling Ratio} = \frac{W_t}{W_0}$$

( $W_t$  = t시간후의 시료 중량,  $W_0$  = 최초 시료 중량)

### In vitro 점막부착력 측정

하이드로겔의 점막부착력은 Fig. 1의 장치를 사용하였다. Mucin 당단백과 pH 7.4 완충액(20% w/v)으로 제조한 점액질 0.3 g을 원형의 셀룰로오스 여과지(0.2 μm pore size, Sartorius Ltd., 영국)에 위에 놓고 이것을 점막부착력 측정셀(Figure 1-F)에 고정시켰다. 점막부착력 측정셀을 전자식 저울의 팬 위에 고정시킨 후 pH 7.4 완충액 내에서 평형 팽윤도에 도달한 하이드로겔 시료(Figure 1-D)를 진공펌프와 연결된 다공성 탐침(Figure 1-D)에 부착시켰다. 다공성 탐침은 시린지펌프에 의해 상하 왕복운동할 수 있도록 설치하였다. 하이드로겔 시료와 점액질의 부착이 완료된 후 탐침을 서서히 하강 시켜 하이드로겔과 점액질이 서로 접촉하자마자 저울의 눈금을 0으로 맞추었다. 그리고 나서 25 g의 중량



**Figure 1**—Schematic presentation of in vitro mucoadhesion testing apparatus (A: syringe pump, B: remote control for syringe pump operation, C: vacuum line, D: upper probe, E: hydrogel disk, F: lower mucoadhesion cell, G: vacuum line, H: data output to personal computer, I: chemical balance pan).

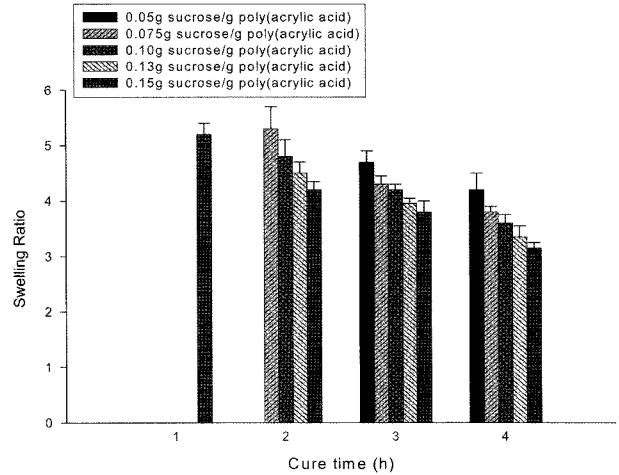
이 30 초간 가해지도록 탐침을 하강시킨 후 30 초가 경과하자마자 탐침을 40 mm/min의 속도로 상승시키면서 전자저울과 연결된 data capture program (WinWedge version 1.2, TAL Technologies Inc., 미국)을 통해 중량의 변화를 기록하였다. 이와 같이 접촉하고 있는 두개의 물질이 분리되는데 필요한 힘을 점막부착력의 지표로 삼았고 분리되는데 필요한 힘은 다음의 식을 이용하여 평가하였다.<sup>7)</sup>

$$\text{Detachment force (N/cm}^2\text{)} = \frac{[\text{maximum detachment weight (kg)} \times \text{acceleration due to gravity (m/s}^2\text{)}] / \text{contact area (cm}^2\text{)}}{}$$

**결과 및 고찰**

**백당으로 가교된 폴리아크릴산 하이드로겔의 제조 및 팽윤 특성**

백당으로 가교된 폴리아크릴산 하이드로겔을 제조할 때 추후 약물을 탑재하기에 충분한 팽윤도를 얻기 위해서는 가교제의 농도를 조절하는 것이 필요하다. 서로 다른 가교제의 농도가 하이드로겔의 형성에 미치는 영향은 하이드로겔의 평형 팽윤도 (equilibrium swelling ratio)를 구연산 완충액을 사용하여 실온에서 측정하여 조사하였다. Table I에서 보듯이 팽윤 시험에 사용된 하이드로겔 중 별표로 표시된 몇몇



**Figure 2**—Histogram demonstrating the dependency of the mean (n=3, ±S.D.) equilibrium swelling ratio on both cure time and cross-linker (sucrose) concentration.

조성은 충분한 기계적 강도를 갖지 못해 팽윤시험 도중 파괴되거나 용해되었다. 이들 하이드로겔은 고분자 용액으로부터 용매를 제거한 후 90°C에서 각각 다른 경화처리 시간 (cure time) 조건으로 제조 되었는데 특히 충분한 경화처리 시간을 거친 하이드로겔 (즉, 하이드로겔 A 및 B군)의 강도가 그렇지 못한 하이드로겔 (즉, 하이드로겔 D군) 보다 기계적 강도가 우수하였다. 경화처리 온도를 90°C로 선택한 이유는 이 보다 높은 온도에서는 경화처리 시간을 줄일 수 있지만 본 연구에서는 백당을 가교제로 사용하였기 때문에 백당이 카라멜화 되는 문제점이 발생한다. 예비실험을 통해 90°C 이하의 온도조건에서는 백당의 카라멜화가 발생하지 않음을 확인하고 90°C를 경화처리 온도로 정하였다.

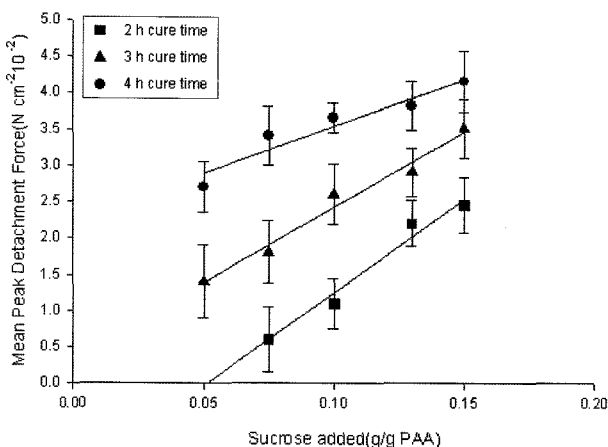
Figure 2의 팽윤도 측정결과를 보면 백당의 반응액 중 농도가 증대함에 따라 하이드로겔에서의 가교밀도가 직선적으로 증대되어 팽윤도가 감소하였음을 알 수 있었다. 또한 경화처리 시간 (cure time)을 늘릴수록 주어진 백당 : 폴리아크릴산 비에서 팽윤도가 감소함이 보여졌다. 가교밀도가 증대함에 따라 팽윤도가 감소함을 고려해 볼 때 경화처리 시간을 증대시킬수록 보다 많은 양의 백당이 폴리아크릴산의 가교에 참여하는 것으로 사료된다.

**백당으로 가교된 폴리아크릴산 하이드로겔의 점막부착력**

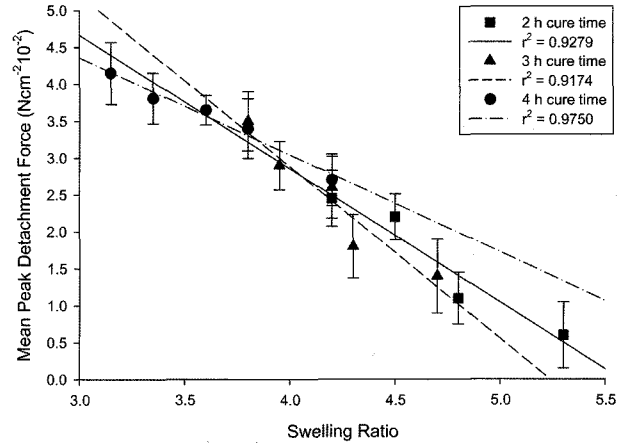
폴리아크릴산과 같은 polyacid 류에서는 점막부착력을 측정하는 pH가 고분자의 전하밀도와 고분자 체인의 운동성에 큰 영향을 미쳐 팽윤도를 변화시킨다. 또한, 점액질의 망상 구조도 점액질의 구성에 다수 존재하는 시알산기의 pKa 보다 높은 pH에서 느슨해 지거나 열리게 된다.<sup>8)</sup> 박과 로빈슨

은,<sup>1)</sup> polycarbophil의 점막부착력에 미치는 pH의 영향을 조사하였으나 본 연구에서는 하이드로겔을 pH 7.4 완충액에서 평형 팽윤도에 도달시킨 후 점막부착력 시험에 사용하였고 점액질도 mucin을 pH 7.4 완충액을 이용하여 제조함으로써, pH 변동에 따른 영향을 배제하였다. 또한, 본 연구의 후속연구로 폴리아크릴산 하이드로겔을 구강점막 부착형 약물전달시스템으로의 개발을 고려하고 있기 때문에 pH의 변동이 거의 없는 구강의 생리학적 환경 상 pH 변동에 따른 점막부착력의 영향을 평가하는 것은 본 연구의 목적과 큰 관련이 없다고 판단하였다. pH와 더불어 점막부착성 고분자와 점액질이 접촉할 때 발생하는 변수들도 점막부착력에 큰 영향을 미치기 때문에 이들의 영향을 점막부착력 평가 시 고려해야 한다. 고분자 물질과 점액질을 예비적으로 접촉시킨 후 이들을 분리할 때 필요한 힘의 측정을 통해 점막부착력을 평가하면 처음 두 물질이 접촉할 때 많은 힘을 가해 주면 고분자와 점액기질 사이의 상호침투와 얽힘이 크게 증대되어 결과적으로 고분자와 점액기질의 결합력을 증대시키고 이는 고분자의 점막부착력의 상승으로 나타난다. 따라서 본 연구에서는 이와 같은 영향을 최소화 하기 위해 점막부착력 측정 시 고분자와 점액기질이 접촉할 때 25 g±2g의 일정한 힘으로 접촉이 일어나게 하였다.

Figure 3에서 나타난 결과에서는 가교밀도가 증가할수록 점막부착력도 증가함을 보여주었고, 주어진 조성에서는 90 °C에서의 경화처리 시간이 길수록 고분자의 점막부착력도 증가하는 것으로 나타났다. 각각의 가교제의 농도에 따른 팽윤도의 변화에 대해 점막부착력을 도시하면 Figure 4에서와 같이 고분자의 팽윤도와 점막부착력이 역비례 함을 알 수 있었다. 이는 가교제의 양을 증가시키면 고분자 체인의 가교밀



**Figure 3**—The impact of cross-linker (sucrose) concentration on mean peak detachment forces (n=3, ±S.D.) of swollen poly(acrylic acid) hydrogels from reconstituted mucin (20%, w/v).



**Figure 4**—Relationship between equilibrium swelling ratio and mean peak detachment forces (n=3, ±S.D.) of swollen poly(acrylic acid) hydrogels from reconstituted mucin (20%, w/v).

도가 증대되고 이것이 pH 7.4에서 당단백 체인의 이동성 (mobility)이 증대된 개방 망상구조의 점액기질과 용이하게 연합하고 얽힐 수 있게 되기 때문이다. 이와 같은 결과는 고분자의 가교밀도가 증대함에 따라 고분자물질과 점액기질과의 얽힘 정도 및 두 물질간의 상호작용의 강도가 증대함을 나타낸다. 비록 가교밀도가 큰 하이드로겔은 고분자의 이동성이 가장 낮을 것으로 예상되지만 점막부착력 측정에 사용된 높은 가교밀도를 지닌 하이드로겔의 망상구조는 점액기질의 당단백이 용이하게 침투하여 친밀한 결합을 형성할 수 있을 만큼 충분히 늘어날 수 있음을 보여주었다. 또한, 점액기질과 점막부착성 고분자 간에 수소결합이 발생하여도 점막부착력이 생길 수 있으나 점막부착력 측정조건인 pH 7.4에서 폴리아크릴산의 카르복실 기들은 대부분 이온화된 상태로 존재하고 있어<sup>1)</sup> 수소결합 형성에 참여하지 않기 때문에 수소결합 형성에 의한 점막부착력의 증대는 무시할 수 있을 것으로 생각되었다. 실제 백당으로 가교된 폴리아크릴산 하이드로겔을 구강점막 부착형 약물전달시스템으로 개발하고자 할 때, 처음에 투여되는 하이드로겔은 건조된 상태이기 때문에 in vivo에서 하이드로겔이 얼마나 빨리 수화되는지가 제제의 점막부착력에 가장 크게 영향을 미칠 것이다.

### 결론

백당을 가교제로 사용하여 폴리아크릴산의 하이드로겔을 제조하고 하이드로겔의 팽윤거동과 생체의 시험조건에서 점액기질을 사용해 점막부착력을 평가한 결과 다음의 결론을 얻을 수 있었다. 첫째, pH 7.4에서 팽윤도를 측정해 보면 백당의 반응액 중 농도가 증대함에 따라 하이드로겔에서의

가교밀도가 비례적으로 증대되어 팽윤도가 감소하였음을 알 수 있었다. 또한 경화처리 시간 (cure time)을 늘릴수록 주어진 백당 : 폴리아크릴산 비에서 팽윤도가 감소함이 보여졌다. 둘째, 가교밀도가 증가할수록 점막부착력도 증가함을 보여주었고, 주어진 조성에서는 90°C에서의 경화처리 시간이 길수록 고분자의 점막부착력도 증가하는 것으로 나타났다. 마지막으로, 가교제의 농도에 따른 팽윤도의 변화에 대해 점막부착력을 도시하면, 고분자의 팽윤도와 점막부착력이 역비례 함을 알 수 있었다. 본 연구를 통해 약물의 봉입에 유리한 팽윤도를 지니면서도 강한 점막부착력을 나타내는 폴리아크릴산의 하이드로겔을 확인할 수 있었다.

### 감사의 말씀

이 논문은 2005년도 중앙대학교 학술연구비 지원에 의한 것임.

### 참고문헌

- 1) H. Park and J.R. Robinson, Physico-chemical properties of water insoluble polymers important to mucin/epithelial adhesion, *J. Control. Release*, **2**, 47-57 (1985).
- 2) J.D. Smart, I.W. Kellaway and H.E.C. Worthington, An *in vitro* investigation of mucosa-adhesive materials for use in controlled drug delivery, *J. Pharm. Pharmacol.*, **36**, 295-299 (1984).
- 3) M. Ishida, Y. Machida, N. Nambu and T. Nagai, New mucosal dosage form of insulin, *Chem. Pharm. Bull.*, **23**, 810-816 (1981).
- 4) K. Morimoto, E. Kamiya, T. Toshiyuki, T. Takeda, Y. Nakamoto and K. Morisaka, Enhancement of rectal absorption of insulin in polyacrylic acid aqueous gel bases containing long chain fatty acid in rats, *Int. J. Pharm.*, **14**, 149-157 (1983).
- 5) R. Langer, Polymeric delivery systems for controlled drug release, *Chem. Engineering Comm.*, **6**, 1-48 (1980).
- 6) I.W. Kellaway, *In vitro* test methods for the measurement of mucoadhesion: In *Bioadhesion-Possibilities and Future Trends*, R. Gurny and H. Junginger (Ed.), CRC Press, Stuttgart, Germany, pp. 86-92 (1990).
- 7) J. Lee, S.A. Young and I.W. Kellaway, Water quantitatively induces the mucoadhesion of liquid crystalline phases of glyceryl monooleate, *J. Pharm. Pharmacol.*, **53**, 629-636 (2001).
- 8) H.S. Ch'ng, H. Park, P. Kelly and J.R. Robinson, Bioadhesive polymers as platforms for oral controlled drug delivery II. Synthesis and evaluation of some swelling water insoluble bioadhesive polymers, *J. Pharm. Sci.*, **74**, 399-405 (1985).