

키토산-리포산 자기 조립체의 제조 및 특성

박은주 · 김영진[†]

충남대학교 공과대학 바이오응용화학과

(2008년 6월 3일 접수, 2008년 7월 25일 수정, 2008년 7월 30일 채택)

Preparation and Characterization of Self-aggregated Nanoparticles of Chitosan-Lipoic Acid Conjugate

Eun Ju Park and Young Jin Kim[†]

Department of Applied Chemistry and Biological Engineering,

Chungnam National University, 220, Gung-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-764, Korea

(Received June 3, 2008; Revised July 25, 2008; Accepted July 30, 2008)

초록: 본 연구에서는 키토산의 알칼리 가수분해를 통해 탈아세틸화도가 조절된 세 가지 조건의 키토산을 제조하였고, 이 키토산이 수용성을 지니게 화학적 분해법을 이용해 분자량을 조절하였다. 이렇게 제조된 분자량이 조절된 세 가지 조건의 탈아세틸화도를 가지는 키토산 각각에 항산화제인 리포산을 합성하여 항산화 능력을 가지는 생체 적합성 나노 구조체를 형성하였다. 키토산-리포산의 합성을 확인하기 위하여 분광학적 분석 방법을 사용하여 분석하였다. 키토산-리포산 합성체는 수용액 상태에서 자기조립체를 형성하며 이렇게 형성된 자기조립체 나노 입자는 약 135 nm 정도의 크기를 가지고 있음을 알 수 있었다.

Abstract: The objective of this study is to obtain the anti-oxidant nanoparticles based on biocompatible polymers. It was chosen to conjugate with chitosan as the biodegradable polymer and lipoic acid as the hydrophobic anti-oxidant. Lipoic acid helps the regeneration of exogenous and endogenous anti-oxidants vitamin as well as glutathione and hence acts as antioxidant indirectly. Chitosan was prepared from chitin which was deacetylated under alkali solution for the various reaction time. Lipoic acid-chitosan complex was confirmed by ¹H-NMR. The critical aggregation concentration was measured using pyrene and the values were about 5×10⁻³ g/L. The particle shapes and sizes of the chitosan-lipoic acid nanoparticles were about 135 nm that measured by DLS and TEM.

Keywords: chitosan, lipoic acid, bioactive ingredient, anti-oxidant, self-aggregated nanoparticles.

서 론

인간의 질병을 치료하는데 있어 최적의 치료 효과를 얻기 위해서는 약물을 효율적이고 지속적으로 방출할 수 있는 새로운 전달체의 개발이 요구된다. 이러한 목적으로 주로 사용되고 있는 생체고분자로는 젤라틴, 셀룰로오스, 텍스트란, 키토산, 키토산과 같은 천연 고분자 물질 외에도 폴리 히드록시 계열의 폴리락타이드, 폴리글리콜리드 및 이들의 공중합체 그리고 폴리아미드와 폴리아미노산 등의 합성 고분자 물질 등이 있다. 이러한 생체고분자를 이용하여 질병 치료의 최적화를 위해 고분자물질로 보호피막을 형성한 microsphere나 microcapsule 이 약물의 제어 방출 시스템에 이용되고 있다.¹ 이들 고분자 중에서도 생체를 구성하고 있는 주요 성분 중의 하나인 셀룰로오스와 유사한 구조를 가진 키토산(1,4-2-amino-deoxy-β-D-glucan)은 천연고분자인 게와 새우 껍질로부터 추출한 키토산(1,4-2-acetamino-

deoxy-β-D-glucan)을 강한 알칼리 조건하에서 탈아세틸화하여 얻어진 다당류 고분자이다.² 이렇게 개질된 키토산은 키토산과 달리 용매로 용해가 되며, 지난 수세기 동안 특히 무독성, 생분해성 및 생체 적합성과 같은 고유한 특성이 있어서 많은 연구가 이루어져 왔다.³ 이때, 키토산의 아세트아미노로부터 아미노로 변환되는 탈아세틸화 정도 (DDA)를 조절하여 고분자의 단위에 있는 1차 아민기(-NH₂)의 수를 변화시킬 수 있다.⁴ 분자구조 중에 포함된 이 아민기가 쉽게 양이온화(NH₃⁺)하며 미생물 세포벽을 구성하는 시알산, 인지질 등의 음이온을 끌어 당겨 미생물의 자유도를 구속하여 증식을 억제하기 때문에 항균특성을 나타내며, 화학산기 단위당 전하 극성기 밀도가 크기 때문에 비교적 높은 수분율과 함유율을 가지고, 또한 분자구조 내에 수소결합을 일으킬 수 있는 다량의 수산기와 아민기를 동시에 가지고 있으므로 비교적 타 고분자와의 상용성도 큰 것으로 알려져 있다.⁵ 이러한 키토산은 근래 다양한 분야에서 활용될 수 있는 가능성을 가진 천연고분자 재료로서 주목받고 있으며, 최근 생분해성을 이용한 보다 정교한 응용 연구가 활발히 보고되고 있다. 생체적합성, 생분해성, 무

[†]To whom correspondence should be addressed.
E-mail: kimyj@cnu.ac.kr

독성, 무공해성, 항산화력 등의 키토산의 우수한 특성으로 인하여 약물 전달체 또는 생체의료용 재료로서 많은 응용이 시도되고 있다.⁶ 또한 키토산의 유리 아민기에 의해 발현되는 항산화 활성을 이용한 연구가 다양하게 진행되고 있다. 본래의 키토산은 분자내의 견고한 수소 결합 등으로 인해 산성영역에서만 용해되는 등 용해성이 제한적이기 때문에, 키토산에 일반적으로 식품 및 화장품에서 산화 작용을 완화시켜주는 항산화제로서 잘 알려진 유기물의 페놀리기를 개시제를 사용하여 그래프트공중합시켜 항산화제로 화장품 분야에서 응용되어지는 연구가 보고되고 있다.⁷ 키토산의 분자량은 산성용액 상태에서 경과되는 시간과 온도에 따라 분해되어 감소되는 경향을 보인다. 따라서 이때 그 분자량이 적절히 조절되어야만 각 분야에서 응용될 수 있는 기능성 소재로서의 물성을 발현시킬 수 있으며, 또한 용액의 점도도 적정수준을 유지하여야 액상으로서의 응용이 가능해진다.⁸⁻¹⁰ 산소를 이용하는 생물체의 정상적인 대사과정에서 필요약으로 생기는 반응성이 큰 활성산소종(1O_2 , $\cdot OH$, H_2O_2 , O_2^- 등)과 유기자유라디칼은 지질, 단백질, 당 및 핵산을 손상시키고 세포막의 파괴에 관여하여 세포의 살상, 돌연변이 유발, 발암, 조직의 노화 등의 원인이 된다고 보고되고 있다.⁷ 알파-리포산은 미토콘드리아 내의 여러 효소에 대한 보조 인자로 작용하는 티올 계열에 속하는 항산화제로서 히드록시 라디칼, 하이포염소산과 단일항 산소를 제거하며 철, 구리 등과 결합하여 킬레이트 화합물을 형성한다.¹¹ 또한 알파-리포산은 체내에 흡수되어 환원형인 디하이드로리포산으로 전환되어 수용성 및 지용성 환경 모두에서 산화 스트레스를 감소시키는 강력한 항산화효과를 가지는데, 디하이드로리포산은 하이포아염소산과 과산화 라디칼 그리고 하이드록시 라디칼을 제거할 뿐만 아니라 다른 항산화제인 토코페롤, 아스코르빈산, 글루타티온을 환원형으로 변화시켜 항산화 효과를 증가시킨다.¹² 본 연구에서는 강한 알칼리 조건에서 시간을 변화시켜 탈아세틸화도를 조절하고 화학적 분해를 통해 분자량을 조절한 저분자량의 수용성 키토산을 항산화물질인 리포산과 합성하여 지용성 물질을 수송하는데 적합한 나노입자를 제조하였다.

실 험

재료. 본 연구에 사용된 저분자량 수용성 키토산(LMWSC)은 Aldrich Chemical사의 제품인 키토산을 사용하여 제조하였고, 1-ethyl-3-[3-(dimethylamino)propyl]carbodiimide(EDC)와, N-hydroxysuccinimide(NHS), α -lipoic acid 역시 Aldrich Chemical사의 제품을 사용하였다.

키토산의 탈아세틸화 반응. 키토산(particle grade)을 분쇄하고, 170-250 mesh로 분획하여 평균 입자 크기를 약 70 μm 로 조절하였다. 키토산 분말을 질소 가스 존재 하에 혐기적으로 3구 플라스크를 사용하여 기계적으로 교반을 하며 유지하였다. 60 $^{\circ}C$ 에서 수산화나트륨(NaOH) 47%로 50, 120, 360분 탈아세틸화 반응을 시행하였다. 모든 시료는 반응 완료 후, molecular weight cut off(MWCO) = 8000 g/mol dialysis membrane을 사용하여 24시간 동안 투석하여 탈아세틸화 반응 시 사용된 수산화나트륨을 제거하였다. 그리고 동결건조를 통하여 분말 형태의 탈아세틸화도가 조절된 키토산을 제조하였다.

키토산의 탈아세틸화도 측정. 탈아세틸화 반응을 통해 얻은 키토산

의 탈아세틸화도는 toluidine blue-O를 이용한 콜로이드 적정법으로 다음과 같이 구하였다.¹³ 키토산 0.1 g을 증류수 10 mL와 0.4 M acetate solution(pH 4.0) 10 mL의 혼합용액에 용해시킨 후, 그 중 1 g을 채취하여 증류수 30 mL로 희석하고 toluidine blue-O 지시약을 300 mL 첨가한 후, 1/400 N potassium poly(vinylsulfate) solution(PVSK)로 적정하여 지시색의 변화점(purple-pink end-point)을 적정점으로 식 (1)에 의해 탈아세틸화도(DDA)를 계산하였다.

$$DDA(\%) = \frac{100}{\left(\frac{50}{4.30V} - 1\right)0.793 + 1} \tag{1}$$

V: 적정액의 부피(mL)

저분자량 수용성 키토산의 제조 및 분석. 고분자량 불용성 키토산($M_w=1.90 \times 10^6$ g/mol)에 4 N HCl 100 mL를 첨가하고 50 $^{\circ}C$ 에서 24시간 동안 질소 기류 하에서 반응시켰다. 반응 종료 후 반응물은 MWCO=8000 g/mol dialysis membrane을 사용하여 24시간 동안 투석하여 반응시 사용된 HCl을 제거하였다. 그리고 동결건조를 통하여 백색분말의 저분자량 수용성 키토산을 얻는다. 이렇게 얻어진 저분자량 수용성 키토산은 Ostwald viscometer를 이용하여 아래에 주어진 Mark-Houwink 식 (2)에 의해 분자량을 측정하였다.

$$[\eta] = 1.81 \times 10^{-5} \bar{M}^{0.93} (\text{dL/g}) \tag{2}$$

키토산-리포산의 합성. 500 mg의 키토산에 250 mg EDS · 150 mg NHS(1.3 mmol)을 넣고 증류수 50 mL에 녹여준다. 그 후 이 용액에 250 mg 리포산(1.0 mmol)을 acetone(200 mL)에 녹여 30분간 방울방울 가해준 뒤 20시간 동안 70 $^{\circ}C$ 에서 반응시킨다. 그 후 tetrahydrofuran(THF)에 침전시켜 얻은 침전물을 동결건조시켜 흰색의 키토산-리포산 합성물을 얻는다.

나노파티클 형성. 얻어진 세 가지 조건의 키토산-리포산 합성물을 증류수와 DMSO의 혼합용액에 넣어 교반시켜 녹인다. 이를 MWCO=2000 g/mol dialysis membrane을 사용하여 24시간 동안 투석하여 나노 입자를 형성함과 동시에 사용된 유기 용매인 DMSO를 제거하였다. 그리고 동결건조를 통하여 파우더 형태의 키토산-리포산 나노입자를 얻었다.

결과 및 토론

셀룰로오스와 유사한 구조를 가지고 있는 천연고분자로 널리 알려진 키토산과 항산화제로 널리 알려진 리포산을 이용하여 생체 적합하며 항산화능력을 가지는 전달체를 제조하였다. 반응 시간을 50, 120, 360분으로 변화시키면서 60 $^{\circ}C$ 에서 수산화나트륨을 47% 농도로 하여 알칼리 가수분해를 수행하였다(Figure 1). 이렇게 구하여 본 실험에 사용한 키토산의 탈아세틸화도는 반응 시간이 각각 50, 120, 360분일 때, 39.84%, 57.35%, 88.57%가 된다. 이때, 조절된 탈아세틸화도에 따라 키토산-1, 2, 3으로 명명하였다. 또한, 360분 이상으로 알칼리 분해 시간이 더 경과하여도 탈아세틸화도가 더 높아지지는 않았

다. Figure 3에 평균 입자가 70 μm 인 키틴 분말을 위의 조건에서 탈아세틸화 반응을 진행시켰을때, 탈아세틸화도(DDA)의 시간적 진행을 나타내었다. 이렇게 얻어진 세 가지 조건의 탈아세틸화도를 가지는 고분자량 불용성 키틴산 1, 2, 3($M_w=1.90 \times 10^6$ g/mol)에 수용성을 부여하기 위해 화학적 분해법을 이용하여 제조한 저분자량 수용성 키틴산의 평균분자량은 25.0 ± 0.01 °C에서 Ostwald viscometer를 이용하여 고유점도를 얻은 뒤 이 값을 Mark-Houwink식에 대입함으로써 본 실험에서 제조된 저분자량 수용성 키틴산의 평균분자량은 5.98×10^5 임을 확인하였다. 키틴산-리포산 합성물은 분자량이 조절된 세 가지 조건의 탈아세틸화도를 가지는 키틴산 1, 2, 3 각각과 항산화제인 리포산의 아민기(-NH₂)와 리포산의 카르복시기(-COOH)의 썬시닐결합에 의하여 합성되었으며 구조식을 Figure 2에 나타내었다. 합성되어진 키틴산(1, 2, 3)-리포산의 구조분석은

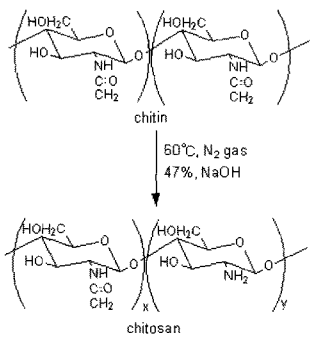


Figure 1. Reaction scheme of the deacetylation of chitin.

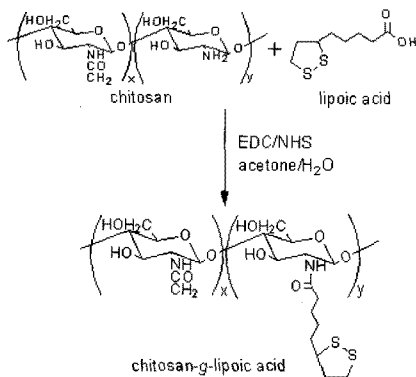


Figure 2. Synthetic scheme of chitosan-lipoic acid.

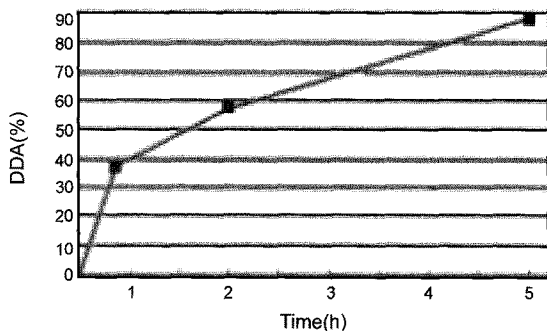


Figure 3. Progress of the deacetylation of chitin by alkali treatment.

¹H-NMR을 이용하여 규명하였다. NMR 용매로는 D₂O : DMSO-d₆의 혼합용액을 사용하였으며 키틴산의 특성 피크 4.7 ppm (키틴산 1번), 3.0 ppm(키틴산 2번), 3.5~4.0 ppm(키틴산 3~6번)과 1.1~1.9 ppm (리포산)에서 합성을 확인할 수 있었다. 또한 탈아세틸화도가 높아질수록 리포산이 많이 치환되어 1.1~1.9 ppm 피크세기가 증가하는 것 역시 확인할 수 있었다(Figure 4). 이렇게 합성된 키틴산-리포산은 친수성기(키틴산), 소수성기(리포산)를 가지고 있어 수용액 상에서 소수성은 내부에 위치하고 친수성은 외부에 위치하는 구형의 입자를 형성한다. 이 입자는 일정 농도 이상일 때 형성되게 되는데 입자가 형성되는 시점의 농도를 임계 응집체 농도(CAC)라 한다. 임계 응집체 농도를 측정하기 위하여 형광물질인 pyrene 용액을 제조하고 키틴산-리포산 합성물 각각을 다양한 농도로 희석시킨 후 형광 광도계를 이용하여 입자 내부에 포집된 pyrene의 형광 광도를 측정하였다. Figure 6은 pyrene의 여기파장(400 nm)과 발산파장(480 nm)에서 키틴산-리포산 결합체 용액의 농도에 따른 강도를 나타낸 스펙트럼이다. 키틴산-리포산 합성물 수용액의 다양한 농도에서 I₄₄₅/I₄₅₂의 값을 구한 뒤 농도에 따른 그래프를 그리면 Figure 6처럼 특정 농도 값 이상에

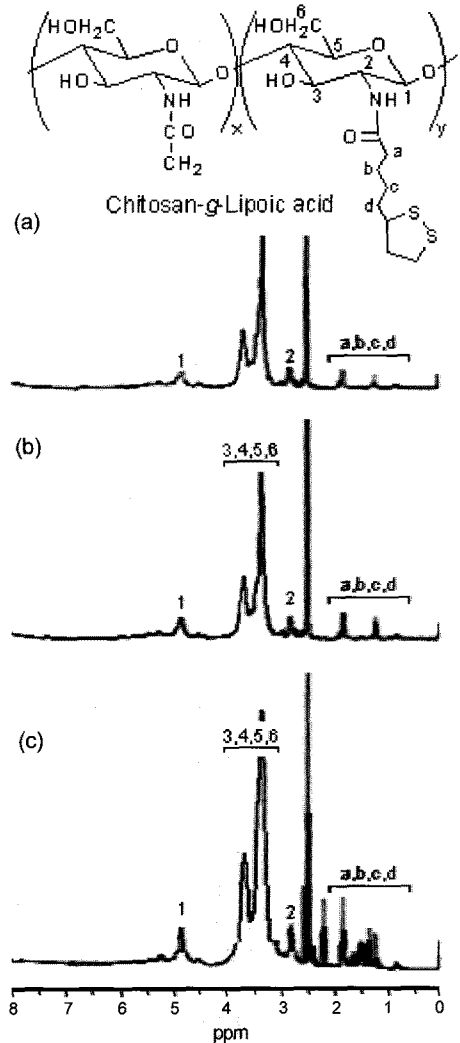


Figure 4. ¹H-NMR spectra of chitosan-lipoic acid conjugate. (a) CH1-LA, (b) CH2-LA, and (c) CH3-LA.

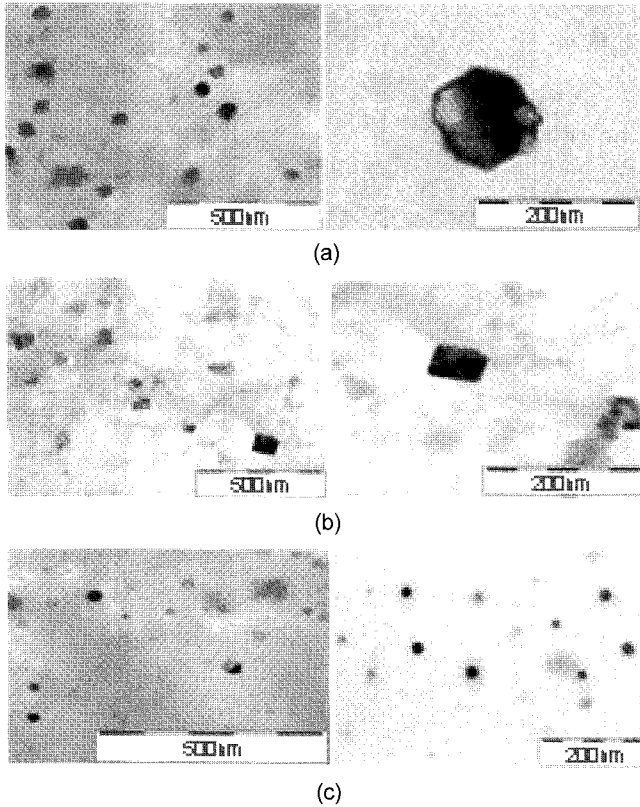


Figure 5. Transmission electron microscope(TEM) images of chitosan-lipoic acid nanoparticles. (a) CH1-LA, (b) CH2-LA, and (c) CH3-LA.

서 그래프가 갑자기 증가하는 것을 볼 수 있다. 이때 그래프의 기울기가 달라지는 지점의 농도가 바로 임계 응집체 농도 값이 된다. 키토산 1-리포산 결합체의 임계 응집체 농도 값은 1×10^{-2} mg/mL 이었고, 키토산 2-리포산 결합체는 5×10^{-3} mg/mL, 키토산 3-리포산 결합체는 1×10^{-3} mg/mL 이었다. 이는 탈아세틸화도가 증가할수록 소수성을 가지는 리포산이 많이 결합하여 응집체를 형성하기가 더 쉬워짐을 나타낸다. 또한 수용액 상에서 형성된 키토산-리포산 결합체의 크기를 측정하기 위하여 dynamic light scattering(DLS)를 사용하였다. 이때, 산란각은 90°로 고정하고 온도는 25 °C로 일정하게 유지하여 측정하였다. 측정 결과 키토산 1-리포산 결합체의 크기는 217.4 nm 이고, 키토산 2-리포산 결합체는 115.4 nm, 키토산 3-리포산 결합체는 73.85 nm 이었다(Figure 7). 키토산의 탈아세틸화도가 증가할수록 소수성 부분이 증가하여 응집이 더 잘되므로 크기가 줄어들었음을 확인할 수 있었다. 키토산-리포산 합성물의 크기뿐만 아니라 형태도 알아보기 위해 키토산-리포산 결합체 나노입자 수용액을 동결 건조하여 투과전자현미경으로 관찰하였다. Figure 5에서 보이는 것과 같이 키토산의 탈아세틸화도가 증가할수록 소수성 부분이 증가하여 응집이 더 잘되므로, 입자의 형태가 각진 육각형 형태에서 점점 구형의 형태를 띠고 있음을 확인할 수 있었다. DLS 측정 결과보다 투과전자현미경으로 측정된 입자 크기가 작은 이유는 전처리로 동결 건조를 하게 되는데 이때 입자의 무너짐이 일어나기 때문이다.

결 론

천연생체고분자인 키토산은 키틴의 탈아세틸화 반응을 통해 얻을

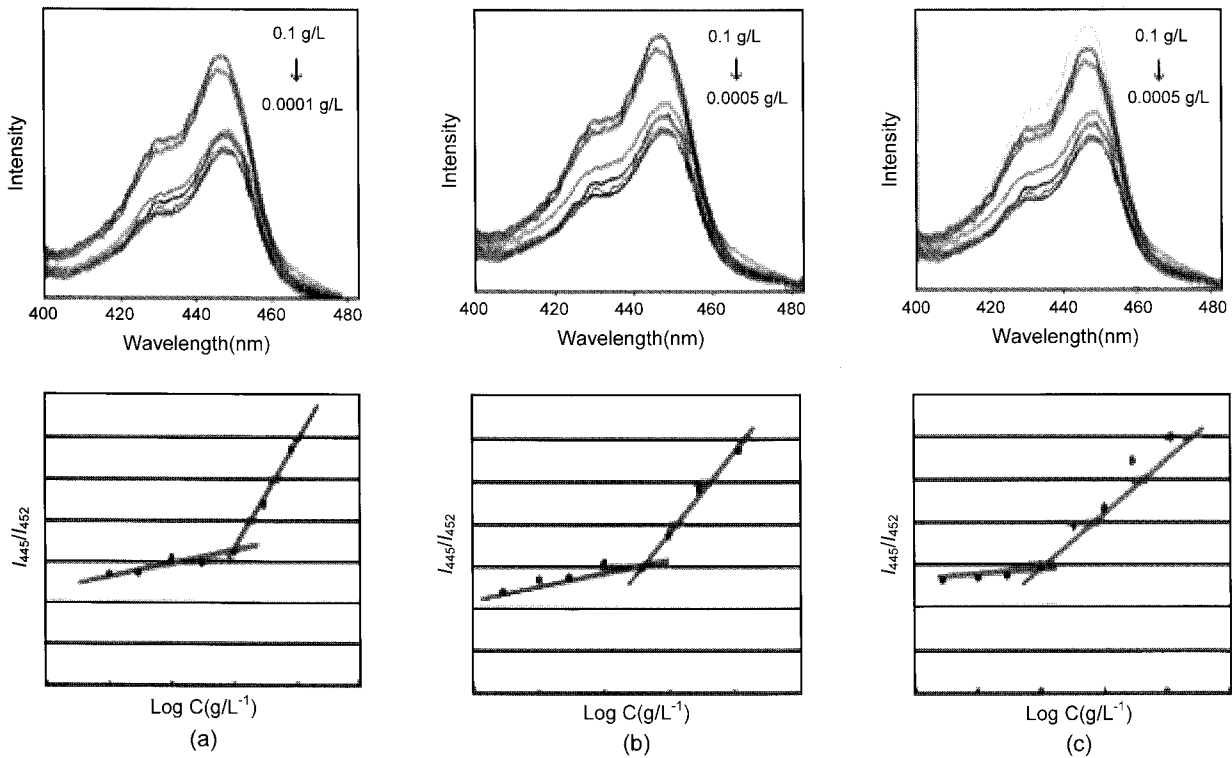


Figure 6. Fluorescence spectra of pyrene in water in the presence of increasing concentrations of the chitosan-lipoic acid nanoparticles. (a) CH1-LA, (b) CH2-LA, and (c) CH3-LA.

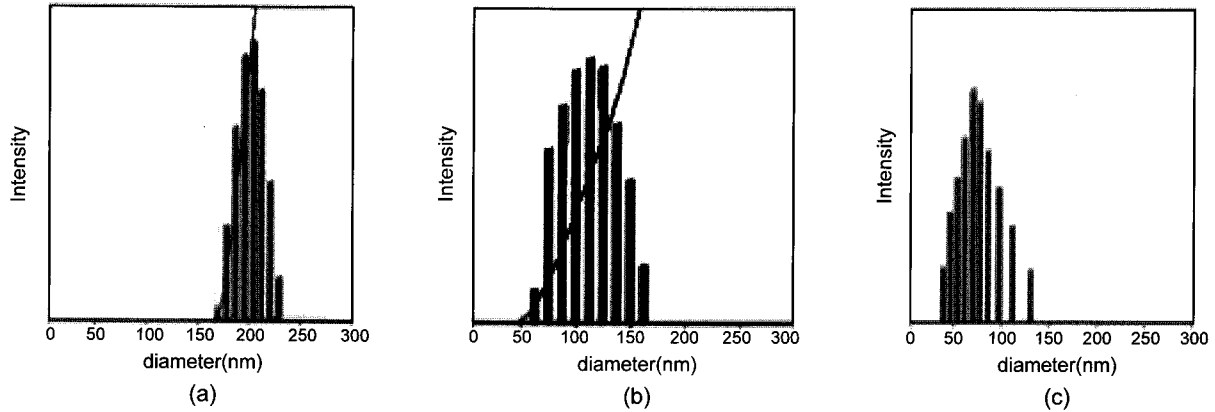


Figure 7. Particle size distributions of the chitosan-lipoic acid nanoparticles measured by dynamic light scattering. (a) CH1-LA, (b) CH2-LA, and (c) CH3-LA.

수 있다. 알칼리 가수분해를 통해 탈아세틸화도가 39.84%(키토산1), 57.35%(키토산2), 88.57%(키토산3)으로 조절된 키토산을 얻었다. 이 키토산에 화학적 분해로 분자량이 조절되어 수용성을 부여한 저분자량 수용성 키토산에 항산화제인 리포산을 합성시켜 새로운 양친매성 고분자를 제조하였다. 이렇게 얻어진 키토산(1, 2, 3)-리포산 합성물은 투석에 의해 수용액 상에서 나노입자를 형성하였다. 이때, 입자를 형성하기 시작하는 농도인 임계 응집체 농도(CAC) 값은 각각 1×10^{-2} mg/mL(키토산1-리포산), 5×10^{-3} mg/mL(키토산2-리포산), 1×10^{-3} mg/mL(키토산3-리포산)이었다. 또한 키토산-리포산 나노입자의 크기 및 형태는 dynamic light scattering(DLS), 투과전자현미경으로 확인하였다. 그 결과 입자의 크기는 217.4 nm(키토산1-리포산)이고, 115.4 nm(키토산2-리포산), 73.85 nm(키토산3-리포산)이었으며, 탈아세틸화도가 높은 키토산으로 합성된 나노입자일수록 점차 크기는 작아지며 각진 형태에서 구형을 띠는 입자로 변화함을 알 수 있었다. 형성된 키토산-리포산 나노입자는 키토산의 높은 생체적합성과 리포산의 항산화력 때문에 소수성 물질을 전달하는 전달체로 사용되었을 때 많은 이익을 제공할 것으로 생각한다.

감사의 글: 본 연구는 대덕연구개발특구지원본부에서 지원받아 이루어진 것으로 이에 감사를 드립니다(과제번호 : M12008-M07010181).

참고 문헌

1. X. Y. Wu and P. I. Lee, *J. Appl. Polym. Sci.*, **77**, 833 (2000).
2. J. X. Lu and F. Prud'hommeaux, *Biomaterials*, **20**, 1937 (1999).
3. J. S. Park, J. W. Park, and B. H. Kim, *Polymer(Korea)*, **29**, 183 (2005).
4. V. M. Ramos, N. M. Rodriguez, M. S. Rodriguez, A. Heras, and E. Agullo, *Carbohydr. Polym.*, **51**, 425 (2003).
5. M. G. Jeong, D. S. Kim, Y. H. Choi, and H. S. Lim, *Polymer(Korea)*, **28**, 253 (2004).
6. M. J. Jang, D. G. Kim, and J. W. Nah, *Polymer(Korea)*, **31**, 555 (2007).
7. Y. S. Chung, J. J. Kim, and C. Y. Choi, *J. Chitin Chitosan*, **10**, 202 (2005).
8. H. J. Kim and D. W. Jeon, *J. Kor. Soc. Cloth. Ind.*, **5**, 520 (2003).
9. S. Mina, M. Miya, R. Iwamoto, and S. Yoshikawa, *J. Appl. Polym. Sci.*, **28**, 1909 (1983).
10. S. H. Lee, *J. Appl. Polym. Sci.*, **90**, 2870 (2003).
11. L. Packer, E. H. Witt, and H. J. Tritschler, *Free Radic. Biol. Med.*, **19**, 227 (1995).
12. P. Lester and J. T. Hans, *Free Radic. Biol. Med.*, **20**, 625 (1996).
13. T. Y. Kim, C. K. Oh, H. Moon, and J. H. Yang, *J. Korean Ind. Eng. Chem.*, **6**, 700 (1995).