

소수성 항진균제 전달체로 응용하기 위한 데옥시콜릭산이 결합된 저분자량 수용성 키토산 나노입자의 제조와 특성

최창용 · 정 현 · 남정표 · 박윤경* · 장미경 · 나재운†

순천대학교 고분자공학과, *조선대학교 생명공학과

(2009년 5월 15일 접수, 2009년 6월 9일 수정, 2009년 6월 9일 채택)

Preparation and Characterization of Deoxycholic Acid-Conjugated Low Molecular Weight Water-Soluble Chitosan Nanoparticles for Hydrophobic Antifungal Agent Carrier

Changyong Choi, Hyun Jung, Jung-Pyo Nam,
Yoonkyung Park*, Mi-Kyeong Jang, and Jae-Woon Nah†

Department of Polymer Science and Engineering, College of Engineering,
Suncheon National University, Suncheon, Jeonnam 540-742, Korea

*Department of Biotechnology and BK21 Research Team for Protein Activity Control,
Chosun University, Gwangju 501-759, Korea

(Received May 15, 2009; Revised June 9, 2009; Accepted June 9, 2009)

초록: 저분자량 수용성 키토산(LMWSC)을 소수성 항진균제 전달체로 응용하기 위하여, 데옥시콜릭산(deoxycholic acid, DA)을 이용하여 LMWSC를 화학적으로 개질하였다. DA가 결합된 LMWSC 나노입자(WSCDA)의 특성은 동적 광산란기, 투과전자현미경을 이용하여 그 특성을 분석하였다. 제조되어진 나노입자의 크기는 250~350 nm로 DA의 치환도가 증가함에 따라 입자의 크기가 증가하였다. 항진균제인 이트라코나졸(itraconazole)이 봉입된 WSCDA 나노입자(WSCDA-ITCN)는 소수성 상호작용을 이용한 용매 증발법으로 제조하였다. UV 분광광도계를 이용하여 약물의 함량 및 담지 효율을 측정된 결과 약물의 담지 효율은 61~68%로 우수한 담지 효율을 보였다. 약물방출 거동에서 이트라코나졸이 봉입된 나노입자의 DA의 함량이 많아질수록 약물이 천천히 방출되었다. 이상의 결과로부터 본 연구에서 제조한 DA가 결합된 저분자량 수용성 키토산 나노입자가 항진균제 전달체로서 매우 높은 응용 가능성을 나타내고 있음을 확인하였다.

Abstract: To develop the carrier of hydrophobic antifungal agents based on low molecular weight water-soluble chitosan (LMWSC), LMWSC was chemically modified with deoxycholic acid (DA) which is one of the bile acid as a hydrophobic group. The nanoparticles (WSCDA) using DA conjugated LMWSC were characterized using dynamic light scattering (DLS) and transmittance electron microscope (TEM). The particle size of WSCDA ranged from 250 to 350 nm and increased with the number of DA substitution. The loaded itraconazole as an antifungal agent WSCDA nanoparticles (WSCDA-ITCN) were prepared by solvent evaporation method. The drug content and the loading efficiency were investigated approximately 9~10% and 61~68% by UV spectrophotometer, respectively. The release of drug from nanoparticles was slow and showed sustained release characteristics. Based on the results of release study that the higher DA contents in WSCDA, the slower the releasing rate, the WSCDA-ITCN could be used as an excellent antifungal agent.

Keywords: LMWSC, deoxycholic acid, antifungal, itraconazole, drug carrier.

서 론

키토산은 게나 새우 등 갑각류나 오징어 연골 등에 존재하는 키틴을 탈아세틸화시켜 얻어지는 천연고분자로서 최근에 천연 소재로 주목 받고 있는 재료이다.¹ 이러한 키토산은 면역력 강화, 항암, 상처치료,

항균 활성 효과 등의 다양한 생리활성 효과를 갖고 있어 그 자체로 식품, 의료 부분에 많은 응용이 되고 있다.^{2,3} 특히, 키토산은 인체의 구강, 비강, 장강 등에 존재하는 점액질 층에 결합하여 약물의 흡수를 촉진시키는 효과를 나타내기 때문에 소수성 약물의 경구 및 주사제 등의 다양한 형태의 제형에 있어서 흡수 촉진제 또는 전달체로의 응용이 활발하게 연구되고 있다.⁴⁻⁷ 키토산은 무독성, 생분해성 고분자로 잘 알려져 있으며, 각 단량체마다 한 개의 1차 아민기(-NH₂)를 갖

†To whom correspondence should be addressed.
E-mail: jwnah@suncheon.ac.kr

고 있기 때문에 다양한 기능성 그룹을 쉽게 도입할 수 있는 장점을 갖고 있다. 이러한 특성은 약물 전달체, 조직공학 등 의학 분야에서 다양한 응용이 시도되어지고 있다.⁸⁻¹⁰

생체적합성이고 생분해성 특성을 갖는 고분자 재료중 락타이드-글리콜라이드 공중합체(PLGA)가 소수성 약물의 용해도를 증가시키고 지속적인 방출을 유도할 수 있는 약물전달체로 많이 이용되고 있으나,¹¹ 합성고분자로서 갖는 단점이 있다. 키토산의 경우 단량체에 존재하는 1차 아민을 이용하여 소수성기를 도입함으로써 소수성 약물을 쉽게 담지할 수 있다. 담즙산은 소수성 기능기 카르복실(-COOH)을 포함하고 있으므로 키토산과 쉽게 반응되어 소수성 약물을 담지시킬 수 있다. 담즙산은 생체물질로서 간에서 만들어지며, 콜레스테롤 및 지방을 유화시켜 소화를 촉진시키는 역할을 한다. 또한, 수용액에서 자가적으로 소수성 중심을 갖는 미셀을 형성함으로써 소수성 약물을 효율적으로 담지할 수 있다. 담즙산의 종류는 담즙산의 구조 중에 포함되어 있는 히드록시기의 위치, 입체적 배위 수, 결사슬 구조 등의 차이에 따라 나뉘어진다. 결사슬 구조의 히드록시기수에 따라 리소콜릭산(lithocholic acid), 데옥시콜릭산(deoxycholic acid), 콜릭산(cholic acid) 등으로 나뉘어지며 약리작용이 우수하다는 장점을 가지고 있다. 본 연구에서는 소수성이 강한 데옥시콜릭산을 가지고 실험을 진행하였다.

자연계에 존재하는 병원성 진균들을 퇴치하기 위한 항진균제의 개발은 진균 감염증이 최근까지 심각한 감염성 질환으로 인지되지 않았기 때문에 항생제에 비해서 연구가 미비하다. 그러나, 1970년대부터 면역결핍증 환자의 증가, 강력한 화학요법을 이용한 항암치료 및 생체 기관 이식수술의 증가 등으로 인해 환자의 생명을 위협하는 전신성 진균감염증이 전 세계적으로 급격히 증가하고 있기 때문에 탁월한 효능을 가진 항진균제의 개발이 절실히 필요해지고 있다.¹² 본 연구에 사용된 항진균제 약물인 이트라코나졸(itraconazole)은 triazole계의 광범위 항진균제로 칸디다증, 조갑진균증, 피부사상균증 등의 치료에 사용된다.¹²⁻¹⁶ 이트라코나졸은 매우 난용성 약물로서 임상에서는 주로 경구제로 사용되고 사용량은 전신, 표재성 감염의 경우에 100~600 mg/day를 3~6개월간 복용한다. 이러한 난용성 약물의 경우 투여시 생체 이용률은 인체내의 다양한 생리적 환경, 섭취 음식물에 영향을 받아 그 이용률이 감소되고,¹⁷ 간독성, 구역, 설사, 복통, 소화불량, 두통 등의 부작용이 있는 것으로 알려져 있다.¹⁸⁻²⁰ 칸디다증, 조갑진균증 등의 치료 목적으로 투여되는 이트라코나졸 경구제는 목적부위인 피부, 손발톱에서의 유효 약물농도를 유지하기 위해서 장기간 복용하여야 하며, 또한 생체 이용률을 높이기 위하여 음식과 함께 복용해야 하는 불편함이 있다.¹⁸

본 연구에서는 저분자량 수용성 키토산(low molecular weight water-soluble chitosan, LMWSC)과 데옥시콜릭산을 이용하여 친수성과 소수성을 갖는 키토산 유도체를 합성함으로써 소수성 약물을 담지할 수 있는 약물전달체를 제조하였다. 소수성 약물로 사용된 이트라코나졸을 입자 내에 봉입시킴으로써 약물의 수용액상에서 용해성을 향상시키고 부작용을 최소화할 수 있는 약물전달체를 연구하였다.

실 험

재료. 저분자량 수용성 키토산(LMWSC, 평균분자량: 10000 Da, 탈아세틸화도: 87%)은 (주)키토라이프(Korea)에서 공급받아 사용

하였다. LMWSC에 소수성 그룹을 도입하기 위해 사용된 소수성 그룹인 데옥시콜릭산(deoxycholic acid, DA, 분자량: 392 Da), 반응에 사용된 유기촉매인 3-dicyclohexyl carbodiimide (DCC), *N*-hydroxy succinimide, (NHS)와 입계미셀형성농도 측정에 필요한 형광염료인 pyrene 등은 Sigma(USA)에서 구입하여 사용하였다. 약물방출 실험에 사용된 항진균제인 이트라코나졸(분자량: 705.63 Da, >98% purity)은 Sigma사(USA)에서 구입하여 사용하였다. 반응용매인 dimethylsulfoxide(DMSO), tetrahydrofuran(THF)는 lithium aluminiumhydride를 이용하여 48시간 동안 건조시킨 후 증류하여 사용하였다. 그 외에 실험에 사용된 용매인 *n*-hexane, benzene, diethyl ether 등은 일급 및 특급시약을 이용하여 정제 없이 사용하였다.

데옥시콜릭산의 활성화(DA-NHS). DA가 결합된 LMWSC의 합성은 LMWSC의 1차 아민과 DA의 카르복실산과의 반응을 통하여 이루어졌다. 이 반응의 높은 효율을 위해 DA의 카르복실 그룹을 DCC/NHS를 이용하여 활성화하여 LMWSC와 반응을 진행하였다. DA의 활성화 반응은 다음과 같이 수행하였다. 계산된 DA와 NHS와 DCC를 각각 DA의 2.1배, 2배의 몰비로 DMSO 10 mL에 녹인 후 1일 동안 상온에서 반응시켰다. 반응 후, 생성된 dicyclohexylurea(DCU)를 종이필터를 이용하여 제거하고 과량의 핵산에 침전시켜 활성화된 DA-NHS를 얻었다. 얻어진 생성물은 진공건조한 후 벤젠에 녹여 핵산에 침전시키는 과정을 추가로 수행하여 불순물을 제거함으로써 생성물의 순도가 향상된 최종 생성물을 얻었다.

DA가 도입된 LMWSC 유도체 (WSCDA)의 합성 및 나노입자의 제조. WSCDA는 다음의 방법으로 합성하였다. LMWSC 100 mg을 10 mL 증류수/DMSO 혼합용매(10/90, v/v)에 녹인 후, 이 용액에 DA-NHS를 각각 LMWSC의 단량체에 대해서 3, 5, 10%의 몰비가 되도록 첨가하여 상온에서 24시간 동안 반응을 진행하였다. 반응물은 10 배 과량의 diethyl ether와 아세톤의 혼합용매(2:1, v/v)에 침전시킨 후 원심분리하여 회수하였다. 회수된 침전물을 순수한 아세톤에 분산시켜 반응물내의 미반응 DA 및 불순물을 용해시킨 후 순수한 반응물을 원심분리하여 회수하였다. 회수된 반응물을 증류수에 용해시킨 후 투석(MWCO: 3500 Da)을 한 후 동결건조하여 DA가 결합된 WSCDA 나노입자를 얻었다.

WSCDA의 구조. 합성된 WSCDA의 구조는 ¹H-NMR과 FT-IR을 이용하여 분석하였다. ¹H-NMR spectrometer(Bruker, AVANCE 400, Germany)를 이용하여 DA-NHS와 WSCDA의 구조 및 DA의 치환도를 구하였다. 사용된 NMR 용매로는 LMWSC는 D₂O, DA는 DMSO, WSCDA는 D₂O/DMSO(1/3, v/v)를 각각 사용하였다. FT-IR을 통한 구조 분석은 KBr 펠렛법을 이용하여 WSCDA와 KBr을 적당한 비율로 혼합하여 분석하여 펠렛을 만든 후 FT-IR(FT-IR, 8700 Shimadzu, Japan)을 이용하여 400~4600 cm⁻¹에서 실시하였다.

나노입자의 크기 및 형태 측정. WSCDA 나노입자 크기와 분포는 동적광산란기(dynamic light scattering, DLS, ELS-8000, Otsuka, Japan)를 이용하여 측정하였다. 측정을 위해 제조된 나노입자를 1 mg/mL의 농도로 증류수에 분산시킨 후 He-Ne 레이저로 632.8 nm에서 측정하였다. 나노입자의 형태는 투과전자현미경(FEI, Tecnai 20, Netherlands)을 이용하여 측정하였다. 나노입자 용액에 phosphor-tungstic acid 0.01%를 첨가하여 carbon 필름으로 코팅된 TEM

grid 위에 적하하여 건조시킨 후 가속전압 200 kV에서 측정하였다.

입계미셀형성농도(Critical Aggregation Concentration, CAC) 측정. WSCDA는 친수성 및 소수성을 갖는 양친성 물질로서 수용액 하에서 자가 응집에 의한 입자를 형성하게 된다. 이러한 자가 응집 경향은 pyrene을 형광염료로 사용하여 서로 다른 농도를 갖는 WSCDA의 수용액내에서 pyrene의 광학적 거동을 형광광도계(RF-5301PC, Shimadzu, Japan)를 이용하여 발광스펙트럼을 얻은 후 파장의 이동을 이용하여 CAC를 결정하였다. 실험과정은 다음과 같다. Pyrene을 아세톤에 6×10^{-5} M이 되도록 제조하고 이를 증류수에 첨가하여 최종농도가 1.2×10^{-6} M이 되도록 만든 후 이 용액을 40 °C에서 2시간 동안 감압하에서 아세톤을 제거하였다. 이 pyrene 용액과 다양한 농도의 나노입자의 용액($3.0 \times 10^{-5} \sim 2$ mg/mL)을 혼합하여 pyrene의 최종농도가 6.0×10^{-7} M이 되도록 하였다. 이 용액을 60 °C에서 3시간 동안 암실에서 교반 후 형광광도계를 이용하여 흡수과장 390 nm에서 형광특성을 관찰하였다.

이트라코나졸이 봉입된 나노입자(WSCDA-ITCN)의 제조. WSCDA 나노입자는 소수성 중심 및 친수성 껍질의 구조를 갖고 있으며 이 나노입자 중심의 소수성과 약물의 소수성간의 상호작용(hydrophobic interaction)을 이용하여 소수성 약물이 이트라코나졸을 봉입하였다. 약물 봉입 실험은 다음과 같이 수행하였다. WSCDA 30 mg을 10.5 mL의 증류수/THF 혼합용매(2/8.5, v/v)에 용해시킨 후, 이트라코나졸 5 mg을 1 mL의 THF에 용해시킨 후 첨가시켰다. 이 혼합용액을

증류수 200 mL에 초음파를 조사하면서 천천히 적하시킨 후 THF를 감압 증발시켜 나노입자수용액을 얻었다. 이 용액을 투석막(MWCO: 3500 Da)을 이용하여 24시간 동안 투석하여 잔여 THF 및 봉입되지 않은 이트라코나졸을 제거하고 동결건조하여 이트라코나졸이 봉입된 WSCDA 나노입자(WSCDA-ITCN)를 얻었다.

WSCDA-ITCN의 특성 분석. 이트라코나졸이 봉입된 WSCDA-ITCN 나노입자 크기와 분포는 1 mg/mL의 농도로 증류수에 분산시킨 후 동적광산란기(dynamic light scattering, DLS, ELS-8000, Otsuka, Japan)를 이용하여 측정하였다. WSCDA-ITCN의 형태는 투과전자현미경을 이용하여 가속전압 200 kV에서 측정하였다.

약물의 함량 및 담지 효율 측정. 약물 함량(drug contents)과 봉입효율(loading efficiency)은 WSCDA-ITCN 나노입자를 3 mg을 1 mL 증류수에 분산시키고, 이 중 0.1 mL을 취하여 9.5 mL의 THF를 첨가하여 나노입자 내부의 이트라코나졸을 완전히 용출시켜 UV분광광도계(UV-1601, Shimadzu Co., Ltd., Japan)를 이용하여 흡광도를 측정하고 다음의 식을 이용하여 계산하였다. 모든 과정은 실험의 오차를 줄이기 위해 세 번씩 시행하였다.

Drug contents (%) =

$$\frac{\text{Amount of Itraconazole in the WSCDA-ITCN}}{\text{Total Weight of WSCDA-ITCN}} \times 100$$

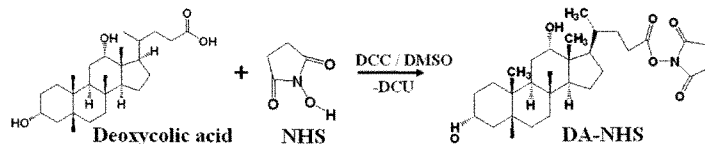


Figure 1. Scheme of deoxycolic acid (DA) activation.

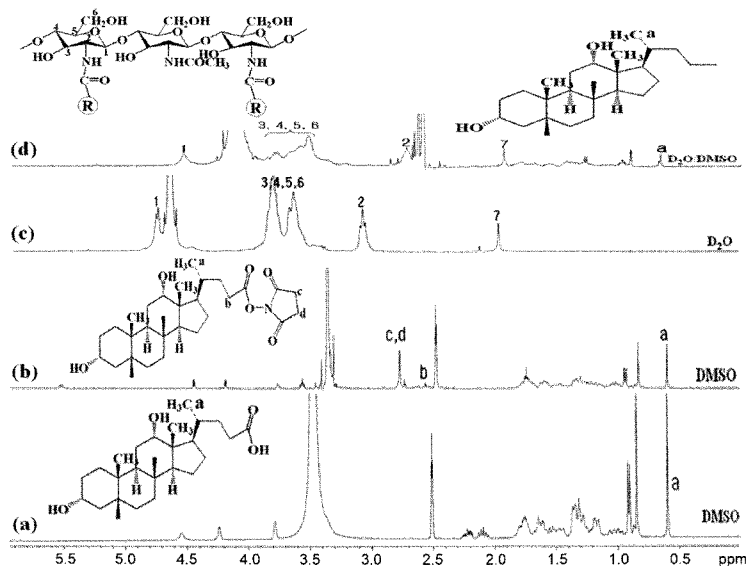


Figure 2. ¹H-NMR spectra of DA (a); DA-NHS (b); LMWSC (c); WSCDA5 (d).

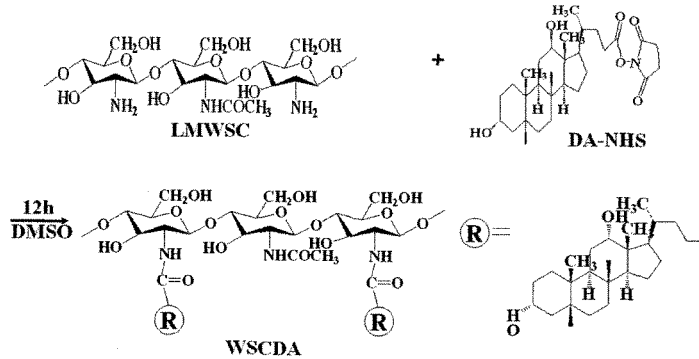


Figure 3. Scheme of deoxycolic acid conjugated LMWSC.

Loading efficiency(%) =

$$\frac{\text{Residual amount Itraconazole in the WSCDA-ITCN}}{\text{Feeding amount of Itraconazole}} \times 100$$

나노입자에서 약물의 방출 실험. 이트라코나졸이 봉입된 WSCDA-ITCN 나노입자에서 이트라코나졸의 방출 거동을 규명하기 위하여 WSCDA-ITCN 나노입자를 인산염 완충용액(phosphate buffered saline, PBS, pH 7.4)에 2 mg/mL의 농도로 분산시킨 후 2 mL을 투석막(MWCO; 3500 Da)에 넣어 밀봉한 다음 40 mL의 PBS에 넣고 37 °C에서 100 rpm으로 교반하면서 일정 시간 간격으로 샘플을 채취하여 UV 분광광도계(UV-1601, Shimadzu Co., Ltd., Japan)를 이용하여 흡광도를 측정함으로써 이트라코나졸의 방출 거동을 확인하였다.

결과 및 토론

데옥시콜릭산(DA)의 활성화. DA의 활성화 과정은 Figure 1에 나타났다. Figure 1에 나타낸 바와 같이 DA의 활성화는 DCC와 NHS를 이용하여 DA의 카르복실산을 NHS ester의 형태로 변화시키는 과정으로 이 결과는 ¹H-NMR을 통하여 분석할 수 있다. Figure 2(a), (b)에서 DA와 DA-NHS ¹H-NMR 스펙트럼을 나타냈다. Figure 2(a)는 DA의 ¹H-NMR 스펙트럼 결과로 2.1~2.3 ppm 부근에서 DA의 메틸(-CH₂-COOH) 특성 피크가 확인되었으나, NHS ester 반응 후 ¹H-NMR 결과(Figure 2(b))에서는 이 특성 피크가 2.6~2.8 ppm으로 이동하였음을 확인할 수 있었다. 이 결과를 통하여 DA의 카르복실산이 성공적으로 NHS-ester로 전환되었음을 확인하였다.

DA가 결합된 LMWSC의 합성(WSCDA). WSCDA의 합성 과정은 Figure 3에 나타냈으며, Table 1에서 보는 것처럼 반응 초기에 도입된 DA의 양에 따라 WSCDA3, 5, 10 세 종류를 합성하였으며 구조분석은 ¹H-NMR과 FT-IR을 통하여 분석하였다. Figure 2(c), (d)는 각각 LMWSC와 WSCDA의 ¹H-NMR 결과를 보여주고 있다. Figure 2(d)에서 LMWSC와 DA의 모든 피크를 확인할 수 있었다. 또한, Figure 2(d)의 4.5 ppm과 2.0 ppm에서 각각 나타나는 LMWSC의 1번 위치(-CH₂)와 아세틸 그룹(-NHCOCH₃)의 수소의 면적과 0.7 ppm에서 나타나는 DA의 a의 위치(-CH₂)의 수소 면적

Table 1. Characterization of WSCDA Nanoparticles

Samples	Feed ratio(%)	DS(%) ^a	d(nm) ^b	CAC ^c (g/L)	
WSCDA3	Deoxycolic acid	3	2.8	254.9	0.0422
WSCDA5		5	4.9	330.3	0.0303
WSCDA10		10	9.6	359.5	0.0101

^aCalculated based on ¹H-NMR results. ^bParticle size measured by DLS at 25 °C (Concentration of 1 mg/mL). ^cCritical aggregation concentration measured by spectrofluorophotometer (pyrene).

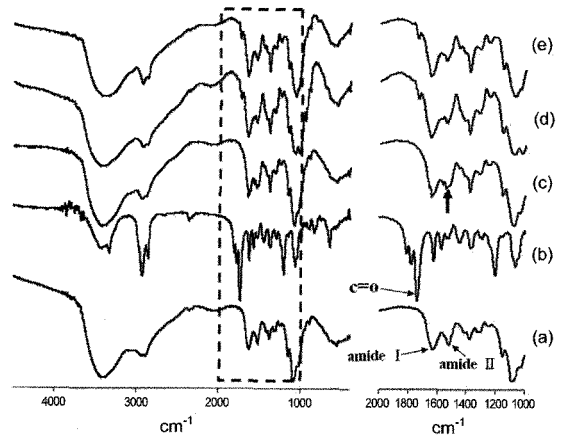


Figure 4. FT-IR spectra of LMWSC (a); DA (b); WSCDA3 (c); WSCDA5 (d); WSCDA10 (e).

의 비를 이용하여 WSCDA에서 DA의 치환도를 구하였다. 이 결과는 Table 1에 나타내었다. Table 1에서 볼 수 있듯이 DA의 치환도는 초기 반응물의 양에 따라 각각 2.8, 4.9, 9.6%를 보였다. 이 결과는 반응 전 이론적으로 도입된 양과 거의 일치하고 있으며 이로써 LMWSC에 DA가 성공적으로 합성되었음을 알 수 있다. 또한, WSCDA의 FT-IR 결과는 Figure 4에 나타냈다. Figure 4(a)는 LMWSC의 FT-IR 결과로 1650 cm⁻¹와 1500 cm⁻¹에서 amide I과 amide II의 특성피크를 확인할 수 있었으며, Figure 4(b)는 DA의 결과로 1750 cm⁻¹에서 DA의 카르복실기의 특성 피크를 확인할 수 있었다. LMWSC에 DA가 결합된 WSCDA의 FT-IR 결과는 Figure 4(c), (d), (e)로 DA

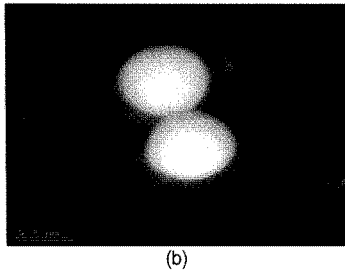
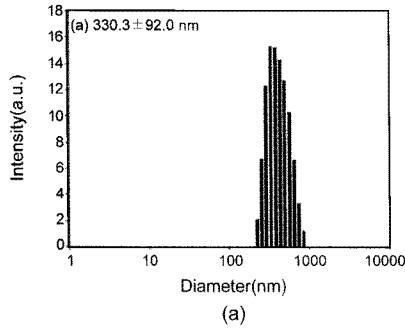


Figure 5. Particle size distribution (a); TEM image (b) of WSCDA5 nanoparticle.

에서 나타난 카르복실기의 특성피크가 합성 후 사라짐을 확인할 수 있었으며, DA의 치환도가 증가함에 따라 LMWSC의 amide II의 특성피크의 면적이 감소함을 확인할 수 있었다. 이상의 ¹H-NMR, FT-IR 결과는 LMWSC에 DA가 결합된 WSCDA가 초기 반응에 이론상 도입된 양과 거의 일치되는 치환도로 합성되었음을 보여준다.

WSCDA 나노입자의 특성. LMWSC에 DA가 도입된 WSCDA의 경우 분자 내에 친수성을 나타내는 LMWSC와 소수성을 나타내는 DA가 함께 공존하는 양친성 물질의 특성을 나타내게 된다. 이러한 양친성 물질의 경우 수용액 하에서 분자내·외의 소수성 DA간의 소수성 상호작용을 통하여 자가 응집 형태의 나노입자를 형성하게 된다. WSCDA 나노입자의 크기 및 분포는 동적광산란법과 TEM을 이용하여 측정하였다. Figure 5는 WSCDA5의 입자크기 분포와 TEM으로 관찰한 입자의 형태를 보여주고 있다. Figure 5(a)에서 볼 수 있듯이 WSCDA5의 크기는 평균 330 nm이고 매우 좁은 크기 분포를 보이고 있으며, Figure 5(b)는 TEM 이미지로 입자가 구형이고 그 크기 동적광산란장치의 결과와 비슷함을 확인할 수 있었다. Table 1에서 볼 수 있듯이 WSCDA의 크기는 250~350 nm의 크기를 갖고 있으며 DA의 치환도가 증가함에 따라 입자가 커지는 것을 확인할 수 있다. 이것은 WSCDA 분자내 소수성 그룹인 DA의 양이 증가함에 따라 나노입자의 중심을 형성하는 소수성 그룹의 증가와 함께 WSCDA 분자간 소수성 결합의 증가로 인하여 나노입자의 크기가 증가되는 것으로 사료되어진다. 이러한 결과는 본 연구자가²¹ 이미 발표한 저분자량 키토산올리고당을 이용하여 키토산-테옥시폴릭산 유도체를 합성하여 나노입자를 제조하여 유전자 전달체로 응용하고자 한 연구에서도 DA의 치환도가 증가함에 따라 입자의 크기가 증가하고 있는 결과와 일치하고 있다. 반면에 고분자량 키토산을 이용하여 키

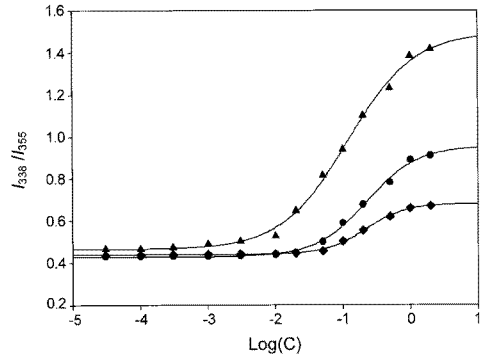


Figure 6. Critical aggregation concentration measurements. Intensity ratio (I_{338}/I_{335}) from pyrene excitation spectra as a function of concentration of WSCDA3 (◆), WSCDA5 (●) and WSCDA10 (▲) in water.

토산-테옥시폴릭산 유도체를 합성하여 나노입자를 제조한 경우 DA의 치환도가 증가함에 따라 분자내의 강한 소수성 결합에 의해 완벽한 소수성 내부를 형성하여 입자의 크기가 감소되는 것으로 보고되고 있다.²² 키토산-테옥시폴릭산 유도체의 나노입자의 크기는 DA의 치환도 및 친수성 주사슬인 키토산의 분자량에 영향을 받는 것으로 사료 되어진다.

WSCDA의 CAC. DA가 결합된 WSCDA의 경우 양친성 특성으로 인하여 수용액 하에서 농도에 의존하는 자가 응집 경향을 나타내며 이러한 특성은 pyrene을 형광 표지로 이용한 형광특성 분석을 이용하여 조사할 수 있다. Pyrene의 형광특성 변화는 양친성 물질의 농도와 밀접한 관계가 있다. CAC 이하의 농도에서는 특별한 pyrene의 형광특성을 나타내지 않는 반면, CAC 이상의 농도에서는 매우 강한 형광특성 및 pyrene의 특성 피크의 이동을 수반한다. WSCDA의 경우 CAC 이하의 농도에서는 335 nm에서 가장 강한 특성 피크를, 그리고 이러한 특성 피크는 농도의 증가와 더불어 고농도에서는 338 nm로 이동하였다. 이러한 특성피크의 강도비를 이용하여 WSCDA의 CAC 값을 구하였다. Figure 6에 나타난 바와 같이 특성 피크의 강도비인 I_{338}/I_{335} 의 경우 저농도에서는 일정한 값을 보이나 농도의 증가와 더불어 급격한 증가 현상을 보이게 되며 일반적으로 이 지점을 CAC 값으로 결정한다. Figure 6의 결과를 이용하여 측정된 WSCDA의 CAC 값은 Table 1에 나타내었으며 0.0101~0.0422 g/L의 결과를 얻었다. 이러한 결과는 DA의 치환도 증가에 따른 소수성의 증가에 의하여 CAC 값이 감소되는 것으로 사료된다.

이트라코나졸이 봉입된 나노입자(WSCDA-ITCN)의 특성. 소수성과 친수성을 동시에 갖는 양친성 물질의 경우 수용액에서 내부에 소수성, 외부에 친수성 그룹이 각각 위치하는 형태의 입자가 형성되어진다. 입자의 형성 과정에서 소수성 약물은 입자내부의 소수성 그룹과 상호작용을 통하여 입자 내부로 봉입되어진다. 이트라코나졸이 봉입된 WSCDA-ITCN의 입자 크기 및 분포는 동적광산란법과 TEM을 이용하여 측정하였다. Figure 7은 WSCDA5-ITCN의 입자의 크기 분포와 형태를 보여 주고 있다. Figure 7(a)는 동적광산란법에 의한 입자의 크기 및 분포로 입자의 크기는 평균 350 nm이고 매우 좁은 크기 분포를 보이고 있다. 또한, Figure 7(b)의 TEM 이미지는 나노입자가

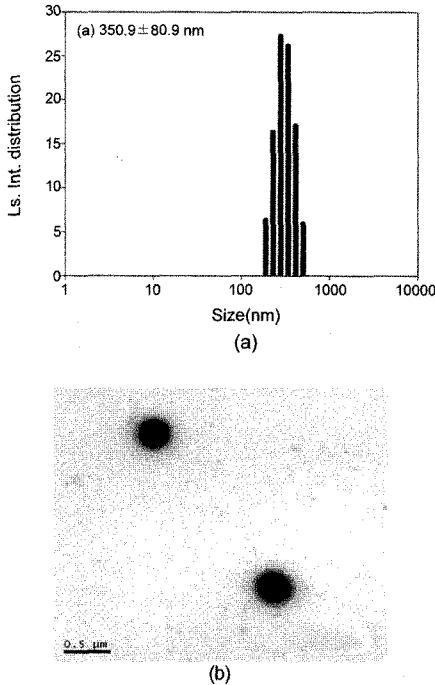


Figure 7. Particle size distribution (a); TEM image (b) of WSCDA5-ITCN nanoparticle.

Table 2. Characterization of Itraconazole-Incorporated WSCDA-ITCN Nanoparticles

Samples	Carrier wt. (mg)	Itraconazole (mg)	NP size (nm)	Drug content (%)	Loading efficiency (%)
WSCDA3-ITCN	30	5	320.3	9.19	60.7
WSCDA5-ITCN	30	5	350.9	9.57	63.5
WSCDA10-ITCN	30	5	396.6	10.17	67.9

구형의 형태를 갖고 있음을 보여주고 있다. Table 2에서 WSCDA-ITCN의 크기를 요약하였다. 입자의 크기는 이트라코나졸이 봉입되기 전과 비교하여 약간 증가하는 경향을 보이고 있으며, 소수성 그룹이 증가함에 따라서 이트라코나졸이 봉입되기 전과 동일한 경향성을 보이고 있다. 이트라코나졸이 봉입되면서 입자의 크기가 약간 증가하는 것은 입자의 내부를 형성하는 소수성 부분에 약물이 도입됨으로써 전체적으로 약물이 봉입되기 전보다 입자의 크기가 증가되는 것으로 사료된다. 약물이 담지된 나노입자는 약물전달체로서 생체이용률 등을 판단하기 위하여 약물의 봉입효율 및 약물의 함량 등이 매우 중요한 요인으로 작용된다. 이트라코나졸이 봉입된 WSCDA-ITCN를 UV 분광광도계를 이용하여 약물의 봉입효율 및 함량을 측정하였다. 이 결과는 Table 2에 요약하였다. 약물의 봉입효율은 61~68%, 함량은 9~10%로 DA의 치환도가 증가할수록 봉입효율과 함량이 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 이 결과는 나노입자의 내부를 구성하고 있는 소수성 그룹인 DA의 양이 증가되어 이트라코나졸과 강한 소수성 상호 작용에 의해 약물의 봉입효율이 증가되는 것으로 사료된다.

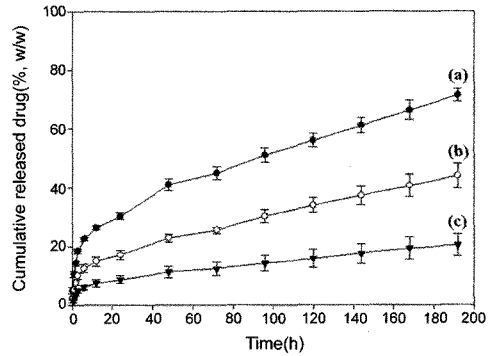


Figure 8. The release behavior of itraconazole from WSCDA3-ITCN (a); WSCDA5-ITCN (b); WSCDA10-ITCN (c) at 37 °C in PBS.

WSCDA-ITCN 나노입자에서 이트라코나졸의 방출 특성. 이트라코나졸의 방출 거동은 인체의 조건과 비슷한 37 °C, PBS에서 실시하였으며 이 결과는 Figure 8에 나타났다. Figure 8에서 볼 수 있듯이 입자내에서 이트라코나졸의 방출 거동은 DA의 치환도가 높을수록 서방성을 보이는 것을 확인할 수 있었다. 이 결과는 DA의 치환도가 높을수록 나노입자내의 소수성 그룹이 증가되어 소수성 약물인 이트라코나졸과의 소수성 상호작용이 강하게 작용되기 때문에 좀 더 천천히 방출되는 것으로 사료된다. 또한, WSCDA-ITCN이 전체적으로 10일 이상 지속적으로 방출되는 것을 확인할 수 있었다. 이상의 결과로 WSCDA-ITCN 나노입자의 경우 우수한 약물의 봉입효율 및 방출 거동에 의하여 이트라코나졸을 비롯한 소수성 약물의 전달체로 응용이 가능할 것으로 사료된다.

결론

저분자량 수용성 키토산(LMWSC)을 소수성 항진균제 전달체로 응용하기 위하여, 데옥시콜릭산(deoxycholic acid, DA)을 이용하여 LMWSC를 화학적으로 개질하였고, ¹H-NMR, FT-IR을 이용하여 합성을 확인하였다. DA가 결합된 WSCDA 나노입자의 경우 분자 자체의 양친성 특성에 의하여 수용액 하에서 나노입자를 형성하는 것을 확인하였고, 그 크기가 약 250~350 nm의 등근 형태의 나노입자인 것을 확인할 수 있었다. 또한, WSCDA를 이용하여 용매증발법을 이용하여 항진균제인 이트라코나졸이 담지된 WSCDA-ITCN 나노입자를 제조하였고, 제조된 나노입자의 분석을 통하여 WSCDA-ITCN 나노입자가 우수한 약물담지 효능 및 봉입량을 갖는다는 것을 확인하였다. 약물방출 거동에서 이트라코나졸이 봉입된 나노입자의 DA의 함량이 많아질수록 약물이 천천히 방출되는 것을 확인하였다. 이상의 결과로부터 본 연구에서 제조한 DA가 결합된 저분자량 수용성 키토산 나노입자는 소수성 약물 전달체로 매우 높은 응용가능성을 제시하였다.

감사의 글: 본 연구는 한국산학협동재단의 지원을 받아 수행하였습니다.

참 고 문 헌

1. J. -W. Nah and M. -K. Jang, *J. Polym. Sci. PartA: Polym. Chem.*, **40**, 3796 (2002).
2. I. Ikeda, M. Sugano, K. Yoshida, E. Sasaki, Y. Iwamoto, and K. Hatano, *J. Agric. Food Chem.*, **41**, 431 (1993).
3. R. A. A. Muzzarelli, C. Lough, and M. Emanuelli, *Carbohydr. Res.*, **8**, 433 (1987).
4. Y. Sawayanagi, N. Nambu, and T. Nagai, *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 2507 (1983).
5. W. Paul and C. P. Sharma, *S. T. P. Pharma Science*, **10**, 5 (2000).
6. M. Lee, J. Nah, Y. Kwon, J. Koh, K. Ko, and S. W. Kim, *Pharmaceut. Res.*, **18**, 427 (2001).
7. M. J. Jang, D. G. Kim, Y. I. Jeong, M. -K. Jang, and J. -W. Nah, *Polymer(Korea)*, **31**, 555 (2007).
8. J. P. Behr, *Acc. Chem. Res.*, **26**, 274 (1993).
9. E. Wagner and M. Cotton, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **4**, 705 (1993).
10. T. Chandy and C. P. Sharma, *Art Cells Art. Org.*, **18**, 1 (1990).
11. J. S. Park, J. C. Yang, S. H. Yuk, H. S. Shin, J. M. Rhee, M. S. Kim, H. B. Lee, and G. Khang, *Polymer(Korea)*, **31**, 189 (2007).
12. J. Q. Del Rosso and A. K. Gupta, *Today's Therapeutic Trends*, **15**, 179 (1997).
13. J. Q. Del Rosso, S. Zellis, and A. K. Gupta, *J. Am. Osteopath. Assoc.*, **98**, 497 (1998).
14. J. G. Hickman, *J. Am. Acad. Dermatol.*, **34**, 785 (1996).
15. J. Delescluse, *J. Am. Acad. Dermatol.*, **23**, 551 (1990).
16. J. Q. Del Rosso and A. K. Gupta, *Int. J. Dermatol.*, **38**, 28 (1999).
17. R. Alcantara and J. M. Garibay, *Adv. Ther.*, **5**, 26 (1998).
18. G. Dongowski, B. Fritzsche, J. Giessler, A. Härtl, O. Kuhlmann, and R. H. H. Neubert, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **60**, 147 (2005).
19. T. Maeda, H. Takenaka, Y. Yamahira, and T. Noguchi, *J. Pharm. Sci.*, **68**, 1286 (1979).
20. Y. Chiba, N. Kohri, K. Iseki, and K. Miyazaki, *Chem. Pharm. Bull.*, **39**, 2158 (1991).
21. S. Y. Chae, S. Son, M. Lee, M. -K. Jang, and J. -W. Nah, *J. Control. Release*, **109**, 330 (2005).
22. S. Kwon, J. H. Park, H. Chung, I. C. Kwon, S. Y. Jeong, and I. -S. Kim, *Langmuir*, **19**, 10188 (2003).