# W/O 에멀젼에 의한 chitosan microcapsule 및 microbead의 morphology와 팽윤성

하병조, 이옥섭, 이충남, 이윤식*
((주)태평양 기술연구원, 서울대학교 공업화학과*)

# Morphology and swelling property of chitosan microcapsules and microbeads prepared by w/o emulsion

Byung-jo Ha, Ok-sub Lee,
Choong-nam Lee, Yoon-sik Lee*
(Pacific R&D Center, Dept. of Chem. Tech., Seoul Nat'l Univ.*)

## 요 약

키토산 마이크로캡슐 및 마이크로비드를 W/O emulsion법에 의해 제조하였으며, SEM을 통해 이들의 morphology를 관찰하였다. 마이크로캡슐은 SEM을 통해 관찰한 결과 약 8 μm 정도의 표피층을 가지고 있었으며, 평균 입자의 크기는 약 250 μm 이였다. 마이크로캡슐의 팽윤부피를 측정한 결과 양성자성 용매가 비양성자성 용매에 비해 상대적으로 높은 팽윤성을 보였다. 또한 메칠바이올렛을 함유시킨 후 그 방출거동을 pH 변화 및 라이소자임 첨가에 따라 관찰한 결과, pH 5.1에서 라이소자임 첨가시 방출속도가 높게 나타났다. 한편 W/O emulsion법에 의해 제조한 마이크로비드의 경우 70 μm 정도의 크기를 보였으며 다공성의 표면구조를 나타내었다. 용매 종류별 팽윤성을 측정한 결과 수용액에서 마이크로캡슐에 비해 2배 이상의 팽윤부피를 나타내었다.

# 1. 서 론

키토산은 게, 새우 등의 껍질을 이루는 구성 성분인 키틴을 탈아세틸화하여 얻어지며, 화학적으로는 D-glucosamine의 pyranose 단위체가 β-(1→4) 결합을 하고 있다. 키토산의 조성과 구조는 셀루로오즈와 유사하나 C-2 위치에 1차 아민기가 있다는 점이 다른 차이점이다(1-2). 키토산의 모노머 형태인 D-glucosamine의 염산염은 pKa 값이 7.8 부근인데 비해, 수용액 상태에서 키토산의 pKa값은 6.1 부근인 것으로 알려져 있다. 따라서 키토산의 아민기는 전자 주개기로 작용할 수 있어 금속이온과 배위결합에 의한 착물을 형성하게 되며 이러한 성질을 이용하여 중금속 흡착제 등으로 사용되고 있다(3). 이외에도 키토산과 그 유도체들은 최근 항균활성, 면역증강효과, 상처치유효과와 같은 여러가지 생리활성이 알려지면서 주목을 끌고 있다. 특히 키토산은 생분해성, 무독성, 생체친화성이라는 측면에서 의료, 화장품, 식품 등의 분야에 대한 응용 연구가 활발히 진행되고 있다(4-6). 키토산 키틴과 달리 유기산과 일부 무기산에 용해되는 성질이 있다. 즉, 산성 수용액상에서 키토산의 아민기들은 양성자화 되며, 이로인해 고분자 사슬사이의 반발이 일어나게 되며 용해하게 된다. 즉, 산성 수용액에 대한 용해성이 우수하며 여러가지 형태로 성형 가공성이 용이하여, 최근 키토산을 마이크로캡슐, 마이크로비드, 멤브레인 등의 형태로 제조하여 이들을 약물전달용 담체(7-12), 세포 및 효소고정화용 담체, 분리막 등의 분야에 응용하고자 하는 연구가 활발히 이루어 지고 있다. 본 연구에서는 키토산 마이크로캡슐과 마이크로비드의 morphology와 팽윤특성 및 기타 물리화학적 특성들을 고찰해 보고자 한다.

# 2. 실 험

## 2.1. 시약 및 기기

키토산은 일본 동경화성의 시약급을 사용하였다. 사용된 키토산의 점도 평균분자량은 8.2 x $10^5$, 탈아세틸화도 78%, $[\alpha]_D^{22}$ = -4.8 (c 1.0, 1% acetic acid) 이였다. Sorbitan monooleate (HLB=4.3)는 ICI사의 것을 사용하였다. 초산, 수산화나트륨은 동양화학의 1급 시약을 사용하였고, 에칠에테르, 메칠렌클로라이드는 Junsei사의 1급 시약을 $P_2O_5$ 하에서 정제하여 사용하였다. 이외 시약들은 모두 시약급을 사용하

였으며, 일반적인 방법에 따라 정제하였다. 자외선 흡수스팩트럼은 Beckman사의 DU-65 Spectrophotometer를 사용하여 측정하였다. 전자현미경은 JEOL사의 JSM-35 Scanning Microscope, Specific rotation은 JASCO사의 Digital Polarimeter DIP-360을 사용하여 측정하였다.

## 2.2. 마이크로캡슐의 제조

메칠바이올렛 10mg과 키토산 0.8g을 초산용액(1 wt.%) 80ml에 용해하였다. 솔비탄모노올레이트 0.6g과 n-헥산올 0.2g을 톨루엔 60ml에 녹인후 이를 수상에 가하고 400 rpm에서 1 시간동안 교반하였다. 이때 형성된 W/O 에멀젼에 25% 글루타르알데히드 1ml을 적가하고 3시간 동안 가교반응을 수행하였다. 생성물을 세척한 후 흡인 여과하고 건조하여 마이크로캡슐을 얻었다.

## 2.3. 마이크로비드의 제조

키토산 용액(1 wt%, in 1% acetic acid) 60g에 솔비탄모노올레이트 0.3g과 n-헥산올 0.1g이 함유된 톨루엔 60ml와 혼합 후 400 rpm으로 균일하게 교반하여 W/O emulsion을 만들고, 이를 약 5℃로 냉각된 2.4L의 12% NaOH 용액에 가한 후 3시간 동안 교반하여 마이크로비드를 생성시켰다. 여기에 에탄올 2L 를 가한 후 다시 1시간 동안 교반 하였다. 경화된 마이크로비드를 여과하고 여액의 액성이 중성이 될때 까지 증류수로 세척하였다. 얻어진 마이크로비드를 에탄올, 아세톤, 에칠 에테르로 차례로 세척하고 최종적으로 G4 glass filter로 여과한 후 $P_2O_5$ 상에서 24시간 동안 진공 건조하였다.

## 2.4. 평균 입자크기 측정

마이크로캡슐과 마이크로비드의 평균 입자크기를 측정하기 위해 U.S standard sieve를 사용하였다. 즉, 정확하게 칭량한 전 시료를 상단체에 넣고 30분간 두드려서 흔든 다음 각 sieve 위에 함유된 잔류량을 측정하여 평균 입자크기를 구하였다.

## 2.5. 팽윤부피 측정

Sintered glass filter가 부착된 직경 0.9cm, 길이 40cm의 유리 컬럼에 1g의 시료를 채우고 20배 부피의 용매를 가했다. 유리 컬럼을 상하로 흔들어 주면서 30분간 팽

윤시킨 다음 정치하여 컬럼의 눈금으로 부터 팽윤 부피를 구하였다. 또한 유기용매와 pH가 조절된 수용액에 대해서도 같은 부피 많큼 컬럼에 가한 후 동일한 방법으로 팽윤 부피를 구하였다. 이때 실험에 사용된 물은 2차 증류수로 비전도도 $5.5\text{-}6.0\times10^{-2}$μmho/cm인 것을 사용하였다.

### 2.6. 방출실험

0.1M acetate buffer (pH 5.1)을 10개의 20ml 바이알에 10ml씩 가했다. 완충용액의 온도를 37℃로 조절한 다음 마이크로캡슐 100mg 씩을 각각 침적시켰다. Boundary effect를 제거하기 위해 서서히 교반하였으며 일정시간 경과 후 바이알을 원심분리하고 UV 스팩트럼을 통해 585nm 에서 흡광도를 측정하고 검량선으로 부터 메칠바이올렛의 용출량을 계산하였다. 효소의 영향을 알아보기 위해 lysozyme을 1mg/ml의 농도로 첨가한 효소 용액에 대해서도 동일한 방법으로 실험을 진행하여 용출량을 계산하였다.

## 3. 결과 및 고찰

키토산 마이크로캡슐, 마이크로비드의 입자분포는 가우스 분포에 따랐으며 평균입자는 각각 250 μm와 70 μm 이였다. 마이크로캡슐의 SEM 분석결과 캡슐의 표면은 비교적 매끈한 형태를 나타내었으며 둥근 모습을 보였다. 마이크로 캡슐을 절반으로 자른 후 내부 구조를 관찰한 결과 방사선 모양의 결이 내부의 중심으로 향하고 있는 것을 볼 수 있었으며 약 8 μm 두께의 skin layer 형성을 확인할 수 있었다. 마이크로비드의 제조는 키토산 산성용액을 W/O 에멀젼으로 한 후 알칼리용액에 의해 코아세르베이션(coacervation)을 일으켜 제조하였다. SEM 사진을 통해 마이크로비드들의 표면 morphology를 관찰한 결과 마이크로비드의 표면에 무수히 많은 pore들이 존재하고 있음을 알 수 있었다. 여러가지 pH 조건에서 마이크로캡슐의 팽윤부피를 측정한 결과 pH 7 이상에서는 낮은 팽윤성을 나타내었고 산성용액일수록 팽윤성이 증가하는 현상을 나타내었다 (Fig.1.). 수용액상에서 키토산 암모늄의 pKa 값은 6.1 부근으로, 그 결과 중성의 수용액 상태에서는 다수의 아미노기들이 암모늄 양이온으로 존재하게 되며 그 결과 고분자 사슬사이의 반발력이 증가하게 되고 그 결과 팽윤성이 증가한

것으로 볼 수 있다. 여러가지 유기용매에 대한 팽윤성을 측정한 결과 극성의 양성자성 용매를 사용한 경우 비양성자성 용매에 비해 상대적으로 높은 팽윤성을 보이고 있으나 가교된 상태이므로 그 정도의 차이는 크지 않았다 (Fig.2.). 키토산 마이크로비드의 경우 가교되지 않은 상태이므로 마이크로캡슐에 비해 비교적 높은 팽윤성을 팽윤성을 나타낸 것으로 보인다 (Fig.3.). 한편 약물전달체로서의 가능성을 타진하기 위해 모델화합물로 메칠바이올렛을 내포시킨 결과 실험 조건에서 모두 서방성을 나타내었다. 이와같은 방출지연효과는 마이크로캡슐 표면의 skin layer형성에 기인한 것으로 볼 수 있다. Fig.4.에는 메칠바이올렛의 방출량을 시간에 대해 도시하였다. 그림에서 볼 수 있듯이 초기 40시간 까지는 초산 완충용액의 라이소자임 처리군이 빠른 방출을 나타내었으며 이후 완만한 상승곡선을 나타내고 있다. 이는 라이소자임의 활성부위에 존재하는 35번 글루탐산의 pKa값이 6.0이고, 52번 아스파르산의 pKa값이 4.5인 것을 고려해 볼 때 pH 5근처에서 글루탐산은 일반산 촉매로 작용하여 1,4-글루코시드 결합의 산소원자와 수소결합을 통해 접근하게 되며, 이때 글루탐산으로 부터 글루코시드 결합의 산소원자로 양성자 전이가 일어나게 되며, 이 결과 형성된 카르보양이온을 아스파르산의 카르복시음이온이 정전기적으로 안정화시키기 때문으로 볼 수 있다. 그러나 매우 지연된 발출속도를 보인 것은 마이크로캡슐의 비교적 두꺼운 skin layer에 의한 낮은 팽윤성과 이로인해 라이소자임이 용이하게 침투할 수 없으며 이로인해 가수분해 반응이 지연되어 그 결과 방출이 지연된 것으로 볼 수 있다.

## 4. 결 론

W/O 에멀젼법에 의해 얻어진 마이크로 캡슐의 단면을 SEM으로 관찰한 결과 바깥층에 얇은 skin layer가 형성되었음을 알 수 있었다. 마이크로 캡슐의 팽윤 실험결과 양성자성 용매가 비양성자성 용매에 비해 상대적으로 높은 팽윤성을 나타내었다. 또한 pH가 조절된 완충용액상에서 모델약물로 사용한 메틸바이올렛의 방출속도를 측정한 결과, 방출속도는 팽윤성에 비례하였으며, pH 5.1에서 lysozyme을 첨가시켰을때 상대적으로 높은 방출특성을 나타내었다. 한편, W/O 에멀젼 상분리법에 의해 제조된 마이크로 비드의 표면은 SEM 사진 분석결과 다공성을 나타내었으며 팽윤실험결과 마이크로캡슐에 비해 2배 이상의 팽윤성을 나타내었다.

# Abstract

Chitosan microcapsules and microbeads were prepared by W/O emulsion method, and their morphologies were observed through SEM. The microcapsules have sk-i n layer of 8 μm and 250 μm of mean diameter. The swelling test showed higher s welling ability in protic solvents than in aprotic solvents. After containing meth-yl violet in the microcapsules, the release patterns were investigated. The results sho wed that the addition of lysozyme in pH 5.1 acetate buffer accelerated the re-lease rate. In case of the microbeads, the mean diameter was about 70 μm. The surfac e of the microbeads showed porous structures. The swelling ability of the beads r evealed two times higher than the one of the microcapsules.


# 참 고 문 헌


1. R. A. A. Muzzarelli, "Chitin", Pergamon Press, Oxford (1977).
2. K. Ogawa, S. Hirano, T. Miyanishi, T. Yui, and T. Watanabem, *Macromolecules*, 17, 973 (1989).
3. R. A. A. Muzzarelli, "Natural Chelating Polymers", Pergamon Press, Oxford (1977).
4. G. Skjåk-Break, T. Anthonsen, and P. Sandfjord (Eds.) "Chitin and Chitosan", Elsevier, New York (1989).
5. A. E. Pavlath, D-S. W. Wong, T. F. Kumosinski, *Chemtech*, 36, (Feb., 1993).
6. H. Struszczyk, *British Polymer Journal*, 23, 261 (1990).
7. S. Miyazaki, K. Ishi, and T. Nadai, *Chem. Pharm. Bull.*, 29, 10, 3067 (1981).
8. T. Ouchi, T. Banba, and H. Masuda, *J. Macromol. Sci, Chem.*, A28, 10, 959 (1991).
9. D. Knorr and R. A. Teutonico, *J. Agric. Food Chem.*, 34, 96 (1986).
10. C. R. Carrara and A. C. Rubiolo, *Biotechnol. Prog.*, 10, 220 (1994).
11. H. Kusaoke and A. Kato, *SEM-I GAKKAISHI*, 49, 4, 202 (1993).

12. M. L. Huguet, A. Groboillot, R. J. Neuffld, D. Poncelet, and E. Dellacherie, *J. Appl. Polym. Sci.*, 51, 1427 (1994).

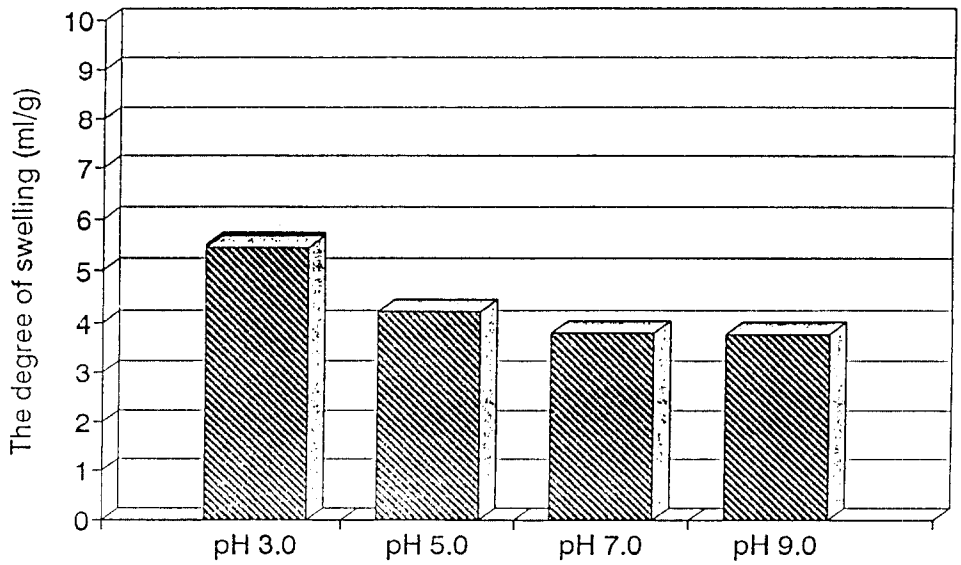


Fig. 1. The swelling volume of chitosan microspheres for various pH conditions.

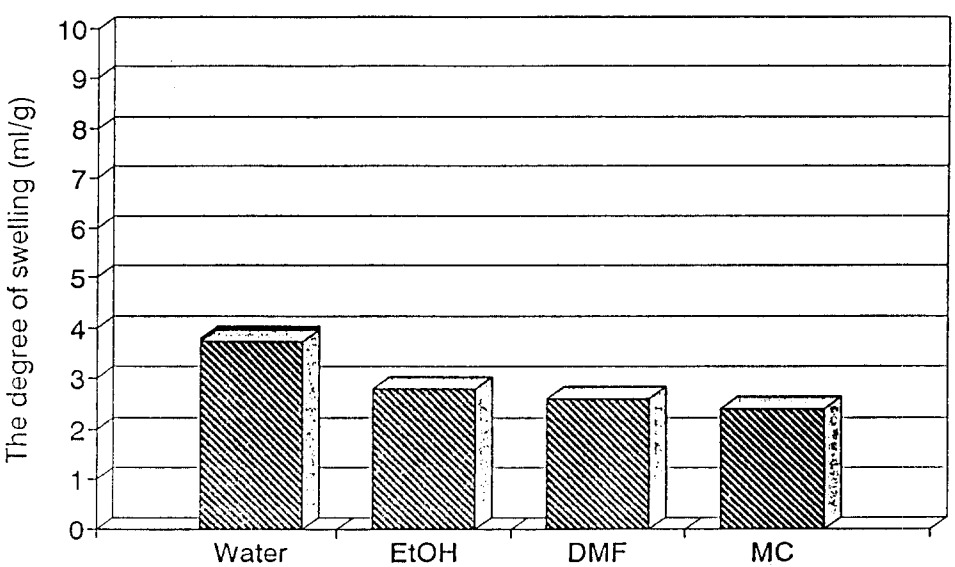


Fig. 2. The swelling volume of chitosan microcapsules in various organic solvents.

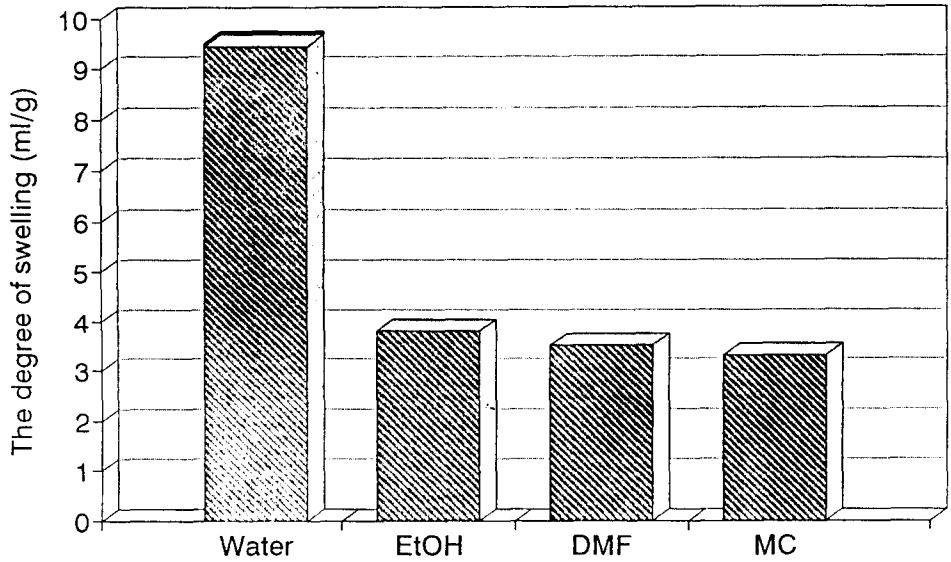


Fig. 3. The swelling volume of chitosan microbeads in various organic solvents.

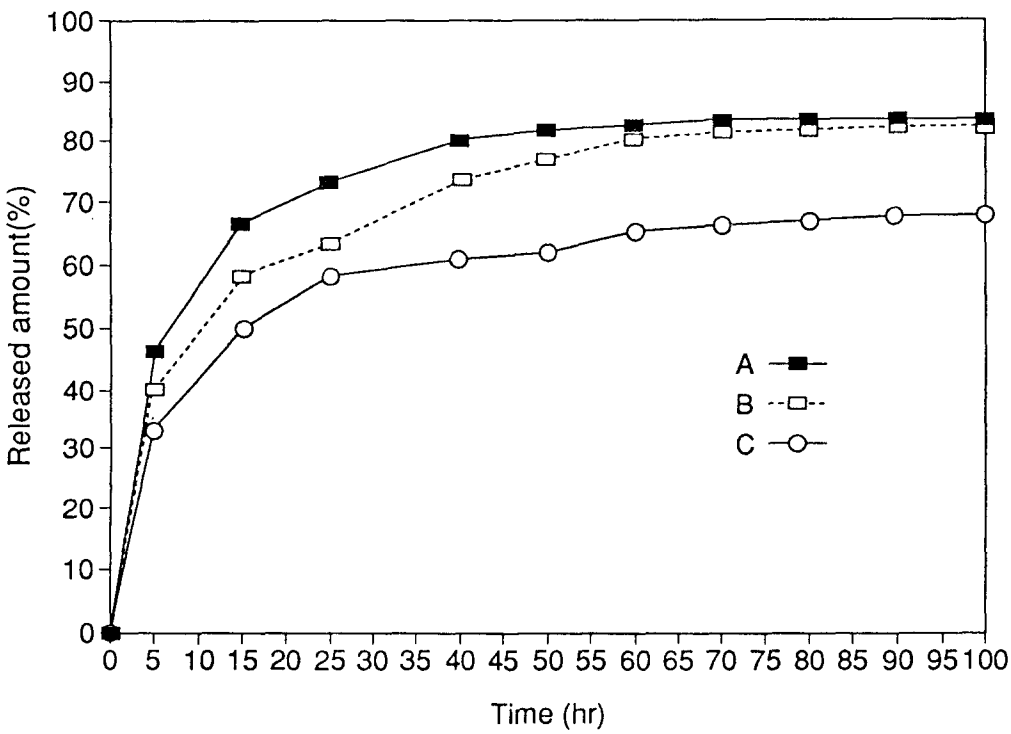


Fig. **4**. The release pattern of methyl violet form chitosan microcapsules at 37°C. [A : 0.1M acetate buffer (pH 5.1) containing lysozyme at a concentration of 1 mg/ml, B : 0.1M acetate buffer (pH 5.1), C : 0.1M phosphate buffer (pH 7.0)]