

## Curdlan Acetate Microspheres를 이용한 Indomethacin의 pH 민감성 방출

<sup>1</sup>이 창 문 · <sup>2</sup>이 영 진 · <sup>1</sup>김 형 주 · <sup>2</sup>박 회 정 · † <sup>3</sup>이 기 영  
<sup>1</sup>전남대학교 의공학협동과정, <sup>2</sup>물질·생물화학공학과, <sup>3</sup>응용화학공학부 및 촉매연구소  
(접수 : 2004. 10. 19., 게재승인 : 2005. 2. 15.)

## pH-Sensitive Release of Indomethacin from Curdlan Acetate Microspheres

Chang-Moon Lee<sup>1</sup>, Young-Jin Lee<sup>2</sup>, Hyung-Ju Kim<sup>1</sup>, Hee-Jung Park<sup>2</sup>, and Ki-Young Lee<sup>† 3</sup>

<sup>1</sup>Interdisciplinary Program of Biomedical Engineering, <sup>2</sup>Department of Material Chemical and Biochemical Engineering,

<sup>3</sup>Faculty of Applied Chemical Engineering & The Research Institute for Catalysis,

Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

(Received : 2004. 10. 19., Accepted : 2005. 2. 15.)

Curdlan, a natural  $\beta$ -1,3-glucan, has been studied as drug carrier due to its unique properties including its thermal gelling characters. In this study, curdlan was chemically acetylated for pH-sensitive drug delivery. Curdlan acetate microspheres (CAMs) were prepared by the solvent evaporation method. The size of the CAMs was below 200  $\mu$ m. The drug loading efficiency of microspheres was approximately 58.44%. In the swelling test, the CAMs showed pH-sensitive behavior. The swelling capacity of microspheres at pH 7.4 was much greater than at pH 1.4. Also, release rate of indomethacin (IND) at pH 7.4 from the CAMs was faster than that at pH 1.4. Therefore the CAMs have potential for the controlled release of IND over an extended period of time.

**Key Words** : Curdlan, indomethacin, pH-sensitive, microsphere

### 서 론

약물전달 시스템 (DDS, drug delivery system)에 관한 연구는 약물의 과량 복용으로 인한 약물의 독성과 부작용을 줄이고 약물의 손실을 최대한 막음으로써 약물이 가지고 있는 효능 및 효과를 최적화시켜 효율적으로 질병을 치료하는 것을 목적으로 한다(1, 2).

DDS 분야에서 다양한 기능을 가진 생체 고분자 및 합성 고분자들이 새로운 약물전달체로 주목 받고 있으며 이러한 약물전달체 개발을 통하여 투여된 약물이 인체 내에서 유효 혈중 농도를 최적화함으로써 치료효과를 극대화하고자 수많은 연구가 활발히 진행되고 있다. DDS에 적합한 고분자로서 요구되는 특성은 생체적합성, 생분해성, 생체에 미치는 독성이 낮아야 함이 필수이다(1). 이러한 목

적으로 대부분 합성 고분자가 약물의 코팅 제제와 방출조절 물질로 사용되고 있지만, 그 독성이 문제되면서 최근 천연 고분자와 같은 새로운 대체 물질에 대한 연구가 활발하다(3).

Curdlan은 glucose가  $\beta$ -1,3-glucosidic linkage에 의해 선형으로 결합되어 있는  $\beta$ -glucan이다(Fig. 1). 이 다당은 다른 다당류에 비해 물에 불용성이며 수용성 현탁액을 가열하면 탄력성이 있는 겔을 형성하는 가열 응고성 다당류이다(4). 또한, curdlan은 독성이 매우 낮고 안정성이 우수하기 때문에 식품으로써의 활용도 기대된다. 최근에 curdlan의 면역 증강, 항암활성과 AIDS 바이러스 감염 저해 활성 등과 같은 새로운 특성들이 밝혀지면서 더욱 DDS 분야에서 주목 받고 있다(5). 이러한 curdlan을 이용한 약물전달 시스템 개발에 있어서 소수성 약물 전달을 위한 제제 개발은 화학적 변형을 통한 불용화가 필수적이며 본 연구에서는 아세틸화를 통하여 효과적으로 약물을 적재한 미세구를 제조하였다.

IND는 cyclooxygenase 저해제이며 화학적으로 indoleacetic acid 유도체로 1-(4-chlorobenzoyl)-5-methoxy-2-methyl-3-indole-3-acetic acid이고 비스테로이드성 소염제로 주로 사용되어

† Corresponding Author : Faculty of Applied Chemical Engineering, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

Tel : +82-62-530-1843, Fax : +82-62-530-1849

E-mail : kilee@chonnam.ac.kr

저 왔다. 이러한 비스테로이드성 소염제 경구 투여로 인한 위장관의 부작용은 주로 위점막 병변을 일으킨다고 알려져 있으나, 최근에는 소장에서 점막 손상이나 궤양, 천공, 격막성 병변과 같은 부작용이 일어난다고 보고 되고 있다(6). 이는 비스테로이드성 소염제의 투여 후 prostaglandin 생성이 감소되며 prostaglandin 생성 활성도가 회복될 때까지 점막 내에 미생물 침입이 일어나서 소장질환 즉 염증, 궤양, 천공, 복막염 및 심하면 사망까지도 일으키는 것으로 보고 되고 있다(7). 이와 같은 부작용을 제거하고 약물의 치료효과를 얻기 위하여 서방출성 제제의 개발이 필요하다.

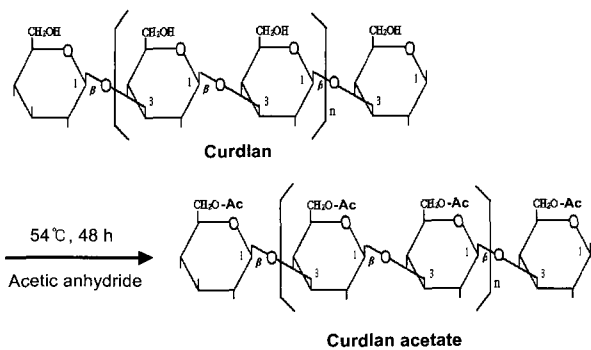


Figure 1. Synthesis of curdlan acetate by acetylation (Ac: acetyl group).

따라서 본 연구에서는 약물 전달제로 응용되고 있는 다당 중에서 생분해성이며 생체적합성인 curdlan을 이용하여 IND을 포함한 미세구를 제조함으로써 연속적으로 약물을 방출하여 치료효과를 높이고 부작용을 최소화할 수 있는 약물전달시스템을 고안하였고, pH에 의한 약물 방출 특성을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 시약

Curdlan은 Wako Chemical Co. (Japan)에서 구입하였고, acetic anhydride는 Lancaster Synthetic Co. (UK)에서 pyridine은 Junsei Chemical Co. (Japan)에서 구입하여 사용하였다. Indomethacin은 Sigma Co. (USA)에서 구입하여 사용하였으며 모든 실험 재료는 정제 공정 없이 사용하였다.

### Curdlan acetate 제조

Curdlan acetate는 Na 등(8)이 사용한 방법을 수정하여 제조하였다. Curdlan 2 g을 formamide 20 ml에 현탁하고 54°C에서 강력히 교반하여 용해시킨 후 pyridine 30 ml와 acetic anhydride 20 ml를 첨가하고 54°C에서 48시간 동안 반응시킨 후 증류수를 넣는다. 미반응물을 제거하기 위해 원심분리 및 투석의 반복 정제 과정을 거친 다음 동결 건조하여 curdlan acetate를 얻었다. 제조한 curdlan acetate는 FT-IR spectroscopy (Nicolet 520P)를 사용하여 확인하였다.

### IND가 적재된 CAMs의 제조

IND가 적재된 CAM을 제조하기 위해 curdlan acetate 100 mg을 DCM 10 ml에 용해시킨 후 IND 30 mg을 첨가하여 실온에서 함께 용해하였다. 제조한 혼합 용액에 증류수 30 ml를 첨가하여 O/W emulsion을 형성하고 실온에서 DCM이 완전히 증발될 때까지 충분히 교반하였다. 용매 증발 후 여과하고 증류수로 세척과정을 반복한 다음 실온에서 건조하였다.

### 주사전자현미경을 통한 CAMs의 관찰

주사전자현미경 (SEM; Scanning Electron Microscope, JEOL, JSM 5400, Japan)을 이용하여 제조한 CAM의 형태와 입자 크기를 관찰하기 위해 제조한 미세입자를 graphite 표면에 놓고 Ion-sputter (JEOL, JFC-1100, Japan)를 사용하여 20 mA에서 5분 동안 gold/palladium으로 코팅시킨 후 가속전압을 20 kV, 배율 100으로 하여 관찰하였다.

### CAMs에 적재된 IND 농도 측정

건조된 CAMs 10 mg을 methanol 3 ml에 용해시킨 후 원심분리하여 상등액을 취하고 UV-spectrometer (Techne, Specgene, UK)를 이용하여 319 nm에서 흡광도를 측정하고 미리 작성한 검정곡선에 의해 IND의 농도를 계산하였다.

### CAMs의 Swelling 측정

건조된 CAMs 30 mg을 PBS buffer (pH 7.4)와 HCl-KCl buffer (pH 1.4) 30 ml이 각각 들어 있는 tube에 넣어 37°C에서 swelling test를 행하였다(8). 일정시간 간격으로 microspheres를 취하여 수분을 제거하고 무게를 측정하여 다음 식에 의해 swelling 정도를 측정하였다.

$$Swelling(\%) = \frac{Wet\ Microsphere\ weight - Dried\ Microsphere\ weight}{Dried\ Microsphere\ weight} \times 100$$

### CAMs로부터 IND의 방출

CAMs 30 mg을 각각 투석막 (M.W. cut off. 12,000)에 담아 PBS buffer (pH 7.4)와 HCl-KCl buffer (pH 1.4) 30 ml가 들어 있는 tube에 넣어 37°C에서 방출 실험을 행하였다. 일정시간 마다 IND이 방출된 buffer를 취하고 새로운 buffer로 교환하였다. CAMs로부터 방출된 약물의 농도는 UV-spectrometer (Techne, Specgene, UK)를 이용하여 319 nm에서 흡광도를 측정하고 미리 작성한 검정곡선식에 의해 계산하였다.

## 결과 및 고찰

### Curdlan acetate의 제조

Curdlan을 이용하여 소수성 약물인 IND를 적재한 미세구를 제조하기 위해 소수성인 curdlan acetate를 제조하였고, Fig. 2에 FT-IR 분석 결과를 나타내었다. 1751 cm<sup>-1</sup>에서 C=O peak, 1376 cm<sup>-1</sup>에서 CH<sub>3</sub> peak 그리고, 600 cm<sup>-1</sup>에서 O-C=O peak의 증가 또는 생성을 확인할 수 있었고 이 결과는 curdlan의 OH기가 acetyl기로 수식되었음을 보여준다(8, 9). 또한, 유기 용매인 DCM에 완전히 용해되는지 여부

를 조사하여 아세틸화된 curdlan이 제조되었음을 확인하였다.

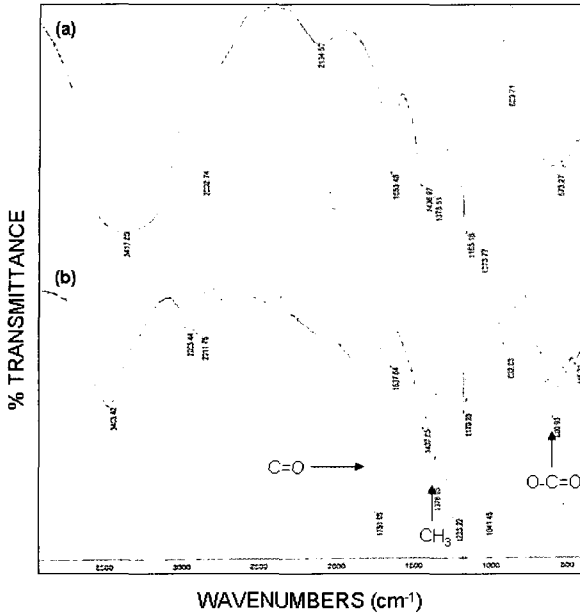


Figure 2. Comparison of FT-IR spectrum of curdlan (a) and curdlan acetate (b).

주사전자현미경을 통한 CAMs의 관찰

제조한 curdlan acetate를 이용하여 미세입자를 제조하고 관찰한 결과, 대부분 매끈한 표면을 갖는 구형으로 이루어져 있었고 입자의 크기는 200 μm 이하의 크기를 가지고 있었다(Fig. 3). 또한, 입자 표면에 용매 증발에 의한 pore가 있음이 관찰되었다.

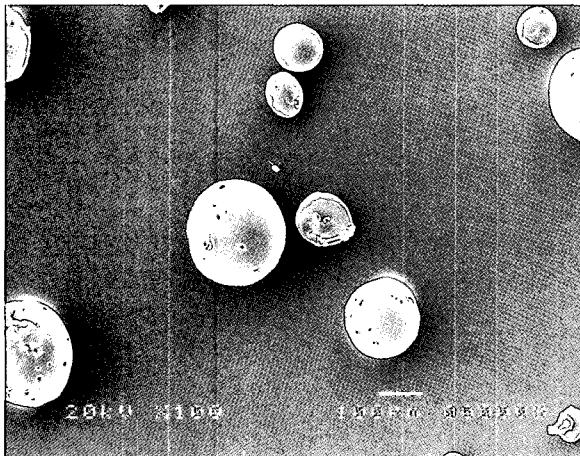


Figure 3. Photograph of curdlan acetate microspheres by SEM (×100).

CAMs의 swelling 특성

미세입자로부터 약물 방출 경향을 결정하는 요인 중의 하나는 미세입자의 swelling 특성이다. 제조한 CAMs를 pH 1.4인 HCl-KCl buffer와 pH 7.4인 PBS buffer에 담귀 swelling을 측정한 결과 1시간 동안 pH 1.4에서는 거의 아

무 변화가 없는 반면 pH 7.4에서는 약 30%의 swelling이 일어났다. pH 1.4에서도 시간이 지남에 따라 서서히 swelling 되는 경향을 나타내지만 8시간에 25%의 비교적 낮은 swelling을 보였다. 이와 달리 pH 7.4에서의 swelling을 14시간까지 증가하는 경향을 보였고 14시간만에 63%의 swelling이 되었다. 이러한 swelling 특성은 curdlan이 산성 조건에서 응집되고 알칼리 조건에서 용해되는 고유한 특성에서 기인한다고 여겨지며 CAMs에 적재된 약물의 방출이 pH에 의해 큰 영향을 받을 것임을 보여주는 결과라 할 수 있다(10). CAMs로부터의 약물 방출에 pH가 미치는 영향만을 고려해 볼 때 경구투여 후 위에서의 방출률은 낮고 소장과 대장에서의 방출률이 높을 것으로 판단된다.

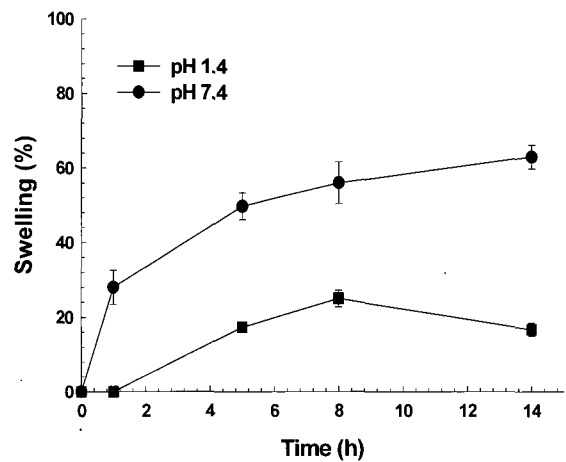


Figure 4. Time courses of swelling of curdlan acetate microspheres at the pH 1.4 and 7.4.

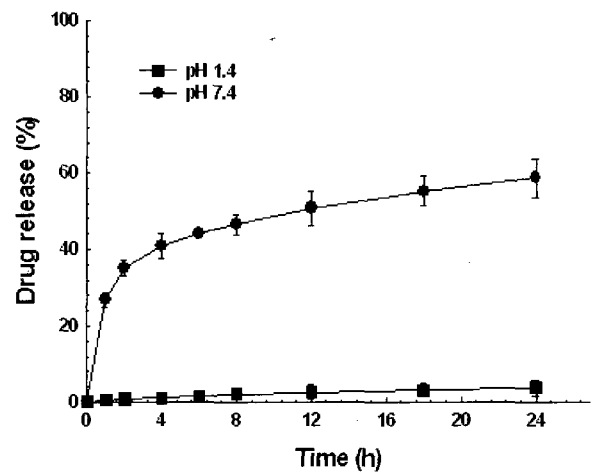


Figure 5. Release of IND from curdlan acetate microspheres at the pH 1.4 and 7.4.

CAMs에 적재된 IND의 농도와 방출

CAMs에 포함된 IND의 농도를 조사한 결과 IND의 loading efficiency (wt-%)는 58.44%였다. 각각 다른 pH 조건 (pH 1.4와 7.4)에서 CAMs로부터 IND의 방출은 앞서 조사한 swelling과 유사한 경향을 나타내었다. pH 1.4에서 CAMs로부터 IND의 방출은 24시간 동안 약 3.7% 밖에 일

어나지 않았고 반면에 pH 7.4에서의 약물 방출은 처음 3시간 동안 약 35%의 방출을 나타내었고 그 이후 서서히 증가하여 24시간 동안 58.74%의 방출을 나타내었다. pH 7.4에서의 방출이 pH 1.4의 방출보다 약 15배 이상 높게 나타났다. 이러한 결과는 CAMs로부터의 IND의 방출이 미세입자의 swelling에 의한 결과라고 판단되며 소장과 대장에서 약물의 흡수가 대부분 일어날 것으로 생각된다(10-13). 또한, 약물의 지속적인 방출을 통해 부작용을 줄이고 약물의 치료효과를 높일 수 있을 것으로 기대된다. 따라서, 이러한 결과로 IND가 포함된 CAMs는 pH 의존성 방출 경향을 보이며 pH 의존성 약물 전달체에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

## 요 약

생분해성인 curdlan을 아세틸화하여 소수성 약물인 IND의 치료효과를 증진시킬 수 있는 약물전달시스템 개발을 위한 실험을 수행한 결과, IND가 포함된 CAMs를 제조할 수 있었고, IND의 loading efficiency는 58.44%였다. 약물 방출 거동에 영향을 미치는 요인 중 제조한 CAMs의 swelling 특성은 처음 1시간 동안 pH 1.4에서는 아무런 변화가 없었고 pH 7.4에서는 30%의 swelling을 보였고 pH 1.4에서보다 pH 7.4에서의 swelling이 약 3배 높았다. 또한 CAMs로부터 IND의 방출은 pH 1.4에서보다 pH 7.4에서 약 15배 이상 증가하였다. 이러한 결과로 CAMs는 IND의 약물전달시스템으로 유용할 것이며 특히 pH에 의존하는 약물방출 경향을 보였다.

## 감 사

이 논문은 2003년도 전남대학교 학술연구비 지원에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

1. Kwon, I. C., K. Kim, S. Kim, H. Chung, and S. Y. Jeong (2004), Drug delivery system using chitosan nanoparticles, *Polym. Sci. Technol.* **15**, 396-401.
2. Shin, B. C., S. H. Cho, and M. S. Kim (2003), Nanoparticles for drug delivery, *Polym. Sci. Technol.* **14**, 298-307.
3. Lim, S., K. Y. Lee, M. S. Lee, C. N. Choi, and Y. D. Kim (2001), Controlled release of indomethacin using biodegradable polymer microspheres, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **16**, 505-510.
4. Kim, B. S., I. D. Jung, J. S. Kim, J. H. Lee, I. Y. Lee, and K. B. Lee (2000), Curdlan gels as protein drug delivery vehicles, *Biotechnology Letters* **22**, 1127-1130.
5. Na, K., K. H. Park, S. W. Kim, and Y. H. Bae (2000), Self-assembled hydrogel nanoparticles from curdlan derivatives: characterization, anti-cancer drug release and interaction with a hepatoma cell line (HepG2), *J. Control. Rel.* **69**, 225-236.
6. Lee, T. K., J. S. Yang, E. S. Choi, Y. B. Yoon, S. H. Bang, K. W. Min, W. Park, and H. S. Kim (1992) Effect of short-term oral administration of indomethacin on intestinal permeability in men, *Kor. J. Gastroenterol.* **24**, 989-995.
7. Park, Y. I., K. H. Yu, Y. S. Hong, J. W. Lee, and S. K. Kim (1998), The Furosemide Effect on renal blood flow of cats treated with indomethacin, *Kor. J. Nephrol.* **17**, 391-400.
8. Na, K., Y. I. Jeong, and K. Y. Lee (1997), Release of indomethacin from pH-sensitive pullulan acetate microsphere, *Biotechnol. Bioprocess. Eng.* **2**, 48-52.
9. Na, K. and K. Y. Lee (1998), pH sensitive release of indomethacin using lactan-acetate microspheres, *Drug Develop. Indust. Pharm.* **24**, 563-568.
10. Lee, C. M., D. W. Kim, H. C. Lee, and K. Y. Lee (2004), Pectin microspheres for oral colon delivery: Preparation using spray drying method and *in vitro* release of indomethacin, *Biotechnol. Bioprocess. Eng.* **9**, 191-195.
11. Brondsted, H. and J. Kopecek (1992), Hydrogels for site-specific drug delivery to the colon: *in vitro* and *in vivo* degradation, *Pharm. Res.* **9**, 1540-1545.
12. Lamprecht, Alf, H. Yamamoto, H. Takeuchi, and Y. Kawashima (2004), Design of pH-sensitive microspheres for the colonic delivery of the immunosuppressive drug tacrolimus, *Euro. J. Pharm. Biopharm.* **58**, 37-43.
13. Yang, L., J. S. Chu, and J. A. Fix (2002), Colon-specific drug delivery: new approaches and *in vitro/in vivo* evaluation, *Int. J. Pharm.* **235**, 1-15.