

로즈마리산을 함유한 키토산 마이크로캡슐의 제조

박진권¹ · 이동희¹ · 이천일² · 강기춘² · 표형배² · 신재섭^{1†}

¹충북대학교 화학과, ²한불화장품

(2009년 2월 2일 접수, 2009년 2월 19일 수정, 2009년 2월 19일 채택)

Preparation of Chitosan Microcapsules Containing Rosmarinic Acid

Jim Kwon Park¹, Dong Hee Lee¹, Chun Il Lee², Ki Choon Kang², Hyeong Bae Pyo², and Jae Sup Shin^{1†}

¹Department of Chemistry, Chungbuk National University, Cheongju, Chungbuk 361-763, Korea

²Hanbul Cosmetics, Umsung, Chungbuk 369-834, Korea

(Received February 2, 2009; Revised February 19, 2009; Accepted February 19, 2009)

요약: 본 연구에서는 주름 개선 효과가 있는 것으로 알려진 rosmarinic acid를 함유하는 마이크로캡슐을 제조하였다. 벽재 물질로는 키토산을 사용하였고, 글루타르알데히드를 가교제로 사용하였으며, W/O 형태의 유화법으로 마이크로캡슐을 제조하였다. 유화제로는 span80을 사용하였으며, 가교가 시행되는 bath상의 물질은 mineral oil을 사용하였다. 제조된 키토산 마이크로캡슐은 완벽한 구의 형태로 평균 0.5~0.9 μm 크기를 보였으며, 교반속도와 유화제의 농도에 따른 캡슐의 크기 및 형태 변화 그리고 함유 효율을 관찰하였다. 마이크로캡슐의 방출특성을 실험하기 위하여 가교제와 유화제의 양을 변화시키면서 방출 속도를 측정하였다.

Abstract: The microcapsules containing rosmarinic acid were prepared in this research. Rosmarinic acid is known that it is effective to care the wrinkles. Chitosan was used as a wall material, and glutaraldehyde was used as a crosslinking agent, and the microcapsules were prepared by the water-in-oil (W/O) emulsion method. In this method Span80 was used as an emulsifier, and mineral oil was used as a medium material. Perfectly spherical microcapsules were obtained in the size range of 0.5~0.9 μm . The effects of emulsifier concentration and stirring speed on the average particle size and distribution, and encapsulation efficiency were investigated. The release behavior of the microcapsules with different amount of the crosslinking agent and different emulsifier concentrations were also investigated.

Keywords: chitosan, microcapsule, rosmarinic acid, controlled release, encapsulation

1. 서 론

최근 환경에 대한 많은 관심과 함께 poly(glycolic acid) (PGA), poly(lactic acid) (PLA), poly(ϵ -caprolactone) (PCL) 그리고 키토산 등과 같은 생분해성 및 생체적합성 고분자 물질에 대한 연구는 점점 증가되어 왔고, 이러한 고분자 물질은 뛰어난 생분해성과 환경 친화적인 특성으로 인하여 일회용품, 마이크로캡슐화에 의한 약물 전달 및 여러 분야에서 다양하게 적용되어 왔다[1-4].

활성 심물질의 보호 및 저장 안정성의 향상을 위한 고분자 담체의 제조를 위한 방법으로 마이크로캡슐화

는 가장 일반적인 방법으로 알려져 있으며, 이러한 마이크로캡슐화는 보통 마이크로 단위의 입자를 갖는 마이크로구와 마이크로캡슐로 나누어진다. 일반적으로 심물질의 보호를 위한 마이크로구는 활성 심물질을 동봉한 고분자가 망상 구조를 이루고 있으며, 마이크로캡슐은 활성 심물질과 고분자 벽재로 구성이 된다. 마이크로캡슐화에 의한 다양한 마이크로 단위의 입자 크기를 갖는 마이크로캡슐의 제조 방법으로는 고분자를 약물과 같이 유화시킨 후 글루타르알데히드 등의 가교제를 이용하여 화학적으로 가교시키는 유화법이 주로 사용되고 있으며, 이 외에도 액중 건조법[5], 스프레이 건조법[6] 등이 있다[7,8].

이러한 마이크로캡슐은 압력에 의해 물질이 방출되는 복사지와 같은 제지분야, 캡슐화를 통하여 자연산

[†]Corresponding author: Jae Sup Shin (jsshin@chungbuk.ac.kr)

연어알과 같은 맛을 지닌 인공 연어알과 같은 식품분야에서 활용되고 있다[9,11]. 또한 액체를 둘러싼 분체 모양을 만들어 다루기 쉽게 하거나, 싸인 물질이 서서히 방출되는 것을 이용하여 그 방출양식을 조절하거나, 그대로 두면 서로 반응하는 물질을 마이크로캡슐화하여 격리시킨 다음 혼합하고 필요에 따라서 반응시키거나, 휘발하기 쉬운 물질을 휘발하지 않도록 하는 것 등의 목적으로 의약, 화장품, 그리고 농약 등 다양한 분야에서 적용되고 있다. 마이크로캡슐의 일반적인 적용 예로서, 살충제와 같은 활성 심물질을 캡슐화하여 대기 중에서의 방출속도를 조절함으로써 오염을 제한시키는 역할 및 심물질의 효율성과 활성의 존속을 향상시키기 위한 방법으로 가장 널리 적용이 되며, 심물질은 마이크로캡슐 입자로부터 방출 매체 내에서 확산에 의하여 방출되는 것으로 알려져 있다[12-15].

본 연구에서 사용된 키토산은 무척추동물 특히 새우나 게와 같은 갑각류, 연체동물인 갯 오징어의 뼈 그리고 곤충류의 겹껍질의 주성분인 키토산을 탈아세틸화한 다당류이다. 키토산은 생체 적합성, 분해성, 무독성 등이 우수하다는 것이 입증되어 인공피부나 수술용 봉합사, 약물 전달체, 혈액응고 방지제, 인공위장막 등의 의약 분야뿐만 아니라 식품, 섬유, 환경, 화장품, 농축산 등에 이르기까지 그 연구 및 응용이 여러 분야에서 활발히 진행되고 있다[16-18]. 또한 심물질로 사용된 rosmarinic acid는 꽃이 핀 허브에서 추출해서 얻을 수 있다. Rosmarinic acid는 여러 가지 기능이 있는데 두통에 효능이 있으며, 순환기 계통에 좋은 물질로 알려져 있다. 또한 rosmarinic acid는 강력한 방부작용이 있으며 탈모 방지에 효능이 있어 모발의 관리에 도움을 준다. 그리고 건성 및 노화된 피부를 정상으로 회복시키는 기능이 있으며, 세포의 재생을 촉진해 주름살을 줄여주는 역할을 한다. 이러한 기능들 때문에 현재 화장품 분야에서 매우 중요한 성분 물질로 등장하고 있으며, 현재 가장 크게 주목을 받고 있는 물질이다.

본 연구에서는 rosmarinic acid를 심물질로 사용하고 생분해성 고분자인 키토산을 벽체 물질로 사용하여 마이크로캡슐을 제조하였고, 제조 조건에 따른 마이크로캡슐의 형태 및 구조적 특성 그리고 rosmarinic acid의 방출거동에 대해 고찰하고자 하였다. 특히 크기가 1 μm 이하인 마이크로캡슐의 제조를 시도하였다.

2. 실험

2.1. 시약 및 기기

본 연구에서는 벽체 물질인 키토산(medium molecular weight, 탈아세틸화도 : 75~85%)과 심물질인 rosmarinic acid는 Aldrich Chemical에서, 가교제인 글루타

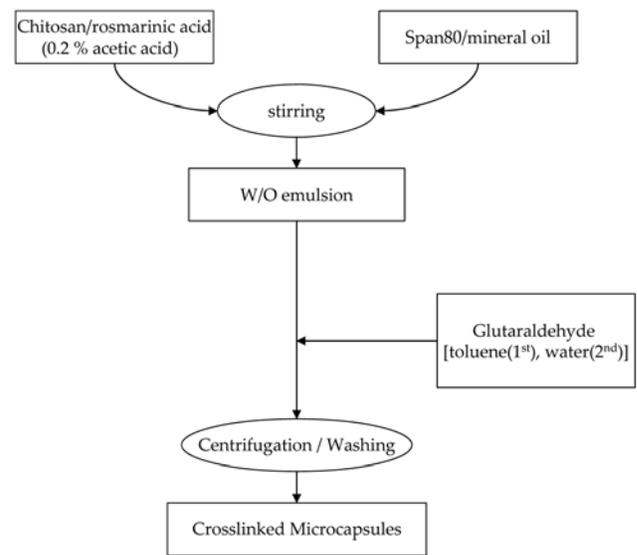


Figure 1. A schematic representation of the microencapsulation process.

르알데히드 용액(25% in water)은 Kanto Chemical에서 구입하여 사용하였다. 계면 활성제인 sorbitan monooleate (Span 80)는 Junsei Chemical에서, 가교가 시행되는 bath상의 물질인 mineral oil과 세척용으로 사용한 n-hexane은 Samchun Chemical에서 구입하여 사용하였다. 그리고 아세트산은 Aldrich Chemical에서 구입하여 사용하였다.

마이크로캡슐의 형태 및 입자크기의 변화를 측정하기 위하여 주사 전자 현미경(SEM: Hitachi S-2500C)을 사용하였으며, homo mixer는 T. K. homo mixer mark II model 2.5를 사용하였고, 마이크로캡슐의 방출거동을 살펴보기 위하여 UV 분광광도계(UV-Vis; Beckman PU 650)를 사용하였으며, IR spectrometer는 Jasco의 FT-IR 680을 사용하였다.

2.2. 키토산 마이크로캡슐의 제조

마이크로캡슐을 제조하는 대표적인 실험 방법을 Figure 1에 나타내었다.

본 연구에서 마이크로캡슐을 제조하는 대표적인 방법은 다음과 같다. 0.2% 아세트산 용액 20.0 g에 키토산 2.00×10^{-1} g과 rosmarinic acid 2.00×10^{-2} g을 녹인 용액(용액 1)과 mineral oil 100 mL에 span 80 1.0 mL를 녹인 용액(용액 2)을 빠른 속도로 교반하면서 유화시켰다. 용액 1을 고속 교반하는 동안 dropping funnel을 이용하여 용액 2를 30 min에 걸쳐 dropwise하여 W/O emulsion을 형성하였다. 형성된 W/O emulsion을 homomixer로 옮겨 10 min 동안 12000 rpm으로 교반하였다.

여기에 글루타르알데히드로 포화된 toluene 1.0 mL를 넣어 1차 외부 가교를 진행하였다. 그리고 12000 rpm으로 1 h 동안 교반한 후에 1차 가교화된 키토산 용액에 글루타르알데히드 용액(25% in water) 0.50 mL를 가하여 2차로 내부 가교를 시켜주었다. 다시 12000 rpm으로 90 min 동안 교반 시켜주었다. 제조된 마이크로캡슐을 원심분리(5000 rpm으로 3 min 동안 실시)하여 mineral oil를 분리해 제거해주었다. 남아있는 mineral oil은 2회에 걸쳐 n-hexane으로 세척한 후에 원심 분리하는 과정(각각 5000 rpm, 3 min 동안)을 반복한 후에 상온에서 건조하였다. 그리고 마이크로캡슐의 특성을 알아보기 위하여 마이크로캡슐을 제조하는 과정 중에 가교제와 유화제의 양을 달리하여 캡슐의 형태 및 크기에 대한 영향을 살펴보았으며, 또한 마이크로캡슐을 제조할 때 교반속도에 의한 영향을 알아보기 위하여 교반속도를 6000, 9000, 그리고 12000 rpm으로 변화시켜 가면서 마이크로캡슐을 제조하였다.

2.3. 키토산 마이크로캡슐의 물성 측정

제조 조건의 변화에 따른 마이크로캡슐의 형태 및 입자크기의 변화를 관찰하기 위하여 건조한 키토산 마이크로캡슐을 주사 전자현미경(SEM: Hitachi S-2500 C)을 사용하여 관찰하였다.

2.4. 키토산 마이크로캡슐의 방출 거동

마이크로캡슐의 방출 거동을 알아보기 위하여 에탄올 100 mL에 0.200 g의 제조된 마이크로캡슐을 넣고 36.5 ± 0.5°C로 조절된 항온조에서 천천히 교반하여 주었다. 일정 시간에 따라 용액의 상층액을 채취하였고, UV 분광광도계(Beckman PU 650)를 이용하여 330 nm에서 흡광도를 측정하여 용출된 rosmarinic acid의 양을 정량함으로써 심물질의 방출 특성을 조사하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 마이크로캡슐의 분석

본 연구에서 제조한 마이크로캡슐을 분석하기 위하여 마이크로캡슐의 IR 스펙트럼을 얻어 보았다. 비교를 위하여 키토산과 rosmarinic acid의 IR 스펙트럼도 같이 분석하였다. 그 결과를 Figure 2에 나타내었다.

Figure 2의 결과를 보면 rosmarinic acid에서 나타나는 carbonyl기에 의한 1712 cm⁻¹에서의 흡수가 마이크로캡슐의 IR 스펙트럼에서는 shoulder의 형태로 나타나고 있음을 확인할 수 있었으며, 이것으로 이 키토산 마이크로캡슐에 rosmarinic acid가 함유되어 있음을 확인할 수 있었다.

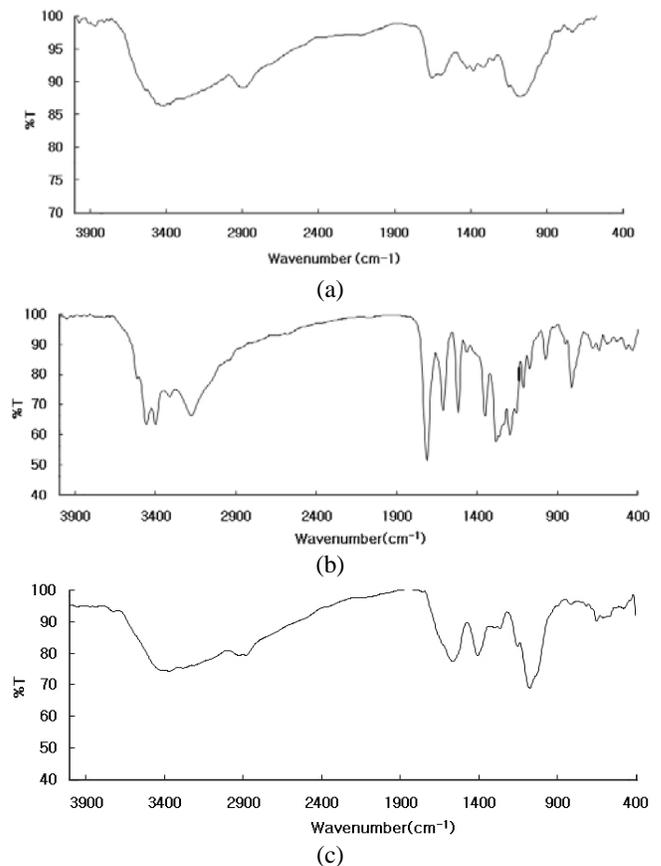


Figure 2. IR spectrum of chitosan (a), rosmarinic acid (b), and the microcapsule (c).

3.2. 교반속도에 대한 영향

교반속도에 따른 마이크로캡슐 입자의 형태 및 크기를 비교 분석하기 위하여 유화제의 농도를 1.0%로 고정하고, 교반 속도를 6000 rpm, 9000 rpm, 그리고 12000 rpm으로 각각 변화시켜가면서 마이크로캡슐을 제조하였다. 교반 속도에 의한 마이크로캡슐의 형태 및 평균 입자 크기를 SEM을 이용하여 관찰한 결과를 Figure 3에 나타내었다.

Figure 3의 결과를 보면 교반 속도의 차이가 입자의 크기에는 영향을 조금밖에 주지 않지만 입자의 모양에는 영향을 주어 6000 rpm에서는 표면이 조금 매끄럽지 못한 마이크로캡슐이 얻어졌고, 9000 rpm이나 12000 rpm에서는 아주 매끄러운 표면을 갖는 마이크로캡슐들이 얻어졌음을 확인할 수 있었다. 마이크로캡슐들의 크기 분포를 비교해 보면 12000 rpm에서가 가장 균일했으며 6000 rpm에서는 균일도가 많이 떨어졌다. 따라서 결론적으로 6000 rpm으로는 좋은 마이크로캡슐을 얻는데 교반 속도가 조금 부족하다고 할 수 있으며 9000 rpm도 나쁘지는 않지만 12000 rpm에서 조금 더 좋은 마이크로캡슐을 얻을 수 있다고 말

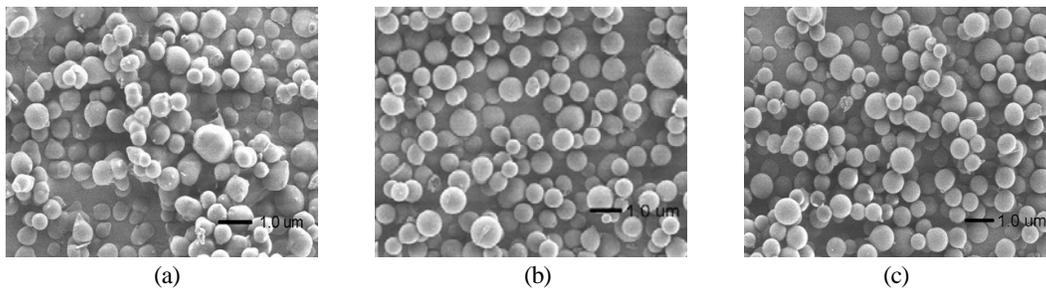


Figure 3. SEM of chitosan microcapsules prepared at different agitation speeds (chitosan concentration: 1.0%, Span 80 content: 1.0%, saturated toluene solution: 1.0 mL). (a) 6000 rpm, (b) 9000 rpm, (c) 12000 rpm.

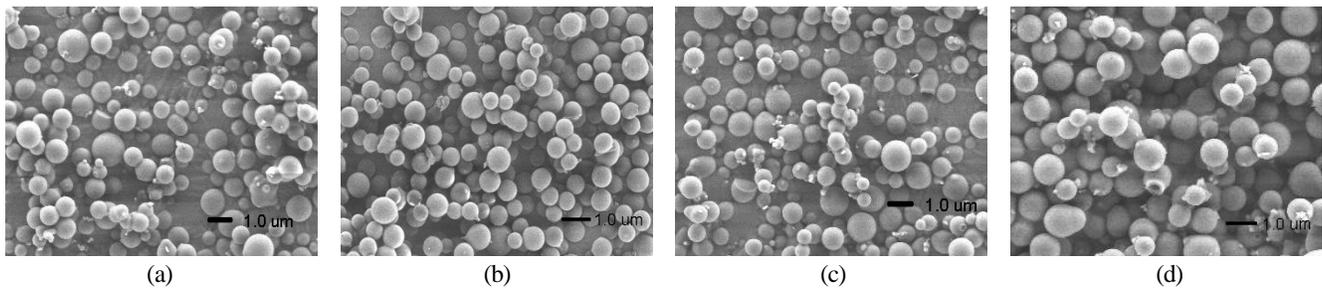


Figure 4. SEM of chitosan microcapsules prepared at different emulsifier contents in mineral oil (chitosan concentration: 1.0%, agitation speed: 12000 rpm, saturated toluene solution: 1.0 mL). (a) 0.5%, (b) 1.0%, (c) 2.0%, (d) 3.0%.

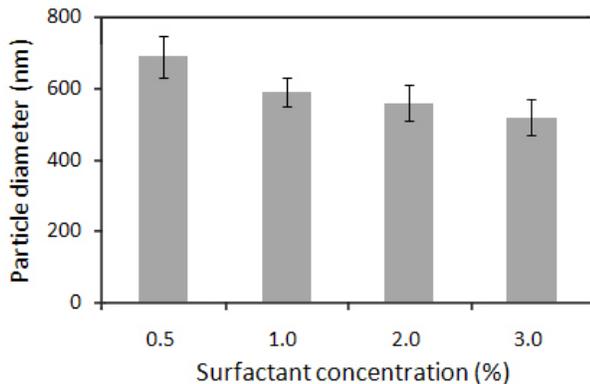


Figure 5. Particle size of chitosan microcapsules prepared at different emulsifier contents in mineral oil (chitosan concentration: 1.0%, agitation speed: 12000 rpm, saturated toluene solution: 1.0 mL). (a) 0.5%, (b) 1.0%, (c) 2.0%, (d) 3.0%.

할 수 있다. 6000 rpm으로 제조된 마이크로캡슐은 910 ± 80 nm의 평균 입자크기를 나타내었고, 9000 rpm으로 제조된 마이크로캡슐은 680 ± 60 nm의 평균 입자크기를 나타내었고, 12000 rpm의 교반속도로 제조된 마이크로캡슐은 평균 입자크기가 590 ± 40 nm로 제조되었다. 따라서 교반속도가 증가함에 따라 조금 작은 평균 입자크기를 갖는 마이크로캡슐이 형성되는 것을 확인할 수 있었다.

3.3. 유화제의 농도에 의한 영향

유화제의 농도가 마이크로캡슐의 형태에 미치는 영향을 알아보기 위하여 교반속도를 12000 rpm으로 고정하고 유화제의 농도를 0.5%, 1.0%, 2.0%, 그리고 3.0%로 변화시켜가면서 마이크로캡슐을 제조하였다. SEM을 이용하여 마이크로캡슐의 형태를 관찰한 결과를 Figure 4에 나타내었다.

유화제는 유기 상태 중에 존재하는 물방울을 효과적으로 분산시키고, 분산된 입자에 안정성을 부여하기 위하여 사용된다. 이러한 유화제의 특성으로 인하여 Figure 4에서 볼 수 있듯이 0.5%에서 3.0%까지 유화제의 농도가 증가할수록 마이크로캡슐의 평균 입자크기는 감소하였다. 그러나 마이크로캡슐 크기의 분포 폭은 더 넓어졌으며 1.0%일 때 비교적 균일한 마이크로캡슐이 얻어졌다. 유화제의 농도 변화에 따른 형성된 마이크로캡슐의 크기 변화를 Figure 5에 나타내었다.

Figure 5의 결과를 보면 형성된 마이크로캡슐의 평균 크기는 유화제의 농도가 0.5%일 때 얻어진 마이크로캡슐의 크기는 690 ± 60 nm이었으며, 1.0%에서 얻어진 것의 평균 크기는 590 ± 40 nm이었으며, 2.0%에서 얻어진 것의 평균 크기는 560 ± 50 nm이었으며, 3.0%에서 얻어진 것의 평균 크기는 520 ± 50 nm이었다. 결론적으로 유화제의 양의 증가가 입자의 크기를 작게 하게 하였으며, 그러나 이 경우에 분포를 더 줄이지는 못하는 것으로 판단되었다.

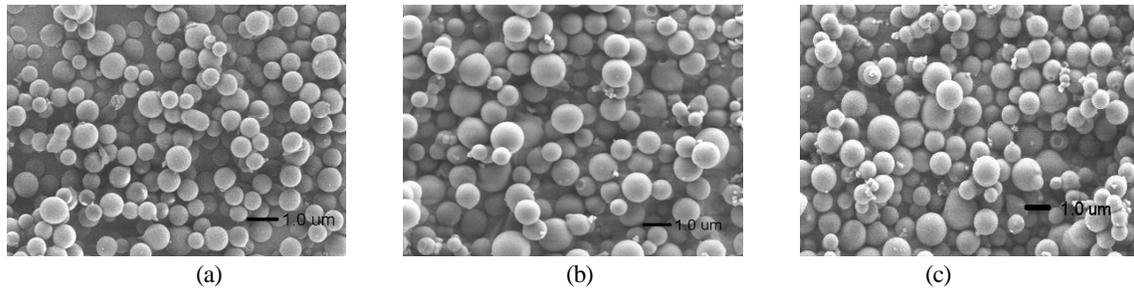


Figure 6. SEM of chitosan microcapsules prepared at different glutaraldehyde crosslinking agent amount (chitosan concentration: 1.0%, agitation speed: 12000 rpm, Span 80 content: 1.0%). (a) 1.0 mL, (b) 2.0 mL, (c) 3.0 mL.

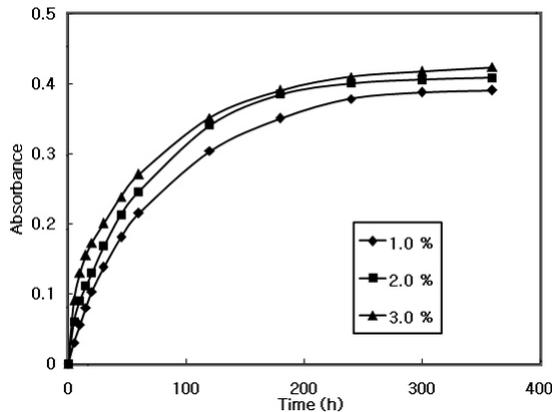


Figure 7. Release profiles of rosmarinic acid from chitosan microcapsules prepared at different emulsifier contents (chitosan concentration: 1.0%, agitation speed: 12000 rpm, saturated toluene solution: 1.0 mL, release temperature: $36.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$).

3.4. 가교제의 양에 의한 영향

가교제의 농도가 마이크로캡슐의 형태에 미치는 영향을 알아보기 위하여 교반속도를 12000 rpm으로 고정하고 글루타르알데히드를 녹인 톨루엔 용액의 양을 각각 1.0 mL, 2.0 mL, 그리고 3.0 mL로 각각 변화시켜가면서 마이크로캡슐을 제조하였다. SEM을 이용하여 마이크로캡슐의 형태를 관찰한 결과를 Figure 6에 나타내었다.

안정화된 마이크로캡슐의 형성을 위해 두 차례에 걸쳐 가교를 시켜주었는데, 분산된 유화제의 분자 층을 두고 외부와 내부를 각각 가교하였다. 외부 가교를 하지 않았을 경우는 마이크로캡슐이 형성되지 않았다. Figure 6의 결과를 보면 가교제의 양의 변화가 형성된 마이크로캡슐의 모양이나 크기에 영향을 주지 않음을 알 수 있다. 형성된 마이크로캡슐의 평균 크기는 3가지 경우 모두 590 ± 40 nm이었다.

3.5. 마이크로캡슐의 방출거동

3.5.1. 유화제의 농도에 의한 영향

같은 조건의 교반 속도, 교반 시간 그리고 가교제의 농도 하에서 유화제의 양만을 변화시켜가면서 제조한 마

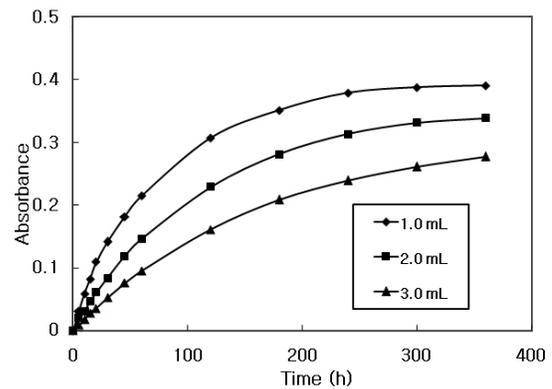


Figure 8. Release profiles of rosmarinic acid from chitosan microcapsules prepared at different glutaraldehyde crosslinking agent amount (chitosan concentration: 1.0%, agitation speed: 12000 rpm, Span 80 content: 1.0%, release temperature: $36.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$).

이크로캡슐에 대한 rosmarinic acid의 방출거동을 Figure 7에 나타내었다.

본 실험에서 심물질로 사용된 rosmarinic acid의 방출 대상 용매로서 에탄올을 이용하였고, UV 분광 광도계를 이용하여 rosmarinic acid의 특성 파장인 330 nm에서 시간의 변화에 따른 심물질의 방출거동을 측정하였다. Figure 7의 결과를 보면 사용한 유화제의 양이 증가할수록 방출 속도가 조금 빨라지는 것을 볼 수 있었지만 그 차이는 매우 미미하였다. 따라서 결론적으로 유화제의 농도의 변화가 방출 속도에 크게 영향을 주지 않는다고 말할 수 있다.

3.5.2. 가교제의 양에 의한 영향

본 실험에서는 가교제의 농도에 따른 마이크로캡슐의 방출거동을 살펴보기 위해 Figure 2에서 확인한 바와 같이, 교반속도가 12000 rpm인 경우에서 비교적 균일한 마이크로캡슐이 얻어지므로 교반속도를 12000 rpm으로 고정하고 가교제의 양을 변화시켜가면서 마이크로캡슐을 제조하였다. 이 때 마이크로캡슐의 방출 특성 결과를 Figure 8에 나타내었다.

Figure 8의 결과를 보면 가교제의 양이 증가할수록 rosmarinic acid의 방출이 지연됨을 알 수 있었다. 가교제의 양이 증가할수록 표면의 가교밀도 증가로 인해 rosmarinic acid의 방출이 지연된 것으로 판단된다. 가교제의 증가에 의해 방출이 지연되는 정도는 Figure 8에서 보듯이 그 차이가 매우 컸다.

3.5.3. 마이크로캡슐 내의 rosmarinic acid의 함량 결정

본 연구에서 얻은 마이크로캡슐 내의 rosmarinic acid의 함량은 방출 실험을 통하여 구하였다. 즉 본 연구에서 대표적인 방법으로 마이크로캡슐을 제조하였을 때 얻어진 마이크로캡슐을 가지고 방출실험을 하였을 때 20일이 경과한 후에 방출된 양을 기준으로 함량을 계산하였다. 계산해본 결과 0.200 g의 마이크로캡슐 당 0.0125 ± 0.0007 g의 rosmarinic acid를 함유하고 있었다.

4. 결 론

본 연구에서는 벽재 물질로서 생분해성 고분자인 키토산을 이용하여, rosmarinic acid를 심물질로 하는 키토산 마이크로캡슐을 W/O 형태의 유화법으로 제조하였다. 교반 속도, 유화제, 가교제의 변화에 따른 마이크로캡슐의 형태 및 평균입자크기 및 방출거동을 조사하였다. 제조된 마이크로캡슐의 입자는 교반 속도가 증가할수록 그 크기가 조금 작아지는 것을 확인하였으며, 유화제의 함량이 증가함에 따라 마이크로캡슐의 평균 입자 크기가 조금 감소함을 알 수 있었다. 사용된 가교제의 양의 변화가 마이크로캡슐의 형태 및 평균 입자 크기에는 영향을 별로 주지 않았지만, 가교밀도의 증가가 rosmarinic acid의 방출을 아주 느리게 하게 함을 관찰할 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 2008년 지식경제부 지자채주도연구개발 지원사업의 지원에 의한 결과이며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. S. Sosnowski, M. Gadziowski, and S. Slomkowski, *Macromolecules*, **29**, 4556 (1996).
2. R. C. Mehta, B. C. Thanoo, and P. P. Deluca, *J. Control. Release*, **41**, 277 (1996).
3. R. J. H. Stenekes, O. Franssen, E. M. G. van Bommel, D. J. A. Crommelin, and W. E. Hennink, *Int. J. Pharm.*, **183**, 29 (1999).
4. S. Y. Jeong, J. H. Choi, and Y. D. Ma, *Polymer (Korea)*, **26**, 523 (2002).
5. B. O'Donnell and J. W. McGinity, *Adv. Drug Del. Rev.*, **28**, 25 (1997).
6. K. A. Johnson, *Adv. Drug Del. Rev.*, **26**, 3 (1997).
7. S. Benita, *Microencapsulation-Methods and Industrial Applications*, Marcel Dekker, New York (1996).
8. A. Kondo, *Microcapsules Processing and Technology*, Marcel Dekker, New York (1979).
9. C. J. Kim and P. I. Lee, *Pharm. Res.*, **9**, 10 (1992).
10. A. Kim, S. J. Park, and J. R. Lee, *J. Colloid Interface Sci.*, **197**, 119 (1998).
11. S. J. Park and J. R. Lee, *J. Colloid Interface Sci.*, **291**, 178 (1999).
12. T. Kidchob, S. Kimura, and Y. Imanishi, *J. Control. Release*, **54**, 283 (1998).
13. S. J. Park, Y. S. Shin, and J. R. Lee, *J. Colloid Interface. Sci.*, **241**, 502 (2001).
14. K. Hirech, S. Payan, G. Carnelle, L. Brujes, and J. Legrand, *Powder Technol.*, **130**, 324 (2000).
15. X. Y. Shi and T. W. Tan, *Biomaterials*, **23**, 4469 (2002).
16. R. A. A. Muzzarelli, *Chitin*, Pergamon Press, New York (1997).
17. L. Illum, *Pharm. Res.*, **15**, 1326 (1998).
18. D. K. Singh and A. R. Ray, *J. Memb. Sci.*, **155**, 107 (1999).