

히알루론산에 결합된 리포산 자기조립체의 제조 및 특성

홍인림* · 김영진†

충남대학교 공과대학 바이오응용화학과, *충남대학교 공과대학 나노기술학과
(2008년 6월 27일 접수, 2008년 7월 29일 수정, 2008년 8월 21일 채택)

Self-Aggregated Nanoparticles of Lipoic Acid Conjugated Hyaluronic Acid

In Rim Hong* and Young Jin Kim†

Department of Applied Chemistry & Biological Engineering, Chungnam National University,
220, Gung-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-764, Korea

*Department of Nano Technology, Chungnam National University,
220, Gung-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-764, Korea

(Received June 27, 2008; Revised July 29, 2008; Accepted August 21, 2008)

초록: 본 연구에서는 천연고분자인 히알루론산(hyaluronic acid, HA)에 항산화제인 리포산(lipoic acid, LA)을 그래프트시켜 양친성 공중합체를 결합하였다. 이 공중합체는 수용액상에서 자기조립에 의해서 친수성인 히알루론산이 소수성인 리포산을 감싸는 형태의 고분자 입자를 형성한다. 히알루론산과 리포산을 결합하기 전에 adipic acid dihydrazide(ADH)을 이용하여 히알루론산의 카복실 부분을 개질시켰다. 히알루론산의 개질 분석과 HA-*g*-LA의 결합을 확인하기 위해 분광학적 분석방법을 이용하여 분석하였다. 형성된 입자는 DLS와 TEM을 사용하여 크기를 측정하였고 나노크기의 구조를 이룬다는 것을 확인하였다. 나노크기의 고분자 입자는 소수성 물질을 포함하는 전달체로 사용될 수 있다.

Abstract: Hyaluronic acid (HA) is a natural glycosaminoglycan and is used widely in the pharmaceutical field. Lipoic acid (LA) helps the regeneration of exogenous and endogenous antioxidants such as Vitamin C and Vitamin E as well as glutathione. It also acts as antioxidant indirectly. Hydrophilic HA as a biodegradable and biocompatible polymer was conjugated with hydrophobic LA as an antioxidant to form the graft copolymer. The carboxyl group of HA was modified by adipic acid dihydrazide (ADH). The synthesis of HA-*g*-LA graft copolymers was characterized by FT-IR, ¹H-NMR spectroscopy. The conjugates could form the self-assembled nanoparticles in aqueous solution. The particle size and critical aggregation concentration were verified to use the nanoparticle as a carrier for the hydrophobic material.

Keywords: hyaluronic acid, lipoic acid, graft copolymer, antioxidant.

서 론

최근 피부노화를 방지하기 위한 기능성 화장품이 많이 연구되고 있다. 피부노화를 방지, 관리를 하는 수많은 물질 중 중심을 이루는 물질이 바로 항산화제이다. 노화는 나이가 들에 따라 자유 라디칼이라고 불리는 불순물이 체내에 쌓임으로써 진행되며 이 자유 라디칼은 피부노화, 악성종양, 혈관질환 등의 원인이 된다. 항산화제는 원천적으로 이러한 자유 라디칼을 억제하는 성분이다. 항산화제의 종류로 알파리포산(α -lipoic acid, LA)과 vitamin E(VE)가 가장 널리 이용되고 있다. 리포산은 맥아, 맥주효모, 붉은 고기 등에 포함되어 있으며 강력한 항산화 효과로 노화방지와 주름을 예방, 제거하는데 효과적이다. 리포산의 항산화제 수용력은 티올그룹에 의해 정해지며 이러한

티올그룹은 자유 라디칼과 직접반응을 한다. 리포산은 또한 SOD (superoxide dismutase), 코엔자임 Q10, 글루타티온, 다른 항산화제 (vitamin C와 E) 등의 효과를 강화시킨다. 그러므로 리포산은 질병의 치료적으로나 자유 라디칼의 억제에 중요한 항산화제로 고려된다.¹⁻⁴

히알루론산(hyaluronic acid, HA)은 생분해성, 생체적합성, 면역 반응성이 없는 일직선의 polysaccharide이다. 분자량은 1000에서 10000000 Da으로 매우 넓은 범위를 갖는다. 사람의 몸에 일정량 포함되어 있는 물질로 피부밖의 표피와 진피속의 세포를 서로 결합시키는 세포간질로서 작용한다. 히알루론산은 살아있는 세포에 영양분을 전달할 수 있게 하고 윤활유 역할을 하며 피부의 수분증발을 막는 동시에 수분을 흡수하여 피부가 적절한 양의 수분을 유지하도록 한다. 히알루론산은 피부에 아주 중요한 작용을 하는데 피부를 탄력있게 하고 피부 손상시에 피부 하층부의 손상을 줄여주는 역할을 한다. 그래서 히알루론산은 피부 주름방지과 골 관절염 치료를 위해서 또는 눈

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

과 인체 수술시에 보형물로서 사용되는 유익한 물질이며 주름을 없애기 위한 주사제로 또는 캡슐과 화장품으로 많이 알려지고 사용되어지고 있는 성분이다. 눈의 초자체나 관절, 태반 등에 많이 존재하는 히알루론산은 피부세포의 재생과 성장을 돕는 피부재생공학연구의 핵심물질이다.⁵⁻¹¹

우리는 히알루론산의 일정부분에 리포산을 결합하기 위해서 히알루론산의 카복실기에 양쪽에 아민기를 갖는 adipic acid dihydrazide (ADH)로 치환한 후 리포산과 결합하였다. 이 치환물은 물속에서 소수성 상호작용에 의해 친수성인 치환된 히알루론산을 외각으로 하고 소수성인 리포산이 내각을 이루는 자기조립 나노입자를 형성하였고 노화방지제 중 지용성 항산화제를 함유하는 캡슐형 제제로 기능성 화장품에 응용될 수 있다.

실 험

시료 및 재료. 본 실험에서 사용된 히알루론산(hyaluronic acid, HA)의 분자량은 35000 Da와 12000 Da으로 Lifecore medical사에서 구입하였다. 히알루론산을 개질시킬 때 사용한 adipic acid dihydrazide(ADH)와 알파리포산(α -lipoic acid, LA), 1-ethyl-3-[3-(dimethylamino)propyl]carbodiimide(EDC), *N*-hydroxysuccinimide(NHS)은 Sigma Aldrich에서 구입하였다.

HA-ADH의 합성. 리포산과 결합하기 전에 히알루론산을 개질하는 실험으로 히알루론산의 카복실기를 ADH로 치환하는 것이다. HA-

ADH 합성은 Luo 등^{6,8} 방법에 따르고 있다. 실험과정은 우선 히알루론산 100 mg을 20 mL의 물에 넣어 녹여 5 mg/mL의 히알루론산 용액을 만든다. 그리고 히알루론산 용액에 ADH(1.736 g)을 넣고 10분 정도 교반 후 에탄올을 넣고 30분 교반한다. 그 반응물은 1 N HCl을 이용하여 pH 4.8로 맞춘 후 EDC(0.191 g) 넣고 pH를 4.8로 유지하면서 2시간 교반한다. 교반이 끝나면 반응물의 pH를 1 N NaOH를 이용하여 7.0으로 올리고 molecular weight cut off(MWCO)=2000 g/mol 투석막을 사용하여 투석한다. 동결건조를 3일 동안하여 가루상태의 HA-ADH를 얻는다.

HA-*g*-LA의 합성. HA-ADH 80 mg을 acetic acid 1% 용액 20 mL에 녹인다. 리포산 48 mg을 THF 5 mL에 녹인다. 히알루론산 용액에 NHS와 EDC를 넣어 교반한 후 리포산 용액을 방울방울 떨어뜨리고 72시간 교반시킨다. 반응물은 THF에 침전시킨 후 원심분리기로 시료를 얻는다. 미반응된 리포산을 제거하기 위해 MWCO=2000 g/mol 투석막을 사용하여 투석시키고 동결건조한다.¹²

HA-*g*-LA 입자의 형성 및 CAC 측정. HA-*g*-LA를 DMSO와 증류수 혼합용액에 녹인다. 이 용액을 투석막(MWCO=2000 g/mol)에 넣고 증류수에서 24시간 투석하여 DMSO를 제거해 주면서 나노입자를 형성하였다. 그리고 동결건조하여 가루형태의 입자를 얻는다.

CAC(critical aggregation concentration, 임계 응집 농도)측정은 다양한 농도의 고분자입자 수용액을 만든 후 형광물질(pyrene)을 넣어 fluorescence scanning spectrometer를 이용하여 각각의 농도에서의 형광 세기를 측정하였다.

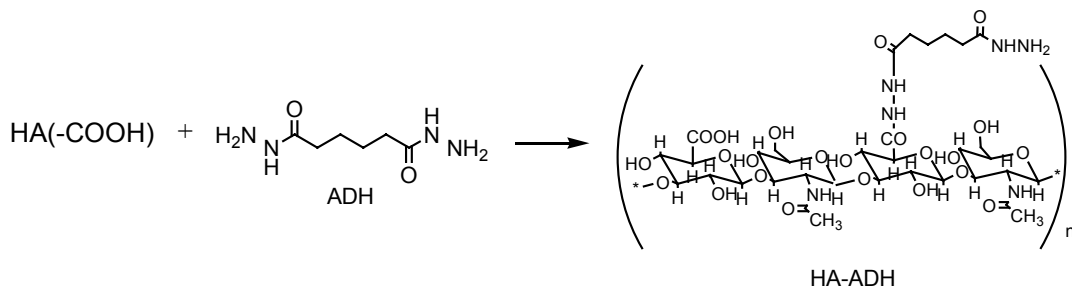


Figure 1. Reaction scheme of HA-ADH.

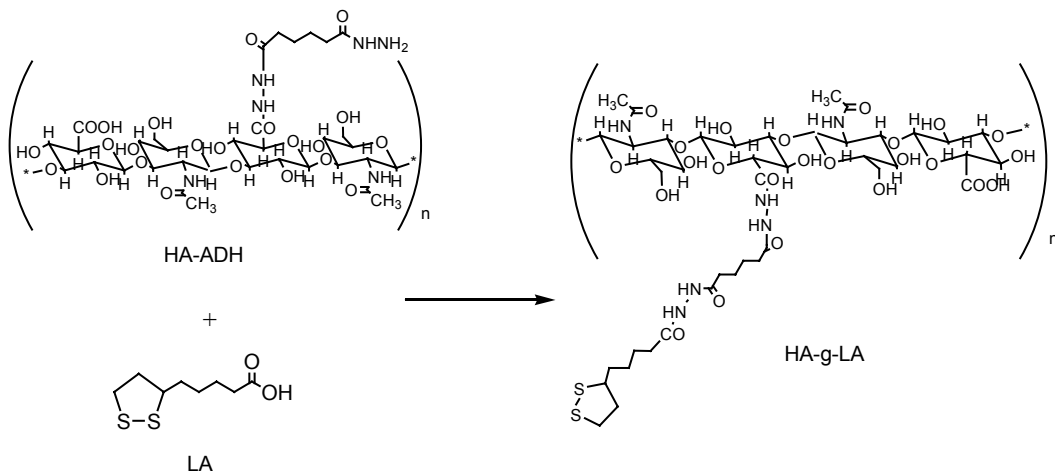


Figure 2. Synthetic scheme of HA-*g*-LA.

결과 및 토론

ADH로 치환된 HA. 히알루론산의 개질실험은 히알루론산의 일정부분에 리포산을 그래프트시키기 위한 전 단계로 양쪽에 아민기를 갖는 ADH를 히알루론산의 카복실기에 결합시켰다. Figure 1은 히알루론산에 ADH가 치환되는 개략적인 반응도이다. Figure 3은 HA-ADH의 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼을 보여주며 ADH의 치환율을 예측할 수 있다. N-acetyl-D-glucosamine의 메틸기의 피크가 $\delta=1.75\sim1.85$ ppm(a)에서 보이며 이것을 기준으로 하여 ADH의 치환율을 측정할 수 있었다. 이 실험에서는 분자량이 다른 히알루론산을 사용하였다. 히알루론산 분자량 35000 Da은 50% 정도 치환되었고 분자량 12000 Da은 20% 정도 치환되었다. 이유는 backbone에 히알루론산의 분자량이 작아질수록 ADH가 그래프트되는 것이 방해되기 때문에 분자량이 낮은 것이 더 낮은 치환율을 보였다. 그리고 치환여부를 확인하기 위해서 FT-IR로 분석하였다. 히알루론산의 카복실기와 ADH의 아민기가 합성이 되어 CONH의 특성피크가 나타났다. 이 분석을 통해 히알루론산의 카복실 부분에 성공적으로 ADH가 치환되었음을 확인할 수 있었다(Figure 1).

그래프트 공중합체(HA-g-LA). 양친성 그래프트 공중합체(HA-g-LA)는 ADH로 치환시킨 히알루론산의 아민기와 리포산의 카복실기를 결합하였다. Figure 2는 히알루론산과 리포산이 결합되어지는 개략적인 반응도이다. 공중합체의 분자구조와 화학적 성분은 $^1\text{H-NMR}$ 과 FT-IR 분석을 통해서 알아보았다. Figure 4는 HA-g-LA의 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼으로 리포산의 $-\text{CH-S-S-CH}_2-$ 의

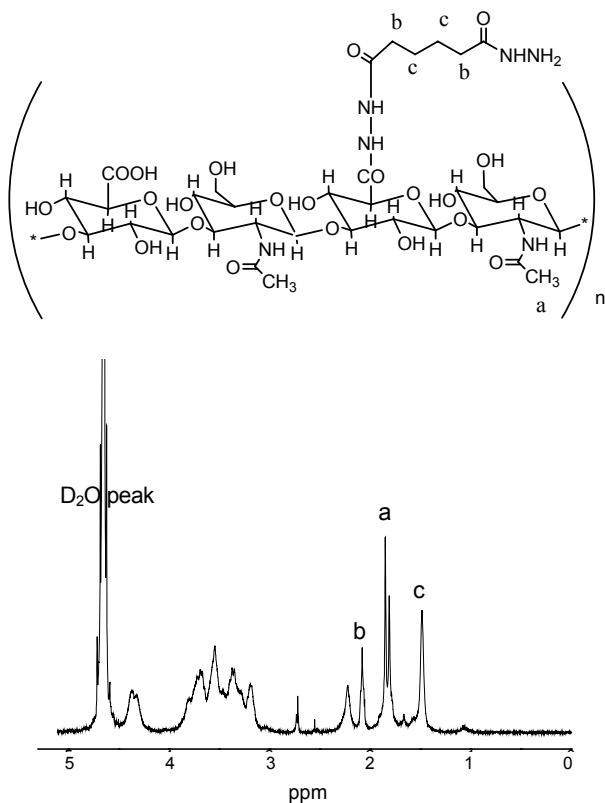


Figure 3. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of HA-ADH.

수소피크가 나타난 것을 확인할 수 있었고 아미드 결합에 의해서 결합될 것을 예측한 것이므로 FT-IR에서 CONH의 피크가 증가된 것으로 보아 결합 되었음을 확인하였다(Figure 5).

수용액 내 고분자 입자의 형성. 결합된 공중합체는 친수성 부분으로 히알루론산을 갖고 소수성 부분으로 리포산을 가지고 있어서 수용액 상에서 히알루론산을 외부로 하고 리포산을 내부로 하는 구형의 입자를 형성하게 된다. 이 고분자 입자는 자기조립과 회합을 통해 어느 농도 이상에서 입자를 형성하게 되는데 그 농도를 임계 응집 농도(CAC)라고 한다. 이 농도를 측정하기 위해 소수성 형광물질은 pyrene을 사용하여 입자 내부의 소수성 부분과 소수성 상호작용을 시켜 봉입시킨 후 형광정도를 확인해보았다. Figure 6은 고분자의 다양한 농도로 희석시킨 후 입자 내부에 pyrene을 봉입하고 그 형광 스펙트럼을 측정하였다. CAC는 용액의 농도가 옅은 농도에서 짙은 농도로 갈수록 형광강도를 확인하여 들뜬 부분을 가르킨다. 고분자를 다양한 농도에서 I_{463}/I_{457} 의 값을 구한 뒤 그래프가 갑자기 증가하는 부분을 찾는다. 히알루론산 분자량 35000 Da의 CAC는 1.0×10^{-3} 단위이고 12000 Da의 CAC는 1.0×10^{-4} 단위이다. CAC도 ADH 치환율에 영향을 받았다. 이유는 ADH가 치환이 많이 될수록 리포산도 많이 결합되었으므로 그 만큼 소수성을 띠는 부분이 강해져 합성물의 농도가 더 작아도 입자를 형성할 수 있었다.

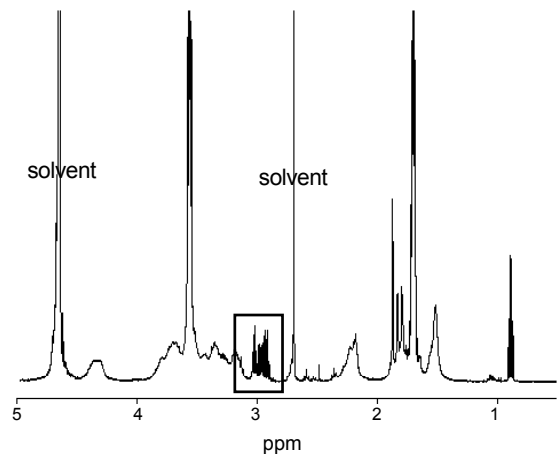


Figure 4. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of HA-g-LA (DMSO : D_2O = 1 : 1).

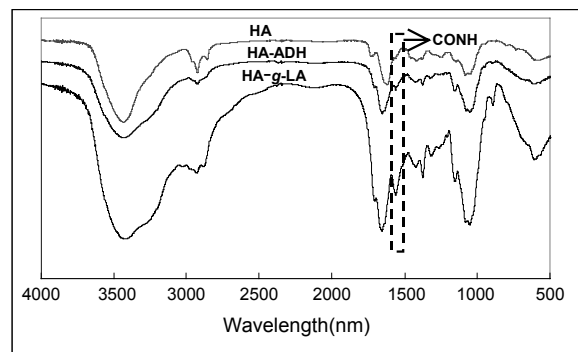


Figure 5. FT-IR absorption spectra of HA, HA-ADH, and HA-g-LA.

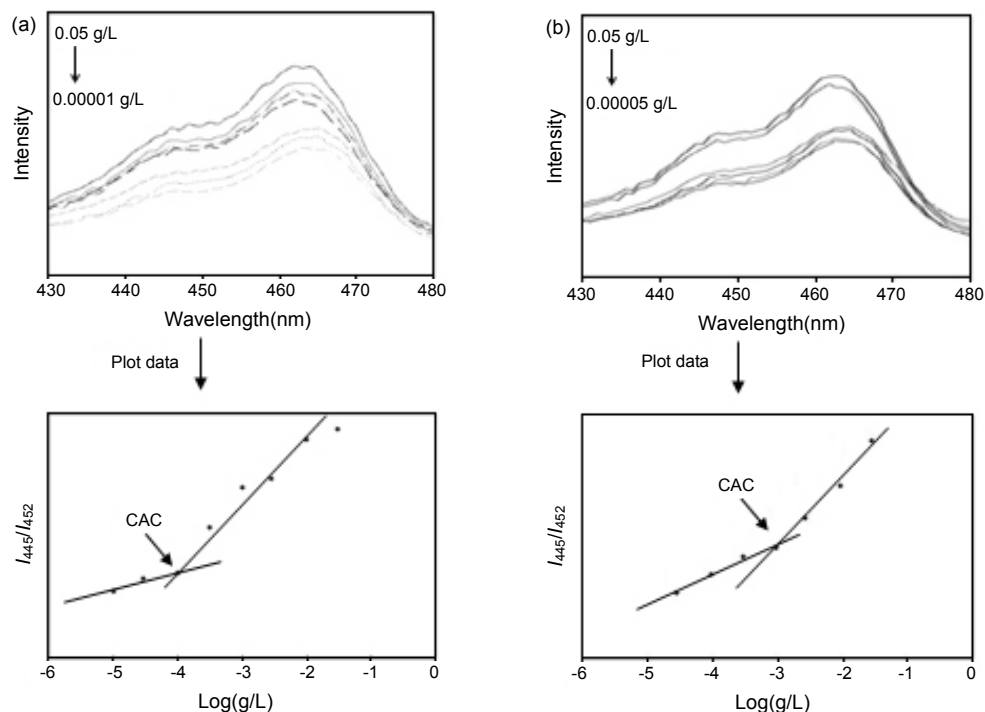


Figure 6. Fluorescence spectra of pyrene in water in the presence of increasing concentrations of the HA-*g*-LA particles. (a) HA (M.W. 35000 Da)-*g*-LA and (b) HA (M.W. 12000 Da)-*g*-LA.

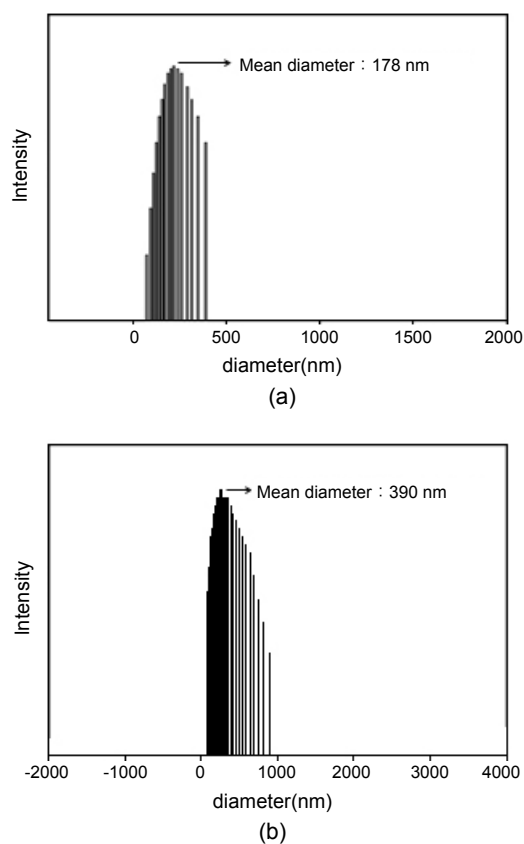


Figure 7. Particle size distribution of HA-*g*-LA measured by DLS. (a) HA (M.W. 35000)-*g*-LA and (b) HA (M.W. 12000)-*g*-LA.

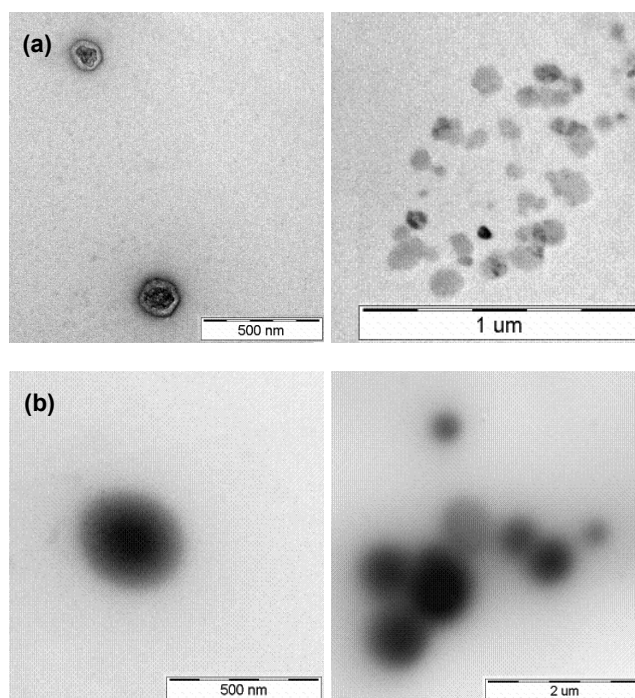


Figure 8. TEM images of HA-*g*-LA. (a) HA (M.W. 35000)-*g*-LA and (b) HA (M.W. 12000)-*g*-LA.

고분자 입자의 크기는 수용액상에서 dynamic light scattering (DLS)를 사용하였다. 수용액의 농도는 1 mg/mL로 준비하고 scattering angle은 90° 고정하고 온도는 25 °C로 일정하게 유지하여 측정하였

다. 측정결과 크기분포는 Figure 7과 같이 나타났다. 히알루론산 분자량 35000 Da에 50% 정도 ADH가 치환된 후 리포산이 결합된 HA-*g*-LA의 입자크기는 178 nm 정도 되고 분자량 12000 Da에 20% 정도 ADH가 치환된 것의 입자크기는 390 nm 정도 된다. HA-*g*-LA 결합물의 크기뿐만 아니라 형태도 알아보기 위해 HA-*g*-LA 입자 수용액을 동결건조를 한 후 transmission electron microscope(TEM)으로 알아보았다. Figure 8과 같이 입자의 형태가 구형임을 알 수 있었다.

결 론

생체친화적 고분자인 히알루론산은 ADH로 개질되어 항산화제인 리포산과 공중합체를 형성하였다. 히알루론산의 개질은 히알루론산의 분자량이 작아질수록 ADH가 그래프트되는 것을 방해하기 때문에 분자량이 낮은 것이 큰 것보다 더 낮은 치환율을 보였다. HA-ADH의 아민기와 리포산의 카복실기가 결합되었기 때문에 ADH의 치환율에 따라 항산화제인 리포산의 결합 정도가 달라지게 되었다. 이렇게 얻어진 HA-*g*-LA는 수용액 상에서 나노입자를 형성하였다. CAC도 ADH의 치환율에 영향을 받아서 치환이 많이 될수록 소수성 부분이 강해져 더 작은 농도에서 입자를 형성하게 되었다. 입자의 크기는 분자량이 높은 히알루론산이 소수성 부분이 더 많아져서 더 작은 입자를 형성하게 되었다. 분자량이 높은 히알루론산이 ADH의 치환율이 높아져 항산화제인 리포산의 결합이 잘되어 소수성 물질을 전달하는 전달체로 더 적합하며 이는 비타민A, E와 같은 지용성 비타민을 함유한 기능성 화장품에 응용 가능하다.

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

참 고 문 헌

1. A. Gruzman, A. Hidmi, J. Katzhendler, Abdalla Haj-Yehie, and Shlomo Sasson, *Bioorg. Med. Chem.*, **12**, 1183 (2004).
2. K. Kofiji, M. Nakamura, T. Isobe, Y. Murata, and S. Kawashima, *Food Chem.*, **109**, 167 (2008).
3. O. Gonzalez-Perez and R. E. Gonzalez-Castaneda, *Nutr. Res.*, **26**, 1 (2006).
4. R. Weeralkody, P. Fagan, and S. L. Kosaraju, *Int. J. Pharm.*, **357**, 213 (2008).
5. S. K. Hahn, E. J. Oh, H. Miyamoto, and T. Shimbouji, *Int. J. Pharm.*, **322**, 44 (2006).
6. S. K. Hahn, J. K. Park, T. Tomimatsu, and T. Shimoboji, *Int. J. Bio. Macromol.*, **40**, 374 (2007).
7. Y. K. Ko, S. H. Kim, J. S. Seong, J. Y. Lim, and G. Khang, *Polymer(Korea)*, **31**, 505 (2007).
8. S. J. Kim, S. K. Hahn, M. J. Kim, D. H. Kim, and Y. P. Lee, *J. Control. Release*, **104**, 323 (2005).
9. Y. Luo, K. R. Kirker, and G. D. Prestwich, *J. Control. Release*, **69**, 169 (2000).
10. E. J. Oh, J. S. Kim, and S. K. Hahn, *Key Engineering Materials*, **342**, 525 (2007).
11. F. Palumbo, G. Pitarresi, D. Mandracchia, G. Tripodo, and G. Giammona, *Carbohydr. Polym.*, **66**, 379 (2006).
12. Y. S. Wang, L. R. Liu, and Q. Q. Zhang, *Eur. Polym. J.*, **43**, 43 (2007).