

## 수용성 키토산을 이용한 니코틴산이 담지된 미소구체의 제조 및 이들의 물리화학적 특성 분석

최창용 · 안준혁 · 정경원 · 이현수 · 최선주 · 김원석 · 나재운<sup>†</sup>

순천대학교 공과대학 고분자공학과

(2016년 3월 3일 접수, 2016년 3월 22일 수정, 2016년 3월 23일 채택)

## Preparation of Nicotinic Acid-loaded Microspheres Using Water-soluble Chitosan and Investigation of their Physicochemical Characteristics

Changyong Choi, Jun-Hyuk Ahn, Gyeong-Won Jeong, Hyun-Su Lee, Sun-Ju Choi,  
Won-Seok Kim, and Jae-Woon Nah<sup>†</sup>

Department of Polymer Science and Engineering, Suncheon National University, 255 Jungang-ro, Suncheon, Jeonnam 57922, Korea

(Received March 3, 2016; Revised March 22, 2016; Accepted March 23, 2016)

**초록:** 니코틴산(NA)은 비타민 B3의 일종으로 물질대사, 해독작용 및 콜레스테롤 혈증을 치료하기 위한 목적으로 사용되는 약물 중의 하나이다. 하지만, 니코틴산은 체내 생체 반감기가 짧기 때문에 많은 양을 복용해야 된다는 단점이 있다. 본 연구에서는 경구 투여 약물전달시스템에 있어서 니코틴산의 생체 반감기를 증가시키고 안정성을 증가시킬 수 있는 서방성 제제 약물 전달체인 니코틴산이 봉입된 키토산 미소구체(NCM)를 W/O 에멀전 방법으로 다양한 교반속도에 의해 제조하였다. NCM의 동적산란장치, 전자현미경 분석 결과 교반속도가 증가함에 따라 크기가 감소하는 것을 확인하였다. FTIR 및 X-선 회절분석 시험 결과, 키토산 미소구체 내에 니코틴산이 안정하게 담지되어 있는 것을 확인할 수 있었다. 니코틴산의 봉입함량, 봉입효율 및 방출거동 시험결과, NCM의 크기가 작아질수록 봉입함량, 봉입효율은 증가하였고, 니코틴산이 천천히 방출되었다. 이러한 결과를 통해 제조된 NCM이 효과적으로 NA를 전달할 수 있는 경구 투여 약물전달 시스템으로 응용될 수 있을 것으로 기대된다.

**Abstract:** The nicotinic acid (NA), one of the vitamin B3, has been used to remedy various disease such as metabolism, detoxification, and hyperlipidaemia. However, NA must be large amounts administrated to increase the treatment efficiency because it has a short-biological half-life in body. In this study, we prepared NA-loaded chitosan microspheres (NCM) as sustained oral drug delivery systems, with different stirring speeds by a W/O emersion method for the enhancement of biological half-life and stability of NA. According to the results of dynamic light scattering and field emission scanning electron microscopy, the particle size of NCM decreased with the increment of stirring speed. From the analysis of FTIR and X-ray diffractometer, we confirmed that nicotinic acid was loaded stably in the NCM. The results of drug contents, loading efficiency and loading nicotinic acid release from NCM showed that drug contents and loading efficiency were increased and release of NA was sustained according to the decrement of NCM size. Based on these results, it was suggested that NCM can be administered as an oral delivery system to effectively deliver NA.

**Keyword:** chitosan microsphere, nicotinic acid, biological half-life, oral delivery system.

## 서 론

니코틴산(nicotinic acid(NA))은 적당한 세포 작용을 하는데 있어서 필요한 필수적인 비타민 B3로서 물질 대사, 해독작용 및 콜레스테롤 혈증을 치료하기 위한 목적으로 많이 사용되는 약물 중에 하나이다.<sup>1</sup> 하지만, 치료목적으로 니코틴산만을

사용했을 경우에, 생체 반감기(biological half-life)가 짧기 때문에 많은 양을 복용해야 된다는 단점을 가지고 있고, 많은 양의 약물복용은 생체 부작용을 초래할 수 있다.<sup>2</sup> 현재는 하이드로젤 및 생분해성 고분자 poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA)를 이용하여 니코틴산의 생체 반감기를 증가시키면서 약물의 효과를 극대화하는 연구들이 진행 중이다. 하지만, 이러한 방법은 니코틴산이 수용성 약물이라는 점을 감안했을 때 약물 담지 효율이 매우 떨어진다는 단점을 가지고 있고 경구 투여로 응용하기에 제한이 있다.<sup>3,4</sup>

<sup>†</sup>To whom correspondence should be addressed.

E-mail: jwnah@sunchon.ac.kr

©2016 The Polymer Society of Korea. All rights reserved.

키토산은 게나 새우 등의 갑각류, 오징어 연골 연체류 등에 분포되어 있는 천연 고분자인 키토산을 농축 알칼리로 처리하여 얻어지는 물질로서  $\beta$ -(1,4)-glycosidic 결합으로 연결된 *D*-glucosamine과 *N*-acetyl *D*-glucosamine 두 단위체로 구성된 생분해성 천연 다당류이다.<sup>5,6</sup> 키토산은 항암효과, 콜레스테롤 감소, 면역 활성화 및 항균성 등 우수한 생리활성을 갖는 것으로 잘 알려져 있다.<sup>7</sup> 키토산 응용 분야로는 화장품, 수처리, 의약품, 식품, 바이오산업 등이 있으며 최근에는 의료용 분야로의 연구가 확대되고 있다.<sup>8</sup> 특히 생체 적합성이 우수하고, 독성이 낮으며, 세포부착 능력이 우수하기 때문에 유전자 및 약물 전달체로 크게 주목받고 있다.<sup>9</sup>

기존에 경구 투여 약물전달시스템에 있어서 친수성과 소수성으로 구성된 전달체를 이용하여 방출속도를 제어하는데 큰 어려움이 있었다.<sup>10</sup> 이러한 이유 중에 하나는 강산 환경인 위에서부터 중성 환경인 소장까지 이르는 동안의 pH 변화뿐만 아니라 다양한 효소에 의한 입자의 안정성이 감소하기 때문이다.<sup>11,12</sup> 많은 연구에서 키토산 미소구체는 pH 변화뿐만 아니라 다양한 효소로부터 안정성을 증가시켜 약물을 천천히 방출할 수 있다는 장점을 갖고 있다고 보고하고 있다.<sup>13,14</sup> 따라서 본 연구에서 제시하는 키토산 미소구체는 이러한 문제점을 효과적으로 극복할 수 있는 유용한 소재가 될 것으로 판단된다.

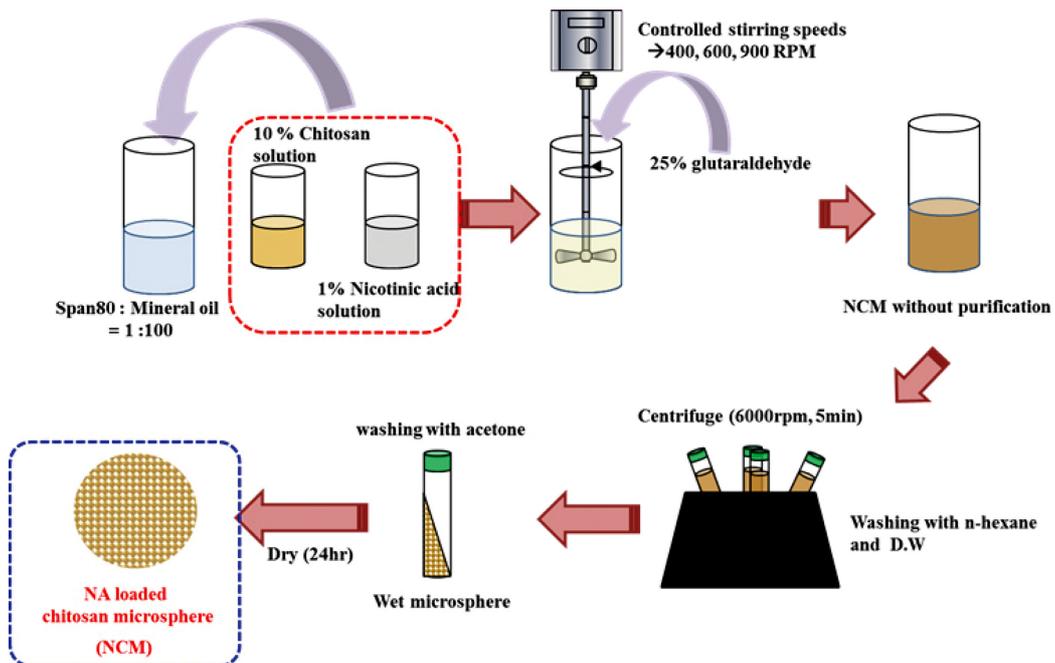
따라서 본 연구에서는 천연고분자인 키토산을 가교하여 마이크로스피어를 제조함으로써 약물의 담지효율을 높이고, 니코틴산의 생체 반감기를 증가시킬 수 있는 경구투여 서방성 제제를 개발하고자 키토산 미소구체를 W/O 에멀전 방법으

로 다양한 교반속도에 의해 제조하였다. 교반속도에 따라 제조되어진 미소구체의 입자크기, 입자형태, 열적특성, 구조적 특성, 결정학적 특성 등을 분석하여 니코틴산이 담지된 미소구체의 물리화학적 특성을 규명하였다. 또한 키토산 미소구체 내의 니코틴산의 봉입함량, 봉입효율 및 방출거동을 분석함으로써 니코틴산의 생체반감기를 증가시킬 수 있음을 제시하고자 한다.

## 실 험

**Materials.** 본 연구에서는 키토산 미소구체(microsphere)를 제조하기 위하여 (주)키토라이프(Korea)사의 수용성 키토산((WSC, 평균분자량 10 kDa, 탈아세틸화도(DDa) 93%)을 제공받아 사용하였다. 약물로 사용된 니코틴산(nicotinic acid (NA))은 Sigma-Aldrich사(USA)의 제품을 구입하여 사용하였다. 니코틴산이 담지된 키토산 미소구체는 W/O 에멀전 방법을 사용하였으며, 이때 오일상인 미네랄 오일과 가교제로 사용된 glutaraldehyde는 Sigma사, 유화제인 Span 80은 Duksan pure chemical(Korea)에서 각각 구입하여 사용하였다. 이외에 사용된 용매는 특급시약을 구입하여 사용하였다.

**키토산 미소구체(Chitosan Microsphere, CM)와 니코틴산이 담지된 키토산 미소구체(Nicotinic Acid Loaded Chitosan Microsphere, NCM) 제조.** CM과 NCM은 W/O 에멀전 방법을 이용하여 다음의 방법으로 제조하였다(Scheme 1). NCM을 제조하기 위하여 10%의 키토산 수용액 15 mL에 니코틴산이 1%이 되도록 수용액(chitosan/NA=10/1(wt/wt))을



**Scheme 1.** Preparation of nicotinic acid loaded chitosan microspheres according to various stirring speeds (400, 600, 900 rpm).

제조하였다. 또한 CM의 경우에는 동일한 조성에서 니코틴산을 제거한 수용액을 사용하였다. 미네랄오일 70 mL에 유화제인 Span 80을 미네랄오일 부피의 1%인 0.7 mL을 첨가하여 교반하여 미네랄오일과 균일하게 혼합되도록 하였다. 계속해서 준비된 키토산 수용액과 키토산/니코틴산 수용액을 오일 상에 천천히 적가하면서 교반하였다. 이후 키토산 수용액이 오일 상에서 균일하게 유화되도록 10분 동안 추가로 교반하였다. 이때 교반 속도에 따른 미소구체의 특성을 규명하기 위하여 교반 속도를 400, 600, 900 rpm으로 변화시켰다. 계속해서 미소구체의 표면을 가교하기 위하여 유화된 용액에 25% glutaraldehyde 2 mL을 천천히 적가한 후 1시간 동안 동일 교반속도로 교반시킨 후 25% glutaraldehyde 1 mL을 추가로 적가한 후 키토산 미소구체가 충분히 가교될 수 있도록 해당 교반속도에서 2시간 동안 교반하여 CM과 NCM을 제조하였다. 사용된 미네랄오일과 미반응 glutaraldehyde를 제거하기 위하여 헥산을 이용하여 세척하고 원심분리(6000 rpm, 5 min, 4°C)하여 분리하였다. 이 과정은 3회 반복하였다. 계속해서 증류수와 아세트산으로 제조되어진 CM과 NCM을 3회 세척 후 자연건조시켜 최종 CM과 NCM 분말을 얻어 다음 실험에 사용하였다.

**CM과 NCM의 형태학적 특성 분석.** CM과 NCM의 크기 및 형태는 동적광산란장치(dynamic light scattering, DLS, SALD-2001, Shimadzu, Japan)와 주사전자현미경(field emission gun scanning electron microscopy, FEG-SEM, S4800, Hitachi, Japan(한국기초과학지원연구원, 순천분원))으로 분석하였다.

제조되어진 CM과 NCM의 입자 크기 및 분포는 DLS를 이용하여 분석하였다. 제조되어진 미소구체를 4 mg/mL 농도의 수용액으로 제조하고 초음파를 이용하여 잘 분산시켜 분석에 이용하였다. 이때 DLS 레이저 산란강도가 적정 수준에 도달할 때까지 농도를 조절하여 분석하였다. 또한 미소구체의 형태학적 특성은 FEG-SEM을 이용하여 분석하였다. 제조되어진 미소구체 분말을 카본 테이프가 접착되어 있는 SEM 홀더에 잘 올려두고, 진공 증착기((HPC-1SW, Vacuum Device Inc.)를 이용하여 오스뎀으로 10초 동안 진공 증착시킨 후 가속저압 10 kV에서 미소구체의 이미지를 관찰하였다.

**CM과 NCM의 화학 구조 및 결정(Crystallite) 특성 분석.** 제조되어진 미소구체의 화학적 구조는 적외선분광광도계(FTIR, FTIR8700, Shimadzu, Japan)를 이용하여 분석하였다. 미소구체와 KBr을 물리적으로 잘 혼합하여 펠렛을 만들고 400 ~ 4000 cm<sup>-1</sup> 범위에서 파장에 따른 투광도를 측정하여 함수로 나타냈다.

NCM 내부의 니코틴산의 담지여부를 확인하기 위하여 키토산, NA, 키토산/NA 물리적 혼합물, CM, NCM의 결정성을 X-ray diffractometer(XRD, X'pert PRO, PANalytical, Netherlands(한국기초과학지원연구원, 순천분원))를 이용하여

분석하였다. XRD 분석은 시료를 상온에서 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>와 함께 3일간 진공건조하여 수분을 완전히 제거하고, 입사각(2θ) 3°~90° 범위에서 분석하였다.

**NCM의 열적 특성 분석.** 키토산, NA, NCM의 열적 특성은 열중량분석계(thermogravimetry analyzer, TGA, Q50, TA Instrument, USA)를 이용하여 온도 변화에 따른 각각 시료의 열분해 온도를 측정하였다. 아울러 온도에 따른 시료의 열분해 온도를 정확하게 측정하기 위하여 1차 미분 그래프로 나타내어 분해온도를 측정하였다. 열분석은 승온속도 10 °C/min으로 30에서 700 °C까지 측정하였다. 또한 완전연소를 위하여 carrier gas로 공기를 40 mL/min로 공급하면서 분석하였다.

**NCM 내의 NA 봉입효율 및 방출거동 분석.** NCM 내에 봉입되어 있는 NA의 봉입함량(drug content)과 봉입효율(loading efficiency)을 구하기 위하여 UV-vis spectrophotometer(UV-1601, Shimadzu, Japan)를 분석하였다. 봉입함량과 봉입효율을 측정하기 앞서 260 nm에서 니코틴산을 PBS buffer에서 0.01 ~ 0.1 mg/mL의 농도로 제조하고 각각의 농도에서 흡광도 값을 측정하여 농도에 따른 흡광도의 함수로 표시되는 standard curve를 얻었으며, 봉입함량, 봉입효율 및 방출거동을 결정하는데 사용하였다.

NCM 내의 니코틴산의 봉입함량과 봉입효율은 다음의 방법으로 실험하였다. NCM을 PBS buffer(pH 7.4)와 0.1 N HCl (0.04 mL) 혼합용액에 용해시켜 NCM 내의 NA를 모두 용해시킨 후 원심분리하여 상층액만을 취하여 260 nm에서 흡광도 값을 UV로 측정하여 다음의 식으로부터 봉입함량(eq. 1)과 봉입효율(eq. 2)을 계산하였다.

$$\text{Drug content(\%)} = \frac{\text{Weight of remained NA in the NCM}}{\text{Weight of initial NCM}} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{Loading efficiency(\%)} = \frac{\text{Amount of remained NA in the NCM}}{\text{Initial feeding amount of NA}} \times 100 \quad (2)$$

NCM 내의 NA의 방출 거동은 다음의 방법으로 실험하였다. 4 mg의 NCM을 1 mL의 PBS buffer(pH 7.4)에 잘 분산시켜 투석막(MWCO 1000 Da)에 넣은 후 PBS 30 mL이 담겨져 있는 conical tube에 담가두었다. 이 후 정해진 시간에 PBS buffer를 제거하고 새로운 PBS buffer를 채움으로 용액 내에서 NA가 포화상태가 되는 것을 방지하였다. 계속해서 NCM으로부터 방출되어진 NA의 농도는 UV-vis spectrometer를 이용하여 측정하였다. 방출 실험은 온도 37 °C, 교반속도 100 rpm에서 수행하였다.

## 결과 및 토론

**니코틴산(NA)이 봉입된 키토산 미소구체(NCM)의 입자 특성.** NA는 비타민 B3 복합체로서 혈액순환과 신경조직기

능 유지에 도움을 줄 뿐만 아니라 고지혈증 치료제로 광범위하게 사용되고 있는 물질이다. 그러나 NA의 생체반감기가 25~45분으로 매우 짧아 생체이용률이 매우 낮다는 문제점을 갖고 있다.<sup>1,2</sup> 본 연구에서는 이러한 문제점을 극복하기 위하여 수용성 키토산에 NA를 담지함으로써 생체 내에서 효율적으로 NA가 이용될 수 있도록 NA가 담지된 키토산 미소구체(NCM)를 제조하였다.

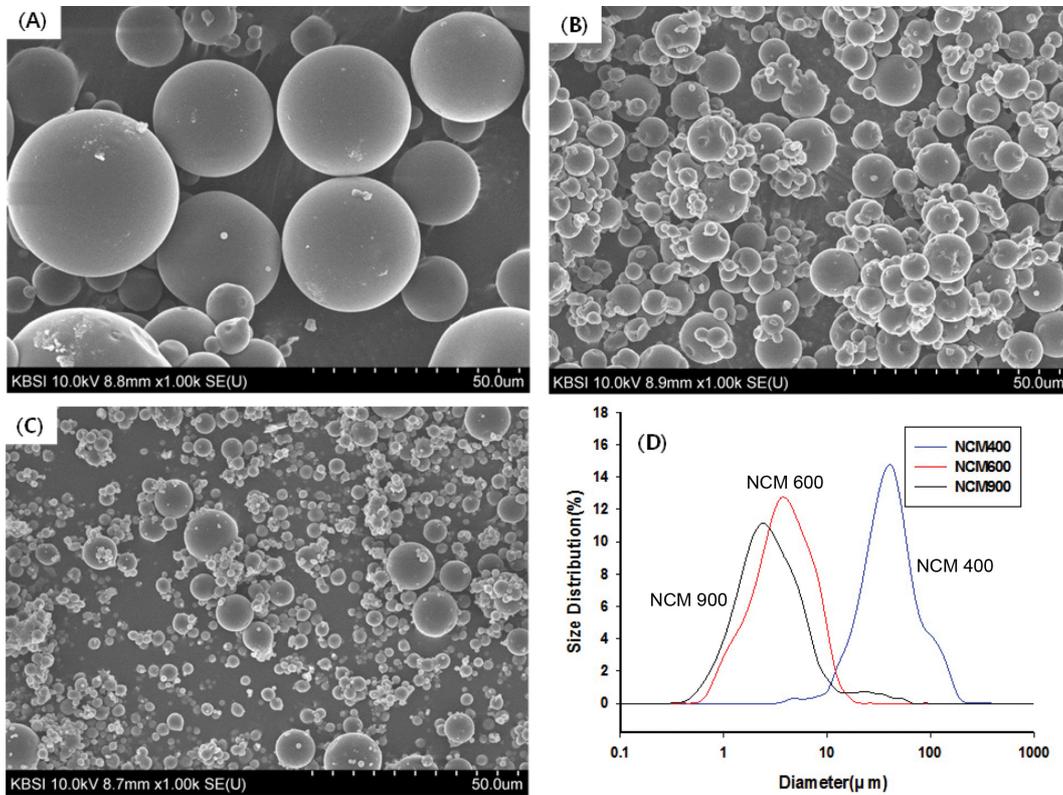
NCM의 제조는 W/O 에멀전 중합법을 이용하여 제조하였으며, NCM 제조에 앞서 키토산만을 사용하여 키토산 미소구체(CM)를 제조하여 대조군으로 사용하였다. 미소구체 제조 공정에서 교반속도에 따른 유화 정도에 따른 입자 크기

및 분포를 관찰하기 위하여 교반 속도를 400, 600, 900 rpm으로 조절하였다. 교반속도에 따른 미소구체의 입자 크기 및 분포는 DLS를 이용하여 분석하였다. CM의 경우 입자 크기가 50에서 5  $\mu\text{m}$ 로 교반속도가 증가함에 따라 감소하는 경향을 확인할 수 있었다(data not shown). 동일한 조건으로 NCM을 제조한 결과 CM의 경우와 동일하게 교반속도가 증가함에 따라 입자의 크기가 약 34에서 3  $\mu\text{m}$ 로 작아지는 것을 알 수 있었다(Table 1). 이는 교반 속도가 증가함에 따라 오일 상에서 수용성 키토산의 입자가 미세하게 형성됨과 동시에 표면 가교를 통해 미소구체가 형성됨으로써 입자의 크기가 작아지는 것으로 판단된다. Z. Du 등은 교반속도에 따른 CM

**Table 1. Particle Size and Characterization of Nicotinic Acid Loaded Chitosan Microspheres (NCMs) Prepared with Various Stirring Speeds**

Sample <sup>a</sup>	Feed amount (mg)		Preparation stirring speed (rpm)	Particle size <sup>b</sup> ( $\mu\text{m}$ )	Drug content <sup>c</sup> (%)	Drug loading efficiency <sup>c</sup> (%)
	Chitosan ( $M_w$ ; 10 KDa)	Nicotinic acid				
NCM400	100	10	400	34.132 $\pm$ 0.324	2.68	23.23
NCM600	100	10	600	3.351 $\pm$ 0.278	3.77	32.67
NCM900	100	10	900	2.964 $\pm$ 0.403	5.58	48.36

<sup>a</sup>Nicotinic acid (NA) loaded chitosan microsphere according to various preparation stirring speed (400, 600, and 900 rpm). <sup>b</sup>Measured by dynamic light scattering (DLS). <sup>c</sup>Measured by UV-vis spectrophotometer.

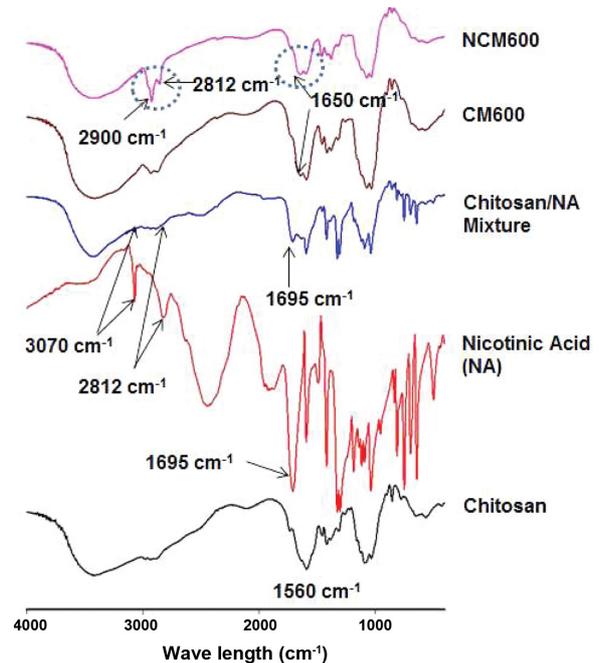


**Figure 1.** Particle size and size distribution of nicotinic acid loaded chitosan microspheres according to stirring speed by FEG-SEM and dynamic light scattering (DLS). Particle morphology and size at 400 rpm (A); 600 rpm (B); 900 rpm (C); their size distribution (D).

을 제조함에 있어 교반속도 증가에 따라 입자의 크기가 작아진다고 보고하고 있으며, 이러한 결과와 본 연구결과와도 일치하고 있다.<sup>13</sup> 또한 동일 조건에서 CM과 NCM을 비교하였을 때 NCM의 입자크기가 상대적으로 작아지는 것은 NCM의 경우 내부에 결정성 물질인 NA가 위치함으로써 에멀전 형성 시 미소구체의 내부에서 NA 분자간의 재배열이 이루어지면서 보다 컴팩트한 구조가 형성되어 입자크기가 상대적으로 작아지는 것으로 사료된다.<sup>15</sup>

NCM의 형태학적 특성은 FEG-SEM으로 관찰하였으며 이 결과는 Figure 1에 나타났다. Figure 1(A)-(C)는 교반속도를 400, 600, 900 rpm으로 증가시키면서 제조된 NCM의 FEG-SEM의 결과로 전체적으로 둥근 형태의 미소구체가 형성되었음을 확인할 수 있었으며 교반 속도가 증가함에 따라 NCM의 입자 크기가 작아지는 것을 확인하였다. 또한 Figure 1(D)는 교반속도에 따른 NCM의 크기 및 분포를 나타낸 DLS 결과로서 교반속도가 증가함에 따라 크기가 작아지는 것을 확인할 수 있었으며, 크기 분포 역시 단일 분포를 갖고 있음을 확인할 수 있다. 이러한 결과는 FEG-SEM 결과와 일치하고 있다. 이러한 결과로부터 본 연구에서 사용된 W/O 에멀전 중합법으로 NCM을 성공적으로 제조할 수 있음을 제시하고 있을 뿐만 아니라, 교반 속도에 따라 입자의 크기를 조절할 수 있으므로 사용 용도에 맞는 입자크기를 제조할 수 있다는 것을 보여 주고 있다.

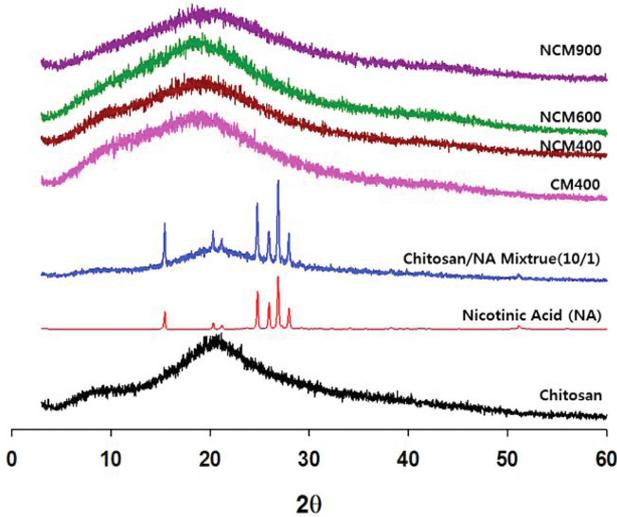
**NCM의 화학적 구조 및 결정 특성.** NCM의 화학적 구조는 FTIR을 이용하여 규명하였으며, 이 결과는 Figure 2에 나타났다. 화학적 구조를 효과적으로 규명하기 위하여 미소구체 제조에 사용된 키토산, 담지 약물인 니코틴산, 이들의 물리적 혼합물(혼합비율; 키토산/니코틴산=10/1(wt/wt)), CM, NCM에 대하여 각각 분석하였다. Figure 2에서 사용된 키토산의 경우 1560  $\text{cm}^{-1}$ 에서 amide II의 특성 피크를 확인할 수 있었다. 그러나 CM의 경우 glutaraldehyde에 의한 가교가 일어나므로써 C=N의 새로운 결합이 나타난다. Figure 2의 CM600 FTIR 결과로부터 1650  $\text{cm}^{-1}$ 에서 C=N의 특성 피크를 확인함과 동시에 키토산과 니코틴산을 물리적으로 혼합한 결과에서는 C=N에서 나타나는 특성 피크가 나타나지 않은 것을 확인함으로써 성공적으로 CM이 제조되었음을 확인할 수 있었다. 니코틴산의 FTIR 결과에서는 1695  $\text{cm}^{-1}$ 에서 니코틴산의 aromatic group의 C-C의 특성 피크, 2812과 3070  $\text{cm}^{-1}$ 에서 니코틴산의 C-H의 특성 피크를 모두 확인할 수 있었다. 또한 키토산과 니코틴산을 물리적으로 혼합한 결과에서는 키토산의 특성 피크와 니코틴산의 특성 피크를 모두 확인할 수 있었다. 조금 더 나가, 니코틴산이 담지되어 있는 NCM의 FTIR 결과에서는 키토산과 glutaraldehyde의 가교에 의해 나타나는 1650  $\text{cm}^{-1}$ 의 C=N, 2900  $\text{cm}^{-1}$ 에서 glutaraldehyde의 C-H 특성 피크를 확인함으로써 성공적으로 미소구체가 제조됨을 확인함과 동시에 2812  $\text{cm}^{-1}$ 에서 니코틴산의 C-H의 특성



**Figure 2.** FTIR spectra of chitosan, nicotinic acid (NA), chitosan/NA physical mixture, chitosan microsphere (CM), and nicotinic acid loaded chitosan microsphere (NCM).

피크를 확인하였다. 이러한 NCM의 FTIR 결과는 CM이 성공적으로 제조됨과 동시에 키토산 미소구체 내에 니코틴산이 담지되어 있는 것을 보여주고 있다.

XRD 분석은 입자 내의 미세 구조 정보를 제공할 수 있기 때문에 제조되어진 미소구체의 결정학적 특성 규명에 중요한 역할을 한다. NCM의 결정성을 규명하기 위하여 키토산, 니코틴산, 키토산과 니코틴산의 물리적 혼합물(키토산/니코틴산=10/1, wt/wt), CM 등의 XRD 분석을 하였으며, 이 결과는 Figure 3에 나타났다. 키토산의 XRD 결과,  $2\theta=10^\circ$ 와  $2\theta=20^\circ$ 에서 특성 피크를 관찰할 수 있었다. 이는 각각 결정 격자 (020), (110) 면에 의해서 나타난다.<sup>16</sup> 좀더 나가, 키토산의 XRD pattern에서 키토산은 결정성과 비결정성을 동시에 갖고 있음을 보여주고 있다. 니코틴산의 XRD 결과에서는  $15^\circ$ ,  $20^\circ$ ,  $21^\circ$ ,  $25^\circ \sim 18^\circ$ 에서 강한 결정성 피크를 보여주고 있다. 키토산과 니코틴산을 물리적으로 혼합한 경우, 두 물질의 결정성 피크를 동일한 각도에서 확인할 수 있었다. 니코틴산이 담지되지 않은 CM의 경우에는  $19^\circ$  부근에서 결정 특성 피크를 관찰할 수 있었는데, 키토산 원재료의 특성 피크인  $20^\circ$ 보다 약간 낮은 각도로 이동함과 동시에 결정성이 줄어드는 것을 확인할 수 있었다. 이는 키토산의 가교에 의한 미소구체의 형성에 의해 결정성의 감소 및 특성 피크가 이동된 것으로 판단된다. 아울러, 니코틴산이 담지된 NCM의 경우, 니코틴산의 결정 피크가 존재하지 않고, CM과 동일한 형태의 XRD pattern을 보는 것을 확인할 수 있었다. 이는 CM 내에



**Figure 3.** Crystallinities of chitosan, nicotinic acid (NA), chitosan/NA physical mixture, chitosan microsphere (CM), and nicotinic acid loaded chitosan microsphere (NCM).

니코틴산이 담지되어 키토산 입자의 결정학적 구조에 변화를 보이지 않는 것을 보여주고 있다. 이러한 결과는 CM에 유효 성분을 담지시켜 결정학적 특성을 규명한 연구 보고와도 일치하고 있다.<sup>16</sup>

이상의 FTIR 결과와 XRD 결과를 종합적으로 검토하면, 미소구체가 성공적으로 제조되어 있음을 알 수 있으며, CM 내에 니코틴산이 안정적으로 봉입되어 있는 것을 보여 주고 있다.

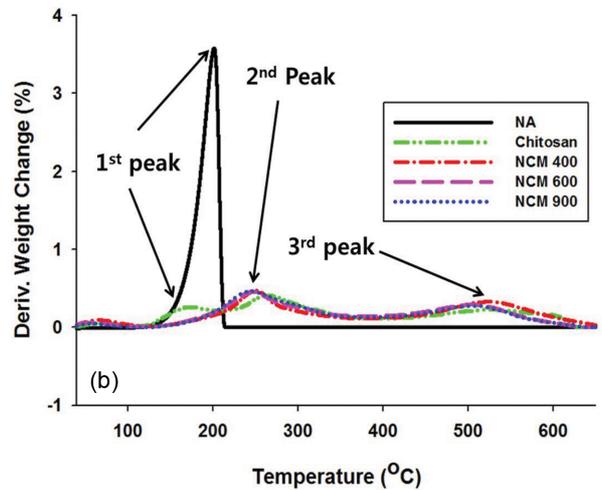
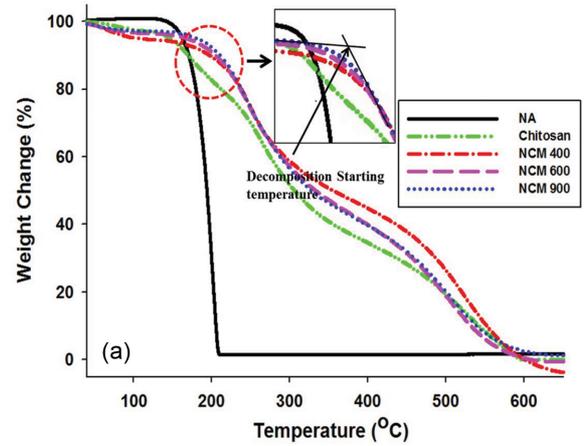
**NCM의 열적 특성.** 열중량분석계(TGA)를 이용하여 제조된 미소구체의 열분해온도를 측정하여 열안정성을 입증 하였다. TGA 분석은 미소구체의 제조에 사용된 키토산, 키토산에 봉입되는 니코틴산 그리고 NCM에 대하여 실시하였으며, 이 결과는 Table 2와 Figure 4에 요약하였다. 분해 시

**Table 2. Thermal Properties of Chitosan and Nicotinic Acid (NA) Loaded Chitosan Microspheres (NCMs)**

	Decomposition starting temperature <sup>a</sup> (°C)	Deriv. temperature <sup>b</sup> (°C)		
		1st peak	2nd peak	3rd peak
Chitosan	144.18	172.79	262.69	525.33
Nicotinic acid	159.24	201.39	-	-
NCM400	210.80	-	249.72	521.70
NCM600	202.44	-	247.56	504.39
NCM900	200.03	-	245.11	501.50

<sup>a</sup>Calculated on-set point by TGA thermal diagram. <sup>b</sup>Calculated derivative weight change vs. derivative temperature.

\*TGA analysis condition: heating rate (10 °C/min), temp. range (30~700 °C), furnace gas (air 40 mL/min).



**Figure 4.** Weight changes (a); derivative weight change (b) of nicotinic acid (NA), chitosan and NA-loaded chitosan microsphere (NCM).

작은도는 Figure 4(A)의 온도에 따른 열분해 곡선의 on-set point를 측정하여 나타냈다. 키토산과 니코틴산의 열분해 시작온도는 각각 144.18와 159.24 °C로 측정되었다. 또한 Figure 4(B)는 온도에 따른 무게감소량의 미분 데이터를 나타낸 미분열분해 곡선으로 시료의 분해 최고 온도를 정확하게 나타냈다. 이 결과 Table 2에서 볼 수 있듯이 키토산의 경우 172, 262, 525 °C에서 3번의 분해를 확인할 수 있었으며, 니코틴산은 201.39 °C에서 한 번의 분해를 확인할 수 있었다. NCM의 경우, Figure 4(A)와 Table 2에서 볼 수 있듯이 분해 시작온도는 교반 속도에 따라서 210.80, 202.44, 200.03 °C로 키토산의 분해시작 온도인 144.18 °C보다 높아졌음을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 키토산이 미소구체를 형성함에 따라 키토산 주사슬의 아민 그룹의 가교에 의한 열분해 시작온도가 높아지는 것으로 보인다. 또한 교반속도에 따라 제조된 NCM의 열분해 시작온도를 비교하였을 때 교반속도가 증가함에 따라 온도가 낮아지는 것을 확인하였다. 이러한 결과

는 교반속도가 증가함에 따라 미소 구체의 크기가 작아지고 (Table 1), 이에 따라 미소구체 내부까지의 열전달 속도가 증가되어 상대적으로 입자가 작은 NCM900에서 열분해 시작 온도가 가장 낮으며, 입자의 크기가 큰 NCM400에서 열분해 시작온도가 가장 높은 것으로 사료된다.<sup>14</sup> 또한 Figure 4(B)는 열분해 곡선으로부터 계산되어진 미분 열분해 곡선으로, 키토산 자체는 3번의 분해가 일어나고 있으나, NCM의 경우 두 번의 열분해를 확인할 수 있었다. 이는 키토산의 아민 그룹이 가교됨으로써 이로부터 나타나는 열분해 특성이 사라지고, 키토산 주시슬의 열분해 곡선만이 나타나는 것으로 보인다. 니코틴산의 미분 열분해 온도는 201.39 °C에서 나타나고 있으나, 니코틴산이 봉입되어진 NCM의 경우에서 니코틴산의 열분해 특성을 확실히 관찰할 수 없었다. 이는 미소구체에 담지되어 있는 니코틴산의 함량이 상대적으로 작고 (Table 1), 니코틴산이 CM 내에 안정하게 봉입되어 키토산의 분해 곡선과 겹쳐서 나타나는 것으로 판단된다. 이러한 열분해 특성은 앞서 설명한 FTIR, XRD 결과와 같이 CM 내에 니코틴산이 봉입되어 있으며, CM은 외부 조건 변화에 대하여 담지되어 있는 니코틴산의 안정성을 높일 수 있는 것으로 판단된다.

**NCM 내의 니코틴산의 함량 및 방출거동.** CM 내의 니코틴산의 봉입효율 및 봉입함량은 UV-Vis 분광광도계를 이용하여 260 nm에서 흡광도 값을 측정하여 계산하였다. 교반속도에 따른 NCM을 제조하였으며, 이때 각각의 제조 방법에서 니코틴산의 봉입함량과 봉입효율은 Table 1에 요약하였다. 결과에서 볼 수 있듯이 교반속도가 증가함에 따라 니코틴산의 봉입함량은 2.68에서 5.58%로 증가하였으며, 이에 따른 봉입효율 역시 23.23에서 48.36%로 증가하였다. 이러한 결과는 교반속도가 증가함에 따라 제조되어진 미소구체의 크기가 작아지기 때문에 (Table 1) 단위 부피당 표면적이 증가하

게 된다. 이러한 이유로 미소구체 내의 니코틴산 봉입함량은 입자가 작아질수록 높아지는 것으로 판단된다.

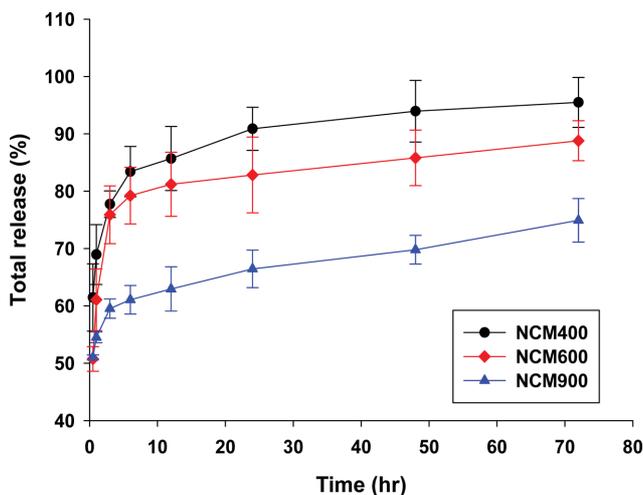
미소구체로부터 니코틴산의 방출 거동은 Figure 5에 나타났다. 결과에서 볼 수 있듯이 NCM900에서 니코틴산의 방출이 가장 지연되는 것을 확인하였다. 이는 NCM900의 경우에서 니코틴산의 봉입함량이 가장 높아서 이러한 경향성을 보이는 것으로 사료된다.<sup>17</sup> 방출 거동 결과로부터 니코틴산이 NCM 내에 안정하게 봉입되어 있으며, 본 연구에서 제조되어진 NCM은 니코틴산의 생체 내의 짧은 반감기를 효과적으로 증가시킬 수 있을 것으로 기대된다.

## 결론

본 연구에서는 니코틴산의 짧은 생체반감기를 증가시키기 위하여 니코틴산이 담지된 키토산 미소구체(NCM)를 유희중합법으로 제조하고 이들의 특성 및 니코틴산의 방출 거동을 관찰하였다. NCM은 교반속도를 변화시키면서 3종류를 제조하였으며, 교반속도가 증가함에 따라 입자의 크기는 감소하였다. 또한 이들의 구조적 특성 및 결정학적 특성 결과로부터 NCM 내에 니코틴산이 안정하게 봉입되어 있는 것을 확인하였다. 또한 열안정 시험 결과로부터 CM이 니코틴산을 안정하게 보호할 수 있는 것을 간접적으로 증명하였다. NCM 내의 니코틴산의 봉입효율과 봉입함량은 입자의 크기가 작아질수록 증가하였으며, NCM으로부터 니코틴산의 방출 역시 입자 크기가 상대적으로 작은 NCM900에서 가장 지연되는 것을 확인할 수 있었다. 이상의 연구 결과로부터 NCM은 니코틴산을 안정하게 봉입함과 동시에 니코틴산의 생체반감기를 증가시킬 수 있는 재료로 그 응용성을 높일 수 있을 것으로 기대된다. 조금 더 나가 본 연구결과는 최종 사용 용도에 맞는 미소구체를 제조할 수 있는 기초데이터를 제공할 수 있으며, 생리활성 물질의 안정성을 요구하는 바이오 분야에 접목이 가능할 것으로 생각된다.

## 참고 문헌

1. D. L. Cooper, J. A. Carmical, P. C. Panus, and S. Harirforoosh, *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, **19**, 3977 (2015).
2. H. Puthoori, T. E. G. K. Murthy, A. Kaushik, and M. K. Asian, *J. Pharmacol.*, **6**, 31 (2012).
3. J. Sirc, J. Hrib, M. Vetrik, R. Hobzova, A. Zak, B. Stankova, O. Slanar, R. Hromadka, V. Sandrikova, and J. Michalek, *Physiol. Res.*, **64**, 51 (2015).
4. S. Elkhesheh, *J. Microencapsul.*, **13**, 4 (1996).
5. W. S. Cha, S. I. Kim, D. B. Lee, and J. W. Nah, *J. Korean Ind. Eng. Chem.*, **6**, 8 (1995).
6. T. H. Kim, J. K. Park, C. Y. Choi, M. K. Jang, and J. W. Nah, *J. Chitin Chitosan*, **17**, 37 (2012).



**Figure 5.** Total nicotinic acid release behavior of NA-loaded chitosan microspheres (NCMs) at 37 °C.

7. O. M. Dragostin, S. K. Samal, M. Dash, F. Lupascu, A. Pânzariu, C. Tuchilus, N. Ghetu, M. Danciu, P. Dubruel, D. Pieptu, C. Vasile, R. Tatia, and L. Profire, *Carbohydr. Polym.*, **141**, 28 (2016).
8. S. Sohrabi, A. Haeri, A. Mahboubi, A. Mortazavi, and S. Dadashzadeh, *Int. J. Biol. Macromol.*, **85**, 625 (2016).
9. F. Qiang, H. J. Shin, B. J. Lee, and H. K. Han, *Int. J. Pharm.*, **430**, 161 (2012).
10. D. Xia, H. Yu, J. Tao, J. Zeng, Q. Zhu, C. Zhu, and Y. Gan, *Colloids Surf., B*, **141**, 301 (2016).
11. T. Woraphatphadung, W. Sajomsang, P. Gonil, A. Treetong, P. Akkaramongkolporn, T. Ngawhirunpat, and P. Opanasopit, *Int. J. Pharm.*, **497**, 150 (2016).
12. P. Zhang, Y. Xu, X. Zhu, and Y. Huang, *Int. J. Pharm.*, **496**, 993 (2015).
13. Z. Du, X. Dou, C. Huang, J. Gao, L. Hu, J. Zhu, Y. Qian, M. Dou, and C. Fan, *PLoS One*, **8**, 79698 (2013).
14. D. Tahtat, M. Mahlous, S. Benamer, A. N. Khodja, H. Oussedik-Oumehdi, and F. Laraba-Djebari, *Int. J. Biol. Macromol.*, **58**, 160 (2013).
15. J. Kouřil, J. Výsloužil, M. Kejdušová, K. Dvořáčková, and D. Vetchý, *Ceska. Slov. Farm.*, **63**, 75 (2014).
16. N. Acosta, E. Sánchez, L. Calderón, M. Cordoba-Diaz, D. Cordoba-Diaz, S. Dom, and Á. Heras, *Mar. Drugs*, **13**, 5901 (2015).
17. K. S. Patel and M. B. Patel, *Int. J. Pharm. Investig.*, **4**, 32 (2014).