

아실 글리콜 키토산이 첨가된 폴록사머 혼합 젤의 제조와 특성

김다은*** · 오혜민* · 강선웅****† · 허강무*†

*충남대학교 고분자공학과, **안전성평가연구소, ***과학기술연합대학원대학교 인체 및 환경 독성학과
(2017년 6월 3일 접수, 2017년 7월 3일 수정, 2017년 7월 3일 채택)

Preparation and Characterization of Acyl Glycol Chitosan-Containing Poloxamer Gels

Da Eun Kim***, Hye Min Oh*, Sun-Woong Kang****†, and Kang Moo Huh*†

*Department of Polymer Science and Engineering, Chungnam National University, 99, Daehak-ro, Yuseong-gu, Daejeon 34134, Korea

**Predictive Model Research Center, Korea Institute of Toxicology, 141 Gajeong-ro, Yuseong-gu, Daejeon 34114, Korea

***Human and Environmental Toxicology Program, University of Science and Technology,
217, Gajeong-ro, Yuseong-gu, Daejeon 34113, Korea

(Received June 3, 2017; Revised July 3, 2017; Accepted July 3, 2017)

초록: 폴록사머는 PEO-PPO-PEO 삼중블록 고분자로 수용액에서 온도 조절을 통해 가역적 젤을 형성할 수 있다는 장점으로 인하여 생체의료용 분야에 광범위하게 사용되고 있다. 하지만, 단일 폴록사머 젤은 수성 환경에서의 낮은 물리적 안정성으로 인해 생체재료로서의 적용에 한계가 있었다. 본 연구에서는 아실 글리콜 키토산의 혼합으로 폴록사머 젤의 물리화학적 특성을 개선하고자 하였다. 폴록사머와 아실 글리콜 키토산을 혼합하여 다양한 조성의 하이드로젤을 제조하였고, 온도 변화에 따른 졸-젤 상전이 특성과 물리적 안정성을 비교하였다. 아실 글리콜 키토산을 함유한 폴록사머 젤은 온도감응성과 물리화학적 특성이 향상됨과 더불어 낮은 세포독성을 보임으로써, 폴록사머의 생체재료로서의 유용성을 보다 높일 수 있을 것으로 기대된다.

Abstract: Poloxamers, PEO-PPO-PEO triblock copolymers, are well-known thermo-reversible sol-gel transition polymers that have great potential for use in biomedical applications, but have several drawbacks such as the weak mechanical properties and physical stability. In this study, we tried to modify and improve the physicochemical properties of poloxamer gels by preparation of acyl glycol chitosan-containing poloxamer gels. Various poloxamer gels with different compositions were prepared and characterized in terms of thermo-reversible sol-gel transition properties, mechanical properties, and physical stability. These hydrogel systems could demonstrate not only enhanced physicochemical and thermo-responsive properties but also low cytotoxicity, allowing poloxamer gels to extend their potential application area.

Keywords: poloxamer, acyl glycol chitosan, thermo-reversible sol-gel, physical stability.

서 론

폴록사머는 친수성 고분자인 poly(ethylene oxide)(PEO)와 소수성 고분자인 poly(propylene oxide)(PPO)의 PEO-PPO-PEO 삼중 블록 공중합체 구조를 가지는 대표적인 온도 감응성 고분자로, 온도 변화를 통해 쉽게 하이드로젤의 제조가 가능하다는 장점을 가진다.^{1,3} 일정 농도 이상의 폴록사머 수용액은 상온에서 미셀 구조로 이루어진 유동성 액체(졸) 상태이지만, 특정 온도 이상에서는 미셀간의 소수성 상호작용이

향상되어 3차원 망상 구조의 네트워크 구조를 형성함으로써 졸-젤 상전이 현상을 보인다.^{4,8} 또한 높은 용해성으로 인해 약물 방출성이 뛰어나, 약물전달 제형의 조성물로 사용되고 있으며,⁹⁻¹³ 낮은 독성과 생체 적합성으로 인하여 생체재료 분야에서 다양한 응용 연구가 시도되고 있다. 하지만, 온도감응성 젤화를 위해서는 고농도의 고분자가 필요하고, 젤화 이후에도 수성 환경하에서 빠르게 용해되는 폴록사머 젤의 낮은 물리적 안정성은 생체재료로의 응용에 제한이 되어왔다.^{5,11-15} 특히 폴록사머 젤은 미셀 구조의 패킹으로 인해 이루어지는 가교 구조 때문에 쉽게 분해되어 안정성을 향상시킬 수 있는 다양한 물리적 또는 화학적 방법들이 모색되고 있다.

고분자 소재의 물리적 특성 향상을 위해 다른 고분자 물질과의 혼합 또는 블렌딩을 통해 물리적 특성을 향상시키고자

†To whom correspondence should be addressed.

E-mail: khuh@cnu.ac.kr; swkang@kitox.re.kr

©2017 The Polymer Society of Korea. All rights reserved.

하는 연구가 광범위하게 이루어지고 있다.^{14,16,17} 이러한 방법은 물질 고유의 성질은 유지하면서 물리적 특성 향상이 가능하며, 화학적 반응을 통한 가교 방법에 비해 용이하여 하이드로젤의 기계적 물성 향상을 위해서도 많이 연구되고 있다.¹⁸ 생체재료용 폴록사머 젤에 적합한 혼합용 고분자 물질은 고유의 온도감응성을 잘 유지하면서, 세포독성이 낮은 생체적합성이 우수한 물질이어야 하며, 적은 농도로도 하이드로젤의 안정성을 개선할 수 있는 것이 바람직하다. 폴록사머의 기계적 물성 향상을 위한 혼합 고분자 물질로 키토산이 사용되어 왔으며 적절한 실험조건에서 혼합물의 기계적 물성이 향상된다는 것이 보고되었다.¹⁹ 하지만, 키토산 자체가 중성 수용액에 잘 용해되지 않기 때문에 폴록사머와의 혼합을 위해서는 산성수용액에 용해하고 폴록사머와 중화하는 복잡한 과정이 요구된다.²⁰

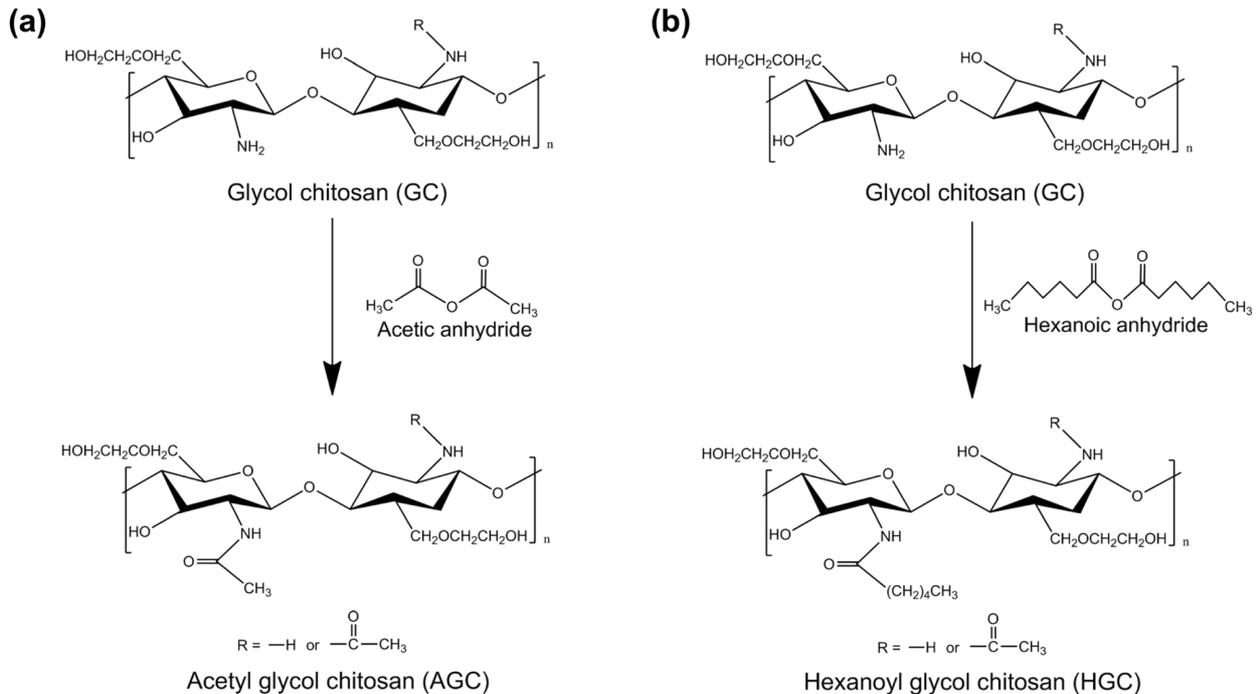
본 연구에서는 글리콜 키토산의 아실화(acylation)반응을 통해 얻어진 아실 글리콜 키토산을 혼합 물질로 사용하여 폴록사머 젤의 안정성을 향상시키고자 하였다. 아실 글리콜 키토산은 본 연구실에서 개발된 새로운 천연고분자 기반의 온도감응성 고분자로서 글리콜 키토산에 다양한 아실기를 적절한 치환율로 도입함으로써 제조될 수 있고, 아실기의 종류와 치환율, 고분자 농도 등을 통해 온도감응성이 조절될 수 있다.²¹⁻²³ 아실 글리콜 키토산 유도체는 상대적으로 낮은 농도에서도 온도 감응성 젤화 특성을 보일 뿐 아니라, 낮은 세포 및 조직 독성, 우수한 물성을 보이는 것으로 보고되었다. 물리적 특성이 개선된 폴록사머 젤의 제조를 위해 본 연구에서는 상

대적으로 짧은 소수성기를 갖는 아세틸 글리콜 키토산(AGC)과 긴 소수성 탄화수소로 이루어진 헥사노일 글리콜 키토산(HGC)을 혼합하여 온도 감응성 젤화 특성, 물리적 안정성, 세포독성 등의 성질을 비교하는 연구를 수행하였다.

실 험

시약 및 시료. 글리콜 키토산(GC)(DP≥400)은 Wako Pure Chemical Industries(일본)에서 구입하였다. 폴록사머 407(P, Lutrol F127[®] MW 12600)은 BASF Corp.(Seoul, Korea)에서 구입하였다. GC의 아실화 반응을 위해 사용한 acetic anhydride (Ac₂O≥99%)와 hexanoic anhydride(97%)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)제품을 사용하였다. 용매로써 이용한 메탄올과 침전 시 이용한 아세톤은 (주)삼전화학(한국)에서 구입하여 사용하였다. 그 외 다른 시약들은 별도의 정제 과정 없이 사용하였다.

N-아실 글리콜 키토산(NAGC) 합성. 기존의 보고된 합성 방법에 따라 Scheme 1과 같이 아실화 반응을 통해 아실 글리콜 키토산을 합성하였다.²² 기계적 교반 하에서 1차 증류수와 메탄올의 부피비가 1:1인 혼합 용매 300 mL에 GC 1 g을 녹였다. 아세틸화 반응을 위해 Ac₂O를 첨가하여 상온에서 48시간 동안 반응시켰다. 이 후 반응된 용액을 아세톤 1 L에 침전시키고, 48시간 동안 4 °C의 냉장고에서 보관하였다. 침전된 물질을 원심 분리하여 분리한 후 수득한 물질을 48시간 동안 투석막(MWCO, 12-14 kDa)을 이용하여 증류수로 투석



Scheme 1. Synthetic procedure of acetyl glycol chitosan: (a) acetyl glycol chitosan (AGC); (b) hexanoyl glycol chitosan (HGC).

하였다. 투석 후 얻어진 물질을 회수하여 3~4일 동안 동결건조한 후 최종적으로 파우더 형태의 AGC를 얻었다. HGC는 hexanoic anhydride를 사용하여 같은 합성 조건과 정제 과정을 거쳐 합성되었다.

고분자 합성 및 분석. 합성한 AGC와 HGC의 화학적 조성을 ¹H NMR과 ATR-FTIR 분석을 통해 관찰하였다. ¹H NMR 스펙트럼을 얻기 위해 600 MHz NMR(AVANCE III 600 spectrometer, Bruker, 독일)을 이용해 32회 스캔하였고, 분석용 샘플은 D₂O를 용매로 사용하여 1.0 wt%로 녹여서 제조하였다. 아실화도(degree of acylation)는 ¹H NMR 스펙트럼 분석을 통해 글루코피라노실 고리의 수소 피크 적분값과 N-아실화된 치환기들의 수소 피크 적분값 평균을 비교하여 계산하였다. ¹H NMR 스펙트럼의 피크 분석을 통해 AGC와 HGC의 아실화도를 각각 확인하였다. ATR-FTIR(Nicolet iS 5, Thermo Scientific, 미국) 스펙트럼은 분해능 4 cm⁻¹에서 16회의 스캔을 통해 얻었다.

아실 글리콜 키토산 함유 폴록사머 젤의 제조. 5 mL 바이알에 PBS 용매를 이용하여 다양한 조성의 폴록사머/AGC 혼합 용액(P/AGC)을 1 mL씩 제조하였다. 1 mL의 PBS에 P/AGC의 농도와 혼합비를 달리하여 17/1, 17/2, 18/1, 18/2, 19/1, 19/2, 20/1, 20/2(wt%)의 다양한 P/AGC 혼합 용액을 제조하였다. HGC 또한 P/AGC 혼합 용액과 같은 조성으로 폴록사머/HGC 혼합 용액(P/HGC)을 제조하였다. 비교를 위한 대조군으로 17, 18, 19, 20 wt%의 1 mL 폴록사머 용액을 제조하였다.

젤 상전이 온도 측정. 합성된 NAGCs의 젤-젤 온도를 측정하기 위해 tube-inverting 방법을 사용하였다. PBS(phosphate-buffered saline, pH 7.4)용매에 AGC와 HGC를 각각 5 wt% 농도로 녹인 후 4 °C의 온도에서 보관하면서 용액이 투명해질 때까지 충분히 용해시켰다. 이후 고분자 용액을 0.5 °C/min의 속도로 승온하면서 젤-젤 거동을 확인하였다.²³ 젤-젤 온도는 바이알을 1분간 뒤집어 표면이 기울어지지 않으면 젤 상태로, 표면이 기울어지고 흐름이 관찰되면 졸 상태로 간주하였다. 아실 글리콜 키토산을 함유한 폴록사머 혼합용액의 온도 변화에 따른 젤-젤 전이온도도 같은 방식으로 관찰하였다. 제조된 다양한 농도의 고분자 혼합 용액을 0.5 °C/min의 속도로 승온하면서 18 °C에서부터 60 °C까지 젤-젤 또는 젤-졸 전이 온도를 확인하였다.

유변학적 특성 분석. 고분자 용액의 온도 변화에 따른 유변학적 거동을 관찰하기 위해 온도조절기가 장착된 rotating rheometer(HAAKE MARS 40, Thermo Scientific, 미국)를 통해 분석하였다.²⁴⁻²⁶ 시료는 1 mm의 간격을 두고 있는 반경 20 mm의 두 평판 사이에 놓았다. 승온 속도 1 °C/min, 온도 범위 10-60 °C에서 진동수를 1 Hz로 고정하고 25 Pa의 일정한 힘으로 측정하였다.

하이드로젤 안정성 평가. 보고된 문헌을 참조하여 혼합 젤

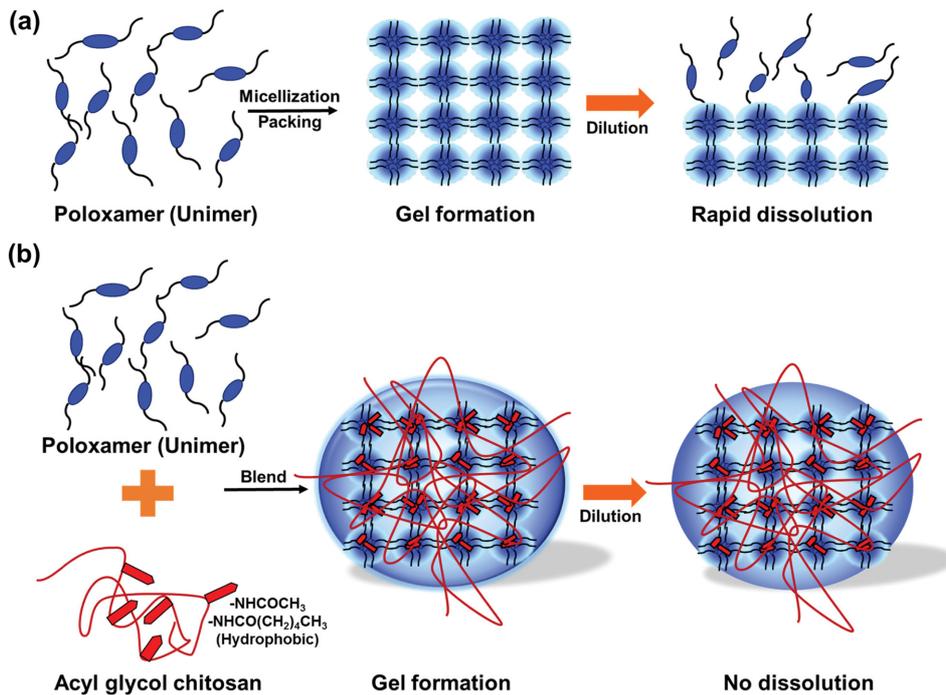
의 안정성 평가를 수행하였다.²¹ P/NAGCs 혼합 용액을 5 mL 바이알에 2 mL씩 분주하여 37 °C로 유지되는 인큐베이터 내에 정치하였다. 젤 안정성의 비교를 위한 대조군으로 농도가 20 wt% 폴록사머 샘플과, 온도 감응성이 없는 GC와 혼합한 폴록사머/글리콜 키토산(P/GC) 샘플을 준비하여 인큐베이터 내에 정치하였다. 20분 후 같은 온도의 증류수 2 mL를 분주된 바이알에 첨가하여 인큐베이터에 정치하였으며, 젤이 사라질 때까지 매일 증류수를 교환하였다. 24시간마다 증류수를 교환하기 전 잔류하는 젤의 질량을 측정하여 처음 젤의 질량과 각각 비교하여 백분율로 환산하였다.

세포독성 평가. 하이드로젤의 세포독성 평가를 위해 준비된 인간 섬유아세포(human fibroblast)를 2×10⁵ cells/well의 농도로 6-well culture plate(Corning, 미국)에 분주하여 37 °C 배양기에서 배양하였다. 48시간 후, 제조된 젤을 배양접시 중앙에 올려 세포와 접촉하도록 한 후 24시간 동안 배양하였다. 하이드로젤과 배양된 세포를 헤마톡실린(Hematoxylin, Sigma)으로 염색하였고, 독성반응 영역은 Image J 소프트웨어를 사용하여 계산하였다. 양성 대조군으로는 0.1%의 zinc diethyldithiocarbamate를 포함하는 polyetherurethane(PU-ZDEC, Hamtano Research Institute, 일본) 필름을 사용하였으며, 독성반응 영역의 크기로 독성의 정도를 분류하였다.^{21,27}

결과 및 토론

NAGCs의 합성 및 특성 분석. 본 연구는 폴록사머와 아실 글리콜 키토산의 혼합을 통해 소수성 상호작용 향상 및 고분자간의 사슬 얽힘을 유도하여 물리적 가교를 통해 폴록사머 젤의 물리적 안정성을 향상시키고자 하였다(Scheme 2). 이를 위해 폴록사머와의 혼합할 고분자로 아세틸 글리콜 키토산(AGC)과 헥사노일 글리콜 키토산(HGC)을 합성하였다.

Figure 1은 아실기를 도입하기 전 글리콜 키토산(GC)과 아실기를 도입한 AGC, HGC의 ¹H NMR 스펙트럼을 나타낸 것이다. N-아실화 반응 후 AGC의 스펙트럼에서 아세틸기의 수소 피크($\delta=2.0$)가 크게 증가한 것을 통해 AGC로의 합성이 성공적으로 이루어졌음을 확인할 수 있었다. 합성된 AGC의 아실 치환도(DA) 분석을 위해 글루코피라노실 고리의 수소와 아세틸기의 메틸 수소 피크의 넓이를 비교하였고, 그 결과 약 90%의 DA를 가지는 것을 확인하였다. 마찬가지로 아실기로 헥사노일기가 도입된 HGC의 합성 여부를 알아보기 위해 ¹H NMR 스펙트럼 피크를 분석하였다. 헥사노일기의 수소 피크 중 메틸기 피크인 $\delta=0.9$ ppm(e), 헥사노일기의 메틸렌 피크인 $\delta=1.3$ ppm(c,d), $\delta=1.6$ ppm(b), $\delta=2.3$ ppm(a) 가 나타난 것으로 보아 HGC가 성공적으로 합성되었음을 확인할 수 있었다. 합성된 HGC의 DA를 알아보기 위해 글루코피라노실 고리의 수소와 헥사노일기의 수소 피크의 넓이를 비교하여 32%의 DA를 가지는 것을 확인하였다. ¹H NMR



Scheme 2. Schematic illustration of gelation of samples in aqueous solutions: (a) poloxamer gel; (b) poloxamer/acyl glycol chitosan blend thermogel.

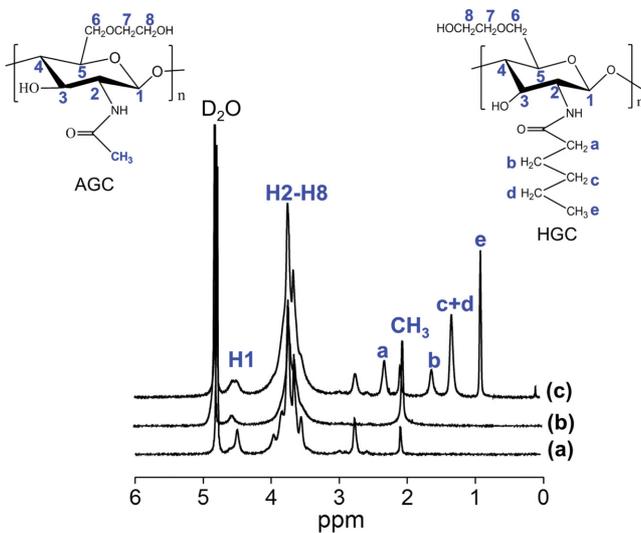


Figure 1. ¹H NMR spectra of (a) GC; (b) AGC; (c) HGC.

스펙트럼 분석과 더불어 ATR-FTIR로 특성 피크 분석으로 NAGCs의 합성여부를 확인하였다(Figure 2). 아실화 반응 후 GC의 1차 아민기의 굽힘 진동 피크(1596 cm⁻¹)가 감소하면서 카보닐기의 신축 진동(1655 cm⁻¹)과 아마이드기의 굽힘 진동 피크(1555 cm⁻¹)가 나타난 것으로 보아 NAGCs의 합성이 성공적으로 이루어졌음을 확인할 수 있었다.

합성된 NAGCs가 온도 감응성을 가지는지 알아보기 위하여 tube-inverting method를 통해 졸-겔 상전이 거동을 관찰

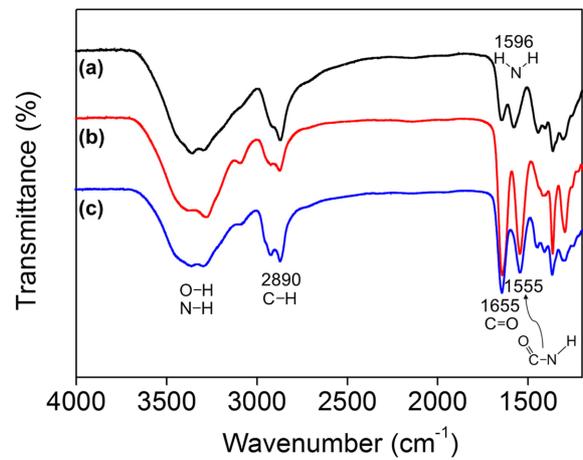


Figure 2. ATR-FTIR spectra of (a) GC; (b) AGC; (c) HGC.

Table 1. Synthetic Results of Acyl Glycol Chitosan

Sample	DA (%) ^a	T _{gel} (°C) ^b	Yield (%)
GC	9.34±2.5	-	-
AGC	90±1	34.5±0.5	95
HGC	32±1	38	80

^aDegree of *N*-acylation determined by the peak integration of ¹H NMR. ^bSol-gel transition temperatures from the polymer solutions (5 wt%, PBS).

하였다(Table 1). GC에서는 온도 변화에 따른 젤화 현상이 관찰되지 않은 반면, AGC와 HGC는 각각 5 wt%에서 약 34,

38 °C에서 졸-젤 상전이 거동을 보였고, 가역적 온도 감응성을 가지는 것을 확인하였다.

폴록사머 혼합 젤의 졸-젤 상전이 거동. 합성된 NAGCs를 이용하여 Table 2에서와 같이 정리된 다양한 농도와 혼합비를 갖는 폴록사머 혼합 젤을 제조하였다. 폴록사머 단일 또는 혼합 젤의 온도 감응성 졸-젤 상전이 거동을 tube-inverting 방법을 통해 관찰한 결과를 Figure 3을 나타내었다. 폴록사머 단일 성분으로 제조된 경우, 18 wt% 이상에서 온도 감응성 졸-젤 현상이 관찰되었고, 17 wt%에서는 이러한 젤화 현상이 관찰되지 않았다. 하지만, 폴록사머 17 wt%(P17)에 NAGCs인 AGC와 HGC를 각각 혼합한 수용액(P/AGC, P/HGC)에서는 온도 감응성 상전이 현상이 관찰되었다. NAGCs를 1 wt% 혼합한 P17/AGC1일 때는 약 34 °C, P17/HGC1에서는 약 32 °C에서 관찰되어 P/HGC가 좀 더 향상된 온도 감응성을 보였다. 18 wt%의 경우, 대조군인 단일 폴록사머 젤과 비교할 때, P/AGC, P/HGC 두 종류 모두 낮은 졸-젤 상전이 온도를 나타냈고, 또한 NAGCs를 1 wt% 혼합한 것 보다 2 wt% 혼합하였을 때 대조군보다 1~2 °C 더 낮은 온도 감응성을 보였다. 폴록사머는 졸-젤 전이 온도 이상에서 온도가 증가됨에 따라 PEO 블록의 탈수 현상으로 인해 젤이 붕괴되어 다시 졸상태로 돌아가는 젤-졸 상전이 온도가 존재하는 것으로 알려져 있다.⁶ NAGCs가 혼합된 폴록사머의 젤-졸 상전이 특성을 관찰하기 위해 60 °C까지 온도를 증가시키면서 젤-졸 전이를 관찰하였다. 대조군인 폴록사머는 보고된 바와 같이 일정 온도 이상에서 젤-졸 상전이가 관찰되었고 농도가 증가하면서 전이온도 또한 증가하는 것으로 관찰되었다. NAGCs가 첨가된 폴록사머 젤의 경우 상대적으로 더 높은 온도에서 젤-졸 상전이 온도가 관찰되는 경향을 보였고, 특히 P/HGC가 P/AGC보다 더 높은 상전이 온도를 보였다. 따라서 상전이 거

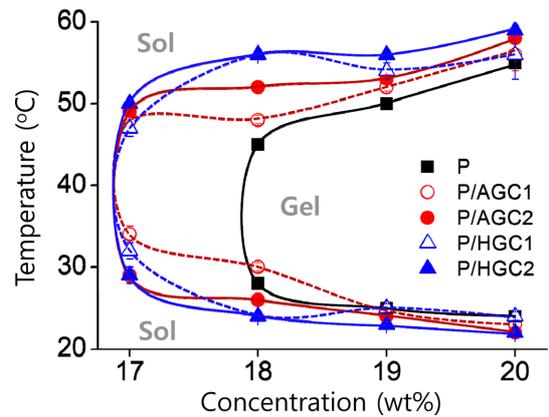


Figure 3. Sol-gel transition phase of poloxamer/acyl glycol chitosan blend thermogel measured by the tube inverting method.

동 분석을 통해 NAGCs의 첨가가 폴록사머의 젤화 거동을 향상시키고, 젤화 농도 영역을 높이는 효과가 있음을 알 수 있었고, 특히 소수성기의 길이가 긴 HGC와의 혼합이 보다 효과적으로 젤화능을 향상시킬 수 있다는 것을 알 수 있었다. 이는 아세틸기보다 분자량이 크고, 소수성이 큰 헥사노일기가 폴록사머의 PPO 소수성 블록과 상호작용하는데 효과적이며 보다 안정적으로 소수성 결합을 할 수 있는데 기인된 것으로 사료된다.

유변학적 특성 분석 및 안정성 분석. 레오미터를 이용하여 폴록사머와 혼합 젤, NAGCs의 유변학적 특성을 분석하였다(Figure 4). Tube-inverting method로 측정된 결과와 유사하게 측정 온도 범위에서 폴록사머 17 wt%(P17)는 온도 변화에 따른 저장 탄성률(*G'*)의 변화를 보이지 않지만, 같은 농도의 폴록사머에 NAGCs를 혼합할 경우 졸-젤 전이에 의한

Table 2. Comparison of Sol-Gel Transition Temperature of Poloxamer/Acyl Glycol Chitosan Blend Thermogel

Sample	Conc. (wt%) P/AGC	<i>T</i> _{gel} (°C)	<i>T</i> _{sol} (°C)	Sample	Conc. (wt%) P/HGC	<i>T</i> _{gel} (°C)	<i>T</i> _{sol} (°C)
P17	17	-	-	P17	17	-	-
P17/AGC1	17/1	34±1	48	P17/HGC1	17/1	32±1	47±1
P17/AGC2	17/2	19±1	49	P17/HGC2	17/2	29±1	50
P18	18	28	45	P18	18	28	45
P18/AGC1	18/1	30±0.5	48±0.5	P18/HGC1	18/1	24±0.5	56±0.5
P18/AGC2	18/2	26±0.5	52±0.5	P18/HGC2	18/2	24±0.5	56±0.5
P19	19	25	50	P19	19	25	50
P19/AGC1	19/1	25±0.5	52±0.5	P19/HGC1	19/1	25±0.5	54±1
P19/AGC2	19/2	24±0.5	53±0.5	P19/HGC2	19/2	23±0.5	56±0.6
P20	20	24	55	P20	20	24	55
P20/AGC1	20/1	23±0.5	56±2	P20/HGC1	20/1	24±0.5	56±3
P20/AGC2	20/2	22±0.5	58±0.5	P20/HGC2	20/2	22±0.5	59±0.5

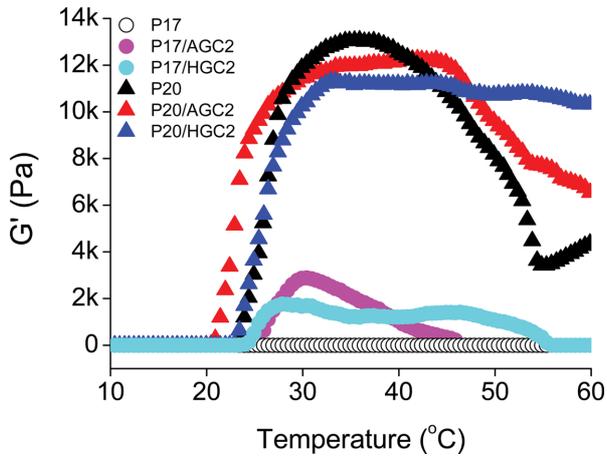


Figure 4. Temperature sweep rheology analysis of poloxamer/acyl glycol chitosan blend thermogel.

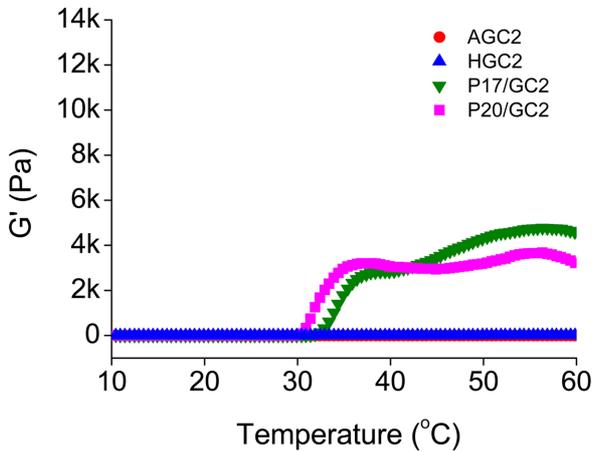


Figure 5. Temperature sweep rheology analysis of poloxamer/glycol chitosan blend gel.

급격한 G' 값의 증가를 보였다. P17/AGC2는 약 20~45 °C 범위에서 젤을 유지하였고, P17/HGC2는 약 24~55°C에서 젤을 유지하였다. 또한 P20, P20/AGC2, P20/HGC2의 초기 줄-젤 상전이 온도는 약 20 °C로 유사하지만, P20/HGC2는 이후 측정 온도 범위인 60 °C까지 G' 이 감소하지 않았고, 더 넓은 온도 범위에서 젤 상태를 유지하였다.

아실기의 영향을 알아보기 위해 온도 감응성이 없는 GC와 폴록사머를 혼합한 P/GC 혼합 젤을 관찰하였다(Figure 5). P17/GC2, P20/GC2 둘 다 약 30 °C 이상에서 줄-젤 상전이 현상이 관찰되었으나, P/AGC와 P/HGC 혼합 젤보다 더 낮은 물성을 보였다. 이는 분자량이 큰 GC의 첨가에 따라 폴록사머의 젤 형성능이 다소 증가되었다고 볼 수 있으나, 온도 감응성이 있는 AGC 또는 HGC와의 혼합 젤에서는 보다 큰 온도 감응성 젤 형성능의 증가와 물성의 증가를 동시에 보일 수 있었다. 한편, Figure 5에서 나타난 바와 같이 2 wt%

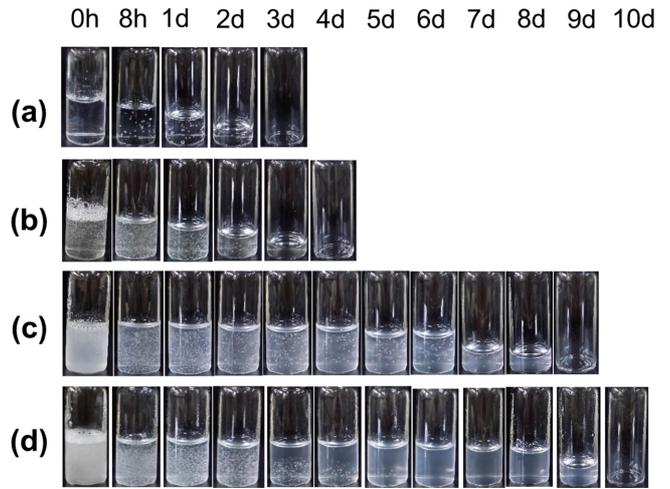


Figure 6. Images of *in vitro* gel stability test of poloxamer/acyl glycol chitosan blend thermogel: (a) P20; (b) P20/GC2; (c) P20/AGC2; (d) P20/HGC2.

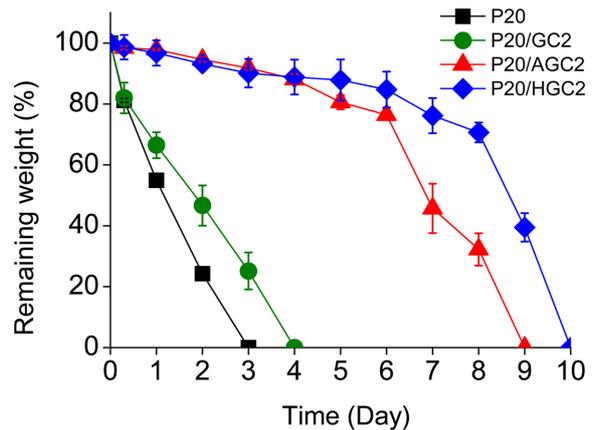


Figure 7. *In vitro* gel stability test of poloxamer/acyl glycol chitosan blend thermogels.

의 농도에서는 AGC와 HGC가 단독으로는 온도 감응성을 가질 수 없는 것으로 보아 혼합 젤의 온도 감응성과 물성에서의 향상은 폴록사머와 NAGCs 사이에서의 효과적으로 상호작용에 기인한 것으로 판단된다.

37 °C로 유지되는 인큐베이터에서 PBS 내에 2 mL씩 정지된 혼합 젤의 잔류량을 측정하여 안정성을 평가하였다(Figure 6 and 7). 기존 폴록사머 젤은 PBS 조건 하에서 3일 이내에 젤이 용해되는 것을 확인할 수 있었고, GC가 첨가된 경우 다소 향상되었으나, 4일 이내에 분해되는 것을 확인할 수 있었다. 이에 반해 NAGCs와의 혼합 젤은 9~10일까지 젤이 유지되는 것을 확인하였고, HGC의 경우 AGC보다 상대적으로 더 안정하게 유지되었다. 결과적으로 아실 글리콜 키토산을 혼합한 폴록사머 젤은 Scheme 2에서와 같이 증가된 고분자의 사슬 얽힘과 효과적인 소수성 상호작용을 통해 젤의 온도

Table 3. Reactivity Grades for Direct Contact Cytotoxicity²⁷

Grade	Reactivity	Description of reactivity zone
0	None	No detectable zone around or under specimen
1	Slight	Zone limited to area under specimen
2	Mild	Zone extends less than 0.5 cm beyond specimen
3	Moderate	Zone extends 0.5-1.0 cm beyond specimen
4	Severe	Zone extends greater than 1.0 cm beyond specimen but does not involve entire dish

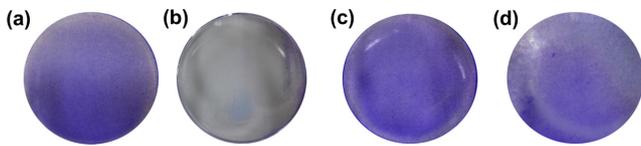


Figure 8. Direct contact cytotoxicity assay: (a) Non-treatment; (b) PU-ZDEC; (c) P20/AGC2; (d) P20/HGC2.

Table 4. Direct Contact Cytotoxicity Assay of Blend Thermogel (n=3)

Sample	Formed zone size (cm)	Zone index
Non-treatment	0	0
PU-ZDEC	0.86±0.2	3
P20/AGC2	0	0
P20/HGC2	0	0

감응성 뿐 아니라 물리적 안정성을 크게 향상시킬 수 있었다.

세포독성 평가 분석. 폴록사머 혼합 젤의 세포독성은 직접 접촉 세포독성 평가방법을 통해 확인하였다(Table 3).²⁷ 양성 대조군은 *in vitro*상에서 고분자의 세포독성을 확인할 때 사용하는 0.1%의 zinc diethyldithiocarbamate(ZDEC)를 포함하는 polyetherurethane(PU) 필름을 사용하였다.²⁷ Figure 8은 직접접촉 세포독성 평가를 통해 얻은 양성 대조군과 글리콜 키틴의 세포독성 영역을 나타낸다. 양성 대조군인 PU-ZDEC는 세포독성이 시료의 크기보다 0.86 cm(±0.2) 정도 벗어난 지점까지 영향을 미친 반면, 혼합 젤(P20/AGC2, P20/HGC2)은 non-treatment와 마찬가지로 세포독성 영역이 검출되지 않았다(Table 4). 이를 통해 폴록사머 혼합 젤이 유의미한 세포독성을 나타내지 않는 것을 확인할 수 있었다.

결 론

본 연구에서 폴록사머 젤의 특성을 개선하고자 온도 감응성 아실 글리콜 키토산을 첨가한 혼합 젤을 제조하고 평가하

였다. 아실 글리콜 키토산의 첨가는 폴록사머 젤의 온도 감응성 젤화능을 향상시킬 수 있을 뿐 아니라 수성 환경 내 물리적 안정성을 높이는데 효과가 있었다. 이러한 폴록사머 혼합 젤은 우수한 온도 감응성, 향상된 젤 안정성, 낮은 세포독성 등 다양한 장점을 보유함으로써 약물전달, 조직공학, 3차원 세포배양 등 다양한 생체의료용 분야에 유용하게 활용될 수 있을 것으로 전망된다.

감사의 글: 이 논문은 2016년도 정부(미래창조과학부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(NRF-2016M3A9B4919616).

참 고 문 헌

1. J. S. Ahn, J. M. Suh, M. Lee, and B. Jeong, *Polym. Int.*, **54**, 842 (2005).
2. L. Yu and J. Ding, *Chem. Soc. Rev.*, **37**, 1473 (2008).
3. H. J. Moon, M. H. Park, M. K. Joo, and B. Jeong, *Chem. Soc. Rev.*, **41**, 4860 (2012).
4. P. Alexandridis and T. A. Hatton, *Colloids. Surf. A. Physicochem. Eng. Asp.*, **96**, 1 (1995).
5. G. Dumortier, J. L. Grossiord, F. Agnely, and J. C. Chaumeil, *Pharm. Res.*, **23**, 2709 (2006).
6. J. Escobar-Chávez, M. López-Cervantes, A. Naik, Y. Kalia, D. Quintanar-Guerrero, and A. Ganem-Quintanar, *J. Pharm. Pharm. Sci.*, **9**, 339 (2006).
7. E. Ruel-Gariepy and J.-C. Leroux, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **58**, 409 (2004).
8. A. V. Kabanov, E. V. Batrakova, and V. Y. Alakhov, *J. Control. Release*, **82**, 189 (2002).
9. S. H. Lee, J. E. Lee, W. Y. Baek, and J. O. Lim, *J. Control. Release*, **96**, 1 (2004).
10. S. Kempe and K. Mäder, *J. Control. Release*, **161**, 668 (2012).
11. M. S. H. Akash and K. Rehman, *J. Control. Release*, **209**, 120 (2015).
12. T. Ur-Rehman, S. Tavelin, and G. Gröbner, *Int. J. Pharm.*, **409**, 19 (2011).
13. C. Lu, M. Liu, H. Fu, W. Zhang, G. Peng, Y. Zhang, H. Cao, and L. Luo, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **77**, 24 (2015).
14. S. I. H. Abdi, J. Y. Choi, J. S. Lee, H. J. Lim, C. Lee, J. Kim, H. Y. Chung, and J. O. Lim, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **9**, 1 (2012).
15. G. Niu, F. Du, L. Song, H. Zhang, J. Yang, H. Cao, Y. Zheng, Z. Yang, G. Wang, H. Yang, and S. Zhu, *J. Control. Release*, **138**, 49 (2009).
16. C.-J. Wu, A. K. Gaharwar, B. K. Chan, and G. Schmidt, *Macromolecules*, **44**, 8215 (2011).
17. S. B. D. S. Ferreira, T. D. Moço, F. B. Borghi-Pangoni, M. V. Junqueira, and M. L. Bruschi, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, **55**, 164 (2015).
18. Y. M. Kang, L. S. Kim, S. H. Lee, J. S. Son, B. Lee, J. H. Kim, and M. S. Kim, *Polym. Sci. Technol.*, **20**, 245 (2009).

19. Y. Lee, H. J. Chung, S. Yeo, C.-H. Ahn, H. Lee, P. B. Messersmith, and T. G. Park, *Soft Matter*, **6**, 977 (2010).
20. T. Gratieri, G. M. Gelfuso, E. M. Rocha, V. H. Sarmiento, O. de Freitas, and R. F. V. Lopez, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **75**, 186 (2010).
21. H. S. You, M. O. Cho, I. S. Cho, Z. Li, N. H. Kim, M. K. Jang, S. W. Kang, and K. M. Huh, *Polym. Korea*, **40**, 1 (2016).
22. M. O. Cho, Z. Li, H.-E. Shim, I.-S. Cho, M. Nurunnabi, H. Park, K. Y. Lee, S.-H. Moon, K.-S. Kim, S.-W. Kang, and K. M. Huh, *NPG Asia Mater.*, **8**, e309 (2016).
23. Z. Li, S. Cho, I. C. Kwon, M. M. Janát-Amsbury, and K. M. Huh, *Carbohydr. Polym.*, **92**, 2267 (2013).
24. K. Edsman, J. Carlfors, and R. Petersson, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **6**, 105 (1998).
25. T. Kojarunchitt, S. Hook, S. Rizwan, T. Rades, and S. Baldursdottir, *Int. J. Pharm.*, **408**, 20 (2011).
26. G. Bonacucina, M. Spina, M. Misici-Falzi, M. Cespi, S. Pucciarelli, M. Angeletti, and G. F. Palmieri, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **32**, 115 (2007).
27. M. C. I. M. Amin, N. Ahmad, N. Halib, and I. Ahmad, *Carbohydr. Polym.*, **88**, 465 (2012).