

약물전달체로서 디옥시콜산이 결합된 히알루론산의 제조와 특성

최창용 · 박준규 · 김원석 · 장미경[†] · 나재운[†]

순천대학교 공과대학 고분자공학과

(2010년 8월 17일 접수, 2010년 9월 27일 수정, 2010년 11월 16일 채택)

Preparation and Characterization of Deoxycholic Acid-Grafted Hyaluronic Acid as a Durg Carrier

Changyong Choi, Jun-Kyu Park, Won Suk Kim, Mi-Kyeong Jang[†], and Jae-Woon Nah[†]

Department of Polymer Science and Engineering,

Sunchon National University, Jeonnam 540-742, Korea

(Received August 17, 2010; Revised September 27, 2010; Accepted November 16, 2010)

초록: 본 연구에서는 항암제 전달체로 응용하기 위하여 천연고분자인 히알루론산(hyaluronic acid, HA)에 소수성기 도입을 위하여 담즙산(bile acid) 중 하나인 디옥시콜산(deoxycholic acid) (DA)을 개질하여 양친성 공중합체를 제조하였고, 이를 항암제 전달체로 응용하고자 하였다. 디옥시콜산이 결합된 히알루론산(HADA)의 물리화학적 특성은 ¹H NMR, FTIR, spectrophotometer와 TEM을 이용하여 측정하였다. 디옥시콜산이 결합된 히알루론산에 항암제(파클리탁셀)를 투석방법을 통하여 봉입시켰고, *in vitro*에서 KB 세포에 대한 항암활성을 확인하였다. 제조된 디옥시콜산이 결합된 히알루론산이 항암제 전달체로서의 응용 가능성을 제시하였다.

Abstract: To develop hyaluronic acid (HA)-based anticancer agent carrier, hyaluronic acid was chemically modified with the hydrophobic group of deoxycholic acid (DA). The physicochemical properties of the deoxycholic acid-conjugated HA (HADA) were investigated by using ¹H NMR, FTIR, spectrophotometer and TEM. Paclitaxel (Tx)-loaded HADA nanoparticles were prepared by a dialysis method. The loading efficiency of drug and drug contents of Tx-loaded HADA nanoparticles (HADA-Tx) were measured by HPLC. The anticancer activity of HADA-Tx was investigated by its cytotoxicity against KB cell *in vitro*. The HADA-Tx was shown to have the superior potential for the anticancer drug delivery.

Keywords: hyaluronic acid, bile acid, deoxycholic acid, drug carrier, nanoparticle.

서 론

인간의 질병을 치료하는데 있어 최적의 치료효과를 얻기 위해서는 약물을 효율적이고 지속적으로 방출할 수 있는 새로운 장치의 개발이 요구된다. 이러한 목적으로 주로 사용되고 있는 생체고분자로는 젤라틴, 셀룰로오스, 텍스트란, 키틴, 키토산, 히알루론산과 같은 천연고분자 물질과 polylactide, polyglycolide 및 이들의 공중합체 그리고 polyamide와 poly(amino acid) 등의 합성고분자 재료 등이 있다.¹

생체고분자인 히알루론산(hyaluronic acid, HA)는 생분해성, 생체적합성, 면역반응성이 없는 선형 형태의 polysaccharide로 분자량은 1~10000 kDa으로 매우 넓은 범위를 갖는다. 히알루론산은 높은 분자량을 갖고 있으나 열이나 효소 등과 같이 물리적이거나 생화학적으로 쉽게 분해가 가능하여 필요에 따른 분자량 조절이 용이하다. 또한 화학적 구조에서 히알루론산의 분자 내에는 많은 관능기가 존재하여 화학적으로 다른 종류의 이온으로 치환하거나 가교시켜 구조적 개질이 용이하

다. 이러한 히알루론산은 무코다당류로서 연골사이에서 연골을 보호하며, 세포간 분자의 3차원가교역할을 하고, 세포 운동성과 세포증식을 증진시키는 역할을 한다.² 또한 히알루론산은 인체 내에서 혈액, 체액 및 생체 조직과 접촉하였을 때 우수한 생체적합성을 갖고 있다. 최근에는 히알루론산의 우수한 물리·화학적 성질을 이용하여 히알루론산을 개질함으로써 조직공학, 약물전달체, 인체보형물 등에 적용되는 생체 재료물질을 개발하려는 연구가 활발히 진행되고 있다.³⁻¹¹ 이와 더불어 히알루론산은 피부 주름방지와 골 관절염 치료를 위해서 또는 눈과 인체 수술 시에 보형물로서 사용되는 유익한 재료이며 주름을 제거하기 위한 주사제 그리고 캡슐과 화장품 및 의약품으로 많이 응용되어지고 있다.¹²⁻¹⁸

담즙산(bile acid, BA)은 쓸개즙의 주요성분이고, 종류로는 콜릭산, 리소콜릭산, 디옥시콜산 등의 종류가 있고, 음식물의 소화 및 소화산물 특히 지방 카보티노이드 비타민의 흡수를 도와주는 역할을 한다. 담즙산은 주로 간의 콜레스테롤로부터 만들어져 생체 내의 콜레스테롤 대사, 당대사, 핵산대사와 밀접한 관계를 갖고 있으며, 담즙 유동의 발생으로 인한 콜레스테롤 항상성, 지질 흡수, 약물과 비타민 재순환과 분비

[†]To whom correspondence should be addressed.

E-mails: jwnah@sunchon.ac.kr, jmk8856@sunchon.ac.kr

를 포함한 중요 생리학적 기능을 도외준다.¹⁹

본 연구에서는 히알루론산과 담즙산의 한 종류인 디옥시콜산을 이용하여 약물전달체로 사용하기 위해서 히알루론산의 카르복실기 양쪽에 아민기를 갖는 adipic acid dihydrazide (ADH)로 치환한 후 디옥시콜산과 결합시켜 친수성과 소수성을 갖는 양친성 디옥시콜산이 결합된 히알루론산 유도체를 합성함으로써 소수성 약물을 전달할 수 있는 전달체를 제조하였다. 이 유도체에 항암제인 파클리탁셀을 봉입시켜 입자의 크기 봉입효율 등을 규명함으로써 약물전달체로 응용 가능성을 제시하였다.

실 험

시약 및 재료. 본 실험에서 사용된 히알루론산(hyaluronic acid, HA (Mn: 590000 Da)과 adipic acid dihydrazide (ADH)와 1-ethyl-3-[3-(dimethylamino)propyl]-carbodiimide (EDC), deoxycholic acid (DA), *N*-hydroxysuccinimide (NHS)은 Sigma Aldrich사에서 구입하였다. 소수성 모델 약물로 사용된 파클리탁셀은 Sigma Aldrich사에서 구입하여 사용하였다. 항암활성 실험에 사용된 암세포는 KB 세포를 사용하였다. 세포는 American Type Culture Collection (ATCC)에서 분양받은 후 10%의 fetal bovine serum (FBS)을 함유한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)을 이용하여 배양하였다. 기타 시약들은 일급 시약을 구입하여 정제하지 않고 사용하였다.

히알루론산-Adipic Acid Dihydrazide (HA-ADH) 합성. 히알루론산을 개질하기 위하여 히알루론산의 카르복실기에 ADH로 치환하였다. HA-ADH 합성은 S. K. Hahn 등¹³ S. J. Kim 등¹⁵ 방법에 따라서 합성하였다. 히알루론산 100 mg을 20 mL의 증류수에 용해시켜 5 mg/mL의 히알루론산 용액을 제조하였다. 그리고 이 용액에 ADH(1.736 g, 0.01 mol)를 넣은 후 자석 교반기를 이용하여 1시간 동안 교반하였다. 이 반응물에 0.1 N HCl을 이용하여 pH 5.0 이하로 유지한 후 EDC(0.191 g, 0.001 mol)를 넣어준 후 24시간 동안 실온에서 반응을 하였다. 반응이 종결 후 1 N NaOH를 이용하여 pH를 7.0으로 조정하여 과량의 에탄올에 적가함으로써 재결정을 형성시킨 후 얻은 침전물의 정제를 위하여 증류수에 1 mg/mL의 농도로 녹여 투석(투석막: MWCO 3500 Da)하여 동결건조를 통하여 고체 분말(HA-ADH)을 얻었다.

HA-ADH-디옥시콜산(HADA)합성. 소수성기인 디옥시콜산(DA) 도입은 HA-ADH의 아민그룹과 디옥시콜산의 카르복실기 반응을 통하여 이루어진다. 이 반응에서 디옥시콜산의 합성 효율을 향상시키기 위하여 반응 전 디옥시콜산의 카르복실기를 NHS(DA-NHS)를 이용하여 활성화시킨 후 반응에 사용하였다. 반응을 간략하게 설명하면 다음과 같다. HA-ADH 20 mg을 5 mL 증류수에 녹인 후 DMSO 15 mL를 넣어준다. 이 용액에 DA-NHS(5 mg, 0.01 mmol)를 넣어 상온에서 24시간 반응하였다. 반응 종료 후 증류수로 24시간 동안 투석(MWCO 3500 Da)하여 미반응물과 용매를 제거한 후 동결건조하여 HADA를 얻었다.

HADA 나노입자 제조. HADA 1 mg을 증류수/DMSO 혼합용매(1:9, v/v) 10 mL에 용해시킨 후 투석법으로 나노입자를 제조하였다. 투석에 사용된 투석막은 MWCO 15000 Da을 사용하였으며 상온에서 24

시간 동안 일정 시간 간격으로 증류수를 교체함으로써 투석하였으며, 투석 후 용액을 동결건조하여 HADA 나노입자를 얻었다.

합성물의 구조 분석. 최종 생성물의 합성여부는 FTIR spectroscopy (Shimadzu, FTIR 8700, Japan)와 ¹H NMR (Bruker AVANCE 400, Germany)을 이용하여 규명하였다. FTIR을 이용한 구조분석은 KBr과 샘플을 혼합비 100:1로 혼합하여 투명한 펠렛을 제조한 후 투광도로 규명하였다. ¹H NMR 분석을 위하여 사용된 용매는 HA와 HA-ADH는 D₂O, HADA는 D₂O/DMSO-*d*₆(1:3, v/v)를 사용하여 화학적 이동을 ppm 단위로 규명하였다.

HADA 나노입자 특성 규명. 디옥시콜산이 결합된 히알루론산의 경우 한 분자에 친수성 및 소수성을 갖는 양친성 물질로서 수용액 하에서 자가응집에 의한 나노입자를 형성하게 된다. HADA의 특성은 형광광도계(RF-5301, Shimadzu, Japan)를 이용하여 임계미셀형성농도(CAC), 동적산란계(dynamic light scattering, DLS, ELS8000, Otsuka, Japan)를 이용하여 나노입자의 크기, 투과전자현미경(transmission electron microscope, TEM, Tecani 20, FEI, Netherlands)을 이용하여 나노입자의 형태 및 크기를 관찰하였다.

CAC는 pyrene을 형광 염료로 사용하여 농도에 따른 pyrene의 광학적 거동의 관찰을 통하여 조사하였다. 실험을 위하여 pyrene을 아세트론에 6×10^{-5} M이 되도록 용해시키고 제조하고 이를 증류수에 첨가하여 최종농도가 1.2×10^{-6} M이 되도록 하였다. 이때 용액중의 아세트론은 40 °C에서 2시간 동안 감압 증발시켜 제거시켰다. 이 pyrene 용액과 다양한 농도의 나노입자의 용액($1.0 \times 10^{-5} \sim 1$ mg/mL)을 1:1의 비율로 혼합하여 pyrene의 최종 농도가 6.0×10^{-7} M이 되도록 하였다. 이 용액을 60 °C에서 약 3시간 방치한 후 형광광도계를 이용하여 형광특성을 관찰하였다. 형광 발광 분석은 흡수과장 390 nm에서 측정하였다. 측정된 형광 스펙트럼과 발광 과정의 이동을 이용하여 임계미셀형성농도(CAC)를 결정하였다. 디옥시콜산이 결합된 히알루론산 나노입자의 크기와 분포는 동적산란기와 투과전자현미경을 이용하여 측정하였다. 동적산란기 분석을 위하여 샘플을 증류수에 1 mg/mL의 농도가 되도록 한 후 25 °C에서 산란 각도를 90°로 고정하여 측정하였다. 투과전자현미경을 이용한 나노입자의 형태 분석을 위하여 나노입자 표면의 전지밀도를 높이기 위하여 2% 우라닐아세테이트 용액에 염색한 후 카본 필름으로 코팅된 TEM grid 위에 적가하여 건조시킨 후 관찰하였다.

파클리탁셀이 봉입된 나노입자의 제조. 디옥시콜산이 결합된 히알루론산 나노입자는 소수성 핵 및 친수성 껍질의 구조를 갖고 있다. 나노입자의 소수성 핵과 소수성 항암제인 파클리탁셀의 소수성 상호작용(hydrophobic interaction)에 의하여 파클리탁셀이 나노입자 내부로 봉입된다. 약물 봉입 실험은 다음과 같이 수행하였다. HADA 20 mg을 증류수와 DMSO의 혼합용매(2:8.5, v/v)에 용해시킨 후 파클리탁셀 4 mg을 DMSO 0.5 mL에 녹여 첨가한다. 봉입에 사용된 유기용매인 DMSO는 투석(투석막 MWCO: 3500 Da)을 통하여 24시간 동안 제거한 후 동결건조를 통하여 파클리탁셀이 봉입된 히알루론산 나노입자를 얻었다.

약물의 담지효율 및 봉입효율 측정. 나노입자에 약물의 봉입량과 봉입효율은 HPLC(Agilent 1200, Agilent, USA)를 이용하여 분석하였다. 분석에 사용된 용매는 혼합용매(MeOH/H₂O(95/5, v/v))로 각각의 시료 제조와 이동상으로 사용하였다. 시료 내 용매의 조성은 혼합용매로 맞춘 후 동일 조건하에서 적절한 희석을 통하여 제조하였다.

분석은 1.5 mL/min의 유속으로 50 °C에서 진행하였고, 약물의 검출은 UV 검출기를 이용하여 224 nm 파장에서 측정하였다. 파클리락셀의 농도와 그에 따른 특성 피크의 면적 변화를 이용하여 검량선 (standard curve)을 작성한 후 이를 이용하여 시료 내 파클리락셀의 농도를 계산하였다. 또한 약물 봉입효율 및 약물 함량은 다음의 식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{약물담지량} = (\text{나노입자 내 약물량}) / (\text{전체 나노입자 중량}) \times 100,$$

$$\text{봉입효율} = (\text{나노입자 내 약물 총량}) / (\text{초기 약물 사용량}) \times 100$$

세포 독성 실험. 파클리락셀이 봉입된 히알루론산 나노입자의 항암활성은 암세포인 KB세포를 이용하여 세포독성을 측정함으로써 규명하였다. 세포는 10% FBS가 포함된 DMEM을 이용하여 배양한 후 96 well plate에 분주하여 실험에 사용하였다. 약물 처리를 위하여 약 5000 개의 세포를 분주하여 90 μL의 배양액과 함께 각각의 well에 넣고 약 하루 동안 추가 배양을 실시하여 세포가 안정되게 부착될 수 있도록 하였다. 파클리락셀이 봉입된 HADA 샘플의 농도를 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001, 0.00001 μg/mL로 넣어 준 후 추가 배양하였다. 약 24시간 동안 추가 배양 후 각 well에 MTT 용액(5 mg/mL in PBS) 10 μL를 넣어준 후 약 1시간 동안 배양하여 생존 세포에 의한 MTT의 산화를 유도하였다. 최종적 배양 후 세포 배양액을 제거한 후 100 μL의 DMSO를 이용하여 생존 세포에 의하여 형성된 진한 보라색의 MTT 산화물을 용해시킨 후 570 nm에서의 흡광도 및 다음의 식을 이용하여 생존 세포의 비율을 측정하였다.

$$\text{세포 생존율 (\%)} = \frac{(OD_{570}(\text{sample}) - OD_{570}(\text{blank}))}{(OD_{570}(\text{control}) - OD_{570}(\text{blank}))} \times 100$$

위 식에서 $OD_{570}(\text{sample})$ 은 파클리락셀 봉입된 HADA, $OD_{570}(\text{control})$ PBS 완충용액으로 처리된 well로부터 측정된 흡광도 값이다.

결과 및 토론

담즙산이 결합된 히알루론산. 히알루론산의 소수성기 도입을 위하여 히알루론산의 양쪽에 아민기를 갖는 ADH를 히알루론산의 카르복실기에 치환시켰고 그 후 디옥시콜산의 카르복실기와 HA-ADH의 아민과의 반응을 통하여 소수성기인 디옥시콜산이 결합된 히알루론산 (HADA)을 제조하였다. Figures 1과 2는 각각 히알루론산과 ADH의 합성 및 HA-ADH에 디옥시콜산을 합성시키기 위한 반응 모식도를 나타낸 것이다. Figure 3은 FTIR 스펙트럼의 결과로, 히알루론산의 카르복실기와 ADH의 아민기가 결합되어 1650 cm^{-1} 와 1550 cm^{-1} 의 CONH 특성피크가 증가함을 확인하였다. Figure 4는 HA, HA-ADH와 HADA의 ^1H NMR 스펙트럼을 나타낸 것이며, 각각의 특성 피크를 확인하였고, HA-ADH 및 HADA의 합성 후 ADH의 특성 피크가 고자장으로 이동함으로써 HA-ADH와 HADA가 성공적으로 합성되었음을 확인하였다. ^1H NMR 스펙트럼으로부터, 히알루론산 메틸기의 피크 1.77 ppm과 ADH의 피크인 1.5 ppm를 비교하여 치환율을 측정하였고, 그 결과로써 카르복실기들의 50% 정도 치환되었음을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 S. K. Hahn과¹³ In Rim Hong

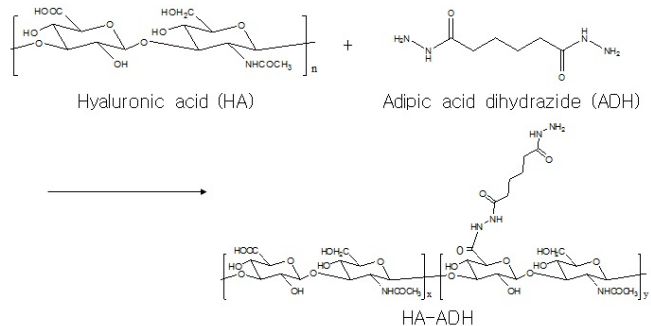


Figure 1. The reaction scheme of hyaluronic acid grafted by adipic acid dihydrazide (HA-ADH).

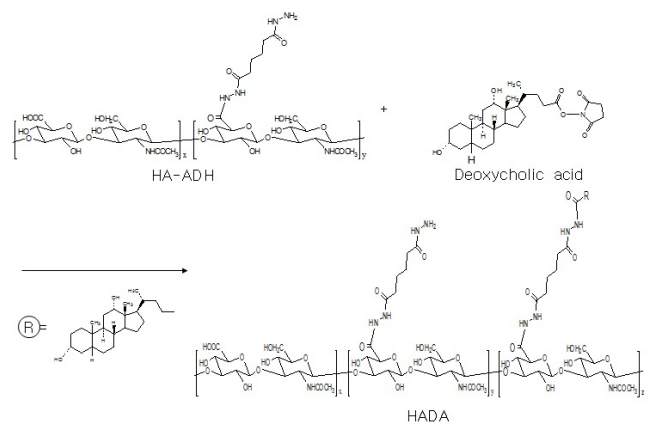


Figure 2. The reaction scheme of bile acid-grafted HA-ADH (HADA).

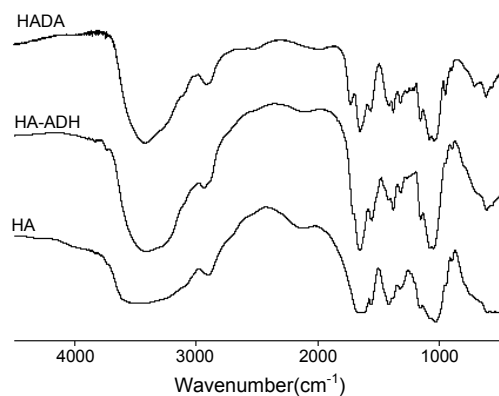


Figure 3. FTIR spectra of HA, HA-ADH and HADA.

의²⁰ 연구 결과를 참고로 하여 유사한 HA-ADH의 치환 비율로 치환되었음을 확인할 수 있다. HADA의 ^1H NMR 스펙트럼을 통하여 히알루론산의 메틸기에 의한 피크인 1.77 ppm의 면적과 담즙산의 메틸기의 피크인 1.2 ppm 면적비를 이용하여 치환도를 계산하였고, 결과로써 2.3% 치환되었음을 확인하였다.

디옥시콜산이 결합된 히알루론산 나노입자 분석. 디옥시콜산을 이용하여 화학적으로 개질된 히알루론산의 경우 분자 내에 친수성을 나타내는 히알루론산과 소수성을 나타내는 디옥시콜산이 함께 공존하는 양친성 물질의 특성을 나타내게 된다. 이러한 양친성 물질의 경우 수용액 하

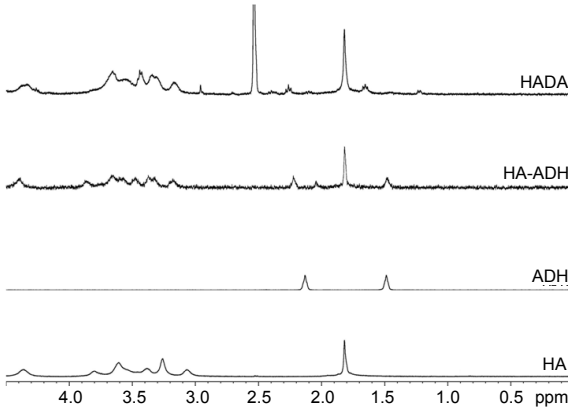


Figure 4. ¹H NMR spectra of HA, ADH, HA-ADH, and HADA.

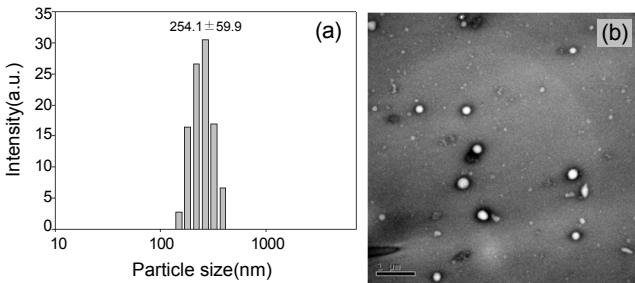


Figure 5. Particle size distribution of HADA nanoparticles (a); TEM image (b).

에서 소수성 디옥시콜산간의 소수성 상호작용을 통하여 자가응집(self-aggregation) 형태의 나노입자를 형성하게 된다.²¹⁻²³

HADA의 나노입자 크기를 동적산란기와 TEM을 이용하여 측정하였고, 그 결과를 Figure 5에 나타내었다. Figure 5에 나타낸 바와 같이 제조된 나노입자는 구형의 입자를 보이며, 약 250 nm 정도의 크기를 보였다.

양친성 특성을 갖는 고분자의 경우 수용액 하에서 농도에 의존하는 자가응집 경향을 나타낸다.²¹⁻²³ 이러한 농도 의존 자가응집 특성은 pyrene을 형광 표지를 이용한 형광 특성 분석을 이용하여 규명할 수 있다. Pyrene의 형광분석은 소수성을 나타내는 pyrene 분자가 수용액 하에서 선택적으로 소수성 미세 환경(microenvironment)에 침투하여 수용액 하에서 보다 매우 강한 형광특성을 나타내게 되고, 이러한 pyrene의 형광특성 변화는 양친성 물질의 농도에 매우 밀접하게 반응한다. 이는 임계미셀형성 농도(critical aggregation concentration, CAC) 이상의 농도에서 양친성 물질이 자가응집을 통하여 소수성 미세환경을 구성하기 때문이다. 따라서 CAC 이하의 농도에서는 특별한 pyrene의 형광특성을 나타내지 않는 반면, CAC 이상의 농도에서는 매우 강한 형광특성 및 pyrene의 특성 피크의 이동을 수반한다. 본 실험에서 제조한 HADA의 경우 CAC 이하의 농도에서는 335 nm에서 가장 강한 특성 피크를 나타내었고 그리고 이러한 특성 피크는 농도의 증가와 더불어 고농도에서는 339 nm로 이동하였다. 이러한 특성 피크의 강도비를 이용하여 HADA의 CAC 값을 구하였다. Figure 6에 나타낸 바와 같이 특성 피크의 intensity ratio인 I_{339}/I_{335} 의 경우 저농도에서는 일정한 값을 보이나 농도의 증가와 더불어 급격한 증가 현상을 보이게 된다. 일반적으로 intensity ratio의 급격한 증가가 일어나

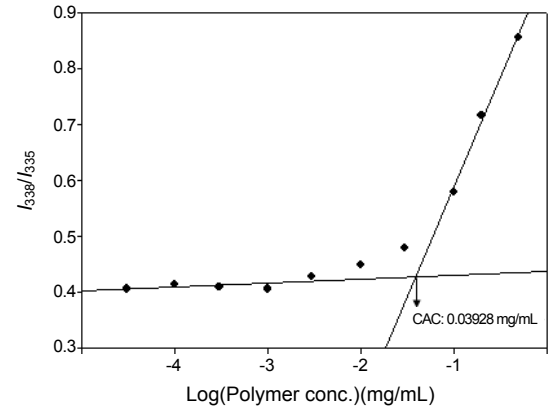
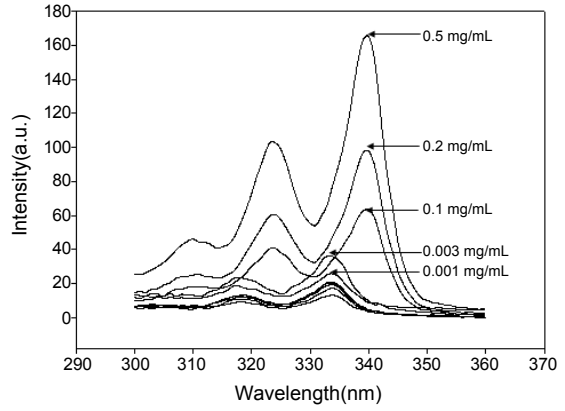


Figure 6. Pyrene excitation spectra ($[Py]=6.0 \times 10^{-7} M$) in HADA self-aggregate aqueous solution (emission wavelength was 390 nm).

는 지점을 CAC 값으로 설정한다. 따라서 Figure 6의 결과를 이용하여 측정된 CAC은 0.039 mg/mL이었다.

파클리탁셀이 봉입된 HADA 나노입자 분석. 양친성 물질 또는 양친성 나노입자를 이용하여 소수성 약물을 담지하는 경우 소수성 약물의 선택적인 소수성 나노입자 내부로의 침투를 통하여 이루어진다. 약물을 나노입자에 담지시키는 방법으로는 용매증발법(solvent evaporation method), 투석법 등이 주로 사용되고 있다. 본 실험에서는 용매증발법과 투석법을 병행하여 나노입자를 제조하였다. 파클리탁셀이 담지된 히알루론산 나노입자를 HPLC를 이용한 분석을 통하여 약물의 봉입효율 및 담지량을 측정하였다. 파클리탁셀 및 HADA 나노입자에 봉입된 파클리탁셀이 동일한 HPLC 분석 조건하에서 동일한 retention time 및 피크의 형태를 보였다. 또한 나노입자 내부의 약물 담지량을 측정하기 위하여 순수한 파클리탁셀을 이용하여 검량선을 얻었다. 이 결과는 Figure 7에 나타냈으며, Figure 7에서 볼 수 있듯이 0.1~0.001 mg/mL의 범위에서 직선 형태의 검량선을 형성함을 확인할 수 있었다. 파클리탁셀이 담지된 히알루론산 나노입자 내의 파클리탁셀의 농도는 Figure 7의 사각형 점으로 표시되었으며, 이 결과를 바탕으로 계산된 파클리탁셀의 봉입 효율 및 봉입량은 각각 40%, 8.9%이었다.

파클리탁셀이 담지된 나노입자의 세포독성 실험 결과는 Figure 8에 나타냈다. Figure 8에서 볼 수 있듯이 상대적으로 낮은 농도에서는 암

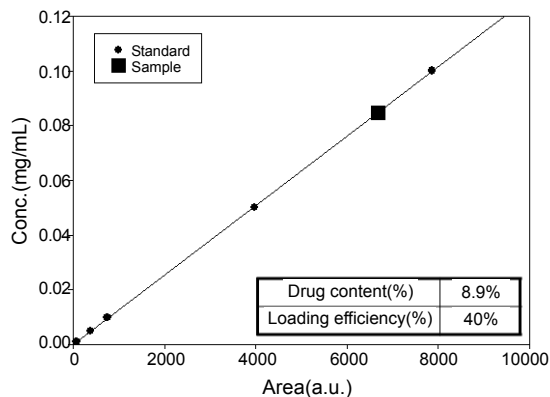


Figure 7. HPLC standard curve of paclitaxel(circle) and paclitaxel in HADA(square).

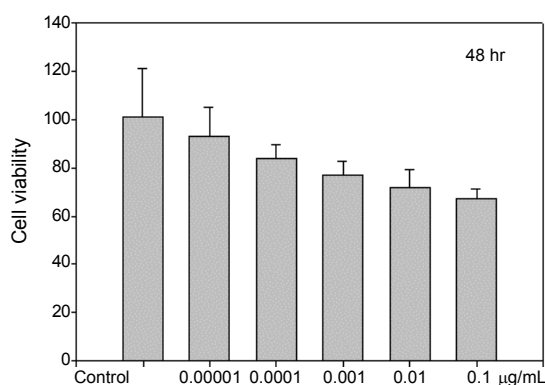


Figure 8. In vitro cytotoxicity test (KB cell).

세포인 KB 세포에 대한 독성이 대조군과 거의 비슷한 수준이었으나 농도가 증가함에 따라 세포의 생존율이 감소하는 것을 확인함으로써 본 실험의 나노입자가 항암제 전달체로 응용이 가능할 것으로 사료된다.

결론

생체친화적 고분자인 히알루론산에 ADH를 치환시킨 후 소수성 그룹인 디옥시콜산을 도입하여 HADA를 합성하였으며 FTIR, ¹H NMR 등을 이용하여 화학적 구조를 규명함으로써 각각의 화합물이 성공적으로 합성되었음을 확인할 수 있었다. 합성된 HADA는 수용액 상에서 나노입자를 제조하여 특성을 관찰한 결과 투과전자현미경 이미지로부터 구형의 나노입자가 형성됨을 확인하였으며 동적산란기를 이용한 나노입자의 크기 및 분포는 250 nm의 좁은 크기 분포를 갖는 나노입자가 제조되었음을 확인할 수 있었다. 파클리탁셀이 봉입된 나노입자 내의 약물 봉입효율 및 담지량은 HPLC를 통하여 분석하였으며 그 결과 각각 40%, 8.9%임을 확인할 수 있었다. 또한 파클리탁셀이 담지된 나노입자를 이용한 세포독성 실험을 통하여 디옥시콜산이 결합된 히알루론산 나노입자가 암세포의 세포 생존율을 감소시키는 것을 확인하였다. 이상의 결과는 본 실험에서 합성된 HADA는 소수성 약물전달체로 응용 가능성을 보여주고 있다.

참고 문헌

1. X. Y. Wu and P. I. Lee, *J. Appl. Polym. Sci.*, **77**, 833 (2000).
2. T. C. Laurent, *Wenner-Gren International Series*, Portland Press, London, Vol **72** (1998).
3. G. D. Prestwich, D. M. Marecak, and J. F. Marecek, *J. Control. Release*, **53**, 93 (1998).
4. Y. Luo, K. R. Kirker, and G. D. Prestwich, *J. Control. Release*, **69**, 169 (2000).
5. S. N. Park, H. J. Lee, and H. Suh, *Biomaterials*, **22**, 1205 (2002).
6. S. N. Park, H. J. Lee, and H. Suh, *Biomaterials*, **24**, 1631 (2003).
7. H. S. Nam, J. H. Kim, J. H. An, and D. J. Jung, *Polymer(Korea)*, **25**, 476 (2001).
8. J. A. Hunt, H. N. Joshi, V. J. Stella, and E. M. Topp, *J. Control. Release*, **12**, 159 (1990).
9. L. Benedetti, R. Cortivo, T. Berti, F. Pea, M. Marzzo, M. Moras, and G. Abatangelo, *Biomaterials*, **14**, 1154 (1993).
10. J. Aigner, J. Tegeler, P. Hutzler, D. Campoccia, A. Pavesio, C. Hammer, E. Kastenbauer, and A. Naumann, *J. Biomed. Mater. Res.*, **42**, 172 (1998).
11. G. P. Chen, Y. Ito, Y. Imanishi, A. Magnani, S. Lamponi, and R. Barbucci, *Bioconjugate Chem.*, **8**, 730 (1997).
12. S. K. Hahn, E. J. Oh, H. Miyamoto, and T. Shimbouji, *Int. J. Pharm.*, **322**, 44 (2006).
13. S. K. Hahn, J. K. Park, T. Tomimatsu, and T. Shimbouji, *Int. J. Bio. Macromol.*, **40**, 374 (2007).
14. Y. K. Ko, S. H. Kim, J. S. Seong, J. Y. Lim, and G. Khang, *Polymer(Korea)*, **31**, 505, (2007).
15. S. J. Kim, S. K. Hahn, M. J. Kim, D. H. Kim, and Y. P. Lee, *J. Control. Release*, **104**, 323 (2005).
16. Y. Luo, K. R. Kirker, and G. D. Prestwich, *J. Control. Release*, **69**, 169 (2000).
17. E. J. Oh, J. S. Kim, and S. K. Hahn, *Key Engineering Materials*, **342**, 525, (2007).
18. F. Palumbo, G. Pitarresi, D. Mandracchia, G. Tripodo, and G. Giammona, *Carbohydr. Polym.*, **66**, 379 (2006).
19. B. Agellon and E. C. Torchia, *Biochim. Biophys.*, **1386**, 198 (2000).
20. I. R. Hong and Y. J. Kim, *Polymer(Korea)*, **32**, 561 (2008).
21. Y. Chang, S. C. Lee, K. T. Kim, S. D. Reeves, and H. R. Allcock, *Macromolecules*, **20**, 1331 (1987).
22. W. Binana-Limbele and R. Zana, *Macromolecules*, **20**, 1331 (1987).
23. B. Magny, I. Iliopoulos, R. Zana, and R. Audebert, *Langmuir*, **10**, 3180 (1994).