

N-아세틸화 글리콜 키토산의 합성과 온도감응성 졸-젤 전이 특성

유호선* · 조명옥*** · 조익성* · 이정정**** · 김남홍**** · 장미경**** · 강선웅***** · 허강무*†

*충남대학교 고분자공학과, **안전성평가연구소, ***천진과학기술대학교,
****순천대학교 고분자공학과, *****과학기술연합대학원대학교 인체 및 환경 독성학과
(2015년 12월 19일 접수, 2015년 12월 30일 수정, 2015년 12월 31일 채택)

Synthesis of N-Acetylated Glycol Chitosans and Their Thermo-sensitive Sol-Gel Transition Properties

Ho Seon You*, Myeong Ok Cho***, Ik Sung Cho*, Zhengzheng Li****, , Nam-Hong Kim****, Mi-Kyeong Jang****, Sun-Woong Kang*****, and Kang Moo Huh*†

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

**Next-generation Pharmaceutical Research center, Korea Institute of Toxicology, Daejeon 34114, Korea

***College of Chemical Engineering and Material Science, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300-457, China

****Dept. Polymer Science and Engineering, Suncheon National University, 255 Jungangdong, Suncheon, Jeonnam 57922, Korea

*****Human and Environmental Toxicology Program, University of Science and Technology, Daejeon 34113, Korea

(Received December 19, 2015; Revised December 30, 2015; Accepted December 31, 2015)

초록: 본 연구에서는 수용성 천연고분자인 글리콜 키토산의 N-아세틸화를 통해 새로운 천연고분자 기반의 온도감응성 고분자를 합성하고, 온도감응성을 평가하였다. 글리콜 키토산의 N-아세틸화 반응을 통해 글리콜 키토산 구조의 고분자를 성공적으로 합성하였고, 수용액 상에서 37°C 주변에서 온도감응성 졸-젤 전이현상이 효과적으로 일어남을 확인하였다. 이러한 졸-젤 전이 특성은 기존의 합성고분자 기반 온도감응성 고분자에 비해 상대적으로 더 낮은 농도(3~16 wt%)에서 보였고, 고분자의 분자량, 아세틸화도, 농도를 변화시킴으로써 효과적으로 조절될 수 있었다. 글리콜 키토산은 우수한 온도감응성 뿐 아니라 낮은 세포독성과 향상된 젤 안정성을 보임으로써, 약물전달, 조직공학, 3차원 세포배양 등 다양한 생체의료용 응용분야에 유용하게 활용될 수 있을 것으로 전망된다.

Abstract: In this study, new polysaccharide-based thermo-sensitive polymers were synthesized and their thermo-sensitive sol-gel transition properties were evaluated. Glycol chitin structures were successfully introduced by N-acetylation reaction of glycol chitosan. The aqueous solutions of glycol chitins demonstrated unique thermo-sensitive sol-gel transition behaviors around 37 °C. Their sol-gel transition properties were observed at a relatively lower concentration range (3~16 wt%) compared to those of typical synthetic polymer based systems and efficiently modulated by varying molecular weight, DA, and concentration. Based on their thermo-sensitivity, low cyto-toxicity, and high gel stability, the glycol chitin polymers could be utilized for various biomedical applications, such as drug delivery, tissue engineering, and 3D cell culture.

Keywords: glycol chitosan, N-acetylation, sol-gel transition, thermo-sensitive hydrogel.

서 론

졸-젤 전이 거동을 보이는 온도감응성 하이드로젤은 기존의 화학적 가교에 의한 하이드로젤의 단점을 극복할 수 있는 다양한 장점 때문에 스마트 생체재료로서 다양한 응용분야에

서 주목받고 있다.^{1,2} 유동성 액체인 졸 상태에서 체내로 주입하여 고형의 하이드로젤을 형성하는 온도감응성 하이드로젤은 복잡하고 불규칙적 형태의 신체 적용부위에도 외과적 수술 없이 간단한 주입형으로 적용이 가능하다. 이러한 국소주입에 의한 투여는 특정 부위에서 약물 방출이 이루어지면서 전달 효율을 증가시킬 뿐 아니라 약물에 의한 부작용도 감소시킬 수 있다.³ 또한 졸 상태에서 간단한 물리적 혼합만으로도 다양한 약물이나 세포를 담지할 수 있어 약물전달시스템 뿐만 아니라 조직공학, 세포치료제, 3차원 세포배양 등 다양

†To whom correspondence should be addressed.

E-mail: khuh@cnu.ac.kr

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

한 응용분야에서 유용하게 적용될 수 있을 것으로 전망된다.^{1,3}

졸-겔 전이를 보이는 온도감응성 하이드로겔의 제조를 위해 사용되는 대표적인 고분자로는 poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAAm) 기반 공중합체와 poly(ethylene glycol)(PEG) 기반 블록공중합체로 나눌 수 있다. PNIPAAm은 1960년대에 처음으로 온도감응성이 보고된 이후로 가장 많이 연구되어 온 자극응답성 고분자이다.⁴ 32°C 근처에서 급격한 상전이 현상을 보이는 PNIPAAm은 온도감응성의 조절 및 다양한 응용을 위해 수많은 형태의 공중합체들이 합성되고, 스마트 생체재료로서 활용된 많은 보고가 있어왔다. 하지만, 우수한 온도감응성 및 광범위한 응용성에도 불구하고 비분해성과 세포독성이라는 본질적인 문제로 인해 생체재료로서의 활용에 제한이 있어 왔다.^{4,6}

PEG 기반 블록공중합체의 대표적인 예로는 폴록사머(poloxamer)로 알려진 PEG와 poly(propylene glycol)(PPG)의 블록공중합체와 PEG와 생분해성 폴리에스터계의 블록공중합체가 있다. PEG-PPG-PEG 삼중블록공중합체인 폴록사머는 일정 농도 이상의 수용액 상에서 온도감응성 졸-겔 전이를 나타내며 낮은 독성과 생체적합성 때문에 주입형 약물 전달시스템으로 광범위하게 연구되었다.^{7,8} 하지만, 생분해성이 없고, 생체 내에서 혈장 콜레스테롤과 트리글리세리드를 유발하는 등의 부작용이 보고되었다. 또한 온도감응성 젤 형성을 위해서 매우 높은 농도(최소 20 wt% 이상)를 필요로 할 뿐 아니라, 안정성이 매우 취약하여 폴록사머 자체로서는 생체재료로서의 응용에 제한이 있다.^{6,8,9} PEG와 생분해성 폴리에스터계의 블록공중합체로 이루어진 하이드로겔은 생분해성이 우수할 뿐 아니라, polylactide, poly(lactide-co-glycolide), poly(ϵ -caprolactone) 등 다양한 생분해성 폴리에스터계 고분자들이 적용 가능하여 다양한 물성을 구현할 수 있는 장점이 있다. 반면, 여전히 젤 형성을 위해 고농도가 필요하고, 세포와의 친화성이 떨어진다는 단점들이 보고되어 왔다.^{10,11}

한편, 알지네이트, 히알루론산, 텍스트란, 키토산 등의 천연 고분자는 뛰어난 생체적합성과 생분해성을 기반으로 생체재료로서 많은 연구가 되어 왔으나,^{12,13} 온도감응성을 보이는 천연 고분자 기반의 하이드로겔에 대한 연구는 많이 보고되지 않았다. 키토산은 다당류 공중합체로서 항박테리아성, 생분해성, 생체적합성, 점막접착성 등의 다양한 생기능성이 보고되어, 다양한 응용분야에서 활발히 연구되고 있는 생체재료이다.^{14,20} 키토산 기반의 온도감응성 하이드로겔 시스템으로는 키토산과 글리세롤-인산염(glycerol phosphate disodium salt, GP)의 혼합물로 상온의 중성 수용액에서는 졸 상태로 존재하며 온도가 상승함에 따라 졸-겔 전이를 보인다.²¹⁻²³ 하지만, 이러한 온도 감응성 하이드로겔 시스템은 글리세롤-인산염의 과다사용과 더불어 복합물 형태로서의 온도감응성에 기인한 사용의 제한이 존재한다.^{3,14,23,24} 고분자 자체적으로 온도감응성 졸-겔 전이 특성을 갖는 것으로 보고된 천연고분자로는 셀

룰로오스 유도체가 있으나, 온도감응성의 범위가 40°C 이상으로 생체재료로서의 활용이 어렵다.²⁵

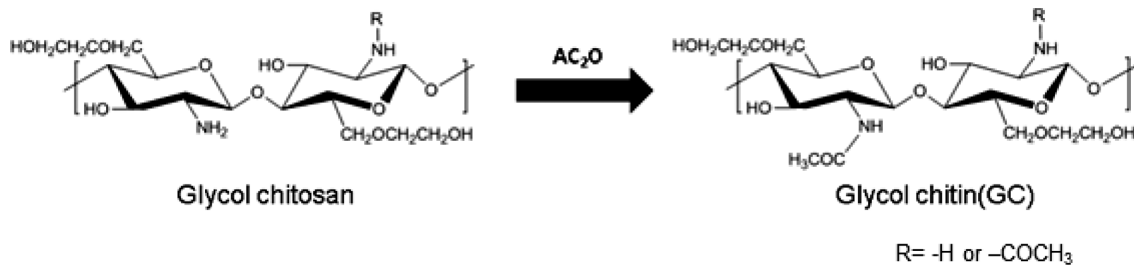
본 연구그룹은 글리콜 키토산의 아세틸화 반응을 통해 글리콜 키틴 구조를 도입함으로써 생체 온도 하에서 온도감응성 졸-겔 전이를 보이는 하이드로겔을 제조할 수 있다는 것을 보고하였다.¹⁴ 글리콜 키틴은 수용성이며, 키토산의 무독성, 생분해성, 생체적합성 등의 특성을 잘 유지하는 것으로 알려졌다.²⁶ 천연고분자 기반의 본 하이드로겔은 기존의 합성 고분자 기반의 하이드로겔 시스템보다 상대적으로 낮은 농도(5~7 wt%)에서도 안정한 온도감응성을 보일 수 있으며, 치환율과 농도에 따라 물리화학적 특성을 조절할 수 있고, 세포독성이 낮다는 장점이 있어 생체재료로서 다양한 분야에서 유용하게 응용될 수 있을 것으로 기대된다.^{14,19} 한편, 온도감응성 고분자의 온도감응 및 물리화학적 특성은 화학적 구조, 분자량, 농도 등 다양한 내외부적 환경 인자들에 의존하는 것으로 알려져 왔다.^{3,14,16,17,19,23,27} 본 연구에서는 온도감응성 및 생체적합성 고분자로서 뛰어난 장점을 가지고 있는 글리콜 키틴의 생체재료로서의 활용을 위해 다양한 조건하에서의 온도감응성을 관찰하고, 각 조절인자와 온도감응성과의 상호관계를 분석하기 위한 연구를 진행하였다. 특히 고분자 자체의 특성에 의존한 온도감응성을 이해하기 위해 서로 다른 치환율, 농도 뿐만 아니라 저분자량의 글리콜 키틴의 합성을 통해 고분자의 분자량이 온도감응성 및 물리화학적 특성에 미치는 영향에 대하여 알아보려고 하였다.

실 험

시약 및 시료. 글리콜 키토산(DP \geq 400)은 Wako Pure Chemical Industries(일본)에서 구입하였다. 아세틸화 반응을 위한 무수초산(Ac₂O)은 Sigma-Aldrich(미국)에서, 용매로 사용한 메탄올과 아세톤은 (주)삼전화학(한국)에서 구입하였다. 과산화칼륨(KPS)은 Shinyo Pure Chemical Co., Ltd.(일본)에서, 수소화붕소나트륨(NaBH₄), 염산(HCl), 수산화나트륨(NaOH, 1 M)은 (주)삼전화학(한국)에서 구입하였다.

글리콜 키틴 합성. Scheme 1에서와 같이 글리콜 키토산의 *N*-아세틸화 반응을 통해 글리콜 키틴을 제조하였다. 글리콜 키토산 1 g을 증류수와 메탄올의 부피 비가 1:1인 혼합용매 300 mL에 녹였다. 빠른 교반 하에서 무수초산을 천천히 첨가한 후 상온에서 2일 동안 교반과 함께 반응시킨 후, 아세톤 1 L에 침전시키고, 4°C의 냉장고에서 2일 동안 보관하였다. 침전된 물질을 원심분리기로 분리 및 수거 후 2일간 투석막(MWCO, 12~14 kDa)을 이용하여 증류수로 투석하였다. 최종적으로 3~4일 동안의 동결건조를 통해 파우더 형태의 글리콜 키틴을 얻었다.

저분자량 글리콜 키틴 합성. 글리콜 키토산의 아세틸화 반응에 앞서 저분자량의 글리콜 키토산을 얻기 위해 보고된 문



Scheme 1. Synthetic scheme for *N*-acetylation of glycol chitosan.

현을 참조하여 글리콜 키토산의 가수분해 실험을 수행하였다.²⁶ 시작하기에 앞서, 둥근 플라스크와 콘테서를 설치 후 항온조를 이용하여 70 °C를 유지했다. 0.8%(v/v)의 HCl 수용액 100 mL에 글리콜 키토산 1 g을 녹인 후 KPS 9 mg을 첨가하고 70 °C에서 8시간 교반하였다. 교반 후 반응물을 상온에서 식힌 후, NaBH₄ 125 mg을 첨가하고 30분 동안 교반하였다. NaOH를 이용하여 pH를 7.4에 맞추었으며 투석막(MWCO, 10000 Da)을 이용하여 2일간 증류수에서 투석하였다. 동결건조를 통해 파우더 형태의 저분자량의 글리콜 키토산을 얻은 후 글리콜 키틴 합성과 동일한 방법을 통해 저분자량의 글리콜 키틴을 합성하였다.

고분자 분석. 고분자의 화학적 조성변화를 ¹H NMR과 ATR-FTIR 분석을 통해 관찰하였다. ¹H NMR 스펙트럼은 600MHz NMR(AVANCE III 600 spectrometer, Bruker, 독일)을 이용하여 32회 스캔을 통해 얻었다. 고분자 시료를 1.0 wt%의 농도로 D₂O에 녹여 측정하였다. 아세틸화도는 δ 3.55의 글루코피라노실링 수소와 δ 1.88의 아세틸기의 메틸 수소에 해당하는 피크 넓이를 비교하여 분석하였다. ATR-FTIR(Nicolet iS 5, Thermo Scientific, 미국) 스펙트럼은 4 cm⁻¹의 분해능에서 16회 스캔을 통해 얻었다. 합성된 글리콜 키틴의 절대 분자량과 분자량 분포(PDI)는 multi-angle laser light scattering detector(GPC-MALLS, 18 angle detector)가 장착된 젤투과크로마토그래피를 통해 측정하였다. 시료는 증류수에 녹였으며 주입 부피는 0.2 mL(10 mg/mL), 이동상의 유속은 0.5 mL/min이었다. 굴절률의 변화(dn/dc)는 Pot-LAB reflectometer(Wyatt, 미국)를 통해 측정하였다. 기준 물질로는 poly(ethylene glycol)을 사용하였다.

젤 젤 상전이 온도 측정. Tube inverting method를 통해 글리콜 키틴의 졸-젤 전이 온도를 측정하였다. 합성된 글리콜 키틴을 다양한 농도 조건으로 증류수에 녹인 후 4 °C 하에서 하루 이상 보관하였다. 고분자 수용액을 0.5 °C/min의 속도로 승온하면서 졸-젤 전이현상을 관찰하였다. 졸-젤 전이온도는 바이알을 뒤집어 30초 후에도 흐름이 관찰되지 않는 온도로 정의하였다.

유변학적 특성 분석. 유변학적 특성은 온도조절기가 장착된 rotating rheometer(TA Instruments, AR 1500ex)를 통해

분석하였다. 시료는 1000 μm의 간격을 두고 있는 반경 20 mm의 두 평판 사이에 놓았다. 승온 속도 1 °C/min, 온도 범위 0~50 °C에서 진동수를 1 Hz로 고정하고 25 Pa의 일정한 힘으로 측정하였다.

젤 안정성 평가. 젤 안정성 평가를 위한 조건은 보고된 문헌을 참조하여 수행하였다.²⁸ 2 mL의 글리콜 키틴 수용액을 바이알에 넣고, 38 °C의 인큐베이터 내에서 정치하였다. 20분 후 같은 온도의 증류수 동량을 첨가하여 인큐베이터에 정치하였으며 매일 증류수를 교환하였다. 이때, 24시간 마다 잔류하는 젤의 질량과 부피를 측정하여 각각 처음 젤의 질량 및 부피를 비교하여 백분율로 환산하여, 시간에 따른 변화를 관찰하였다.

형태학적 관찰. 액체질소를 통해 급냉한 하이드로젤을 동결건조하여 관찰할 시료를 준비하였다. 건조된 시료는 20 mA에서 스퍼터링 방식을 통해 60초간 플라티넘으로 코팅한 후 장방출 주사전자현미경 II(냉전계형)(S-4800, Hitachi, 일본)를 사용하여 10.0 KV에서 하이드로젤의 단면을 관찰하였다.

세포독성 평가. 고분자의 직접 접촉 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, 얇은 필름 형태(1×1 cm²)로 제조된 하이드로젤을 배양접시 중앙에 올려 세포와 접촉하도록 한 후 24시간 동안 배양하였다. 하이드로젤 필름과 배양된 세포를 헤마톡실린(Hematoxylin, Sigma)으로 염색하였고, 독성반응 영역은 ImageJ 소프트웨어를 사용하여

Table 1. Reactivity Grades for Direct Contact Cytotoxicity²⁵

| 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 |

계산하였다. 양성대조군으로는 0.1%의 zinc diethyldithiocarbamate를 포함하는 polyetherurethane(PU-ZDEC, Hatano Research Institute, 일본) 필름을 사용하였으며, 독성반응 영역의 크기로 독성의 정도를 분류하였다(Table 1).²⁹

결과 및 토론

글리콜 키토산의 합성 및 구조. 높은 N-아세틸화도를 갖는 글리콜 키토산을 합성하기 위해 상대적으로 많은 양의 무수초산을 이용하여 반응을 진행하였다. 앞선 연구에서 글리콜 키토산은 약 87% 이상의 아세틸화도를 가질 때 우수한 온도감응성을 보이는 것으로 확인되었다.¹⁴ 따라서 본 연구에서는 87% 이상의 아세틸화도를 갖는 고분자를 합성하고자 하였고, 글리콜 키토산의 아민기 대비 무수초산의 양이 최소 10배에서 최대 50배 이상일 때 해당하는 치환율을 얻을 수 있었다. 자세한 합성 조건과 결과를 Table 2에 요약하였다. 본 연구에서는 아세틸화도와 분자량대가 서로 다른 4가지 고분자 시료를 제조하여 비교하였다.

Figure 1은 글리콜 키토산 및 글리콜 키토산의 ¹H NMR 스펙트럼을 나타낸 것이다. 아세틸화 반응 후 글리콜 키토산의 스펙트럼에서 명확하게 보이는 아민 수소의 피크(δ 2.7)가 글리콜 키토산의 스펙트럼에서는 거의 사라지고, 아세틸기 수소의 피크(δ 2.0)가 크게 증가한 것을 통해 N-아세틸화 반응이 성공적으로 이루어졌음을 확인할 수 있었다. 아세틸화도 분석을 위해 글루코피라노실링 수소와 아세틸기의 메틸 수소 피크의 넓이를 비교한 결과, GC1과 L-GC1이 각각 87.4%, 86.8%로 서로 유사하고, GC2와 L-GC2가 각각 89.6%와 89.1%로 서로 유사한 아세틸화도를 갖는 것을 확인할 수 있었다. 글리콜 키토산과 글리콜 키토산의 분자 구조는 ATR-FTIR 분석(Figure 2)을 통해서도 확인할 수 있었다. O-H와 N-H의 신축 진동은 3400 cm⁻¹에 걸쳐 피크가 넓게 분포되어 있다. 2890 cm⁻¹ 근방의 피크는 메틸렌과 메틸기의 C-H 신축진동에 기인한다. 아세틸화반응 후에는 글리콜 키토산의 아민기의 굽힘 진동피크(1596 cm⁻¹)가 감소하면서 카보닐기의 신축진동(1655 cm⁻¹)과 아마이드기의 굽힘진동(1555 cm⁻¹) 피크가 증가

Table 2. Chemical Data of Glycol Chitins

| Sample | Ac ₂ O:NH ₂ ^a | DA(%) ^b | Yield(%) |
|-----------------|--|--------------------|----------|
| Glycol chitosan | - | 9.4 | - |
| GC1 | 10:1 | 87.4 | 84.8 |
| GC2 | 25:1 | 89.6 | 69.7 |
| L-GC1 | 25:1 | 86.8 | 91.3 |
| L-GC2 | 50:1 | 89.1 | 85.9 |

^aFeed molar ratio of Ac₂O to the amino group of glycol chitosan.
^bDegree of N-acetylation determined by the peak integration of ¹H NMR spectra.

함을 통해 글리콜 키토산이 성공적으로 합성되었음을 확인할 수 있었다. 또한 고분자량과 저분자량의 글리콜 키토산의 NMR 및 IR 스펙트럼을 비교한 결과, 각 스펙트럼의 모양과 피크의 위치가 동일하였다. 이를 통해 글리콜 키토산을 분해하는 과정에서 분자구조에 의미있는 변화는 없다는 것을 확인할 수 있었다. GPC를 통해 측정된 수평균 분자량은 고분자량과 저분자량의 글리콜 키토산은 각각 74360 g/mol(PDI 2.1), 39230 g/mol(PDI 1.2)이었다.

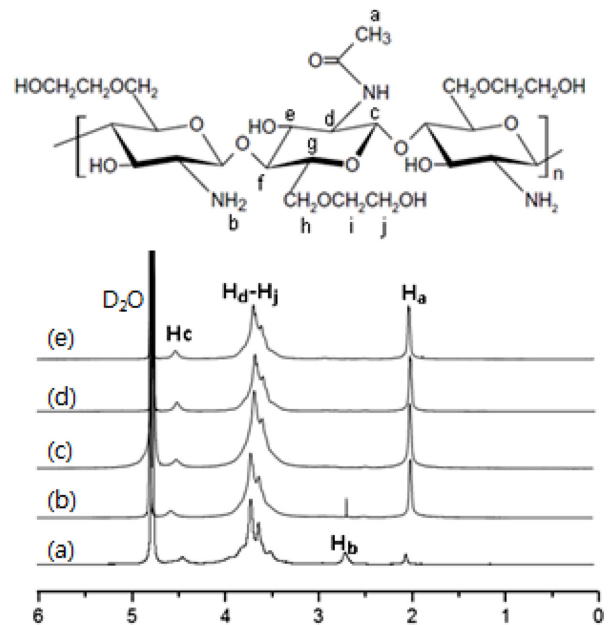


Figure 1. ¹H NMR spectra of (a) glycol chitosan; (b) GC1; (c) GC2; (d) L-GC1; (e) L-GC2.

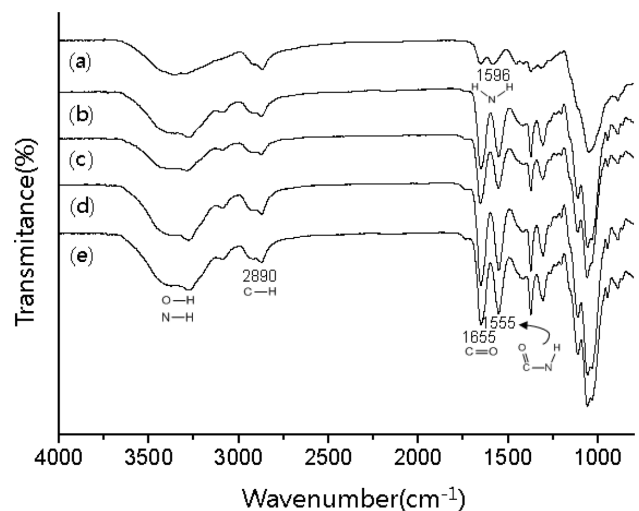


Figure 2. ATR-FTIR spectra of (a) glycol chitosan; (b) GC1; (c) GC2; (d) L-GC1; (e) L-GC2.

졸-젤 상전이 거동. 졸-젤 전이 거동을 tube inverting method를 통해 직접 관찰하였고, 그 결과를 Figure 3에 나타냈다. 글리콜 키토산 수용액은 온도에 상관없이 어떠한 온

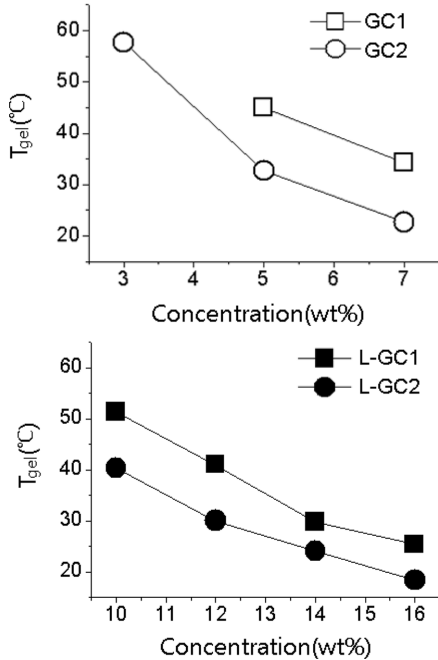


Figure 3. Sol-gel transition temperatures measured by tube inverting method.

도감응 특성을 보이지 않는 반면에, 글리콜 키틴은 분자량뿐만 아니라 농도, 아세틸화도에 따라 서로 다른 온도감응성을 보였다. 두 종류의 분자량 모두 글리콜 키틴에서는 농도와 아세틸화도가 높을수록 더 강한 온도감응성을 보였고, 같은 농도 조건에서 아세틸화도가 높을수록 상대적으로 낮은 온도에서 졸-젤 전이가 관찰되었다. 이는 아세틸화도가 높을수록 소수성이 커져 온도가 증가함에 따라 소수성 상호작용이 더욱 효과적으로 일어나기 때문일 것으로 사료되고, 이는 소수성 상호작용에 기반한 온도감응성 고분자에서 일반적으로 관찰되는 현상이다. 농도가 증가하는 경우 고분자의 물리적 가교가 더 증가되어 졸-젤 전이 온도가 더 낮은 온도에서 관찰될 수 있다. 한편, 분자량이 다른 GC와 L-GC 샘플을 비교해 보면 GC의 경우 5~7 wt%의 농도에서 졸-젤 전이가 관찰되는 반면, 저분자량인 L-GC 샘플들의 경우 10~16 wt% 농도범위에서 졸-젤 전이가 관찰되는 것을 알 수 있었다. 저분자량의 글리콜 키틴의 경우 유효한 온도감응성을 보이기 위해서는 상대적으로 보다 높은 농도가 필요하다는 것으로, 분자량이 온도감응성에 매우 중요한 인자임을 알 수 있다. 고분자 사슬 분자량은 사슬얽힘(chain entanglement) 현상에 직접적으로 영향이 있으며, 분자량이 클수록 사슬얽힘의 증가에 기인하여 젤 형성이 더 유리한 것으로 사료된다. 비슷한 아세틸화도를 가진 샘플을 비교할 때 분자량이 낮은 고분자는 비슷한 온도범위에서 온도감응성을 보이기 위하여 약 2배 농도를 요구하였다.

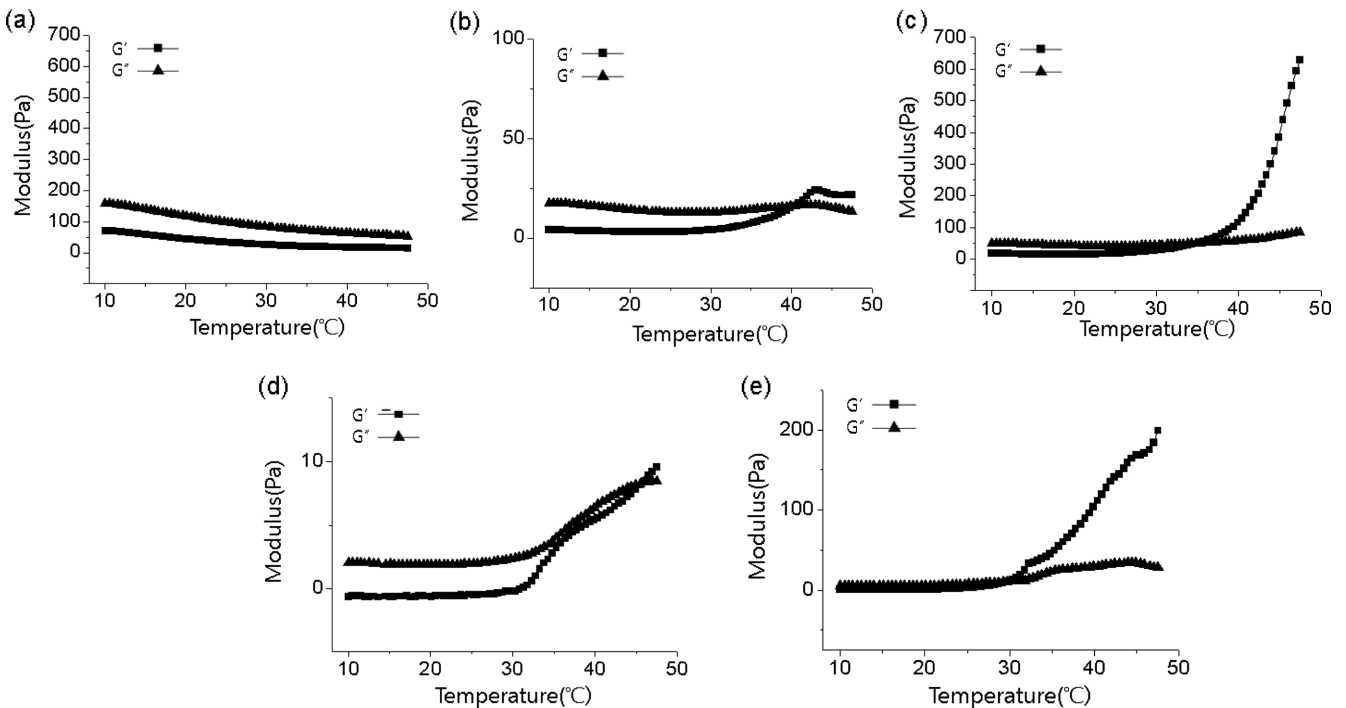


Figure 4. Temperature dependent rheological behavior of (a) glycol chitosan (5 wt%); (b) GC1 (5 wt%); (c) GC2 (5 wt%); (d) L-GC1 (12 wt%); (e) L-GC2 (12 wt%).

Figure 4는 레오미터를 이용하여 글리콜 키토산, GC, L-GC의 유변학적 특성을 분석한 결과이다. GC와 L-GC를 증류수에 각각 5와 12 wt%로 녹인 후 온도의 상승에 따른 저장 탄성률(storage modulus, G')과 손실 탄성률(loss modulus, G'')의 변화를 측정하였다. 아세틸화 반응을 하지 않은 글리콜 키토산 수용액은 측정 온도 범위 내에서 특별한 온도 의존성 변화를 보이지 않는 반면, GC와 L-GC의 경우 일정 온도 이상에서 G' 값이 급격히 상승하면서 G'' 값과 교차하는 것을 알 수 있었다. 레오미터를 통해 측정한 졸-겔 전이 거동은 tube inverting method를 통해 측정한 결과와 비슷한 경향을 보였다. 또한 같은 분자량대의 글리콜 키토산은 치환율이 높을수록 하이드로젤의 탄성이 보다 크게 증가하였다. 또한 비슷한 치환율에서는 분자량이 높을수록 낮은 농도에도 불구하고 하이드로젤의 탄성이 증가하는 경향을 보였다.

겔 안정성. 온도감응성 하이드로젤의 안정성은 실제 생체 응용 시 매우 중요한 물성이다. 기존의 합성고분자 기반의 하이드로젤은 겔 형성이 용이하지만, 낮은 안정성으로 인해 희석 상태에 노출이 되면 바로 겔의 용해가 일어나는, 적용 조건에 따라 수 시간에서 수 일 이내에 모든 하이드로젤이 분해되어 사라진다.^{30,31} Figure 5는 시간에 따라 하이드로젤의 잔류 상태를 잔류량과 잔류부피로 관찰한 결과이다. 생체조건 근방에서 온도 감응성을 보이는 농도에서 서로 다른 치환율과 분자량을 가진 하이드로젤을 제작하여 겔 안정성을 비교하였다(Figure 5(a) and 5(b)). 대부분 하이드로젤은 하루가 지나서부터 부피와 무게가 미소하게 감소하기 시작하면서, 분자량, 치환율, 농도에 의존하여 6~9일 동안 서서히 겔 분해가 이루어 지는 것을 확인하였다. 비슷한 치환율의 경우, GC 고분자가 더 낮은 농도임에도 불구하고, 저분자량인 L-GC 보다 비슷한 안정성을 보이거나 약간 더 높은 안정성을 보였다. 같은 분자량에서는 치환율이 높을수록 낮은 농도에도 불구하고 하이드로젤이 2~3일 정도 더 유지되었으며 완만한 분해현상을 보였다.

Figure 5의 (c)와 (d)는 GC2와 L-GC2의 농도에 따른 겔 안정성 평가 결과를 보여준다. 고분자량과 저분자량 글리콜 키토산 모두 농도가 증가할수록 더욱 긴 잔류기간과 완만한 감소 거동을 보였다. 고분자량의 글리콜 키토산의 경우 하이드로젤의 농도가 2 wt% 증가했을 때 잔류 기간이 약 3배정도 증가하여 25일 동안까지도 잔류하였으며, 저분자량의 글리콜 키토산은 약 1.5배정도 증가하여 13일 동안 잔류하였다. 결과적으로, 농도와 분자량이 증가할수록 사슬 얽힘과 물리적 가교의 밀도가 크게 증가하여 겔 안정성에 더 큰 기여를 하는 것을 확인할 수 있었다.

하이드로젤의 모폴로지. 다양한 글리콜 키토산의 치환율과 분자량을 고려하여 생체조건 근방에서 하이드로젤을 형성할 수 있는 농도로 샘플을 제작하여 장방출 주사전자현미경 II (냉전계형)을 통해 하이드로젤 단면의 형태를 관찰하였다. 단

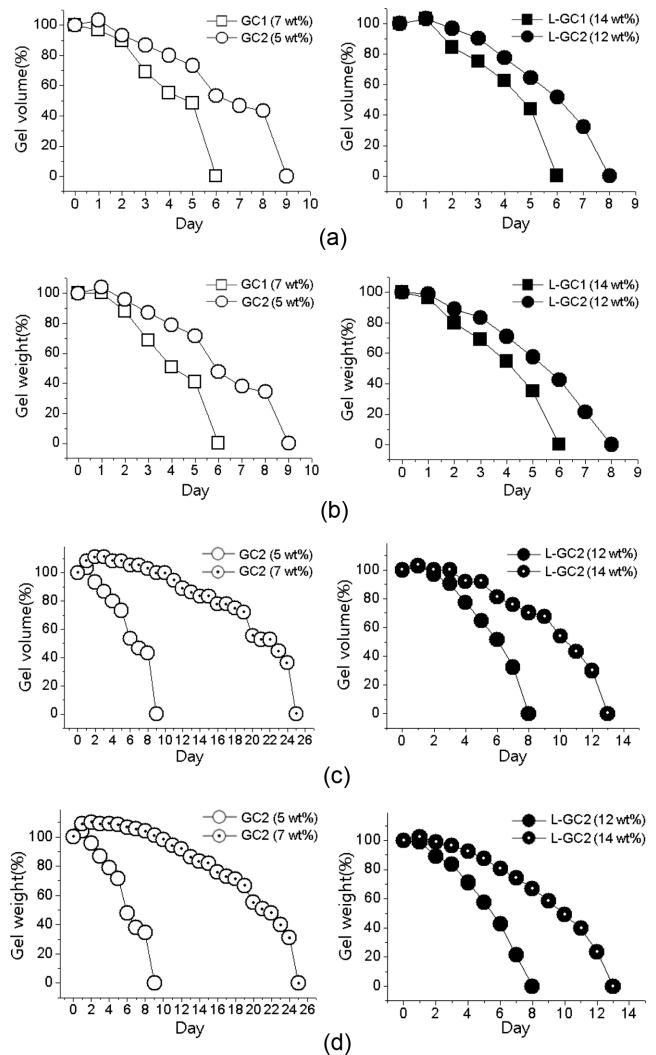


Figure 5. *In vitro* gel stability tests of GC1, GC2, L-GC1, and L-GC2.

면을 관찰한 결과 글리콜 키토산 하이드로젤은 미세 기공이 매우 많이 존재하며 미세 기공간에 3차원적으로 매우 잘 연결되어 있는 것을 관찰할 수 있었다(Figure 6). 비슷한 치환율을 갖는 글리콜 키토산에서는 분자량이 낮은 하이드로젤 기공의 크기가 상대적으로 작은 것을 확인할 수 있었다. 이는 저분자량의 글리콜 키토산이 생체조건 근방에서 온도 감응성을 나타내기 위해서 농도가 2배 이상 증가함에 따라 고분자의 밀도가 증가했기 때문일 것으로 사료된다.

세포독성 평가. 글리콜 키토산의 세포독성은 직접 접촉 세포독성 평가방법을 통해 확인하였다. Figure 7은 직접접촉 세포독성 평가를 통해 얻은 양성 대조군과 글리콜 키토산의 세포독성 영역을 나타낸다. 양성 대조군인 PU-ZDEC는 세포독성이 시료의 크기보다 0.36 cm(±0.04)정도 벗어난 지점까지 영향을 미친 반면, 글리콜 키토산은 고분자량과 저분자량 모두 아

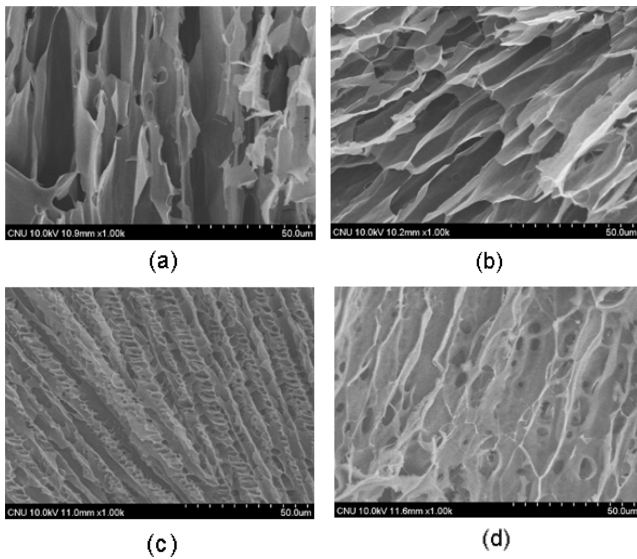


Figure 6. Cross-sectional morphology of glycol chitins: (a) GC1 (7 wt%); (b) GC2 (5 wt%); (c) L-GC1 (14 wt%); (d) L-GC2 (12 wt%).

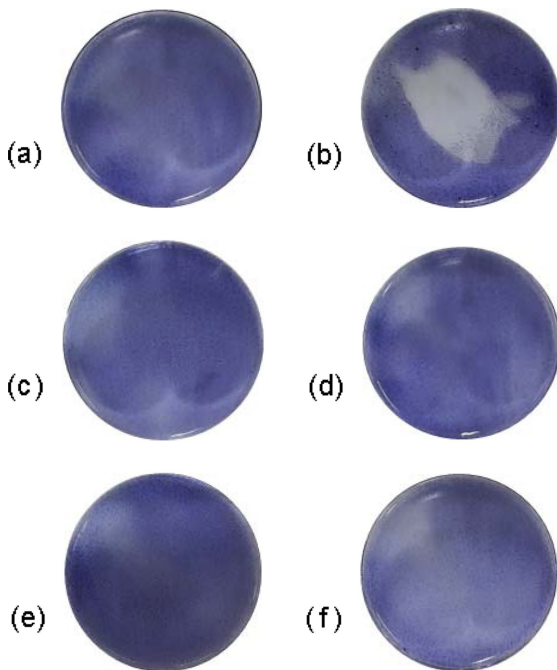


Figure 7. Direct contact cytotoxicity assay: (a) Non-treatment; (b) PU-ZDEC; (c) GC1 (7 wt%); (d) GC2 (7 wt%); (e) L-GC1 (12 wt%); (f) L-GC2 (12 wt%).

무것도 처리하지 않은 non-treatment와 마찬가지로 세포독성 영역이 검출되지 않았다(Table 3). 이를 통해 고분자량과 저분자량의 글리콜 키틴 모두 의미 있는 세포독성을 나타내지 않는 것을 확인할 수 있었다.

Table 3. Direct Contact Cytotoxicity Assay of Glycol Chitins (n=3)

| Smaple | Formed zone size (cm) | Zone index |
|---------------|-----------------------|------------|
| Non-treatment | 0 | 0 |
| PU-ZDEC | 0.36±0.04 | 2 |
| GC1 | 0 | 0 |
| GC2 | 0 | 0 |
| L-GC1 | 0 | 0 |
| L-GC2 | 0 | 0 |

결론

본 연구에서는 글리콜 키틴산의 아세틸화를 통해 새로운 천연고분자 기반 온도감응성 하이드로젤을 합성하고 평가하였다. 서로 다른 분자량과 아세틸화도를 갖는 글리콜 키틴을 합성하였고 온도감응성과 세포독성을 평가하였다. 합성된 고분자의 분자량, 아세틸화도, 분자량은 온도감응성 졸-젤 전이 거동, 유연학적 특성, 젤 안정성 등의 물리화학적 특성에 크게 영향을 주었다. 분자량, 아세틸화도, 농도가 증가할수록 강한 온도감응성에 기인하여 낮은 젤 형성 농도, 낮은 졸-젤 전이 온도, 높은 탄성 및 젤 안정성을 보였다. 본 연구를 통해 단순한 아세틸화 반응을 통해 글리콜 키틴산으로부터 새로운 온도감응성 하이드로젤의 제조가 가능하고, 이러한 하이드로젤의 물성과 온도감응성은 분자량, 아세틸화도, 고분자 농도 등의 조건에 따라 조절이 가능하였다. 글리콜 키틴은 우수한 온도감응성, 낮은 세포독성, 향상된 젤 안정성 등 다양한 장점을 보유함으로써, 약물전달, 조직공학, 3차원 세포배양 등 다양한 생체의료용 응용분야에 유용하게 활용될 수 있을 것으로 전망된다.

감사의 글: 이 연구는 2014년도 충남대학교 학술연구비에 의해 지원되었습니다.

참고 문헌

1. H. J. Moon, D. Y. Ko, M. H. Park, M. K. Joo, and B. Jeong, *Chem. Soc. Rev.*, **41**, 4860 (2012).
2. A. Gandhi, A. Paul, S. O. Sen, and K. K. Sen, *Asian J. Pharm. Sci.*, **10**, 99 (2015).
3. N. Bhattarai, J. Gunn, and M. Zhang, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **62**, 83 (2010).
4. M. Heskins and J. E. Guillet, *J. Macromol. Sci. Chem.*, **2**, 1441 (1968).
5. X. Z. Zhang, Y. Y. Yang, F. J. Wang, and T. S. Chung, *Langmuir*, **18**, 2013 (2002).

6. E. S. Gil and S. M. Hudson, *Prog. Polym. Sci.*, **29**, 1173 (2004).
7. H. W. Huh, L. Zhao, and S. Y. Kim, *Carbohydr. Polym.*, **126**, 130 (2015).
8. M. Radivojša, I. Grabnar, and P. Ahlin Grabnar, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **50**, 93 (2013).
9. A. Chenite, C. Chaput, D. Wang, C. Combes, M. D. Buschmann, C. D. Hoemann, J. C. Leroux, B. L. Atkinson, F. Binette, and A. Selmani, *Biomaterials*, **21**, 2155 (2000).
10. L. Klouda and A. G. Mikos, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **68**, 34 (2008).
11. C. He, S. W. Kim, and D. S. Lee, *J. Control. Release*, **127**, 189 (2008).
12. Y. D. Park, N. Tirelli, and J. A. Hubbell, *Biomaterials*, **24**, 893 (2003).
13. H. C. Chiu, Y. F. Lin, and Y. H. Hsu, *Biomaterials*, **23**, 1103 (2002).
14. Z. Li, S. Cho, I. C. Kwon, M. M. Janát Amsbury, and K. M. Huh, *Carbohydr. Polym.*, **92**, 2267 (2013).
15. J.-K. Park, J.-W. Nah, and C. Choi, *Polym. Korea*, **39**, 480 (2015).
16. Y. I. Jeong, D. G. Kim, M. K. Jang, and J. W. Nah, *Carbohydr. Res.*, **343**, 282 (2008).
17. L. Cui, J. Jia, Y. Guo, Y. Liu, and P. Zhu, *Carbohydr. Polym.*, **99**, 31 (2014).
18. A. Lejardi, R. Hernández, M. Criado, J. I. Santos, A. Etxeberria, J. R. Sarasua, and C. Mijangos, *Carbohydr. Polym.*, **103**, 267 (2014).
19. J. K. Francis Suh and H. W. T. Matthew, *Biomaterials*, **21**, 2589 (2000).
20. M. K. Jang and J. W. Nah, *J. Korean Ind. Eng. Chem.*, **19**, 457 (2008).
21. W. Nie, X. Yuan, J. Zhao, Y. Zhou, and H. Bao, *Carbohydr. Polym.*, **96**, 342 (2013).
22. A. Lejardi, R. Hernández, M. Criado, J. I. Santos, A. Etxeberria, J. R. Sarasua, and C. Mijangos, *Carbohydr. Polym.*, **103**, 267 (2014).
23. Y. Peng, J. Li, J. Li, Y. Fei, J. Dong, and W. Pan, *Int. J. Pharm.*, **441**, 482 (2013).
24. N. Duhem, J. Rolland, R. Riva, P. Guillet, J. M. Schumers, C. Jérôme, J. F. Gohy, and V. Préat, *Int. J. Pharm.*, **423**, 452 (2012).
25. M. C. I. M. Amin, N. Ahmad, N. Halib, and I. Ahmad, *Carbohydr. Polym.*, **88**, 465 (2012).
26. D. K. Knight, S. N. Shapka, and B. G. Amsden, *J. Biomed. Mater. Res., Part A*, **83**, 787 (2007).
27. Z. Li, Y. H. Kim, H. S. Min, C. K. Han, and K. M. Huh, *Macromol. Res.*, **18**, 618 (2010).
28. Y. I. Jeong, D. G. Kim, M. K. Jang, and J. W. Nah, *Carbohydr. Polym.*, **343**, 282 (2008).
29. J. C. Park, B. J. Park, D. H. Lee, H. Suh, D. G. Kim, and O. H. Kwon, *Yonsei Med. J.*, **43**, 518 (2002).
30. G. Dumortier, J. L. Grossiord, F. Agnely, and J. C. Chaumeil, *Pharmaceut. Res.*, **23**, 2709 (2006).
31. T. Ur-Rehman, S. Tavelin, and G. Gröbner, *Int. J. Pharm.*, **474**, 19 (2011).