Journal of the Korean Chemical Society
2018, *Vol. 62, No. 1*
Printed in the Republic of Korea
https://doi.org/10.5012/jkcs.2018.62.1.24

이온성 상호작용을 통한 키토산-폴리아크릴산 Polyplex의 형성 및 이를 이용한 하이드로젤 특성 분석

김여진 · 권지영 · 이상민*
가톨릭대학교 화학과
(접수 2017. 11. 6; 게재확정 2017. 11. 26)

Electrostatic Formation of Chitosan-Polyacrylate Polyplex for the Preparation of Cross-Linked Hydrogel Particles

Yeojin Kim, Ji-Yeong Kwon, and Sang-Min Lee*
Department of Chemistry, The Catholic University of Korea, Bucheon 14662, Korea.
**E-mail: smlee120@catholic.ac.kr*
(Received November 6, 2017; Accepted November 26, 2017)

요 약. 대표적인 양이온성 폴리사카라이드인 키토산은 생체 친화적인 특성으로 인하여 식품 및 의약품으로의 다양한 응용성이 제시되고 있으나, 용액의 pH에 따른 급격한 용해도 변화로 인하여 실제적인 사용에 많은 제약이 따른다. 본 연구에서는 양이온성 키토산 고분자체와 음이온성 고분자 전해질인 PAA의 이온성 상호작용을 이용하여 두 고분자 전해질의 구성 비율 및 용액의 pH에 따른 polyplex 형성 과정을 관찰하였다. 특히, 두 고분자체의 조성 비율에 따라 나타나는 입자 표면의 전하량은 입자 간 정전기적 반발력을 제공하여 균일한 입자 크기와 높은 콜로이드 안정성을 제공하였으며, 이와 같이 안정화된 polyplex 입자는 추가적인 가교화 반응을 통하여 하이드로젤 입자로의 형성이 가능하였다. 두 고분자 전해질의 부분적인 교차 결합으로 형성된 하이드로젤 입자 내부의 acryl amide 작용기는 특징적인 저임계 용액 온도(LCST)를 나타냄으로써 입자의 온도에 따른 수화 작용에 차이를 보이며 그에 따른 입자의 수력학적 직경 변화가 관찰되어 온도에 따른 하이드로젤 입자의 가역적인 팽윤 작용이 관찰되었다. 이와 같은 하이드로젤 입자는 생리활성적인 환경에서 제한된 용해도를 보이는 키토산의 응용성을 한 층 더 높일 수 있을 것으로 기대된다.

주제어: 키토산, 폴리아크릴산, 폴리플렉스, 하이드로젤

ABSTRACT. Despite the great potential for the versatile applications in food industry and medical area, chitosan as a biocompatible cationic polysaccharide has suffered from the limited solubility under physiological condition. Herein, we demonstrated the electrostatic formation of chitosan-based polyplex particles, counterbalanced by polyacrylate as an anionic polyelectrolyte. The resulting polyplex exhibited pH- and composition-dependent changes in their surface charges as measured by zeta potential, which can be employed to provide the interparticle repulsive forces for enhanced colloidal stability in homogeneous solution. Subsequently, amide coupling between the acrylates and glucosamine residues of chitosan inside the polyplex further generated the hydrogel particles, which showed the temperature-sensitive swelling property. This aspect can be attributed to the partial formation of acryl amide residues, which have been generally known to possess the lower critical solution temperature (LCST).

Key words: Chitosan, Polyacrylate, Polyplex, Hydrogel

서 론

D-glucosamine (GlcN)의 단량체로 구성된 대표적인 폴리사카라이드인 키토산은 부분적으로 형성되어 있는 *N*-acetyl-glucosamine과 각각의 단량체들을 연결하는 β-glycosidic bond로 인하여 수용액 상에서 제한된 용해도를 보인다. 이에 따라 키토산 GlcN 단량체의 amine 작용기가 양이온성을 보이는 pH 4 미만의 산성 조건에서는 높은 용해도를 보이는 반면, pH 6 이상의 환경에서는 수용액 상 키토산의 용해도가 급속히 감소하여 침전물을 형성한다. 또한 산성 환경에서는 증가된 용해도에도 불구하고 수화된 키토산 고분자체가 매우 높은 점도(viscosity)를 보여 실제적인 사용상의 제약이 따른다.[1] 이러한 점을 극복하기 위하여 키토산 GlcN의 amine 작용기의 높은 반응성을 이용하여 다양한 화학적 변형을 도입함으로써 키토산 분자의 성질을 개선하는 연구가 진행되어 왔다.[2] 대표적

인 예로, 지방산 혹은 콜산과 같은 소수성 작용기를 결합하여 키토산 고분자체의 입체 배열 구조(conformation) 변화를 야기함으로써 나노입자를 형성하여 그 응용성을 높이는 연구 사례가 있었다.[3,4] 또한 약 산성 조건에서 양이온성을 보이는 키토산 고분자체에 tripolyphosphate(TPP)와 같은 다중 음이온성 분자 (polyanion), 혹은 구연산(citric acid)과 같은 다양성자 산(polyprotic acid)을 첨가하여 키토산 고분자체에 정전기적 교차 결합을 유도함으로써 나노 구조체를 형성하여 이용한 연구 사례가 있다.[5,6]

앞서 소개한 화학적 치환반응 혹은 단분자 형태의 기능성 첨가제를 이용함으로써 키토산 고분자체에 소수성 또는 정전기적 상호작용을 높이는 방법 이외에, 수용액상 용해도를 높일 수 있는 친수성 고분자를 도입하여 키토산 구조체의 입체 배열 구조 변화를 야기함으로써 그 응용성을 높일 수 있다. 대표적인 사례로 생체-친화성 고분자인 poly(ethylene glycol)을 키토산에 화학적으로 결합하여 comb-like 구조를 형성함으로써 키토산의 수용액상 용해도를 높임과 동시에 키토산 고분자체에 부분적인 양친매성(amphiphilic)을 부여하여 pH 조건이나 온도 변화에 따른 점도(viscosity) 조절 혹은 졸-젤 전이를 관찰한 연구 사례가 있다.[7,8] 그러나 이러한 전략은 키토산에 도입되는 고분자체의 큰 분자량으로 인하여 콜로이드 입자 형성 보다는 주로 벌크 형태의 기능성 하이드로젤 구조체 형성에 이용되었으며, 따라서 수용액 상에서 안정한 콜로이드 입자 구조를 만들기 위해서는 입자의 크기 제어가 가능하도록 oil-in-water droplet을 콜로이드 입자 형성을 위한 주형(template)으로 이용하기도 한다.[9,10]

본 연구에서는 키토산 고분자체를 이용하여 표면전하가 제어된 콜로이드 입자를 형성할 수 있도록 상반된 전하를 지닌 음이온성 고분자 전해질인 poly(acrylic acid), PAA와의 정전기적 상호작용을 통하여 polyplex 콜로이드 입자를 형성하고자 한다. 키토산 GlcN의 ammonium(pK_a≈6.5) 작용기와 PAA의 acrylate(pK_a≈4.7) 작용기는 pH 4~6 화학적 환경에서 각각 양이온성, 음이온성 고분자 전해질을 주로 형성하므로 이들 단량체 사이의 정전기적 상호작용을 통하여 polyplex가 형성될 것으로 기대된다. 또한 이러한 두 가지 고분자 전해질의 단량체들 사이의 상호작용은 고분자-고분자 사이의 다가성(polyvalent) 결합을 유도하여 향상된 결합활성(avidity) 및 가역적 결합이 가능하도록 한다.[11] 이와 같이 형성된 polyplex 입자는 이용되는 고분자 단량체인 GlcN와 acrylate의 구성 비율에 따라 음이온성 입자와 양이온성 입자의 형성이 가능하며, 이 때 입자 표면에 나타나는 표면 전하는 콜로이드 입자 간의 정전기적 반발력을 제공하여 형성된 polyplex 입자의 콜로이드 안정성을 유지할 수 있다. Polyplex 입자 내부에서 형성된 ammonium-acrylate 결합은 차후 carbodiimide로 매개된 결합 반응을 통하여 amide 작용기로 결합함으로써 내부가 가교화된 키토산-PAA polyplex 기반의 하이드로젤 형성 또한 가능할 것으로 기대된다.

실험 기기 및 방법

시약 및 기기

Chitosan (low molecular weight, M_v 125 kDa estimated, 14.5% acetylation), poly(acrylic acid) partial sodium salt(average M_w=~15,000, 35 wt % in H_2O), *N*-ethyl-*N'*-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC)는 Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI)에서 구매하였고, Acetic acid(99.5%), Sodium hydroxide(98.0%)는 Samchun Chemical Co.(Pyeongtaek, Korea)에서 구매하여 추가적인 정제없이 사용하였다.

모든 측정용 기기는 가톨릭대학교 공동기기원의 분석기기를 이용하였다. 형성된 나노 사이즈 하이드로젤의 크기와 표면전하는 Zetasizer Nano ZS(Malvern Instruments, Malvern, UK)에서 633 nm He–Ne laser를 사용하여 측정하였다. 나노입자의 크기분포는 non-negative least-squares (NNLS) 분석을 통하여 얻었다. 각 샘플의 zeta(ζ)–potential은 전기영동 이동성 값을 이용해 Smoluchowski equation을 통해 계산되었다. 콜로이드 입자 용액의 혼탁도 분석은 Lambda 35 spectrophotometer(Perkin Elmer, Waltham, MA)를 이용하여 500 nm 파장에서의 투과도를 통하여 측정하였고, FT-IR 스펙트럼은 Bruker TENSOR II FTIR spectrometer를 이용하여 측정하였다.

키토산–PAA Polyplex 입자 형성

키토산 30 mg(0.19 mmol)과 poly acrylic acid 50 mg(PAA, 0.19 mmol)을 각각 99.5% acetic acid로 pH 조절된 산성 수용액 50 mL에 용해한 후, 수용액을 pH 4로 조절한 후, 각각의 키토산 용액과 PAA 용액을 1:9, 3:7, 5:5, 7:3, 9:1 (GlcN:acrylate) mol/mol 비율로 혼합한다. Vortex mixer를 이용해서 용액을 균일하게 혼합한 뒤 실온에서 1시간 교반한다. 형성된 polyplex를 동적 광산란(Dynamic light scattering, DLS) 분석을 통하여 수력학적 직경(Hydrodynamic diameter, D_H)과 표면 전하(Zeta potential, ζ)를 측정한다. 같은 방법으로 pH 5, 6으로 조절된 각각의 시료를 혼합한 후, 형성된 polyplex 입자 크기 (D_H)와 표면 전하를 측정하였다.

Carbodiimide 가교화 반응을 통한 하이드로젤의 형성

PAA의 acrylate와 키토산의 amine 작용기가 amide 결합을 통하여 고분자 하이드로젤 네트워크을 형성할 수 있도록 carbodiimide를 통한 결합 반응을 이용하였다. 균일한 크

기 분포가 관찰된 PAA-키토산 polyplex 입자에 대하여 실험군에 포함된 PAA의 acrylate 작용기를 대상으로 10 mol %의 교차 결합을 위하여 100 당량의 *N*-ethyl-*N*-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide·hydrochloride(EDC)를 첨가하였다. 24시간 동안 교반 후, 투석을 통하여 *O*-acyl-isourea를 포함한 부생성물을 제거하고 순수한 생성물을 동결 건조하여 얻었다. 생성물 1 g을 취하여 푸리에 변환 적외선 분광계(FT-IR)로 분석 하여 amide 결합 형성을 확인하였다. 얻어진 하이드로젤 나노입자는 pH가 조절된 50 mM NaCl 용액에서 온도에 따른 수력학적 직경(D_H) 변화와 표면 전하를 측정하였다.

결과 및 고찰

pH 변화에 따른 polyplex의 표면전하 및 콜로이드 특성 분석

Fig. 1A는 중성 환경에서 양이온성을 지니는 키토산 GlcN 단량체와 음이온성을 지니는 PAA의 acrylate 작용기의 몰 비율에 따라 형성되는 polyplex 입자의 표면 전하를 pH 별 ζ-potential을 관찰하여 나타내었다. 전반적으로 양이온성을 지닌 키토산의 몰비율이 높아짐에 따라 ζ–potential이 양의 값으로 증가하는 반면, 음이온성을 지닌 PAA의 비율이 높아질수록 ζ–potential이 감소하여 음의 값을 갖는 경향성을 볼 수 있다. 또한 용액의 pH 변화에 따라 산성 조건에서는 높아진 H^+ 이온 농도로 인하여 polyplex 입자의 ζ–potential이 전반적으로 증가하는 반면, 높은 pH 조건에서는 polyplex 입자의 표면 작용기에서 H^+이 제거됨으로써 산성 조건에서 보다 상대적으로 낮아진 ζ–potential 이 관찰되었다. 이러한 현상은 키토산의 amine 작용기(pK_a≈6.5)와 PAA의 acrylate 작용기(pK_a≈4.6)의 pK_a 값을 이용한 henderson–hasselbalch 관계식을 통하여 계산된 유효 전하의 상대적인 비율을 비교해 보았을 때, 유사한 경향성이 관찰되어 pH 변화에 따른 입자의 표면 전하의 차이를 확인할 수 있었다. *Fig.* 1A 그래프의 오른쪽 Y축은 키토산의 amine 작용기와 PAA의 acrylate 작용기의 pK_a 값을 고려하여 계산된 $[COO^-]/[NH_3^+]$의 비율에 따른 이론적 유효 전하량인데, 각각의 pH 조건에서 PAA의 acrylate 작용기의 몰 비율에 따른 이론적 유효 전하량의 변화가 ζ–potential의 실험적 측정값과 매우 유사한 경향성으로 나타남을 확인하여 정전기적 상호작용을 통한 키토산과 PAA의 polyplex 형성을 유추해 볼 수 있다.

형성된 키토산과 PAA의 polyplex 입자는 표면 전하의 정전기적 반발력을 통하여 콜로이드 안정성이 유지될 것으로 예상되는데, 이러한 점은 키토산과 PAA의 상대적인 몰 비율에 따른 polyplex 용액의 혼탁도(turbidity) 관찰을

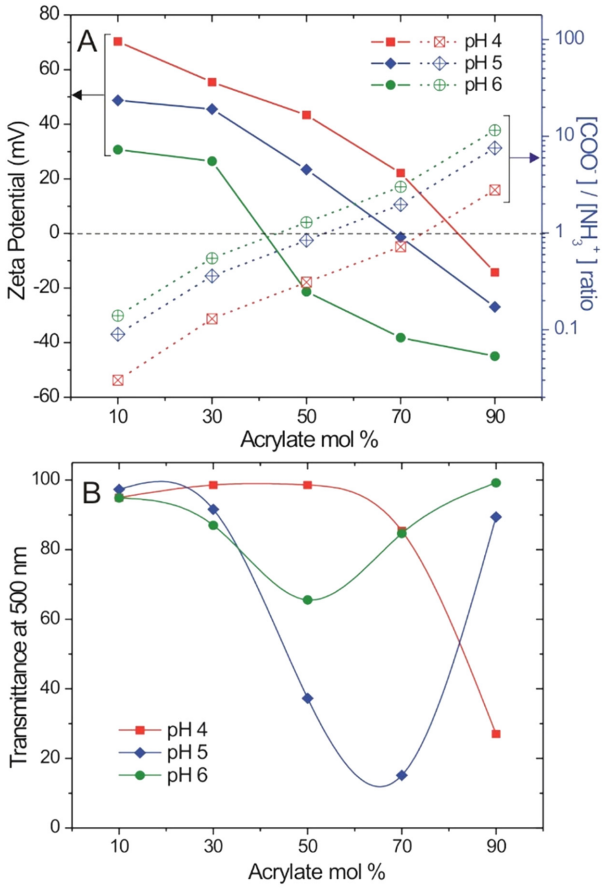


***Figure* 1.** (A) Zeta potential (ζ) changes of chitosan–PAA polyplex, depending on the molar ratio of chitosan and PAA mixtures at various pH conditions. Also shown is the theoretical values of effective charge ratio at the corresponding pH condition, obtained by henderson–hasselbalch equation. (B) Chitosan and PAA molar ratio-dependent changes of solution turbidity at various pH condition. Turbidity was observed by the measurements of transmittance at 500 nm.

통하여 확인해 볼 수 있다. Polyplex 입자의 표면 전하는 pH에 따라 형성되는 키토산과 PAA의 $[COO^-]/[NH_3^+]$ 유효 작용기의 비율에 따라 결정되는데, 이때 전체 표면 전하가 0이 되는 화학적 환경에서 콜로이드 안정성을 유지할 수 있는 정전기적 반발력이 사라지게 되어 콜로이드 입자의 응집현상(flocculation)이 나타날 것으로 예상된다. *Fig.* 1B에서는 이러한 과정에서 나타나는 응집된 콜로이드 입자를 확인하기 위한 용액의 혼탁도를 pH 변화와 PAA 몰 비율 변화에 따른 500 nm 파장에서의 빛 투과도 변화를 이용하여 관찰하였다.[12] 실제로 polyplex 입자의 ζ–potential이 0이 되는 PAA의 몰 비율은 용액의 pH가 6에서 4로 감소함에 따라 ~40 mol %에서 70 mol %, 85 mol %로 증가함을 알 수 있는데, 용액의 혼탁도 또한 동일한 pH 조건에서 각각 ~50, 65, 90 mol %의 PAA의 몰 비율에서 최고치가 관

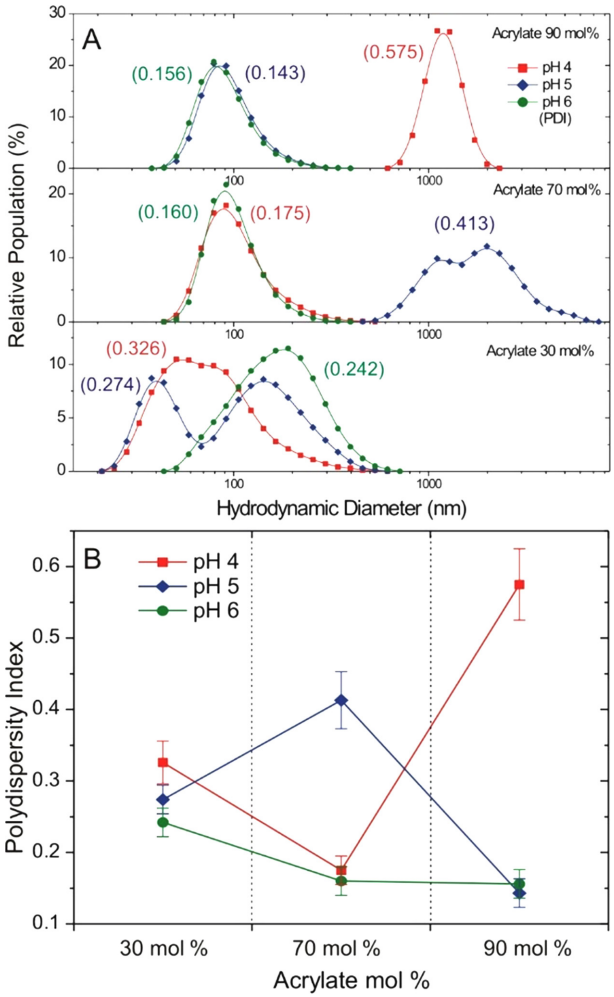


***Figure* 2.** (A) Hydrodynamic diameter of chitosan–PAA polyplex measured by dynamic light scattering (DLS) at pH 4, 5, and 6. (B) pH–dependent variation of polydispersity index (PDI) monitored by DLS analyses of chitosan–PAA polyplex with different acrylate mol %.

찰되어 polyplex 입자의 표면 전하에 따른 콜로이드 안정성 변화를 확인할 수 있다.

형성된 polyplex 입자의 크기를 확인하기 위하여 동적 광산란 법(dynamic light scattering, DLS)을 통하여 acrylate mol % 별 pH에 따른 입자의 수력학적 직경(hydrodynamic diameter, D_H)과 이를 통한 입자의 균일도를 polydispersidy index(PDI) 값을 비교하여 분석하였다(*Fig.* 2). Polyplex 입자의 크기는 *Fig.* 1B에서 관찰된 바와 같이 용액의 혼탁도와 밀접하게 관련되어 관찰되었는데, 일반적으로 낮은 혼탁도에서는 상대적으로 균일한 입자의 형성이 관찰된 반면, 높은 혼탁도의 용액에서는 형성된 입자의 낮은 콜로이드 안정성으로 인하여 입자의 응집 현상이 발생하여 높은 PDI 값과 증가된 수력학적 직경이 관찰되었다.

우선 acrylate 90 mol %로 구성된 polyplex 입자의 경우, 앞서 관찰된 바와 같이 pH 4 조건에서 높은 혼탁도를 보였으며, 또한 감소된 ζ–potential로 인하여 DLS 분석 결과, 증가된 크기(D_H>1000 nm)와 높은 PDI 값을 보여서, 콜로이드 입자의 응집 현상이 확인되었다(*Fig.* 2A, Top). 반면, 낮은 혼탁도가 관찰된 pH 5와 6 조건에서는 각각 98 ± 18 nm와 94 ± 17 nm 크기의 입자가 낮은 PDI 값으로 관찰되어 음전하로 인한 입자간 반발력으로 인하여 안정화된 콜로이드 입자가 형성되었음을 확인 할 수 있다.

표면 전하의 정전기적 반발력을 통하여 안정화된 polyplex 입자는 입자 형성에 사용된 키토산과 PAA의 몰 비율 및 수용액 상의 pH 조건에 따라 양이온성 입자와 음이온성 입자의 형성이 가능하다. 예를 들면, acrylate 70 mol %로 구성된 polyplex 입자의 경우, pH 6 조건에서는 –38.1 mV의 ζ–potential이 관찰되어 음전하를 통하여 안정화된 104 ± 18 nm 크기의 균일한 입자(PDI = 0.160)가 형성되었으나, pH 4 조건에서는 +22.1 mV의 표면 전하를 통하여 109 ± 24 nm 크기로 안정화된 콜로이드 입자(PDI = 0.175)의 형성이 관찰되었다(*Fig.* 2A, Middle). 이러한 점은 앞서 *Fig.* 1B에서 관찰된 pH에 따른 용액의 혼탁도와 동일한 경향성으로 나타났는데, 낮은 용액상의 혼탁도를 보인 pH 4와 6 조건에서는 안정한 콜로이드 입자가 형성된 반면, 높은 혼탁도를 보이는 pH 5 조건에서는 감소된 표면 전하(ζ = –1.32 mV)로 인하여 입자간 반발력이 약화되어 크기가 커진 응집된 입자(D_H >1000 nm)가 관찰되었다.

Acrylate 30 mol %로 구성된, 키토산의 함량이 더 높은 polyplex 입자의 경우, 모든 pH 조건에서 높은 양전하성 표면 전하를 지녀 용액의 혼탁도가 낮은 안정한 입자가 형성되는 것을 관찰할 수 있으나, 모든 pH 조건에서 전반적으로 0.2 이상의 PDI 값이 관찰되어 상대적으로 다소 낮은 균일도의 콜로이드 입자가 형성됨을 확인할 수 있다(*Fig.* 2A, Bottom). 이와 같이 키토산의 몰분율이 높은 polyplex가 상대적으로 큰 크기의 불균일한 입자를 형성하는 이유는, 중성 조건의 수용액 상에서 낮은 용해도를 지닌 키토산의 함량이 높아짐에 따라, 형성된 polyplex입자에서 수화 가능한 영역의 상대적인 비율이 감소하여 수용액 상에서 수화되지 못하고 부분적으로 석출되는 부분이 증가하여 입자의 크기 또한 커지는 것으로 예상된다. 반면, 키토산의 함량이 낮은(acrylate 70, 90 mol %) polyplex 입자는 ζ–potential 관찰 결과, 충분한 표면 전하를 지닌 pH 조건에서 모두 낮은 PDI 값을 나타내어 입자 크기의 편차가 크지 않은, 상대적으로 균일한 입자를 형성함을 확인할 수 있다. 따라서 이러한 일련의 실험 결과를 통하여 polyplex 입자의 구성 성분에 따른 표면 전하량과 이를 통한 콜로이드 입자의 안정성 변화를 관찰할 수 있다.

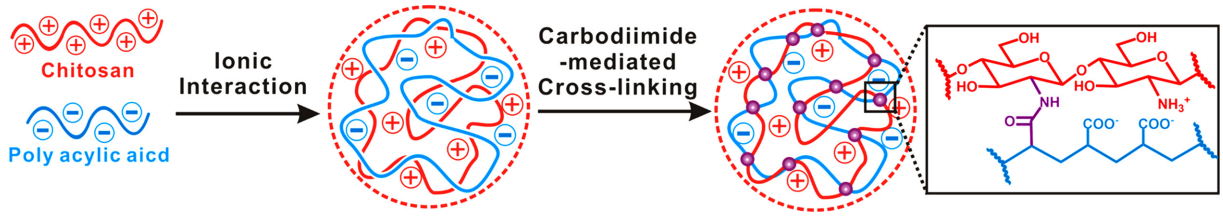


***Figure* 3.** Schematic illustration of EDC–mediated cross-linked chitosan–PAA polyplex hydrogel nanoparticles.

화학적 가교화 반응을 통한 하이드로젤 형성 및 특성 분석

위와 같은 화학적 조건에서 형성된 polyplex 입자는 수용액 상에서 amide 결합 반응을 매개하는 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide·hydrochloride(EDC) 를 이용하여 키토산의 amine 작용기와 PAA의 acrylate 작용기를 amide 결합으로 교차 결합함으로써 수용액 상에서 하이드로젤을 형성하도록 유도하였다(*Fig.* 3). 24 시간 반응 후, EDC의 부산물인 urea는 투석 과정을 통하여 제거하였으며, 가교화된 polyplex 입자의 amide 결합은 교차결합 반응 전, 후의 입자를 동결 건조하여 적외선 흡광 분석을 통하여 관찰하였다(*Fig.* 4A). 우선, 교차 결합 반응 전 polyplex 입자의 스펙트럼을 보면 (black line), 중성 pH 조건에서 이온화된 PAA의 carboxylate(COO^-) 작용기의 anti-symmetric(1550 cm^{-1})과 symmetric(1410 cm^{-1}) stretching peak을 확인할 수 있으며, 또한 1000–1100 cm^{-1}에서 키토산의 C–O 작용기가 관찰되어 polyplex를 구성하는 PAA의 acrylate 작용기와 키토산의 GlcN 단량체를 확인할 수 있다. 반면, 교차 결합 반응 이후 형성된 하이드로젤의 스펙트럼을 보면(red line), 1640, 1557, 1253 cm^{-1}에서 현저하게 나타난 amide I, II, III peak이 추가적으로 관찰되어 amide 결합을 통한 키토산-PAA polyplex 하이드로젤의 형성을 확인할 수 있다.

Acrylate 30 mol % 하이드로젤 입자의 경우, 교차 결합 반응 후 상온에서 270 ± 55 nm의 크기를 나타낸 반면, 50 °C로 수용액의 온도가 증가함에 따라 크기가 186 ± 38 nm로 감소하였다(*Fig.* 4B, top). 이러한 온도 변화에 따른 입자의 크기 변화는 교차 결합 후 부분적으로 형성된 poly(acryl amide) 단량체의 온도 감응성에 의한 효과로 예상된다. 이와 같은 온도 감응성은 고분자의 특징적인 저임계 용액 온도(lower critical solution temperature, LCST)에 의해서 나타나는데, 대표적인 acryl amide 계열의 온도 감응성 고분자인 poly(N-isopropyl acryl amide)의 경우 약 32 °C에서 LCST가 관찰되어 그 이상의 온도 조건에서는 수용액 상에서 용매 분자와의 상분리로 인한 용액의 혼탁도가 증가되는 현상이 관찰된다.[13,14] 따라서 교차 결합 반응 후 이러한 acryl amide와 유사한 구조의 작용기가 형성될 경우, LCST 이상의 온도에서 용매 분자에 의한 수화 작용이 감소하고 고분자의 입체 배열 구조의 변화를 통하여 수력학적 직경이 감소한 것으로 사료된다.[15]

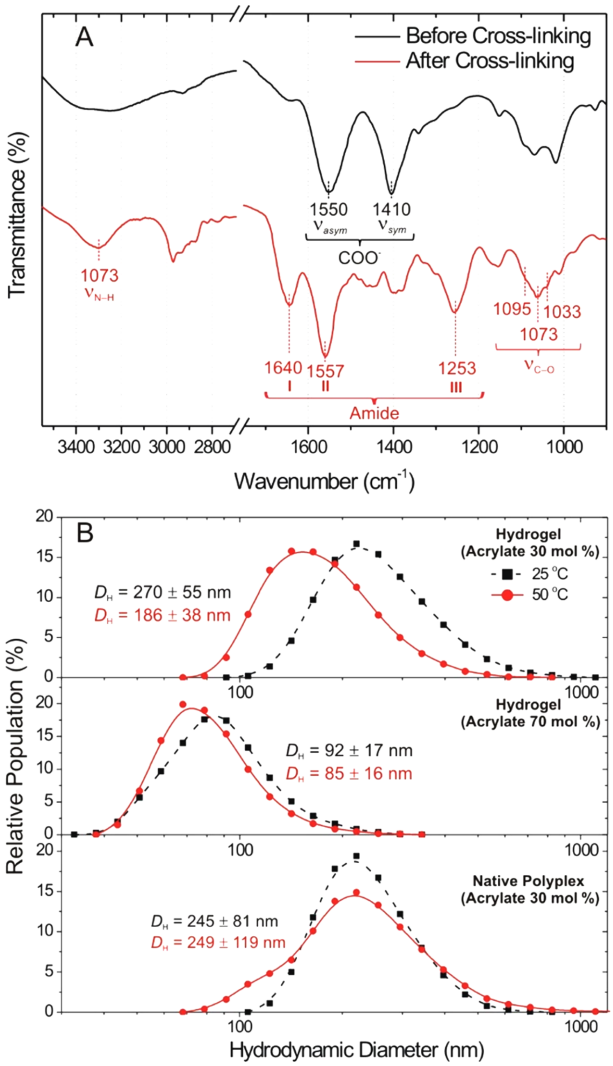


***Figure* 4.** (A) FT-IR spectra of chitosan-PAA polyplex particle before (black line) and after the hydrogel formation via EDC–mediated cross–linking (red line). (B) Temperature-sensitive size changes of cross-linked chitosan–PAA polyplex hydrogel particles. Also shown is the size change of native polyplex as a control.

교차 결합되지 않은 polyplex 입자의 온도에 따른 수력학적 직경을 측정해 보면, 25 °C와 50 °C의 두 온도 조건

에서 유의미한 평균 직경의 변화가 관찰되지 않아 특징적인 온도 감응성이 나타나지 않았으며, 그에 따라 키토산과 PAA의 교차 결합 반응으로 형성된 acryl amide 작용기가 앞서 관찰된 하이드로젤의 LCST에 주요한 영향을 미침을 확인할 수 있다(*Fig*. 4B, bottom). 반면, 높은 온도 조건의 polyplex 입자에서 더 넓은 분포의 수력학적 직경이 관찰되었는데, 이는 고온에서 약해진 이온성 상호작용으로 인하여 나타나는 polyplex 입자의 상대적으로 낮은 콜로이드 안정성 때문으로 사료된다.

키토산-PAA 하이드로젤의 LCST로 인한 온도 감응성은 수용액상 용해도가 낮은 키토산이 상대적으로 높은 비율로 구성된 acrylate 30 mol % 입자에서 극명하게 관찰된 반면, PAA의 비율이 높은 acrylate 70 mol % 입자의 경우, 상온에서 92 ± 17 nm, 50 ºC에서 85 ± 16 nm의 수력학적 직경을 나타내어 온도에 따른 크기 변화가 명확히 관찰되지 않았다(*Fig*. 4B, middle). 이러한 점은 수용액 상 용해도가 높은 PAA의 acrylate 작용기가 입자의 전반적인 수화 작용을 유지함으로써, 교차 결합 후 부분적으로 형성된 acryl amide 작용기에 의한 온도 감응성 고분자 입체 배열 구조의 변화가 입자의 크기 변화를 충분히 유도하지 못하는 것으로 사료된다.

결 론

본 연구에서는 수용액 상에서 pH에 따라 제한된 용해도를 보이는 키토산 고분자체와 음이온성 고분자 전해질인 PAA의 정전기적 상호작용을 이용한 polyplex 형성 및 이를 토대로 한 하이드로젤 입자의 합성과 특성 분석에 관하여 논의하였다. 형성된 polyplex 입자의 pH에 따른 안정성은 henderson–hasselbalch 관계식으로 계산된 표면 전하량에 따라 예측된 결과와 정확히 부합하였으며 이러한 결과는 동적 광산란 분석 및 ζ–potential 측정과 polyplex 용액의 혼탁도 분석을 통하여 확인되었다. 형성된 polyplex 입자의 표면 전하는 키토산과 PAA 고분자체의 몰비율 및 용액의 pH에 따라 조절 가능하였는데 증가된 표면 전하는 입자 간 반발력을 제공하여 균일한 입자 크기와 높은 콜로이드 안정성을 제공한 반면, 표면 전하가 감소된 입자는 응집 현상을 나타내어 크기가 불균일하고 혼탁도가 높은 용액이 형성됨을 확인할 수 있다.

표면 전하의 반발력을 통하여 안정화된 polyplex 콜로이드 입자는 키토산의 amine 작용기와 PAA의 acrylate 작용기 간의 amide 결합을 통하여 가교화 반응을 진행함으로써 하이드로젤 입자를 형성할 수 있다. 이와 같이 형성된 입자는 부분적으로 형성된 poly(acryl amide)에 의하여 특징적인 저임계 용액 온도(LCST)를 나타냄으로써 온도에 따른 작용기의 수화작용에 차이를 보이며 그에 따라 입자의 수력학적 직경 변화가 관찰되었다. 이러한 현상은 특히 수용액상 용해도가 낮은 키토산의 구성 비율이 높은 경우 더 명확히 관찰되었으며, 용해도가 높은 PAA의 구성비가 높은 경우, 입자의 크기 변화가 상대적으로 감소하여 입자의 조성에 따른 하이드로젤 입자의 특성 변화를 확인할 수 있다.

Acknowledgments. This research was supported by Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Education (NRF-2016R1D1A1B03934733).

REFERENCES

1. Desbrieres, J. *Biomacromolecules* **2002**, *3*, 342.
2. Kumar, M. N. V. R.; Muzzarelli, R. A. A.; Muzzarelli, C.; Sashiwa, H.; Domb, A. *J. Chem. Rev.* **2004**, *104*, 6017.
3. Kim, J.-H.; Kim, Y.-S.; Park, K.; Lee, S.; Nam, H. Y.; Min, K. H.; Jo, H. G.; Park, J. H.; Choi, K.; Jeong, S. Y.; Park, R.-W.; Kim, I.-S.; Kim, K.; Kwon, I. C. *J. Controlled Release* **2008**, *127*, 41.
4. Zhao, Z.; He, M.; Yin, L.; Bao, J.; Shi, L.; Wang, B.; Tang, C.; Yin, C. *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 565.
5. Aktaş, Y.; Yemisci, M.; Andrieux, K.; Gürsoy, R. N.; Alonso, M. J.; Fernandez-Megia, E.; Novoa-Carballal, R.; Quiñoá, E.; Riguera, R.; Sargon, M. F.; Çelik, H. H.; Demir, A. S.; Hıncal, A. A.; Dalkara, T.; Çapan, Y.; Couvreur, P. *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16*, 1503.
6. Bodnar, M.; Hartmann, J. F.; Borbely, J. *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 2521.
7. Bhattarai, N.; Ramay, H. R.; Gunn, J.; Matsen, F. A.; Zhang, M. *J. Controlled Release* **2005**, *103*, 609.
8. Jang, J. H.; Choi, Y. M.; Choi, Y. Y.; Joo, M. K.; Park, M. H.; Choi, B. G.; Kang, E. Y.; Jeong, B. *J. Mater. Chem.* **2011**, *21*, 5484.
9. Prego, C.; Torres, D.; Fernandez-Megia, E.; Novoa-Carballal, R.; Quiñoá, E.; Alonso, M. J. *J. Controlled Release* **2006**, *111*, 299.
10. Chen, C.-K.; Wang, Q.; Jones, C. H.; Yu, Y.; Zhang, H.; Law, W.-C.; Lai, C. K.; Zeng, Q.; Prasad, P. N.; Pfeifer, B. A.; Cheng, C. *Langmuir* **2014**, *30*, 4111.
11. Mammen, M.; Choi, S.-K.; Whitesides, G. M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2754.
12. Xu, P.; Bajaj, G.; Shugg, T.; Van Alstine, W. G.; Yeo, Y. *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 2352.
13. Nayak, S.; Lyon, L. A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7686.
14. Lee, S.-M.; Nguyen, S. T. *Macromolecules* **2013**, *46*, 9169.
15. Lee, S.-M.; Lee, O.-S.; O'Halloran, T. V.; Schatz, G. C.; Nguyen, S. T., *ACS Nano* **2011**, *5*, 3961.