



# 공 학 석 사 학 위 논 문

# 근적외선 제어형 키토산 기반 하이드로겔의 합성 및 약물 전달 시스템으로의 응용



# 부경대학교 대학원

스마트그린기술융합공학과

## 박 한 솔

공 학 석 사 학 위 논 문

# 근적외선 제어형 키토산 기반 하이드로겔의 합성 및 약물 전달 시스템으로의 응용

지도교수 임 권 택

이 논문을 공학석사 학위논문으로 제출함.

2021년 2월

부경대학교 대학원

ГH

O

스마트그린기술융합공학과

박 한 솔

# 박한솔의 공학석사 학위논문을 인준함.

2021년 2월 19일



| 목차                                            |
|-----------------------------------------------|
| 표 목차                                          |
| 그림 목차                                         |
| ABSTRACT ···································· |
| 제 Ⅰ장 서 론                                      |
| 제 Ⅱ장 이 론                                      |
| 2.1 하이드로겔 개요                                  |
| 2.2 키토산 개요                                    |
| 2.3 키토산의 원료                                   |
| 2.4 키토산의 용해도                                  |
| 2.5 키토산의 독성 8                                 |
| 2.6 키토산의 생의학적 특성9                             |
| 2.7 키토산의 pH 반응성                               |
| 2.8 화학 결합 가교반응과 가교제 10                        |
| 2.9 키토산의 하이드로겔의 상처 드레싱 약물 전달으로의 응용            |
| 2.10 근적외선에 의한 가교제의 Diselenide 결합 분해           |
| 제 Ⅲ장 실 험                                      |
| 3.1 시약14                                      |
| 3.2 분석                                        |
| 3.3 Cs-Nb-COOH의 합성15                          |
| 3.4 Cs-Nb-COOH의 합성16                          |
| 3.5 Cs의 탈산화도와 Cs-Nb-COOH 치환도 분석               |
| 3.6 ɣ-BSeL의 합성                                |
| 3.7 Se-MeTz의 합성                               |
| 3.8 Cs-Se Gel의 제조                             |

목 차

| 3.9 겔 함량 분석                                      |
|--------------------------------------------------|
| 3.10 팽윤도 분석                                      |
| 3.11 횡단면 표면분석                                    |
| 3.12 CIP 검량선 ··································· |
| 3.13 ICG/CIP 탑재····· 22                          |
| 3.14 근적외선 제어 CIP 방출 거동 분석                        |
| 제 IV장 결과 및 고찰··································· |
| 4.1 Cs-Nb-COOH의 합성                               |
| 4.2 Cs의 탈산화도와 Cs-Nb-COOH 치환도 분석                  |
| 4.3 ɣ-BSeL의 합성······ 26                          |
| 4.4 Se-MeTz의 합성                                  |
| 4.5 Cs-Se Gel의 제조······ 29                       |
| 4.6 팽윤도 분석                                       |
| 4.7 횡단면 표면분석                                     |
| 4.8 CIP 검량선····································  |
| 4.9 근적외선 제어 CIP 방출 거동 분석                         |
| 제 Ⅴ 장 결 론··································      |
| 제 Ⅵ 장 참고 문헌                                      |

| 표 | 목 | え | - |
|---|---|---|---|
|---|---|---|---|

# 그림 목차

| [그림 1] 키토산의 구조                                                             |
|----------------------------------------------------------------------------|
| [그림 2] 키토산의 양성자화 반응                                                        |
| [그림 3] 키토산의 pH 반응 팽윤 거동 메커니즘                                               |
| [그림 4] 화학 결합 가교제의 구조                                                       |
| [그림 5] 지니핀과 키토산의 가교 결합12                                                   |
| [그림 6] NIR-responsive chitosan-based hydrogel, Cs-Se Gel 합성15              |
| [그림 7] NIR-responsive chitosan-based hydrogel, Cs-Se Gel 실험 도식16           |
| [그림 8] Cs와 Cs-Nb-COOH의 1H NMR Spectra ···································· |
| [그림 9] Cs, Cs-Nb-COOH, Se-MeTz, Cs-Se Gel 1의 FT-IR Spectra24               |
| [그림 10] y-BSeLt와 Se-MeTz의 1H NMR Spectra ·······27                         |
| [그림 11] (a) pH = 3.7, (b) pH = 5.2, (c) pH = 7.4의 세 가지 PBS 조건에서            |
| Cs-Se Gel 1/2/3의 팽윤도 분석······ 30                                           |
| [그림 12] (a) Cs-Se Gel 1, (b) Cs-Se Gel 2, (c) Cs-Se Gel 3의 내부 횡단면          |
| SEM 사진····································                                 |
| [그림 13] (a) pH = 3.7, (b) pH = 5.2 의 두 가지 PBS 조건에서 CIP의 검량선(추              |
| 세선) 함수 및 결정계수 R <sup>2</sup> ······32                                      |
| [그림 14] (a) Cs-Se Gel 1에 탑재된 CIP의 질량, (b) R3(Release Solution pH           |
| 3.7), (c) R5(Release Solution pH 5.2) 두 가지 PBS 조건에서 Cs-Se Gel 1의 CIP       |
| 방출 거동 및 NIR 제어                                                             |

## Synthesis of near-infrared light-controllable chitosan-based hydrogels and their application for drug delivery system

Hansol Park

Department of Smart Green Technology Engineering, The Graduate School, Pukyong National University

## Abstract

Chitosan is one of the most widely used materials to fabricate hydrogels. It has low toxicity, immune-stimulatory activities and excellent biocompatibility. In addition to these advantages, a biodegradable and near-infrared (NIR) light-responsive hydrogel is one of the most promising strategies as a on demand drug releasing carrier.

In this study, Biodegradable and NIR light-triggered chitosan-based hydrogels were prepared as drug delivery carriers for antibiotic drug ciprofloxacin (CIP).

The situ-forming hydrogel bonded ex that have covalently cross-linked networks fabricated readily via inverse electron demand Diels-Alder (iEDDA) click chemistry between (Cs-Nb-COOH) norbornene-functionalized chitosan and methyl-tetrazine cross-linkage containing diselenide bonds (Se-MeTz). Cross-linking densities were multipleized into three conditions to manipulate their properties.

NIR sensitive indocyanine green (ICG) and a drug, CIP were post-loaded into the dried hydrogel matrix in phosphorate-buffered

– iv –

saline (PBS) at three different pH values (3.7, 5.2, and 7.4). The release profile for the hydrogels was examined in three different PBS media same as drug loading.

The results indicated that the release profile has pH-dependent influences and rapid release of CIP under NIR light. ICG generated reactive oxygen species (ROS) which could cleavege diselenide bonds in the polymer matrix, inducing release of entrapped CIP.



## 제 I장서론

약물의 치료효과를 높이고 부작용을 줄이기 위해서는 작용 부위에 선택적 으로 약물이 전달될 수 있도록 약물의 거동을 제어할 필요가 있다. 약물을 효율적으로 전달할 수 있도록 설계한 제형을 약물전달시스템(Drug delivery system, DDS)이라고 한다.[1]

생체 의학적 응용 면에서 이러한 물질 중 하나가 하이드로겔이다. 하이드 로겔은 혈액, 체액 및 생체조직과 접촉했을 때 우수한 생체 적합성을 갖는 다. 그래서 하이드로겔은 상처 치료용 드레싱, 콘택트 렌즈, 인공 연골이나 막 등의 다양한 생체 재료로 사용되었다.[2,3]

하이드로겔은 많은 양의 물을 흡수하여 고분자 네트워크가 팽창하여 평형 을 이루면서 3차원의 물리적 구조가 파괴되지 않는 특징을 가지는 생체재 료이다.[4]

하이드로겔은 중합되는 소재의 출처에 따라서 천연소재 기반 고분자 네트 워크와 합성소재 기반 고분자 네트워크에 의해 제조되는 것으로 분류될 수 있다.[5] 생체재료로 많이 사용되는 히알루론산, 콘드로이틴 설페이트, 젤라 틴, 콜라겐 등과 같은 천연고분자는 생물체로부터 유래된 고분자이며, 라이 소자임, 히알루로네이즈, 콜라게네이즈 등과 같은 동물에 존재하는 효소에 의해서 분해되어 이산화탄소, 물, 산소 등과 같은 분자로 전환되고 최종적

으로는 인체로부터 배출되기 때문에 생체에 무해한 특성을 가진다.[6] 생체에 적합한 소재로 알려진 키토산(Chitosan)은 게와 같은 갑각류의 외 골격에서 주로 발견되는 키틴(Chitin)의 고분자 화학구조에서 알칼리 용액 을 이용하여 화학적으로 탈 아세틸화하는 방법과 효소를 사용하여 N-아세 틸기를 제거함으로써(탈 아세틸화) 키토산 고분자 네트워크의 측쇄의 끝을

- 1 -

-NH2로 전환하여 얻은 고분자로 선형 다당류이다.[7]

키토산의 아민기와 하이드록실기는 키토산 고분자 내부 혹은 외부 구조 사이의 상호작용에서 수소결합을 형성하여 결합력이 우수하다. 키토산 고 분자는 1차 아미노 그룹이 많아서 다양한 화학결합을 유도시키는데 유용한 작용기이며, 고분자의 생체활성을 제공할 수 있다.[8] 키토산의 장점은 생 체에 적용할 때 효소에 의한 생분해성, 혈액 적합성, 생체 적합성, 무독성 의 특징을 가지고 있으며, 자연계에 존재하는 고분자들 중에서 셀룰로오스 다음으로 가장 많이 존재하는 천연 고분자이기 때문에 의료용 소재를 얻기 쉬우면서, 저비용의 장점을 가진다.[9]

최근 연구에서는 선형 고분자의 가교결합을 형성하는 가교제에 -Se-Se-결합을 포함하도록 합성하여 근적외선에 의해 형성되는 활성산소가 가교제 를 분해시켜 가교 고분자가 다시 선형 고분자로 돌아가면서 탑재된 약물의 방출을 조절하는 보고가 활발하게 이루어지고 있다.[10,11]

본 연구에서는 앞서 언급한 키토산 측쇄에 치환시킨 노르보넨기가 선형 대 칭구조의 테트라진 가교제와 만나 Inverse electron demand Diels-Alder reaction의 화학적 공유결합을 통해 합성되었고, 가교제 중심부가 근적외선 조건에서 분해되도록 설계하였다. 겔화율, 팽윤도, 횡단면 분석을 통해 겔 의 특성을 확인하였으며 항생제 약물 용액으로 팽윤시킨 후 용액의 산도와 근적외선 유무에 따른 약물 방출 거동을 분석하였다.

- 2 -

# 제 Ⅱ장 이 론

#### 2.1 하이드로겔 개요

하이드로겔은 고분자의 가교결합에 의해 형성되어 그 형태가 무너지거나 녹지 않고도 내부에 많은 양의 물을 흡수하고 함유할 수 있는 3차원 구조 를 말한다.[12] 몇몇의 하이드로겔은 항바이러스성 혹은 항진균의 생리활 성을 갖는다.[13] 이러한 특성은 상처 치료용 드레싱과 상처 회복 과정에 유용하게 사용될 수 있다.[14] 하이드로겔을 형성시키는 고분자는 친수성 혹은 소수성의 작용기를 갖는다. 하이드록실기(-OH), 아민기(-NH2), 그리 고 아마이드기(-CONH-CONH<sub>2</sub>) 등의 친수성 작용기는 하이드로겔이 물 을 흡수하여 팽창하는 팽윤을 가능케 한다. 팽윤 과정 동안, 가교 결합된 하이드로겔은 물과의 접촉에 의한 가교 구조의 해리와 완전한 파괴가 일어 나지 않는다. Polylactic acid와 같은 소수성 주쇄를 갖는 하이드로겔은 친 수성 주쇄를 갖는 격자구조의 하이드로겔 보다 낮은 팽윤 용량을 갖는다. 하이드로겔은 여러 가지의 서로 다른 화학적 구성을 가지는 합성 고분자 혹은 천연 고분자로부터 형성될 수 있는데, 각각의 기계적, 화학적 성질이 모두 다르다. 하이드로겔에 사용되는 천연 고분자는 알지네이트, 키토산, 히알루론산, 셀룰로스, Starch, Ulvan, 젤라틴, 풀루란 등이 있다. 반면 합 성 고분자로는 폴리비닐알콜, 폴리아크릴아마이드, 폴리에틸렌글리콜 등의 고분자가 사용된 하이드로겔이 보고되었다. 하이드로겔은 두 가지의 분류 로 구분될 수 있다. 공유결합이 포함되어 가교 네트워크 사이에서의 결합 을 통해 형성되는 Chemical or permanent gel과 분자구조 사이의 얽힘이 나 이온결합이나 수소결합에 의해 혹은 소수성 작용기의 상호 작용 1(Ahmed)에 의한 Physical or reversible gel으로 구분할 수 있다. 물리적 가교 결합에 의해 형성된 겔은 서로 다른 고분자 주쇄 사이에서 물리적 상 호작용에 의해 물에서 분해되는 것이 방지된다.[15] 이러한 하이드로겔은 slabs, microparticles, nanoparticles, coatings, films로 형성되는 것을 포함 한다.

하이드로겔의 가장 중요한 특성은 조직 근처에서 필요치 않은 면역 반응이 없게 하는 것으로, 생체적합성이 그 특성이다.[16] 몇몇의 경우에는 이 특 성이 상처 치료용 드레싱에서 나타나게 되는데, 육아조직과 흉터 형성에서 의 치유 효과를 가지기 때문이다.[17] 다루기 까다롭고 약물의 탑재와 살균 작용이 힘들고, 대부분 기계적 성질이 약하다는 것이 그 특징이다. 이런 단 점에도 불구하고 하이드로겔은 상처 치료용 드레싱, 약물 전달체, 임플란 트, 주사 가능한 고분자 시스템 등의 형태로 아주 다양한 분야에서 조직공 학과 약학, 생리의학 등으로의 많은 응용이 있다.

## 2.2 키토산 개요

키토산은 하이드로겔을 만들기 위해 가장 많이 사용되는 천연 고분자의 종류 중 하나로, 많은 분야 중 상처 치료용 드레싱으로 가장 많이 사용되는 하이드로겔을 형성시킬 수 있다. 키토산은 아주 뛰어난 생체적합성과 낮은 독성, 그리고 면역자극을 갖는다.[18] 이러한 특성 때문에, 키토산은 좋은 생체적합성과 상처 치료용 고분자로의 긍정적인 영향력을 갖는다. 또한, 키토산은 다른 조직과 상처와의 상호작용을 높여 상처 치료에 효과적이 다.[13] 또한 키토산의 세포질 적합성은 단기 세포독성 효과를 갖지 않음이 연구되어 입증되었다.[19] 키토산은 산성 용매를 제외하고 용해도가 낮고 이 때문에 분석의 수행에 어려움이 있다.[20] [그림 1]과 같이 아민기 (-NH<sub>2</sub>)의 반응성 때문에 키토산은 유일한 양전하를 띄는 천연 고분자에 속하며 많은 응용이 있다. 상처 회복, 항응고제, 항균, 항진균, 항암, 지혈 등의 용도로 응용되어져 왔다. 일반적인 용어의 키토산은 순수한 형태의 poly-(beta-1-4) N-acetyl-D-glucosamine으로 존재한다. 이는 탈 아세틸 화의 정도(degree of deacetylation)에 아주 의존적이며 탈 아세틸화의 정 도에 의해 평균 분자량과 다분산성 그리고 구조가 결정된다. 한 논문에서 는 키토산 하이드로겔에서의 분자량과 탈 아세틸화의 정도의 상관성에 대 해 보고했다. 이 두 가지의 요인이 하이드로겔이 가지는 pH 값과 현탁도, 점도, 온도 감응성 등의 특징에 영향을 미치는 것으로 나타났다.[21] 탈 아 세틸화의 정도는 키토산의 항균 작용에 영향을 미치는 것도 보고되었다.



[그림 1] 키토산의 구조

## 2.3 키토산의 원료

키틴, poly (β-(1→4)-N-acetyl-D-glucosamine)은 천연 다당류의 하나이 다. 1811년 프랑스의 화학자 Henri Braconnot에 의해 처음 발견되었다.[22] 키틴은 proteoglycan(Glycosaminoglycan과 Core protein을 총칭하는 단어) 으로서 특정 생물의 세포 외벽 구조 매트릭스의 형태를 갖는다. 이것은 셀 룰로스 다음으로 자연에서 가장 풍부하게 존재하는 고분자이다. 이런 생체 고분자는 거대한 숫자의 갑각류 생물의 겉껍질에 많이 존재한다. 이런 생 물에서 유래한 고분자는 키틴과 다중 불포화산, 그리고 콜라겐의 중요한 원료가 된다. 키틴은 또한 이족 생물의 외골격은 물론 오징어나 문어에서 도 추출될 수 있다.[23-26]

1859년에 Roget에 의해 처음 발견된 키토산은 알칼리성의 환경에서 부분 적으로 탈 아세틸화가 일어난 키틴의 변형된 형태로 키틴에서 유래된 가장 중요한 응용이라고 할 수 있다.[27] 키토산에서 발견되는 물리화학적 특성 은 해양 원료의 분류에 밀접한 연관이 있다.[28] 키토산은 또한 알칼리 처 리 이외에도 높은 온도에서 효소 작용에 의해서도 생성된다.[29,30] 키토산 은 키틴의 효소 작용에 의한 분해로 형성될 수 있지만 많은 양이나 상업적 인 응용으로의 사용은 불가능하다. Almond emulsin의 β-glucosidase는 효 소 제제의 기존 chitanase로 인해 키틴의 표면을 가수 분해할 수 있는 것으 로 보고되었기 때문이다.[31]

곰팡이 세포 벽으로부터 발효를 통해 얻어지는 키토산 제조법은 경제적 인 방식으로 키토산을 얻을 수 있는 방법이다. 이러한 방법은 특정 곰팡이, *zygomycete*(접합균류, 진균류의 한 종류)의 세포벽에서부터 얻어질 수 있 다.[32,33] 이 진균류를 활용하여 키토산을 생산하는 방법에는 몇 개의 장 점이 있다. 가장 중요한 장점은 의 세포 외벽은 아주 많은 양의 키토산과 발효과정에서 제어될 수 있는 몇 가지 요인들에 의해 결정되는 키토산의 물리화학적 특성을 이유로 들 수 있다. 예를 들면, 이런 진균류 곰팡이가 서로 다른 pH 산도를 갖고 다른 환경에서 성장하면 서로 다른 분자량을 갖는 키토산이 생성된다.[34] 충분한 양의 키토산을 얻는 방법과 97%에 달 하는 탈 아세틸화 정도를 갖는 키토산에 대한 방법도 보고되었다.[35,36] 갑각류의 키틴으로부터 얻어지는 키토산은 진균류 곰팡이를 활용하여 키 토산을 얻는 방법보다 탈 아세틸화의 정도가 낮고 점도와 분자량 또한 낮 다. 낮은 분자량의 키토산은 키토산 단일막의 인장력과 연장성을 감소시키 지만 침투성은 높인다. 진균류 곰팡이를 통해 얻어진 키토산은 보다 의료 용, 농업용 응용에 적합하다.[37,38]

## 2.4 키토산의 용해도

수소결합에 의한 분자간의 강한 상호작용에 의해 키틴은 높은 결합에너 지를 갖기 때문에, 키틴은 물, 희석시킨 산성 용매 그리고 알콜류를 포함한 다양한 용매에 녹지 않는다.[39] 이것은 천연 고분자 키틴을 활용하기에 개 발과 처리단계에서 가장 주요한 문제점이다. 키틴에서 유래한 가장 중요한 고분자인 키토산은 희석시킨 산성 수용액에서 아주 쉽게 용해될 수 있다. 탈 아세틸화에 의해 생겨난 1차 아민기의 존재로 인해 pKa 값으로 6.3을 갖기 때문이다. 용해의 원리는 [그림 2]에서 표현된 것과 같이 D-glucosamine의 반복단위 속 - NH<sub>2</sub> 작용기의 양성자화로 인해 -NH<sub>3</sub><sup>+</sup>로 변환되기 때문이며, 다당류는 산성 용매 속에서 고분자 전해질으로 변환되 기 때문이다.



[그림 2] 키토산의 양성자화 반응

키토산의 용해도는 보통 1% 또는 0.1 M 아세트산 수용액을 통해 측정된 다. 키토산 수용액의 농도는 키토산을 용해시키기 위해 사용한 아세트산의 양에 의존하는 것으로 나타났다.[40] 양성자의 최소 농도는 키토산 반복단 위가 가진 아민기의 수에 의해 결정된다. 양성자화의 정도(degree of protonation)가 점진적으로 증가할수록 키토산의 용해도도 따라서 증가한 다.

키토산의 용해도는 분자량이 작아질 수록 증가한다. 분자 내외의 영향과 서로 다른 키토산의 형태에 의해 발생하는 분자량의 변화는 키토산 내부의 N-acetylglucosamines 반복단위의 함량을 변화시킨다. 그러나 탈 아세틸 화를 조절하여 용해도를 향상 시키는 것은 높은 비용과 낮은 수율을 갖는 다.[41]

## 2.5 키토산의 독성

대부분의 보고에서 키토산의 독성은 무시할 수 있는 정도를 나타냈다. 키 토산 하이드로겔의 진피 섬유 아세포에 대한 *in vitro* 세포독성 연구의 결 과는 실험 쥐의 피부에서 얻어졌다. 그들의 세포 생존력에 관한 연구에서

- 8 -

는 하이드로겔과 분해로 발생한 부산물로부터 세포독성이 없는 것으로 나 타났다. 조직학적 분석에서도 키토산 하이드로겔의 반응성 부족(lack of reactive) 혹은 피부 병변(skin lesions)의 육아 종성 염증(granulomatous inflammatory)으로 드러났으며 장기(organs)의 병리학적 이상 (pathological abnormalities)의 존재는 이 하이드로겔의 국소(local) 및 전 신(systemic) 조직 적합성(histocompatibility)을 뒷받침했다.[42]

또한 *in vivo* 만성 독성(chronic toxicity)에 대한 연구와 정제 이후 낮은 내독소(endotoxin)를 갖는 키토산에 대한 보고에서도 마찬가지로 키토산의 독성은 무시할 만큼인 것으로 나타났다. 또한 독성이 없는 키토산이 지혈 제와 같은 의약품으로의 용도로 적합함을 밝혔다.[43-45]

## 2.6 키토산의 생 의학적 특성

키토산의 분해율은 탈산화 정도 또는 분자량을 변경하여 제어할 수 있 다.[46] 키토산의 분해된 제품이 무독성, 비면역성임을 입증하기 위해 많은 연구가 이루어졌다.[47] 이 중에 폴리아크릴아마이드/키토산 하이드로겔의 특성, 생체적합성, 방출성 등을 보고했으며 키토산이 생체적합성과 생체흡 수성이 우수한 것으로 나타났다.[48] 키토산의 항균 활성은 많은 박테리아, 백열성 곰팡이, 효모에 대해 입증되었다. 키토산은 반응성의 스펙트럼이 넓고 박테리아 박멸에 효과가 있으며 포유류 세포에 대한 독성이 낮다.[14]

#### 2.7 키토산의 pH 반응성

키토산의 주쇄에 있는 수많은 아민 그룹들은 pH에 의존적인 용해성을 부

여하는데, 이는 바이오 센서와 약물 전달 시스템을 조작하는 데 이용되어 왔다. [그림 3]과 같이 키토산의 아민기는 산성 완충용액에 의해 이온화되 어 아민기 사이의 정전기적 반발에 기여하여 사슬 간 체인 확장으로 이어 져 결국 키토산 하이드로겔의 수분 흡수를 증가시킨다. 또한, 키토산의 항 균 활성도 pH에 의존하며, 키토산은 산성 환경에서만 항균 활동을 보인 것 으로 보고되었다.[49]



2.8 화학 결합 가교반응과 가교제

화학적으로 가교결합된 하이드로겔은 결합 형성이 비가역적인 키토산 고 분자의 공유결합에 의해 형성된다. 천연 및 합성 고분자의 가교결합은 가 교제와 고분자 측쇄의 기능기(-OH, -COOH, NH<sub>2</sub> 등)의 반응에 의해 얻어 질 수 있다. 가교제는 중합체 사슬 사이의 결합을 형성할 수 있는 최소 두 개의 반응성 기능기를 갖는 분자이다. 현재까지 키토산 하이드로겔을 얻기 위해 가장 많이 사용되는 가교제는 그림 4와 같이 글루타알데히드, 포름알 데히드, 또는 에틸렌글리콜 디클리시딜 에테르, 지니핀과 같은 디알데하이 드이다. 언급된 가교제들 중에서 키토산과의 알데하이드 반응은 인접한 이 중 에틸렌 결합으로 생성되는 공명효과에 의해 키토산의 아민기와 결합을 형성한다. 하지만 글루타알데히드는 저용량에서도 세포독성이 있으며 글 루타알데히드 중합으로 보관 또는 멸균 시 글루타알데히드 잔여물이 배출 될 수 있다고 보고되었다.



약물 방출 및 약물 응용을 제어하기 위한 비용해성 하이드로겔을 얻기 위 해 연구자들은 낮은 세포독성을 가진 가교제를 찾으려고 시도해왔다. 지니 핀은 지니파 열매에서 분리된 이리도이드 글루코사이드인 지니포시드에서 추출한 천연 가교제이다. 지니핀은 생물조직, 키토산, 젤라틴과 같은 생체 고분자와 결합하여 공유결합을 이루는 것으로 보고되었다. 아미노기가 존 재하는 고분자에 효과적인 가교제 역할을 한다. 하지만 지니핀과 아민기의 반응 속도가 글루타알데히드보다 현저히 느린 것으로 밝혀졌다. 그림 5에 서 나타난 키토산과 지니핀의 반응은 이해하기 쉽고 인간과 동물 세포에 대한 세포독성이 없다. 지니핀으로 가교결합된 하이드로겔의 생체적합성, 생분해성 및 약효를 조사하여 지니판이 임상 용도에 매우 적합할 수 있다 고 결론지었다.[50-52] 지니핀은 또한 항염증, 항혈관신생제제 역할에 관여 하는 것으로 나타났으며, 알츠하이머 아밀로이드 베타 단백질의 독성으로 부터 해마 뉴런을 보호했다.[53]



2.9 키토산의 하이드로겔의 상처 드레싱 약물 전달으로의 응용

생체의 상처 치유과정은 응고, 염증, 이주 확산(migration proliferation), 리모델링의 4가지 중첩 단계를 포함하는 복잡한 과정이다. 인체는 피부기 능의 결핍이나 큰 상처의 엄청난 유체 손실이 없는 한 정상적인 상처에서 치유과정의 모든 요건을 제공할 수 있다. 하지만 적절한 pH, 수분, 산소 압 력을 제공하고 미생물 침투를 방지하면서 상처치유 과정을 가속화 할 수 있다.[54,55] 비 치료 상처에 대한 상처 관리는 최근 응고, 염증, 혈관신생, 상피, 수축, 리모델링과 같은 다양한 메커니즘을 수반하는 많은 상처 드레 싱 응용에서 증가하고 있다. 이상적인 상처 드레싱은 박테리아 감염으로부 터 상처를 보호하고, 촉촉하고 치유되는 환경을 제공해야 하며, 생체적합 성이 있어야 한다.[56,57] 앞서 언급한 키토산은 생체적합성, 생분해성, 지 혈성 및 반감염 활동, 상처치유를 가속화 하는 능력 등 상당한 특성 때문에 많은 연구자들로 하여금 상처 치료 드레싱으로의 활용이 보고되고 있다.

## 2.10 근적외선에 의한 가교제의 Diselenide 결합 분해

하이트로겔의 약물 방출 거동을 외부 자극에 의해 제어하기 위한 방법으 로는 pH, 빛, 초음파 등이 있다. 특히 UV 빛 자극을 통한 하이트로겔 약물 방출 프로세스는 자외선이 조직 깊숙히 침투하지 못해 인체에 손상을 줄 수 있다는 것이 보고되었다.[58] 이와 반대로 근적외선(NIR) 빛은 유해한 부작용 없이 약 3~5 mm 깊이의 체내 조직으로 침투할 수 있다. NIR 빛 반 응 하이트로겔을 생산하는 일반적인 방법은 산화 그래핀 나노시트와 탄소 나노튜브, 금 나노입자와 같은 NIR 흡수 물질을 사용하는 방법이 다.[59-61] 그러나 이러한 종류의 방법은 열 감응성 중합체에 대해서만 실 현 가능하며 NIR 조명이 꺼진 후에는 아무런 효과가 없었다.

인도시아닌 그린(Indocyanine green, ICG)은 NIR 빛을 흡수하고 활성산 소종(Reactive oxygen specious, ROS)을 생성할 수 있는 안전한 광 감응 성 물질이다.[62,63] 이 단계 이후 ROS는 약한 공유결합에 산화 손상을 일 으키며, 특히 낮은 결합에너지(172 kJ/mol)를 갖는 diselenide(-Se-Se-)결 합을 분해시킨다.[64]

따라서 diselenide 결합과 IEDDA 클릭 반응의 조합은 아주 간단하면서도 생체적합성을 가지며, 별다른 부산물이나 독성을 갖지 않는 키토산의 하이 드로겔의 특징을 그대로 살리면서도 약물 방출의 제어에 사용될 수 있는 유망한 전략이 될 수 있다.

# 제 Ⅲ장 실 험

## 3.1 시약

천연 유래 고분자 Chitosan(CS, low molecular weight, Mw=50-190 kDa, deacetylation degree = 93% caculated by 1H NMR)은 Sigma-Aldrich에 서 구매하였다. CS의 아민기에 개환 반응으로 결합시키기 위한 Carbic anhydride(CA, mixture of endo and exo, predominantly endo, 99%)는 ACROS Organics에서 구매하여 별도의 정제과정 없이 사용되었다. Selenium powder(Se, -325 mesh, 99.5%(Metals basis))와 4-Bromobutyryl chloride(4-BBC, 97%)는 Alfa Aesar에서 구매하였다. Sodium 98%)와 borohydride(NaBH4, powder, Tetrabutylammonium hydrogensulfate(TBA)(97%)는 Sigma-Aldrich에서 구매하였다. 테트라진-셀레늄 가교제를 만들기 위한 Methyltetrazine-amine (MeTz-Amine, HCl salt, 95%)는 Click Chemisty Tools에서 구매하였다. Ciprofloxacin hydrochloride monohydrate(CIP)(98%)는 TCI에서 구매하였다. 가교제 합 성을 위한 Tetrahydrofuran(THF, HPLC)은 SK Chemicals에서 구매하여 증류 과정을 거쳐 정제한 후 무수 상태로 사용하였다. 하 번의 Triethylamine(TEA, 98%)은 JUNSEI에서 구매하였다. 용매는 다른 시약과 용매들은 Analytical grade(HPLC)로 DUKSAN, JUNSEI에서 구매하여 별 도의 정제과정 없이 사용되었다.

#### 3.2 분석

분자의 구조를 해석하기 위한 양성자 퓨리에 변환 핵자기공명(NMR) 스 펙트럼은 400MHz JEOL NMR Spectomerter를 통해 얻어졌다. 시료의 작 용기와 반응도 등의 정보를 얻기 위한 적외선 분광분석(FT-IR) 스펙트럼 은 Potassium Bromide(KBr) Pellets을 만들어 Agilent Cary640 Spectrometer를 통해 얻어졌다. 하이드로겔의 횡단면 구조 분석을 위한 주 사전자현미경(SEM) 사진은 MIRA3 TESCAN을 통해 얻어졌다. 하이드로 겔의 팽윤도 분석을 위한 전자저울은 SCALTEC SPB31을 통해 얻어졌다. 하이드로겔의 CIP 약물전달 성능을 분석하기 위한 자외선-가시광선 (UV-vis) 스펙트럼은 Optizen POP UV-vis Spectrophotometer를 통해 얻 어졌다. 하이드로겔의 근적외선 조사 분석을 위해 808 nm 파장의 NIR-laser photo diode를 광원으로 사용하였고, 2 W/cm<sup>2</sup> 의 출력을 갖도 록 설정하였다.

3.3 합성 및 실험 요약



[그림 6] NIR-responsive chitosan-based hydrogel, Cs-Se Gel 합성



[그림 7] NIR-responsive chitosan-based hydrogel, Cs-Se Gel 실험 도식

## 3.4 Cs-Nb-COOH의 합성

다른 합성에 비해 절차가 간단하고, 정제과정을 간소화시키면서도 미반응 분자를 효과적으로 제거할 수 있는, 기존에 보고된 합성 방법에 따라 [그 림 6]과 같이 Norbornene-functionalized Chitosan 고분자를 합성하였 다.[65] 자력 교반 하에서 100 mL의 2 wt% 아세트산(AcOH) 수용액에 CS(1 g, 5.9 mmol)을 용해시켰다. 투명한 용액으로 모두 용해시킨 이후 CA(972 mg, 5.9 mmol)을 추가하여 50℃의 온도에서 48시간 동안 반응시 켰다. 48시간 이후 투석막(MWCO, cut-off 14 kDa)을 이용하여 5% NaCl 수용액으로 24시간 동안 1차 투석하였고, 증류수를 이용하여 48시간 동안 2차 투석하였다. 투석 이후 얻어진 물질을 회수하여 3일간 동결건조한 후 최종적으로 Cs-Nb-COOH를 얻었다.

## 3.5 Cs의 탈산화도와 Cs-Nb-COOH 치환도 분석

키틴의 탈아세틸화 반응으로 형성된 키토산 천연 고분자의 탈산화도 (Degree of deacetylation, DD, %)와 3.3의 합성 이후 노르보넨 치환도 (Degree of substitution, DS, %) 를 분석하기 위해 기존에 보고된 방법을 따라 1H NMR peak integrals을 이용하여 다음의 [식 1]과 [식 2]를 통해 얻어졌다.

[식 1] Degree of Deacetylation,  $DD = 1 - \frac{1}{1}$ 

# [식 2] Degree of Substitution, $DS = 1 - \frac{I_{Nb}}{I_{H_2}}$

where ICH3 is the integral of CH3 peak of acetyl group in GlcNAc(3H, orange highlight, see Fig 8.), INb is the integral of the alkene peak of norbornene (2H, blue highlight, see Fig 8.) and IH2 is the integral of H2 in GlcN, GlcNAc GlcN-Nb units (1H, green highlight, see Fig 8.)

## 3.6 y-BSeL의 합성

Selenolactones의 합성을 다루고 있는 기존의 보고된 합성 방법에 따라 [그림 6]과 같이 ɣ-BSeL이 합성되었다.[66] 질소 분위기의 자력 교반 하에 서 Se(5.92 g, 0.15 mol)와 50 mL의 증류수를 교반 시킨 후, 드로핑 깔때 기에 미리 50 mL의 증류수에 용해시켜 준비된 NaBH<sub>4</sub>(5.67 g, 0.15 mol) 수용액을 천천히 혼합시켰다. 주입 과정에서 발생하는 가스가 가스 분산 튜브를 타고 원활하게 빠져나올 수 있게 500 rpm의 빠른 교반 속도와 함 께 질소를 충분히 0℃에서 30분 동안 반응시켰다. 반응 이후 상 촉매인 Bu₄NHSO₄(0.96 g, 3.7 mol%)의 수용액과 톨루엔에 용해시킨 BBC(13.91 g, 0.15 mol) 용액을 드로핑 깔때기에 주입하여 NaSeH 혼합액과 천천히 혼합시켰다. 30분 동안 추가 교반 이후, 질소로 치환된 분위기를 유지하며 상온에서 12시간 동안 반응시켰다. 얻어진 혼합물 용액을 분액 깔때기로 옮겨 50 mL의 5% NaHCO<sub>3</sub> 수용액으로 씻어내고, MgSO₄를 사용하여 톨 루엔 혼합액 속의 물 분자를 제거했다. 여과된 혼합액 속의 톨루엔을 저압 증발시킨 후 수득한 용액으로부터 진공 증류를 통해 무색 투명한 액체인 γ-BSeL을 수득하였다. yield : 77%; bp 120-122℃/30 mmHg. 1H NMR (400 Mhz, Chloroform-d): δ 3.54 - 3.43 (m, 1H), 2.42 (td, *J* = 6.8, 1.5 Hz, 1H), 2.28 - 2.17 (m, 1H) [그림 10].

## 3.7 Se-MeTz의 합성

[그립 6]과 같이 자력 교반 하에서 정제된 THF 무수 용매 0.5 mL에 MeTz-Amine(261 mg, 1.1 mmol)과 TEA(0.334 g, 3.3 mmol)를 혼합하여 30분 동안 아민기의 염산염의 형태가 1차 아민으로 변하도록 반응시켰다. 반응 이후 3.3.3에서 합성된 γ-BSeL(149 mg, 1 mmol)을 THF 무수 용매 0.5 mL에 용해시켜 혼합물에 천천히 첨가하여 외부 공기에 노출된 상태로 12시간 동안 반응시켰다. 반응 이후 잔여 THF를 진공으로 제거하고, TEA 의 염산염을 제거하기 위해 5mL의 1N HCl 수용액을 첨가하여 1시간 동안 교반하였다. 교반 이후 혼합액을 여과하여 증류수로 씻어낸 보라색 고체들 을 진공 건조하여 수득하였다. yield : 89%; 1H NMR (400 Mhz, Dimethyl Sulfoxide-d6): δ 8.52 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H), 8.42 - 8.38 (m, 2H), 7.51 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 4.38 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H), 2.98 (s, 3H), 2.94(t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 2.30 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.97 (p, *J* = 7.3 Hz, 2H) [그림 10].

## 3.8 Cs-Se Gel의 제조

[그림 7]에 나타난 것과 같이 클릭 반응을 통한 키토산 고분자 주쇄의 가 교 결합을 위해 용매 Dimethyl Sulfoxide(DMSO)에 Cs-Nb-COOH를 녹인 용액과 Se-MeTz를 녹인 용액을 상온에서 혼합하여 12시간 동안 방치시켰 다. 이 과정에서 하이드로겔의 물리-화학적 특성을 비교하기 위해 Cs-Nb-COOH의 노르보넨 치환기와 Se-MeTz의 메틸-테트라진 작용기의 몰 비율을 고려하여 세 가지의 다른 조건으로 구성하였다. 350 µL의 DMSO에 8 mg Cs-Nb-COOH를 용해하여 준비되었고, 50 µL의 DMSO에 Se-MeTz 작용기를 각각 몰 비율로 10/10, 10/7, 10/4(Nb-COOH/MeTz)만 큼 용해하여 준비되었다. 졸-겔 상 변화는 반응시간 이후 반응 용기를 뒤 집었을 때 모두 겔화가 완료되었음을 확인하였다. 이후 용기에서 수득한 겔을 투석막(MWCO, Cut-off 14 kDa)을 이용하여 증류수로 투석시켰다. 투석 이후 얻어진 물질을 회수하여 3일간 동결건조한 후 최종적으로 건조 상태의 Cs-Se Gel을 얻었다.

## 3.9 겔 함량 측정

3.7에서 얻어진 건조상태의 Cs-Se Gel을 다시 DMSO에 3일 동안 팽윤과 세척 과정을 거쳐 미반응의 고분자와 가교제를 제거시켰다. 이후 다시 투 석과 동결건조 과정을 거쳐 얻은 건조상태의 Cs-Se Gel의 무게를 측정했 다. 각각의 다른 몰 비율로 준비된 Cs-Se Gel의 함량 측정의 결과는 [표 1]과 같이 나타났고, 미반응 고분자와 가교제의 무게를 고려한 겔 함량은 [식 3]과 같이 계산되었다.

CH OL N

GelFeed ratio Nb-COOH/MeTzaGel Content (%)bCs-Se Gel110/1094Cs-Se Gel210/793Cs-Se Gel310/491

[표 1] Cs-Se Gel의 제조 비율과 함량

<sup>a</sup>Theoretical mol equivalent of norborene-carboxylic acid and methyl-tetrazine groups.

<sup>b</sup>Measured by a general gravimetrical method.

## [식 3] Gel Content (%) = $W_1/W_0 \times 100$

where W0 is the primary weight of the dry hydrogels and W1 is the dry weight of hydrogels after swelling and washing with DMSO. The test was conducted in triplicate.

## 3.10 팽윤도 분석

Cs-Se Gel 의 팽윤도 분석은 마이크로 저울을 통한 무게 분석으로 실시 하였다. 납작한 원기둥 형태의 건조된 Cs-Se Gel을 PBS에 담갔다. 가교도 차이에 따른 팽윤도 분석을 위해 Cs-Se Gell/2/3을 각 조건에 적용시켰으 며, 이때 사용된 PBS는 0.01 M 농도와 pH 7.4의 산도를 가지도록 초기에 준비하였고, AcOH를 사용하여 세 가지의 pH 조건(pH 3.7/5.2/7.4)에서 분 석하였다. 팽윤된 하이드로겔은 기존에 보고된 방법대로 특정 시간별로 PBS 용액에서 건져내어 여과지에 표면의 용액을 제거한 후 마이크로 저울 에서 무게를 측정하였다.[66] 각 PBS 용액은 24시간마다 새로운 PBS 수용 액으로 교체되었다. 측정은 세 번씩 반복되었다. 각 하이드로겔의 팽윤도는 아래 [식 4]와 같이 계산되었다.

[식 4] Swelling ratio (%) =  $(W_s - W_d)/W_d \times 100$ 

where  $W_s$  is the weight of swollen hydrogels and Wd is the weight of finally dried hydrogels.

### 3.11 횡단면 표면분석

Cs-Se Gell/2/3의 내부 형태를 분석하기 위해 팽윤 평형상태에 도달한 하이드로겔을 동결건조하였다. 이후 액체질소에 담가 저온으로 굳혀서 횡 단면(Cross-section)이 보이도록 절단시켰다. 샘플을 관찰하기 위해 MIRA3 TESCAN SEM 장비를 사용하였다.

## 3.12 CIP 검량선

하이드로겔의 약물 방출 특성을 평가하기 위해 항생제 약물 중 하나인 시 프로플록사신 염산염(Ciprofloxacin hydrochloride, CIP)을 사용하였다. 다섯 가지 농도 CIP/PBS의 UV-vis 흡광도를 분석하여 각 농도에서 나타내는 흡광도를 그래프로 표현하였다. 이때 PBS는 pH 3.7, 5.2의 두 가지 조건에 서 측정하였으며, 각 산도별 CIP 흡광도의 파장별 peak 값의 변화에 근거 하여 측정되었다. UV-vis 측정 파장범위는 CIP의 특징 peak를 관찰하기에 최적화된 200 ~ 400 nm에서 측정되었다. 그래프에서의 직선은 검량 결과 를 나타내는 추세선이며, 이 추세선의 함수식으로부터 각 농도에서 용해되 어 있는 CIP의 무게를 계산할 수 있었다.

### 3.13 ICG/CIP 탑재

CIP 약물의 사후 탑재과정은 기존의 보고된 방식을 따랐다.[68] 투석 이 후 동결 건조된 Cs-Se Gel1(Nb-COOH/MeTz 10/10 feeding ratio)을 1 mg/mL 농도의 CIP/PBS 용액 1 mL에 팽윤시켜 약물을 하이드로겔 내부 로 탑재했다. 이때 PBS는 pH 3.7로 준비되어 용매로 사용되었다. ICG의 탑재를 위해서는 CIP와 함께 ICG를 1 mL의 PBS에 1 mg만큼 추가하여 용해시킨 이후 Cs-Se Gel1을 팽윤시켰다.

## 3.14 근적외선 제어 CIP 방출 거동 분석

3.12에서 탑재된 CIP 약물의 방출 거동을 분석하기 위해 세 가지의 PBS pH 3.7, 5.2 조건에서 분석되었다. 팽윤 과정을 거쳐 CIP가 탑재된 원기둥 형 Cs-Se Gell을 증류수에 헹궈내고 바이알 속 15 mL의 PBS에 넣었다. 외부 환경을 차단하기 위해 커버를 씌워 암전 상태에서 보관되었고, 온도 조건은 체온과 유사하토록 37℃의 온도를 유지시켰다. 근적외선 조사 시에 는 808 nm의 레이저 다이오드 광원을 사용하여 15분간 반사판을 대고 샘 플에 조사시켰고(ON), 15분 이후에는 다른 샘플들과 같이 커버가 씌워진 상태로 보관되었다(OFF). 바이알에서 특정 시간마다 3mL의 PBS 용액을 추출하여 UV-vis 홉광도 측정을 통해 각 시간 간격마다 방출되는 CIP의 무게를 3.11의 검량선(추세선) 함수식에 대입하여 분석할 수 있었다. 추출 이후에는 3 mL의 순수한 PBS 추가하여 PBS 용액의 전체 부피를 유지시 켰다. 희석되는 효과는 용액이 보충된 것을 각각 고려하여 재계산하였다. 분석을 위한 측정은 각각 3번씩 수행되었다. CIP의 방출 퍼센트는 누적 계 산법으로 계산되었다.

## 제 Ⅳ장 결과 및 고찰

#### 4.1 Cs-Nb-COOH의 합성

아마이드 결합은 하이드록실 그룹에 비해 아민의 높은 친핵성을 이용하여 키토산 주쇄의 작용기를 기능화하는 데 일반적으로 사용된다. 종래의 키토 산의 아민기를 노르보넨 작용기로 기능화하는 방법으로는 Norbornene-carboxvlic acid를 아민기와 Coupling 반응을 하기 위한 Coupling agent = 1-ethyl-3-(3(dimethylamino)-propyl)carbodiimide(EDC), N-hvdroxvsuccinimide(NHS)와 같은 agent가 사용되었다. 하지만 반응 이 후 키토산의 정제과정에서 투석이나 침전 여과 이후에도 미반응 EDC/NHS가 그대로 존재하는 등의 문제점이 발생한다. 덧붙여 기존의 보 따르면. 이렇게 만들어진 Norbornene functionalized 고에 Chitosan(Cs-Nb-H)은 산성 조건이나 서로 다른 용해를 돕는 시약 혹은 공용매의 사용에도 낮은 용해성을 나타내고, 이는 키토산의 아민기가 아마 이드 결합으로 변환됨에 따른 양전하 감소와 함께 노르보넨 작용기의 결합 에 의해 소수성이 증가한 결과임이 예상된다. 이를 우회하기 위해 보고된 방법대로 키토산의 아민 그룹과 반응하기 위해 Carbic Anhydride(CA)를 사용하여 Coupling agent의 사용 없이도 개환 반응을 통해 아마이드 결합 을 형성하여 Cs-Nb-COOH를 합성할 수 있었다.[65] 합성 절차는 [그림 6] 에 나타나 있다. 키토산 주쇄에 존재하는 아민기의 몰수와 개환 반응을 유 도하기 위한 CA의 몰수의 비율을 고려하여 이론적으로 100%(1:1) 치확이 되게끔 키토산 용액에 CA를 첨가하였다.

## 4.2 Cs의 탈산화도와 Cs-Nb-COOH 치환도 분석

키틴으로부터 탈 아세틸화에 의해 형성된 키토산 주쇄의 탈 산화도는 [그 림 8]에서 나타난 <sup>1</sup>H NMR Spectra peaks의 Integral을 사용하여 [식 1]를 따라 계산되었을 때 약 92%의 탈 산화도를 갖는 것으로 나타났다.



[그림 8] Cs(위)와 Cs-Nb-COOH(아래)의 <sup>1</sup>H NMR Spectra

이는 키토산 주쇄의 아민기와 연결된 탄소에서 존재하는 수소들의 피크 적분 값(초록색 하이라이트, 1.00 고정) 대비 아세틸기 끝의 CH3 수소 피 크의 적분 값(주황색 하이라이트, 0.19)을 3으로 나누어 1에서 뺄셈한 값이 퍼센트로 계산되었다. 한편 CA와 -NH<sub>2</sub>의 반응에 의한 -Nb-COOH의 작 용기 치환도는 [그림 8]에 나타난 결과값을 사용하여 [식 2]에 따라 계산되 었을 때 약 32.5%의 치환도를 갖는 것을 알 수 있었다. 키토산 주쇄의 아 민기와 연결된 탄소에서 존재하는 수소들의 피크 적분 값(초록색 하이라이 트, 1.00 고정)대비 노르보덴기의 이중결합 위치에서의 수소 2개가 형성하 는 피크의 적분 값(파란색 하이라이트, 0.65)을 2로 나눈 값을 퍼센트로 계 산하였다. 이는 기존에 보고된 Cs-Nb-COOH의 합성 결과와 일치하는 것 으로 나타났다.[65]



[그림 9] Cs, Cs-Nb-COOH, Se-MeTz, Cs-Se Gel 1의 FT-IR

Spectra

[그림 9]에서 나타난 FT-IR Spectra를 통해 확인한 결과 Cs의 작용기인

하이드록실기(-OH)와 아민기(-NH<sub>2</sub>)의 stretching vibrations에 의해 3429 cm-1의 피크가 나타났다. 1654 cm<sup>-1</sup>와 1594 cm<sup>-1</sup> 에서 나타난 피크는 각 각 - CONH<sub>2</sub>와 -NH<sub>2</sub> 작용기에 기인한다. 합성 과정으로부터 Cs에서 작용 기가 32.5% 치환된 Cs-Nb-COOH에서는, 새로 생겨난 아마이드 결합으로 부터 기인한 C=O stretching 피크가 1764 cm<sup>-1</sup>에서 관찰되었으며, 1693 cm<sup>-1</sup>과 1389 cm<sup>-1</sup>에서 노르보넨기 옆에 형성된 COO-기의 asymmetric, symmetric stretching 피크가 나타났다.

## 4.3 y-BSeL의 합성

[그림 10]에서 나타난 오각형의 락톤 형태에 탄소 대신 셀레늄 원자가 1 개 포함되어 있는 y-BSeL의 합성을 위해 상업적으로 이용 가능한 알킬 할라이드 브롬카복실릭 염소화물 중 4-BBC가 사용되었다. 셀레늄 분말을 증류수에서 NaBH4 이온과 반응시켜 NaSeH 이온을 형성시킨 이후 톨루엔 용매에 용해시킨 4-BBC의 브로민과 염소의 친핵성 치환 반응에 의해 락 톤 형태의 형성을 유도했다. 질소 분위기 하의 실온에서 톨루엔과 물의 상 촉매로서 TBA 촉매가 사용되어 12시간 반응 이후 Selenolactones의 한 종 류인 y-BSeL이 형성되었다. [그림 10]에서 표현된 <sup>1</sup>H NMR 스펙트럼에서 y-BSeL에 존재하는 2/2/2개의 수소 peak가 각각 3.54 - 3.43, 2.42, 2.28 -2.17 ppm에서 같은 integral 값을 갖는 것을 확인할 수 있었다.



[그림 10] y-BSeLt(위)와 Se-MeTz(아래)의 1H NMR Spectra

Ot I

4.4 Se-MeTz의 합성

[그림 6]과 같이 NaSeH로부터 쉽게 합성된 y-BSeL과 1차 아민을 갖는 MeTz-Amine 사이의 Amine-Oxidation Coupling 반응을 통해 중심부에 Diselenide(-Se-Se-)결합을 갖고 양쪽으로 아마이드 결합이 형성되어 Se-MeTz가 합성되었다. 이 단계의 유기합성 프로토콜은 매우 간단히 THF 용매에서 산화 결합을 위해 외부 공기에 노출시킨 채 상온 상태를 유지하며 y-BSeL과 MeTz-Amine의 One-Pot 합성에 의해 Se-MeTz의 구조를 형성시킬 수 있는 장점과 동시에 98%의 매우 높은 수득률과 진공 건조 및 여과 이외에 다른 복잡한 정제과정이 전혀 필요하지 않은 장점을 갖는다. 가존의 x-BSeL 사용 - NH2기와의 산화결합을 다루는 보고에서 다룬 결과를 반영하여 x-BSeL 대비 MeTz-Amine의 양을 1.1배 과량으로 사용하여 반응 속도를 높였다. MeTz-Amine은 Tetrazine의 낮은 안정성과 -NH2기의 높은 반응성 때문에 상업적으로 염산염(NH3+Cl-)의 형태로 유 통되는 제품을 사용하였는데, 이를 1차 아민 형태로 사용하기 위해 MeTz-Amine 대비 3배의 몰 비율을 갖는 과량의 TEA를 사용하였다. TEA는 염산염과 만나 TEA·HCl의 형태로 변화하기 때문에, 추후 여과 과 정에서 0.1 M HCI 수용액에 녹아 쉽게 제거될 수 있었다. [그림 10]에서 표현된 <sup>1</sup>H NMR 스펙트럼에서 8.52 ppm에는 - NH-의 2H peak, 8.42 -8.38 ppm에서 벤젠 고리의 테트라진과 가까운 =CH-의 4H peak, 7.51 ppm에서 벤젠 고리의 아마이드 결합과 가까운 =CH-의 4H peak, 4.38 ppm에서 아마이드 결합과 가까운 -CH2-의 4H peak, 2.98 ppm에서 테트 라진 끝 -CH3의 6H peak, 2.94, 2.30, 1.97 ppm에서 각각 셀레늄과 아마이 드 결합 사이의 -CH2-의 4H peak의 integral 값이 목표한 y-BSeL의 구 조로부터 예측할 수 있는 결과와 동일한 것을 확인하였다.

[그림 9]에서 나타난 FT-IR Spectra를 확인한 결과 3291 cm-1에서 2차 아민의 stretching 피크가 존재하는 것을 확인할 수 있었으며, 방향족 고리 내부의 C-H stretching 피크인 3076 cm-1를 확인할 수 있었다. 또한 테트 라진 고리 내부 아마이드 결합의 특징피크인 C=N과 C-N 피크를 1641 cm-1과 1550 cm-1에서 확인할 수 있었다. 1406 cm-1에서는 테트라진 끝 의 - CH3기에 의해 생겨난 C-H bending vibration 피크가 나타났다. 마지 막으로, 셀레늄 결합이 정상적으로 일어나 -C-Se- 결합의 808 cm-1의 특 징 피크가 생겨난 것을 확인할 수 있었다.

- 28 -

## 4.5 Cs-Se Gel의 제조

가교도 차이를 위해 서로 다른 작용기(-Nb-COOH/-MeTz) 비율로 구성 된 Cs-Se Gel1, Cs-Se Gel2, Cs-Se Gel3 은 테트라진과 노르보넨 사이의 IEDDA "click" 반응에 의해 형성되었다. 가교 반응은 그림 2와 같이 형성 되었다. 가교도 차이에 따라 달라지는 하이드로겔의 성질에 대해 조사하기 위해 세 가지 종류로 구성된 Cs-Se Gel 은 [표 1]과 같이 정리되었다. 겔 함량은 미반응 Cs-Nb-COOH/Se-MeTz를 효과적으로 제거하기 위해 졸-겔 전이 가교반응에서 사용한 DMSO 용매에서 다시 수행되었다. 이 과정 에서 가교결합된 Cs-Se Gel 매트릭스 내부에 존재하는 미반응 Cs-Nb-COOH와 Se-MeTz가 용해되어 밖으로 제거되었고, 이에 따른 전 후 무게 변화를 퍼센트로 나타내었다. [표 1]에서 다룬 것과 같이 모든 구 성에서의 겔 함량 변화는 90-100% 사이에 분포하는 것을 알 수 있으며 이 는 가교 결합을 통한 졸-겔 전이로 Cs-Se Gel을 형성하는 과정이 성공적 인 전략임을 뒷받침해 주었다. 특히 화학적 가교 결합의 한 종류인 노르보 넨-테트라진 사이의 IEDDA 반응은 인체 유해한 금속 촉매 등의 사용 없 이도 높은 반응성을 갖는 것으로, 천연 고분자 키토산 하이드로겔의 인체, 무해성을 그대로 유지할 수 있는 장점을 갖는다.[11]

[그림 9]에서 나타난 FT-IR Spectra를 통해 Cs-Se Gel은 Cs-Nb-COOH 대비 Se-MeTz 가교제가 포함하는 -C-Se- 결합의 808 cm-1의 특징 피크 가 생겨난 것을 확인할 수 있었다.

#### 4.6 팽윤도 분석

가교도 차이에 따른 Cs-Se Gel 1/2/3 각각의 팽윤도와 그 특성은 그래프 3에 정리된 형태의 경향성을 나타냈다. 팽윤도 분석은 건조상태로 준비된 Cs-Se Gel 1/2/3은 각각 PBS pH 3.7/5.2/7.4에서 5일간의 특정 주기별(30 분, 60분, 90분, 120분, 150분, 180분, 4시간, 5시간, 6시간, 12시간, 1일, 2일, 3일, 4일, 5일) 무게 변화 측정으로 결정되었다.



[그림 11] (a) pH = 3.7, (b) pH = 5.2, (c) pH = 7.4의 세 가지 PBS 조건에서 Cs-Se Gel 1/2/3의 팽윤도 분석

대약

[그림 11]에서 세 가지 PBS 조건에서 모두 가교도가 낮은 하이트로겔일 수록 팽윤도가 높아졌다. 팽윤도의 증가 속도는 12시간까지 빠르게 증가하 고, 1-2일차 이후 팽윤 평형에 가까워지는 경향을 보였다. PBS 7.4에서 Cs-Se Gel 1/2/3은 12시간 이후 거의 팽윤 평형에 가까운 것을 알 수 있 고, 이는 높은 pH값, 즉 낮은 산도 조건에서 키토산 주쇄의 치환되지 않은 아민기가 양전하를 띄지 않아 수용액에 대한 용해성이 낮으므로 팽윤도가 낮고, 팽윤 평형에 도달하는 속도가 빠른 것으로 예측된다. 반면, PBS 5.2 에서 3.7으로 높은 산도 조건으로 갈수록 아민기가 양전하를 띄게 되면서 수용액에 대한 용해성이 높아지고 팽윤도가 높아지며, 팽윤 평형에 도달하 는 속도가 느려지는 경향을 알 수 있었다. 가교도가 가장 높은 Cs-Se Gel 1은 모든 PBS 산도 조건에서 팽윤도가 가장 낮았고, 가교도가 가장 높은 Cs-Se Gel 3은 팽윤도가 가장 높은 것으로 나타났다.

## 4.7 횡단면 표면분석

횡단면의 표면분석을 위해 SEM을 사용해 내부 구조를 촬영하였다. [그림 12]에서 나타난 것과 같이 SEM 횡단면 사진은 Cs-Se Gel 1/2/3의 가교도 차이에 따른 하이드로겔 내부 구조를 나타내었다.



[그림 12] (a) Cs-Se Gel 1, (b) Cs-Se Gel 2, (c) Cs-Se Gel 3의 내부 횡단면 SEM 사진

특히 Cs-Se Gel 1/2/3은 내부 구조에서 서로 다른 크기의 다공성 (porosity)을 갖는 것으로 나타났다. 가교도가 가장 높은 Cs-Se Gel 1의 기공(pore)의 크기가 가장 큰 것으로 나타났으며, 가교도가 가장 낮은 Cs-Se Gel 3의 기공 크기가 가장 작은 것으로 나타났다. 이는 Cs-Nb-COOH와 Se-MeTz의 가교결합에 사용된 화학적 메커니즘에서, 노 르보넨과 테트라진 사이의 IEDDA 반응으로 형성된 N<sub>2</sub> 가스가 Cs-Se Gel 내부에 갇혀 형성시켜 발생한 구조적 특징임을 예측할 수 있다. 따라서, 가 교도가 가장 높은 Cs-Se Gel 1에 가까울수록 발생되는 N<sub>2</sub> 가스의 양이 많 아 기공의 크기가 크고, 다공성이 낮은 것을 알 수 있었다. 반면 가교도가 가장 낮은 Cs-Se Gel 3에 가까울수록 발생되는 N<sub>2</sub> 가스의 양이 작아 기공 의 크기가 작고, 다공성이 높은 것을 알 수 있었다.

## 4.8 CIP 검량선

약물 CIP의 UV-vis 특징 peak는 200-400 nm 사이에서 관찰되었으며, 흡 광도가 최댓값(Abs<sub>max</sub>)일 때 파장(λ<sub>max</sub>)은 그림 13에서와 같이 272-279 nm 사이로 나타났다. λ<sub>max</sub>에서의 Abs<sub>max</sub>를 각 농도별(2.5/5/10/15/20 µg/mL)로 측정하여 추세선을 적용한 결과, PBS pH 3.7/5.2/7.4 각각의 1차 방정식의 농도-흡광도 함수를 얻게 되었다. 이를 활용하여 미지의 CIP 농도를 가진 PBS 수용액에 녹아 있는 CIP의 양을 계산하였다.

ATIONAI



[그림 13] (a) pH = 3.7, (b) pH = 5.2 의 두 가지 PBS 조건에서 CIP의 검량선(추세선) 함수 및 결정계수 R<sup>2</sup>

그림 0(a), PBS 3.7에서의 함수 y=0.116x+0.2058, 결정계수 R<sup>2</sup>=0.9958 으로 나타났다. 그림 0(b), PBS 5.2에서의 함수 y=0.10333x+0.2372, 결정계수 R<sup>2</sup>=0.9953 으로 나타났다. 같은 농도의 CIP/PBS 용액에서도 흡광도가 서 로 다른 값을 나타내었고, PBS의 산도별로 검량선(추세선) 함수도 조금씩 다른 기울기를 가진 일차함수의 형태로 결정되었다. 결정계수 R<sup>2</sup> 값은 상 관계수 R의 제곱으로, 0과 1 사이의 값을 나타내며 이 계수의 값이 1에 가 까울수록 추세선의 신뢰성이 높음을 나타내는데, R<sup>2</sup> 값이 모두 1에 근접한 값으로 나타났음을 확인했다.

## 4.9 근적외선 제어 CIP 방출 거동 분석

근적외선 응답특성으로 인해 Diselenide 결합을 포함하는 가교제로 가교 결합된 키토산 하이드로겔 Cs-Se Gel은 체내 혹은 체외의 조건에서 생물 체에 전달되는 약물 방출 기능을 가질 것이 기대되었다. 방출 거동 분석용 샘플로 가장 높은 가교도를 가진 Cs-Se Gel 1을 채택하였다. 방출 거동 분석용 약물은 광범위한 항생 효능을 갖는 CIP로 채택하였다. CIP에는 카 복실기가 있고, ICG는 Zwitterionic amphiphilic 분자로서 Cs-Se Gel의 키 토산 주쇄에 존재하는 미반응 아민기의 양전하 이온뿐만 아니라 물 분자와 상호작용이 가능하여, 약물 탑재 용액인 PBS 수용액과 하이드로겔 매트릭 스에 잘 분포할 수 있다.[49] CIP/ICG의 탑재는, CIP/ICG를 PBS(pH 3.7, 0.01 M)에 용해시켜 준비된 용액 L3(Loading Solution pH 3.7)에 건조된 Cs-Se Gel 1을 동일한 무게로 준비하여 팽윤시키는 포스트-로딩 (Post-loading) 방식으로 탑재되었다. 탑재의 결과 [그림 14(a)]와 같이 Cs-Se Gel 1에는 3 mg의 약 64 μg의 CIP가 탑재되는 것으로 나타났다. 근적외선 제어 CIP 방출 거동 실험은 외부온도 37℃에서 PBS(pH 3.7, 5.2 각 0.01 M)에서 수행되었다. R3(Release Solution pH 3.7), R5(Release Solution pH 5.2)로 구분된 PBS 용액의 세 가지 조건을 따라 [그림 14(b), (c)]와 같이 CIP 방출 거동의 경향성이 관찰되었다.



[그림 14] (a) Cs-Se Gel 1에 탑재된 CIP의 질량, (b) R3(Release Solution pH 3.7), (c) R5(Release Solution pH 5.2) 두 가지 PBS 조건에서 Cs-Se Gel 1의 CIP 방출 거동 및 NIR 제어

PBS 조건 L3에서 Cs-Se Gel 1에 탑재된 CIP는 각각의 용액 R3, R5에 서 경향성을 가지는 CIP 방출 거동을 나타내었다. 그림 0(a)에서 CIP가 탑 재된 Cs-Se Gel 1의 방출 거동을 실험하는 PBS 산도 조건 R3, R5의 차이 는 R3의 조건에서 비교적 완만한 방출 거동을 나타내는 것으로 나타났고, R5의 조건에서 비교적 빠른 방출 거동을 나타내는 것을 알 수 있었다. 특 히 R3의 조건에서는 방출 거동 실험 4일 경과 후에도 안정적으로 약물이 천천히 방출되고 있는 것을 알 수 있으며, R5의 조건에서는 약물이 더욱 이른 시간에 모두 방출되는 것을 알 수 있었다. 이 경향성은 팽윤도 분석 의 결과와 동일한 이유로, PBS 3.7에서 5.2로 낮은 산도 조건으로 갈수록 Cs-Se Gel 고분자 주쇄의 치환되지 않은 아민기가 양전하를 잃게 되면서 수용액에 대한 용해성이 낮아지고 팽윤도가 낮아지는 원인에서 기인한 것 으로 예측할 수 있다. [그림 14(b)]에서 근적외선 조사에 의한 방출 거동의 변화는 R3 조건에서 기존 L3/R3 하이드로겔의 조건을 변화시켜 조사되었 다. CIP의 탑재 시, CIP 1 mg/mL농도의 L3에 CIP와 동일한 양 만큼의 ICG를 용해 시킨 후 팽윤시킨 하이드로젤을 R3에 투입하였고, 특정 시간 마다 15분간 808 nm의 근적외선을 조사하여 L3/R3 /ICG +NIR 조건을 형 성시켰다. 반면, ICG 없이 근적외선만 동일한 조건으로 조사한 L3/R3 +NIR 조건을 형성시켜 -Se-Se- 결합의 분해에 작용하는 ICG의 유무가 미치는 영향을 비교했다. 이때 근적외선 조사는 12시간 직후/2일 차 직후 로 두 차례에 걸쳐 15분간 조사되었으며, ICG의 유무와 근적외선 조사로 인한 기존 L3/R3와의 흡광도 차이와 방출량 차이를 확인했다. 누적계산법 으로 계산된 CIP의 방출 퍼센트에서 L3/R3 /ICG +NIR의 CIP 방출 퍼센 트는 12시간 직후 근적외선 조사를 통해 약 13%만큼 일시적으로 크게 증 가하였고, 2일 차 직후 근적외선 조사를 통해 약 8%만큼 일시적으로 크게 증가하는 것으로 나타났다. 이는 근적외선 조사를 통해 ICG가 활성산소종 (ROS)을 형성시켜 -Se-Se- 결합을 분해하여 나타난 현상이었다. 반면, ICG가 없는 L3/R3 +NIR도 근적외선 조사 시 CIP의 방출 퍼센트가 소폭 증가하는 것을 알 수 있는데, 이는 근적외선의 광온효과에 의해 R3 용액과

Cs-Se Gel에 전달되는 온도가 상승한 것에서 기인한 결과임을 예측할 수 있다. R5 조건에서의 기존 L3/R5 하이드로겔의 조건을 변화시킨 L3/R5 /ICG + NIR, L3/R5 + NIR 역시 6시간 직후/1일 차 직후로 두 차례에 걸 쳐 15분간 근적외선을 조사하였으며, 동일한 효과를 나타냈다. 하지만, 아 민기의 양성자화가 더 큰 R3 조건에서 이 효과는 더욱 크게 나타나는 것 으로 판단된다.



## 제 V 장 결 론

낮은 독성, 면역반응 활성, 높은 생체 적합성 등의 장점을 가진 천연 유래 고분자 키토산을 활용한 Cs-Se Gel은 - Nb-COOH/-MeTz 사이의 iEDDA click 반응을 통해 손쉽게 제조되었다. 기능화된 키토산 고분자 Cs-Nb-COOH는 Cs의 -NH2와 CA의 개환 반응으로 별도의 Coupling Agent 없이도 32.5%의 높은 치환도를 가지면서도 손쉽게 합성되었다. 가 교 결합에 사용되는 Se-MeTz는 전구체 v-BSeLt로부터 간단한 정제과정 만으로도 쉽게 합성되었다. Cs-Se Gel은 - Nb-COOH/-MeTz 비율로 10/10, 10/7, 10/4의 비율로 가교도를 조절하여 Cs-Se Gel 1/2/3으로 각각 준비되었고, 가교도에 따른 하이드로겔의 특성은 팽윤도 분석과 SEM 횡단 면 분석을 통해 특성 차이가 확인되었다. 건조된 하이드로겔에 CIP를 탑재 한 이후 약물 방출 거동을 확인하였고, 이는 탑재 조건에서 PBS 3.7의 조 건에서 각각 진행되었으며 방출 조건으로는 PBS 3.7 및 5.2 각 산도 조건 별로 나타난 결과치는 키토산 주쇄에 존재하는 아민기의 양전하 유무에 따 라 다른 결과를 나타냈다. 또한 근적외선 조사에 의해 약물 방출 거동을 특정 시간별로 조절할 수 있음을 확인하였다. 따라서 본 연구에서 제시한 약물 방출 시스템은 근적외선을 사용하여 체내로 전달되는 약물의 양을 조 절할 수 있는 키토산 하이드로겔으로, 근적외선 조사가 가능한 신체 부위 에서 상처 치유 드레싱 등의 생체적합 하이드로겔 약물전달 전략이 될 수 있다.

# 제 Ⅵ 장 참고 문헌

[1] Tønnesen, H. H. and Karlsen, J. (2002), Alginate in drug delivery systems. Drug Dev. Ind. Pharm. 28, 621–630.

[2] F. H. Silver and C. Doillonm (1989), "Biocpmpatibility. Interactions of Biological and Implantable Materials", VCH Publ. Inc., New York.

[3] N. A. Peppas (1986, 1987), "Hydrogels in Medicine and Pharmacy", ed. Boca Raton, Vol. I, II, III, CRC Press. Inc., Florida.

[4] Zhang Y.S., Khademhosseini A. (2017), Advances in engineering hydrogels. Science., 356, eaaf3627.

[5] Ahmadi F., Oveisi Z., Samani S.M., Amoozgar Z. (2015), Chitosan based hydrogels: characteristics and pharmaceutical applications.Res. Pharm. Sci., 10, 1–16.

[6] Nguyen T.H.M., Abueva C., Van Ho H., Lee S.-Y., Lee B.-T. (2018), In vitro and in vivo acute response towards injectable thermosensitive chitosan/TEMPO-oxidized cellulose nanofiberhydrogel. Carbohydr. Polym., 180, 246–255.

[7] Elieh–Ali–Komi D., Hamblin M.R. (2016), Chitin and chitosan: production and application of versatile biomedical nanomaterials.Int. J. Adv. Res., 4, 411–427.

[8] Choi C., Nam J.-P., Nah J.-W. (2016), Application of chitosan and chitosan derivatives as biomaterials. J. Ind. Eng. Chem., 33, 1-10.

[9] Muya F.N., Sunday C.E., Baker P., Iwuoha E. (2016),

Environmentalremediation of heavy metal ions from aqueous solution through hydrogel adsorption: a critical review, Water. Sci. Technol., 73, 983–992.

[10] Salma, S. A., Patil, M. P., Kim, D. W., Le, C. M. Q., Ahn, B.-H., Kim, G.-D. (2018), Near-infrared light-responsive, diselenide containing core-cross-linked micelles prepared by the Diels-Alder click reaction for photocontrollable drug release application, Polymer Chemistry, 9, 4813-4823

[11] D.S.B. Anugrah, K. Ramesh, M. Kim, K. Hyun, K.T. Lim (2019), Near-infrared light-responsive alginate hydrogels based on diselenide-containing cross-linkage for on demand degradation and drug release, Carbohydrate Polymers, 223, 115070.

[12] Ahmed, E. M. (2015). Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review, Journal of Advanced Research, 6(2), 105–121.

[13] Jaya kumar, R., Prabaharan, M., Sudheesh Kumar, P. T., Nair, S. V., & Tamurac, H. (2011), Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications, Biotechnology Advances, 29(3), 322–337.

[14] Ueno, H., Mori, T., & Fujinaga, T. (2001), Topical formulations and wound healing applications of chitosan, Advanced Drug Delivery Reviews, 52(2), 105–115.

[15] Hennink, W. E., & Nostrum, C. F. (2002), Novel crosslinking methods to design hydrogels, Advanced Drug Delivery Reviews, 54(1), 13–36.

[16] Calo, E., & Khutoryanskiy, V. V. (2015), Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products, European

#### Polymer Journal, 65, 252-267.

[17] Chung, L. Y., Schmidt, R. J., Hamlyn, P. F., Sagar, B. F., Andrews, A. M., & Turner, T. D. (1994), Biocompatibility of potential wound management products: Fungal mycelia as a source of chitin/chitosan and their effect on the proliferation of human f1000 fibroblasts cultur. J of Biomecical Materials Research, 28, 463–469.

[18] Souza, R. D., Zahedi, P., Allen, C. J., & Miller, M. P. (2009), Biocompatibility of injectable chitosan-phospholipid implant systems, Biomaterial, 30(23-24), 3818-3824.

[19] Goncalves Ferreira, M. O., Ribeiro Leite, L. L., Lima, I. S., Medeiros Barreto, H., Cunha Nunes, L. C., Ribeiro, A. B. (2016), Chitosan hydrogel in combination with nerolidol for healing wounds, Carbohydrate Polymers, 152, 409–418.

[20] Croisier, F., & Jerome, C. (2013), Chitosan-based biomaterials for tissue engineering, European Polymer Journal, 49(4), 780–792.

[21] Zhou, Y., Zhao, Y., Wang, L., Xu, L., Zhai, M., & Wei, S. (2012), Radiation synthesis and characterization of nanosilver/gelatin/carboxymethyl chitosan hydrogel, Radiation Physics and Chemistry, 81(5), 553–560.

[22] Arias, J. L., Neira-Carrillo, A., Arias, J. I., Escobar, C., Bodero, M., David, M. (2004), Sulfated polymers in biological mineralization: A plausible source for bio-inspired engineering, Journal of Materials Chemistry, 14, 2154–2160.

[23] Arrouze, F., Essahli, M., Rhazi, M., desberieres, J., & Tolaimate, A. (2017), Chitin and chitosan: Study of the possibilities of their production

by valorization of the waste of crustaceans and cephalopods rejected in Essaouira, Journal of Materials and Environmental Sciences, 8(7), 2251–2258.

[24] Jothi, N., & Nachiyar, R. K. (2013), Identification and isolation of chitin and chitosan from cuttle bone of sepia prashadi winckworth, 1936, Global Journal of Biotechnology & Biochemistry, 8(2), 33–39.

[25] Kurita, K. (1998), Chemistry and application of chitin and chitosan, Polymer Degradation and Stability, 59, 117–120.

[26] Shanmugam, A., Kathiresan, K., & Nayak, L. (2016), Preparation, characterization and antibacterial activity of chitosan and phosphorylated chitosan from cuttlebone of sepia kobiensis (hoyle, 1885), Biotechnology Reports, 9, 25–30.

[27] Patrulea, V., Ostafe, V., Borchard, G., & Jordan, O. (2015), Chitosan as a starting material for wound healing applications, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 97, 417–426.

[28] Rhazi, M., Desbrieres, J., Tolaimate, A., Alagui, A., & Vottero, P. (2000), Investigation of different natural sources of chitin: Influence of the source and deacetylation process on the physicochemical characteristics of chitosan, Polymer International, 49(4), 337–340.

[29] Cai, J., Yang, J., Du, Y., Fan, L., Qiu, Y., Li, J., et al. (2006), Enzymatic preparation of chitosan from the waste aspergillus niger mycelium of citric acid production plant, Carbohydrate Polymers, 64(2), 151–157.

[30] No, H. K., & Meyers, S. P. (1995), Preparation and characterization of chitin and chitosan, A review. Journal of Aquatic Food Product

Technology, 4(2).

[31] Zhang, H., & Neau, S. H. (2011), In vitro degradation of chitosan by a commercial enzyme preparation: Effect of molecular weight and degree of deacetylation, Biomaterials, 22(12), 1653.1658.

[32] Nwe, N., Chandrkrachang, S., Stevens, W. F., Maw, T., Tan, T. K., Khor, E., et al. (2002), Production of fungal chitosan by solid state and submerged fermentation, Carbohydrate Polymers, 49(2), 235–237.

[33] Tayel, A. A., Moussa, S., Opwis, K., Knittel, D., Schollmeyer, E., & Nickisch-Hartfiel, A. (2010), Inhibition of microbial pathogens by fungal chitosan, International Journal of Biological Macromolecules, 47(1), 10–14.

[34] Tan, S. C., Tan, T. K., Wong, S. M., & Khor, E. (1996), The chitosan yield of zygomycetes at their optimum harvesting time, Carbohydrate Polymers, 30, 239–242.

[35] White, S. A., Farina, P. R., & Fulton, I. (1979). Production and isolation of chitosan from mucor rouxii, Applied and Environmental Microbiology, 38, 323–328.

[36] Tajdini, F., Aminia, M. A., Nafissi-Varcheh, N., & Faramarzi, M. A. (2010), Production, physiochemical and antimicrobial properties of fungal chitosan from rhizomucor miehei and mucor racemosus, International Journal of Biological Macromolecules, 47(no. 2), 180–183.

[37] Pochanavanich, P., & Suntornsuk, W. (2002), Fungal chitosan production and its characterization, Letters in Applied Microbiology, 35(1), 17–21.

[38] Yen, M. T., & Mau, J. L. (2007). Physico-chemical characterization

of fungal chitosan from shiitake stipes, Food Science and Technology, 40, 472-479.

[39] Zargar, V., Asghari, M., & Dashti, A. (2015), A review on chitin and chitosan polymers: Structure, chemistry, solubility, derivatives, and applications, ChemBioEng Reviews, 2, 1–24.

[40] Rinaudo, M. (2006a), Chitin and chitosan: Properties and applications. Progress in Polymer Science, 31(7), 603–632.

[41] Kurita, K., Kamiya, M., & Nishimura, S. I. (1991), Solubilization of a rigid polysaccharide: Controlled partial n-acetylation of chitosan to develop solubility, Carbohydrate Polymers, 16, 83–92.

[42] Ribeiro, M. P., Espiga, A., Silva, D., Baptista, P., Henriques, J., Ferreira, C. (2009), Development of a new chitosan hydrogel for wound dressing, Wound Repair and Regeneration, 17, 817–824.

[43] Dowling, M. B., Kumar, R., Keibler, M. A., Hess, J. R., Bochicchio,
G. V., & Raghavan, S. R. (2011), A self-assembling hydrophobically modified chitosan capable of reversible hemostatic action, Biomaterials, 32(13), 3351–3357.

[44] Horio, T., Ishihara, M., Fujita, M., Kishimoto, S., Kanatani, Y., Ishizuka, T. (2010), Effect of photocrosslinkable chitosan hydrogel and its sponges to stop bleeding in a rat liver injury model, Artificial Organs, 34(4), 342–347.

[45] Valentine, R., Athanasiadis, T., Moratti, L., Hanton, L., Robinson, S., & Wormald, P. J. (2010), The efficacy of a novel chitosan gel on hemostasis and wound healing after endoscopic sinus surgery, American Journal of Rhinology & Allergy, 24(1), 70–75.

[46] Tomihata, K., & Ikada, Y. (1997), In vitro and in vivo degradation of films of chitin and its deacetylated derivatives, Biomaterials, 18, 567–573.

[47] MuzzareUi, R. A. A. (1993), Biochemical significance of exogenous chitins and chitosans in animals and patients, Carbohydrate Polymers, 20, 7–16.

[48] Risbud, M. K., & Bhonde, R. R. (2000), Polyacrylamide-chitosan hydrogels: In vitro biocompatibility and sustained antibiotic release studies, Drug Delivery, 7, 69-75.

[49] Helander, I. M., Nurmiaho-Lassila, E. L., Ahvenainen, R., Rhoades, J., & Roller, S. (2001), Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of gram-negative bacteria, International Journal of Food Microbiology, 71, 235–244.

[50] Kitano A., Saika S., Yamanaka O., Reinach P. S., Ikeda K., Okada Y., Shirai K., Ohnishi Y. (2006), Genipin suppression of fibrogenic behaviors of the a-TN4 lens epithelial cell line, Journal of Cataract and Refractive Surgery, 32(10), 1727-1735.

[51] Muzzarelli R. A. A. (2009a), Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids, Carbohydrate Polymers, 77(1), 1–9.

[52] Yaoa, C., Liua, B., Hsuc, S. (2005), Calvarial bone response to a tricalcium phosphategenipin crosslinkedgelatin composite, Biomaterials, 26, 3065–3074.

[53] H. J. Koo, Y. S. Song, H. J. Kim, Y. H. Lee, S. M. Hong, S. J. Kim, B. C. Kim, C. B. Jin, C. J. Lim, E. H. Park (2004),

Antiinflammatory effects of genipin, an active principle of gardenia, European Journal of Pharmacology, 495, 201–208.

[54] Field, C. K., & Kerstein, M. D. (1994), Overview of wound healing in a moist environment, American Journal of Surgery, 167(1), S2–S6.

[55] Guo, S., & DiPietro, L. A. (2010). Factors affecting wound healing.,Critical Reviews in Oral Biology & Medicine, 89(3), 219–229.

[56] Bhuvanesh, A. R. M. S. A. G. (2010), Textile-based smart wound dressings, Indian Journal of Fibre & Textile Research, 35(2), 174-185.

[57] Paul, W., & Sharma, C. P. (2004), Chitosan and alginate wound dressings: A short review, Trends in Biomaterials and Artificial Organs, 18, 18–23.

[58] Wang, M., Hou, Z., Al Kheraif, A. A., Xing, B., & Lin, J. (2018), Mini review of TiO2-based multifunctional nanocomposites for near-infrared light.responsive phototherapy, Advanced Healthcare Materials, 7(20), 1–19.

[59] Shi, K., Liu, Z., Wei, Y. Y., Wang, W., Ju, X. J., Xie, R. (2015), Near-infrared lightresponsive Poly(N-isopropylacrylamide)/graphene oxide nanocomposite hydrogels with ultrahigh tensibility, ACS Applied Materials & Interfaces, 7(49), 27289–27298.

[60] Zhang, X., Pint, C. L., Lee, M. H., Schubert, B. E., Jamshidi, A., Takei, K. (2011), Optically– and thermally–responsive programmable materials based on carbon nanotube–hydrogel polymer composites, Nano Letters, 11(8), 3239–3244.

[61] Xu, X., Huang, Z., Huang, Z., Zhang, X., He, S., Sun, X. (2017), Injectable, NIR/pHresponsive nanocomposite hydrogel as long-acting implant for chemophotothermal synergistic cancer therapy, ACS Applied Materials & Interfaces, 9(24), 20361–20375.

[62] Engel, E., Schraml, R., Maisch, T., Kobuch, K., Konig, B., Szeimies,R. M. (2008), Light-induced decomposition of indocyanine green,Investigative Ophthalmology & Visual Science, 49(5), 1777–1783.

[63] Tang, Y., & McGoron, A. J. (2009), Combined effects of laser–ICG photothermotherapy and doxorubicin chemotherapy on ovarian cancer cells, Journal of Photochemistry and Photobiology B, Biology, 97(3), 138–144.

[64] Kildahl, N. K. (2009), Bond energy data summarized, Journal of Chemical Education, 72(5), 423.

[65] Sarah E. S. M., Fabien D., Mark L. D., M. Carmen G. and Wuge H. B. (2019), Facile Synthesis of Chitosan-Based Hydrogels and Microgels through Thiol-Ene Photoclick Cross-Linking, ACS Applied Bio Materials, 2, 8, 3257–3268.

[66] Haruki S., Akemi N., Mamoru K. (2008), A New One-Pot
 Synthetic Method for Selenium-Containing Medium-Sized α,β
 -Unsaturated Cyclic Ketones, Synthesis 20, 3229–3236

[67] Feng W., Yan P., Jinyao L. (2020), Swelling-strengthening hydrogels by embedding with deformable nanobarriers, Nature Communications, 11, 4502

[68] Wang S., Attah R., Li J., Chen Y., Chen R. (2018), A pH-Responsive Amphiphilic Hydrogel Based on Pseudopeptides and Poly(ethylene glycol) for Oral Delivery of Hydrophobic Drugs, ACS Biomaterials Science&Engineering, 4, 12, 4236–4243.