

단신

HMDI 가교 폴리아스파르트아미드 수화젤의 제조 및 특성

김정훈 · 심상준 · 이동현 · 김덕준 · 이영관 · 김지홍[†]
성균관대학교 화학공학과, 고분자기술연구소
(2005년 6월 22일 접수, 2005년 8월 24일 채택)

Preparation and Properties of Biodegradable Hydrogels from Poly(2-hydroxyethyl aspartamide) and HMDI

Jeong Hoon Kim, Sang Jun Sim, Dong Hyun Lee, Dukjoon Kim, Youngkwon Lee, and Ji-Heung Kim[†]
Department of Chemical Engineering,
Polymer Technology Institute, Sungkyunkwan University,
300 Chunchun, Jangan, Suwon, Gyeonggi 440-746, Korea
(Received June 22, 2005; accepted August 24, 2005)

초록 : 생분해성 고분자와 수화젤의 약물 전달 시스템과 조직 공학을 포함하는 다양한 생의학적인 응용이 점차 확대되고 있다. 하이드록실 pendant group을 갖고 있는 폴리아미노산의 하나인 PHEA는 뛰어난 생분해성과 우수한 생체적합성을 갖는 고분자로 알려져 있다. PHEA 및 그 유도고분자를 제조하고 이를 다양한 생의학적인 응용에 적용하는 연구가 진행되어 왔다. 본 연구에서는 유기용매에서 가교제인 HMDI를 사용하여 PHEA 수화젤을 제조하였다. PHEA는 아스파르트산의 열 축중합에 의해 합성한 polysuccinimide와 ethanolamine과의 고분자 반응으로부터 제조하였다. 제조한 수화젤에 대한 서로 다른 수용액과 pH 용액에서의 팽윤 거동을 조사하였고, SEM을 통한 수화젤의 모폴로지와 가수분해 거동을 관찰하였다.

Abstract: Biodegradable polymers and hydrogels have been increasingly applied in a variety of biomedical applications including current drug delivery system and tissue engineering field. α,β -Poly(*N*-2-hydroxyethyl-DL-aspartamide), PHEA, is one of poly(amino acids) with hydroxyethyl pendants, which is known to be biodegradable and potentially biocompatible. So that, the utilization and various chemical modifications of PHEA have been attempted for useful biomedical applications. In this work, chemical gels based on PHEA were prepared by crosslinking with diisocyanate compound in DMF in the presence of catalyst. Here, the PHEA was prepared from polysuccinimide, the thermal polycondensation product of aspartic acid, via ring-opening reaction with ethanolamine. The preparation of gels and their swelling behavior, depending on the different medium and pH, were investigated. Also the morphology by SEM and simple hydrolytic degradation were observed.

Keywords: hydrogel, biodegradable, polyaspartamide, swelling behavior.

1. 서론

생체조직 공학은 손상된 생체조직의 복원을 위하여 적절한 담체에 서 조직 세포를 체외 배양하여 실제 장기와 유사한 기능과 구조를 지

닌 인공 조직을 형성하고 이를 체내 이식하여 생체내의 결손된 장 기나 조직을 재생하거나 대체하고자 하는 분야이다. 이를 위해서는 체내에서 분리된 조직 세포를 체외에서 조직의 형태로 재구성 하기 위한 삼차원 구조를 가진 지지체가 필요하다. 이리하여 최근에는 생체 적합성의 생분해성 고분자를 이용하여 다공성 지지체(porous scaffold)를 제조하여 조직 세포를 지지체에 포집하여 삼차원 구조의 세포-지지체 복합체를 체내에 이식하고자 하는 연구가 진행되고 있다. 이런 다공성 지지체를 사용하여 만든 삼차원의 인공 조직을 체내에 이식하게 되면, 이식 초기에는 이식된 조직 세포들이 체내에서 사멸하지 않고, 본래의 기능을 유지하는 기반을 제공하게 되고, 시간이 지남에 따라 생분해성 고분자는 서서히 분해, 소멸하게 되어 자연 조직과 동일한 모양과 기능을 지닌 인공 조직을 형성할 수 있게 된다.^{1,2}

최근 생체의학 분야에서 천연 물질과 합성 물질로 생체 조직을 대신하는 연구가 활발히 진행되고 있다. 생체 의학적 응용 면에서 이러한 목적에 가장 적합한 물질 중 하나가 수화젤이다. 수화젤은 혈액, 체액 및 생체조직과 접촉했을 때 우수한 생체적합성을 갖는다. 그래서 수화젤은 약물 전달 시스템, 상처 치료용 드레싱, 콘택트 렌즈, 인공 연골, 막으로서 다양하게 응용되고 있다.^{3,4}

수화젤은 대개 친수성 단일고분자나 두 개 이상의 고분자 복합 조성으로 이루어진 3차원 망상 구조이다. 수화젤은 화학적(공유 또는 이온 결합) 또는 물리적 가교에 의해 물에서 녹지 않게 되며, 원래의 형태를 유지하면서 평형 상태에 이를 때까지 물에서 팽윤하게 된다. 수화젤이 팽윤하는 이유는 고분자 사슬의 -OH, -COOH, -CONH₂, -CONH-, -SO₃H 작용기들과 물 사이의 수화화 삼투압 현상, 모세관 현상의 작용 때문이다. 지난 35년 동안 수화젤은 높은 수팽윤성과 천연 조직과 유사한 soft하고 rubbery한 성질뿐만 아니라, 뛰어난 생체적합성 때문에 생의학과 약학 분야의 응용에 유용하게 사용되어 왔다. 수화젤은 pendent 그룹의 전하와 형태에 따라 비이온성 또는 이온성 수화젤이 될 수 있다. 이런 수화젤은 외부 자극에 감응하는 팽윤 거동을 나타내기도 한다. pH, 온도, 이온 세기, 전자기 방사 등의 변화에 따라 급격한 팽윤 변화를 보여준다.^{5,6}

Poly(2-hydroxyethyl-DL-aspartamide)(PHEA)는 폴리아미노산 구조를 갖는 수용성 합성고분자이며, 아스파르트산(aspartic acid)의 열 축중합 중합체인 polysuccinimide(PSI)의 ethanolamine과의 개환 반응으로부터 비교적 용이하게 제조할 수 있다. 아스파르트산은 아미노산의 일종으로 천연 및 합성 화합물로서 얻어지며 환경과 인체에 무해한 기초화합물로서 관심의 대상이 되어왔다. PHEA는 뛰어난 생분해성, 생체적합성과 무독성을 가지고 있으며, 결사슬에 히드록시기를 가지고 있어 약물과의 결합을 통한 macromolecular prodrug으로 이용될 수 있으며, 블록 또는 그래프트 공중합체를 통해 고분자 미셀로서 응용 가능하다.⁷⁻¹⁰

본 연구에서는 생분해성 고분자인 PHEA를 기반으로 하는 수화젤 물질의 유도와 그 응용을 위한 연구의 일환으로서 DMF 용매내에서 가교제로서 diisocyanate 화합물을 사용하여 PHEA 가교젤을 제조하였다. 제조된 수화젤의 팽윤 거동을 조사하였으며, 동결 건조를 통해 얻은 다공성 지지체의 모폴로지를 SEM을 통해 관찰하였다.

2. 실험

2.1 시료 및 시약

L-Aspartic acid(98+%), o-phosphoric acid(98+%), ethanolamine(99%),

[†]To whom correspondence should be addressed. E-mail: kimjh@skku.edu

hexamethylene diisocyanate(HMDI, 98%)와 dibutyltin dilaurate(95%)는 Aldrich Chemical Co.에서 구입하여 정제없이 사용하였다. *N,N*-dilaurate-formamide(DMF)는 YAKURI사의 제품을 건조제인 CaH₂를 사용하여 감압하에서 증류하여 사용하였다.

2.2 수화젤의 제조 방법

50 °C로 유지된 water bath내에 장치된 둥근플라스크에 PHEA 0.5 g을 DMF 15 mL에 녹인 뒤 여기에 PHEA의 2 wt%에 해당하는 dibutyltin dilaurate를 첨가한다. 계속해서 3, 5, 7 및 10 mol%에 해당하는 HMDI를 가하고 교반한 후 24시간 반응시킨다. 이렇게 해서 얻어진 가교젤을 미반응물과 DMF를 제거하기 위해 3일 동안 증류수에서 washing한 후 냉동 건조하여 건조 젤을 얻는다. PHEA 합성과 젤 제조 반응을 Scheme 1에 나타내었다.

2.3 FTIR 분석

동결 건조된 젤시료를 소량 미세하게 분말로 만든 후, KBr과 1:100 (1 mg/100 mg)으로 혼합한 시료로부터 pellet을 만들어, Perkin Elmer FTIR spectrometer(Model SPECTRUM 2000)을 이용하여 4000~400 cm⁻¹의 파장범위에서 흡수 스펙트럼을 얻어 분석하였다.

2.4 수화젤의 팽윤 거동 관찰

서로 다른 조성비로 제조된 수화젤 시료 30~40 mg을 disc 형태로 프레스를 사용하여 제조한 후, Tea-bag에 넣고 서로 다른 수용액(증류수, buffer solution) 또는 표준 pH 용액에서 팽윤 변화를 측정하였다. 측정은 24시간 동안 행하여 졌으며, 일정 시간 동안 담근 후, Tea-bag 밖으로 흐르는 물을 제거한 후 그 무게를 측정하였다. 젤시료를 넣지 않은 젖은 상태의 Tea-bag 무게를 기준으로 하여 건조 수화젤의 무게에 대한 흡수한 물의 무게 비율로서 팽윤비(swelling ratio)를 측정하였다.

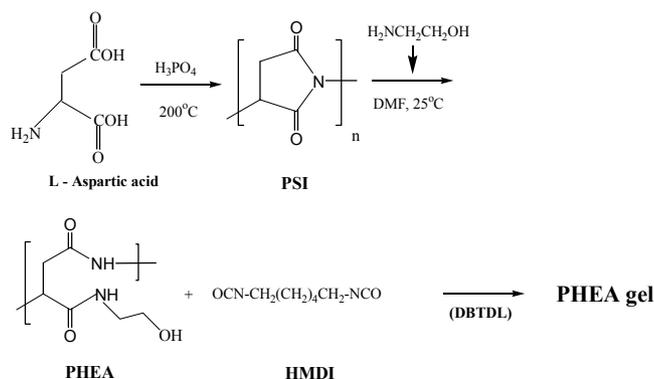
$$S(\text{팽윤비}) = (W_s - W_T) / W_d \tag{1}$$

위 식에서 W_s는 팽윤된 젤의 무게와 젖은 Tea-bag 무게의 합, W_T는 젖은 Tea-bag만의 무게, 그리고 W_d는 측정에 사용한 건조 젤의 무게이다.

2.5 수화젤 모폴로지 관찰

동결 건조된 수화젤을 automatic coater(Sputter Coater 108 auto, Cressington Scientific Instruments Inc.)을 이용하여 Au-Pd로 60초 동안 vacuum 하에서 코팅한 후에 Field Emission Scanning Electron Microscope(FESEM, Model JSM6700F, JEOL Inc.)를 이용하여 시료의 다공성 구조를 관찰하였다.

2.6 수화젤의 가수분해 실험



Scheme 1. Reaction scheme for the synthesis of PHEA gel by HMDI.

가수분해 실험은 Tea-bag 안에 젤시료를 넣은 다음 PBS(pH 7.4) 용액에 담겨 37 °C로 유지된 항온조에서 시간에 따른 중량변화를 측정하는 방법으로 간단히 테스트하였다. 잔류 중량 %는 주어진 시간에 남아있는 젤시료를 냉동 건조하여 얻어진 중량을 측정하여 얻은 것으로 수화젤의 가수분해에 대한 간접적인 정량치로 사용하였다.

3. 결과 및 토론

본 연구에서 사용한 poly(2-hydroxyethyl-DL-aspartamide)(PHEA)는 그 전구체 고분자인 PSI로부터 유도하였으며 멤브레인(Spectra/pore4, with MWCO 12000~14000)을 사용한 dialysis를 통해 정제하였다. PSI는 *o*-phosphoric acid를 사용한 L-aspartic acid 단량체의 열 축중합 방법으로 합성하였고, 그 용액점도의 측정으로부터 평균 분자량이 대략 120000 Dalton임을 확인하였다. PHEA 고분자는 amide(CO-NH) 결합을 주사슬 및 결사슬에 갖고 있으며, 동시에 히드록실 그룹(-OH)을 결사슬 말단에 보유하고 있어 이 히드록실 관능기를 통해 다양한 화학적 수식 내지는 가교반응이 가능하게 된다.^{11,12} 본 실험에서는 이미 잘 알려진 이소시아네이트와 히드록실 그룹 간의 우레탄 형성반응을 가교반응으로 이용하여 PHEA 젤을 제조하였다.

3.1 구조 분석

Figure 1은 순수한 PHEA(A)와 HMDI 각각 10, 20 mol%(B, C)로 가교된 젤의 IR spectra를 보여준다. HMDI에 의해 가교된 PHEA 젤의 경우에는 2920 cm⁻¹에서 -CH₂- 신축진동에 의한 흡수 피크의 증가를 보여주고 있으며, 새로운 우레탄 결합의 형성으로 인한 C-N 신축진동 흡수 피크의 증가가 1250 cm⁻¹, C=O 신축 흡수에 의한 증가가 1100 cm⁻¹에서 두드러지게 나타남을 확인할 수 있었다.

3.2 조성에 따른 수화젤의 팽윤 거동

Figures 2와 3에 HMDI 각 3, 5, 7, 10 mol%로 가교된 젤의 증류수와 PBS(pH 7.4) 용액에서의 팽윤 거동을 각각 나타내었다. 모든 젤이 초기에 비교적 빠른 팽윤을 보이다가 대략 3시간 내에 평형(equilibrium)에 도달함을 알 수 있었다. 순수한 경우는 약 15~23배의 팽윤비를 나타내었고, PBS 용액에서는 순수의 약 1/2 수준으로 낮아진 대략 8~11배의 팽윤비를 나타내었다. 가교제인 HMDI 양의 증가와 비례적으로 팽윤비가 감소하는 경향을 보이는 것은 직접적으로 가교밀도의 영향을 보여주고 있다. 젤의 팽윤도 또는 흡수능은 고분자사슬과 물의 친화력 및 젤 내외에서의 가동이온의 농도차에 의한 삼투압으로 이루어지며 망상구조에 의한 고무 탄성력이 흡수력을 억제한다. 따라서 가교제 농도가 높을수록 가교점간 분자량이 감소하여 젤의 팽

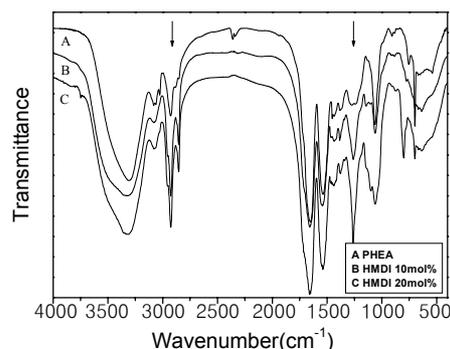


Figure 1. FT-IR spectra of PHEA and PHEA gels.

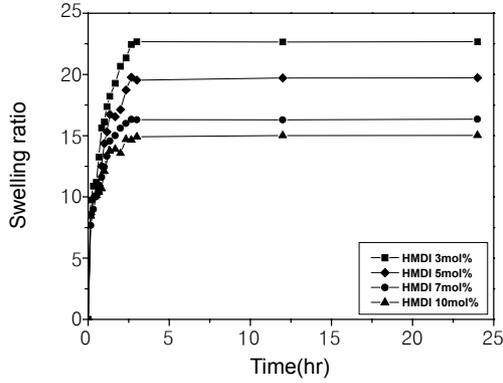
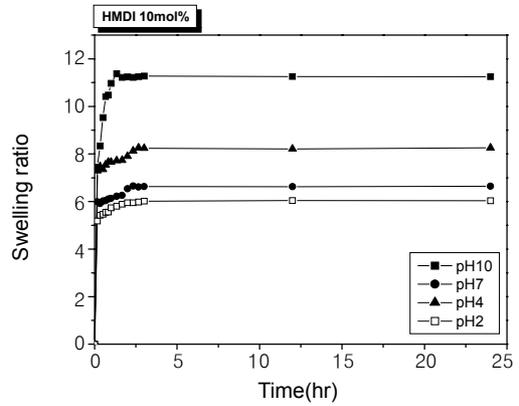


Figure 2. Typical swelling curve of gels in pure water at RT.



(a)

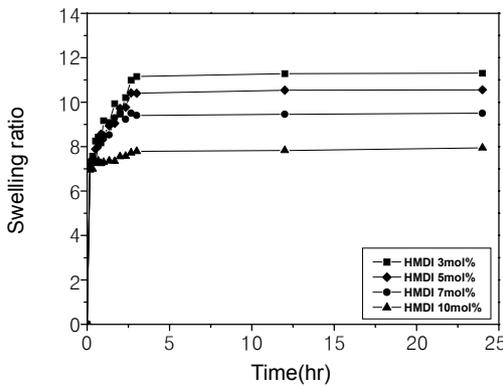
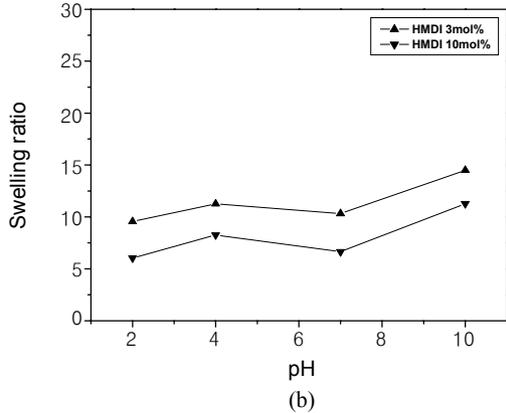


Figure 3. Typical swelling curve of gels in PBS (pH 7.4) at RT.



(b)

Figure 4. Swelling dependence on the pH of buffer solutions at RT.

윤을 억제하는 고무 탄성력이 상대적으로 커져 흡수력이 떨어지게 되며, 순수보다는 PBS에서 팽윤도가 낮게 나타나는데 이는 높은 매질의 이온강도(ionic strength)가 평형 흡수능에 역으로 작용하기 때문으로 사료된다. 가교제의 농도를 변화시켜 젤의 흡수능을 어느 범위에서 조절할 수 있음을 알 수 있으며, 가시적인 젤 강도 또한 달라짐을 관찰하였다.

Figure 4는 몇 가지 다른 pH buffer 용액에서 젤의 팽윤 거동을 상온(25 °C)에서 관찰한 결과의 그래프이다. 히드록실 그룹의 부분적인 이온화로 인하여 다른 pH buffer 용액에서 보다는 염기성인 pH 10에서 팽윤도가 다소 높게 나타나는 것으로 사료된다. 한편 중성과 산성의 pH buffer 용액에서는 상대적으로 낮은 팽윤도를 보였으나 pH 7과 2에서 보다는 pH 4에서 다소 높게 관찰되었다(Figure 4(a)). 서로 다른 함량의 HMDI로부터 유도한 젤시료에서도 같은 경향을 보였으며, 물론 가교제의 함량이 높은 시료의 경우 팽윤도가 낮은 수준으로 이동함을 확인할 수 있었다(Figure 4(b)).

3.3 PHEA 수화젤의 분해 실험

PHEA 수화젤은 생분해성을 갖는 소재로서 알려져 있으며 본 실험에서는 물질의 단순 가수분해 거동을 조사하여 보았다. 생분해는 미생물과 가수분해에 의해서 고분자 사슬이 끊어지면서 저분자화되어 자연 또는 생체내에 흡수되어지는 현상이며, 여러 생체응용 분야에 매우 중요하게 요구되는 성질의 하나이다. Figure 5는 제조된 수화젤의 중량 변화로부터 추정된 가수분해 거동을 실험한 결과 그래프이다. HMDI (10 mol%) 가교 PHEA 젤시료를 37 °C로 고정된 항온조 내에서 PBS (phosphate buffered saline, pH 7.4) 용액에 담구어 실시하였다. 시간에

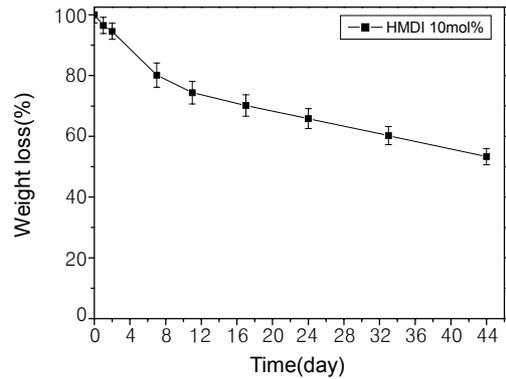
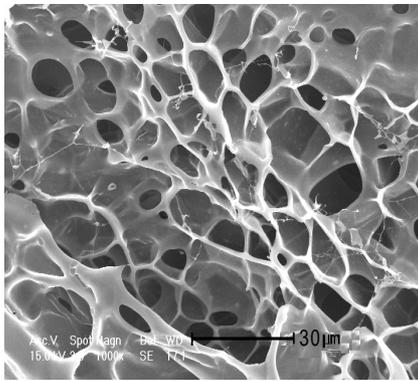


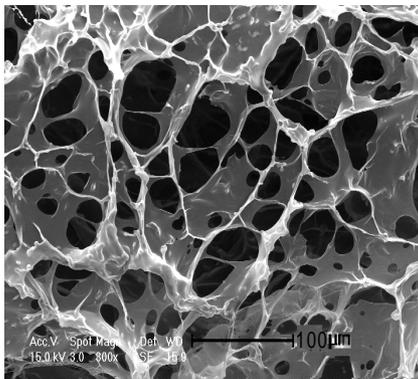
Figure 5. Hydrolytic degradation in phosphate buffered saline(pH 7.4) at 37 °C.

따라 sampling한 젤시료의 냉동 건조를 통해 잔류 중량을 측정하여 백분위로 나타내었다. 중량 변화 곡선을 보면 초기 수일간의 비교적 가파른 감소를 제외하면 시간에 따라 매우 완만하고 선형적인 감량이 일어남을 알 수 있었다. 약 2개월이 경과한 후에 원래 젤 무게의 약 50%에 상당하는 중량 감소를 나타내었다. 아마도 수화젤의 분해는 과잉의 물 속에서 젤이 갖는 화학적 구조인 amide와 우레탄 그룹의 랜덤한 가수분해 반응에 의해 서서히 진행되는데 기인한 것으로 사료되며, 구조는 가수분해에 비교적 안정함을 알 수 있다.

3.4 수화젤의 모폴로지 관찰



(a)



(b)

Figure 6. SEM images of freeze-dried hydrogel [(a): HMDI 3 mol%, (b): HMDI 5 mol%].

Figure 6은 동결 건조에 의해 제조한 PHEA 젤 scaffold의 내부를 관찰한 SEM 사진을 나타낸 것이다. 각각 그림 (a)는 가교제 HMDI 3 mol%로 제조된 젤, (b)는 HMDI 5 mol%로 제조된 젤이며, 두 조성의 건조 젤 모두 가시적으로는 brittle한 스펀지 형태를 보여주었다. 두 사진에서 유사하게 대략 수십 μm 크기의 불규칙한 pore를 갖는 그물 모양에 얇은 wall을 포함한 다공성 구조를 관찰할 수 있었다.

4. 결론

PSI와 EA의 개환 반응으로부터 생분해성 수용성 PHEA 고분자를 제조한 후, HMDI를 통한 가교반응으로부터 PHEA 수화젤을 얻었다. 제조된 PHEA 가교젤은 증류수와 PBS(pH 7.4) 용액에서 수~수십 배(8~22g water/g dry-gel)의 팽윤도를 보여주었다. 가교제의 함량이 증가함에 따라 팽윤도가 비례적으로 낮게 나타남을 확인할 수 있었다. 한편, 약염기성 pH buffer 용액에서 팽윤도가 다소 높게 관찰되었으며, 반면에 중성과 산성에서는 비교적 적은 차이로 낮은 팽윤도를 보였다. 37 $^{\circ}\text{C}$, PBS 용액에서 PHEA 수화젤의 가수분해가 장시간에 걸쳐 따라 매우 완만하고 선형적으로 일어남을 알 수 있었으며, SEM을 통해 수십 μm 크기의 동공을 갖는 젤의 망상 구조를 확인하였다.

감사의 글 : 본 연구는 한국학술진흥재단 연구비의 지원으로 수행되었으며 이에 감사 드립니다(KRF-2004-005-D00070).

참고문헌

1. T. G. Park and J. J. Yoon, *Polymer Science and Technology*, **10**, 722 (1999).
2. J. L. Drury and D. J. Mooney, *Biomaterials*, **24**, 4337 (2003).
3. K. R. Park and Y. C. Nho, *Polymer(Korea)*, **25**, 728 (2001).
4. A. S. Hoffman, *Adv. Drug Deliver. Rev.*, **54**, 3 (2002).
5. Robert Langer and N. A. Peppas, *AIChE Journal*, **49**, 2990 (2003).
6. G. S. Khang, M. S. Kim, S. H. Cho, H. B. Lee, J. H. Chang, and K. J. Kim, *Polymer Science and Technology*, **14**, 431 (2003).
7. R. Mendichi, A. Giacometti Schieronni, G. Cavallaro, M. Licciardi, and G. Giammona, *Polymer*, **44**, 4871 (2003).
8. T. van der Merwe, B. Boneschans, B. Zorc, J. Breytenbach, and M. Zovko, *Int. J. Pharm.*, **241**, 223 (2002).
9. G. Pitaresi, P. Pierro, G. Giammona, F. Iemma, R. Muzzalupo, and N. Picci, *Biomaterials*, **25**, 4333 (2004).
10. G. Cavallaro, M. Licciardi, G. Giammona, P. Caliceti, A. Semenzato, and S. Salmaso, *J. Control. Release*, **89**, 285 (2003).
11. J. H. Kim, S. J. Sim, D. H. Lee, D. Kim, Y. K. Lee, and J.-H. Kim, *J. Ind. Eng. Chem.*, **10**, 278 (2004).
12. J. H. Kim, S. J. Sim, D. H. Lee, D. Kim, Y. K. Lee, D. J. Chung, and J.-H. Kim, *Polymer J.*, **36**, 943 (2004).