

Tertiary Amine 을 포함하는 Hydroxypropyl Methacrylate 고분자막의 투과특성

홍재민·심정섭

서울대학교 공과대학 공업화학과
(1990년 11월 27일 접수)

Permeation Characteristics of Poly(Hydroxypropyl Methacrylate) membrane having Tertiary Amine Moiety

Jae-Min Hong and Jyong-Sup Shim

Department of Chemical Technology, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea
(Received November 27, 1990)

요 약

glucose 의 농도에 따라 인슐린의 방출을 조절하기 위하여 3급 아민을 함유하는 Hydroxypropyl methacrylate 고분자막을 합성하였다. 이 막의 함수율은 수용액의 pH가 감소함에 따라 증가하였다. 인슐린의 투과도 역시 수용액의 pH가 감소함에 따라 증가하였다. 이 막에 당산화효소를 고정화시킨 acryl amide 막을 부착하여 복합막을 제조하였다. 이 막의 인슐린 투과도는 glucose 의 농도가 증가함에 따라 증가하였다.

Abstract : Hydroxypropyl methacrylate polymeric membranes having tertiary amine moiety were prepared to control the release rate of insulin in response to the concentration of glucose. Hydroxypropyl methacrylate was copolymerized with N, N'-diethylaminoethylacrylate. Its water content was increased with decreasing the pH of the medium and was reversible with variation of the pH of the medium. The permeation coefficient of insulin through copolymer membrane was also increased with decreasing the pH of the medium. Combining this copolymer membrane and the glucose oxidase immobilized membrane as a sensor for glucose, composite membrane was prepared. The permeability of this composite membrane was increased with addition of glucose.

1. 서 론

1921년 Banting 과 Best 가 insulin 을 발견함으로써, 이를 이용한 당뇨병의 치료가 가능하게 되었다. 현재, 당뇨병의 치료를 위하여는 insulin 의 "daily injection" 방법이 사용되고 있으나 이 방법으로는 혈당량의 항상성을 유지할 수 없으며[1], 이로 인하여

녹내장, 신장질환, 심장질환 등의 합병증이 유발될 가능성이 있다. 따라서, 혈당량을 일정하게 유지할 수 있는 새로운 방법이 필요하다[2, 3]. 이러한 단점을 해결하기 위하여 insulin infusion pump (4) 가 사용되고 있는데, 이것은 혈당농도를 검출하여, 그에 따라 insulin 의 주입량을 자동적으로 조절하는 장치이다. 이는 혈당농도에 따라 insulin 주입량을 변화시킬 수

있으므로 좋은 치료효과를 기대할 수 있으나, 행동에 많은 제약이 따르게 된다. R. Langer (5) 등은 ethylene-vinyl acetate 계의 공중합체 pellete 에 insulin 을 swelling 시켜 당뇨병에 걸린 쥐의 배에 이식한 결과, 한달간 일정한 혈당농도를 유지할 수 있음을 보고하였다. 이는 많은 양의 insulin 을 작은 부피의 고분자에 농축시켜 사용하므로 장시간의 사용이 가능하다는 장점이 있으나 혈당량의 변화에 따른 insulin 의 방출 속도 변화를 기대하기는 어렵다.

이상적인 insulin delivery system 은 혈당의 농도에 비례하여 insulin 이 방출될 수 있도록 설계되어야 한다. Brownlee (6) 등은 Concanavalin A 와 glycosylated insulin 의 치환이 경쟁적으로 일어남을 발견하고, 이를 이용한 self-regulating insulin delivery system 의 가능성을 제시하였다. Kim (7) 등은 Concanavalin A 와 glycosylated insulin 의 화합물을 생체 적합성이 좋은 고분자막으로 둘러싸므로써, 혈당량에 따라 insulin 방출 속도를 조절할 수 있음을 보고하였으며, 당뇨병에 걸린 개에 대한 생체실험에서 1주일간 일정한 혈당량을 유지하는 데 성공하였다. 또한 Alhaique (8) 등은 tertiary amine group 을 포함하는 ethylene-vinyl-N, N'-diethyl glycinate 공중합체가 용액의 pH 가 감소함에 따라 protonation 되어 고분자의 친수성이 증가함을 보고 하여 controlled release membrane 으로의 사용 가능성을 제시하였다. 따라서 본 연구에서는, 생체 적합성이 우수한 것으로 알려진 hydroxypropyl methacrylate 와 diethylaminoethyl acrylate 의 공중합막을 합성하여 이의 pH 에 따른 함수율의 변화, insulin 의 방출에 대하여 고찰하였다. 또한 glucose oxidase 를 polyacrylamide gel 에 고정화 한 후, 위의 막과 결합하여 복합막을 제조하였고 이 막의 insulin 투과속도를 고찰하였다.

2. 실험

2. 1. 시 약

Hydroxypropyl methacrylate(HPMA) 는 Fluka 의 1 급 시약에 hydroquinone monoethylether 와 hydroquinone 을 각각 0.5g/l 씩 첨가한 후, 질소 기류하에서 2 회 감압 증류(1.5 torr, 60 °C) 하여 사용하였다. Diethylaminoethylacrylate(DEAEA)는 Fluka 의 1 급 시약에 hydroquinone 을 1g/l 씩 첨가한 후, 질소 기류

하에서 2 회 감압증류(1.5 torr, 54 °C) 하여 사용하였다. N, N'-Azobisisobutyronitrile(AIBN) 은 Junsei Chemical 의 특급시약을 methanol 에서 재결정한 후, 감압건조하여 사용하였다. DMF 는 Junsei chemical 의 1 급 시약을 ninhydrin 을 첨가하여 감압증류한 후 molecular sieve 4 A 를 넣어 수분을 제거하여 사용하였다. Acrylamide (AAM) 는 Fluka 의 1 급 시약을 acetone 에 녹인 다음 서서히 냉각하여 재결정하고, 감압건조하여 사용하였다. Insulin 은 녹십자 제약의 crystalline Beef Insulin 을 -70 °C 에서 보관하여 사용하였다. Glucose Oxidase(GOD) 는 Sigma Chemical Co. 의 Type II Glucose Oxidase 를 사용하였다. Peroxidase 도 Sigma Co. 의 Type II 를 사용하였다. 그 밖에 N, N, N', N'-Tetramethyl ethylene diamine, N,N'-Methylene bisacrylamide, Methanol, Acetone 등은 시판 특급이나 1 급 시약들을 그대로 사용하였다.

2. 2. 기기분석

합성한 고분자들의 원소 분석에는 Yanaco 사의 MT-2 형 CHN corder 를 사용하였다. 적외선 분광분석에는 JASCO 사의 DS-701 G 형 Diffraction Grating IR Spectrophotometer 를 사용하였다. 시료들은 KBr tablet 으로 만들어 분석하였다. NMR 분석에는 JEOL 사의 JNM-MH-100 을 사용하였다. Insulin 을 정량하기 위하여 Shimadzu 사의 UV-200S 를 사용하여 280 nm 에서의 UV 흡수를 측정하였다. 상온의 완충용액에 팽윤시킨 막을 Instron Corporation 의 Instron Universal Testing Model 1130 을 사용하여 기계적 성질을 측정하였다. 시료는 길이 8cm, 너비 1.5cm 로 절단하여 측정하였으며 span 은 4 cm, crosshead speed 는 5cm/min 으로 하였다.

2. 3. Poly(HPMA-co-DEAEA) 의 합성

200ml 의 마개달린 삼각 플라스크에 정제한 HPMA, DEAEA, DMF 들을 주입한 후 자력교반하면서, 20 분간 질소를 bubbling 하여 용존산소를 제거하였다. 이를 60 ± 0.1 °C 로 유지되는 항온조에 장치하고 용액의 온도가 일정하게 유지된 후 개시제인 AIBN 을 첨가하였다. 교반하면서 3 시간 정도 반응시켜 viscous 한 투명액을 얻었다. 생성된 공중합물을 water/ice bath 에서 급냉시킨 후 -10 °C 로 유지되는 냉동실에 3 시간 정도 넣어둔 뒤, 이를 꺼내 과량의

n-hexane/acetone (10/1 v/v) 에 적하시켜 흰색의 침전을 얻었다. fibril 형태의 침전이 생성되었으며, 이를 다시 한번 재결정 하였다. 침전된 공중합물을 감압 건조기에서 3 일 이상 건조시킨 후 다음 실험에 사용하였다. 반응조건을 Table 1 에 나타내었다.

Table 1. Recipe of Polymerization.^{a, b}

Copolymer	initial composition			
	HPMA (mℓ)	DEAEA (mℓ)	AIBN (g) ^c	DMF (mℓ)
PHPMA	17.5	0	0.035	23.5
PHD1	33.3	2.3	0.069	47.0
PHD2	31.5	4.6	0.069	47.0
PHD3	29.8	6.9	0.069	47.0

- a ; reaction temperature : 60 °C,
- b ; reaction time : 75 min.
- c ; initiator concentration : 5.05 × 10⁻³M

2. 4. membrane 제조

충분히 건조된 HPMA-DEAEA copolymer 를 1g 당 4mℓ 의 DMF 에 녹인 후, 가끔씩 저어두면서 하루동안 방치하였다. 이것을 상온의 진공 오븐에서 1 시간 방치하여 용존 기체들을 구출한 후 유리판에 casting 하였다. 60 ± 1 °C 의 오븐에서 3 일간 방치시킨 뒤 40 ± 1 °C 의 진공 오븐에서 잔류용매를 제거시킨 후 45 °C 의 증류수에 침지시켜 유리판에서 분리하여 증류수에 보관하였다.

2. 5. 함수율의 측정

제조한 membrane 을 30 °C 에서 여러 pH(6.4, 6.6, 6.8, 7.0, 7.2, 7.4, 7.6) 의 완충용액(9) 에서 일주일간 팽윤시켜 완전히 평형에 도달한 뒤 표면의 물기를 거름종이로 닦아내고 무게를 측정하였다. 이것을 감압건조기에서 일정한 무게를 보일 때까지 감압건조시킨 뒤 함수율을 계산하였다. 여기서 사용한 완충용액은 Na₂HPO₄/KH₂PO₄ 의 phosphate buffer 를 사용하였으며 ionic strength 가 0.1 이 되도록 하였다. 함수율은 다음의 식으로부터 계산하였다. [10].

$$\text{water content (\%)} = \frac{(\text{wt. of swollen membrane}) - (\text{wt. of dry membrane})}{(\text{wt. of dry membrane})} \times 100$$

2. 6. Poly (HPMA-co-DEAEA) 막에의 insulin 투과

PHD 3 Membrane 을 일정 pH (7.0, 7.2, 7.4, 7.6) 의 완충용액에서 팽윤시킨 뒤, 이 membrane 을 투과장치 (Fig. 1) 에 고정하고 silicone rubber 로 packing 하였다. 이 cell 의 투과단면적은 4.84 cm² 이었으며, 각 cell 에는 60mℓ 의 0.1 M 완충용액을 넣고, 농도의 분극이나 boundary resistance 등을 방지하기 위하여 500 rpm 으로 자력 교반하였다. 이 때 사용한 초자기구는 insulin 이 초차벽면에 흡착되는 것을 방지하기 위하여 5wt% 의 dichlorodimethylsilane chloroform 용액에 담근 후 180 °C 에서 2 시간 가열함으로써 silanization 하여 사용하였다. 한쪽의 cell 에 insulin 8.0 mg 을 넣은 후 일정시간마다 양쪽 cell 의 용액 일부를 채취하여 UV 를 측정하여 insulin 을 정량하였다. 시간에 따른 농도 변화를 측정하여 다음식에 의하여 겉보기 막투과 계수를 구하였다[11].

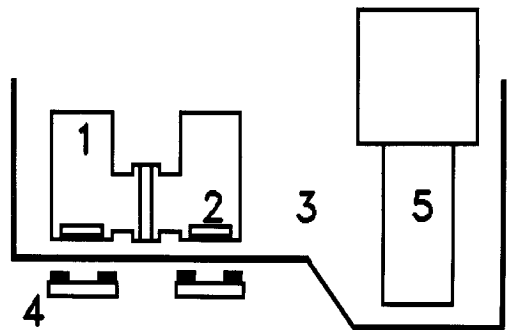


Fig. 1. Apparatus for solute permeability measurement.

- 1. cell 2. magnetic bar 3. bath
- 4. rotating magnets 5. circulator

$$P(t) = \frac{1}{(V_1^{-1} + V_2^{-1})} \ln \frac{C_1 + C_2}{C_1 - C_2}$$

- V₁, V₂ : 각 cell 의 부피(cm³)
- C₁ : t 초 후의 concentrate solution 농도
- C₂ : t 초 후의 dilute solution 농도

위의 P(5) 를 t 에 대해 도시하여, 이 기울기를 S(cm³/sec) 라 하면 이 때 막투과계수 P 와 S 는 다음의 관계가 있으므로 이에 의해 막투과 계수 P(cm²/sec) 를 구하였다.

$$P = S \times L / A$$

L : 막의 두께(cm)

A : 막의 면적(cm²)

2. 7. GOD 가 고정된 poly(acryl amide) gel 막의 제조

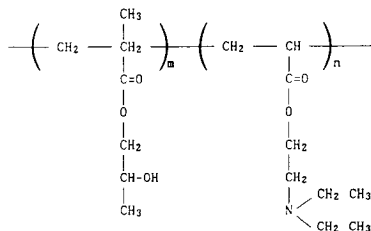
1.31 g 의 acrylamide 와 65.3 mg 의 N, N'-methylenebisacrylamide 와 0.09 ml 의 N, N,N', N'-tetramethylethylene diamine 을 6.5ml 의 증류수에 녹인후 10 mg 의 GOD 를 넣고 완전히 녹을때까지 교반하였다. 여기에 25 mg 의 ammonium persulfate 를 1 ml 의 증류수에 녹인 용액을 넣고 잘 교반한 후, 유리판으로 만든 mold 사이에 부어 넣었으며, 상온에서 중합하였다. mold 에서 떼어낸 후 증류수로 세척하여 사용하였다.

2. 8. 복합막제조와 insulin 확산실험

깨끗한 유리판 위에 직경 3.5cm 의 원형 HPMA-DEAEA membrane 을 놓고 표면의 물기를 닦아낸 후 1.0mm 두께의 silicone rubber ring 을 장치하였다. 이 위에 acrylamide solution 을 붓고 유리판을 덮어서 복합 membrane 을 제조하였다. 중합이 완성된 후 증류수로 세척하여 투과실험에 적용하였다. 위의 복합 membrane 을 투과 cell 에 장치한 후 양쪽의 cell 에 pH 7.3 의 1mM phosphate buffer 를 넣고 HPMA-DEAEA 막 쪽의 cell 에 8.00mg 의 insulin 을 첨가하였다. GOD 고정화된 막쪽의 cell 에 β-D-Glucose 를 첨가한 후 UV 를 이용하여 시간에 따른 insulin 농도를 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

생성된 poly(HPMA-co-DEAEA) 의 구조는 다음과 같다.



생성된 중합물의 원소분석결과와, 질소의 분석결과에 따른 각 고분자의 조성을 Table 2. 에 나타내었다.

Table 2. Result of Elemental Analysis

Copolymer	Result(wt %)			Composition of DEAEA(%)
	N	C	H	
PHPMA	9.16	57.54	—	—
PHD1	8.98	56.56	0.45	4.8
PHD2	9.21	56.56	0.68	7.4
PHD3	9.21	56.10	0.96	10.5

3. 1. 함수율의 변화

여러가지 조성의 membrane 들의 pH 에 따른 함수율의 변화를 Fig. 2 에 나타내었다. 동일한 membrane 의 경우 용액의 pH 가 감소함에 따라 함수율이 증가함을 알 수 있으며 그 곡선은 sigmoidal 한 형태로 Ishihara(14) 등의 결과와는 다른 양상이다. 이는 그들이 충분히 낮은 pH 에서의 함수율을 측정하지 않은 때문으로 생각된다. PHD1 은 pH 6.7, PHD2 는 6.8, PHD3 는 7.2 부근에서 함수율의 급격한 변화를 보여 준다. 이것은 H. Hagi(12) 등이 linear poly(tertiary amine) 의 protonation 에서 고분자쇄의 tertiary amine 이 조밀하게 배치되면 protonation 의 확률이

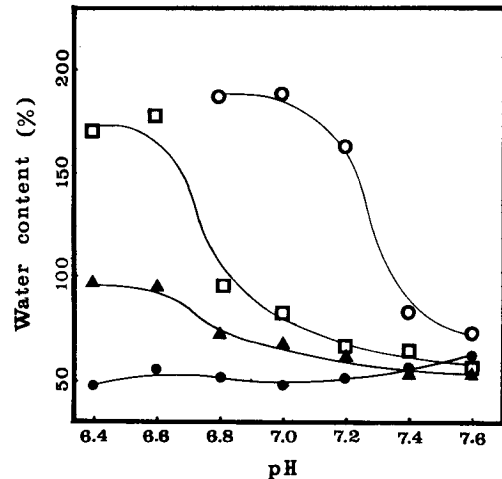


Fig. 2. Effect of pH on the water content of HPMA-DEAEA copolymer membrane.

(●) : PHPMA (▲) : PHD1
(□) : PHD2 (○) : PHD3

높아지므로 pKa가 증가된다고 한 것과 일치하는 결과이다. 본 실험의 경우에서도 도입된 tertiary amine의 양이 증가함에 따라 상대적으로 protonation의 가능성이 높아져서 고분자의 pKa가 증가한 것으로 보이며 따라서 protonation된 amine에 의해 함수율이 증가한 것으로 추측된다. 또한 tertiary amine을 포함하지 않는 PHPMA의 함수율은 pH에 따라 큰 변화가 없는 것으로 보아 pH에 따른 HPMA-DEAEA 공중합막의 함수율 변화는 도입된 DEAEA의 tertiary amine에 기인한 것으로 생각된다. 이는 동일한 pH에서 DEAEA의 조성이 커질수록 함수율도 증가하는 것에서도 확인할 수 있었다.

함수율이 투과도와 비례한다는 것은 잘 알려진 사실이므로 본 실험에서 합성한 막은 특정한 pH에서 급격히 투과도가 증가할 것으로 생각되며 이때의 pH는 amine의 함량으로 조절할 수 있을 것으로 생각된다. 즉 amine의 함량이 많은 고분자는 상대적으로 높은 pH에서 투과도의 변화를 보이며 또한 그 변화폭도 증가하게 된다. 이는 반대로 특정한 막의 용액의 pH를 조절하여 투과도를 조절할 수도 있음을 시사해 준다. 또한 pH에 따른 함수율변화의 가역성을 확인하기 위하여 용액의 pH를 6.8에서 7.4로, 다시 6.8로 바꾸었을때의 PHD3 membrane의 함수율변화를 Fig. 3에 나타내었다. 용액의 pH를 6.8에서 7.4로 바꾸었을 때, 이에 따라 membrane의 함수율은 감소하였으며 용액의 pH를 6.8로 다시 감소시키자, membrane의 함수율은 다시 증가하여 첫번째의 함수율 곡선과 유사하게 되었다. 즉, poly(HPMA-co-

DEAEA) 고분자막의 함수율은 주어진 pH에 따라 가역적으로 변화함을 알 수 있었다.

3. 2. 기계적 성질의 변화

membrane의 조성과 용액의 pH에 따른 막의 기계적 성질의 변화를 알아보기 위해 Instron을 사용하여 stress-strain curve를 측정하여 Fig. 4, 5에 각각 나타내었다. Fig. 4는 pH 7.0의 용액에서 팽윤된 여러 막들의 곡선이다. 각 곡선들은 고무와 유사한 경향을 보이며 DEAEA moiety가 증가함에 따라 그의 인장

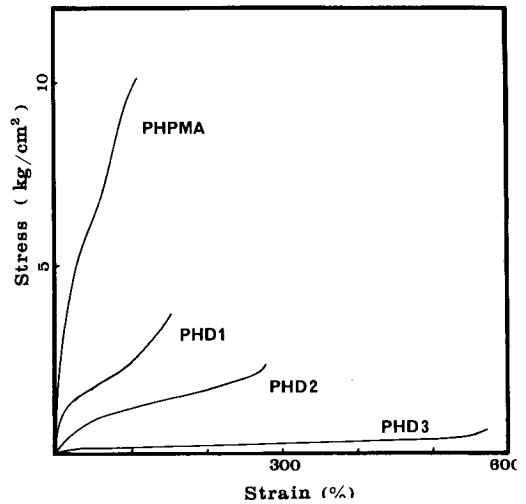


Fig. 4. Stress-strain curve of various membranes at pH 7.0.

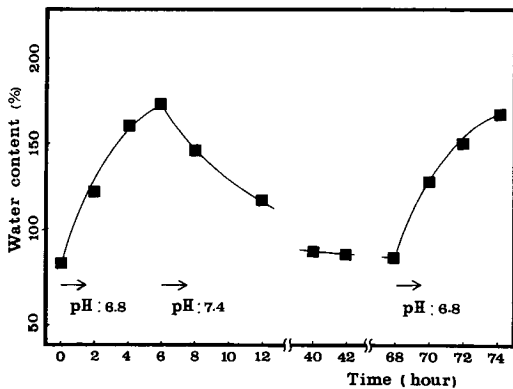


Fig. 3. Reversible change of water content of PHD3 membrane.

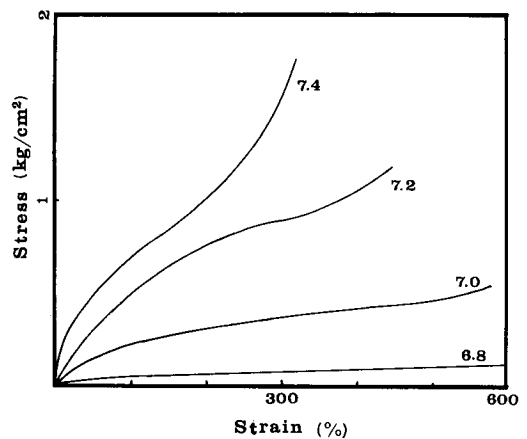


Fig. 5. Stress-strain curve of PHD3 membrane with various pH.

강도는 급격히 감소하였다. 반면 신장율은 증가하였다. 인장 강도의 감소는 DEAEA 의 함량이 증가하여 함수율이 증가하고 따라서 단위부피당 고분자의 체적이 줄어든 것에 기인한 결과이다. 용액의 pH 에 따라 측정된 Fig. 5 의 곡선에서도 함수율과 관계하여 볼 때 비슷한 경향을 볼 수 있었다. 함수율의 결과로부터 amine 의 함량이 높을수록 투과성능이 우수한 막을 제조할 수 있음을 알 수 있으나, 기계적 강도는 감소되므로 적절한 함량을 가진 고분자의 선택이 필요하다.

3. 3. Insulin 의 투과

PHD3 막의 diluted cell 에서의 시간에 따른 UV 흡수 변화를 Fig. 6 에 나타내었다. 시간에 따라 거의 직선적으로 insulin 의 농도가 증가함을 알 수 있었으며 용액의 pH 가 감소할수록 많은 양의 insulin 이 방출됨을 알 수 있었다. Concentrated cell 의 insulin 농도는 초기에는 매우 급격히 감소함을 알 수 있는데, 이는 insulin 의 고분자막에의 partition 에 의한 것이라 생각된다. Permeation profile 들로 부터 투과도를 구하여 pH 에 따라 Fig. 7 에 나타내었으며 함수율의 곡선과 비슷한 형태의 곡선을 나타내었다. 이는 팽

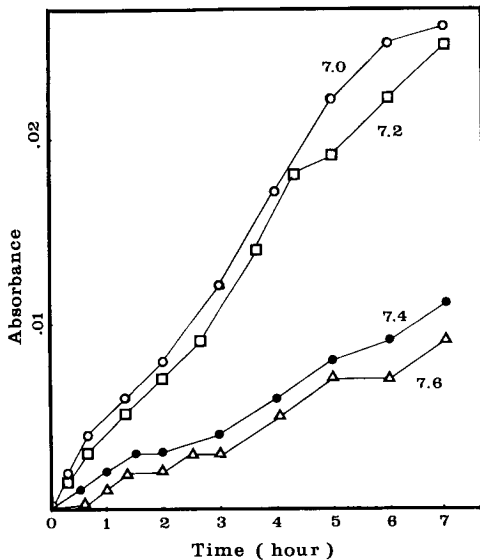


Fig. 6. Permeation profile of insulin.

- (○) : pH 7.0 (□) : pH 7.2
- (●) : pH 7.4 (△) : pH 7.6

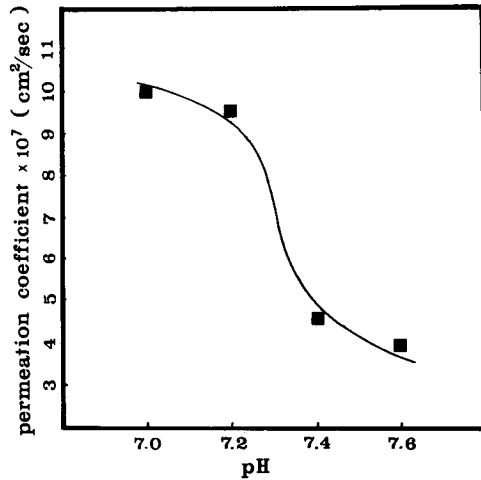


Fig. 7. Effect of pH on the permeation coefficient of HPMA-DEAEA copolymer membrane.

윤된 고분자막을 통한 물질 투과는 막의 함수율에 의존한다는(13) 사실과 잘 일치한다. pH 7.3 을 기준으로 약 3 배의 투과도 차이를 나타내고 있다. 따라서 이 막은 pH 가 7.3 인 용액에서 가장 민감하게 pH 의 변화에 반응할 것으로 예측할 수 있다. 따라서 복합막의 insulin 투과 실험은 용액의 pH 를 7.3 으로 하여 실행하였다.

3. 4. GOD 의 고정화와 복합 membrane 의 insulin 투과 실험

복합 membrane 에서의 insulin 투과 실험에 의한 결과를 Fig. 8 에 나타내었다. Glucose 를 첨가함에 따라 투과되는 insulin 의 양은 증가하였다. glucose 농도가 0.05, 0.2M 일 때의 곡선은 초기 약 4 시간 동안은 0.2 M 의 곡선의 기울기가 더욱 큼을 알 수 있다. 이는 GOD 가 glucose 와 반응하여 gluconic acid 를 생성함으로써 용액의 pH 를 감소시키고 따라서 막의 투과도가 증가한 때문이다. 그러나 그 이후의 두 곡선의 기울기는 점차 거의 같아져서 insulin 의 투과속도가 같아짐을 알 수 있었다. 이는 GOD 의 효소반응이 많이 진행되어 GOD immobilized membrane 과 PHD3 막의 계면의 pH 가 pKa 값보다 비교적 작은 값, 즉 pH 에 따라 투과도가 변화하지 않는 값이 되었기 때문인 것으로 생각할 수 있다. 즉 이 때의 대부분의 amine 은 acid 에 의해 quaternary ammonium 의 상

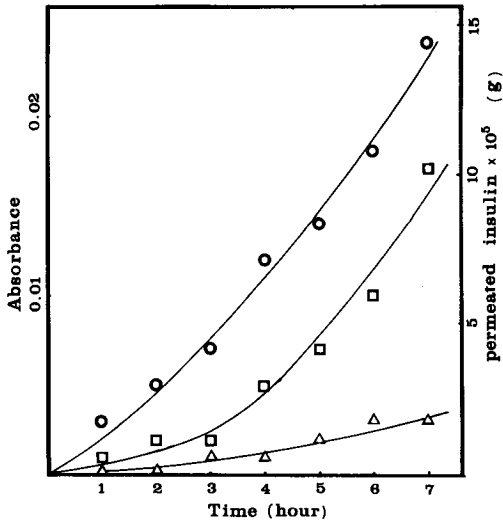


Fig. 8. Permeation profile of insulin through composite membrane.

- (△) : control
 (□) : 0.05M glucose solution
 (○) : 0.2M glucose solution

태로 존재한다. 투과 초기의 insulin 투과속도는 glucose의 농도에 비례하며 이를 이용하여 glucose의 농도에 따라 insulin 투과를 조절할 수 있었다.

4. 결 론

Tertiary amine 을 포함하는 hydroxypropyl methacrylate 고분자막의 제조와 그의 함수율측정, insulin 투과 등의 실험에서 다음의 결론을 얻었다.

동일한 pH 에서는 고분자막에 도입된 tertiary amine 의 함량이 높을수록, 동일 고분자막에서는 용액의 pH 가 감소할수록 함수율이 증가하였으며 그 곡선은 sigmoidal 한 형태를 나타내었다. 합성한 막의 인장 강도는 함수율의 증가에 따라 감소하였고 신장율은 함수율이 증가함에 따라 증가하였다. 합성한 막의 insulin 에 대한 투과계수는 용액의 pH 가 감소

함에 따라 증가하였다. 합성한 막과 GOD immobilized membrane 을 결합함으로써 용액내의 glucose 농도에 따라 insulin 의 투과속도를 조절할 수 있었다.

참 고 문 헌

1. J. L. Chiason and F. Ducros, *Diabetes Care*, **7**, **4**, 331, (1984).
2. C. M. Peterson, *Diabetes Care*, **5**, suppl. 1, 1, (1982).
3. J. Pirart, *Diabetes Care*, **1**, 168, (1978).
4. A. Schiffrin and M. Belmonte, *Diabetes Care*, **5**, 479, (1982).
5. H. M. Creque, R. Langer and J. Folkman, *Diabetes*, **29**, 37, (1980).
6. M. Brownlee and A. Cerami, *Science*, **206**, 1190, (1979).
7. J. M. Anderson and S. W. Kim, "Insulin Delivery at Variable Rates in Recent Advances in Drug Delivery Systems" Plenum Press., New York, 1984.
8. F. Alhaique, M. Marchetti, F. M. Riccieri and E. Santucci, *J. Pharmacol.*, **33**, 413, (1981).
9. D. D. Perrin and B. Dempsey, "Buffers for pH and Metal Ion Control", Chapman and Hall, London, 1974.
10. S. Hosaka and H. Ozawa, *J. Appl. Polym. Sci.*, **23**, 2089, (1979).
11. Y. Saka and H. Tanazawa, *J. Appl. Polym. Sci.*, **22**, 1805, (1978).
12. H. Hagi and O. Ooishi, "Polymeric Amines and Salts" Pergamon Press., 1980.
13. H. Yasuda and C. E. Lamaze, L. D. Ikenberry, *Makromol. Chem.*, **118**, 19, (1968).
14. K. Ishihara, M. Kobayashi, I. Shinohara, *Makromol. Chem. Rapid Comm.*, **4**, 327(1983).