

1,3-Butadiene Diepoxide에 의해 가교된 락타이드/히아루론산 고분자의 특성

한광선 · 배정은* · 김인섭* · 정성일†

한남대학교 나노생명화학공학과, *한남대학교 생명과학과

(2008년 4월 15일 접수, 2008년 5월 27일 수정, 2008년 6월 12일 채택)

Characterization of Lactide/Hyaluronic Acid Polymer Cross-Linked by 1,3-Butadiene Diepoxide

Gwang Seon Han, Jung Eun Bae*, In Seop Kim*, and Seong Ihl Cheong†

Department of Chemical Engineering and Nano-Bio Technology, Hannam University,

461-6 Jeonmin-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-811, Korea

*Department of Biological Sciences, Hannam University,

461-6 Jeonmin-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-811, Korea

(Received April 15, 2008; Revised May 27, 2008; Accepted June 12, 2008)

초록 : 조직공학용 생체재료로 사용하고자 가교제 1,3-butadiene diepoxide (BD)를 사용하여 락타이드(LA)와 가교시킨 히아루론산(HA) 고분자를 제조하였다. 가교된 고분자의 락타이드 및 BD 반응도는 핵자기 공명 분광법으로 결정하였다. 반응도와 팽윤도는 LA/HA 몰비 혹은 가교제 농도를 증가시키기에 따라 증가하였다. 탄성률은 가교제 농도가 증가하거나 HA/LA 몰비가 감소함에 따라 감소하였다. 생분해는 2단계로 진행되었으며 BD 농도가 증가할수록 서서히 진행되었다. 첫 단계 분해는 주로 가교구조에 존재하는 에스테르기의 분해에 기인한 것으로 나타났다. 세포 성장 저해는 BD 농도가 증가함에 따라 증가하였다. 세포 독성은 BD 농도가 클 경우 약간 나타났으나 그 값은 6% 미만으로 세포 성장에 큰 문제는 없는 것으로 나타났다.

Abstract : The hyaluronic acid (HA) polymers cross-linked with lactide (LA) using the crosslinking agent, 1,3-butadiene diepoxide (BD), were prepared in order to develop a biomedical material for tissue engineering. The degree of lactide and BD reaction of the crosslinked polymer was determined by the analysis of nuclear magnetic resonance spectroscopy. Both degree of reaction and swelling ratio increased with BD concentration or LA/HA mole ratio. Tensile modulus decreased with increasing BD concentration or decreasing LA/HA mole ratio. Degradation was shown to be progressed at two different stages and became slow with increasing BD concentration. It was shown that the first stage degradation was mainly due to the decomposition of ester linkage in the crosslinked structure. The cell growth inhibition increased with BD concentration. Although cytotoxicity was slightly observed in the high BD concentration, the value was very low (below 6%) enough not to affect the cell growth.

Keywords : biodegradable polymer, hyaluronic acid, lactide, 1,3-butadiene diepoxide, cytotoxicity.

서 론

생체 고분자인 히아루론산(hyaluronic acid, HA)은 무코다당류로서 연골사이에서 연골을 보호하며, 세포간 분자의 3차원 가교 역할을 하고, 세포 운동성과 세포증식을 증진시키는 역할을 한다.¹ 히아루론산은 천연 생체 고분자이므로 인체 내에서 혈액, 체액 및 생체 조직과 접촉하였을 때 우수한 생체 적합성을 갖는다. 또 열이나 효소 등에 의해서 쉽게 분해되므로 필요에 따라 분자량을 조절하는 것이 용이하며, 분자 내에 존재하는 무수한 관능기를 여러 종류의 이온으로 치환하거나 다른 물질과 가교시켜 새로운 형태의 히드로겔로 재구성하

는 것이 용이하다. 요즘 이러한 히아루론산의 우수한 물리 화학적 성질을 이용하여 히아루론산을 개조하여 조직공학, 약물전달계, 인체 모형물 등에 적용되는 생체 재료물질을 개발하려는 연구가 활발히 진행되고 있다.²⁻¹⁰ 한편, 합성 고분자인 polylactide (PLA), polyglycolide (PGA) 등은 대표적인 생체 적합성 고분자로서 수술용 봉합사로 사용된 이래 신체의 손상된 조직이나 기관의 치유를 위한 용도로 널리 사용되어 왔다. 이 고분자들은 생체 내에서 신진대사를 통해 서서히 물과 이산화탄소로 분해되므로 인체에 전혀 해롭지 않을 뿐 아니라 수술 후 인체로부터의 제거를 위한 별도의 조치가 필요치 않다.¹¹ 특히 PLA는 반분단위에 존재하는 손대칭 중심으로 인해 여러 가지 이성질체가 존재하는데 이를 조절함으로써 분해속도를 조절할 수 있으며,^{12,13} PLA의 올리고머도 D/L형 이성질체의 비율 및 분자량에 따라 분해속도

†To whom correspondence should be addressed.
E-mail: suho@hnu.kr

가 달라진다.¹⁴

본 실험실에서는 이러한 두 종류의 고분자를 가교시켜 생체 적합성이 우수할 뿐 아니라 생체 내에서 분해속도를 조절할 수 있는 생체 적합성 고분자를 합성하는 연구를 계속하여 왔다.¹⁵⁻¹⁹ 가교제 1,3-butadiene diepoxide(BD)를 사용하여 현탁액 상태에서 히아루론산을 가교시켜 비드를 제조하였으며 그 분자 구조 및 물성 등을 측정하였다.¹⁵ 대부분의 가교제에서 HA와 PLA, PGA는 반응하지 않았으나 가교제 1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide(EDC)를 사용할 경우 HA와 PLA의 단량체인 젯산이 가교되어 고분자 막이 만들어졌다.¹⁶ 그런데 히아루론산과 젯산을 가교시켜 얻은 고분자는 분해속도가 너무 빨라 생체 재료나 세포배양용 지지체로 사용하는데 문제점이 있었다. 이러한 문제점을 개선하기 위해 소수성이 더 큰 젯산의 무수 이량체인 락타이드(LA)를 사용하였다. 냉동 건조법을 이용하여 EDC로 히아루론산과 락타이드를 가교시켜 고분자를 제조하였으며, 제조된 고분자의 생체 재료로서의 응용가능성을 연구하였다.¹⁷⁻¹⁹ 락타이드와 히아루론산으로 가교된 고분자 막의 약물방출시스템에의 응용가능성을 관찰한 결과 가교도, 약물의 종류 등에 따라 약물 방출속도가 크게 달라짐을 알 수 있었다.¹⁸ 그런데 제조된 막의 세포 독성을 측정하는 과정에서 EDC 농도가 높을 경우 가교도는 증가하나 세포 독성도 함께 증가하는 현상이 관찰되었다.¹⁹ 이는 가교 반응시 반응에 참여한 EDC가 막에 존재하여 세포 독성을 일으키는 것으로 밝혀져 생체 재료로서 사용하기에 부적절한 것으로 판명되었다. 막의 제조에 사용되는 다른 종류의 가교제 중 epoxide계열의 가교제가 생체 적용 고분자 합성에 사용될 뿐 아니라²⁰⁻²² 본 실험실에서도 BD를 사용하여 비드를 합성한 경험이 있어¹⁶ 이를 사용할 것을 검토하였다. BD는 독성을 일으키는 것으로 추정되는 아민기를 포함하지 않을 뿐 아니라 BD에 존재하는 에폭사이드기는 가교 반응 후 에테르기로 변화되는 것으로 알려져 있어²³ 제조된 막은 독성이 없을 것으로 보여²⁴ BD를 가교제로 선정하여 고분자 막을 합성하려고 하였다. 이렇게 얻어진 고분자가 예상대로 세포 독성이 없을 경우 신체의 장이나 세포가 접촉하여 분화, 성장할 수 있는 지지체 혹은 인체 내에서 서서히 약물을 방출시키는 약물전달 지지체로서 응용될 수 있을 것이다.

본 연구에서는 BD로 히아루론산과 락타이드를 가교시켜 고분자 막을 제조하였고 핵자기 공명 분광 분석기(NMR)로 분자구조를 확인하였다. 또 히아루론산과 락타이드의 혼합 몰비와 가교제 농도를 변화시키면서 제조된 막의 팽윤도 및 기계적 물성을 측정하였다. 생체 재료로서의 사용 가능성을 살펴보기 위해 생분해성과 L929 섬유아세포에 대한 세포독성을 측정하였다.

실 험

실험재료. 히아루론산은 평균분자량 2×10^6 Da인 Fulllong-chem Corp.사(Changzhou, China)의 의약품 제품을 사용하였다. 락타이드, 페니실린, 황산 게타마이신, phosphate buffered saline (PBS), trypan blue solution은 Sigma Aldrich(Korea)에서, BD는 Wako Chemical(Japan)에서, 트립신은 GIBCO Lab.(USA)에서 구입하여 사용하였다. 세포 독성 실험에 사용된 PS 배양플레이트는 Corning사(USA) 제품을 사용하였고 fetal bovine serum(FBS)과

DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 배지는 HyClone Laboratories, Inc.사(USA) 제품을 사용하였다. 모델 세포로 사용된 L929 섬유아세포(KCLB 10001)는 Korea Cell Line Bank(Korea)로부터 구하여 사용하였다.

막의 제조. 1 N NaOH 수용액에 3 wt% 히아루론산을 녹인 후 히아루론산 기준으로 락타이드를 2-7 몰비로 첨가하여 상온에서 24시간 교반하였다. 히아루론산과 락타이드의 혼합 용액에 가교제 BD를 4-12 wt%로 넣은 후 30 °C에서 8시간 교반기로 교반시키며 반응시켰다. 반응 후 혼합용액을 캐스팅 판에 부어 Gardner 칼을 이용하여 균일한 두께로 캐스팅한 후 25 °C에서 48시간 건조시켰다. 건조된 막은 에탄올로 세척 후 증류수로 30분간 세척하여 미반응 물질과 잔유 BD를 제거한 후 48시간 건조시켰다.

물성연구.

기기분석: 제조된 막의 가교됨을 확인하기 위해 NMR을 사용하여 관능기를 확인하였고 이를 기초로 락타이드 반응도와 가교제 BD의 반응도를 결정하였다. NMR은 D_2SO_4 를 용매로 하여 Bruker AMX 500 MHz(Karlsruhe, Germany)로 측정하였다. Universal Testing Machine(UTM)을 사용하여 $76.2 \times 3.15 \text{ mm}^2$ 크기로 제작된 막의 인장 강도를 측정하였다.

팽윤도: 막을 일정한 크기로 잘라 물속에 침전시킨 후 막이 평형에 완전히 이를 수 있도록 24시간 동안 상온에서 보관하였다. 이 막을 꺼내 표면의 물을 제거한 후 무게를 측정한 다음 건조기에 넣어 수분을 완전히 제거한 후 건조된 막의 무게를 측정하여 다음 식으로 팽윤도를 계산하였다.

$$\text{팽윤도}(\%) = \frac{W_s - W_d}{W_d} \times 100(\%)$$

W_s : 젖은 시료의 무게, W_d : 건조된 시료의 무게

막의 가수분해: 제조된 막을 다른 효소 없이 증류수에 침전시킨 후 37 °C에서 분해가 얼마나 이루어지는지 살펴보았다. 시료는 일정한 크기로 잘라 50 mL 병에 넣어 37 °C에서 가수분해시키면서 정해진 시간에 37 °C 건조기에서 24시간 건조한 후 시료의 무게를 재어 분해정도를 측정하였다. 동일한 조건에서 3회 반복하여 평균값을 취하였다.

막의 침출물 추출: 락타이드로 가교시킨 히아루론산 막을 지름이 1.2 cm 정도로 일정하게 자르고 24 well polystyrene(PS) 배양 플레이트에 넣은 후 PBS 2 mL를 각 well에 첨가하여 37 °C에서 100 rpm으로 24시간 동안 교반하면서 침출물을 추출하였다.

막의 세포독성: 막 침출물의 세포독성을 평가하기 위한 모델 세포로 L929 섬유아세포를 사용하였다.²⁵ 섬유아세포는 10% FBS와 100 units/mL의 페니실린 및 100 µg/mL의 황산 게타마이신이 첨가된 DMEM 배지를 사용하여 37 °C, 5% CO₂의 incubator에서 배양하였다. 섬유아세포를 0.25% 트립신으로 처리하여 배양용기 바닥에서 떼어 낸 후 24 well PS 배양용기에 $4 \times 10^4 \text{ cell/cm}^2$ 의 세포농도로 파종하였다. 24시간 동안 배양한 후 배지를 피펫으로 제거하고 미리 준비한 침출물을 첨가하여 4일 동안 배양하였다. 이때 PBS를 막 침출물의 대조군으로 사용하였다. 세포계수를 위해 PBS를 이용하여 각

well을 세척한 후 0.25% 트립신으로 처리하여 세포를 분리시킨 후 세포배양매지를 넣고 현탁한 뒤 1000 rpm에서 5분간 원심 분리하여 트립신을 제거하였다. 1 mL 세포배양매지를 첨가하여 현탁한 뒤 동량의 trypan blue solution을 처리하고 5분간 반응시킨 후 hemacytometer를 이용하여 계수하였다. 세포독성은 막 침출물에 의해서 섬유아세포의 성장이 저해받는 정도를 아래와 같은 계산에 의해 % growth inhibition으로 나타내었다.

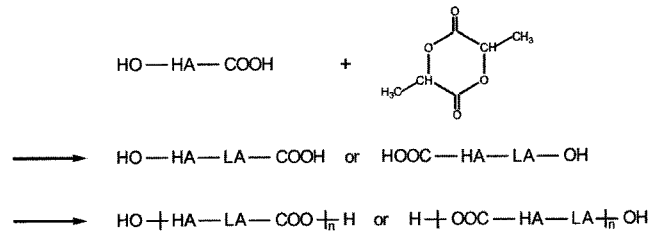
$$\% \text{ growth inhibition} = (A - B) / A \times 100$$

A : 세포배양매지를 첨가한 well에서 자란 섬유아세포의 개수

B : 막 침출물을 첨가한 well에서 자란 섬유아세포의 개수

결과 및 토론

가교제 BD로 히아루론산과 락타이드를 반응시켜 얻은 고분자는 이미 발표된 가교제 EDC를 사용하여 얻은 고분자의¹⁷ 경우와 동일하게 히드록시기와 카복실기가 에스테르화한 분자구조를 갖게 된다. 히아루론산은 히드록시기와 카복실기를 갖고 있고, 락타이드는 젖산의 무수이량체로서 고리형 구조를 갖는데 이들이 서로 결합하여 1차 반응 생성물이 생성된다. 1차 반응생성물은 서로 반응하여 가교화되며 이 반응이 계속되면서 가교화가 진행된다. 히아루론산을 HOOC-HA-OH, 락타이드에서 반복단위구조[CHCH₃-COO]₂를 LA로 표시하면 여기서 언급한 가교반응은 다음과 같이 표현할 수 있다.



이 반응식은 가장 대표적인 반응만을 표현한 것으로 히아루론산, 반응 생성물 모두 히드록시기와 카복실기를 갖고 있어 그들끼리의 에스테르반응 혹은 락타이드와의 반응에 의하여 반응은 매우 복잡하게 진행된다. 우리는 히아루론산과 락타이드의 반응유무에 관심이 있기 때문에 반응에 의해 생성되는 분자구조에 초점을 맞추려 하고 이때 얻을 수 있는 분자구조를 Figure 1에 보였다. Figure 1(a)는 히아루론산에 반응한 락타이드가 말단기 형태로 존재하는 경우이며 Figure 1(b)는 말단기에 존재하는 락타이드에 또 다른 히아루론산이 반응하여 완전히 가교된 형태로 존재하는 경우이다. 말단기로 존재하는 에스테르기에 연결되어 있는 메틸기와 가교된 상태로 존재하는 에스테르기에 연결된 메틸기의 연결 방식이 다른 점에 주목하여 관능기의 구조를 확인하기 위하여 NMR로 분석하였으며 대표적인 스펙트럼을 Figure 2에 보였다. 1.9, 2.1, 2.8 ppm에서 각각 말단기로 존재하는 에스테르기에 연결되어 있는 메틸기(a), 가교된 상태로 존재하는 에스테르기에 연결된 메틸기(b), 히아루론산의 아마이드기에 연결되어 있는 메틸기(c)의 피크가 나타났다. 이미 발표된 논문과¹⁷ 동

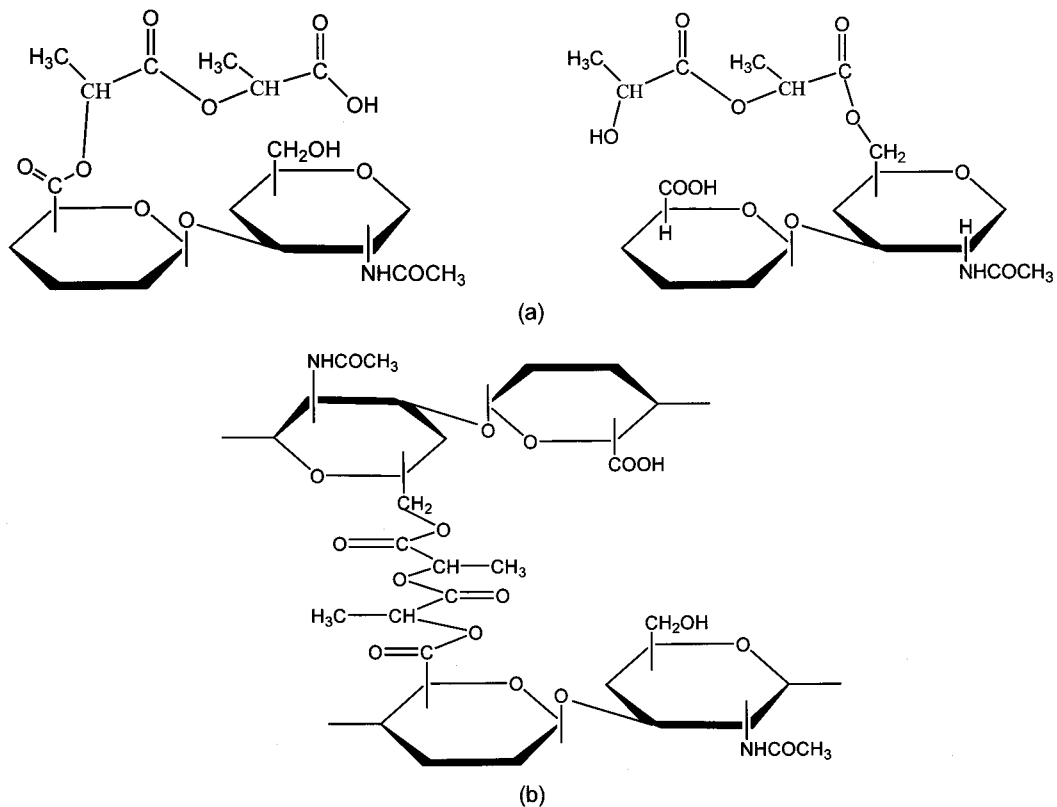


Figure 1. Structure of ester group (a) connected to lactide end group and (b) crosslinked to HA.

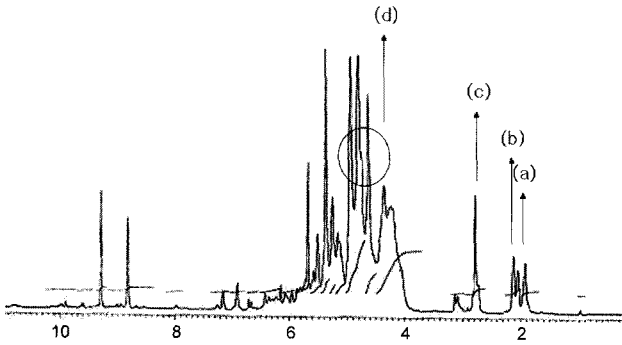
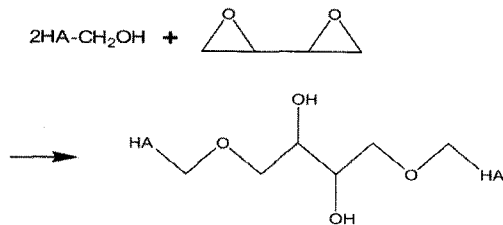


Figure 2. $^1\text{H-NMR}$ spectra with methyl group (a) connected to ester end group, (b) connected to crosslinked ester group, (c) connected to amide group of HA, and (d) methylene group connected to BD.

일한 방법으로 2.8 ppm 피크의 면적에 대한 2.1과 1.9 ppm에서의 피크 면적의 합에 대한 면적비를 락타이드 반응도로, 면적 합에 대한 2.1 ppm에서의 면적비를 반응한 락타이드 중에서 가교된 부분의 선택도로 간주하였다. 또 BD는 히아루론산의 히드록시기와 반응하여 아래와 같은 분자구조를 형성하는 것으로 알려져 있다.²³



NMR 분석 도표에서 에테르기에 연결된 메틸렌기(d)의 분자구조는 확인 결과 4.3–4.8 ppm 위치에서 여러 피크가 중첩되어 나타났다. 이 위치에서의 피크는 가교제가 히아루론산과 반응하여 생성된 피크이므로 이 피크를 가교제에 의한 가교정도를 나타내는 경향성으로 보아 2.8 ppm 피크 면적에 대한 4.3–4.8 ppm 피크 면적비를 가교제 BD의 반응도로 간주하였다. 가교 온도 30 °C에서 가교제 농도를 증가시키면서 반응시켜 얻어진 막의 NMR 그래프로부터 각 위치에서의 피크 면적을 Table 1에, 위의 방법으로 계산된 반응성 결과를 Table 2에 나타내었다. 가교제 농도가 증가함에 따라 락타이드 반응도와 선택도 모두 증가하여 가교제가 많을수록 락타이드의 반응성이 증가할 뿐 아니라 락타이드가 말단에 연결된 형태로 존재하는 것보다 가교된 형태로 존재하는 경향이 더욱 커짐을 보였다. 또 가교제 BD도 반응에 더욱 많이 참여하여 가교된 구조에 더 많이 존재함을 알 수 있었다. 가교제 EDC를 사용한 경우와 마찬가지로^{4,17} 가교제 농도가 커질수록 락타이드 반응도와 가교제 반응도가 증가하였고 선택도 또한 증가하였다.

락타이드 및 BD의 부가가 막의 소수성과 기계적 물성에 미치는 영향을 살펴보기 위해 팽윤도와 기계적 강도를 측정하였다. 시료의 기계적 물성을 측정된 결과를 Table 3에 나타내었다. 가교제 농도가 증가함에 따라 인장 강도와 탄성률은 감소하였으나 인장률은 증가하였다. 가교제 EDC를 사용할 경우 가교제 농도가 증가하면 가교

Table 1. Methyl and Methylene Group Concentration Measured by $^1\text{H-NMR}$ in the LA/HA Polymers Crosslinked at Different BD Concentration

BD Concentration (wt%)	1.9 ppm (a)	2.1 ppm (b)	2.8 ppm (c)	4.3–4.8 ppm (d)
4.26	0.0536	0.0399	0.0661	0.6277
8.18	0.0234	0.0378	0.0414	0.7344
11.78	0.0213	0.0373	0.0244	0.7516

Table 2. Reactivities Calculated from NMR Data of Table 1

BD Concentration (wt%)	Degree of lactide reaction((a+b)/c)	Selectivity (b/(a+b))	Degree of BD reaction(d/c)
4.26	1.415	0.427	9.496
8.18	1.478	0.618	17.739
11.78	2.402	0.637	30.803

Table 3. Tensile Properties of LA/HA Polymers with BD Concentration (mole ratio: 5, temperature: 30 °C)

BD concentration (wt%)	Tensile strength (kg/mm ²)	Young's modulus (kg/mm ²)	Elongation (%)
4.26	0.484	0.461	155
8.18	0.324	0.211	220
11.78	0.113	0.066	269

도가 증가하여 인장 강도와 탄성률이 증가하고 인장률은 감소하였으나^{4,17} 가교제 BD를 사용할 경우 이와 반대로 인장 강도와 탄성률은 감소하고 인장률은 증가하는 경향을 보였다. 일반적으로 가교도가 증가하여 분자내에 3차원 구조가 발달하게 되면 인장 강도가 증가하고 인장률은 감소하게 된다. 한편, BD가 히아루론산과 반응하면 에폭시기가 에테르기로 변하게 되는데 이것이 골격의 비틀림 유동과 유연성을 증가시키는 역할을 한다.²⁵ 그리하여 가교제 BD의 농도가 증가하여 BD 반응도가 증가하면 에테르기의 농도가 높게 되어 인장률은 증가하게 하고 인장 강도와 탄성률은 감소하게 된다. 가교제 농도가 증가하여 반응도가 증가하게 되면 이 두 가지 효과가 동시에 함께 나타나게 되는데 BD 반응도가 락타이드 반응도에 비해 상대적으로 크기 때문에 이 효과가 더 크게 나타나게 되어 인장 강도와 탄성률은 감소하고 인장률은 증가하는 것으로 사료된다.

Figure 3에서 BD 농도에 따른 팽윤도를 가교도와 함께 보였다. BD 농도가 증가할수록 BD 및 락타이드 반응도 모두 커지며 팽윤도는 감소하였다. EDC를 가교제로 사용할 때와 비교하여 볼 때 팽윤도가 2–3배 정도 증가하였다.^{4,17} BD를 사용할 경우 EDC를 사용한 경우보다 팽윤도가 증가하는 이유는 가교된 분자구조의 차이에서 기인한 것으로 보인다. 즉 EDC에 의해서 얻어진 고분자의 구조에는 에테르기가 존재하지 않아 친수성이 떨어지나 BD를 사용할 경우 에테르기가 생성되며 이 에테르기가 물과의 상호작용이 우수하여 친수성을 높여주어 팽윤도가 증가하는 것으로 보인다.

가교제 농도 8.18 wt%, 가교 온도 30 °C에서 물비를 2–7로 변화시키면서 만든 막의 기계적 물성을 관찰한 결과를 Table 4에, 반응성 및 팽윤도 결과를 Figure 4에 나타내었다. Table 4에서 물비가 증가함에 따라 인장 강도와 탄성률은 증가하였으나 인장률은 감소하

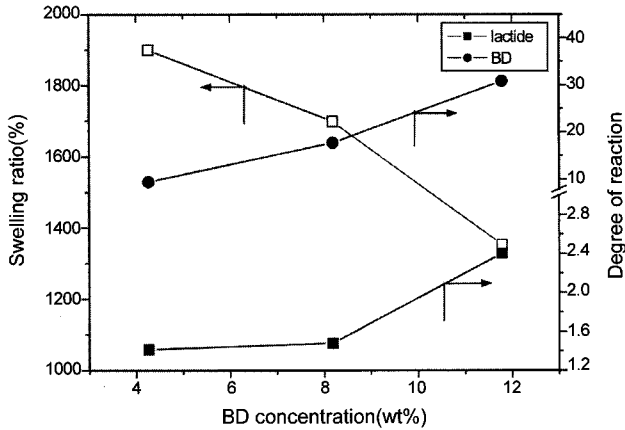


Figure 3. The effect of BD concentration on swelling and reactivity.

Table 4. Tensile Properties of LA/HA Polymers with Mole Ratio (BD concentration: 8.18 wt%, temperature: 30 °C)

Mole ratio (LA/HA)	Tensile strength (kg/mm ²)	Young's modulus (kg/mm ²)	Elongation (%)
2	0.214	0.161	255
5	0.324	0.211	220
7	0.733	0.706	107

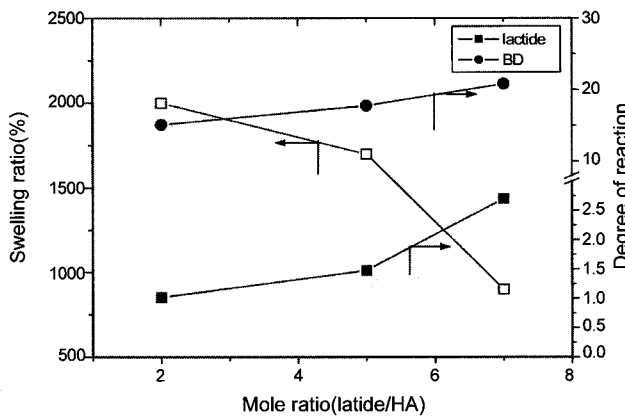


Figure 4. The effect of mole ratio on swelling and reactivity.

였다. 또 Figure 4에서 몰비가 증가하면 락타이드 반응도 및 BD 반응도 모두 커지며 따라서 3차원적인 분자구조가 더욱 발달하여 팽윤도는 감소하는 경향을 보였다. Figure 4에서 반응도를 살펴보면 몰비가 증가함에 따라 락타이드 반응도는 크게 증가하나 BD 반응도는 약간 증가하는 경향을 보이고 있다. 몰비가 증가할수록 BD보다 락타이드가 더 많이 반응에 참여하여 반응도가 증가한 것을 알 수 있는데, 그 결과 BD에 의한 유연성이 물성에 미치는 영향은 크게 변화가 없으나 락타이드의 반응에 의한 가교도의 증가와 젖산기의 취성이 물성에 큰 영향을 주어 인장 강도와 탄성률은 증가하고 인장률은 감소한 것으로 사료된다.

가교된 고분자의 생체 내에서 분해 능력을 살펴보기 위해 동일한 분자량의 히이루론산으로부터 가교된 고분자 막을 증류수에 침전시킨 후 37 °C, pH 7.4에서 시간에 따른 분해거동을 관찰하였다. 물

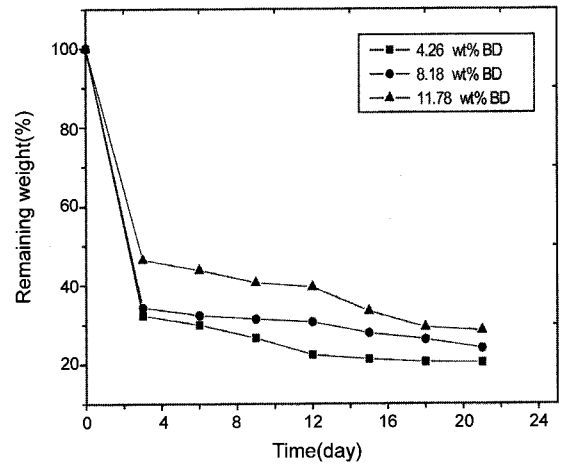


Figure 5. Degradation profiles of LA/HA polymers crosslinked at different BD concentration.

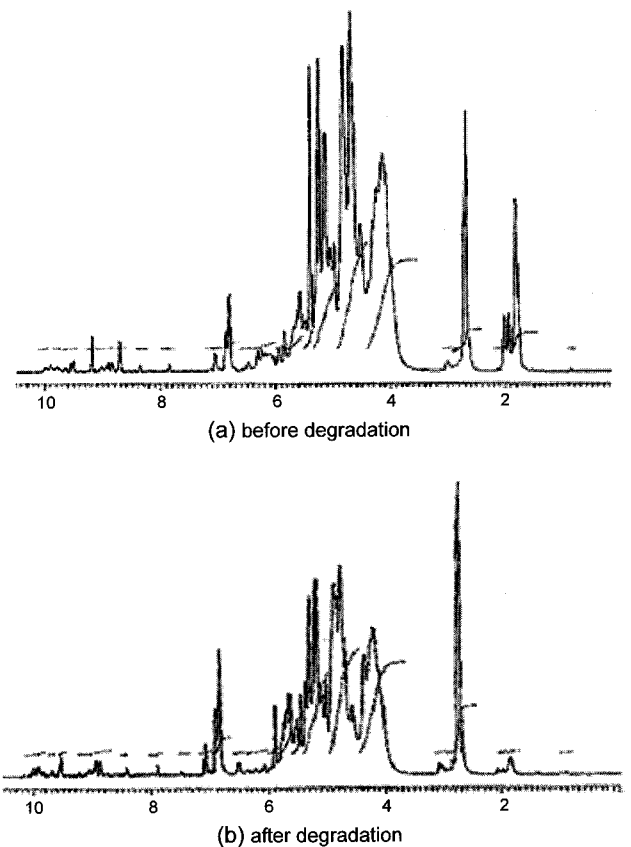


Figure 6. Comparison of ¹H-NMR spectra of LA/HA polymer (a) before degradation and (b) after 3 days' degradation.

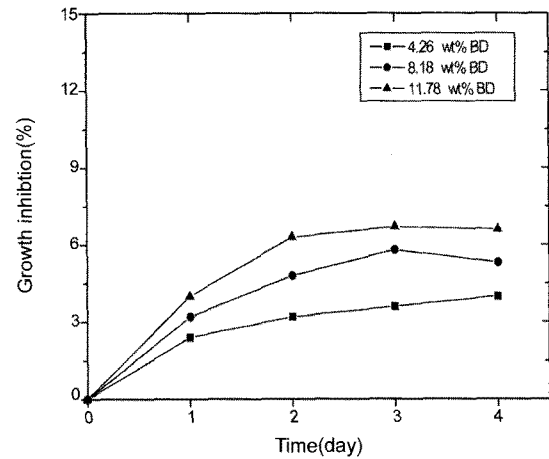
비 5, 가교온도 30 °C에서 가교제 농도를 증가시키면서 제조된 막의 분해 속도를 측정된 결과를 Figure 5에 보였다. 모든 종류의 막이 신속히 분해되었고 가교제 농도가 커서 가교가 많이 된 막일수록 분해 속도가 느렸다. 또 초기에 급격히 분해되고 그 후에는 서서히 분해되는 경향을 보였다. 전반적으로 EDC로 가교된 막이 반감기가 약 30-60일 정도인데^{4,17} BD로 제조된 막의 경우 반감기가 3일 이내로

Table 5. Reactivities Calculated from NMR Data in the LA/HA Polymers before Degradation and after 3 days' Degradation

Time	Degree of lactide reaction	Degree of BD reaction
Before degradation	1.16	5.3
After degradation	0.08	2.2

분해가 훨씬 빠르게 진행되었다. 이는 BD로 만든 막에는 주사슬에 친수성이 우수한 에테르기가 존재하는데 이러한 주사슬의 구조차이로 인해 가수분해 속도가 차이는 것으로 보여진다. 이 현상을 보다 분명히 이해하기 위하여 가교제 농도 4 wt%, 몰비 5, 반응온도 30 °C에서 제조된 시료와 이 시료를 3일 동안 가수분해시킨 후의 시료를 NMR로 측정한 그래프를 Figure 6에 보였다. Figure 6(b)에서 3일 동안 가수분해시킨 후의 그래프에서 2.1–2.3 ppm에 존재하는 피크가 거의 소멸된 것을 볼 수 있는데 이 위치의 피크는 락타이드와 히아루론산이 반응하여 가교된 구조에 존재하거나 혹은 말단기 형태로 존재하는 메틸기로서 대부분이 빠르게 가수분해 되었음을 보여주고 있다. 이 자료를 위에서의 동일한 방법으로 반응도를 계산한 결과를 Table 5에 보였다. 가수분해되기 전 시료의 락타이드 반응도와 BD 반응도는 각각 1.16, 5.3이었으나 가수분해 후의 시료는 0.08, 2.2이었다. 즉 가수분해 후 락타이드로 가교된 구조는 93%정도 분해되었으나 BD로 가교된 구조는 58%정도만 분해되었다. BD로 가교된 경우 친수성이 우수한 에테르기로 연결된 부분이 분해가 빠를 것으로 보였으나 오히려 락타이드로 가교된 에스테르기가 더 빨리 분해되었다. 주사슬에 존재하는 에테르기의 분해속도와, 에스테르기의 분해속도가 현저히 차이가 나는 것을 알 수 있었다.

조직 공학, 약물 전달체, 인체 보형물 등에 적용되는 의료용 생분해성 고분자는 물리화학적 특성과 기계적 물성이 생체 재료로 사용하기 적합해야 할 뿐 아니라 인체 세포에 독성을 나타내지 않아야 한다. 이미 발표된 가교제 EDC로 히아루론산과 락타이드를 가교시켜 제조한 고분자 막은^{4,17} 가교도가 낮은 경우 세포 독성을 나타내지 않으나 기계적 물성이 약하여 사용하는데 제한적이었다. 또 가교도를 높일 경우 EDC가 고분자 막에 상당량 포함되어 있어 세포독성을 나타내어 생체 재료로 사용할 수 없었다. 그리하여 세포독성이 없는 고분자 막을 제조하고자 새로운 가교제 BD를 사용하여 가교시켰다. 비록 BD와 같은 에폭사이드 계통의 화합물이 세포 독성이 있을 수 있으나 히아루론산과 가교하면 에폭사이드기가 에테르기로 변화하여 세포독성이 없을 것으로^{24,26} 예상하여 BD를 가교제로 선택하였다. BD 함유율이 높을 경우 세포독성이 나타날 확률이 높으므로 이에 대한 영향을 관찰하기 위해서 BD 농도를 증가시키면서 합성된 막의 세포독성을 관찰하여 Figure 7에 보였다. 시간이 지남에 따라 6% 이하의 성장 저해가 나타났으나 3–4일이 지나면 더 이상의 성장저해가 나타나지 않았다. 또 BD 농도가 높을수록 성장저해가 더 크게 나타났다. 그러나 모든 경우에 있어서 성장저해가 6% 이하의 미미한 수준이어서 세포 성장에 큰 문제가 없는 것으로 나타났다. 특히 이번에 사용된 섬유아세포 L929는 본 실험실에서 EDC를 사용하여 세포 독성을 관찰할 때 사용하였던 NIH/3T3에 비해 독성에 대한 민감도가 훨씬 우수한 종류임을 고려할 때 생체 적합성이 매우 우수한 것으로 판단되었다. 이 실험 결과를 살펴볼 때 BD 농도를 조절함으로써 BD 반응도를 최소화하

**Figure 7.** Growth inhibition of L929 embryo fibroblast cell in the extracts of LA/HA polymers crosslinked at different BD concentration.

면 세포독성이 거의 없는 고분자 막을 제조할 수 있으며 따라서 조직 재생용 지지체, 약물 전달체, 인체 보형물 등의 생체 재료로 활용 가능할 것으로 기대된다.

결론

히아루론산과 락타이드 수용액을 가교제 BD로 가교시켜 불용성 막을 제조하였다. 생성된 고분자 막을 NMR로 분석하여 락타이드와 BD가 히아루론산과 결합한 구조를 확인하였고 이로부터 반응도를 추정하였다. 가교제 농도를 증가시키면서 가교시킨 결과 가교도가 증가하였으며 팽윤도는 감소하였다. 동일한 시료로 기계적 강도를 측정할 결과 탄성률은 감소하였고 신장률은 증가하였다. 분해 속도를 살펴본 결과 3–4일 이내에 1차적으로 급격히 분해된 후 서서히 분해되는 모습을 보였다. 세포 독성을 살펴본 결과 가교제를 많이 사용하여 막 내부에 가교제가 많이 포함된 시료일수록 성장저해가 증가하였으나 모든 시료에서 6% 이하의 미미한 세포 독성이 관찰되었다.

참고 문헌

1. Y. D. Park, N. Tirelli, and J. A. Hubbell, *Biomaterials*, **24**, 893 (2003).
2. G. D. Prestwich, D. M. Marecak, and J. F. Marecek, *J. Control. Rel.*, **53**, 93 (1998).
3. Y. Luo, K. R. Kirker, and G. D. Prestwich, *J. Control. Rel.*, **69**, 169 (2000).
4. S. N. Park, H. J. Lee, K. H. Lee, and H. Suh, *Biomaterials*, **22**, 1205 (2002).
5. S. N. Park, H. J. Lee, K. H. Lee, and H. Suh, *Biomaterials*, **24**, 1631 (2003).
6. H. S. Nam, J. H. Kim, J. H. An, and D. J. Jung, *Polymer(Korea)*, **25**, 476 (2001).
7. J. A. Hunt, H. N. Joshi, V. J. Stella, and E. M. Topp, *J. Control. Rel.*, **12**, 159 (1990).

8. L. Benedetti, R. Cortivo, T. Berti, A. Berti, F. Pea, M. Marzzo, M. Moras, and G. Abatangel, *Biomaterials*, **14**, 1154 (1993).
9. J. Aigner, J. Tegeler, P. Hutzler, D. Campoccia, A. Pavesio, C. Hammer, E. Kastenbauer, and A. Naumann, *J. Biomed. Mater. Res.*, **42**, 172 (1998).
10. G. P. Chen, Y. Ito, Y. Imanishi, A. Magnani, S. Lamponi, and R. Barbucci, *Bioconjugate Chem.*, **8**, 730 (1997).
11. J. S. Lee, D. J. Choo, S. H. Kim, and Y. H. Kim, *Polymer (Korea)*, **22**, 880 (1998).
12. C. Grandfils, P. Flandroy, and R. Jerome, *J. Control. Rel.*, **38**, 109 (1996).
13. H. Fukuzaki, M. Yoshida, M. Asano, and M. Kumakura, *Eur. Polym. J.*, **25**, 1019 (1989).
14. S. Li, M. Tenon, H. Garreau, C. Braud, and M. Vert, *Polym. Degrad. Stab.*, **67**, 85 (2000).
15. J. Y. Kwon and S. I. Cheong, *Polymer (Korea)*, **29**, 445 (2005).
16. J. Y. Kwon and S. I. Cheong, *Membrane J. (Korea)*, **15**, 8 (2005).
17. J. Y. Kwon and S. I. Cheong, *Polymer (Korea)*, **29**, 599 (2005).
18. M. S. Kim, J. Y. Kwon, and S. I. Cheong, *Membrane J. (Korea)*, **15**, 281 (2005).
19. W. J. Kim, J. Y. Kwon, S. I. Cheong, and I. S. Kim, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **21**, 255 (2006).
20. K. Sakurai, Y. Ueno, and T. Okuyama, U.S. Patent 4,716,224 (1987).
21. T. Malson, L. G. Ahrgren, and A. N. Belder, U.S. Patent 4,772,419 (1988).
22. J. D. Yang, S. W. Tsai, J. H. Chen, C. L. Chen, and Y. L. Hsieh, U.S. Patent 6,852,255 (2002).
23. T. C. Laurent, K. Helsing, and B. Gelotte, *Acta Chem. Scand.*, **18**, 274 (1964).
24. B. Ronneberger, W. J. Kao, J. M. Anderson, and T. Kissel, *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, **30**, 31 (1996).
25. H. R. Allcock and F. W. Lampe, *Contemporary Polymer Chemistry*, 2nd ed., Prentice-Hall, Inc., New Jersey, NJ, 1981.
26. S. H. Oh, J. Y. Lee, S. H. Ghil, S. S. Lee, S. H. Yuk, and J. H. Lee, *Biomaterials*, **27**, 1936 (2006).