

동결/융해와 방사선 가교법에 의한 PVA/CMC 수화젤의 제조 및 특성 평가

조선영*** · 임윤목*† · 윤민호* · 권희정* · 박종석* · 노영창* · 신홍수**

*한국원자력연구원 정읍 방사선과학연구소 방사선공업환경연구부, **한양대학교 대학원 생명공학과
(2009년 5월 21일 접수, 2009년 7월 1일 수정, 2009년 7월 7일 채택)

Fabrication and Characterization of PVA/CMC Hydrogels by Freezing-Thawing Technique and Gamma-Ray Irradiation

Sun-Young Jo***, Youn-Mook Lim*†, Min-Ho Youn*, Hui-Jeong Gwon*,
Jong-Seok Park*, Young-Chang Nho*, and Heungsoo Shin**

*Radiation Research Division for Industry & Environment,
Advanced Radiation Technology Institute, Korea Atomic Energy Research Institute,
1266 Sinjeong-dong, Jeongeup-si, Jeollabuk-do 580-185, Korea

**Department of Bioengineering, Division of Applied Chemical and Bio Engineering,
Hanyang University, Haengdang-dong, Seongdong-gu, Seoul 133-791, Korea

(Received May 21, 2009; Revised July 1, 2009; Accepted July 7, 2009)

초록: Poly(vinyl alcohol) (PVA)와 carboxymethyl cellulose sodium salt (CMC)는 우수한 생체적합성 및 수용성으로 인하여 생체의학 분야에서 주목하는 재료 중 하나이다. 본 연구에서는 PVA와 CMC를 동결/융해 과정과 감마선 조사에 의하여 인공연골로서 사용 가능한 수화젤을 제조하였다. 수화젤 제조시 PVA/CMC의 농도는 PVA는 7 wt%, CMC는 4 wt%로 고정시켰으며, 동결/융해 과정은 2회 반복하였으며, 감마선은 30 kGy 조사하였다. 방사선 조사 전과 후의 겔화율은 눈에 띄는 차이는 보이지 않았으나 팽윤도는 조사 후에 감소하였으며, 겔강도는 증가하였다. CCK-8 assay에 의하여 세포독성이 없는 것으로 확인되었다. 제조된 PVA/CMC 수화젤은 체내에 삽입되는 인공연골 재료로서 사용가능성을 제시하였다.

Abstract: Poly(vinyl alcohol) (PVA) and carboxymethyl cellulose (CMC) have received increasing attention in biomedical and biochemical applications because of their properties such as being water-soluble and biocompatible. In this study, a PVA/CMC hydrogel applicable to artificial cartilage was prepared by a freezing-thawing technique and a gamma-ray irradiation. The solid concentration of PVA was 7 wt% and the concentration of CMC was 4 wt%. The freezing/thawing process was repeated twice and the dose of gamma-ray irradiated was 30 kGy. Results of gelation before and after gamma-ray irradiation were similar, but the swelling degree decreased and compressive strength increased. The cytotoxicity was investigated with CCK-8 assay.

Keywords: PVA, CMC, gamma-ray irradiation, hydrogel.

서 론

최근 교통사고 및 산업재해 뿐만 아니라 여가생활의 활용도 증가로 다양한 레저스포츠를 즐기는 인구가 증가하면서 따르는 부상의 증가로 인하여 골대체제 및 골조직 치료개선을 위한 연구가 활발히 이루어지고 있다.^{1,2} 또한, 고령화 인구가 증가하고 있는 시대적 배경에 맞춰 노화에 의해 유발되는 골다공증을 비롯한 골조직의 마모현상 등 질병의 해결을 위한 대책 마련이 시급한 현실이다.

생체 의학 분야에서 여러 가지 목적에 부합되는 재료로서 사용되는 물질 중 하나로 수화젤을 들 수 있다. 수화젤은 체내에서 분해가

용이하며 주변조직과의 친화성을 가지고 있어 약물전달체, 상처 치료용 드레싱, 유착방지막 및 연골 등 다양한 분야에 사용된다.³⁻⁵ 수화젤을 이루는 두 개 이상의 고분자 중 하나는 친수성 고분자인데, 고분자의 사슬들이 결합에 의하여 3차원 망상구조를 이루면 물에 녹지 않는 성질과 함께 망상구조 내에 수분을 함유할 수 있다.⁶

Poly(vinyl alcohol) (PVA)를 이용한 수화젤은 우수한 생체적합성을 가지며 생체의학적으로 인공디스크 및 인공연골, 콘택트렌즈 등의 여러 분야에서 연구되고 있다.^{7,8} PVA 수화젤은 제조 방법에 따라 다양한 물성 제어가 가능하며 특히, 동결/융해 기술에 따라 기계적 특성을 강화시킬 수 있다. PVA 수화젤은 동결/융해 과정을 거치면 수화젤 내의 고분자들의 물리적인 가교가 이루어지며 이에 따라 결정질 형태를 띠게 됨과 함께 기계적 물성이 높아지고 수용성의 성질을 잃게 된다.^{13,14}

†To whom correspondence should be addressed.
E-mail: ymlim71@kaeri.re.kr

Carboxymethyl cellulose(CMC)는 천연고분자로서 자연상태에서 풍부하게 존재하며 값이 저렴고 물에 잘 녹으며 생체적합성이 뛰어나 많은 분야에 폭넓게 사용되고 있다. CMC 수화젤 역시 인체에 무해하며 높은 수분 흡수성과 우수한 생체 적합성 등의 특징을 나타내어 생체재료로서 널리 이용되고 있다. 그러나, 여러 가지 우수한 특성을 갖는 반면, CMC 수화젤은 낮은 기계적 물성을 보여 다양한 분야의 응용에 제한이 따른다.⁹⁻¹²

본 연구에서는 우수한 기계적 물성을 가지고 있어 다양한 수화젤과 막의 제조에 자주 이용되는 PVA와^{7,8} 무독성, 생분해성 및 생체적합성을 가지고 있어 수화젤의 원료나 동종이식 전달체로서 의학적으로도 널리 사용되는 천연고분자 CMC를^{11,12} 이용하여 PVA/CMC 혼합 수용액으로 생체 친화성이 높은 수화젤을 제조하고자 하였다. 혼합수용액 중 PVA는 동결/융해과정을 통하여 물리적으로 가교가 일어나는 성질을^{13,14} 가지고 있어, 2회 반복하여 물리적인 가교를 수행하였으며, 가교된 PVA/CMC는 방사선(⁶⁰Co 감마선) 조사에 의하여 생성되는 라디칼을 이용하여 화학적 가교와 열관과정을 동시에 수행하였다. 최종적으로 제조된 수화젤의 인공 연골 대체물로서의 적합성을 평가하기 위하여 감마선 조사 전후의 물성을 팽윤도, 겔화율, 겔강도 등을 관찰하였다.

실 험

시료 및 시약. PVA는 분자량(M_w) $1.24 \times 10^5 - 1.86 \times 10^5$, hydrolyzed 98-99%를 Aldrich(USA)사에서 구입하여 사용하였으며, CMC(D.S 1.2)는¹⁵ Sigma-Aldrich(USA)에서 구매하였다. 사용된 PVA는 정제 과정 없이 사용되었으며, 물은 3차 증류수를 사용했다. 세포독성 실험에서는 L-929(10001, KCLB) 세포를 사용했으며, 사용된 배지는 10% Fetal Bovine Serum(FBS, GIBCO, USA)와 1% Penicillin-streptomycin(P/S, GIBCO, USA)가 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM, GIBCO, USA)을 사용하였다. 배양된 세포 처리 시 trypsin-EDTA(GIBCO, USA)와 phosphate buffered saline(PBS, GIBCO, USA)를 사용하였으며, 세포독성 평가는 Cell counting kit-8(CCK-8, Dojindo, Japan)을 사용하였다.

수화젤 제조. PVA를 7 wt%로 121 °C에서 1.2 atm의 압력을 가하며 20분 동안 용해시켰다. 수용액을 균일혼합기를 이용하여 혼합하였다. 균일하게 혼합된 수용액에 CMC를 4 wt%를 넣고 75 °C에서 역시 균일하게 혼합한 후 기포가 없어질 때까지 같은 온도를 유지한다. 이때, 수용액을 공기에 노출되지 않도록 한다. 제조된 PVA/CMC 용액을 각각 페트리 접시(50 mm×12 mm)와 사각 접시(9.5 mm×9.5 mm)에 부어 모양을 만들었다.

접시에 부은 고분자 용액을 동결/융해에 의한 물리적 가교 후, 방사선 조사에 의한 화학가교 하는 방법을 이용하여 수화젤을 제조하였다. 동결/융해에 의한 물리적 가교는 PVA/CMC 용액을 -76 °C에서 급속냉동시킨 후 상온에서 해동하는 과정을 거쳤다. 이 과정을 2회 거친 후 30 kGy(선량률; 10 kGy/h, MDS Nordion, Canada, IR 221 n wet storage type C-188, 한국원자력연구원 정읍 방사선과학연구소)의 감마선(⁶⁰Co)을 조사하였다.¹⁶

수화젤의 물리적 특성.

겔화율: 가교반응에 참여하지 않고 남아있는 고분자를 제거시키기 위하여 30 °C에서 48시간 동안 교반하면서 수세하였다. 수세과정을 거친 수화젤을 꺼내어 겔 표면의 물기를 닦아 60 °C의 오븐에 넣고 48시간 동안 건조시켰다. 겔화율은 식 (1)에¹⁷ 나타낸 바와 같이 건조된 겔의 무게(W_d)를 초기 사용한 고분자 무게(W_i)로 나누어 백분율로 표시하였다.

$$\text{겔화율}(\%) = \frac{W_d}{W_i} \times 100 \quad (1)$$

팽윤도: 겔화율 측정과 마찬가지로 건조된 겔을 상온에서 증류수에 침지시킨 후 시간 경과에 따른 무게변화를 평형에 이를 때까지 측정하였다. 팽윤도는 식 (2)에 나타낸 바와 같이 팽윤된 겔의 무게(W_s)와 건조된 겔의 무게(W_d)차를 건조된 겔의 무게로 나누어 백분율로 나타냈다.

$$\text{팽윤도}(\%) = \frac{W_s - W_d}{W_d} \times 100 \quad (2)$$

압축강도: 제조된 수화젤의 강도를 알아보기 위하여 압축강도를 측정하였다. 수화젤의 강도는 INSTRON 5569(Instron Co., USA)를 이용하여 상온에서 압축강도를 측정하였다. 압축강도 측정을 위한 수화젤의 시편 두께는 $4.5 \text{ mm} \pm 0.5 \text{ mm}$ 이고 지름은 10 mm이었으며 각 조성마다 6개의 시편을 제조하여 측정하였다. 압축강도 측정 시 크로스 헤드(cross head) 속도는 10 mm/min이었으며, 시편이 50% 변형이 이루어질 때의 값을 측정하였다.¹⁸ 감마선 조사 전의 수화젤 강도를 대조군으로 하여, 감마선이 겔의 강도에 미치는 영향을 연구했다.

FT-IR/ATR: 제조된 PVA/CMC 수화젤의 구조변화를 측정하기 위해 FT-IR/ATR(TENSOR 37 Spectrophotometer BRUKER, USA)를 사용하였고, DLa TGS detector를 사용하여 4 cm^{-1} 해상도로 16회 scan하여 $4000-500 \text{ cm}^{-1}$ 파장범위에서 분석하였다.

독성 실험: PVA/CMC 수화젤의 세포독성을 확인하기 위하여 dojindo에서 제시한 기술 지침서를 참고하여 CCK-8(Cell counting kit-8) assay를¹⁹ 이용하여 관찰하였다. 감마선 조사에 의해 제조된 수화젤을 0.1 g/mL의 비율로 세포 배양 배지에 첨가하여 37 °C에서 72시간 용출하여²⁰ 얻은 용출액을 사용하였다. L-929 섬유아 세포를 배양액에 24시간 배양(1×10^3 /well)한 후 용출액을 처리한다. 24시간 후 배양액을 버리고 10 μL 의 CCK-8 용액을 첨가시켜 2시간 동안 배양한 후 분광광도계(450 nm)로 CCK-8의 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 조사하였다.

결과 및 토론

겔화율과 팽윤도. Figure 1, 2는 PVA/CMC의 감마선 조사 전·후의 겔화율과 팽윤도를 나타낸 것이다. 그래프상에서 겔화율은 감마선 조사 전과 후가 비슷한 결과를 보였으나 팽윤도는 낮은 것으로 나타났다.

고분자에 조사된 방사선이 갖는 에너지가 물질에 부여되어 고분자 사슬에 가교 반응을 할 수 있는 라디칼이 형성되기²¹ 때문에 방사선 조사 후의 물질은 겔화가 진행되며, 이러한 원인에 의하여 3차원 망상 구조가 증가하여 물을 함유할 수 있는 체적이 감소하므로,^{22,23} 팽윤도

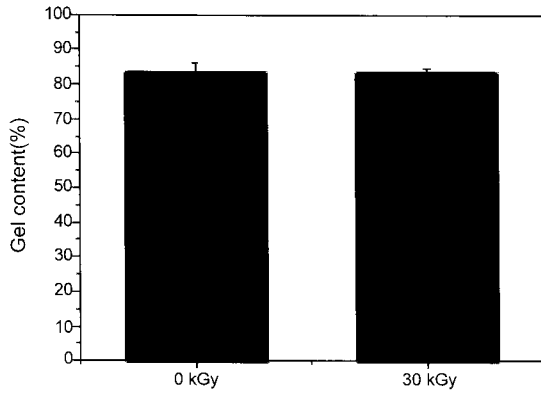


Figure 1. Gel content of PVA/CMC before (0 kGy) and after gamma-ray irradiation (30 kGy).

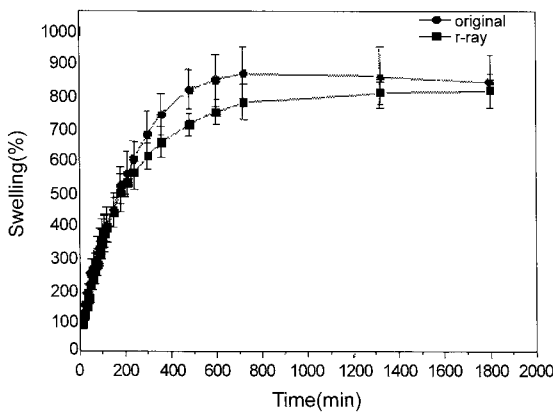


Figure 2. Swelling kinetics of PVA/CMC composites (radiation dose: 30 kGy) in deionized water at room temperature.

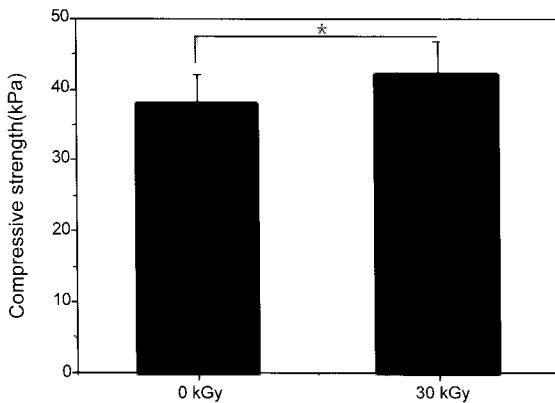


Figure 3. Compressive strength of PVA/CMC before (0 kGy) and after gamma-ray irradiation (30 kGy) (* $p < 0.05$, $n = 6$).

가 낮아진다.

겔강도. Figure 3은 PVA/CMC 수화젤의 감마선 조사 전후의 겔 강도이다. 겔강도는 압축강도를 이용하여 시편의 변형이 50% 이루어질 때까지 측정하였다. 제조된 수화젤의 압축강도는 방사선 조사 전·후 가가 약 37, 42 kPa를 나타내었으며, 방사선 조사 후의 겔강도가 높게 나타났다. 이는 방사선이 조사되어 겔화율이 증가하며 겔 내부에서 강한 망상구조를 형성하게 되기 때문에 겔강도 역시 높은 값을 갖게 된다.²⁴

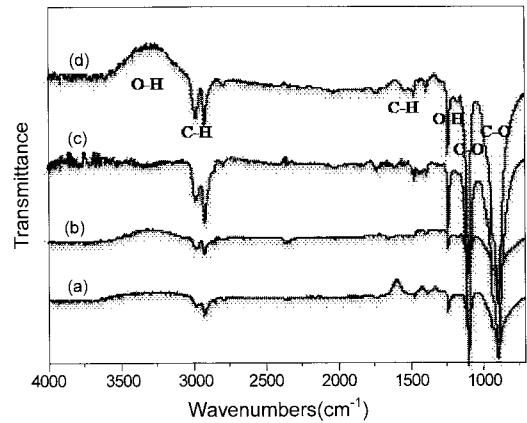


Figure 4. FT-IR/ATR spectra profiles of CMC powders (a); PVA powders (b); PVA/CMC before irradiation (c); irradiated gamma-ray (d).

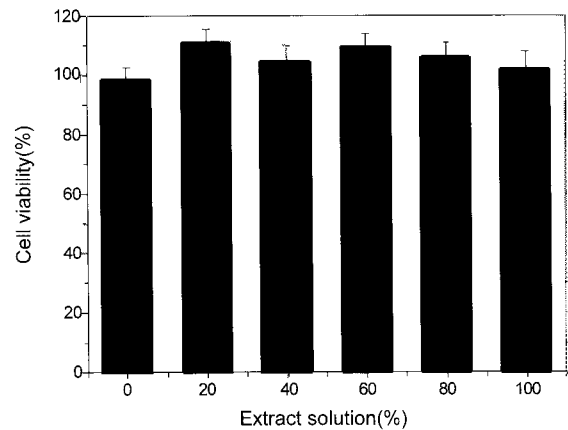


Figure 5. Cytotoxicity result depending on the specimen extract at raw composite and radiation dose; 30 kGy.

FT-IR/ATR. 감마선을 조사한 PVA/CMC 수화젤의 구조변화를 확인하기 위해 FT-IR/ATR spectrophotometer를 이용하여 분석하였다. Figure 4의 그래프에서 889 cm^{-1} 와 1089 cm^{-1} 는 C-O그룹, 1236 cm^{-1} 는 -OH, 1469 cm^{-1} 은 C-H그룹을 나타낸다. 또한, 2926 cm^{-1} 과 2979 cm^{-1} 는 C-H 그룹을 나타낸다. 그래프상에서 PVA/CMC 수화젤의 감마선 조사 전후의 확인한 차이는 $3000\text{--}3600\text{ cm}^{-1}$ 사이의 -OH 밴드의 증가이다. 이는 조사된 감마선의 에너지에 의해 PVA/CMC 수화젤 내의 수소결합이 많아지게 되면서 -OH 밴드가 증가하게 되는 것이다.²⁵

독성 실험. CCK-8 assay를 이용하여 관찰한 PVA/CMC 수화젤의 세포독성평가는 모든 농도에서 80% 이상으로 독성이 없는 것으로 볼 수 있음을 Figure 5에서 확인할 수 있다. 실험 결과 각 농도의 물질 처리에서 세포가 모두 80% 이상의 생존율을 보여 본 실험에 이용된 수화젤은 세포독성이 없는 생체 소재로 체내 삽입이 가능하며, 다양한 생체 재료로의 응용도 예측할 수 있다.

결론

PVA/CMC 혼합 수용액을 이용하여 수화젤을 제조하였다. 실험 결

과 방사선 조사에 의해 PVA/CMC 수화젤의 겔화율에 큰 변화는 없었으나 팽윤도는 조사 후에 낮은 값을 보였다. 수화젤의 강도를 알아보기 위한 압축강도 측정은 방사선 조사 후에 높게 나타났으나 인공 연골로서 이용하기엔 강도 값이 낮아 강도 개선에 대한 연구가 요구된다. FT-IR/ATR을 이용하여 분석한 결과 방사선 조사에 의하여 구조적인 변화는 없는 것으로 보여졌다. 세포독성평가를 통해 나타난 결과 제조된 수화젤의 독성은 없는 것으로 판단 가능하다. 따라서, 동결/융해 과정을 통해 물리적 가교된 PVA/CMC 수화젤은 방사선 조사에 의하여 겔 자체의 구조는 변화하지 않고 방사선 조사에 의하여 형성된 화학적 가교가 진행됨을 예측할 수 있었다.

이와 같이 본 연구에서 수화젤은 방사선 가교방법을 이용하여 가교와 동시에 멸균이 이루어져 생산공정을 단순화시켜 인공 연골재료로서 개발 가능성을 보였다.

감사의 글: 이 논문은 교육과학기술부의 재원으로 시행하는 한국 과학재단의 원자력기술개발사업으로 지원받았습니다.

참 고 문 헌

1. S. W. Kim, S. P. Lee, and J. W. Lee, *artificial cartilage*, KISTI, Seoul, 2004.
2. S. H. Lee, *Ceramist*, **7**, 47 (2004).
3. F. H. Silver and Ch. Doillon, *Biocompatibility. Interactions of Biological and Implantable Materials*, VCH Publ. Inc., New York, 1989.
4. K. R. Park and Y. C. Nho, *Polymer(Korea)*, **25**, 728 (2001).
5. Y. Shin, K. S. Kim, and B. Kim, *Polymer(Korea)*, **32**, 421 (2008).
6. J. M. Rosiak, *J. Control. Reasase*, **31**, 9 (1994).
7. K. Burczak, T. Fujisato, M. Hatada, and Y. Ikada, *Bio-materials*, **15**, 231 (1994).
8. T. Hirai, T. Okinaka, Y. Amemiya, K. Kobayashi, M. Hirai, and S. Hayashi, *Angew. Makromol. Chem.*, **240**, 213 (1996).
9. P. F. Liu, M. L. Zhai, J. Q. Li, J. Peng, and J. L. Wu, *Radiat. Phys. Chem.*, **63**, 525 (2002).
10. R. A. Wach, H. Mitomo, N. Nagasawa, and F. Yoshii, *Radiat. Phys. Chem.*, **68**, 771 (2003).
11. A. Santa-Comba, A. Pereira, R. Lemos, D. Santos, J. Amarante, M. Pinto, P. Tavares, and F. Bahia, *J. Biomed. Mater. Res.*, **55**, 396 (2001).
12. C. Xiao and Y. Gao, *J. Appl. Polym. Sci.*, **107**, 1568 (2007).
13. E. Pines and W. Rins, *Macromolecules*, **6**, 888 (1973).
14. C. M. Hassan, J. H. Ward, and N. A. Peppas, *Polymer*, **41**, 6729 (2000).
15. Y. M. Lim, J. H. Lee, Y. C. Noh, and T. I. Son, *J. Radiat. Ind.*, **1**, 53 (2007).
16. KAERI/RR-2327/2002 (2002).
17. ASTM, ASTM D 2765-01.
18. E. K. Choi, H. I. Kim, K. R. Park, and Y. C. Nho, *J. Korean Ind. Eng. Chem.*, **14**, 505 (2003).
19. C. Zou and Z. Shen, *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, **56**, 58 (2007).
20. ISO/EN 10993-5.
21. R. L. Clough and S. W. Shalaby, *Radiation Effects on Polymers*, Maple Press. Inc., New York, PA, p271 (1990).
22. C. Tranquilan-Aranilla, R. Yoshii, A. M. Dela Rosa, and K. Makuuchi, *Radiat. Phys. Chem.*, **55**, 127 (1999).
23. L. F. Miranda, A. B. LugaAo, L. D. B. Machado, and L. V. Ramanathan, *Radiat. Phys. Chem.*, **55**, 709 (1999).
24. K. R. Park, D. P. Kim, and Y. C. Nho, *J. Korea Ind. Eng. Chem.*, **12**, 718 (2001).
25. Manal F. Abou Taleb, N. L. Abd El-Mohdy, and H. A. Abd El-Rehim, *J. Hazard. Mater.*, in press (2009).