

1,3-Butadiene diepoxide에 의해 가교된 히아루론산 비드의 제조 및 특성

권지영 · 정성일[†]

한남대학교 나노생명화학공학과

(2005년 4월 29일 접수, 2005년 7월 28일 채택)

Synthesis and Characteristics of Hyaluronic Acid Bead Crosslinked by 1,3-Butadiene diepoxide

Ji Young Kwon and Seong Ihl Cheong[†]

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

133 Ojeong-dong, Daeduk-gu, Daejeon 306-791, Korea

(Received April 29, 2005; accepted July 28, 2005)

초록 : 인체 보형물의 생체 재료로 사용할 목적으로 히아루론산 비드를 제조하였다. 히아루론산 수용액과 콩기름을 섞어서 얻어진 현탁상태에서 히아루론산을 1,3-butadiene diepoxide로 가교시켰다. 제조된 비드의 물성을 살펴보기 위해 직경, 표면적과 팽윤도를 측정하였고 전자현미경으로 표면상태를 관찰하였다. 가교제의 농도가 5-12 vol% 범위에서 비드가 형성되었으며 제조된 비드는 단분산성을 보였다. 히아루론산 농도 혹은 가교제 농도가 증가할수록, 가교 온도가 감소할수록, BET 표면적과 팽윤도가 감소하였다. 혼합속도의 변화에 의해 비드의 물성은 거의 변하지 않았으나 비드의 크기는 효과적으로 조절되었다.

Abstract: Hyaluronic acid-based beads were prepared in order to develop a biomedical material for augmentation. Hyaluronic acid was crosslinked by 1,3-butadiene diepoxide in a suspension state maintained by rapid mixing of soybean oil and hyaluronic acid solution. The particle size, surface area and swelling ratio were measured to investigate the physical properties of the synthesized beads and the bead surface was examined by scanning electron microscopy. The beads were formed in the range of 5-12 vol% concentration of crosslinking agent, which showed monodisperse size distribution. Both BET surface area and swelling ratio decreased as the concentration of either hyaluronic acid or crosslinking agent increased, and crosslinking temperature decreased. Bead size could be effectively controlled by mixing speed without affecting other physical property.

Keywords: hyaluronic acid, 1,3-butadiene diepoxide, bead, crosslinking, size control.

1. 서론

최근 교통사고에 의한 외상 및 화상 환자가 증가하고, 고령화와 양질의 삶에 대한 욕구로 보형 및 성형 재료의 수요가 급증하여 생체 의학 분야에서 천연 및 인공 물질을 생체 재료로 사용하려는 연구가 활발히 진행되고 있다. 이러한 목적에 적합한 물질로 고분자를 가교시켜 만든 3차원 망상구조의 수화젤을 들 수 있다. 수화젤은 높은 흡습성과 안정성, 무독성을 가지고 있고 혈액, 체액 및 생체와 접촉하였을 때 우수한 생체 적합성을 보인다. 1960년 폴리히드록시 에틸메타크릴레이트(PHEMA)를 이용한 제품이 처음 선보인 이래¹ 상처 치료용 드레싱, 콘택트렌즈, 약물 전달계, 성형 보형물 등의 생체 재료로 널리 사용되고 있다.²⁴ 수화젤은 pH, 온도, 이온 강도, 용매, 빛 등의 환경 변화에 따라서 팽창, 수축이 가능하고 그 반응 범위도 조절될 수 있다. 수화젤이 약물 전달계 또는 성형 보형물의 용도로 사용되기 위해서는 단백질이나 효소 등과 화학 반응을 일으키지 않고 인체 변화 조건에 순응하도록 비드, 막, 필름 등의 형태로 제조되어야 한다. 비

드 형태의 모습으로 널리 알려진 수화젤은 천연 고분자인 알긴산을 이온 처리하여 얻은 젤 비드로서 효소나⁵⁶ 식물⁷ 및 동물⁸ 세포를 고정하여 약물 전달계나 바이오촉매로 사용된다. 또 키토산을 가교시켜 얻은 비드는 중금속 제거용으로 사용되기도 한다.⁹¹⁰

비드 형태로 제조된 수화젤이 생체 재료로 사용되기 위해서는 합성 고분자보다는 생체 적합성이 우수한 생체 고분자를 사용하는 것이 바람직하다. 히아루론산은 조직 내의 간질에 광범위하게 분포되어 있는 천연 무코다당류로서 인체 내에서 혈액, 체액 및 생체 조직과 접촉하였을 때 우수한 생체 적합성을 갖는다. 그러나 생체와 유사한 환경 하에서 효소작용 혹은 가수분해 반응에 의해서 신속히 분해되는 특징을 가지고 있다.¹¹¹² 히아루론산을 비드 형태로 생체 내에서 장시간 분해되지 않도록 가공하면 인체 내에 손쉽게 주입이 가능하며, 장시간 안정한 상태로 사용할 수 있다. 히아루론산의 생체 적합적 성질을 이용하기 위해서 관능성 작용기를 개조하거나, 가교시켜 면역성 조직공학과 약물전달계, 인체 보형물에 적용되는 생체 재료 물질을 개발하려는 연구가 활발히 진행되고 있다.¹³²¹

일반 화합물이나 고분자를 가공하여 비드 형태의 물질로 제조하는 방법으로 적가법,⁵⁸²² 분무건조법,⁹¹⁰ 현탁중합법 등이²³ 적용된다. 키

[†]To whom correspondence should be addressed. E-mail: suho@hannam.ac.kr

토산, 알긴산 등의 천연고분자를 이온 처리하여 비드를 제조할 때 주로 적가법이 사용되며, 저분자량의 고분자를 표면 처리하여 비드를 제조할 때 분무건조법이 주로 사용된다. 의약품으로 사용하는 히아루론산은 분자량(10^6 g/mol)이 매우 커서 분무건조법을 이용하기 힘들고, 이온처리 기술에 의해 표면을 개질하는 것은 장시간 안정화하는데 부적당하다. 현탁중합법은 수용액상의 미립자로부터 고분자 비드를 제조하는 기술로 비드형태의 고분자를 제조할 때 널리 이용된다.

본 연구에서는 인체 보형물로 사용할 목적으로 천연 식물성 기름과 히아루론산 수용액을 혼합시켜 현탁상태로 유지한 후 가교제로 표면을 가교시켜 생체 내에서 안전하게 사용될 수 있는 생체 적합성 비드를 제조하고자 하였다. 입자 크기 분석기, BET 측정 장치, 전자 현미경 등을 사용하여 제조된 비드 입자의 크기, 표면적, 표면 상태, 팽윤도 등을 측정하였다. 히아루론산 농도, 가교제 농도, 혼합 속도, 가교 온도 등이 비드의 물성에 미치는 영향을 관찰하여 비드 제조에 적합한 운전 조건을 탐색하고자 하였다.

2. 실험

2.1 시약 및 제조

히아루론산은 Fullongchem사 제품으로 평균분자량 2×10^6 g/mol인 의약품 제품을 사용하였다. 히아루론산 제조시 사용된 수산화나트륨은 덕산 화학사의 시약용 제품을 사용하였고 가교제 1,3-butadiene diepoxide와 세척용 에틸알코올은 Aldrich사의 시약용을 정제없이 사용하였다. 현탁상을 만들기 위해 사용된 식물성 기름은 시중의 식용 콩기름을 사용하였다.

1 N 수산화나트륨 수용액 1 mL에 히아루론산을 첨가하여 10 wt% 히아루론산 수용액을 제조한다. 제조된 혼합용액과 식물성 기름 5 mL를 반응기에 넣고 1500 rpm 속도의 자석 젓개로 교반시킨다. 가교제 1,3-butadiene diepoxide 0.4 mL(6.3 vol%)를 넣은 후 반응물을 27 °C로 유지하며 24시간 가교시킨다. 가교가 끝나면 생성된 비드를 분리해낸 후 증류수에 2회, 에틸알코올로 2회, 다시 증류수로 2회 세척하여 잔존하는 미반응물을 제거한 후 건조기에서 건조하였다. 다른 운전 조건에서의 실험은 관찰하고자 하는 운전 조건만을 달리 하고 나머지는 위에서 언급한 표준 조건을 동일하게 적용하였다.

2.2 물성 분석

2.2.1 팽윤도

건조기에 넣어 수분이 완전히 제거된 비드의 무게를 측정한다. 비드를 과량의 물 속에 24시간 침적시킨 후 팽윤된 비드의 무게를 측정한다. 시료에 대한 팽윤도는 다음 식에 의해 결정된다.

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

(W_s = 젖은 비드의 무게, W_d = 건조된 비드의 무게)

2.2.2 기기 분석

BET 측정 장치(모델명 : ASAP 2100)를 이용하여 건조된 비드 입자의 표면적을 측정하였고 전자 현미경(모델명 : Hitachi 3-3000 N)을 사용하여 입자의 표면을 분석하였다. 전자 현미경 사진은 여러 개의 샘플을 취하여 관찰한 후 가장 대표적인 형상을 가진 것을 보았다. 레이저 입자 크기 분석기(모델명 : Beckman Coulter LS series 13-

320)를 사용하여 24시간 증류수에 침적시킨 팽윤된 상태의 비드의 크기를 측정하였다. 비드의 입자 크기를 측정할 때 채취한 샘플이 각 집단을 대표할 수 있도록 수백 개 정도의 비드를 취하였다.

3. 결과 및 토론

Figure 1에서 입자 분석기로 혼합속도에 따라 입자 크기를 측정된 결과를 보였다. 혼합속도에 관계없이 입자의 크기는 단순분산성의 모습을 보였으며 다른 조건에서 얻어진 분포도도 동일한 모습을 보였다. 여러 운전 조건에서 얻은 비드의 분포 정도는 다음의 CV 값으로 평가하였다.

$$\text{Coefficient of variation(CV)} = 100 \frac{\text{Standard deviation}}{\text{Mean}}$$

CV 값은 입자가 평균값으로부터 얼마나 퍼져서 분포하여 있는가를 나타내는 척도로 10% 미만이면 단순분산성의²⁴ 입자로 간주되며 작을수록 더욱 산포가 적고 자료의 신뢰도가 높음을²⁵ 의미한다. Figure 2에서 히아루론산 농도, 1,3-butadiene diepoxide 농도, 혼합 속도 및 온도를 변화시키면서 실험하여 얻어진 입자의 크기와 CV 값의 관계를 보였다. 입자의 크기가 작을수록 CV 값이 커져 입자가 평균값으로부터 넓게 퍼지는 경향을 보였으나 전체적으로 그 값이 3% 미만으로 산포가 적은 균일한 크기의 단순분산성 입자가 제조되었음을

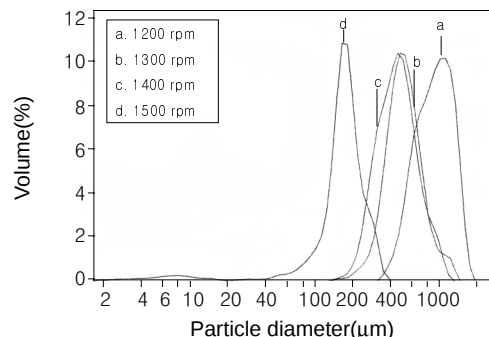


Figure 1. Particle size distribution chart measured by laser particle size analyzer at different mixing speed(1200, 1300, 1400, 1500 rpm).

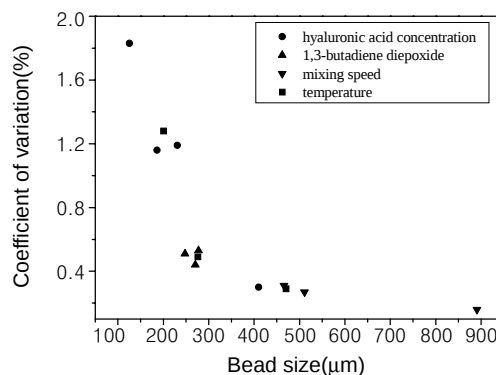


Figure 2. Relationship between the bead size and coefficient of variation value.

알 수 있었다.

Figure 3에서 히아루론산 농도에 따른 비드의 물성 변화를 관찰한 결과 히아루론산 농도가 증가할수록 비드의 직경이 증가하였고 팽윤도와 표면적은 감소하였다. 본 실험에서 히아루론산 농도가 커질수록 반응액의 점도가 커져 혼합이 원활치 않은 모습을 보였는데 일반적으로 현탁중합에서 혼합이 원활하지 않을수록 비드의 직경이 커지는 현상을 보인다.²⁶ 여기서 히아루론산 농도가 증가할수록 비드의 직경이 커지는 것도 동일한 원인에 기인한 것으로 사료된다. 한편 Figure 4의 전자 현미경 사진에서는 히아루론산 농도에 따라 입

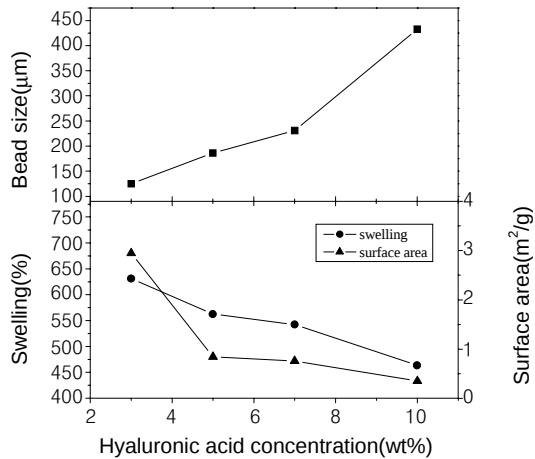
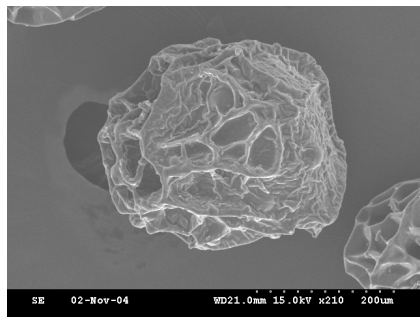


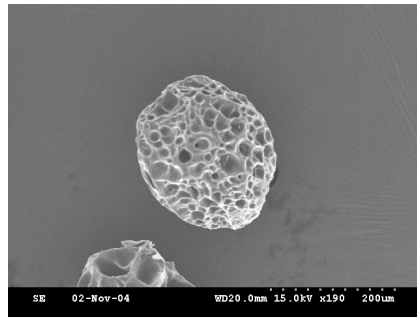
Figure 3. The effect of hyaluronic acid concentration on the bead properties.

자의 표면에 그물 모양이 형성되어 가교된 정도를 보여주고 있다. Figure 4(d)는 실험 부분에서 언급한 반응 조건에서 제조된 입자의 모습이다. 이 사진을 보면 입자의 표면에 거의 기공이 나타나지 않을 정도로 충분히 가교된 모습을 보이고 있다. 이 실험 조건을 기준 조건으로 하여 입자의 운전 변수가 입자의 물성에 미치는 영향을 관찰하였고, Figure 4(d) 입자를 기준으로 SEM 사진도 비교 관찰하였다. Figure 4에서 히아루론산 농도가 커질수록 기공이 점점 작아지고 그물 모양이 더욱 조밀해 졌으며 히아루론산 농도가 10 wt% 정도가 되면 표면이 거의 가교되어 기공이 거의 없는 매끄러운 상태로 되었다. 이러한 모습은 Figure 3에서 히아루론산 농도가 커질수록 가교가 진행되어 팽윤도가 감소하고, 입자의 표면적이 줄어드는 현상을 잘 설명해 주고 있다. 이를 응용하면 히아루론산 농도를 조절함으로써 입자의 표면을 매끄럽고 기공이 없는 입자로부터 기공이 많은 다공성의 입자에 이르기까지 원하는 형태의 입자를 만들 수 있을 것이다.

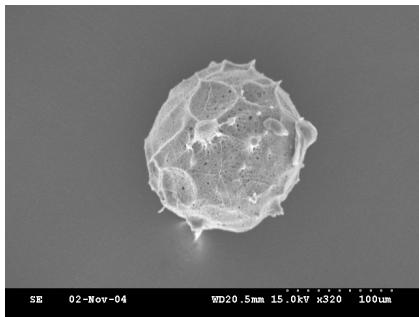
Figure 5에서 가교제의 농도를 증가시키면서 비드의 물성을 살펴 보았다. 가교제의 농도가 3 vol% 이하에서는 비드가 생성되지 않았고 17 vol% 이상이 되면 가교가 급격히 진행되어 반응물이 커다란 덩어리 형태로 뭉쳐서 전체가 겔화하는 모습을 보였다. 이로써 가교제 농도를 적절히 유지해야 비드가 생성됨을 알 수 있었고 본 실험은 비드가 잘 생성되는 6-11 vol% 농도 범위에서 진행되었다. 주어진 범위에서 가교제의 농도가 증가함에 따라 팽윤도는 서서히 감소하였으나 비드의 크기는 거의 변화가 없었다. 또 표면적은 감소하다 9 vol% 이상이 되면 거의 변화가 없었다. Figure 6의 전자 현미경 사진에서 입자 표면을 살펴보면 가교제 농도가 7.7 vol% 이상이 되면 표면이 가교가 충분히 진행되어 매끄러운 상태로 그물 모양이 거의 없음을 보여주고 있다. 즉 가교제 농도가 7.7 vol% 이상이 되



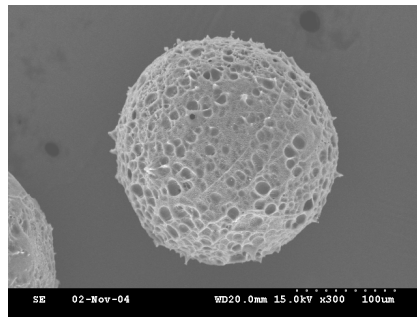
(a) 3 wt%



(b) 5 wt%



(c) 7 wt%



(d) 10 wt%

Figure 4. Scanning electron microscopy (SEM) photographs of the bead prepared at different hyaluronic acid Concentration. Concentration (3, 5, 7, 10 wt%).

면 가교 반응이 활발히 일어날 수 있는 그물 모양의 구조가 더 이상 보이지 않으므로 가교 반응이 더 이상 활발히 진행되지 않으리라 예상할 수 있다. Figure 5에서 농도가 7.7 vol% 이상이 되면 표면적이 거의 변화하지 않고, 팽윤도가 서서히 감소하였는데 이는 Figure 6에서 가교제 농도 증가에 따른 표면적 변화와 일치하는 결과이다. 즉 가교제의 농도가 7.7 vol% 이상이 되면 표면이 가교 반응으로 기공이 사라진 매끄러운 상태로 되어 가교 반응이 더 이상 활발히 진행되지 않는 것으로 보여진다. 또 주어진 범위에서 가교제의 농도는 비드의 크기에 거의 영향을 주지 않았다.

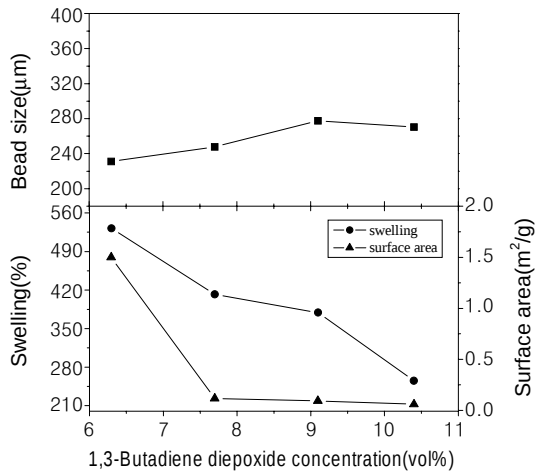


Figure 5. The effect of crosslinking agent concentration on the bead properties.

Figure 7에서 반응기내의 자석 젓게 혼합 속도를 증가시키면서 비드의 물성을 살펴보고 이 때의 전자 현미경 사진을 Figure 8에 보였다. 전자 현미경 사진으로부터 입자의 표면을 살펴보면 조밀한 그물 모양으로 혼합속도에 관계없이 동일한 형태를 띄고 있었다. 이러한 모습은 Figure 7에서 팽윤도와 표면적이 혼합속도에 거의 상관없이 일정한 값을 나타내는 결과를 잘 설명하여 주고 있다. 또 혼합속도가 증가할수록 비드의 직경이 줄어들었는데 이는 전형적인 현탁(비드)중합 반응에서 나타나는 현상으로 현탁 상에서 반응시키는 본 실험에서도 동일한 결과를 보였다.

Figure 9에서 가교 온도에 따라 비드의 물성 변화를 살펴본 결과 가

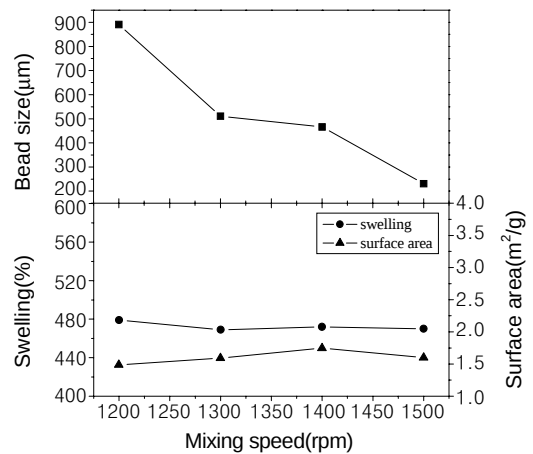
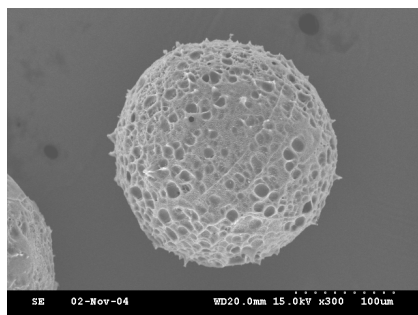


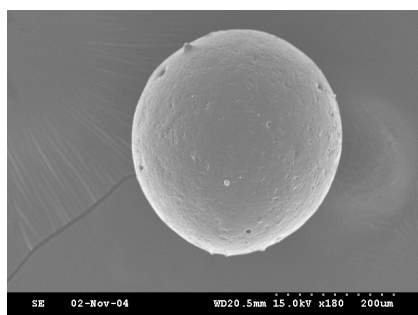
Figure 7. The effect of mixing speed on the bead properties.



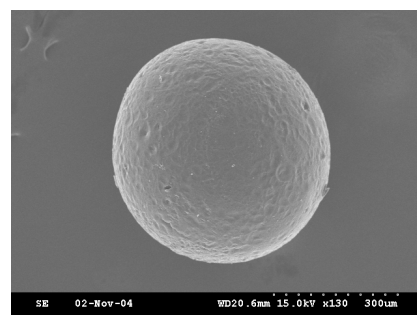
(a) 6.3 wt%



(b) 7.7 wt%



(c) 9.1 wt%



(d) 10.4 wt%

Figure 6. Scanning electron microscopy (SEM) photographs of the bead prepared at different crosslinking agent Concentration. Concentration (6.3, 7.7, 9.1, 10.4 vol%).

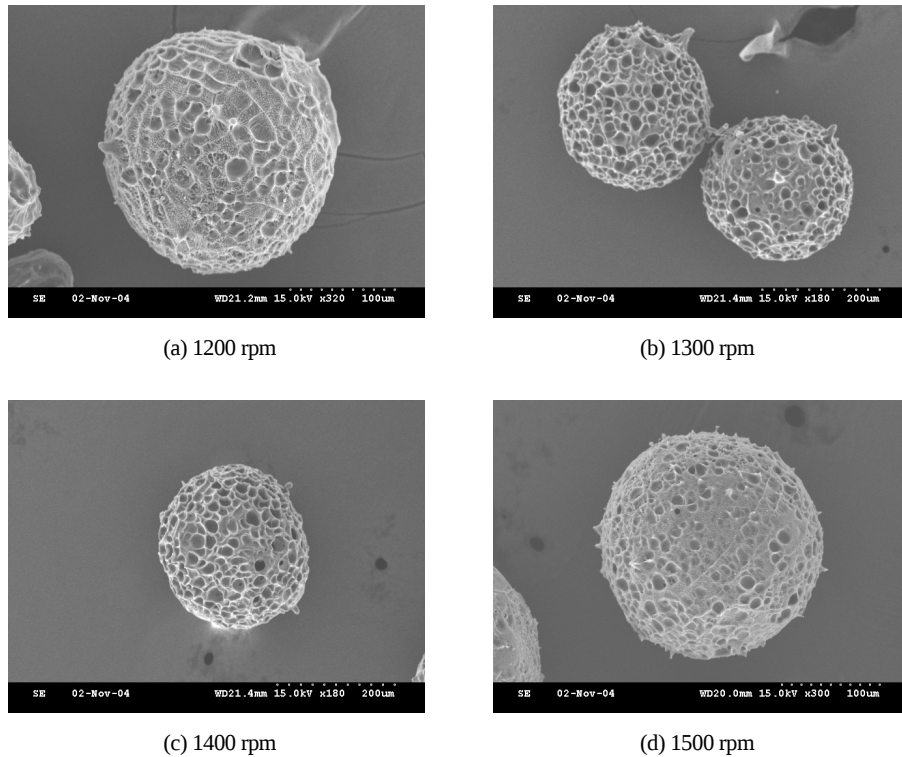


Figure 8. Scanning electron microscopy (SEM) photographs of the bead prepared at different Mixing speed. Mixing speed (1200, 1300, 1400, 1500 rpm).

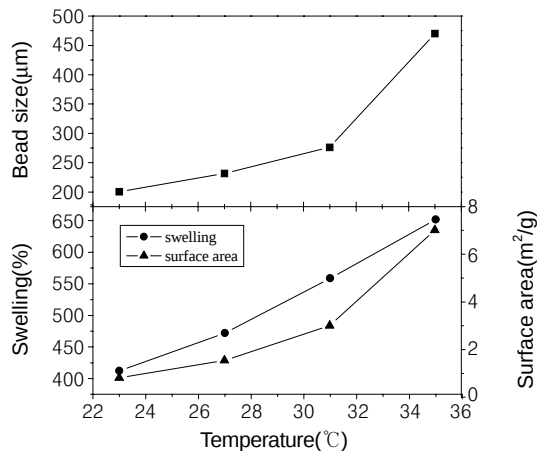


Figure 9. The effect of crosslinking temperature on the bead properties.

교 온도가 감소할수록 비드의 직경, 표면적과 팽윤도가 감소하였다. Figure 10에서 이 때의 전자 현미경 사진을 관찰한 결과 가교 온도가 감소할수록 기공의 밀도와 크기가 줄어들고 공극끼리의 연결된 그물 형태가 더욱 조밀한 경향을 보였다. 즉 온도가 감소하면 가교가 잘 되어 그물 형태가 더욱 조밀하게 되어 27 °C에서는 기공이 거의 사라지고 매끈한 표면 형태의 비드가 생성되었다. 이러한 현상은 Figure 9에서 온도가 감소할수록 가교가 진행되어 팽윤도가 감소하고 비드의 표면적이 감소하는 모습과 일치하는 것이다. 일반적으로 고분자 가교 반응은 온도가 증가할수록 반응 속도가 증가하는 경향을 보이는데 여기서는 그와 반대되는 모습을 띄고 있어 이에 대

한 연구는 계속 진행할 예정이다.

여러 운전 조건에 따른 비드의 물성 조사를 관찰한 결과 비드의 표면적과 팽윤도는 직접적인 상관 관계가 있는 것으로 나타나 Figures 3, 5, 7, 9에서 동일한 그래프 상에 표시하였다. 기공이 완전히 없어진 후에는 표면적의 변화가 거의 없고 팽윤도는 서서히 감소하는 경향을 보였지만 표면에 기공이 존재할 경우에는 표면적이 감소하면 팽윤도도 함께 감소하는 경향을 보여 표면적과 가교도는 선형적인 관계를 갖는 것으로 나타났다. 또 다른 물성에 영향을 주지 않고 비드의 크기를 조절하는 것은 혼합 속도를 이용하는 것이 가장 좋은 방법임을 알 수 있었다.

4. 결론

1,3-Butadiene diepoxide 가교제를 사용하여 히아루론산 비드를 제조하였다. 제조된 비드는 단순분산성을 가졌으며 비드의 크기가 작을수록 분산이 커지는 경향을 보였다. 히아루론산 농도가 증가할수록 비드의 직경이 증가하였고 팽윤도와 표면적은 감소하였다. 가교제의 농도가 증가함에 따라 표면적과 팽윤도는 약간 감소하였으나 비드의 직경은 거의 일정하였다. 그러나 가교제의 농도가 너무 높으면 겔화 현상이 발생하고, 너무 낮으면 비드가 제조되지 않아 적절한 가교제의 농도가 비드 생성에 중요한 인자임을 알 수 있었다. 혼합 속도가 증가하면 비드의 직경은 감소하였으나 표면적, 표면 상태와 가교도는 거의 변화가 없었다. 또 가교 온도가 증가할수록 비드의 직경, 표면적과 팽윤도는 증가하였다. 비드의 표면에 기공이 존재하는 경우 표면적과 팽윤도는 선형 관계가 있고, 비드의 크기는 혼합 속도에 의해 조절하는 것이 바람직함을 알 수 있었다.

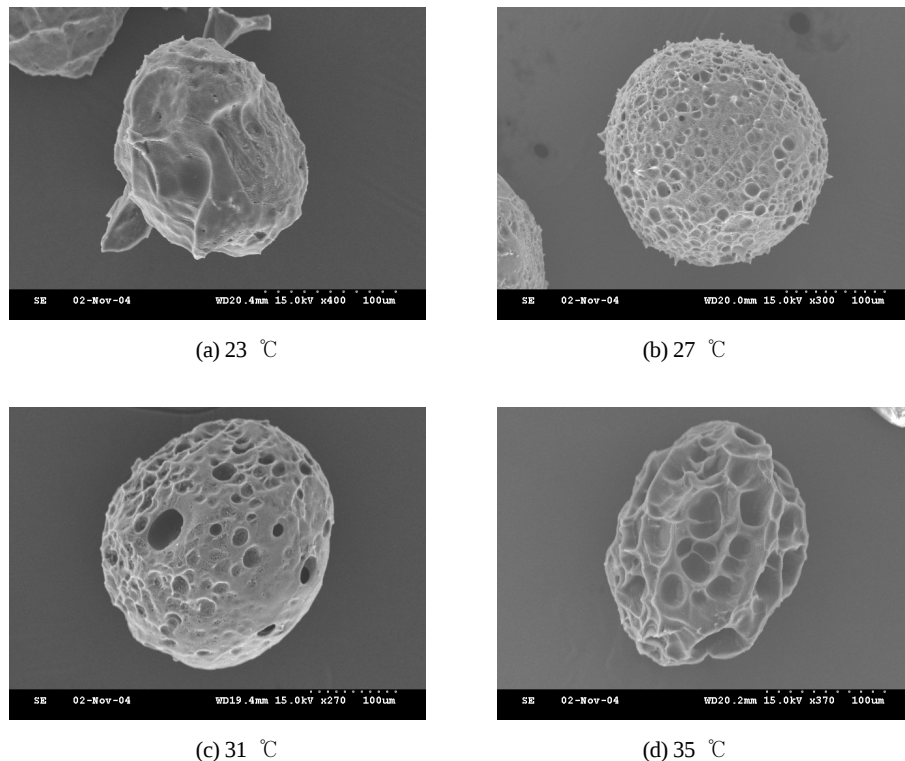


Figure 10. Scanning electron microscopy (SEM) photographs of the bead prepared at different crosslinking temperature. Temperature (23, 27, 31, 35 °C).

감사의 글 : 본 연구는 2005년 산업자원부의 지역전략산업 석박사 연구인력 양성사업의 연구결과로 수행되었음.

참고문헌

- O. Wichterle and D. Lim, *Nature*, **185**, 117 (1960).
- N. A. Peppas, *Hydrogels in Medicine and Pharmacy*, Boca Raton, Vol. I, II, III, CRC Press Inc., Florida, 1986.
- G. Khang, M. S. Kim, S. H. Cho, H. B. Lee, J. H. Chang, and K. J. Kim, *Polym. Sci. and Tech.*, **14**, 431 (2003).
- F. Lim and A. M. Sun, *Science*, **210**, 908 (1980).
- G. Palmierie, P. Giardina, and B. Desiderio, *Enzyme Microbiol. Biotechnol.*, **16**, 151 (1994).
- E. Akertek and L. Tarhan, *Appl. Biochem. Technol.*, **50**, 291 (1995).
- S. Declerck, D. Strullu, and C. Plenchette, *J. Biotechnol.*, **48**, 51 (1996).
- H. Clayton, R. James, and N. London, *Acta. Diabetol.*, **30**, 181 (1993).
- W. S. W. Ngah, C. S. Endud, and R. Mayanar, *Reactive & Functional Polymers*, **50**, 181 (2002).
- M. Chiou and H. Li, *J. Hazardous Materials*, **B93**, 233 (2002).
- Y. Tokita and A. Pkamoto, *Eur. Polym. J.*, **32**, 1011 (1996).
- S. P. Zhong, D. Campoccia, P. J. Doherty, R. L. Benedetti, and D. F. Williams, *Biomaterials*, **15**, 359 (1994).
- G. D. Prestwich, D. M. Marecek, and J. F. Marecek, *J. Control. Release*, **53**, 93 (1998).
- Y. Luo, K. R. Kirker, and G. D. Prestwich, *J. Control. Release*, **69**, 169 (2000).
- S. Park, J. Park, H. O. Kim, M. J. Song, and H. Suh, *Biomaterials*, **22**, 1205 (2002).
- S. Park, H. J. Lee, K. H. Lee, and H. Suh, *Biomaterials*, **24**, 1631 (2003).
- H. S. Nam, J. H. Kim, J. H. An, and D. J. Chung, *Polymer(Korea)*, **25**, 476 (2001).
- P. A. Delco, M. Stefanetti, D. Pressato, S. Piana, M. Dona, and A. Pavesio, *Fertil. Steril.*, **69**, 318 (1998).
- J. A. Hunt, H. N. Joshi, V. J. Stella, and E. M. Topp, *J. Control. Release*, **12**, 159 (1990).
- L. Benedetti, R. Cortivo, T. Berti, A. Berti, F. Pea, M. Marzzo, M. Moras, and G. Abatangelo, *Biomaterials*, **14**, 1154 (1993).
- J. Aigner, J. Tegeler, P. Hutzler, D. Campoccia, A. Pavesio, and C. Hammer, *J. Biomed. Mater. Res.*, **42**, 172 (1998).
- C. Ouwerx, N. Velings, M. M. Mestdagh, and M. A. V. Axelos, *Polymer Gels and Networks*, **6**, 393 (1998).
- L. Zhang, G. Cheng, and C. Fu, *Reactive & Functional Polymers*, **56**, 167 (2003).
- T. Murakata, H. Honma, S. Nakazato, and Kuroda, *J. Chem Eng. Japan*, **34**, 299 (2001).
- K. A. Gomez and A. A. Gomez, *Statistical Procedures for Agricultural Research*, 2nd ed., John Wiley and Sons, New York, 1984.
- F. Rodriguez, *Principles of Polymer Systems*, 3rd ed., Hemisphere Publishing Co., New York, 1989.