

마이크로파에 의해 합성된 β -TCP/PLGA 복합체의 의사체액에서의 분해 거동

진형호 · 민상호 · 현용택* · 박홍채 · 윤석영[†]

부산대학교 재료공학부

*한국기계연구원 미래기술연구부

In vitro Degradation of β -TCP/PLGA Composites Prepared with Microwave Energy in Simulated Body Fluid

Hyeong-Ho Jin, Sang-Ho Min, Yong-Taek Hyun*, Hong-Chae Park and Seog-Young Yoon[†]

School of Materials Science and Engineering, Pusan National University, Busan 609-735, Korea

*Department of Future Technology, Korea Institute of Machinery and Materials, Changwon 641-010, Korea

(2006년 9월 28일 받음, 2006년 11월 1일 최종수정본 받음)

Abstract The biodegradable β -tricalcium phosphate (β -TCP)/poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) composites were synthesized by in situ polymerization with microwave energy. The degradation behavior of β -TCP/PLGA composite was investigated by soaking in simulated body fluid (SBF) for 4 weeks. The molecular weight of the β -TCP/PLGA composites decreased with soaking time until week 2, whereas the loss rate of molecular weight reduced after week 2. The incubation time was needed for the degradation of the β -TCP, indicating that the β -TCP should be detached from the PLGA matrix and then degraded into SBF solution. The studies of mass loss of the composites with the soaking time revealed that the degradation behavior of PLGA would be processed with the transformation from the polymer to the oligomer followed by the degradation. Morphological changes, whisker-like, due to transformation and degradation of polymer in the composites were observed after week 2. On the basis of the results, it found that the degradation behavior of β -TCP/PLGA composites was influenced by the β -TCP content in the composites and the degradation rate of the composites could be controlled by the initial molecular weight of PLGA in the composites.

Key words β -TCP, PLGA, composite, biodegradable, Microwave.

1. 서 론

고분자 재료는 그 개발과 동시에 의료분야의 응용에 대한 연구가 이루어져 왔으며, 현재는 의료기기 및 생체 재료에 널리 응용되고 있다. 특히 생체이식용 재료로서 고분자 재료로는 poly(lactide) (PLA), poly(glycolide) (PGA), poly(propylene fumarate) (PPF), poly(ethylene oxide) (PEO), poly(ϵ -caprolactone) (PCL) 및 이들의 공중합체 등의 생분해성 고분자가 있으며,¹⁾ 생분해성 고분자는 기존의 금속재료에 비해 그 특성이 우수하고 골집합재 제거를 위한 이차수술이 필요 없는 장점이 있어 fixation device, 골지지체로서의 응용 뿐 아니라^{2,3)} 생분해성을 이용해 약물담체로의 응용에 관해서도 활발한 연구가 진행되고 있다.^{4,5)} 이러한 생분해성 고분자는 우수한 분해성에도 불구하고 약한 기계적 특성 때문에 체내

에 고하중이 발생하는 부분에는 사용되지 못하고 있는 실정이며, 생체적합성에 있어서도 고분자의 분해로 인해 염증이 유발될 수 있다는 연구가 보고되고 있다.^{6,7)} 이러한 문제점의 해결방법으로, 생분해성 고분자에 생체친화성이 매우 큰 골집합성 세라믹인 hydroxyapatite (HAp) 및 tricalcium phosphate (TCP) 등을 복합화 하는 방법이 제시되고 있는데, 생체친화성이나 뼈의 집합에도 긍정적인 영향을 미칠 것으로 기대된다.^{8,9)}

생체내의 환경은 중성의 pH, 낮은 이온농도, 36.5°C라는 상태가 유지되고 있지만 이물질이 삽입되면 다양한 거부반응이 일어나기도 한다. 또한 생체의 운동은 조직에 따라 다양하며, 생체재료는 이런 연속적인 물리적 부하에 견딜 수 있어야 한다. 따라서 본 연구에서는 비교적 낮은 온도와 짧은 반응시간으로 합성이 가능한 마이크로파를 이용하여 in-situ polymerization으로 생분해성 β -TCP/poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) 복합체를 제조하였고, 제조된 복합체를 simulated body fluid (SBF) 용액에

[†]E-Mail : syy3@pusan.ac.kr

침적시켜 침적기간에 따른 복합체의 분자량, 중량, 미세 구조 변화 및 기계적 특성, SBF 용액의 칼슘이온 농도, pH 변화를 분석하였다.

2. 실험 방법

β -TCP/PLGA 복합체 제조를 위한 β -TCP는 calcium nitrate ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, Shinyo Pure Chemicals Co., Ltd., 98.5%)와 ammonium phosphate, dibasic ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, Junsei Chemical Co., Ltd., 99.0%)을 출발물질로 하여 합성하였다. 0.3 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 와 0.2 M $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 를 각각 이차이온 증류수에 녹인 후 두 용액을 혼합하여 침전물을 생성시키고 암모니아수(NH_4OH , Junsei Chemical Co., Ltd., 28%)를 첨가하여 pH 10이 되도록 하여 상온에서 5시간 동안 aging 하였다. 용액으로부터 침전물을 분리하고 100°C에서 24시간 동안 건조한 후 800°C에서 2시간 동안 하소하였다. L-lactide (PURAC, Holland)와 glycolide (PURAC, Holland)는 ethyl acetate ($\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$, Junsei Chemical Co., Ltd., 99.5%)로 재결정시켜 사용하였다. L-lactide와 glycolide를 75:25의 비율로 혼합하고 140°C로 가열하여 완전히 녹인 후 β -TCP를 10, 20, 30 wt%로 변화시켜 첨가하여 분산시키고 개시제로 stannous octoate (Sigma-Aldrich, Inc., USA, 95%)를 사용하여 microwave (2.45 GHz, 3 kW, Hankuk Microwave Co., Korea)에서 100 W 출력으로 2시간 동안 중합하였다. In vitro 실험을 위하여 증류수에 NaCl, NaHCO_3 , KCl, $\text{K}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 , Na_2SO_4 를 첨가하고 1 M-HCl, tri(hydroxymethyl)aminomethane ($(\text{CH}_2\text{OH})_3\text{CNH}_2$)으로 36.5°C, pH 7.4로 조절하여 SBF 용액을 제조하였다.¹³⁾ 제조된 SBF 용액의 이온농도는 Table 1에 나타내었다. β -TCP/PLGA 복합체를 SBF 용액에 침적하여 36.5°C의 shaking incubator에서 배양시키고 1주, 2주, 3주, 4주 후에 꺼내어 상온의 진공건조기에서 48시간동안 건조하였다. β -TCP/PLGA 복

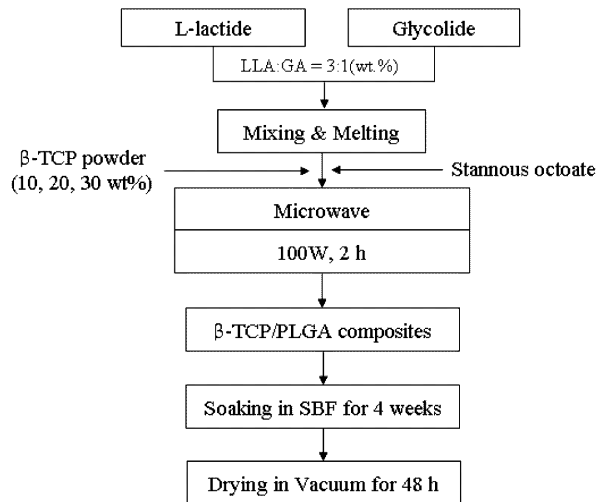


Fig. 1. Flowchart of experimental procedure.

합체 제조 및 in vitro 실험의 전체적인 공정도를 Fig. 1에 나타내었다.

β -TCP/PLGA 복합체를 SBF 용액에 침적시킨 후 매주 미세구조, 분자량, 칼슘이온농도, 중량변화를 측정하였다. β -TCP/PLGA 복합체의 분자량 변화는 gel morphology chromatography (GPC, Styragel HT, Waters, USA)를 사용하여 tetrahydrofuran (THF)에 녹여 상온에서 유속 1.0 ml/min으로 분석하였고, in vitro 실험 전후 SBF 용액의 칼슘이온 농도의 변화는 ICP-AES (ICP-IRIS, Thermo Jarrell Ash, USA)로 측정하였다. β -TCP/PLGA 복합체의 3점 굽힘강도는 만능시험기(UTM, DW-TSM-20, Korea)로 측정하였으며, 미세구조 변화는 주사전자현미경 (SEM, HITACHI S-4200, Japan)으로 관찰하였다.

3. 결과 및 고찰

Fig. 2는 합성된 β -TCP 분말, 합성된 PLGA와 β -TCP/PLGA 복합체의 XRD 패턴 및 SEM 관찰결과이다. Fig. 2(a)에서 합성된 분말은 단일상의 β -TCP 결정상을 이루고 있음을 알 수 있다. 합성된 β -TCP 분말은 잘 분산되어 있었으며 다소 불규칙한 형상이었다. 합성된 PLGA는 Fig. 2(b)에서와 같이 주상은 비정질이었으며, 20° 미만의 지각에서 약한 결정상이 나타났다. Fig 2(c)는 PLGA에 30 wt% β -TCP를 첨가하여 합성한 복합체의 결정성 및 미세구조를 나타내고 있다. XRD 패턴에서 볼 수 있듯이 PLGA와 β -TCP 결정상이 공존하고 있으며, 비정질상의 PLGA matrix에 β -TCP 분말이 비교적 잘 분산되어 있음을 알 수 있다. β -TCP/PLGA 복합체 합성 및 특성은 본 연구실의 이전 논문에서 발표한 바 있다.¹⁴⁾

SBF 용액에서의 침적기간에 따른 PLGA 및 β -TCP/PLGA 복합체의 분자량의 변화를 Fig. 3에 나타내었다.

Table 1. Ion concentrations of human blood plasma and SBF

Ion	Ion Concentrations (mM)	
	Human blood plasma	SBF
Na ⁺	142.0	142.0
K ⁺	5.0	5.0
Mg ²⁺	1.5	1.5
Ca ²⁺	2.5	2.5
Cl ⁻	103.0	147.8
HCO ₃ ⁻	27.0	4.2
HPO ₄ ²⁻	1.0	1.0
SO ₄ ²⁻	0.5	0.5
pH	7.2 ~ 7.4	7.40

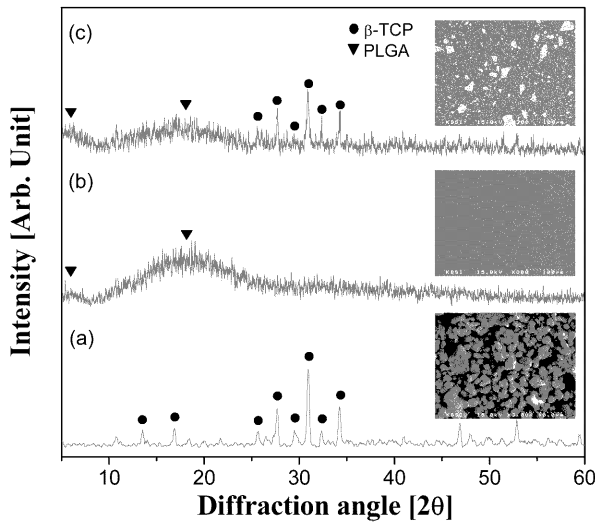


Fig. 2. XRD patterns and SEM morphologies of (a) β -TCP, (b) PLGA, and (c) β -TCP/PLGA composites (30:70 wt%).

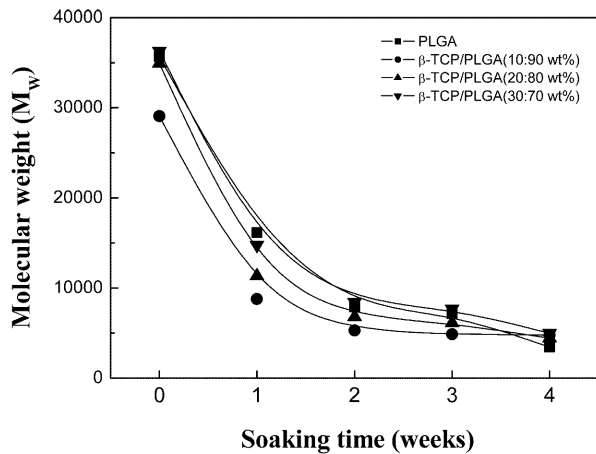


Fig. 3. Molecular weight of PLGA and β -TCP/PLGA composites after soaking test in SBF solution.

일반적으로 PLGA의 분해는 두 단계로 진행된다. 분해 초기과정에서는 고분자량의 polyester 분자고리가 저분자량의 oligomer로 가수분해 되며, 이 과정은 산 또는 염기에 의해 촉진될 수 있으며, 온도, 수분량에 의해서도 영향을 받는다. 수평균 분자량이 더욱 감소하면 embrittlement가 발생하며 일반 환경에 존재하는 미생물들에 의해 분해가 더욱 촉진되고, 수분, 이산화탄소 등으로 분해된다.^{15,16)} Fig. 3에서 볼 수 있듯이, PLGA, β -TCP/PLGA 복합체 모두 침적 후 최초의 분자량에 비례하여 감소하는 경향을 보이나, 2주까지는 수평균 분자량이 급격히 감소하며 2주 후부터는 수평균 분자량 10,000 이하에서 서서히 감소한다. 이는 침적 후 PLGA가 lactide 및 glycolide로 가수분해 되고 있음을 의미하며, 복합체의 고분자 matrix

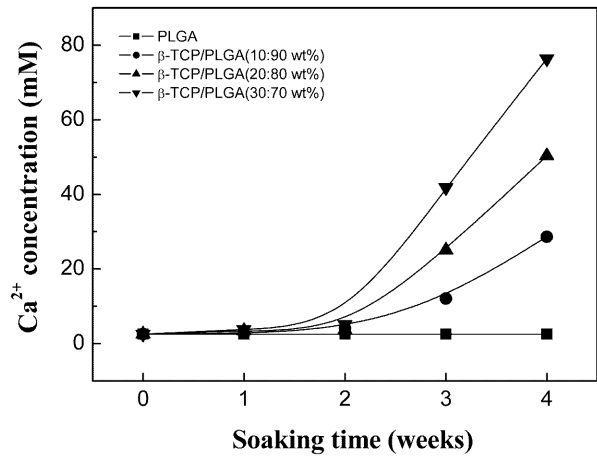


Fig. 4. Changes in Ca^{2+} concentration of SBF solution for PLGA and β -TCP/PLGA composites.

의 분자량을 조절하여 분해거동을 제어할 수 있을 것으로 생각된다.

Fig. 4는 PLGA 및 β -TCP/PLGA 복합체의 SBF 침적 후 침적기간에 따른 SBF 용액의 Ca^{2+} 농도 측정 결과이다. 침적 후 2주까지는 Ca^{2+} 농도변화는 거의 나타나지 않았다. 이는 침적 후 2주까지는 β -TCP의 분해가 일어나지 않음을 의미한다. 그러나 2주 후부터는 침적시간이 늘어남에 따라 β -TCP/PLGA 복합체의 β -TCP 함량에 비례하여 선형적으로 증가함을 볼 수 있는데, β -TCP 분해는 incubation time이 필요한 것으로 보여지며, 또한 β -TCP를 싸고 있는 PLGA matrix의 분해 후 β -TCP가 떨어져 나가면서 β -TCP의 분해가 더욱 가속화 된 것으로 판단된다.

SBF 용액에서의 침적기간에 따른 PLGA 및 β -TCP/PLGA 복합체의 중량 변화를 Fig. 5에 나타내었다. PLGA

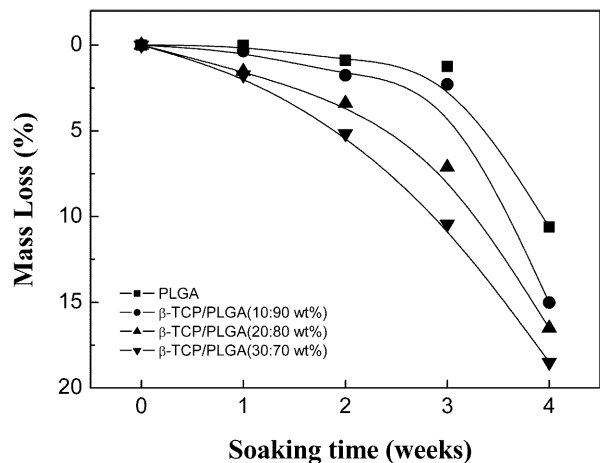


Fig. 5. Mass loss of PLGA and β -TCP/PLGA composites after soaking test in SBF solution.

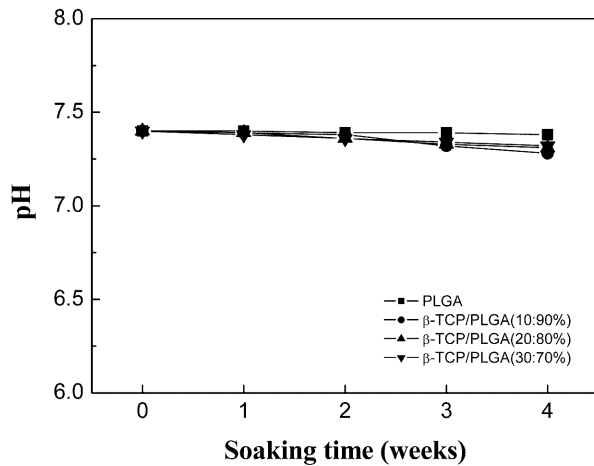


Fig. 6. Changes in pH of SBF solution for PLGA and β -TCP/PLGA composites.

및 β -TCP/PLGA 복합체 모두 침적시간이 늘어남에 따라 중량은 감소하나 상대적으로 β -TCP의 함량이 적은 PLGA와 β -TCP의 함량이 10%인 β -TCP/PLGA 복합체의 경우 침적 후 3주까지는 서서히 감소다가 3주 후부터 급격히 감소한다. 이는 Fig. 3의 GPC 결과에서도 볼 수 있듯이 matrix인 PLGA가 oligomer로의 분해 후 3주부터 분해되어 없어짐을 의미한다. 그러나 상대적으로 β -TCP의 함량이 높은 β -TCP 함량이 20%, 30%인 β -TCP/PLGA 복합체의 경우에는 β -TCP의 함량이 낮은 경우보다 중량감소가 크고 침적 후부터 중량이 감소함을 볼 수 있는데, 이는 matrix인 PLGA가 분해되면서 상대적으로 밀도가 높은 β -TCP가 matrix로부터 떨어져 나가고, 또한 β -TCP의 분해가 시작되었기 때문으로 여겨진다.

Fig. 6은 PLGA 및 β -TCP/PLGA 복합체의 SBF 침적 후 침적기간에 따른 SBF 용액의 pH 측정 결과이다. PLGA는 일차적으로 lactide와 glicolide로 분해되고 다시 lactic acid와 glycolic acid로 분해되는데, 이 과정에서 pH를 떨어뜨려 생체의식 시 염증을 유발시킬 수 있다. Fig. 6에서 볼 수 있듯이 PLGA와 β -TCP/PLGA 복합체 모두 4주까지 거의 pH 변화가 없으나 pH가 Fig. 3의 GPC 결과와 비례하여 소폭 감소함을 볼 수 있는데, 이 결과로 PLGA의 분해가 pH에 영향을 미칠 것으로 판단된다.

SBF 용액에서의 침적기간에 따른 PLGA 및 β -TCP/PLGA 복합체의 3점 굽힘강도를 Fig. 7에 나타내었다. PLGA 및 β -TCP/PLGA 복합체 모두 최초의 강도에 비례하여 감소하며, 침적 후 1주에 상대적으로 감소폭이 큼을 볼 수 있다. 고분자 복합체의 경우 강도는 matrix인 고분자의 분자량에 비례하는데, Fig. 3의 GPC 결과와 같이 PLGA의 분자량감소가 강도에 영향을 미친 것으로 생각되며, PLGA 및 β -TCP/PLGA 복합체가 표면

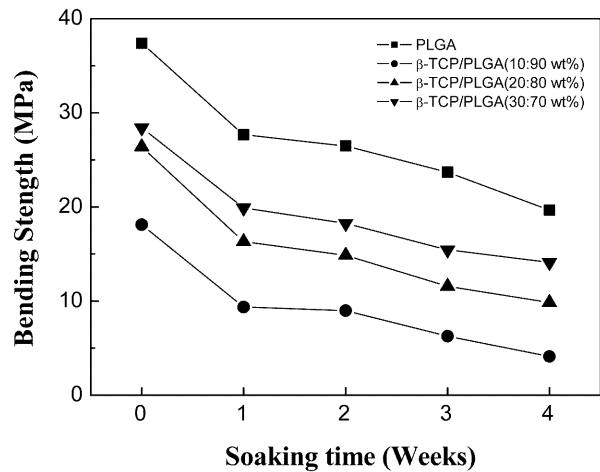


Fig. 7. Bending strength of PLGA and β -TCP/PLGA composites after soaking test in SBF solution.

부터 서서히 분해됨에 따라 강도도 선형적으로 감소한 것으로 판단된다. 이 결과로 β -TCP/PLGA 복합체 합성 시 matrix인 고분자의 분자량을 제어함으로써 복합체의 분해 및 강도를 제어할 수 있을 것으로 생각된다.

Fig. 8은 β -TCP 함량이 30wt%인 β -TCP/PLGA 복합체의 SBF 침적 후 침적기간에 따른 SEM 관찰 결과이다. Fig. 8(a)에서와 같이 합성된 β -TCP/PLGA 복합체는 PLGA matrix에 β -TCP 분말이 분산되어 있음을 볼 수 있다. SBF 침적 후 1주에는 PLGA가 분해가 일어나고 있으며(Fig. 8(b)), 2주 후에는 PLGA가 수지상으로 변함을 볼 수 있는데, 이는 PLA 및 PGA와 같은 polyester의 경우 용융상태 또는 용액에서 결정화할 때 수지상결정을 형성하므로, PLGA가 SBF 용액에서 분해-재결정되어 수지상이 나타난 것으로 판단된다.^{15,16} 생성된 수지상은 침적시간이 늘어남에 따라 더욱 성장하며, β -TCP 분말은 PLGA matrix로부터 떨어져 나가고 있음을 볼 수 있다.

4. 결 론

생분해성 β -TCP/PLGA 복합체를 마이크로파를 이용하여 in-situ polymerization으로 제조하였다. PLGA, β -TCP/PLGA 복합체의 분자량은 침적 후 최초의 분자량에 비례하여 감소하는 경향을 보이나, 2주까지는 분자량이 급격히 감소하며 2주 후부터는 서서히 감소한다. β -TCP 분해는 incubation time이 필요한 것으로 보여진다. PLGA 및 β -TCP/PLGA 복합체의 중량은 PLGA 및 β -TCP의 함량이 낮은 β -TCP/PLGA 복합체의 경우에는 PLGA가 분해되어 없어지는 3주 후부터 급격히 감소하는 경향을 보이나, 상대적으로 β -TCP의 함량이 높은 β -TCP/PLGA 복합체의 경우에는 β -TCP로 인해 침적 후

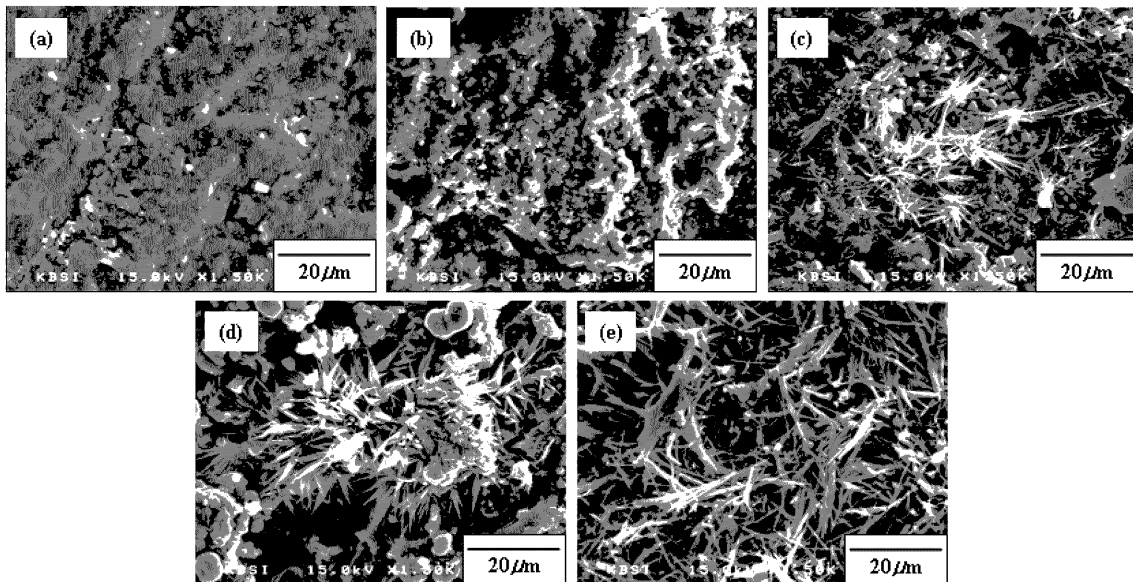


Fig. 8. SEM morphologies of β -TCP(30 wt%)/PLGA composites after soaking test in SBF solution for (a) 0, (b) 1, (c) 2, (d) 3, and (e) 4 weeks.

부터 감소한다. pH는 PLGA matrix의 분자량 감소와 비례하여 소폭감소 하였고 PLGA의 분해가 pH에 영향을 미칠 것으로 판단된다. PLGA 및 β -TCP/PLGA 복합체의 3점 굽힘강도는 침적기간이 늘어남에 따라 최초의 강도에 비례하여 감소하였으며, 고분자의 분자량을 제어함으로써 복합체의 분해 및 강도를 제어할 수 있을 것으로 생각된다. β -TCP/PLGA 복합체의 미세구조는 2주 후부터 PLGA가 분해-재결정되어 수지상으로 변한다. β -TCP/PLGA 복합체의 분해는 matrix인 PLGA의 분자량과 β -TCP의 첨가량 따라 제어될 수 있을 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 한국기계연구원 기본사업의 지원으로 이루어진 결과임.

참고 문헌

1. T. Kissel, Y. Li and F. Unger, ad. Drug. Deliv. Reviews, **54**, 99 (2002).
2. R. Langer and J. P. Vacanti, Science, **260**, 920 (1993).
3. L. Wu and J. Ding, Biomaterials, **25**, 5821 (2004).
4. L. Lu, S. J. Peter, M. D. LyMan, H. L. Lai, S. M. Leite, J. A. Tamada, S. Uyama, J. P. Vacanti, R. Langer and A. G. Mikos, Biomaterials, **21**, 1837 (2000).
5. C. M. Agrawal, J. S. Micjinney, D. Lanctot and K. A. Athanasiou, Biomaterials, **21**, 2443 (2000).
6. R. Langer, Science, **249**, 1527 (1990).
7. D. H. Kim and D. C. Martin, Biomaterials, **27**, 3031 (2006).
8. A. O. Eniola and D. A. Hammer, J. of Controlled Release, **87**, 15 (2003).
9. Z. Wang, S. Wang, Y. Marois, R. Guidoin and Z. Zhang, Biomaterials, **26**, 7387 (2005).
10. K. T. Nguyen, N. Shaikh, K. P. Shukla, S. H. Su, R. C. Ederhart and L. Tang, Biomaterials, **25**, 5333 (2004).
11. A. A. Ignatitus, P. Augat and L. E. Claes, J. Biomater. Sci. Polymer Edn., **12**, 185 (2001).
12. K. Kesenci, L. Fambri, C. Migliaresi and E. Piskin, J. Biomater. Sci. Polymer Edn., **11**, 617 (2000).
13. A. Oyane, H. M. Kim, T. Furuya, T. Kokubo, T. Miyazaki and T. Nakamura, J. Biomed. Mater. Res., **65A**, 188 (2003).
14. H. H. Jin, S. H. Min, H. C. Park and S. Y. Yoon, Kor, J. Mater. Res., **16**, 1 (2006).
15. A. J. Domb, J. Kost and D. M. wiseman, Drug Targeting Delivery, Vol. 7 Handbook of Biodegradable Polymers, CRC, Boca Raton (1998).
16. Y. Dui and A. Steinbuechel, Biopolymers, Vol. 4 Polyesters III, Wiley-VCH, Weinheim (2002).