

## 1,3-Butadiene diepoxide로 가교된 히아루론산 막의 응용

한 광 선·배 정 은\*·김 인 섭\*·정 성 일<sup>†</sup>

한남대학교 나노생명화학공학과, \*한남대학교 생명과학과  
(2008년 5월 19일 접수, 2008년 5월 29일 수정, 2008년 6월 11일 채택)

### Application of Hyaluronic Acid Membrane Cross-linked with 1,3-Butadiene Diepoxide

Gwang Seon Han, Bae Jung Eun\*, In Seop Kim\*, and Seong Ihl Cheong<sup>†</sup>

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 May 19, 2008, Revised May 29, 2008, 2008, Accepted June 11, 2008)

**요 약:** 조직공학용 생체 물질로 사용하고자 가교제 1,3-butadiene diepoxide (BD)를 사용하여 락타이드와 가교시킨 히아루론산 막을 제조하였다. 막의 락타이드 및 BD 반응도는 핵자기 공명 분광법으로 결정하였다. BD 농도가 높을 경우 6% 이하의 성장저해 현상이 나타났으나 그 값은 세포 성장에 문제되지 않을 정도로 충분히 낮았다. 가교온도가 낮을수록 탄성율은 증가하고 팽윤도는 감소하였다. 막의 생분해속도는 가교온도가 낮을수록 감소하였다. 약물방출 실험 결과 가교 온도가 낮을수록 막을 통한 약물 투과는 감소하였다.

**Abstract:** The biodegradable hyaluronic acid membranes cross-linked with lactide using the crosslinking agent, 1,3-butadiene diepoxide (BD), were prepared as a potential biocompatible material for tissue engineering. The degree of lactide and BD reaction of the crosslinked membrane was determined by the analysis of nuclear magnetic resonance spectroscopy. 6% of growth inhibition was observed in case of high BD concentration but the value is low enough not to affect cell growth. As the crosslinking reaction temperature increased, elongation increased and swelling ratio decreased. The rate of degradation was found to increase with the crosslinking temperature. The drug release experiment showed that the transport of drug through the membrane decreased with the crosslinking temperature.

**Keywords:** hyaluronic acid, crosslinking, swelling, degradation, drug delivery

### 1. 서 론

문명의 발달로 인간의 수명이 연장되고 양질의 삶에 대한 욕구가 커지면서 생체 조직이나 장기의 손상 및 기능 상실을 효과적으로 치료할 수 있는 보형 및 성형 재료의 수요가 급증하고 있다. 이러한 시대적 요구에 따라 천연 및 인공 물질로 생체에 적합한 재료를 만들려는 노력이 활발히 전개되고 있다. 생체 재료로서 사용되기 위해서는 생분해성, 비독성, 구조적 안정성, 낮은 면역 반응성 등의 생체 적합적 성질을 갖추고 있어

야 한다. 히아루론산(hyaluronic acid, HA)은 조직 내에 존재하는 천연고분자로서 세포외 물질을 구성하는 중요한 물질이나 효소작용 및 가수분해에 의해 쉽게 분해되어 그 응용이 제한되었다. 최근 히아루론산을 물리화학적으로 개조하여 조직공학용 재료로 개발하려는 연구가 활발히 진행되고 있다[1-10]. 한편 합성 고분자인 polylactide (PLA), polyglycolide (PGA) 등은 생체 적합성이 뛰어나 수술용 봉합사로 사용된 이래 신체의 손상된 조직이나 기관의 치유를 위한 용도로 널리 사용되어 왔다. 이 고분자들은 인체 내에서 생분해되어 자연히 소멸되며 분자 구조의 차이로 인해 분해속도를 조절할 수 있는 특징이 있다[11-13].

<sup>†</sup>주저자(e-mail : suho@hnu.kr)

본 실험실에서는 이러한 두 종류의 고분자를 가교시켜 생체적합성이 우수할 뿐 아니라 생체 내에서 분해속도를 조절할 수 있는 생체 적합성 고분자를 합성하는 연구를 계속하여 왔다[14-18]. 가교제 1,3-butadiene diepoxide (BD)를 사용하여 현탁액 상태에서 히아루론산을 가교시켜 비드를 제조하였으며 그 분자 구조 및 물성 등을 측정하였다[14]. 이때 현탁액 상에서 자체 가교 반응에 의해서 반응이 진행되는 데 가교제 농도, 반응 온도, 혼합속도 등을 조절하여 비드의 물성과 크기를 조절하였다. 대부분의 가교제에서 HA와 PLA, PGA는 반응하지 않았으나 가교제 1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide (EDC)를 사용할 경우 HA와 PLA의 단량체인 젖산 혹은 무수 이량체인 락타이드(LA)가 가교되어 고분자 막이 만들어졌다[15-18]. 특히 가교조건을 변화시키면서 적절한 물성을 갖는 막을 제조하여 약물전달 시스템에의 적용가능성을 탐색하였다[17]. 그런데 제조된 막의 세포독성을 측정하는 과정에서 EDC의 농도가 높을 경우 가교도는 증가하나 세포독성도 함께 증가하는 현상이 관찰되었다[18]. 이는 가교 반응시 반응에 참여한 EDC가 막에 존재하여 세포독성을 일으키는 것으로 밝혀져 생체 재료로서 사용하기에 부적절한 것으로 판명되었다. 가교제 BD는 독성을 일으키는 것으로 추정되는 아민기를 포함하지 않을 뿐 아니라 BD에 존재하는 에폭사이드기는 가교 반응 후 에테르기로 변화되는 것으로 알려져 있어[19] 제조된 막은 독성이 없을 것으로 보여[20,21] BD를 가교제로 선정하여 고분자 막을 합성하려고 하였다. 이렇게 얻어진 고분자가 예상대로 세포독성이 없을 경우 신체의 장기나 세포가 접착하여 분화, 성장할 수 있는 지지체 혹은 인체 내에서 서서히 약물을 방출시키는 약물전달 지지체로서 응용될 수 있을 것이다.

본 연구에서는 가교제 BD로 히아루론산과 락타이드를 가교시켜 고분자 막을 제조하였다. 막의 가교됨을 확인하기 위하여 핵자기 공명분광분석기(NMR)로 분석하였고 이를 이용하여 반응도를 추정하였다. 여러 가지 운전 조건을 변화시키면서 막의 기계적 물성 및 팽윤도를 측정하였다. 약물방출 시스템에 적용가능성을 보기 위해 생분해성, 세포독성, 약물방출성 등을 살펴보았다.

## 2. 실험

### 2.1. 실험재료

히아루론산은 평균분자량  $2 \times 10^6$  Da인 Fulllongchem 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.

### 2.2. 막의 제조

1 N NaOH 수용액에 3 wt% 히아루론산을 녹인 후 히아루론산 기준으로 락타이드를 5몰비로 첨가하여 상온에서 24시간 교반하였다. 히아루론산과 락타이드의 혼합 용액에 가교제 BD를 4~12 wt%로 넣은 후 20~30°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.

### 2.3. 물성연구

#### 2.3.1. 기기분석

제조된 막의 가교됨을 확인하기 위해 NMR을 사용하여 관능기를 확인하였고 이를 기초로 락타이드 반응도와 가교제 BD의 반응도를 결정하였다. NMR은 D<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 용매로 하여 Bruker AMX 500 MHz (Karlsruhe, Germany)로 측정하였다. Universal Testing Machine (UTM)을 사용하여 76.2 mm × 3.15 mm 크기로 제작된 막의 인장 강도를 측정하였다.

#### 2.3.2. 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 측정하고 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

### 2.3.3. 막의 세포독성

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. 막 침출물의 세포독성을 평가하기 위한 모델 세포로 L929 섬유아세포를 사용하였다. 섬유아세포는 10% FBS와 100 units/mL의 페니실린 및 100 µg/mL의 황산 게타마이신이 첨가된 DMEM 배지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 incubator에서 배양하였다. 섬유아세포를 0.25% 트립신으로 처리하여 배양용기 바닥에서 떼어 낸 후 24 well PS 배양용기에 4 × 10<sup>4</sup> cell/cm<sup>2</sup>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 세포배양배지를 넣고 현탁한 뒤 1000 rpm에서 5분간 원심 분리하여 트립신을 제거하였다. 1 mL 세포배양배지를 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: 세포배양배지를 첨가한 well에서 자란 섬유아세포의 개수

B: 막 침출물을 첨가한 well에서 자란 섬유아세포의 개수

### 2.3.4. 막의 생분해성

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

### 2.3.5. 막의 투과도

크기가 다른 2개의 diffusion cell을 연결하고 그 중간에 막을 설치하여 막을 통하여 이동한 약물의 농도를 측정하였다. 한쪽 방에는 약물 용액을 다른쪽 방에는 pH 7 완충용액을 채우고 두 방 사이에는 가교된 막을 설치하였다. 실험시 농도구배를 최소화하기 위하여 교반시켜 주었으며 온도를 37°C로 일정하게 유지시켜 주기 위해 항온조에서 실행하였다. 완충용액이 채워진 방에서 일정한 시간마다 시료를 채취하여 파장 270 nm에서 분광광도계(UV spectrophotometer) (SMART PLUS SP-1900PC)를 사용하여 투과도를 측정하였고 이를 이용하여 농도를 결정하였다.

## 3. 결과 및 고찰

가교제 BD로 히아루론산과 락타이드를 반응시켜 얻은 고분자는 이미 보고된 가교제 EDC를 사용하여 얻은 고분자의[16] 경우와 마찬가지로 히드록시기와 카르복실기가 에스테르화한 분자구조를 갖게 된다. 히아루론산에는 히드록시기와 카르복실기가 존재하고, 락타이드는 젖산의 무수이량체로서 고리형 구조를 갖는데 이들이 서로 결합하여 1차 가교 물질이 생성된다. 히아루론산, 1차 가교 물질 모두 히드록시기와 카르복실기가 존재하므로 그들끼리의 에스테르반응 혹은 락타이드와의 반응에 의하여 반응은 매우 복잡하게 진행된다. 우리는 히아루론산과 락타이드의 반응유무에 관심이 있으므로 반응에 의해 생성되는 분자구조에 초점을 맞추려 하고 이때 얻어질 수 있는 분자 구조를 Fig. 1에 보였다. Fig. 1(a)는 히아루론산에 반응한 락타이드가 말단기 형태로 존재하는 경우이며 Fig. 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

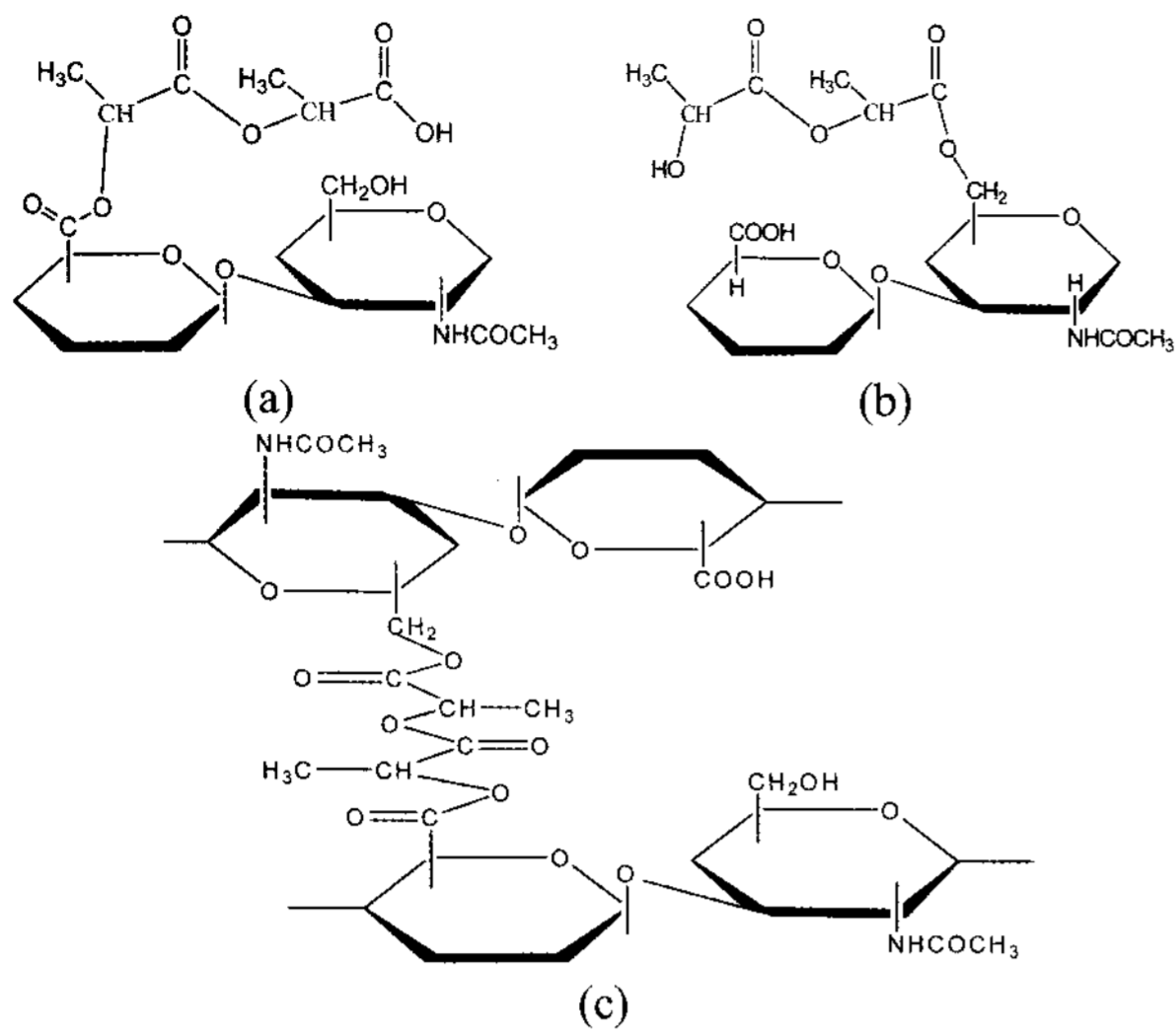


Fig. 1. Structure of ester group (a) connected to lactide end group and (b) crosslinked to HA.

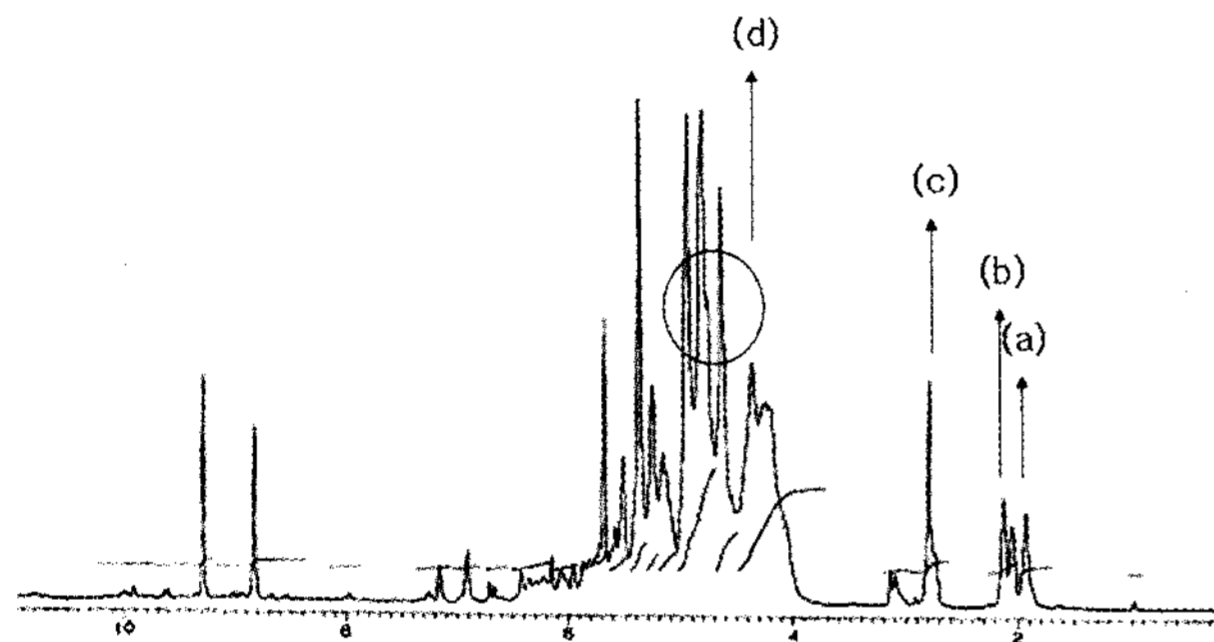


Fig. 2. <sup>1</sup>H-NMR spectra with methyl group (a) connected to ester end group, (b) connected to crosslinked ester group, (c) connected to amide group of HA, (d) and methylene group connected to BD.

방식이 다른 점에 주목하여 관능기의 구조를 확인하기 위하여 NMR로 분석하였으며 대표적인 도표를 Fig. 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 peak가 나타났다. 본 연구실에서 발표한 논문과[16] 동일한 방법으로 2.8 ppm peak의 면적에 대한 2.1과 1.9 ppm에서의 peak 면적의 합에 대한 면적비를 락타이드 반응도로, 면적 합에 대한 2.1 ppm에서의 면적비를 반응한 락타이드 중에서 가교된 부분의 선택도로 간주하였다. 또 BD는 염기성 분위기에서 히아루론산의 히드록시기와 반응하여 에폭사이드기가 에테르기로 변화하는 것으로 알려져 있어 Fig. 3에서 그 반응식을 나타내었

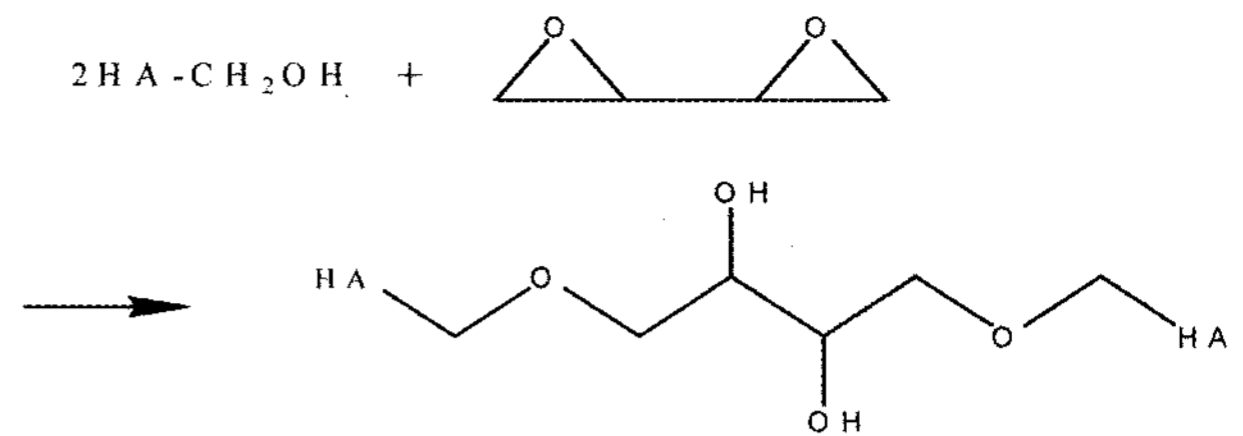


Fig. 3. Reaction scheme of hyaluronic acid and lactide.

Table 1. Methyl and Methylene Group Concentration Measured by <sup>1</sup>H-NMR in the HA Membranes 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	0.054	0.040	0.066	0.628
8.18	0.023	0.038	0.041	0.734
11.78	0.021	0.037	0.024	0.752

Table 2. Reactivities Calculated from NMR Data of Table 1

BD Concentration (wt%)	Degree of lactide reaction ((a+b)/c)	Selectivity Degree of BD reaction (b/(a+b))	Degree of BD reaction (d/c)
4.26	1.42	0.43	9.50
8.18	1.48	0.62	17.74
11.78	2.40	0.64	30.80

다[19]. NMR 분석 도표에서 에테르기에 연결된 메틸렌기(d)의 분자구조는 확인 결과 4.3~4.8 ppm 위치에서 여러 peak가 중첩되어 나타났다. 이 위치에서의 peak는 가교제가 히아루론산과 반응하여 생성된 peak이므로 이 peak를 가교제에 의한 가교정도를 나타내는 경향성으로 보아 2.8 ppm peak 면적에 대한 4.3~4.8 ppm peak 면적비를 가교제 BD에 의한 반응도로 간주하였다. 가교 온도 30°C에서 가교제 농도를 증가시키면서 반응시켜 얻어진 막의 NMR 그래프로부터 각 위치에서의 peak 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 말단기에 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[3] 가교제 농도가 커

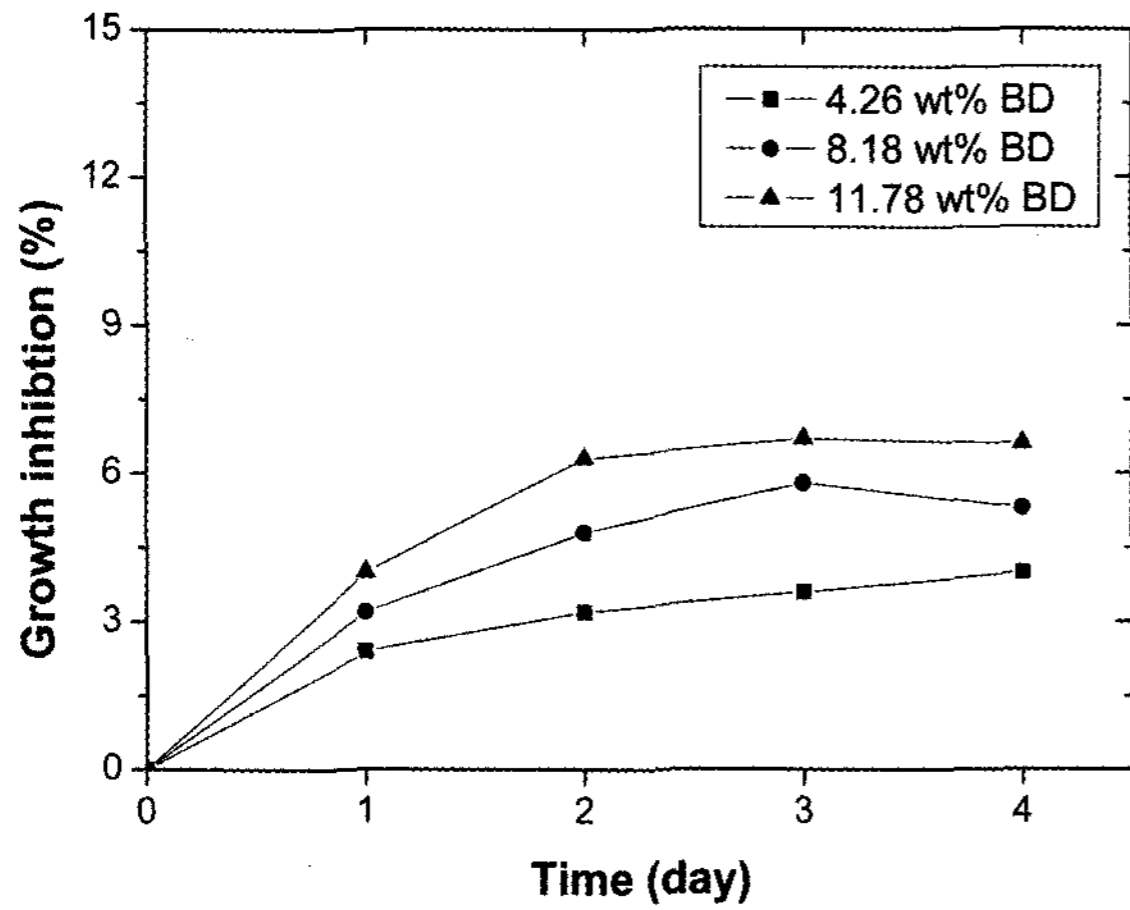


Fig. 4. Growth inhibition of L929 embryo fibroblast cell in the extracts of HA membranes crosslinked at different BD concentration.

질수록 락타이드 반응도와 가교제 반응도가 증가하였고 선택도 또한 증가하였다.

가교된 고분자가 지지체로 사용될 경우 세포들이 안착하여 증식할 수 있기 위해서는 표면적이 크고 물과 영양분이 원활하게 이동할 수 있어야 하며 세포에 대한 독성이 없어야 한다. 이미 보고된 가교제 EDC로 히아루론산과 락타이드를 가교시켜 제조한 고분자 막은 [4,17] 가교도가 높은 경우 고분자 막에 포함되어 있는 EDC가 세포독성을 나타내어 생체 재료로 사용하는데 문제가 있었다. 그러나 에폭사이드 계통의 가교제 BD는 히아루론산과 가교되면 에폭사이드기가 에테르기로 변화하여 세포독성이 없을 것으로 [20,21] 예상되어 BD를 새로운 가교제로 선택하였다. BD 함유율이 높을 경우 세포독성이 나타날 확률이 높으므로 이에 대한 영향을 알아보기 위해서 BD 농도를 증가시키면서 합성된 막의 세포독성을 관찰하여 Fig. 4에 보였다. 시간이 지남에 따라 6% 이하의 성장저해가 나타났으나 3~4일이 지나면 더 이상의 성장 저해가 나타나지 않았다. 또 BD 농도가 높을수록 성장저해가 더 크게 나타났다. Table 2에서 보는 바와 같이 BD농도가 높을수록 막에 BD 분자가 더 많이 존재하는데 이것이 세포의 성장에 영향을 주는 것으로 추정된다. 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 세포독성을 관찰할 때 사용하였던 NIH/3T3에 비해 독성에 대한 민감도가 훨씬 우수한 종류임을 고려할

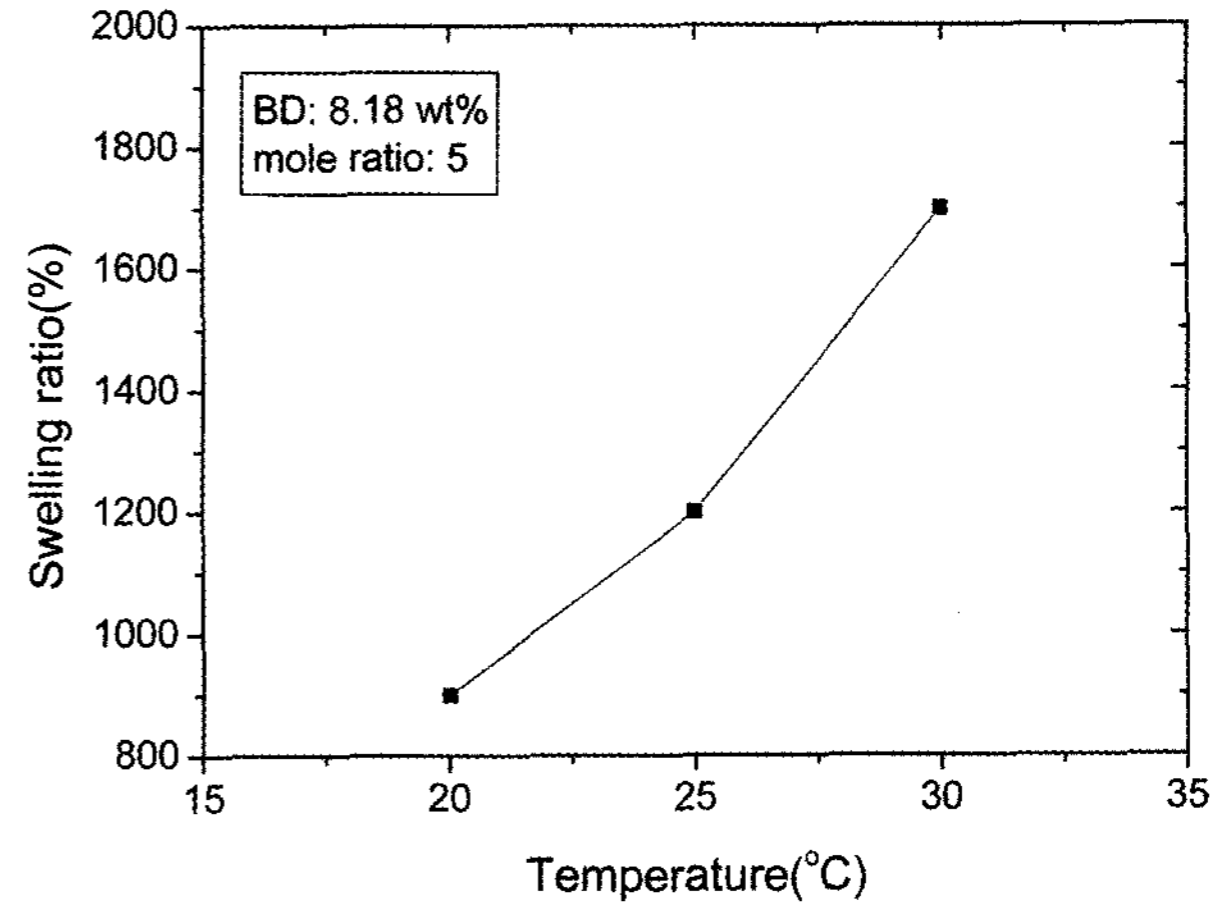


Fig. 5. The effect of temperature on swelling ratio.

Table 3. Tensile Properties of HA Membranes with Temperature (BD concentration: 8.18 wt%, mole ratio: 5)

Temperature (°C)	Tensile strength (kg/mm <sup>2</sup> )	Young's modulus (kg/mm <sup>2</sup> )	Elongation (%)
20	0.56	0.48	138
25	0.42	0.32	189
30	0.33	0.21	220

때 생체 적합성이 우수한 것으로 판단되었다.

고분자 막이 지지체나 약물전달 시스템 등의 용도로 사용된다면 적절한 강도를 유지하여야 하며 물을 적당하게 흡수할 수 있어야 한다. 운전 조건을 변화시키면서 가교시킨 결과 반응온도가 너무 낮거나, 가교제 농도가 낮거나, LA/HA 몰비가 낮을 경우 가교반응은 일어나나, 제조된 막이 빨리 가수분해되어 반감기가 1~2일 정도밖에 되지 않거나 기계적 강도가 낮아 실험에 사용하기 어려웠다. 막의 기계적 강도나 흡수력은 가교제 농도나 몰비뿐 아니라 가교온도가 민감하게 영향을 미치는 것이 관찰되었다. Table 3에 가교온도를 변화시키면서 시료의 기계적 물성을 측정된 결과를 나타내었다. 가교온도가 낮아지면 육안으로 관찰될 정도로 점도가 높아지는데 이는 가교도가 높아져 반응물에 3차원 구조가 증가할 때 나타나는 현상이다. Table 3에서 보는 바와 같이 가교온도가 감소함에 따라 인장강도와 탄성율이 증가하고 인장율은 감소하였다. 특히 몰비 7, 반응온도 20°C인 조건에서의 가교반응에서는 반응개시 후 4시간 정도가 지나면 겔화 현상이 나타날 정도로 점도가 높아져 반응물을 먼저 casting한 후 막 상태로 반응과 건조를 병행해야 하는 경우도 발생하였다. 가교제

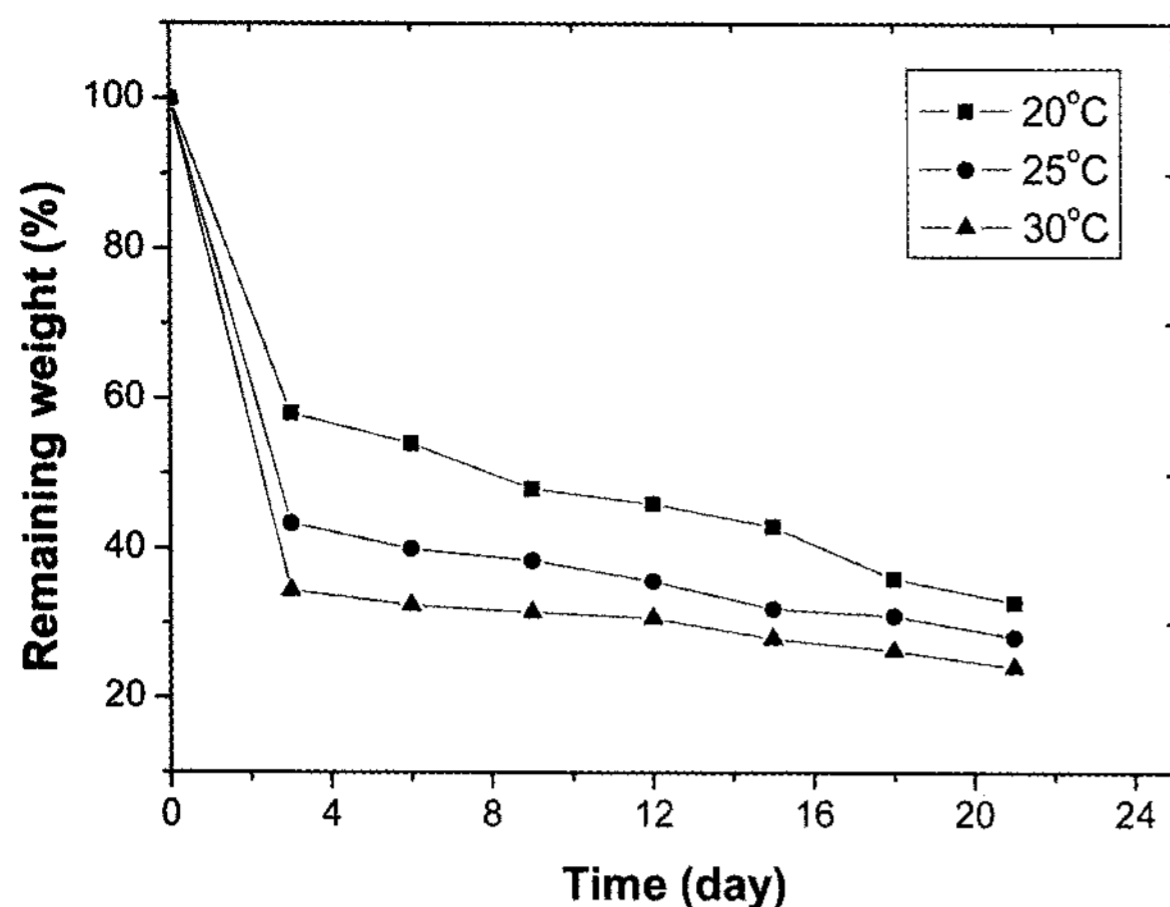


Fig. 6. Degradation profiles of HA membranes cross-linked at different temperature.

EDC를 사용할 경우에도 반응온도가 감소하면 가교도가 증가하였으며[4,17] BD를 사용하여 bead를 제조할 경우에도 동일한 현상을 보였다[15]. BD 8.18 wt%, 물비 5에서 반응온도를 변화시키면서 팽윤도를 측정된 결과를 Fig. 5에 보였다. 예상대로 반응온도가 감소할수록 가교도가 증가하여 3차원 구조가 발달하므로 팽윤도가 감소하였다. 또 EDC를 가교제로 사용할 때와 비교하여 볼 때 팽윤도가 1.5~2.5배 정도 증가하였다[4,17]. EDC를 사용할 경우 동결 건조법으로 막을 만들기 때문에 막 내부에 많은 기공이 형성되어 수분이 들어갈 공간이 커진다. 그러나 다른 한편으로 EDC에 의해서 얻어진 고분자에는 에테르기가 존재하지 않으나 BD를 사용할 경우 에테르기가 생성되며 이 에테르기가 물과의 상호작용이 우수하여 친수성을 높여준다. 이 두 가지 효과 중 에테르기에 의한 친수성이 더 크게 작용하여 EDC를 사용한 경우보다 팽윤도가 증가하는 것으로 보인다. 즉 수분을 흡수하는 성질은 물리적인 3차원 골격구조보다는 분자의 화학적인 구조가 더 큰 영향을 주는 것으로 사료된다.

가교된 고분자의 생체 분해능력을 살펴보기 위해 여러 온도에서 가교된 고분자 막을 증류수에 침전시킨 후 37°C에서 분해거동을 관찰하였으며 그 결과를 Fig. 6에 보였다. 모든 종류의 막이 신속히 분해되었고 가교온도가 낮아서 가교가 많이 된 막일수록 분해속도가 느렸다. 또 초기에 급격히 분해되고 그 후에는 서서히 분해되는 경향을 보였다. 전반적으로 EDC로 가교된 막의 반감기가 약 30~60일 정도인데[4,17] BD로 제조된 막의 경우 반감기가 3일 이내로 분해가 훨씬 빠르게 진행

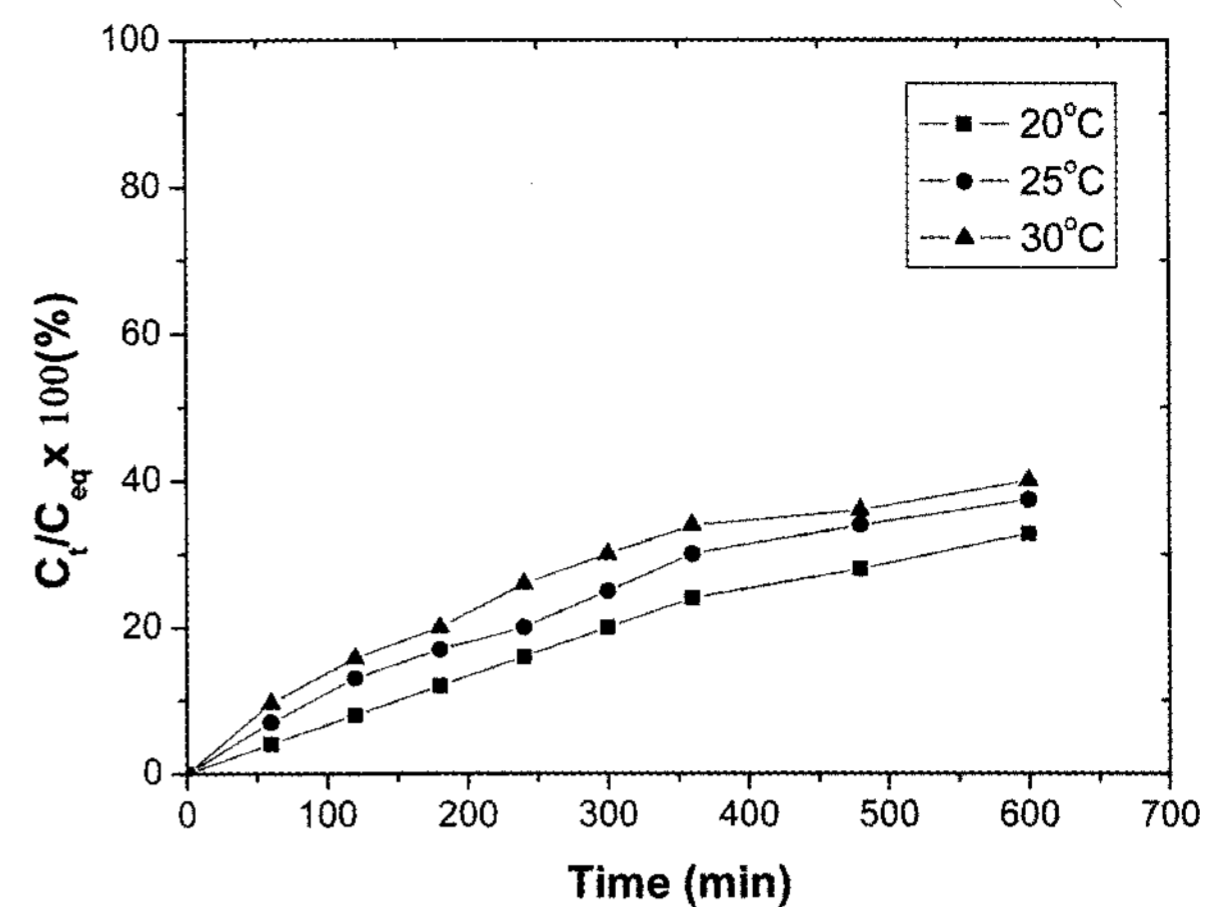


Fig. 7. Release profiles of indomethacin from HA membranes crosslinked at different temperature.

되었다. 특히 초기의 급격한 분해는 EDC로 얻어진 막에서는 관찰되지 않는데 이러한 현상은 BD로 제조된 고분자 막의 주사슬에 존재하는 에테르기에 기인한 것으로 보인다. EDC로 가교된 막의 경우 에테르기가 존재하지 않으나 BD로 제조된 막의 경우 가교된 구조에 친수성이 우수한 에테르기가 존재하고 이로 인해 가수분해가 더 신속하게 진행되어 분해속도가 빠른 것으로 사료된다.

생체 적합성 고분자가 약물전달 시스템에 적용되려면 다양한 크기의 단백질이나 의약품이 막을 통하여 원활하게 이동할 수 있어야 한다. 약물 방출현상은 고분자 막의 물성뿐 아니라 온도, pH, 이온세기, 전기장, 농도, 용제 등의 외부환경이나 자극에 의해 크게 차이난다. Fig. 7에서 다른 가교온도에서 제조된 막을 통하여 약물이 방출되는 현상을 관찰한 결과를 보였다. 막의 두께에 의한 영향을 배제하기 위해 동일한 두께의 막을 사용하였다. 관절염 치료제로 사용되는 indomethacin을 사용하여 37°C로 조절된 항온조에서 시간에 따라 방출된 약물의 농도를 측정하고 평형 농도에 대한 농도비로 계산하여 나타내었다. 약물이 시간에 따라 서서히 방출되었으며 온도가 낮을수록 서서히 방출되었다. 동일한 조건하에 제조된 막이 아니라 정량적인 비교는 할 수 없으나 전반적으로 EDC로 가교된 막에 비해서 방출속도가 느린 것으로 나타났다[17]. 앞에서 언급한 바와 같이 EDC로 가교된 막의 경우 에테르기가 존재하지 않으나 BD로 가교된 막에는 에테르기가 존재하여 친수성이 우수하다. 그런데 친수성이 우수한 막일수록 분배계수가 커 약물이 투과하기 힘들어[22] 이로 인해 BD로

가교된 막이 EDC로 가교된 막에 비해 전반적으로 약물 방출속도가 느린 것으로 보인다. 본 실험에서는 주로 반응온도에 따른 변화를 살펴보았으나 몰비, 가교제 농도, 히아루론산 농도, NaOH 수용액 농도 등 여러 가지 운전 조건의 변화에 따라 가교된 고분자의 물성이 차이므로 응용 제품의 목적에 맞는 조건을 탐색하여 최적의 물성을 가진 고분자를 만드는 것이 가능하다.

이미 발표된 가교제 EDC를 사용하여 얻은 막과 비교하여 불 때[15-18] BD로 제조된 막은 독성이 줄어들어 생체 적합성이 더 우수하였다. 또 팽윤도와 인장율 및 생분해속도는 증가하였고 약물에 대한 투과도는 감소하였다. 두 경우 반응에서의 차이점을 비교하면 히아루론산과 락타이드와 주반응에 의해서 얻어지는 분자 구조는 가교제의 종류에 관계없이 동일하다. 그러나 가교제와 히아루론산과의 반응에 있어서 EDC의 경우 아민기가 생성되나 BD의 경우 에테르기가 생성된다. 주사술에 생성된 에테르기는 유연성을 증가시켜주며 산소분자의 우수한 극성이 물과의 친수성을 좋게 하는데 이러한 분자구조 차이가 물성에 영향을 주는 것으로 보인다. BD로 제조된 막의 경우 생체 적합성이 우수하므로 약물전달체나 조직공학용 지지체로서 더 유용하게 응용될 것으로 기대된다.

#### 4. 결 론

히아루론산과 락타이드 수용액을 가교제 BD로 가교시켜 불용성 막을 제조하였다. 생성된 고분자 막을 NMR로 분석하여 락타이드와 BD 반응도를 추정하였다. 가교제 농도를 증가시키면서 가교시킨 결과 가교도가 증가하였으며 팽윤도는 감소하였다. 모든 막에서 6% 이하의 미미한 성장저해 현상이 관찰되었고 가교제 농도가 높을수록 성장저해 현상이 크게 나타났다. 가교온도가 감소함에 따라 탄성율은 증가하고 인장율은 감소하였다. 가교온도가 낮아 가교가 많이 된 막일수록 팽윤도와 생분해 속도가 감소하였다. 약물방출 실험 결과 가교온도가 낮을수록 약물의 투과도는 감소하였다.

#### 감 사

이 논문은 2007년 한남대학교 교비 연구비 지원에 의하여 연구되었습니다.

#### 참 고 문 헌

1. G. D. Prestwich, D. M. Marecak, and J. F. Marecek, "Controlled chemical modification of hyaluronin acid: synthesis, applications, and biodegradation of hydrazide derivatives", *J. Control. Rel.*, **53**, 93-103 (1998).
2. Y. Luo, K. R. Kirker, and G. D. Prestwich, "Cross-linked hyaluronic acid hydrogel films: new biomaterials for drug delivery", *J. Control. Rel.*, **69**, 169-184 (2000).
3. S. N. Park, H. J. Lee, K. H. Lee, and H. Suh, "Characterization of porous collagen/hyaluronic acid scaffold modified by 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide cross-linking", *Biomaterials*, **22**, 1205-1212 (2002).
4. S. N. Park, H. J. Lee, K. H. Lee, and H. Suh, "Biological characterization of EDC-crosslinked collagen-hyaluronic acid matrix in dermal tissue restoration", *Biomaterials*, **24**, 1631-1641 (2003).
5. H. S. Nam, J. H. Kim, J. H. An, and D. J. Jung, "Synthesis of Hyaluronic acid scaffold for tissue engineering and evaluation of its drug release behaviors", *Polymer(Korea)*, **25(4)**, 476-485 (2001).
6. J. A. Hunt, H. N. Joshi, V. J. Stella, and E. M. Topp, "Diffusion and drug release in polymer films prepared from ester derivatives of hyaluronic acid", *J. Control. Rel.*, **12**, 159-169 (1990).
7. L. Benedetti, R. Cortivo, T. Berti, A. Berti, F. Pea, M. Marzzo, M. Moras, and G. Abatangelo, "Biocompatibility and biodegradation of different hyaluronan derivatives (Hyaff) implanted in rats", *Biomaterials*, **14**, 1154-1160 (1993).
8. J. Aigner, J. Tegeler, P. Hutzler, D. Campoccia, A. Pavesio, C. Hammer, E. Kastenbauer, and A. Naumann, "Cartilage tissue engineering with novel nonwoven structured biomaterial based on hyaluronic acid benzyl ester", *J. Biomed. Mater. Res.*, **42**, 172-181 (1998).
9. G. P. Chen, Y. Ito, Y. Imanishi, A. Magnani, S. Lamponi, and R. Barbucci, "Photoimmobilization of sulfated hyaluronic acid for antithromboge-

- nicity”, *Bioconjugate Chem.*, **8**, 730-734 (1997).
10. S. K. Hahn and A. S. Hoffman, “Characterization of Biocompatible Polyelectrolyte Complex Multilayer of Hyaluronic Acid and Poly-L-Lysine”, *Biotech. and Biopro. Eng.*, **9**, 179 (2004).
  11. C. Grandfils, P. Flandroy, and R. Jerome, “Control of the biodegradation rate of poly(DL-lactide) microparticles intended as chemoembolization materials”, *J. Control. Rel.*, **38**, 109-122 (1996).
  12. H. Fukuzaki, M. Yoshida, M. Asano, and M. Kumakura, “Synthesis of copoly (D,L-lactic acid) with relatively low molecular weight and *in vitro* degradation”, *Eur. Polym. J.*, **25(10)**, 1019-1026 (1989).
  13. S. Li, M. Tenon, H. Garreau, C. Braud, and M. Vert, “Enzymatic degradation of stereocopolymers derived from L-, D,L- and meso-lactides”, *Polym. Degrad. Stab.*, **67**, 85-90 (2000).
  14. J. Y. Kwon and S. I. Cheong, “Characterization of hyaluronic acid membrane containing lactic acid”, *Membrane Journal*, **15(1)**, 8-14 (2005).
  15. J. Y. Kwon and S. I. Cheong, “Synthesis and characterization of hyaluronic acid bead crosslinked by 1,3-butadiene diepoxide”, *Polymer(Korea)*, **29(5)**, 445-450 (2005).
  16. J. Y. Kwon and S. I. Cheong, “Characterization of hyaluronic acid membrane crosslinked with lactide”, *Polymer(Korea)*, **29(6)**, 599-604 (2005).
  17. M. S. Kim, J. Y. Kwon, and S. I. Cheong, “Synthesis of lactide/hyaluronic acid polymer membrane for the application of drug delivery system”, *Membrane Journal*, **15(4)**, 281-288 (2005).
  18. W. J. Kim, J. Y. Kwon, S. I. Cheong, and I. S. Kim, “Cytotoxicity of hyaluronic acid membrane crosslinked with lactide”, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **21(4)**, 255-259 (2006).
  19. T. C. Laurent, K. Hellsing, and B. Gelotte, “Cross-linked gels of hyaluronic acid”, *Acta Chem. Scand.*, **18**, 274-275 (1964).
  20. B. Ronnebeger, W. J. Kao, J. M. Anderson, and T. Kissel, “*In vivo* biocompatibility study of ABA triblock copolymers consisting of poly(L-lactic-co-polycolic acid) A blocks attached to central poly(oxyethylene) B blocks”, *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, **30**, 31-40 (1996).
  21. S. H. Oh, J. Y. Lee, S. H. Ghil, S. S. Lee, S. H. Yuk, and J. H. Lee, “PCL microparticle-dispersed PLGA solution as a potential injectable urethral bulking agent”, *Biomaterials*, **27**, 1936-1944 (2006).
  22. T. Coviello, M. Dentini, G. Rambone, P. Desideri, and F. Alhaique, “A novel crosslinked polysaccharide: studies for a controlled delivery matrix”, *J. Control. Rel.*, **55**, 57-66 (1998).