

구아노신일인산의 결정화에 대한 수용성 고분자의 영향

이민경 · 최혜민 · 김우식* · 홍종팔** · 이종휘†

중앙대학교 공과대학 화학신소재공학부, *경희대학교 공과대학 화학공학과, **케이엔디티엔아이(주) 기술연구소
(2008년 9월 12일 접수, 2008년 11월 12일 수정, 2008년 11월 12일 채택)

Influence of Water Soluble Polymers on Crystallization of 5-Guanosine Monophosphate

Min Kyung Lee, Hyemin Choi, Woo-Sik Kim*, Jong-Pal Hong**, and Jonghwi Lee†

Department of Chemical Engineering and Materials Science, Chung-Ang University,
221 Heukseok-Dong, Dongjak-Gu, Seoul 156-756, Korea

*Department of Chemical Engineering, Kyunghee University,
446-701 Seocheon-Dong, Giheung-Gu, Yongin, Gyeonggi-do 446-701, Korea

**KNDT&i Korea NonDestructive Testing Co., Ltd.,
197-5 Guro-Dong, Guro-Gu, Seoul 152-050, Korea

(Received September 12, 2008; Revised November 12, 2008; Accepted November 12, 2008)

초록: 고분자를 저분자 유기물질의 결정화 과정에 사용하면 결정형성과정을 중간 단계, 즉 메조크리스탈 단계에서 멈출 수 있다. 메조크리스탈은 수백 나노미터-수 마이크로미터의 결정들이 스스로 배열되어 결정성을 갖는, 결정과 고분자의 복합구조로 정의할 수 있다. 본 연구에서는 구아노신일인산의 메조크리스탈 형성에서 고분자의 영향과 그와 관련된 변수들에 대해 알아 보았다. OM과 SEM 분석을 통해 고분자유도 결정화에 의한 GMP 결정은 전형적인 GMP입자와는 다른 모폴로지를 보임을 확인하였고, XRD 분석을 통해 새로운 polymorph를 가짐을 확인하였다. 이러한 결과는 고분자에 의해 GMP의 결정구조가 달라졌음을 의미하며, 결정 안에 함유되는 물의 함량이 달라져 다른 수화물 구조를 보임을 TGA 분석을 통해 확인하였다.

Abstract: In presence of a polymer, the crystallization of low MW organic materials can be stopped at an intermediary step, where mesocrystals can be identified. A mesocrystal is defined as a superstructure of nanoparticles having polymer-adsorbed crystal faces on the scale of several hundred nanometers to micrometers. This study examined the effects of water soluble polymers and relevant parameters on the formation of guanosine-5'-monophosphate mesocrystals. It was observed in OM and SEM that GMP obtained in a polymer solution had a unique particle morphology different from the typical one of GMP. XRD analysis indicated that the polymer-directed crystallized GMP had a different polymorph of GMP. This result shows that the crystal structure of GMP can be changed by polymers. It was observed in TGA analysis that the polymer-directed crystallized GMP had a different water content, indicating a different type of hydrate.

Keywords: polymorph, water soluble polymer, guanosine-5'-monophosphate, polymer-directed crystallization, mesocrystal.

서 론

결정화 과정의 핵 생성(nucleation)과 성장(growth) 단계는 다양한 조건에 의해 영향을 받을 수 있고, 결정의 특성을 결정짓는 중요한 두 단계이다. 초기 핵생성 단계에서 안정화제, 기핵제(nucleating agent), 또는 다양한 첨가제 등을 사용함으로써 전형적이지 않은(non-classical) 결정화 과정으로 진행될 수 있고,^{1,2} 그러한 결정화 과정을 거쳐 얻어질 수 있는 메조크리스탈(mesocrystal)이라는 입자형태가

있다.³⁻⁶ 메조크리스탈은 나노입자의 자기 형성(self-organization) 과정을 거쳐 만들어지는 새로운 물질이며, 메조크리스탈은 수백 나노미터-수 마이크로미터의 결정들이 스스로 배열되어 외형적으로 결정성을 갖고 있는 복합 초구조(superstructure)로 정의할 수 있으며, 완벽한 단결정을 이루기 전의 비교적 안정한 중간물질로 추측할 수 있다. 또한, 여기에서 첨가제를 이용하면 자기형성과정을 중간 단계, 즉 메조크리스탈 단계에서 멈출 수 있으며, 그 구성입자도 분석해 낼 수 있다.

메조크리스탈은 준안정 상태의 생성물이나 결정화 공정 중에서 중간 생성물(intermediate)로 다양한 조건에서 발견될 수 있다. 몇 가지 알려진 바에 따르면, 메조크리스탈은 non-classical 결정화의

†To whom correspondence should be addressed.
E-mail: jong@cau.ac.kr

한 예이며, 나노입자의 응집(aggregation) 과정을 통해 이루어진다. 최근 메조크리스탈에 관한 연구가 활발해지고 있으며, 이미 calcium carbonate system,^{7,8} copper oxalate,¹ BaSO₄,⁹ CoPt₃ 등의¹⁰ 메조크리스탈에 대한 많은 발견이 이루어지고 있다. 또한, 최근에는 저분자 유기물질의 메조크리스탈에 대한 연구도 활발히 진행되고 있다.¹¹⁻¹⁷ 유기물질의 결정은 메조크리스탈을 연구하는 데에 많은 이점을 가지며, 그에 대한 응용가능성은 매우 크다. 유기결정은 낮은 격자 에너지(lattice energy)를 가지며, 쌍극자-쌍극자 상호작용(dipole-dipole interaction)에 의한 추가적인 결정화 변수들이 작용하게 된다. 따라서, 다양한 변수들에 대한 영향으로 메조크리스탈을 발견할 수 있으며, 메조크리스탈 형성의 메카니즘을 밝히는 데에도 적합하다.

결정 형성 시에 고분자가 첨가되면 결정면(crystal face)에 고분자의 선택적인 흡착(adsorption)이 일어날 수 있다. 결정면에 흡착된 고분자들은 입자들 간의 안정성(colloidal stability)을 감소시킬 수 있으며, 따라서 입자들 간의 응집을 유도하게 된다. 반면에 고분자와 결정표면 사이의 상호작용(interaction)에 의해 결정표면과 고분자 사이의 안정성을 증가시키게 되며,¹⁸ 그에 따라서 초기입자(primary cluster)의 크기와 모양에 영향을 미칠 수 있는 것으로 알려져 있다.

본 연구에서 사용된 GMP(Guanosine-5'-MonoPhosphate)라는 물질은 MSG(MonoSodium Glutamate)와 더불어 현재 사용되고 있는 대표적인 식품첨가제로 효소 발효를 통하여 합성되는 고부가가치 물질이다. 이는 drowning-out 결정화를 통하여 분리된다. 용액 결정화 기술의 한 분류인 drowning-out 결정화는 용액 속에 녹아있는 주물질의 용해도를 비용매(non-solvent)를 이용하여 급격하게 감소시키며 높은 과포화도를 유도하는 결정화 방법이다. Drowning-out 결정화를 이용한 GMP의 결정화 과정에서는 비용매 투입 시 초기에는 무정형의 GMP입자들이 발생되며, 시간이 지남에 따라서 핵 생성 및 결정 성장 과정을 통하여 최종적으로 GMP 4수화물 또는 7수화물 형태의 결정으로 phase transformation과정을 통하여 석출된다. 여기에서 GMP 4수화물 또는 7수화물의 GMP polymorph들은 결정화 온도에 의존하여 각기 다른 모폴로지 및 결정성을 가진다. 본 연구에서는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)과 키토산(chitosan) 두 가지의 수용성 고분자의 존재에 의해, 이미 알려진 GMP의 결정화 과정과는 다른 non-classical 결정화 과정을 거쳐 GMP의 메조크리스탈이 형성될 수 있는지의 여부를 확인하고자 하였다. 아울러 결정화의 보다 간편하고 효율적인 탐색체제(high-throughput screening, HTS)를 개발하기 위하여 96-well plate를 이용한 결정화를 시도하였다. 이렇게 얻어진 유기결정의 메조크리스탈은 결정의 형태뿐만 아니라 용해도, 녹는점, 안정성 등의 물리적인 성질이 기존의 결정과 다르게 나타날 수 있다. 따라서, 이러한 시도를 통해 기존의 물질보다 물리적 안정성을 향상시키거나, 용해가 보다 용이해지거나, 혹은 가공성이 보다 좋은 입자형태 등을 발굴해낼 수 있다. 약물에 적용한 경우는 생체이용률(bioavailability)의 개선에 대한 응용가능성을 기대해 볼 수 있다.

실 험

시약. 본 실험에서 사용된 식품 첨가제인 GMP는 98~100% 순도를 가졌으며, 7수화물의 특징을 가진 결정으로 씨제이(CJ Co., Korea)

의 제품을 정제 없이 사용하였다. 고분자 용액 제조 시에 사용된 PEG (polyethylene glycol, $M_w=2000$ g/mol)는 시그마-알드리치(Missouri, USA)에서, 키토산(chitosan, $M_w<3000$ g/mol)은 Kitto Life(Kyeonggi, Korea)에서 구입하였고, HPLC급 물(J. T. Baker)은 정제 없이 사용되었다. Drowning-out 결정화 시 비용매(non-solvent)로 사용된 메탄올(99.8%)은 Samchun Pure Chemical(Kyeonggi, Korea)에서 구입하였다.

고효율검정(high-throughput screening) 기술을 이용한 GMP의 결정화 GMP는 증류수에 용해시킨 2~10 wt% PEG 혹은 키토산 용액에 용해되었다. 고분자 용액에 용해된 GMP의 농도는 12 wt%로 고정시켰다. 고효율검정(high-throughput screening)을 위해 결정화 반응기로서 96-well plate (polypropylene재질, 0.3 mL, Bioneer Co., Korea)를 사용하였다. 96-well을 이용한 결정화 시, 최소한의 물질을 이용하여 신속하게 다양한 결정화 조건을 파악하고 다양한 조건에서 결정형을 얻을 수 있다는 장점이 있다. 96-well plate의 각 well들은 0.3 mL 용량이므로 GMP 용액은 각각 0.1 mL씩 96-well plate에 피펫으로 분주하고, 여기에 비용매인 메탄올을 0.12 mL씩 첨가하여 최종반응액이 0.22 mL가 되도록 하였다. 96-well plate의 세로방향인 8개의 열은 고분자용액의 농도를 2~12 wt%로 달리하였고, 가로방향인 12개의 행은 온도변수를 45~65 °C의 범위로 조절하였다. 다양한 온도 조건에 따른 영향을 확인하기 위해서, 25~45 °C의 온도변수에 따른 결정화도 시도되었다. 혼합용액은 섞이자마자 과포화현상(supersaturation)이 일어나며 침전이 생긴다. 1:1.2의 부피비율로 섞인 GMP와 메탄올의 혼합용액은 Bortex(Scientific Industries, Inc., USA)에 의해 1분 동안 균일하게 섞은 후, 온도구배기(MyGenie 96 Gradient Thermal Block, Bionner Co., Korea)에 넣었다. 온도구배기에 넣은 96-well 샘플들은 12개의 행 방향으로 25~45 °C 혹은 45~65 °C로 온도 gradient가 이루어지도록 하였고, 8시간 동안 결정화되었다.

GMP의 용해도 분석. 고분자 존재 하에서 GMP의 용해도 변화를 관찰하기 위해 자외선/가시광선 분석기(UV-vis. Spectroscopy, V-550, JASCO, Japan)를 사용하였다. GMP의 최대 흡수 파장인 256 nm에서 고분자의 종류와 농도에 따른 흡수량을 비교함으로써 정량화하였다. 96-well plate 샘플에서 석출된 결정을 제외한 투명한 상층액을 0.01 mL 추출해 HPLC급 물로 1000배 희석하였다. 여기에서 샘플은 결정과 용액이 충분한 평형(equilibrium) 상태에 도달할 수 있도록 하루 이상의 시간이 지난 후에 측정되었다.

결정형의 분석. 결정의 크기 및 형상(모폴로지)의 관찰은 광학현미경(optical microscope, BX-51, Olympus, Japan)을 사용하였으며, 교차 편광판을 이용하여 GMP의 결정성 여부를 판단하였다. 결정화 용액을 모두 제거하고 석출된 결정을 메탄올로 씻어낸 후, 실온에서 고압여과를 통해 건조되었다. 건조된 결정은 X-ray Powder Diffractometer(XDS 2000, Scintag, USA)를 이용하여 2 deg/min의 스캔 속도 조건과 2 theta는 10~50 deg의 범위 내에서 결정성을 확인하였고, 고분자 존재 하에서 얻어진 GMP의 새로운 다형체(polymorph)가 얻어지는지의 여부를 확인하였다. 고분자의 영향에 따른 GMP 모폴로지의 변화 및 메조크리스탈의 형성을 확인하기 위해 주사 전자 현미경(scanning electron microscope, S-3400, Hitachi, Japan)을 사용하여 GMP 결정의 표면을 관찰하였다. 샘플은 카본테이프이 붙

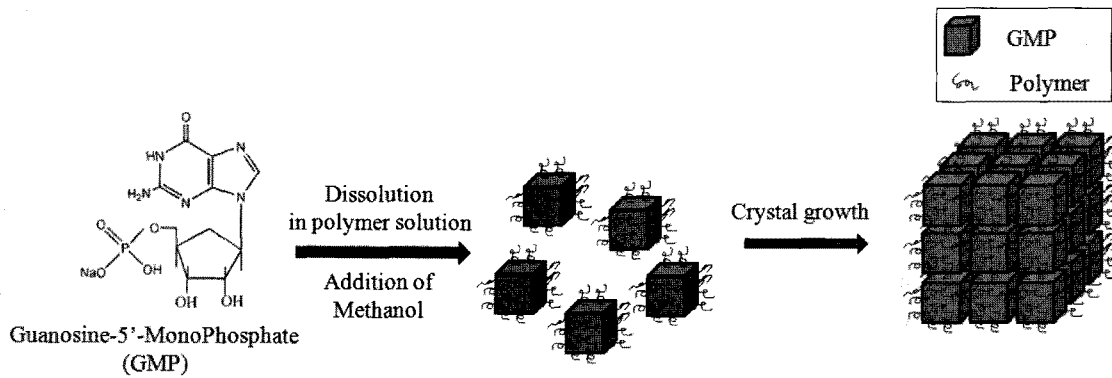


Figure 1. Schematic representation of polymer-directed drowning-out crystallization.

은 유리판 위에 결정을 뿌린 후, carbon coater (Hitachi, Japan)에 의해 백금-카본을 6.7 nm/min 속도로 120 초간 코팅하였고, 7~25 kV 조건하에서 조사되었다. 수화물형태로 존재하는 GMP가 고분자 존재 하에서 결정 구조 안에 함유되는 물의 함량이 달라지는 수화물의 변화가 일어나는지 여부를 열중량분석기(Pyris 6, Pekin Elmer, USA)를 이용하여 승온속도 10 °C/min, 시료부게 7~10 mg으로 N₂ 분위기와 air 분위기 하에서 측정하였다.

결과 및 토론

GMP의 고분자 유도 결정화. Drowning-out 결정화는 용액 속에 녹아있는 주물질의 용해도를 비용매를 이용하여 급격하게 감소시키며 높은 과포화를 유도하여, 핵 생성과 결정 성장 과정을 거쳐 결정 물질을 얻어낸다. 이러한 일반적인 결정화 메커니즘을 따르지 않고, 전형적이지 않은(non-classical) 결정화 과정으로 진행되는 GMP의 고분자 유도 결정화 실험에 대한 메커니즘을 Figure 1에 나타내었다. GMP는 고분자 용액 내에서 수용성 고분자와의 상호작용을 통해서 결정표면의 안정성을 증가시킨다. 이 용액에 비용매인 메탄올이 투입되면서 용해도를 급격히 감소시키며 높은 과포화도를 유발해 침전(precipitation)이 일어나며, GMP표면에 수용성 고분자가 흡착된 형태의 핵(nuclei)들이 형성된다. 이후 시간이 지남에 따라서 수용성 고분자가 선택적으로 흡착된 나노입자 GMP들의 응집 형태로 결정 성장이 이루어진다. 이와 같은 현상은 고분자가 흡착된 결정입자들 간의 낮은 안정성이 입자들 간의 응집을 유도하게 되는 것으로 해석된다. 나노입자의 응집과정을 자기형성(self-organization) 과정으로 설명할 수 있으며, 이러한 나노입자의 자기형성과정을 거쳐 만들어지는 새로운 물질인 메조크리스탈이 얻어지게 된다.³

Polymer-directed 결정화에 의해 얻어진 GMP의 메조크리스탈은 기존에 알려진 GMP 수화물 형태와 다른 결정성을 기대할 수 있다. 기존의 안정적인 GMP는 4수화물 혹은 7수화물의 2가지 polymorph를 가진다. 여기에서 GMP 4수화물 또는 7수화물의 형태는 결정화 온도에 주로 의존하며, 각기 다른 crystal habit과 결정성을 가진다. Figure 2는 각기 다른 온도에서 결정화된 GMP의 4수화물과 7수화물의 광학현미경과 XRD 결과를 보여주고 있다. 결정화 온도가 25~45 °C의 조건에서는 GMP 7수화물, 65 °C이상의 온도에서는 GMP 4수화물이 얻어지며, 그 중간 온도 범위에서는 GMP 7수화물과 4수

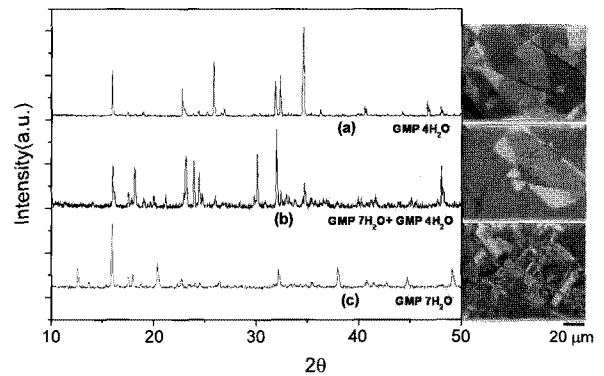


Figure 2. X-ray diffraction (XRD) and optical microscopy (OM) results of the two crystalline hydrates of GMP. GMP hydrates crystallized (a) at 65 °C; (b) 50 °C; (c) 45 °C. Crystallization temperature influenced the kind of crystal hydrates.

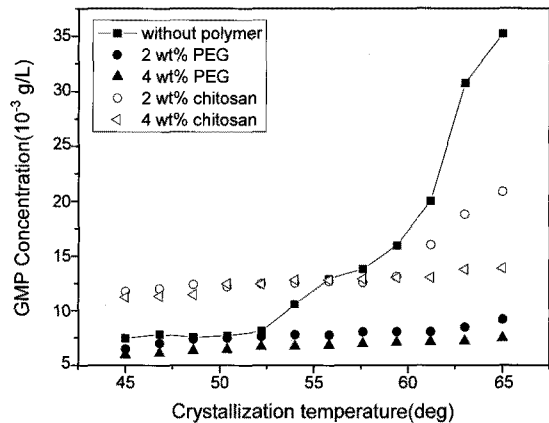


Figure 3. Effect of polymer addition on GMP solubility as a function of temperature.

화물의 형태가 공존하는 것으로 확인되었다. 이와 같은 결과를 바탕으로 고분자의 영향을 받은 GMP 결정형이 알려진 polymorph와 다른 새로운 결정성을 갖는지 비교할 수 있다.

GMP의 용해도 고분자의 존재 하에서 GMP 용해도의 변화는 Figure 3에 나타내었다. 고분자가 존재하지 않는 GMP 단독의 경우는 온도가 증가하면서 용해도가 급격히 증가함을 확인할 수 있지만, 고분자

가 존재하는 GMP의 경우에서 결정화 온도조건은 용해도에 크게 영향을 미치는 요인은 아님을 알 수 있다. 또한, 고분자가 존재하지 않는 GMP와 비교하여 고분자가 존재하는 경우 GMP는 대체적으로 용해도가 감소함을 확인하였고, 고분자의 농도가 증가할수록 GMP의 용해도는 감소하였다. 이는 고분자가 결정표면에 흡착하여 표면 에너지를 안정화시켜 줄 수 있음을 암시한다. 하지만 키토산의 경우는 조금 다른 양상을 보이는데, 55 °C 이하의 온도에서는 키토산이 첨가될수록 GMP의 용해도가 다소 증가함을 확인할 수 있다. 또한, 55 °C 이하 온도의 경우 고분자가 존재하지 않는 경우와 비교해도 GMP용해도는 증가하였음을 확인할 수 있다. 이는 키토산의 경우 수용액 상에서 GMP와 전하-전하 상호작용(charge-charge interaction)으로 인해 안정화되고, GMP의 핵 생성과 생성되는 핵의 수에도 영향을 미치게 되면서, 결정화되지 않고 용액 내에 잔류하는 GMP가 많아지기 때문인 것으로 사료된다. 이 현상은 키토산의 경우 GMP의 메조크리스탈의 형성에 있어 결정화 온도가 중요한 변수로 작용할 수 있음을 제시해준다.

Polymer-directed crystallized GMP결정의 모폴로지. Figure 4는 석출된 결정의 광학현미경 분석 결과이다. (a)는 대조 표준으로써 고분자가 존재하지 않은 상태에서 결정화된 GMP의 결정형태이다. (b)와 (c)의 결과를 보면, 고분자의 농도가 증가할수록 GMP 결정의 크기도 증가함을 확인할 수 있다. 이는 GMP표면에 흡착되는 고분자 양의 증가가 최종 GMP결정의 크기에도 영향을 미칠 수 있는 것으로 사료된다.¹⁹ 이러한 현상에 대해, 고농도의 고분자가 결정 성장을 억제하여 비교적 작은 결정 크기를 가지게 된다는 연구 결과들이 있다.²⁰⁻²² 하지만, 나노입자의 응집과정을 거치며 자기 형성 과정으로 이어지는

메조크리스탈 시스템에서는 그 결정 성장 과정이 다르다.

균일한(homogeneous) 용액으로부터 결정이 얻어질 때 1) 핵의 생성, 2) 핵의 성장의 연속적인 두 단계의 과정을 거치게 된다. 이러한 결정 성장의 과정에서 결정들은 용액 안에 존재하는 결정 물질과 고분자 사이의 평형상태에 도달할 때까지 성장하게 된다. 그러므로, 용액 안에 존재하는 고분자의 종류나 농도 등의 변수는 최종 결정 물질의 크기에 영향을 미치는 중요한 변수가 된다. 전형적인 결정화 이론에서 단위 부피당 결정의 핵생성 속도(J_N)를 보여주는 식이 있다.^{23,24}

$$J_N = A \exp\left(\frac{-\Delta G}{\kappa T}\right), \quad \Delta G = \frac{16\pi V_m^2 \gamma^3}{3|\Delta\mu|^2}$$

ΔG 는 균일한 핵 생성에서의 활성화 에너지(activation energy)를 의미하며, γ 는 표면 장력(surface tension), V_m 은 고체의 몰부피, $\Delta\mu$ 은 화학적 포텐셜의 차이, A 는 pre-exponential인자, κ 는 Boltzmann 상수, T 는 절대온도를 나타낸다. 이 식에서 나타내고 있는 것처럼 고분자가 첨가되면 고분자에 의한 결정표면의 안정화로 인해 $\Delta\mu$ 값은 작아지면서 핵 생성의 속도가 감소하고, 생성되는 핵의 수가 감소함을 유추할 수 있다. 초기 핵 생성 단계에서는 고분자가 표면에 흡착되며 느리게 핵 생성을 이루지만 결정 성장과정에서 결정에 흡착된 고분자들 간의 응집과정을 이루면서 비교적 큰 결정으로 성장할 수 있다. 또한, 고분자의 종류와 농도가 결정의 크기뿐만 아니라 결정 형태에도 영향을 주고 있음을 알 수 있다. PEG의 경우 PEG의 농도가 증가할수록 사다리꼴의 결정 형상에서 삼각형의 형태로 변화함을 확인할 수 있다. 하지만 광학현미경 결과만으로는 고분자의 영향에 의

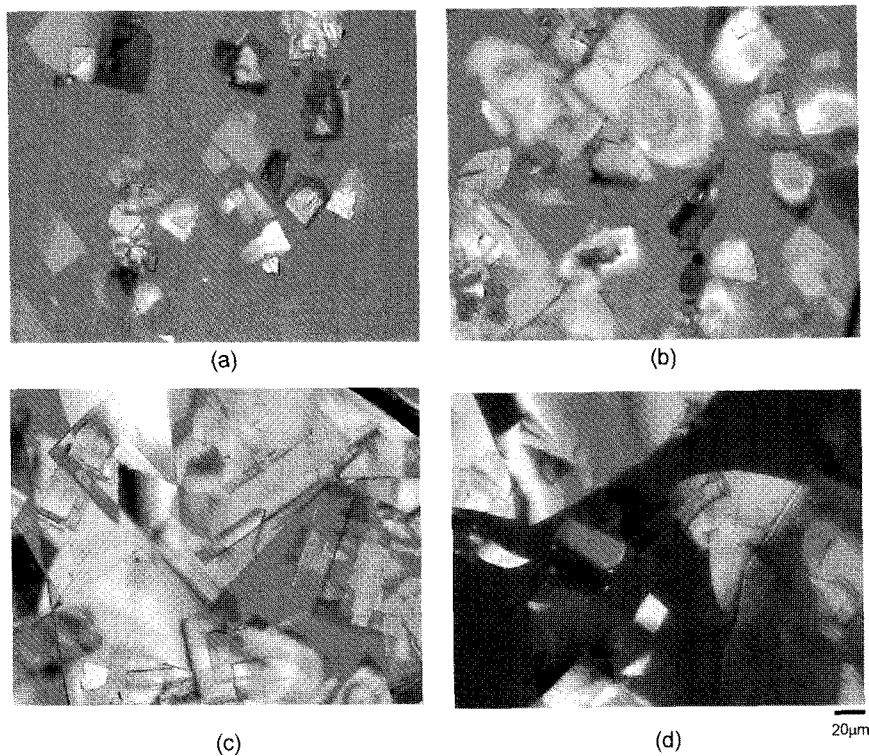


Figure 4. OM images of GMP crystals obtained by drowning-out crystallization at 45 °C: (a) without polymer; (b) in 4 wt% poly(ethylene glycol) solution; (c) 10 wt% PEG solution; (d) 4 wt% chitosan solution.

한 결정성의 변화를 관찰함에 무리가 있다.

여기에서 추가적으로 설명되어야 하는 결과는 GMP의 표면 모폴로지이다. Figure 5는 고분자가 흡착된 GMP의 표면을 보여주고 있는 scanning electron microscopy (SEM) 결과들이다. 여기에서도 마찬가지로 고분자가 존재하지 않은 상태에서 45 °C의 온도 조건에서 결정화된 GMP의 입자 모폴로지(Figure 5(a))와 결정 표면(Figure 5(b))은 대조 표준으로 보여주고 있다. 다른 실험 조건은 동일하고 2 wt% PEG 수용액 내에서 결정화된 GMP의 입자 모폴로지(Figure 5(c))를 대조 표준과 비교해보면, 결정의 크기가 증가했

으며, 전형적인 GMP 7수화물의 모폴로지를 형성하지 않음을 알 수 있다. 확대하여 그 결정의 표면(Figure 5(d))을 살펴보면 초기입자의 응집의 형태인 GMP결정을 확인할 수 있다.

온도에 따른 영향을 확인하기 위하여 25 °C 조건에서 결정화한 GMP와 비교하였다. 고분자가 존재하지 않는 경우에는 25 °C와 45 °C 조건 모두 GMP 7수화물이 발견되는 온도조건이지만, 고분자가 존재하는 경우에는 결정화 온도가 메조크리스탈의 형성에 영향을 미칠 수 있음을 확인하였다. Figure 5(e), (f)는 25 °C에서 2 wt% 고분자 수용액 안에서 결정화한 GMP의 입자와 표면 모폴로지를 나타낸 것이다.

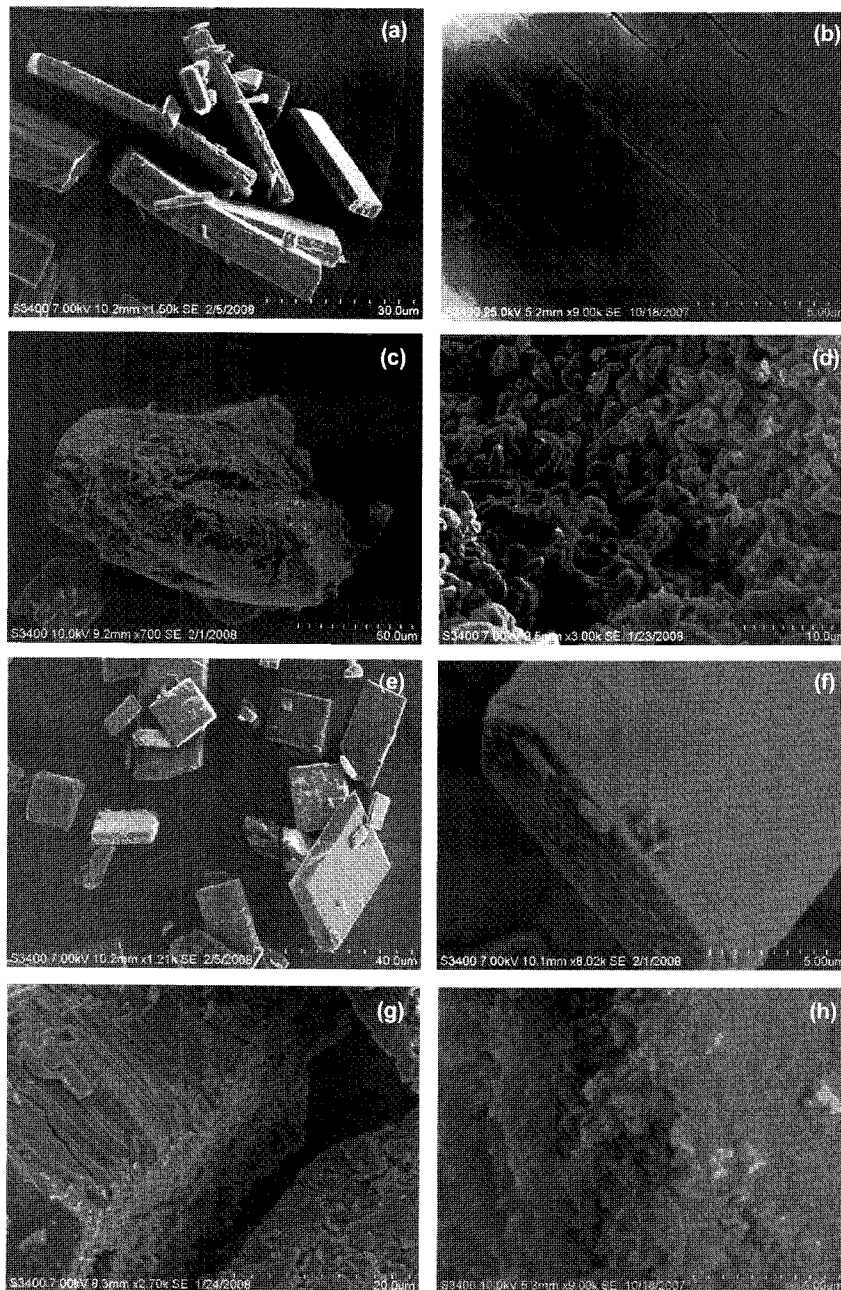


Figure 5. SEM images of GMP crystals formed by drowning-out crystallization: (a) Crystals obtained without a polymer at 45 °C; (b) crystal surface of (a); (c) crystals obtained in 2 wt% PEG solution at 45 °C; (d) crystal surface of (c); (e) crystals obtained in 2 wt% PEG solution at 25 °C; (f) crystal surface of (e); (g) in 4 wt% PEG solution at 45 °C; (h) in 2 wt% chitosan solution 45 °C.

여기에서 GMP의 특정 결정면이 사각형의 결정형태에서 육각형의 결정형태로 모폴로지가 변화하였음을 파악할 수 있다. 변화된 모폴로지에 의해서 고분자유도 GMP 결정화가 진행되었음을 파악할 수 있고, 그에 따라 모폴로지의 변화가 이루어졌음을 알 수 있다. 특정 면이 육각형의 결정형태로 변화한 GMP 입자표면의 모폴로지(Figure 5(f))를 보면 1 μm 이하의 GMP의 초기입자를 확인할 수 있고, 그 초기입자들의 응집형태로 GMP의 성장이 진행되었음을 추측할 수 있다. 온도가 증가할수록 수용액 내에서 분자들의 운동이 활발해지므로 고분자가 GMP의 핵 생성 및 결정 성장에 엔트로피 측면에서 더 많은 영향을 주었음을 추측할 수 있다.

PEG의 농도에 따라서도 GMP의 모폴로지가 변화하였고, 4 wt% PEG가 존재하는 GMP의 경우에 1 μm 이하의 초기입자를 확인할 수 있다(Figure 5(g)). 키토산의 경우(Figure 5(h))도 마찬가지로 1 μm 이하의 초기입자를 확인할 수 있고 그 입자들의 응집과정을 거쳐 GMP의 결정 성장이 이루어졌음을 추측할 수 있다. 키토산의 경우는 수용액 내에서 GMP와 반대 charge를 가지므로 PEG의 경우보다 더 강한 상호작용에 의하여 비교적 작은 사이즈의 초기입자를 형성하였다고 사료된다. 따라서, 여기에서 보여지는 기초입자의 크기와 모양은 핵 생성 단계에서 고분자의 종류와 농도의 영향을 받았을 것으로 추측된다. 특정 결정면과 고분자 사이의 계면 장력(interface tension)은 고분자유도 결정화의 중요 변수로 작용할 수 있으며, 이 계면장력은 결정의 성장 속도(growth rate)에 영향을 미치며, 최종적으로 결정의 모폴로지를 결정할 수 있는 요인이다.

Polymer-directed crystallized GMP 결정의 결정성 파악. Figure 6은 고분자유도 결정화를 통해 얻어진 GMP의 결정성을 확인할 수 있는 X-ray diffraction(XRD) 결과이다. 고분자가 존재하지 않는 상태에서 결정화된 GMP의 결정성(Figure 6(a))은 대조 표준으로 보여주고 있다. 이들은 45 °C의 온도조건에서 얻어지는 GMP 7수화물의 전형적인 XRD 피크들이다. 같은 온도 조건에서 고분자 용액 내에서 결정화된 GMP의 경우는 XRD 주요 피크들의 위치와 그 intensity가 달라짐을 확인할 수 있다. 이는 수용성 고분자에 의해 GMP의 결정 성장이 영향을 받아 GMP의 다른 결정 구조로 성장하였음을 말해

준다. Figure 6(b)에서 보여지는 2 wt% PEG의 경우 피크의 폭이 좁으며 높은 intensity를 가지는 scattering 피크들을 관찰할 수 있다. 이 결과를 통해 PEG의 존재 여부에 따라 GMP의 결정 구조가 달라졌음을 확인할 수 있고, 높은 피크 intensity로 미루어 PEG가 존재하는 GMP결정 구조에서 무정형의 도메인은 거의 존재하지 않음을 추측할 수 있다. PEG 4 wt%의 경우(Figure 6(c))는 PEG 2 wt%와 비교하여 피크의 위치는 변하지 않으며, 피크의 intensity가 감소함을 확인할 수 있다. 이 현상은 키토산의 경우도 동일하게 나타났으며, 특히 키토산 4 wt%의 경우(Figure 6(e))에는 결정 피크의 broadening을 확인할 수 있다. 이는 무정형인 고분자의 함량 증가에 따른 결정 물질의 상대적 함량 감소에 따른 결과로 해석될 수도 있고, 또는 고분자 함량증가에 따른 메조크리스탈 크기 감소에 따른 결과일 수도 있다.

Polymer-directed crystallized GMP결정 수화물의 종류. GMP는 최종적으로 수화물의 형태로 존재하는 결정성의 물질이므로, 새로운 결정성이 파악된 GMP의 polymorph에 함유된 물의 무게를 분석하여 수화물의 종류를 결정할 수 있다. Figure 7은 열중량분석(TGA)의 분석결과이다. 고분자가 존재하지 않는 상태에서의 GMP 결정과 고분자의 종류와 농도에 의해 영향을 받아 얻어진 GMP 수화물 거동의 변화를 관찰할 수 있다. 고분자가 존재하지 않는 GMP 7수화물과 비교하여 고분자의 종류에 따라 온도에 의해 무게가 변화하는 양상에도 차이를 보이며, 결정이 함유하는 물의 함량에도 차이가 있음을 알 수 있다. 계산상으로 PEG 수용액 내에서 결정화된 GMP의 경우에는 PEG의 농도에 따라서 약간의 물의 함량차이는 있었지만 모두 5수화물의 구조임이 확인되었고, 키토산의 존재 하에 결정화한 경우 9수화물 GMP로 계산되었다. 이는 고분자의 영향에 의해 GMP의 결정구조가 달라지며, 그 결정 구조 안에 함유되는 물의 함량도 달라졌음을 의미한다. 하지만, 여기에서 결정 내에 존재하는 수용성 고분자의 함량과 고분자 내에 물의 함량도 포함하고 있음을 고려해야 하므로, GMP의 절대적인 수화물 구조 분석은 아닐 수 있다.

마지막으로 본 연구에서 조사하지 못한 다양한 변수들이 메조크리스탈의 형성에 영향을 미칠 수 있음을 언급하고자 한다. 결정화 조건, 즉 온도, 용매, 농도, 시간 등의 변수들은 각각 결정 성장에 영향을 주는 인자들로 메조크리스탈의 형성에도 큰 영향을 줄 수 있다. 특히 고분자

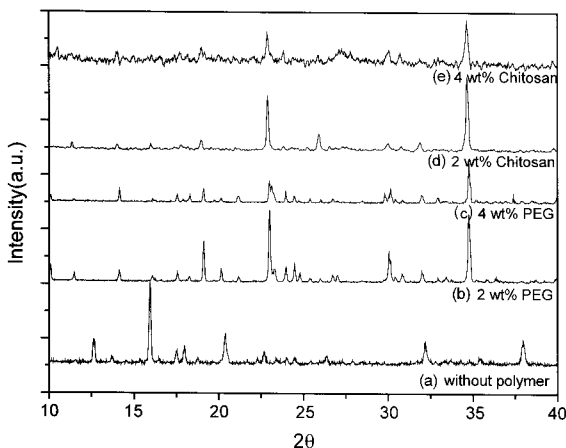


Figure 6. X-ray analysis of GMP crystals formed by drowning-out crystallization at 45 °C: (a) without a polymer; (b) in 2 wt% PEG solution; (c) 4 wt% PEG solution; (d) 2 wt% chitosan solution; (e) 4 wt% chitosan solution.

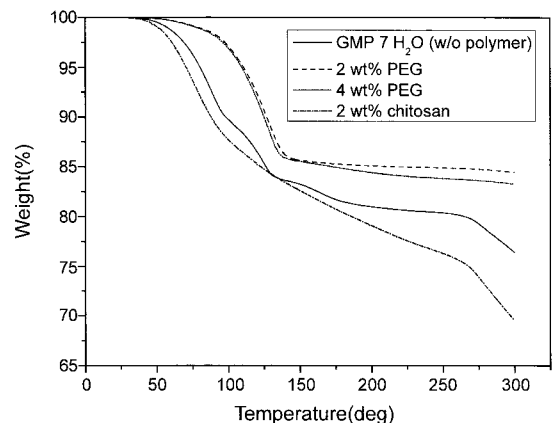


Figure 7. TGA analysis of GMP crystals formed by drowning-out crystallization at 45 °C.

의 분자량은 결정성장 중 표면 흡착에 큰 영향을 미치는 변수로서 본 연구에서 분자량 변화에 따른 연구를 수행하지는 않았으나 Tirrell 등의 연구에 따르면 상대적으로 저분자량의 고분자가 효과적인 것으로 보고되어 있다.²⁵ 이러한 연구결과와 널리 사용된다는 점 등을 들어 분자량 2000과 3000 g/mol 의 고분자들을 본 연구에서 사용하였다.

결 론

수용성 고분자에 의해 전형적인 GMP의 결정화 과정과 다른 non-classical 결정화 과정을 거쳐 나노미터의 결정들이 스스로 배열되어 외형적으로 결정성을 갖고 있는 GMP의 메조크리스탈이 형성될 수 있음을 확인하였다. 수용성 고분자인 PEG와 키토산이 존재하는 수용액 내에서 결정화된 GMP는 전형적인 GMP와는 다른 모폴로지를 형성하였고, 고분자 용액 안에서 결정화된 GMP 결정표면에 고분자가 선택적으로 흡착하며, 고분자가 흡착된 초기 결정들의 응집형태로 결정이 성장하게 됨을 확인하였다. PEG의 경우 GMP의 초기입자를 확인할 수 있었고, 농도나 결정화 온도의 영향은 초기입자의 크기와 모양에 영향을 미치게 됨을 확인할 수 있었다. 키토산의 경우는 PEG의 경우와 비교하였을 때, 보다 작은 초기입자가 형성됨을 확인하였고, 그 입자들의 응집 형태로 성장된 GMP 결정을 확인할 수 있었다. 위와 같은 GMP 메조크리스탈들의 결정성 및 수화물 구조 분석을 통하여 수용성 고분자의 영향으로 인해 GMP의 새로운 polymorph가 형성될 수 있음을 확인하였다. 이러한 새로운 polymorph는 그 열역학적 성질 등이 상이하여 물질의 새로운 응용분야의 창출에 이용될 수 있다.

감사의 글: 본 연구는 에너지관리공단 에너지·자원 기술 개발사업 (Grant number: 2006-E-ID-11-P-30-3-020-2007)의 지원을 통해 수행되었으며, 이에 감사드립니다. 또한, 이민경은 한국학술진흥재단 2단계 두뇌한국(BK) 21사업 및 지식경제부와 한국산업기술재단의 전략기술인력양성사업의 지원에도 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. N. Jongen, P. Bowen, J. Lemaître, J. C. Valmaltette, and H. Hofmann, *J. Colloid Interf. Sci.*, **226**, 189 (2000).
2. A. Taden, K. Landfester, and M. Antonietti, *Langmuir*, **20**, 957 (2004).
3. H. Cölfen and M. Antonietti, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **44**, 5576 (2005).

4. H. Cölfen and S. Mann, *Angew. Chem.*, **115**, 2452 (2003).
5. M. Antonietti, M. Breulmann, C. G. Göltner, H. Cölfen, K. K. W. Wong, D. Walsh, and S. Mann, *Chem. Eur. J.*, **4**, 12 (1998).
6. L. Zhou, D. Smyth-Boyle, and P. O'Brien, *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 1309 (2008).
7. A.-W. Xu, M. Antonietti, H. Cölfen, and Y.-P. Fang, *Adv. Funct. Mater.*, **16**, 903 (2006).
8. J. Zhan, H.-P. Lin, and C.-Y. Mou, *Adv. Mater.*, **15**, 7 (2003).
9. B. Judat and M. Kind, *J. Colloid Interf. Sci.*, **269**, 341 (2004).
10. E. V. Shevchenko, D. V. Talapin, A. L. Rogach, A. Kornowski, M. Haase, and H. Weller, *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 11480 (2002).
11. D. Schwahn, Y. Ma, and H. Cölfen, *J. Phys. Chem. C*, **111**, 8 (2007).
12. S. Wohlrab, H. Cölfen, and M. Antonietti, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **44**, 4087 (2005).
13. S. Wohlrab, N. Pinna, M. Antonietti, and H. Cölfen, *Chem. Eur. J.*, **11**, 2903 (2005).
14. A. Kulkarni and C. Zukoski, *J. Cryst. Growth*, **232**, 156 (2001).
15. A. L. Grzesiak and A. J. Matzger, *J. Pharm. Sci.*, **96**, 11 (2007).
16. C. P. Price, A. L. Grzesiak, and A. J. Matzger, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 5512 (2005).
17. A. L. Grzesiak, F. J. Uribe, N. W. Ockwig, O. M. Yaghi, and A. J. Matzger, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **45**, 2553 (2006).
18. I. D. Morrison and S. Ross, *Colloidal Dispersion: Suspension, Emulsion, Foams*, Wiley-Interscience, New York, 2002.
19. T. Uemura, Y. Hoshino, S. Kitagawa, K. Yoshida, and S. Isoda, *Chem. Mater.*, **18**, 4 (2006).
20. P. C. Ohara, D. V. Leff, J. R. Heath, and W. M. Gelbart, *J. Phys. Chem.*, **99**, 7036 (1995).
21. T. Uemura and S. Kitagawa, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 7814 (2003).
22. T. Uemura, M. Ohba, and S. Kitagawa, *Inorg. Chem.*, **43**, 7339 (2004).
23. J. W. Mullin, *Crystallization*, Butterworths-Heinemann, Oxford, Vol 121, p 175 (1993).
24. J. T. Carstensen, *Advanced Pharmaceutical Solids*, Marcel Dekker, New York, p 100 (2001).
25. L. A. Gower and D. A. Tirrell, *Journal of Crystal Growth*, **191**, 153 (1998).