

Dextran Microsphere의 제조 및 특성에 관한 연구

조정모 · 강춘형[†]

진남대학교 화학공학과, 고분자기술연구소
(2002년 2월 14일 접수, 2002년 3월 29일 채택)

A Study on Preparation and Properties of Dextran Microsphere

Joung-Mo Cho and Choon-Hyoung Kang[†]

Department of Chemical Engineering, Polymer Science and Technology Research Center,
Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea
(Received 14 February 2002; accepted 29 March 2002)

요 약

Methacryloyl(MA) 그룹이 유도된 dextran(dex-MA)을 이용한 microsphere는 코팅, 인쇄, 의약 산업 등에 널리 활용되고 있다. 본 연구에서는 Dex-MA, polyethylene glycol(PEG) 등의 고분자와 물로 구성된 수용액의 고분자 액-액 상분리 현상을 이용하여 dextran(Dex) microsphere를 제조하였으며 이들의 제조에 미치는 영향과 특성에 대해 알아보았다. Dex-MA는 transesterification반응을 통해 제조되었으며, ¹H NMR, ¹³C NMR, FT-IR, GPC 등을 이용하여 그 반응특성을 관찰하였다. MA 그룹의 치환된 양(degree of substitution; DS)은 ¹H NMR의 피크 강도로부터 계산하였으며, 질량수지에 의한 계산값과 비교하였다. ATPS를 이용한 에멀전법을 사용하여 microsphere를 제조하였으며, 이를 위해 필요한 25 °C의 Dex-MA/PEG/물 계의 액-액 상평형 도표는 실험을 통하여 결정하였다. 본 연구에서는 에멀전 법을 이용하여 직경이 7.7-38 μm인 microsphere를 재현성있게 제조할 수 있었다. 계산된 DS가 microsphere의 제조와 특성에 미치는 영향을 조사하였으며, 팽윤 특성은 질량법과 Blue-Dex 용액법을 사용하여 측정하였다.

Abstract – Dextran-based microspheres have become growingly attractive in the fields of surface coating, printing, pharmaceutical and other industrial applications. In an effort to prepare the dextran-based microspheres, methacryloyl(MA) groups were introduced into dextran(Dex-MA) molecules as a crosslinking functional group via the transesterification reaction. The resulting Dex-MA was characterized by use of ¹H NMR, ¹³C NMR, FT-IR, and GPC. Degree of substitution(DS) of the MA groups in the glucopyranose ring of a dextran molecule was calculated from peak intensities of ¹H NMR spectrum and compared well with the calculated value. The aqueous two-phase polymer system(ATPS) emulsion, which consists of Dex-MA, PEG, and water, was used for preparation of the microspheres. To this purpose, the phase diagrams of several Dex-MA/PEG/water systems at 25 °C were constructed. Microparticles with a volume mean diameter from 7.7 to 38 μm could be prepared in a reproducible way. The DS could be used to tailor the size, the initial water content, and the swelling property of the resulting microspheres. In addition, the swelling properties of the microspheres were measured by means of the blue-Dex solution method and the gravimetric method.

Key words: Dextran Hydrogels, Dextran Microspheres, Blue-Dex Solution Method, Methacryloyl, ATPS

1. 서 론

물에 녹지 않고 3차원적 network를 유지하는 어떤 물질이 과량의 물과 접촉하면 매우 빠르게 팽윤하며, 팽윤된 구조 내에 다량의 물을 함유할 수 있다. 이러한 수용성 겔 가교구조를 hydrogel이라 한다[1]. Hydrogel은 일반적으로 친수성 고분자의 가교를 통해 제조할 수 있으며, 자연고분자나 합성고분자가 그것의 재료가 될 수 있다. Hydrogel의 물성은 원

료 고분자의 분자량 분포, 친수도, 그리고 가교밀도 등에 따라 변할 수 있으며[3], 외부환경에 대한 민감성, 조절 가능한 투과도, 그리고 생물학적 친화성의 이유로 의료, 약학, 생화학 및 그 외 많은 산업분야에 있어서 널리 사용되고 있다. 따라서 이와 관련하여 용질의 회수[4], 막분리[5], GPC의 고정상[6], 약물 방출 시스템[7, 8] 등에 대한 많은 연구가 진행되고 있다.

Dextran(Dex)은 α-1,6 linked D-glucopyranose로 구성된 다당류 형태의 수용성 고분자로서, glucopyranose 고리 내부에 많은 OH 그룹이 존재하여 극성이며 친수성인 화학물질과의 구조적 친화성을 가지고 있다. Dex는 주로 미생물에 의한 합성을 통해 얻어지며 친수성, 무독성, 생화

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

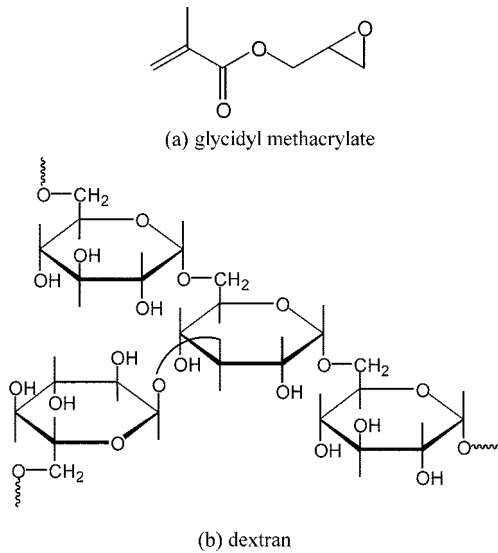


Fig. 1. General structure of reactants.

학적 친화성을 이유로 의약품이나 식품산업 등에 널리 활용되고 있다. 특히, 분자량이 작은 분획은 혈장 대용품의 대명사로 할 정도로 인체와 잘 조화를 이루는 고분자이다. Dex는 hydrogel 및 microsphere의 제조에 적합한 고분자로서 잘 알려져 있으며, 이들의 제조에 있어서 Dex의 가교는 acryloyl 그룹 등으로 유도하여 사용하는 것이 일반적이다. 특히, Dex와 유도된 Dex는 인체의 간, 장내의 점액, 결장, 비장, 신장 등에 존재하는 dextranase에 의해 분해될 수 있어서 경구 투여를 통한 약물전달시스템(DDS)에 자주 응용된다.

Dex-MA의 합성에 자주 사용되는 반응 중 하나가 methacryloyl chloride를 사용하는 것이다. 그러나 DS의 조절이 어렵고, 반응의 결과로써 부생성물이 생긴다는 단점이 있다. 본 연구에서는 이러한 단점을 극복하기 위해 DS의 조절이 용이한 van Dijk-Wolthuis 등에 의한 방법 [9, 10]을 채택하였다. 이 방법에서는 촉매로써 4-(N,N-Dimethylamino)pyridine(DMAP)를 사용하여 glycidyl methacrylate(GMA)의 methacryloyl (MA) 그룹이 transesterification 반응을 통해 Dex에 유도될 수 있으며, 이는 Dex의 glucopyranose 고리 내에 OH 그룹과 MA 그룹의 직접적인 치환으로부터 이루어진다. 이 반응에 있어서의 시작 물질을 Fig. 1에 나타내었다.

서로 용화되지 않는 두 종류의 고분자들이 일정 농도 이상으로 물에 가해졌을 때, 두 액상이 형성된다[11]. 이러한 두상 고분자 용액(ATPS)은 세포나 단백질과 같이 생물학적으로 활성이 요구되는 물질의 분리나 정제에 널리 사용되고 있다. 특히, Dex/PEG/물 계는 ATPS로 사용되는 대표적인 예이다 [11, 12]. PEG는 합성고분자로서 좁은 분자량 분포를 갖는 선형 고분자이며, Dex와 일정농도 이상으로 물과 혼합되었을 때 ATPS를 형성한다.

Microsphere는 물과 같은 용매에 의해 팽윤되는 가교된 작은 입자를 말하며, 이것의 제조에 가장 널리 사용되는 방법 중 하나가 ATPS 에멀전을 이용한 방법이다. ATPS용액을 강렬하게 교반하였을 때 에멀전이 생성되며, 여기에 자유 라디칼 개시제를 첨가하여 가교를 시켰을 때 microsphere가 생성된다. 이러한 방법은 크기의 조절, 좁은 크기 분포, 빠른 시간 내 입자 핵화, 용질의 봉입(encapsulation)에 대한 적용의 용이성 등과 같은 장점을 가지고 있다. Microsphere의 제조과정에 대한 개략도를 Fig. 2에 나타내었다. ATPS 에멀전을 이용하여 microsphere를 제조하기 위해서는 상평형 도표에 대한 정보가 필수적이며 이는 상분리 실험을 통해 결정될 수 있다.

본 연구에서는 Dex microsphere를 제조하고, 이것의 제조에 미치는

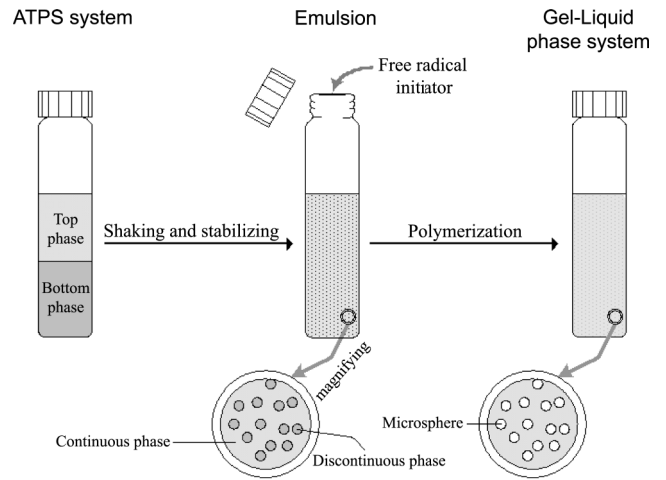


Fig. 2. Schematic drawing for the preparation of microsphere.

영향과 특성을 알아보았다. 먼저, Dex를 가교하기 위해 MA 그룹의 직접적인 치환을 유도하는 transesterification 반응을 통해 Dex-MA를 제조하였다. ¹H NMR, ¹³C NMR, FT-IR, 그리고 GPC를 통해 MA 그룹의 치환을 확인하였으며, DS가 다른 Dex-MA를 사용하여 water-in-water 에멀전을 형성하고, 이로부터 Dex-MA의 가교를 통해 microsphere를 얻었다. 한편, 질량법과 blue-Dex 용액법을 사용하여 hydrogel의 팽윤 특성을 측정하였다.

2. 실험

2-1. 시약 및 재료

Dimethyl sulfoxide(DMSO), potassium peroxydisulfate(KPS)는 Kanto Chemical사, N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine(TEMED), GMA는 Junsei Chemical사, DMAP는 Avocado Research Chemicals로부터 각각 구입하였으며, 더 이상의 정제과정이나 변형없이 사용하였다. 물은 Milli-Q RG system을 사용하여 전도도가 18 MΩ 이상으로 유지되는 2차 증류수를 사용하였다. 고분자로서 PEG 8,000(Lot# 86H1342), Dex 509,500(Lot# 29H1087)는 SIGMA Chemical사로부터 공급 받아 사용하였고, 수평균 및 질량평균 분자량은 GPC를 사용하여 결정하였으며, 이를 Table 1에 나타내었다. 고분자의 분자량을 보정하기 위해 PEG standard kit(WAT035711, Waters사)와 dextran standard samples(Fluka)를 사용하였다.

2-2. Dex-MA의 합성

Dex-MA의 표준 제조과정은 van Dijk-Wolthuis 등의 방법[9, 10]을 따랐다. 반응장치에 대한 개략도를 Fig. 3에 나타내었다. 무게를 측정한 Dex(5 g)와 DMSO(45 g)를 100 ml 삼각플라스크에 넣은 후 질소분위기 하에서 자석 교반기를 사용하여 강렬하게 교반하였다. Dex가 완전하게 녹은 후 DMAP(1 g)을 첨가하여 계속하여 교반하였다. 반응은 계산된

Table 1. Average molecular weights and polydispersity of polymers determined by GPC.

	Average molecular weights		Polydispersity index(PI)
Dex 509500	\overline{M}_w	453190	1.84
	\overline{M}_n	246964	
PEG 8000	\overline{M}_w	9272	1.10
	\overline{M}_n	8422	

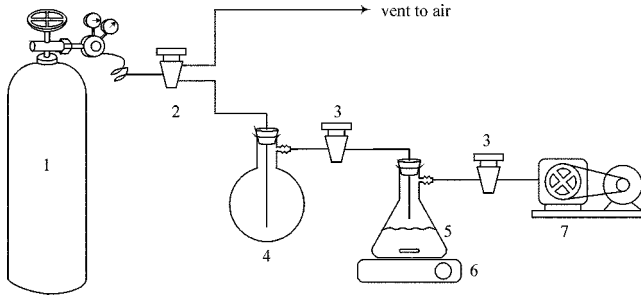


Fig. 3. Schematic drawing for the preparation of Dex-MA.

- 1. N₂ gas cylinder
- 2. 3-way valve
- 3. Stop valve
- 4. Buffer
- 5. Reactor
- 6. Magnetic stirrer
- 7. Vacuum pump

양의 GMA를 첨가하여 시작하였으며, DS의 조절을 위해 첨가한 GMA의 양은 다음의 식으로 계산하였다.

$$(\text{GMA wt.}) = \frac{(\text{wt. of a repeating unit in dex})}{(\text{f.w. of GMA})} \times (\text{added dex wt.}) \times \frac{\text{DS}}{100} \quad (1)$$

GMA를 첨가한 후 4시간 동안 실내 온도 하에서 강렬하게 교반하였으며, 공기의 노출을 막기 위해 반응하는 동안 질소분위기를 유지하였다. 반응의 정지는 당량의 산(HCl)을 첨가함으로써 이루어졌다. 생성된 반응물을 투석튜브에 옮긴 후 10일 동안 연속적인 추출이 이루어지는 과량의 물을 사용하여 반응물에 존재하는 불순물을 제거하였다. 투석튜브 내에 남은 잔류 용액은 동결건조기(Uni Trap Model 10-100)를 사용하여 건조되었으며, 결과물로서 몇 그램의 Dex-MA를 얻을 수 있었다.

2-3. Dex-MA의 분석

GMA, Dex, 그리고 Dex-MA 각각을 ²H₂O에 녹인 후 amx-r-300 NMR spectrometer를 사용하여 이들에 대한 ¹H NMR spectrum을 얻을 수 있었으며, Dex-MA에 대한 spectrum으로부터 DS를 정량적으로 계산할 수 있었다. 4.8 ppm에서 ²HOH는 기준선으로 사용하였으며, 30 mg의 시료를 0.8 ml ²H₂O에 녹인 후 사용하였다. Dex-MA에 대한 DS는 각각의 성분에 대한 피크의 강도로부터 계산되었다. 탄소를 기조로 한 Dex-MA의 구조적인 특징을 조사하기 위해 ¹H-NMR에서 사용된 system을 ¹³C-NMR에 대해 반복하여 측정하였다. 3-(Trimethylsilyl)-1-propane-sulfonic acid, sodium salt(DSS)는 상대적인 화학이동을 보정하는 기준선으로 사용하였다. MA 그룹의 치환을 확인할 수 있는 또다른 방법으로써 FT-IR spectrum 실험이 행해졌다. 건조된 시료(Dex나 Dex-MA)를 KBr과 반죽하여 pellets으로 만든 후, Nicolet 520 FT-IR spectrophotometer를 이용하여 4,000 cm⁻¹-450 cm⁻¹의 범위에서 32회 scan을 통해 시료 각각에 대한 spectrum을 얻을 수 있었다. 고분자의 분자량 분포는 GPC(Young-In Scientific사; M930 solvent delivery pump, Water 410 RI detector)를 통해 결정하였다. 각각의 시료 20 µl를 microsyringe로 취한 후 GPC 컬럼에 도입하여 각각의 성분에 대한 피크를 얻을 수 있었으며, 피크의 분리도를 개선하기 위해 2개 또는 3개의 컬럼을 직렬로 연결하여 사용하였다. 컬럼의 조합은 TSK-GEL G6000PW_{XL}×1, TSK-GEL G3000PW_{XL}×1(또는 TSK-GEL G6000PW_{XL}×1, TSK-GEL G3000PW_{XL}×2)와 같다. 이동상으로써, 3차 증류수에 의해 제조된 10 mM NaCl을 0.7 ml/min의 유속으로 사용하였으며, 컬럼 내 온도는 60 °C로 일정하게 유지하였다.

2-4. Hydrogel의 제조 및 팽윤실험

Dex hydrogel을 제조하는데 있어서 10wt%의 농도를 갖는 Dex-MA 용액을 사용하였다. Dex-MA를 물에 완전하게 녹인 후, 3 ml의 일정 용액으로 겔의 크기를 규격화하기 위해 유리튜브(1 cm 직경)에 넣어 가교를 행하였다. TEMED(60 µl, 20 vol.%, adjusted to pH 7 with 4 M HCl)와 KPS(120 µl, 50 mg/ml)를 첨가한 후, 튜브를 밀봉하여 10초간 강렬하게 교반하여 즉시 37 °C로 유지되는 항온조 속에 옮겨졌다. 여기서 개시제와 가속제로 각각 KPS와 TEMED를 사용하였다. 수 분 내에 반투명성 겔이 침전되는 것을 관찰할 수 있었으며, 반응시간은 특정온도와 TEMED에 의해 개선할 수 있었으며 30분 이내에 모든 겔화가 완결되었다. 생성된 hydrogel을 흐르는 물로 세척하여 동결 건조한 후, FT-IR spectrum을 측정하였다.

앞에서 제조한 겔(1 cm 직경)을 대략 1 cm 길이로 자른 후, 과량의 물에 의해 평형상태로 팽윤된 것과 건조 시킨 것을 각각 팽윤실험에 사용하였다. 먼저 충분한 시간동안 물과 접촉하여 평형상태로 팽윤된 hydrogel의 표면에 존재하는 과잉의 물을 blotting에 의해 닦아낸 후 무게를 측정하여 기록하였다(w₁). 이를 60 °C로 유지되는 건조기 내에서 24시간 방치한 후 무게를 재고 다시 24시간 방치 후 겔 무게와 변화가 없으면 완전히 건조된 것으로 간주하였다(w₂). 팽윤비는 hydrogel의 팽윤된 무게와 건조된 무게의 비로부터 결정하였다(w₁/w₂). 한편, Blue-Dex 용액법에서는 농도의 변화에 따른 blue-Dex의 푸른 색조의 변화를 UV로 측정하여 팽윤비를 간접적으로 얻을 수 있는 방법이다. Blue-Dex의 수용액은 612 nm에서 최대흡수파장(λ_{max})을 갖기 때문에 612 nm 근처의 투과도에 대한 평균값을 이용하여 농도를 보정하였다. Blue-Dex에 대한 농도 보정곡선을 Fig. 4에 나타내었으며, Beer의 법칙과 좋은 일치성을 보이고 있음을 알 수 있다. 시간에 따른 팽윤비를 조사하기 위해 연속 팽윤 실험을 행하였다. 개략적인 실험 장치도를 Fig. 5에 나타내었다. 초기에 농도를 알고 있는 blue-Dex용액을 일정한 온도로 유지되는 이중유리병(A)에 채운 뒤, 건조된 hydrogel을 용액 속에 조심스럽게 담근 후 시간에 따른 blue-Dex용액의 색조변화를 UV(Bausch & Lomb Spectronic 21)(C)로 관찰하였다. 이때 UV의 파장은 612 nm로 고정하여 사용하였다. B로 나타난 유량펌프(Dosca HPLH 200s)는 이중유리병과 UV내에 있는 flow cell(Hellma사 176.000-QS) 사이에 1/16 inch PTFE 관을 통해 blue-Dex용액을 순환시키는데 사용하였으며, 이때 유속은 1.0 ml/sec로 일정하게 유지하였다.

2-5. 삼평형 실험

각각의 고분자(PEG, Dex, Dex-MA)는 stock solution을 제조하여 사

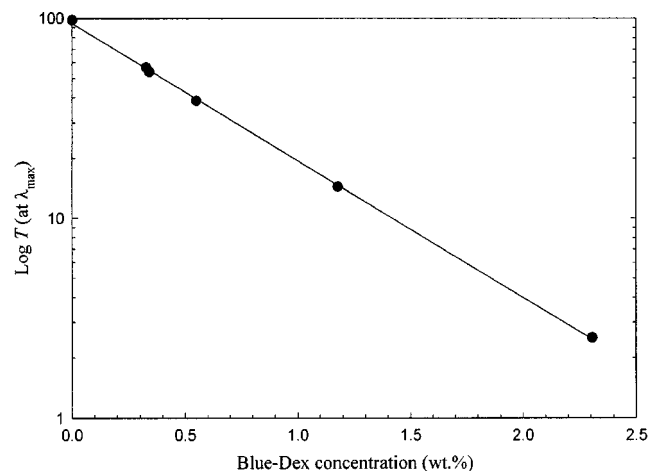


Fig. 4. Calibration curve for blue-Dex solution at wavelength of maximum absorbance(λ_{max}=612 nm).

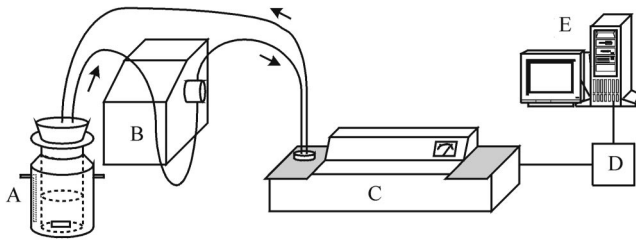


Fig. 5. Apparatus for continuous swelling test.

- A: Water-jacketed bottle
- B: Pump(to circulate blue-dex solution between A and C)
- C: UV spectrophotometer
- D: Data acquisition board
- E: Personal computer

용하였으며, 이때 용매로는 초순수 제조기를 사용하여 18 M Ω 이상으로 유지되는 물을 사용하였다. 제조된 stock solution을 이용하여 상분리 영역 내의 고분자 조성을 갖는 혼합물을 제조하여 vial병에 담아 격렬하게 교반한 후 25 $^{\circ}$ C로 유지되는 항온조 속에 5일 이상 방치하여 두 상으로 분리하였다. 분리된 각 상의 시료를 syringe를 이용하여 매우 조심스럽게 채취하였다. 채취된 시료를 정량적으로 희석한 후 평형조성을 결정하기 위해 microsyringe를 이용하여 20 μ l를 GPC에 주입하였다.

2-6. Microspheres

Dex-MA와 PEG로 구성된 두 상 영역 내 ATPS 용액(5 ml, 0.22 M potassium chloride and 10 mM phosphate buffer, pH 8.0)을 제조한 후 10분 가량 질소를 불어 넣어 용존되어 있는 산소를 제거하였다. 이를 2분 가량 격렬하게 교반하여 에멀전화 되도록 하여 1-10분 동안 안정화시켰다. 그런 다음, Dex-MA를 가교하기 위해 TEMED(100 μ l, 20 vol.%, adjusted to pH 7 with 4 M HCl)와 KPS(200 μ l, 50 mg/ml)를 가한 용액을 37 $^{\circ}$ C로 유지되는 항온조에 30분간 방치하였다. 생성된 가교된 입자는 원심분리와 세척액(증류수) 교환의 반복과정을 통해 불순물을 제거하였으며, 냉동건조를 통해 흰색 분말의 microsphere를 얻을 수 있었다.

완전하게 동결건조된 microsphere를 탄소 스티커에 뿌리고 금으로 코팅한 후, 2차 전자 이미지를 SEM(JEOL, JSM-5400)으로 관찰하였다. 한편, microsphere의 입자 크기 분포는 45 mm-(또는 100 mm-, 300 mm-)의 focal length를 갖는 렌즈가 부착된 입도분석기(PSA; Malvern)를 사용하여 측정하였다. 배경용매로는 2차 증류된 물을 사용하였고, 분석이 일어나는 동안 초음파를 주사하여 입자들 간의 고착을 방지하였다.

3. 결과 및 고찰

3-1. Dex-MA의 합성

본 연구에서 Dex-MA는 van Dijk-Wolthuis 등[9, 10]에 의해 소개된 바와 같이 MA 그룹의 직접적인 치환을 유도하는 transesterification 반응을 통해 제조하였다. 이 방법에서는 Dex와 GMA가 극성 용매인 DMSO내에서 반응이 진행되었으며 DMAP는 염기성 촉매로써 Dex의 OH 그룹을 극성화한 후 MA 그룹의 직접적 치환을 유도하게 된다. Glucopyranose 고리 내에 존재하는 OH 그룹 중 반응도에 있어서는 C-2, C-3 위치에 존재하는 OH가 C-4 위치의 OH보다 높다. 그러나 C-2 위치의 입체장에는 C-3 위치로의 치환을 유도한다. 반응식은 Fig. 6에 나타내었다. 앞의 저자에 의해 언급된 바와 같이[10], 반응의 다른 생성물으로써 glycidol(GDOL)이 생성된다. 이러한 GDOL의 생성은 반응의 결과로써 glycidyl methacrylate derivatized dextran(Dex-GMA)가 생성되지 않음을 설명해 준다.

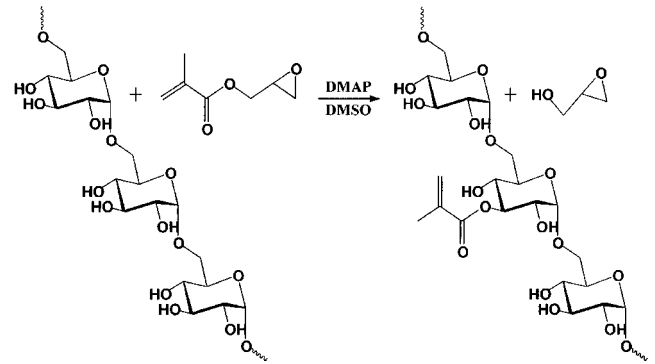


Fig. 6. Reaction of Dex with glycidyl methacrylate.

3-2. Dex-MA의 분석

Glucopyranose 고리 내의 MA 그룹의 확인을 위해, NMR 분석을 행하였다. Fig. 7(a)는 초기의 Dex에 대한 1 H NMR spectrum이다. δ 4.96-4.97 ppm의 신호는 C-1 위치의 anomeric proton을 의미하며, δ 3.47-3.99 ppm의 범위를 갖는 glucopyranose 고리의 수소와 잘 구분되어짐을 알 수 있다. δ 5.30 ppm 근처의 작은 피크는 α -1,3 결합에 대한 작은 부분을 나타내며, 이는 Dex가 비전형 고분자임을 암시하고 있다. δ 5.30 ppm에 대한 δ 4.96, 4.97 ppm에서의 피크의 면적비로부터 α -1,3 결합에 대한 분율($f_{\alpha-1,3}$)은 계산될 수 있다. 본 연구에서 사용된 Dex는 11.26%의 α -1,3 결합을 갖고 있음을 알 수 있었다.

Fig. 7(b)는 Dex-MA spectrum을 나타낸 것이다. Dex의 spectrum과 비교하여 δ 1.94와 δ 5.75, 6.21 ppm에서 추가적인 피크가 발견됨을 알 수 있다. δ 1.94 ppm은 methyl 그룹을, δ 5.75, 6.21 ppm은 MA 그룹의 이중 결합을 각각 나타낸다. 이중결합에서의 피크 면적의 평균값과 δ 5.30 ppm(α -1,3 결합)을 포함한 δ 4.96, 4.97 ppm(anomeric proton)에 대한 피크 면적을 비교하여 Dex-MA의 DS를 구할 수 있었다. 이는 다음 식과 같이 나타낼 수 있다.

$$DS = \frac{(I_d + I_d')/2}{I_a + f_{\alpha-1,3}I_a} \times 100 \quad (2)$$

물결수치를 기초로 한 이론적 DS [식 (1)]와 NMR에 의한 계산된 DS [식 (2)]를 Table 2에 나타내었다. 반응 전 첨가한 GMA는 NMR분석을 통해 계산된 DS값과 잘 비례하고 있음을 알 수 있었다.

한편, 탄소를 기초로 한 Dex-MA의 구조적 형태를 조사하기 위해 Dex와 Dex-MA에 대한 13 C NMR spectrum를 비교 분석하였다. 각각의 spectrum들을 Fig. 8에 나타내었다. Dex의 esterification은 ester에 부착된 탄소 공명으로부터 +0.9-1.9 ppm의 낮은 자기장으로의 이동(downfield shift)을 또 그것의 이웃한 탄소로부터 -1.8-3.3 ppm의 높은 자기장으로의 이동(upfield shift)을 일으키는 것으로 알려져 있다[10]. Fig. 8로부터 glucopyranose 고리 내의 탄소를 의미하는 δ 68-101 ppm의 피크들은 문헌과 잘 일치하는 결과를 보였다. Fig. 8(b)의 Dex-MA에 대한 spectrum은 Dex의 경우와 비교하여 부가적인 피크들이 나타나며, 크게 두 부분으로 나눌 수 있다. 즉, δ 171.9-171.1, 138.3-138.0, 130.7-130.0, 20.2 ppm은 MA 그룹에, δ 97.8, 78.7, 75.8, 73.7, 72.4, 70.2 ppm은 glucopyranose 고리에 각각 해당된다. Dex-MA의 MA 그룹에 대한 신호를 Table 3에 설명하였다. 두개의 이성질체(carbonyl 그룹에 대한 이중결합)가 130.0-130.7(I), 138.0-138.3(II) ppm에서 각각 발견됨을 알 수 있었으며, 그 비율이 비슷함을 알 수 있었다. 고리 탄소에 대한 해석에 있어서, 화학 이동에 대한 두 가지 가정(2-, 3-과 2-, 4-치환 이성질체)을 할 수 있으며, 이를 Table 4에 열거하였다. 앞에서 설명했듯이(3-1절 참조), 반응도의 관점에서 C-3의 OH 그룹이 C-4보다 높다는 것을 유추할 수 있다. 더

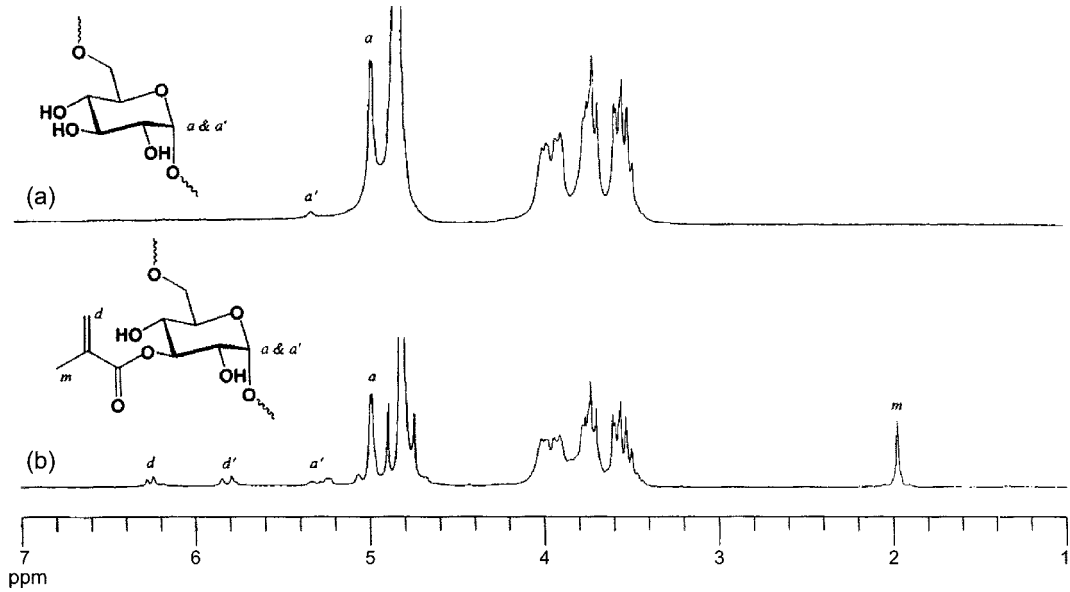


Fig. 7. ¹H-NMR spectra of Dex and Dex-MA(DS 20).

Table 2. The degree of substitution according to (a) calculation(Eq. 1) and (b) determination from NMR analysis(Eq. 2).

Dex-MA	Degree of substitution	
DS 10	Calculated ^(a)	10.501
	NMR analysis ^(b)	9.660
DS 20	Calculated	19.669
	NMR analysis	18.173

Table 3. Assignments for MA group in Dex-MA ¹³C-NMR spectrum; (a) and (b) are the isomers of Dex-MA.

Signal(ppm)	Functional group
20.2	Methyl group
130.0, 130.7	Double bond to carbonyl group I ^(a)
138.0, 138.3	Double bond to carbonyl group II ^(b)
171.1, 171.9	Carbonyl group

옥이 Table 4로부터 2-, 4-치환 이성질체의 가정이 2-, 3-치환 이성질체의 경우보다 문헌으로부터의 더 큰 편차를 보이고 있음을 알 수 있다. 또한, 피크의 강도로부터 2-와 3-치환 이성질체들이 같은 비율로써 존재함을 알 수 있다.

Fig. 9는 Dex와 Dex-MA(DS 20)에 대한 FT-IR spectrum을 각각 나타낸 것이다. Dex-MA에 대한 spectrum에서 추가적인 두개의 분명한 흡수띠를 발견할 수 있다. 1,715 cm⁻¹의 강하고 날카로운 흡수띠는 MA 그룹의 carbonyl 그룹을 나타내고, 지문영역 내 존재하는 814 cm⁻¹의 약

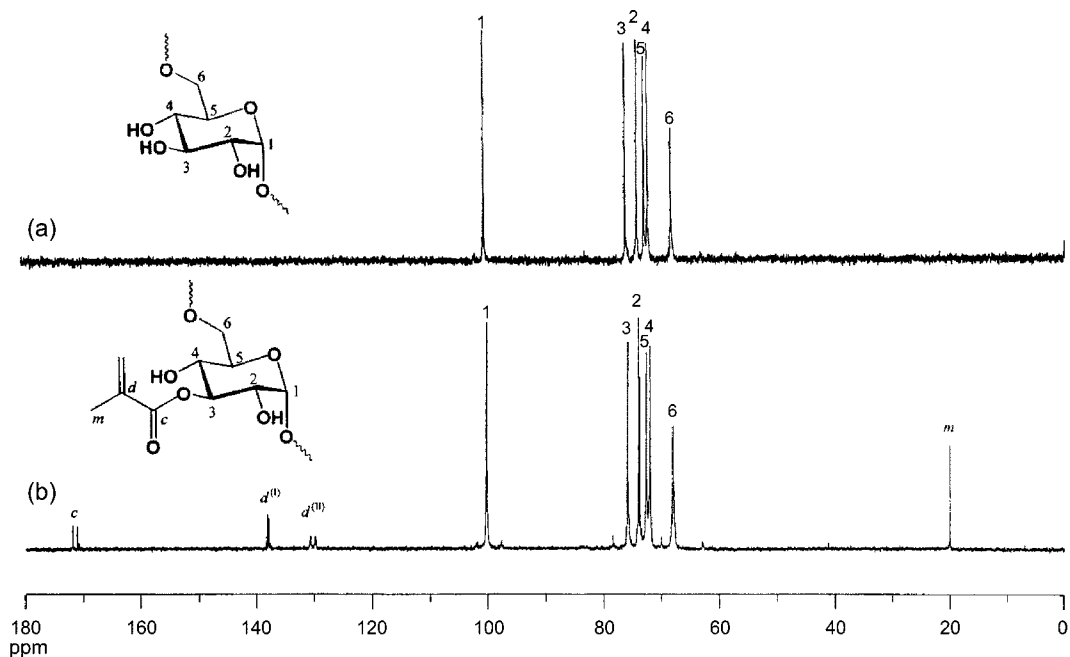


Fig. 8. ¹³C-NMR spectra of Dex and Dex-MA(DS 20).

Table 4. Assignments for glucopyranose ring carbons in Dex-MA ¹³C-NMR spectrum; (a) 2-3-substituted and (b) 2-4-substituted Dex-MA

Obs'd signal (ppm)	Position ^(a)	2-3-substituted		Position ^(b)	2-4-substituted	
		ref.[10]	Shift value		ref.[10]	Shift value
97.8	C _{1-S2}	100.4	-2.6	C _{1-S2}	100.4	-2.6
75.8	C _{2-S2}	74.1	1.7	C _{4-S4}	72.2	3.6
72.4	C _{2-S3}	74.1	-1.7	C _{3-S2}	76.1	-3.7
78.7	C _{3-S3}	76.1	2.6	C _{2-S2}	74.1	4.6
73.7	C _{3-S2}	76.1	-2.4	C _{3-S4}	76.1	-2.4
70.2	C _{4-S3}	72.2	-2.0	C _{5-S4}	72.9	-2.7

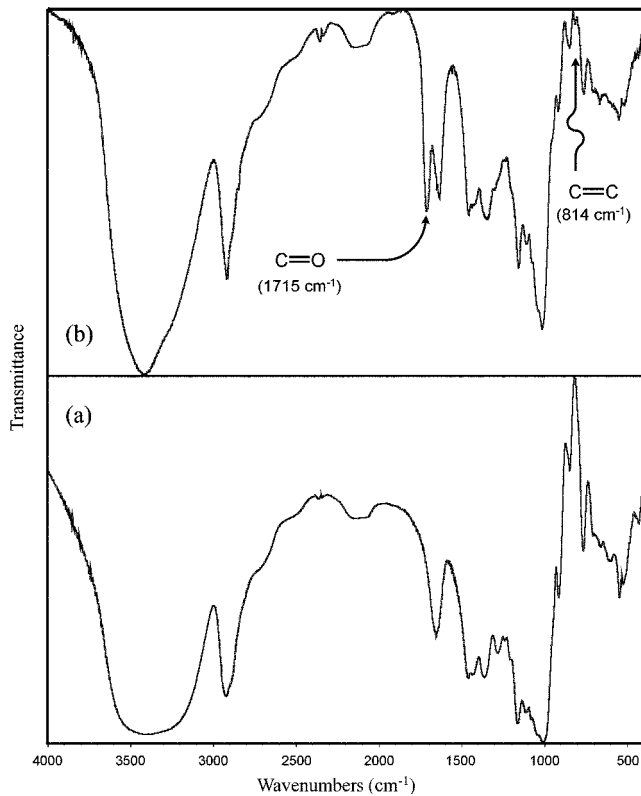


Fig. 9. FT-IR spectra of (a) Dex and (b) Dex-MA.

한 흡수는 이중결합을 나타낸다.

한편 Dex와 Dex-MA의 분자량 분포에 있어서의 차이를 알아보기 위해 GPC 분석을 시행하였다. Fig. 10은 Dex와 Dex-MA(DS 20)에 대한 chromatogram을 나타낸 것이다. Glucopyranose 고리에 대한 치환된 MA 그룹의 상대적인 질량을 고려하면, Dex-MA는 Dex의 경우와 매우 유사한 분자량 분포를 갖을 것을 예측할 수 있으며, Fig. 10은 이러한 결과를 잘 설명해 주고 있다. 여기서 Dex-MA에 대한 용리시간이 약한 감소를 보이는 것은 MA 그룹의 치환에 따른 작은 분자량 증가에 기인하는 영향임을 유추할 수 있다.

3-3. Dex-MA/PEG/물 계의 상평형 도표

Dex(또는 Dex-MA)/PEG/물의 상평형 도표를 결정하기 위해 각각의 계에 대해 상분리 영역 내에 있는 4개의 시료를 조제하였으며, 각각의 상에 대한 고분자의 조성은 GPC에 의해 결정할 수 있었다. 분석에 앞서 농도에 대한 보정이 이루어졌으며, 보정곡선(고분자의 농도에 대한 머무름 부피의 의존성)을 결정하여 그 선형성을 확인하였다.

25 °C에서 Dex(또는 Dex-MA)/PEG/물 계에 대한 상평형 도표를 Fig. 11에 나타내었다. 또 각각의 feed 조성과 대응되는 대응선 데이터를

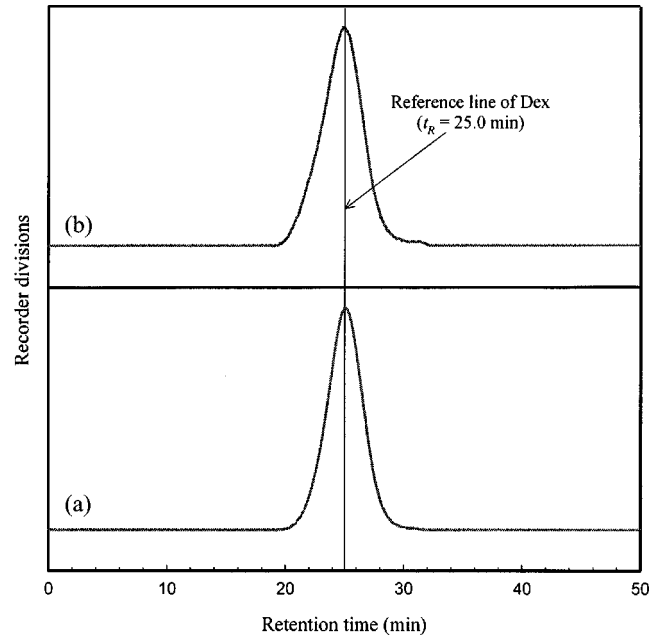


Fig. 10. GPC chromatograms of (a) Dex (b) Dex-MA(DS 20).

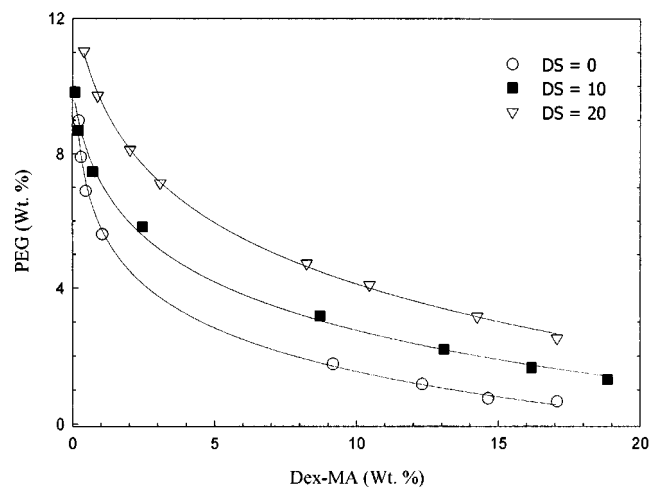


Fig. 11. Phase diagrams for Dex-MA/PEG8000/H₂O systems at 25 °C.

Table 5에 제시하였다. 일반적으로 잘 알려져 있듯이[11-12], 각각의 고분자는 예외 없이 해당하는 각 상에 높은 농도로 농축됨을 알 수 있었다. 즉, PEG의 대부분은 위상에 Dex(또는 Dex-MA)의 대부분은 아래 상으로 농축되었다. 구성 고분자의 분자량이 증가하면 농축된 정도가 증가하여 binodal curve의 저농도 영역으로 이동하는 일반적인 개념과 상반되게 Dex-MA의 DS가 증가함에 따라 binodal curve가 고농도 영역으로 이동하는 것은 주목할만한 결과이다. Fig. 12는 고정된 feed의 조

Table 5. Tie-line data of Dex-MA/PEG/water systems at 25°C

Feed(wt%)		Top phase(wt%)		Bottom phase(wt%)	
Dex-MA	PEG	Dex-MA	PEG	Dex-MA	PEG
Dex509500/PEG8000/water system					
5.00	4.00	1.04	5.61	9.18	1.77
5.99	4.51	0.47	6.90	12.32	1.18
6.99	4.99	0.30	7.91	14.65	0.76
8.00	5.49	0.22	8.99	17.07	0.67
Dex-MA(DS 10)/PEG8000/water system					
5.94	4.55	2.46	5.83	8.72	3.18
6.97	5.00	0.71	7.47	13.09	2.19
7.96	5.50	0.21	8.70	16.17	1.66
8.96	6.00	0.09	9.83	18.86	1.31
Dex-MA(DS 20)/PEG8000/water system					
6.84	5.62	3.09	7.13	8.25	4.73
7.83	5.49	2.03	8.13	10.46	4.10
8.79	5.99	0.89	9.73	14.26	3.16
9.77	6.50	0.40	11.04	17.07	2.52

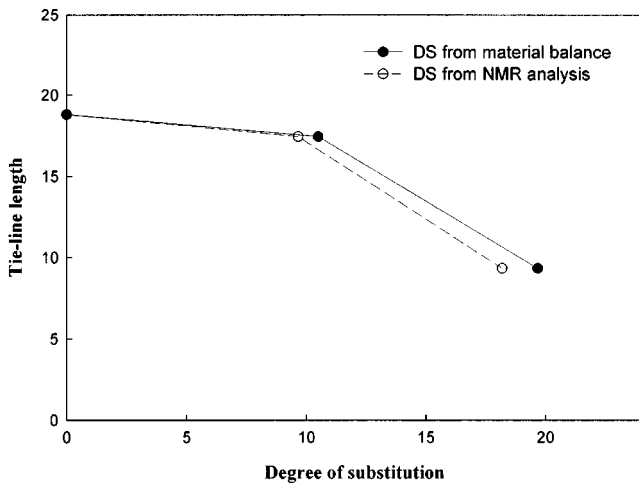


Fig. 12. Tie-line length as a function of DS for a fixed feed composition. (Dex-MA: 8.0 wt%, PEG: 5.5 wt%).

성에 대해 DS에 따른 대응선 길이(tie-line length; TLL)의 변화를 나타낸 것이다. TLL의 물리적 의미는 각 평형상이 임계점으로부터 떨어진 거리를 나타낸다. TLL은 아래식과 같이 표현할 수 있다.

$$TLL = \sqrt{[(Wt.\%)_{bottom}^{dex-MA} - (Wt.\%)_{top}^{dex-MA}]^2 + [(Wt.\%)_{top}^{PEG} - (Wt.\%)_{bottom}^{PEG}]^2} \quad (3)$$

Fig. 12에서 DS가 증가하면 TLL이 감소하고, 이는 OH 그룹이 MA 그룹으로 치환됨에 따라 상분리 영역이 축소됨을 의미한다.

3-4. Dex hydrogel의 제조와 팽윤평형

Dex hydrogel은 Dex-MA의 가교를 통해 얻을 수 있었다. MA 그룹에 있는 이중결합은 자유 라디칼 반응을 통한 Dex의 가교에 사용되었다. KPS와 TEMED를 Dex-MA용액에 첨가하여, KPS의 sulfate 자유 라디칼을 통해 가교 반응을 진행하였다. Fig. 13은 MA 그룹의 이중결합과 관련하여 814 cm⁻¹ 영역 근처에서의 spectrum을 나타낸 것이다. 초기 Dex에 MA 그룹의 부착으로부터 명백한 814 cm⁻¹의 흡수띠를 나타내고(a), 가교에 의한 이중결합의 제거에 따라 다시 소멸됨(b)을 알 수 있다.

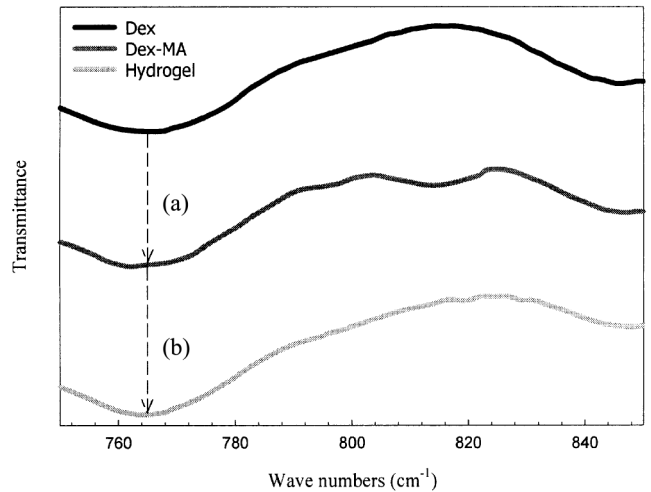


Fig. 13. Changes of transmittance(814 cm⁻¹) in FT-IR spectra due to the (a) attachment of MA group and (b) crosslinking of Dex-MA.

Dex hydrogel의 중요한 특성 중 하나는 팽윤 성질이다. 본 연구에서는 팽윤비를 결정하기 위해 두가지 방법을 사용하였다. 즉, 질량법에서는 팽윤된 겔이 일정온도에서 건조되는 반면, blue-Dex 용액법에서는 건조된 겔을 첨가하여 팽윤하는 방법이다. 질량법은 hydrogel의 질량을 직접적으로 측정하는 방법이지만 조잡한 blotting에 있어서 많은 오차를 가져온다는 점과 재현성이 떨어진다는 단점이 있다. 대조적으로 blue-Dex 용액법은 간접적 방법으로써, blue-Dex 내의 푸른 색조를 UV로 측정하여 팽윤비를 결정하는 방법이다. Blue-Dex는 근본적으로 Dex로부터 제조되었기 때문에 hydrogel로 흡수되지 않고 이와 상호작용이 존재하지 않음을 문헌과 실험을 통해 알 수 있었다. 건조된 hydrogel이 blue-Dex용액과 접촉하게 되면, 물의 흡수가 일어나고 이는 blue-Dex용액의 농도 증가를 초래한다. 이러한 원리를 이용하여 팽윤비를 결정할 수 있었다. Fig. 14는 연속실험을 행하여 서로 다른 DS로부터 제조된 hydrogel의 팽윤비를 속도론적으로 도식한 것이다. Hydrogel이 물과 접촉하였을 때 40분 이내의 빠른 팽윤이 일어나고 있음을 알 수 있었다. 또한 팽윤된 hydrogel은 건조된 hydrogel의 10-20배에 달하는 많은 양의 물을 함유하고 있음을 알 수 있었으며, DS가 큰 hydrogel이 더 큰 값의 팽윤비로 팽윤함을 알 수 있었다. 평형 팽윤비를 질량법으로부터 측정된 팽윤비와 함께 비교하여 Table 6에 나타내었다.

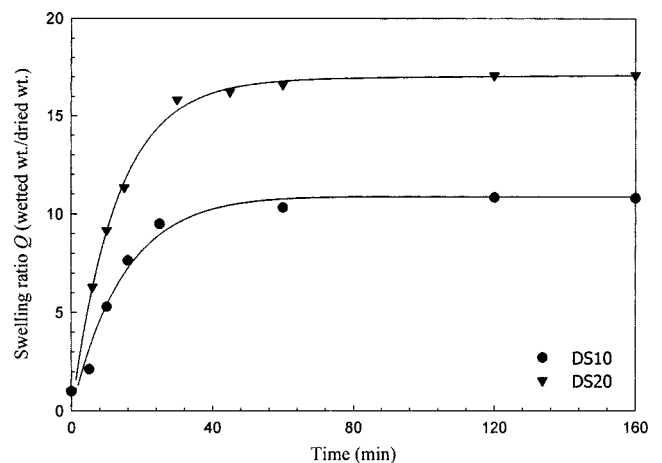


Fig. 14. Swelling ratio of hydrogels as a function of time at 25 °C.

Table 6. Swelling equilibria of hydrogels in water: (a) from gravimetric method and (b) from blue-Dex solution method

	Swelling ratio(wetted wt./dried wt.)		Relative error %
	(a)	(b)	
DS 10	12.15	10.80	12.50
DS 20	17.22	17.10	0.70

3-5. Microspheres

본 연구에서는 APTS 에멀전으로부터 그 용액 내에 존재하는 Dex-MA의 가교를 통해 microsphere을 제조하였다. Dex-MA의 농도가 microsphere의 제조에 미치는 영향에 대해 알아보기 위해 동일 대응선상에 존재하지만 feed의 조성이 다른 APTS 에멀전을 사용하여 microsphere를 제조하였다. 가교반응 후 APTS내의 emulsifier로 사용된 PEG는 다중 세척을 통해 배제하여 dextran microsphere를 제조할 수 있었다.

Fig. 15는 microsphere에 대한 전형적인 SEM 사진을 나타낸 것이다. 두 사진 모두에서 확인할 수 있듯이 완벽한 구모양을 갖고 있으며, 크기가 어느 정도 균일한 microsphere가 제조되었음을 알 수 있었다. 또한 Dex-MA의 DS나 크기에 상관없이 microsphere의 표면을 비다공성임을 확인할 수 있었다.

제조된 microsphere의 체적평균직경과 입자 크기 분포는 PSA분석을 통해 이루어졌으며, 이를 Fig. 16과 17에 나타내었다. Dex-MA의 feed 농도가 증가함에 따라 보다 큰 microsphere가 얻어졌으며, 정규분포의 경향에서 벗어나 넓은 입자 분포를 나타냄을 알 수 있었다. TLL의 값과 Dex-MA 농도가 일정한 경우에도 DS의 값이 증가하면 크기가 작은 입자가 생성되었다. 본 연구에서는 대략 7.7-38 μm 크기의 입자를 얻을 수 있었다.

Dex-MA의 농도가 2.0 wt% 이상으로 높아졌을 때는 APTS의 점도가 크게 증가하고, 이는 불안정한 에멀전의 형성을 초래하였다. 이러한 용

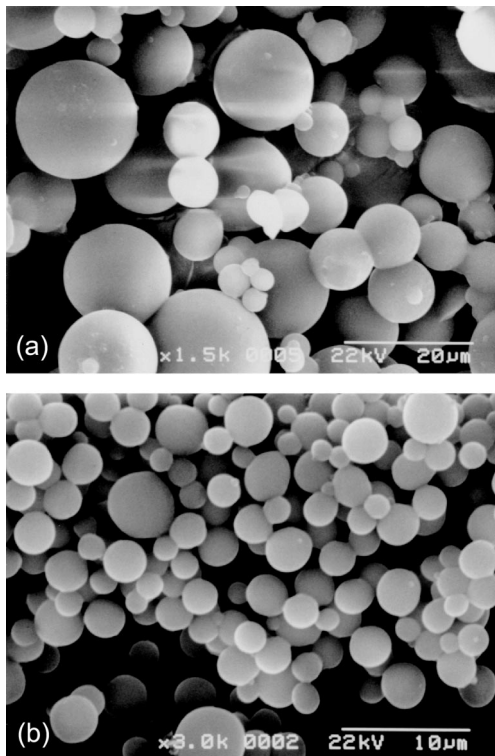


Fig. 15. SEM pictures of microspheres for (a) DS=10, TLL=20.6 and (b) DS=20, TLL=18.7 of 1.0 wt% Dex-MA composition.

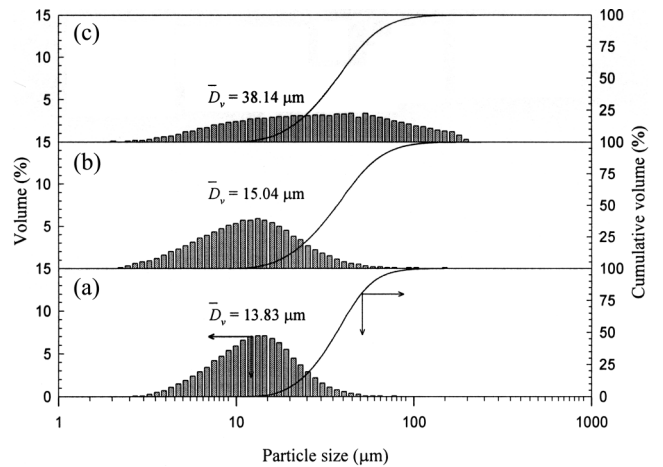


Fig. 16. Particle size distributions of microspheres(DS=10) for (a) 0.7 wt%, (b) 1.0 wt%, (c) 2.0 wt% Dex-MA on TLL=20.6.

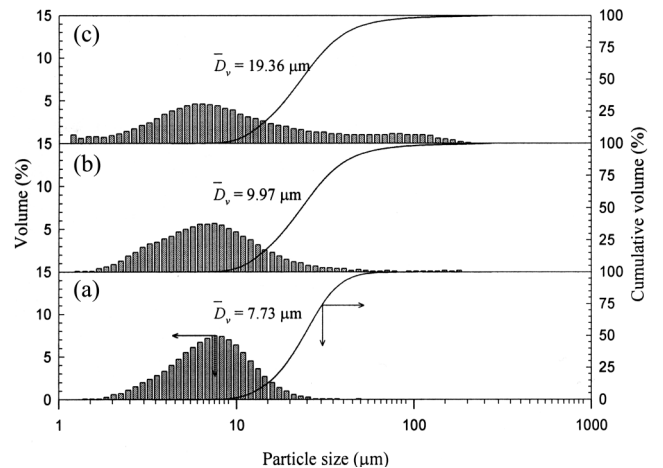


Fig. 17. Particle size distributions of microspheres(DS=20) for (a) 0.7 wt%, (b) 1.0 wt%, (c) 2.0 wt% Dex-MA on TLL=18.7.

액에 대한 가교반응은 구모양의 microsphere의 형성보다는 비다공성 microsphere이거나 고형 hydrogel이 생성되었다.

4. 결 론

Dex-MA는 MA 그룹의 직접적인 치환을 유도하는 transesterification 반응을 통해 제조하였으며, glucopyranose 고리 내에 MA 그룹을 확인하기 NMR, FT-IR, GPC 등을 사용한 분석이 행해졌다. Dex-MA에 대한 ¹H NMR spectrum에 있어서 MA 그룹의 methyl 그룹과 이중결합을 각각 나타내는 δ 1.94와 δ 5.75, 6.21 ppm의 부가적인 신호가 관찰되었다. δ 4.96, 4.97과 δ 5.30 ppm에서의 피크 강도를 비교함으로써 DS를 계산할 수 있었으며 물질 수지를 기초로 한 DS 값과 잘 비례함을 알 수 있었다. Dex와 Dex-MA에 대한 ¹³C NMR spectrum에 있어서 δ 171.9-171.1, 138.3-138.0, 130.7-130.0, 20.2 ppm(MA 그룹)과 δ 97.8, 78.7, 75.8, 73.7, 72.4, 70.2 ppm(glucopyranose 고리)이 각각 부가적으로 발견되었다. 또 Dex-MA spectrum의 화학 이동과 피크의 강도로부터 MA 그룹의 2-와 3- 치환 이성질체가 비슷한 비율로 존재함을 알 수 있었다. FT-IR spectrum에 있어서는 Dex에 비해 Dex-MA는 두개의 추가적인 흡수 띠를 확인할 수 있었으며, 각각은 MA 그룹의 carbonyl 그룹(1,715 cm⁻¹)과 이중결합(814 cm⁻¹)을 나타내었다. 결론적으로 transesterification 반응을 통한 Dex-MA의 합성은 glucopyranose 고리 내 2-와 3- 위치의 OH

그룹을 MA 그룹으로 직접치환을 유도하였으며, 반응초기의 Dex에 대한 GMA의 정량적 비에 의해 DS가 효율적으로 조절됨을 확인할 수 있었다.

25 °C에서 Dex(또는 Dex-MA)/PEG/물 계에 대한 상평형 도표는 GPC를 사용하여 결정하였다. 상평형 도표로부터 PEG의 대부분은 위상에, Dex(또는 Dex-MA)의 대부분은 아래상에 농축되었으며, DS가 증가함에 따라 binodal curve는 고농도영역으로 이동하였으며 TLL은 감소하였다.

팽윤비를 결정하기 위해 질량법과 blue-Dex 용액법을 사용하였다. 특히, blue-Dex 용액법의 결과로써 hydrogel이 물과 접촉하게 되었을 때 매우 빠르게 팽윤하며 다량의 물이 흡수됨을 알 수 있었다. 평형 팽윤비는 DS10이 10.80, DS20이 17.10의 값을 각각 나타내었다.

Microsphere의 제조는 APTS 에멀전 내 Dex-MA의 가교를 통해 제조되었다. 제조된 microsphere의 형태는 SEM을 이용하여 관찰하였으며, 완벽한 비다공성 구모양을 갖고 있음을 확인할 수 있었다. 또한, PSA 데이터로부터 Dex-MA의 초기 농도가 증가하면 크기가 크고, 체적분포가 넓은 microsphere가 얻어짐을 알 수 있었다.

사용기호

ATPS	: aqueous two-phase polymer solution(system)
Blue-Dex	: blue dextran
DDS	: drug delivery system
Dex-GMA	: glycidyl methacrylate derivatized dextran
Dex-MA	: methacrylated dextran
Dex	: dextran
DMAP	: 4-(<i>N,N</i> -Dimethylamino) pyridine
DMSO	: dimethyl sulfoxide
DS	: the degree of substitution(the amount of methacryloyl groups per 100 dextran glucopyranose residues)
DSS	: 3-(Trimethylsilyl)-1-propane-sulfonic acid, sodium salt
f.w.	: formula weight, [g]
FT-IR	: Fourier transform infrared spectrophotometer
GDOL	: glycidol
GMA	: glycidyl methacrylate
GPC	: gel permeation chromatography
KPS	: potassium peroxydisulfate
MA	: methacryloyl
NMR	: nuclear magnetic resonance
PI	: polydispersity index(weight-average molecular weight/number-

	average molecular weight) [-]
PSA	: particle size analysis
PTFE	: polytetrafluoroethylene(trade name is Teflon)
SEM	: scanning electron microscope
TEMED	: <i>N,N,N',N'</i> -tetramethylethylenediamine
TLL	: tie-line length
UV	: ultra-violet spectrophotometer

참고문헌

1. Park, K. N., Shalaby, S. W. and Park, H. S.: "Biodegradable Hydrogels for Drug Delivery", Technomic publishing Co., Inc., Lancaster, PA(1993).
2. "Proceeding of the Tailored Polymeric Materials for Controlled Delivery Systems-sept. 7, 1997", ACS publications, Chapter 2(1998).
3. Beltran, S., Baker, J. P., Hooper, H. H., Blanch, H. W. and Prausnitz, J. M.: *Macromolecule*, **24**, 549(1991).
4. Gehrke, S. H., Vaid, N. R. and McBride, J. F.: *Biotechnol. Bioeng.*, **58**, 416(1998).
5. Kapur, V., Charkoudian, J. C., Kessler, S. B. and Anderson, J. L.: *Ind. Eng. Chem. Res.*, **35**, 3179(1996).
6. Motozato, Y., Ihara, H., Tomada, T. and Hirayama, C.: *J. Chromatogr.*, **355**, 434(1986).
7. Horgaard, L. and Brøndsted, H.: *J. Control. Release*, **36**, 159(1995).
8. Franssen, O., Stenekes, R. J. H. and Hennink, W. E.: *J. Control. Release*, **59**, 219(1999).
9. van Dijk-Wolthuis, W. N. E., Franssen, O., Talsma, H., van Steenberg, M. J., Kettenes-van den Bosch, J. J. and Hennink, W. E.: *Macromolecules*, **28**, 6317(1995).
10. van Dijk-Wolthuis, W. N. E., Kettenes-van den Bosch, J. J., van der Kerk-van Hoof, A. and Hennink, W. E.: *Macromolecules*, **30**, 3411(1997).
11. Albetsson, P.-A.: *Nature*, **182**, 709(1958).
12. Cho, J. M. and Kang, C. H.: *J. Research Inst. for Catal.*, **21**, 105(2000).
13. Stenekes, R. J. H., Franssen, O., van Bommel, E. M. G., Crommelin, D. J. A., Hennink, W. E.: *Pharm. Res.*, **15**, 557(1998).
14. Franssen, O. and Hennink, W. E.: *Int. J. Pharm.*, **168**, 1(1998).
15. Stenekes, R. J. H., Franssen, O., van Bommel, E. M. G., Crommelin, D. J. A. and Hennink, W. E.: *Int. J. Pharm.*, **183**, 29(1999).