

## Gelatin에 2-Hydroxyethyl Methacrylate의 Graft 공중합에 관한 연구

조종수·김범철·강성우·성용길\*  
전남대학교 고분자공학과 · \*동국대학교 화학과  
(1986년 3월 27일 접수)

### Homogeneous Graft Copolymerization of (2-hydroxyethyl methacrylate) onto Gelatin

Chong-Su Cho, Bum-Chul Kim, Sung-Woo Kang, and Yong-Kiel Sung\*

*Department of Polymer Engineering, Chonnam National University, Kwangju 505, Korea.*

*\* Department of Chemistry, Dongguk University, Seoul 100, Korea.*

(Received March 27, 1987)

요약: Gelatin에 HEMA를 graft 공중합 할때 반응시간, 반응온도, monomer 농도, gelatin 농도 및 개시제 농도의 효과를 살폈으며 graft 공중합된 시료의 팽윤도와 효소에 의한 생체분해성이 검토되었다. 50°C에서 grafting percentage는 제일 컸고, 개시제의 농도는  $3.46 \times 10^{-2} M$  부근에서, monomer 및 gelatin 농도는 약 1 wt%에서 최대의 grafting conversion을 나타냈다. graft 공중합된 팽윤도는 graft율이 증가함에 따라 증가하였으나 생체분해는 graft율이 증가함에 따라 적게 일어났다.

**Abstract:** Gelatin-g-poly(2-hydroxyethyl methacrylate) copolymers were obtained in an aqueous medium using  $K_2S_2O_8$  initiator. Grafting conversion, grafting efficiency and grafting percentage were determined as functions of polymerization, temperature, monomer concentration, polymerization time and initiator concentration. The grafting percentage increased up to 50°C and then decreased. The grafting conversion increased up to  $3.46 \times 10^{-2} M$  and then constant with increasing of initiator concentration. The concentration of monomer and gelatin showed a maximum grafting conversion around 1 wt. %. The percentage of swelling of grafted copolymer increased with increasing of grafting. The weight loss of the grafted copolymer in pepsin decreased with increasing of grafting.

### 서론

Grafting에 의한 천연 고분자의 화학적 변형은 실용적인 관점 뿐만아니라 기초 학문의 관점에서

도 흥미를 끌여 왔다. 천연 고무와 cellulose<sup>1-3</sup> 위에 vinyl monomer의 graft중합은 오랜 시간동안 연구 되어왔고 또한 wool과 collagen<sup>4</sup>에도 실용적인 중요성으로 여러 연구자들에 의해서 연구되었

다. 그러나 단백질의 변형물에 대해서는 많은 논문이 발표되지 않았으나 지금까지 발표된 것으로는 gelatin을 backbone으로하여 methyl methacrylate,<sup>5</sup> ethyl acrylate,<sup>6</sup> methyl acrylate,<sup>7</sup> 등을 graft 공중합 한것이 발표된 바 있다. 본 실험에서는 동물의 결합 조직을 구성하는 주요 단백질인 콜라겐의 변성 단백질인 gelatin에 hydrogel 상태이며 생체 적합성이 좋은 P(HEMA)<sup>8</sup>를 graft 공중합 할때 반응시간, 온도, gelatin의 농도, 개시제의 농도에 따른 graft 공중합의 특성을 살폈으며 아울러 물 및 ethyl alcohol에서의 함수율을 검토하고 단백질 분해효소인 pepsin으로 생체분해성을 측정하여 인공피부로서의 가능성을 검토하였다.

### 실 험

#### 시료 및 시약

Gelatin은 WAKO Pure Chemical Industries

LTD의 제품을 그대로 사용하였다 (평균 분자량 : 90,000~110,000). 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA)는 중합 억제제인 hydroquinone을 첨가하여 온도 80~85℃에서 질소 가스를 주입하면서 감압증류한 후 이것을 cyclohexane으로 세번 추출하였다. 여기에 다시 NaCl이 포화 될때까지 첨가하고 HEMA를 위 층에서 분리한 후 anhydrous magnesium sulfate로 건조하여 순수 HEMA를 얻었다. 개시제인 K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>는 정제하지않고 그대로 사용하였다.

#### 중 합

2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA)와 개시제는 gelatin 수용액에 첨가하여 각 sample tube에 20cc 씩 넣어 N<sub>2</sub> gas를 10분간 주입하여 산소를 제거하였다. 이것을 각각의 조건에 따라서 만든 용액을 교반기로 교반 하면서 중합시켰다. (대표적인 예 : HEMA 2 wt.%, KPS 3.46×10<sup>-2</sup>M, gelatin 1 wt.%)

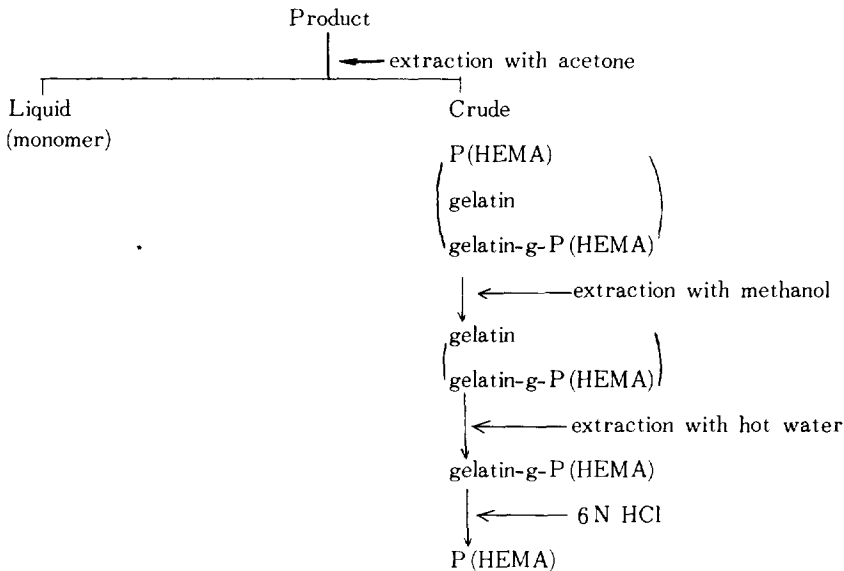


Fig. 1. Flow diagram of purification of gelatin graft copolymers by alternate solvent extraction method.

**Graft양의 측정**

Graft양의 측정은 아래의 식을 이용하여 산출하였다.

· grafting conversion (wt./wt.)=  

$$\frac{\text{grafted p(HEMA)+homopolymer}}{\text{Added HEMA}} \quad (1)$$

· grafting efficiency (wt./wt.)=  

$$\frac{\text{grafted P(HEMA)}}{\text{grafted P(HEMA)+homopolymer}} \quad (2)$$

· grafting percentage (wt./wt.)=  

$$\frac{\text{grafted P(HEMA)}}{\text{gelatin}} \quad (3)$$

**IR Spectra의 측정**

공중합된 중합체의 IR은 pellet을 만들어 Shimadzu IR 43형을 사용하여 측정하였다.

**Graft 공중합체의 정제**

용매 추출 방법에 의한 gelatin graft copolymer의 정제방법을 Fig. 1에 나타내었는데 생성물을 아세톤에 의해 추출하여 liquid층과 crude층으로 분리하고 crude층을 다시 메탄올로 추출하여 P(HEMA)를 제거하고 뜨거운 물로 gelatin을 제거하여 gelatin-g-P(HEMA)를 얻었으며 grafting efficiency를 얻기 위하여 6N HCl로 gelatin을 가수분해 P(HEMA)를 얻었다.

**팽윤도 측정**

증류수와 에탄올을 사용하여 온도를 20℃, 30℃와 40℃로 변화시켜 시간에 따른 팽윤도를 식(4)를 이용하여 측정하였다.

$$Q_w(\%) = (X_2 - X_1) / X_1 \times 100 \quad (4)$$

$Q_w(\%)$ : 시료의 팽윤도

$X_1$ : 건조 상태의 시료무게

$X_2$ : 팽윤된 시료의 무게

**생체분해 실험**

C. A. Homsy<sup>9</sup>의 방법인 0.1M HCl-KCl의 완충 용액(pH=2.0)에 시료를 넣고 단백질분해 효소인

pepsin을 첨가하여 일정 주기로 시험관에서 꺼내어 건조시킨 후 건조된 시료의 무게를 측정하여 생체분해 실험을 하였다.

**주사 전자 현미경의 관찰**

생체분해실험의 시료를 금으로 진공 증착하여 TSM-35형 주사 전자 현미경으로 morphology를 관찰하였다.

**결과 및 고찰**

**IR Spectra의 측정**

Gelatin에 P(HEMA)가 graft 되었는지 확인하기 위하여 graft 중합 후 얻어진 시료의 IR spectra

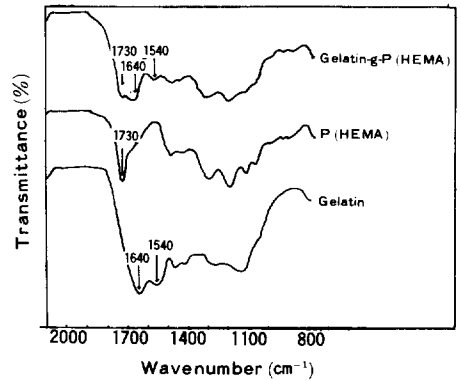


Fig. 2. Infrared spectra of gelatin, poly(HEMA) and gelatin-g-p(HEMA).

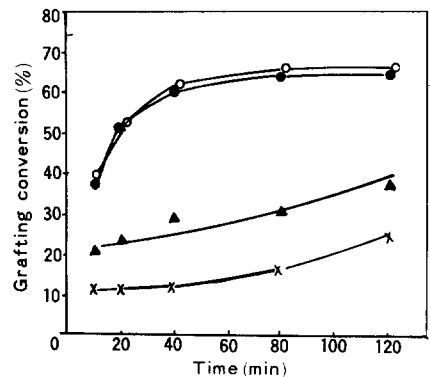


Fig. 3. Total conversion of HEMA polymerization in aqueous solution according to the reaction time at (○) 80℃, (●) 70℃, (▲) 60℃ and (×) 50℃ in the presence of 1.0 wt-% gelatin initiated by KPS.

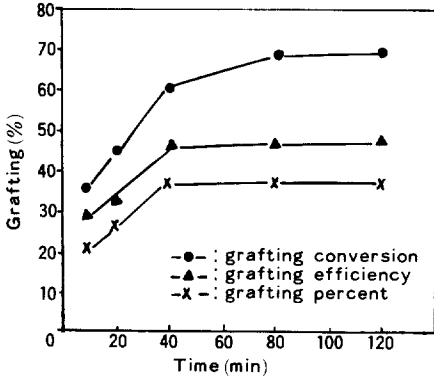


Fig. 4. Variation in the extent of percent grafting with reaction time in the presence of 1.0 wt-% gelatin initiated by  $3.46 \times 10^{-2}$  M KPS, concentration of monomer feed, 2.0 wt-% and temperature  $70^\circ\text{C}$ .

를 Fig. 2에 나타낸 것으로 그림에서 나타내는 바와 같이 gelatin 단독에서는 amide I band의  $1650\text{ cm}^{-1}$  부근과 amide II band인  $1550\text{ cm}^{-1}$ 에서 흡수대를 P(HEMA)단독에서는 ester carbonyl group의 흡수대가  $1730\text{ cm}^{-1}$  부근에서 나타났다. Graft 중합체인 gelatin-g-P(HEMA)에서는 gelatin의 흡수대인 amide I and 및 amide II의 흡수대와 P(HEMA)의 ester carbonyl group의 흡수대가 같이 나타나는 것으로 보아 gelatin에 P(HEMA)가 graft 공중합된 것을 확인 할 수 있다.

#### Graft 중합

Fig. 3은 여러가지 온도에서 중합시간에 따른 grafting conversion을 나타낸 것으로 그림에서 나타내는 바와 같이  $60^\circ\text{C}$ 까지는 grafting conversion이 온도가 상승함에 따라 증가하였으나  $70^\circ\text{C}$  이상에서는 온도에는 영향없이 40분에 이미 중합이 끝났다. Fig. 4는 반응 시간에 따른 grafting conversion, grafting efficiency, grafting percent를 나타낸 것으로 그림에서 나타낸 바와 같이 모두가 초기 시간에는 증가하다가 conversion은 80분에서 efficiency와 percent는 40분에서 거의 일정하게 되었는데 초기에 증가하는 이유로는 grafting site들의 수가 증가되었기 때문이라고 생각된다. Fig. 5는 개시

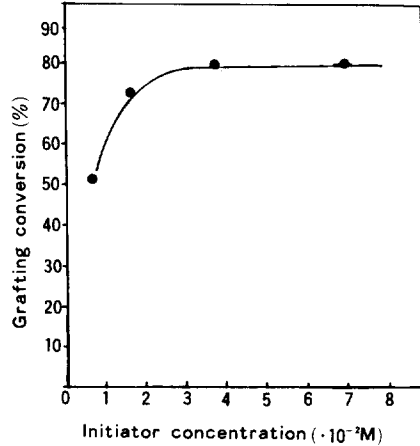


Fig. 5. Relation between initiator concentration and total conversion at the polymerization time of 2 hr in aqueous polymerization system containing 2.0 wt-% HEMA and 1.0 wt-% gelatin initiated by KPS at  $70^\circ\text{C}$ .

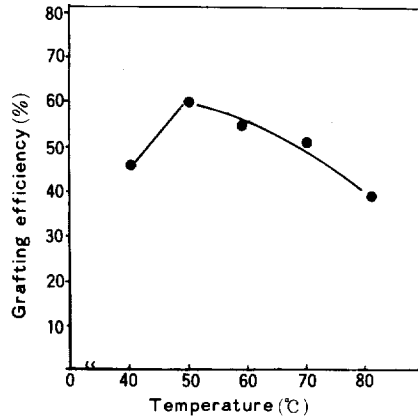


Fig. 6. Relation between temperature and grafting efficiency at the polymerization time of 2hr, in aqueous polymerization system containing 2.0 wt-% HEMA and 1.0 wt-% gelatin initiated by  $3.46 \times 10^{-2}$  M KPS.

제 농도에 따른 grafting conversion을 나타낸 것으로 어느 농도 범위까지는 conversion이 급격히 증가하다가 그 이상에서는 시간과 conversion과의 관계와 같이 일정하게 되었다. 이것은 종말 단계의 반응이 1차 반응의 양상과 비슷한 경향을 나타내고 있었다.

Fig. 6은 반응온도와 grafting efficiency와의 관계를 나타낸 것으로 그림에서 나타내는 바와 같이 50℃까지는 증가하다가 그 이상에서는 다시 grafting efficiency가 감소하는 것으로 보아 50℃가 최적 온도임을 알 수 있었다. 반응 온도에 따른 grafted P(HEMA)와 homopolymer의 양을 Table 1에 나타냈다.

Fig.7은 monomer 농도에 따른 grafting conversion, grafting efficiency 그리고 grafting percent와의 관계를 나타낸 그림인데 grafting percent는 monomer 농도가 증가함에 따라 증가하는 반면 grafting conversion과 grafting efficiency는 점차 감소하고 있었다. 특히 HEMA농도가 증가함에 따라 중

Table 1. Effect of Temperature on Grafting

Reaction Temp. (°C)	Added HEMA (g)	Weight of Grafted P(HEMA)(g)	Weight of Homopolymer (g)
50	0.2	0.02	0.03
60	0.2	0.05	0.02
70	0.2	0.06	0.06
80	0.2	0.07	0.06

reaction time=120min, [gelatin]=1.0wt%, [KPS]= $3.46 \times 10^{-2}M$

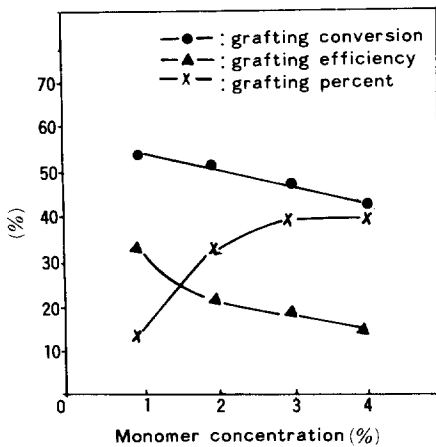


Fig. 7. Effects of monomer concentration on the grafting of HEMA with KPS at 50℃.

합된 총 P(HEMA)의 양이 점점 증가하고 있지만서도 grafting conversion이 감소한 것은 Nishioka 등<sup>8</sup>이 발표한 cellulose에 HEMA를 graft공중합한 것과는 같은 경향이지만 George등<sup>10,11</sup>이 발표한 gelatin이 ethyl acrylate나 butyl acrylate를 공중합한 것과는 상반된 결과가 나오고 있어 여기에 대한 이유는 지금 검토 중에 있다.

Fig. 8은 gelatin의 농도를 0.5 wt.%~2 wt.%까지 변화시키면서 grafting conversion, grafting efficiency 그리고 grafting percent를 나타낸 것으로 그림에서 나타내는 바와 같이 gelatin의 농도가

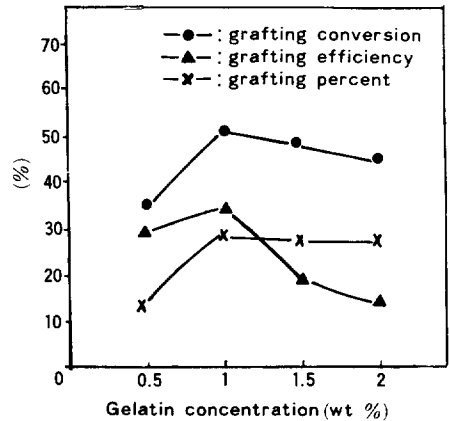


Fig. 8. Effects of gelatin concentration on the grafting of HEMA with KPS at 50℃.

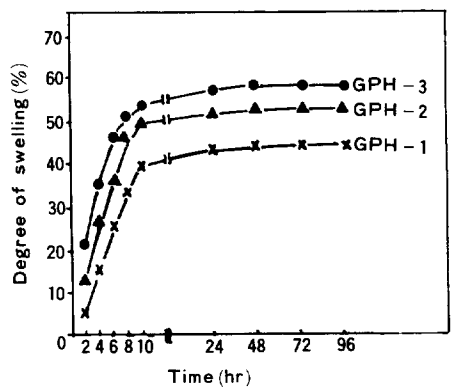


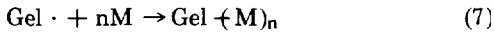
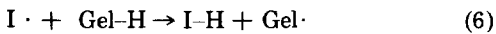
Fig. 9. Degree of swelling of grafted copolymers against swelling time at 30℃ in water : GPH-1, grafting percent 31.3% ; GPH-2, 61.7% ; GPH-3, 65%.

증가함에 따라 grafting percent가 감소 되었는데 이것은 gelatin의 농도가 짙으면 짙을수록 더욱 많은 graft radical들이 발생되어 이것이 서로 상호작용 하면서 종결 반응으로 되기 때문이라고 생각된다.

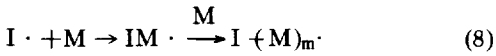
이상의 결과에서 gelatin에 HEMA가 grafting 될 때의 반응메카니즘을 살펴보면 Kumar등<sup>12</sup>이 제안한 바와 같이



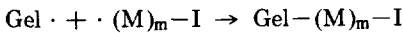
direct grafting :



grafting by chain transfer :



termination :



여기에서 G=gelatin, M=monomer, I=initiator 로 나타내어지고 gelatin의 graft 위치는 gelatin이 가지고 있는 -CH(OH) group에서 자유라디칼이 발생되어 이곳에 HEMA가 graft 공중합된다고 생각된다.

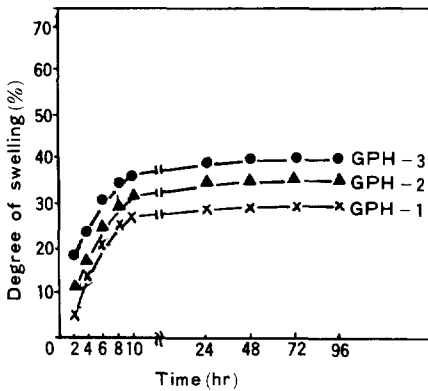


Fig. 10. Degree of swelling of grafted copolymers against swelling time at 30°C in ethanol : Denotation of GPH is same as the Fig. 9.

### Graft 중합체의 함수율 측정

Fig. 9, 10은 30°C에서 물과 에탄올을 사용하여 각 시료의 팽윤도를 나타낸 것으로 물에서의 팽윤도는 처음 8시간까지는 급격히 증가되다가 8시간 이후에는 완만히 증가하였으며 48시간이 지난 후에는 평형상태에 도달하였다. 또한 graft율이 증가할수록 팽윤도는 증가하였는데 이것은 P(HEMA)의 hydrogel성질에서 나온 까닭으로 생각된다. 물과 에탄올에서의 팽윤도를 비교하면 물에서 팽윤도 (40%~60%) [P(HEMA) 단독의

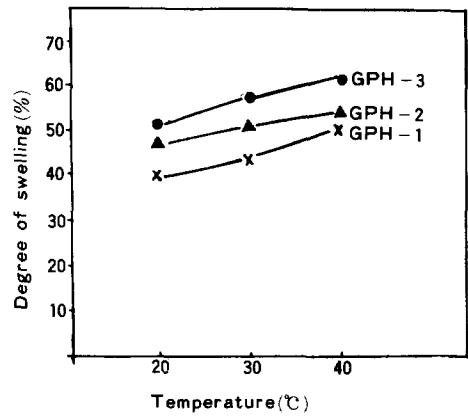


Fig. 11. Degree of swelling of grafted copolymers against swelling temperature in water : Denotation of GPH is same as the Fig. 9.

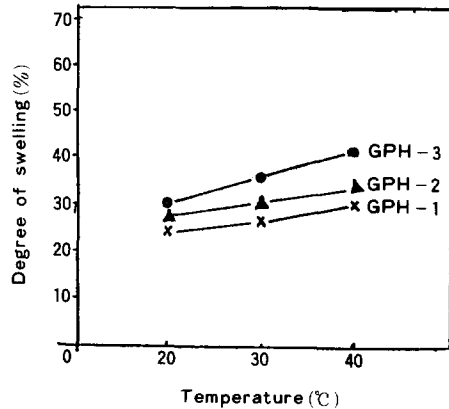


Fig. 12. Degree of swelling of grafted copolymers against swelling temperature in ethanol : Denotation of GPH is same as the Fig. 9.

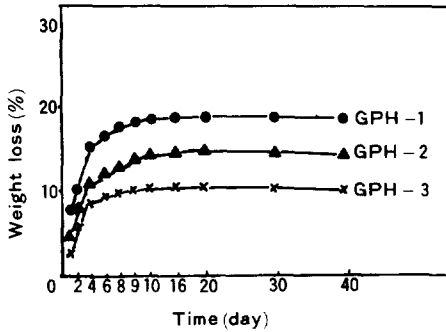


Fig. 13. Weight loss-time curves of gelatin-g-p(HEMA) with pepsin at 37°C : Denotation of GPH is same as the Fig. 9.

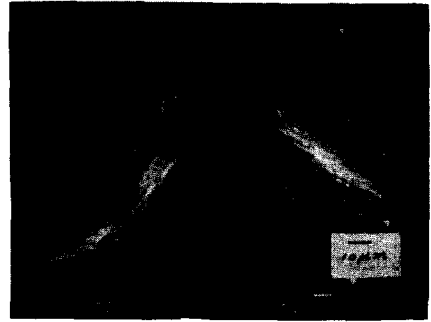
30°C 물에서의 팽윤도는 80%)는 에탄올에서의 팽윤도 (30%~40%) 보다 큼을 알 수 있었다. Fig. 11과 12는 물과 EtOH에서의 팽윤도를 온도에 따라 측정된 것으로 그림에 나타낸 바와 같이 온도가 증가함에 따라 팽윤도는 증가하였으며 또한 에탄올에서도 같은 경향을 나타내었다.

**Graft 공중합체의 생체분해성**

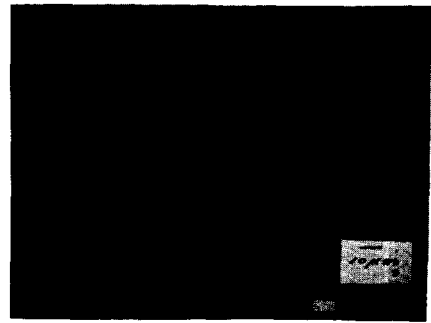
Fig. 13은 단백질 효소인 pepsin에 의한 생체 분해의 결과를 나타낸 것으로 그림에서 나타내는 바와 같이 처음 4일까지는 급격한 무게감소를 보였으나 6일 후에는 완만한 감소를 보이다가 16일이 지난 후에는 변화가 거의없는 평형상태에 도달하였다. 또한 graft율이 증가함에 따라 분해도는 감소하는 경향을 나타냈는데 이것은 pepsin에 의하여 gelatin만 분해되고 P(HEMA)는 분해되지 않기 때문이라고 생각된다.

**생체분해된 Graft공중합체의 전자현미경 관찰**

Gelatin-g-P(HEMA)시료의 생체 분해성 실험 전후의 morphology를 주사 전자 현미경으로 관찰한 것으로 그림에서 나타낸 바와 같이 morphology가 생체 분해성 전과 후에 뚜렷한 차이를 나타내고 있는바 40일이 경과한 후의 시료에서는 움푹 들어간(pitting)부분과 수로(channeling)을 이룬 부분이 관측 되고 있어 이것으로 보아 이러한 것들은 생체 분해성 과정에서 얻어진 것이라고 생각된다.



(a)



(b)

Fig. 14. Scanning electron micrographs of gelatin-g-p(HEMA) before (a) and after (b) incubation with pepsin : grafting percent 31.3%.

**결 론**

Gelatin위에 HEMA를 graft공중합시 반응시간, 온도, monomer농도, gelatin농도 개시제 농도의 효과를 살피고, 단백질 분해 효소인 pepsin을 사용 graft율에 따른 생체 분해성을 검토한 결과 50°C에서 graft율이 가장 좋았으며 monomer의 농도는 1wt.%에서 가장 최적 상태를 나타내었다. 그리고 graft율이 증가할 수록 함수율은 증가 하였으나 생체 분해는 적게 일어나는 경향을 보였다.

감사: 본 연구는 한국과학재단의 재정적 지원에 의해서 이루어진 바 이에 심심한 감사를 표합니다.

참 고 문 헌

1. M. S. Bains, *J. Polym. Sci. C*, **37**, 125(1972).
2. S. Ranga Rao and S. L. Kapur, *J. Appl. Polym. Sci.*, **B**, 2649(1969).
3. T. Nakira and T. Shiro, *Polymer*, **6**, 201(1974).
4. B. Pointz, W. Meigel, J. Rautenterg, and K. Kuhn, *Eur. J. Biochem.*, **16**, 50(1970).
5. T. Kuwajima, H. Yoshida, and K. Hayashi, *J. Appl. Polym. Sci.*, **20**, 967(1976).
6. G. Sudesh Kumar, V. Kalpagam, and V. S. Nandi, *J. Appl. Polym. Sci.*, **29**, 3075(1985).
7. R. Demenberg, R. Bothast, and T. Abbott, *J. Appl. Polym. Sci.*, **22** 459(1978).
8. N. Nishioka, Y. Matsumoto, T. Yumen, K. Monmae, and K. Kosai, *Polym. J.*, **18**, 323 (1986).
9. 相羽誠一, 箕浦憲彦, 富士原行彦, 高分子論集, **39**, 299(1982).
10. A. George, G. Radhakrishan, and K. T. Joseph, *Eur. Polym. J.*, **21**, 1081(1985).
11. A. George, G. Radhakrishan, and K. T. Joseph, *Polymer*, **26**, 2064(1985).
12. G. S. Kuman, V. Kalpagam, and U. S. Nandi, *J. Appl. Polym. Sci.*, **30**, 609(1985).