

헤파린 제거제용 셀룰로오스의 개질

이원규·박기동·한동근·정서영·김영하

=Abstract=

Modified Cellulose for Heparin Binder

Won Kyu Lee, Ki Dong Park, Dong Keun Han, Seo Young Jeong, and Young Ha Kim

Heparin binders (Cell-PALA) used for selective heparin removal from blood, were prepared by immobilizing a cationic polymer, poly(allylamine) (PALA), onto cellulose substrate by a novel method. Their absorbing capacity for heparin was compared with untreated cellulose control using heparin solution *in vitro*. The surface areas of obtained heparin binders and untreated cellulose were 1.36 and 2.56 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, respectively. The amount of bound heparin to PALA immobilized celluloses was determined to be 0.16~0.30 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, which is much higher than that of untreated cellulose (0.03 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). These results suggest that Cell-PALA materials can be utilized for a heparin removal system.

Key words : Heparin binder, surface modification, poly(allylamine) grafted celluloses, PEO spacer

서론

헤파린 (heparin)은 선형의 음이온성 탄수화물로서 glucosamine (GlcN)과 uronic acid를 함유한 tetrasaccharide 반복구조로 이루어진 다분산성의 불균일한 물질이다¹⁾. 이 헤파린은 분자량이 7,000~20,000으로서²⁾ 출처에 따라 분자량 및 분자량분포와 그 화학적 구조가 다양하며, 물에는 잘 녹으나 포름아미드 이외의 유기용매에는 녹지 않는다. 헤파린의 수용상에서의 입체형태는 논란의 대상이 되고 있지만 거의 나선형이나 코일형으로 보고 있다³⁾.

헤파린은 다음의 2가지의 용도가 알려지고 있다⁴⁾. 첫째는 이것이 항응고제 (anticoagulant)이기 때문에 혈액적합성 재료를 제조하는데 사용되며, 둘째로 수술시나 혈액의 체외 순환시 혈전형성을 억제하기 위해서 이용된다. 전자는 헤파린을 생체재료에 분산, 이온결합 및 공유결합시켜

서 인공장기용 대체재료 및 의료용품에 적용하는 연구가 많이 진행되고 있다. 반면에 후자는 심장수술이나 혈액 투석의 체외순환시 혈액의 응고인자를 효과적으로 억제하여 혈전색전증을 최소화하고 또한 콜레스테롤을 과량 함유한 저밀도 지방단백질 (LDL)을 침전시키기 위해서 헤파린이 사용된다.

그러나 헤파린도 과도하게 사용하면 출혈 (bleeding)이 일어날 수 있으며 혈소판 감소증 (thrombocytopenia)이 야기되고 헤파린이 첨가된 혈액은 혈액응고 검사를 할 수 없다는 많은 단점이 있다⁵⁾. 이러한 헤파린의 문제점을 개선하기 위해서 반드시 혈액내에서 헤파린이 중화나 제거되어야만 된다. 현재 임상적으로 프로타민 (protamine)이라는 양이온 단백질을 혈액에 정맥 주사하여 헤파린을 중화시키는 방법이 시도되고 있으나⁶⁾ 이 방법은 혈액의 세포나 혈류역학의 변화를 야기시킬 뿐만 아니라 보체 (comp-

한국과학기술연구원 고분자화학팀

Polymer Chemistry Laboratory, Korea Institute of Science and Technology

통신저자: 박기동, (136-791) 서울시 성북구 하월곡동 39-1, Tel. (02) 962-8801 (교환 3428), Fax. (02) 965-3852

본 연구는 1993년 과학기술처 기초연구과제 (N10472)로 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

lement)가 활성화되는 단점이 보고되었다⁷⁾. 따라서 프로타민을 대체하기 위해서 몇 가지 방법이 시도되었다. 즉, 양이온^{8,9)}이나 헤파린 분해효소 (heparinase)¹⁰⁾가 고정화된 생체재료를 이용하여 헤파린과 정전기적 인력을 유도하거나 또는 헤파린을 생분해시켜서 제거하는 방법이 각각 연구되었다. 또한 poly(amido-amine)이 그래프트된 폴리우레탄¹¹⁾이나 triethylaminoethyl 양이온기가 도입된 cellulose가 보고되었으며 최근에는 poly(L-lysine)¹²⁾ 이나 poly(allylamine) (PALA)¹³⁾이 생체재료에 고정화되어 같은 목적으로 이용한 예도 발표되고 있다.

본 연구에서는 헤파린을 혈액으로부터 선택적으로 흡착, 제거하기 위해서 cellulose 기질을 이용해서 PALA 양이온을 새로운 방법으로 그래프트시켜서 헤파린 제거제를 제조하였다. 특히 제조된 양이온 제거제는 최대한 헤파린만을 결합하고 혈장 단백질의 흡착 및 혈액세포의 점착을 최소화하기 위해서 spacer로 유동성의 친수성 폴리에틸렌 옥사이드(PEO)를 도입하여 *in vitro* 헤파린 용액에서 흡착 거동을 검토하였다.

실 험

1. 재 료

Cellulose는 microcrystalline cellulose(상품명:AVICEL)는 친화약품사 제품으로 50℃에서 감압건조하여 사용하였으며, 이후 Cell로 표기하였다. Hexamethylene diisocyanate(HMDI)와 toluene diisocyanate(TDI)는 각각 Aldrich 사의 1급 시약으로 감압증류하여 사용하였다. Poly(allylamine) (PALA) hydrochloride [분자량=10000(10K) 및 50000-60000(55K)]는 Aldrich 사의 1급 시약으로, HCl을 제거한 후 사용하였고 poly(ethylene oxide) [PEO, hydroxyl terminal, 분자량=1000(1K)]는 일본 Wako Pure Chemical 사의 1급 시약을 chloroform으로 재결정하여 사용하였다. 헤파린 (heparin)은 Sigma Chemical사(grade I, 176U/mg)의 porcine intestinal mucosal variety 제품을 사용하였고, 촉매인 stannous octoate와 dibutyltin dilaurate는 각각 Sigma 사와 Aldrich 사의 1급 시약을 그대로 사용하였다. Dimethyl sulfoxide (DMSO)는 Aldrich 사의 1급 시약을 감압증류하여 사용하였고 benzene은 Baker 제 특급시약을 나트륨으로 건조시킨 후 사용하였으며 그 외의 용매들은 1급 시약을 그대로 사용하였다.

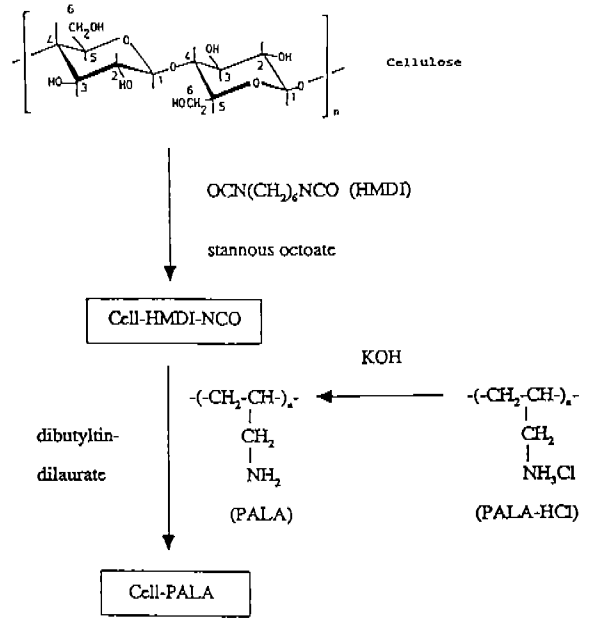


그림 1. Cell-PALA의 제조 모식도

Fig. 1. Scheme for preparation of Cell-PALA

2. 헤파린 제거제의 제조

1) Cell-PALA의 제조

그림 1은 Cell-PALA의 제조과정을 나타낸 모식도이다. 먼저 50℃에서 48시간 동안 감압 건조시킨 cellulose 5g을 DMSO에 분산시키고 HMDI 21.78g (0.13 mol)과 stannous octoate를 0.25ml 첨가한 후 60℃에서 2시간 반응시켰다. 얻어진 생성물을 DMSO와 ethyl ether로 각각 세척한 후 실온에서 24시간 동안 진공 건조하여 Cell-HMDI를 제조하였다. Cell-PALA의 제조전에 PALA는 PALA HCl를 KOH 용액에 녹인 후 50℃에서 5시간 동안 반응시켜 말단의 HCl을 제거한 다음 분자량 cut off가 2000인 막(membrane)으로 투석시켜 KCl과 저분자량의 PALA를 제거하여 사용하였다. PALA10K(또는 55K) 1g을 100ml의 DMSO에 용해시킨 다음 앞에서 제조한 Cell-HMDI 5g과 dibutyltin dilaurate 2.5ml를 첨가한 후 50℃에서 24시간 반응시켰다. 생성물을 DMSO와 methanol로 각각 세척한 후 실온에서 24시간 동안 진공건조시켜 Cell-PALA를 제조하였다. 또한 Cell-TDI는 HMDI 대신 TDI를 사용하여 동일한 방법으로 제조하였다.

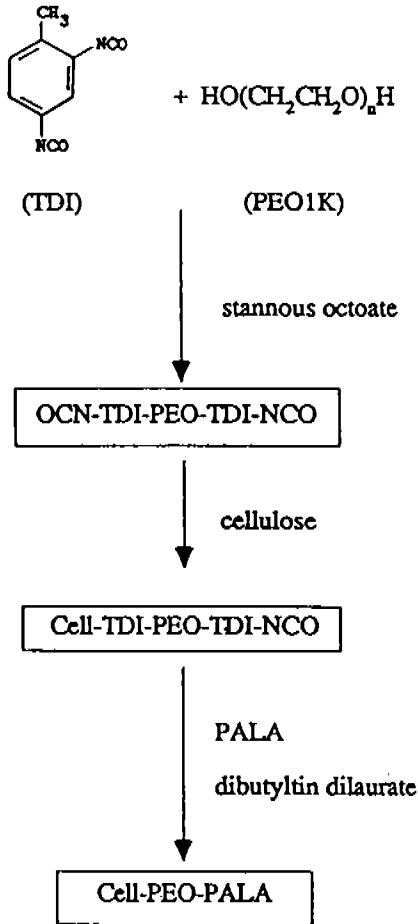


그림 2. Cell-PEO-PALA의 제조 모식도
 Fig. 2. Scheme for preparation of Cell-PEO-PALA

2) Cell-PEO-PALA의 제조

TDI-PEO-TDI의 제조과정은 그림 2에 나타난 것처럼 먼저 PEO1K 5g(0.005 mol)과 TDI 5g(0.029 mol)을 각각 100ml와 50ml의 benzene에 용해시킨 다음 60℃, 질소 기류하의 TDI용액에 PEO용액을 서서히 적하시킨 후 stannous octoate 2.5ml를 첨가하고 24시간 동안 반응시켰다. 반응 후의 용액을 ethyl ether에 침전시킨 후 24시간 동안 실온에서 진공건조하여 TDI-PEO-TDI를 합성하였다. 계속해서, 얻어진 TDI-PEO-TDI를 benzene에 녹이고 충분히 건조시킨 cellulose 5g과 stannous octoate 2.5ml를 첨가한 다음 24시간 반응시킨 후 benzene과 ethyl ether로 각각 세척하고 진공건조하여 Cell-PEO-NCO를 제조하였다. Cell-PEO-PALA는 Cell-PEO-NCO 5g을 DMSO 200ml에 분산시킨 다음 Cell-PALA의 제조방법과 동일한 조건으로 PALA10K(또는 55K)를 그래프트 시켜서 제조하였다.

3. 특성 분석

1) NCO기의 함량 분석

시료 0.1g에 과량의 n-dibutyl amine을 가하여 약 20분 동안 반응시킨 후 미반응 amine을 0.01N HCl 용액으로 역 적정하였다. 이때 지시약은 bromocresol green(약 2~3 방울)을 사용하였으며 용액이 blue(알칼리)에서 green(중성)으로 변할 때를 end point로 하여 시료의 단위 g당 NCO기의 mol 수를 구했다.

2) NH₂기의 함량 분석

시료 0.1g에 0.01N HCl 용액을 가하여 amine 기와 반응시킨 다음 pH를 3.0으로 조정하였다. 반응 후 남아있는 미반응 HCl에 0.01N NaOH 용액을 가하면서 전위차 역적정(potentiometric back titration)하여 시료의 단위 g당 NH₂기의 mol 수를 구했다.

3) Cellulose beads의 측정

미처리 및 개질 cellulose의 표면적은 Quantachrome Autosorb Automated Gas Sorption System을 이용하여 BET isotherm 방법으로 분석하였다.

4) 헤파린 흡착실험

시료 0.1g을 0.609% 헤파린/phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)용액 10ml에 60분 동안 침적시킨 다음 시료에 물리적으로 흡착된 헤파린을 제거하기 위하여 PBS로 세척하였다. 여과 후 건조시켜 시료에 흡착된 헤파린의 양을 toluidine blue법을 이용하여 분석하였다. 즉, 헤파린이 흡착된 시료를 0.005% toluidine blue 수용액 5ml에 분산시킨 다음 vortex mixer로 1분간 혼합, 반응시켰다. 이 현탁액을 원심분리기로 시료와 용액을 분리시킨 후 상층액을 3ml 취하여 UV의 631nm에서 흡수도를 측정하여 미리 작성한 표준 검량곡선과 비교하여 결합된 헤파린의 양을 계산하였다.

결과 및 고찰

본 연구의 목적은 cellulose의 표면에 고정화된 PALA의 양이온과 헤파린이 가지고 있는 음이온과의 흡착을 통해 수술 및 체외순환시 사용한 헤파린을 혈액내에서 제거할 수 있는 헤파린 제거제를 제조하는 것이다. 그러나 혈액 내에는 전하를 띠고 있는 많은 단백질들이 존재하기 때문에 이러한 단백질의 흡착을 최소화시키면서 헤파린의 흡착을 선택적으로 최대화시키는 것이 중요하다.

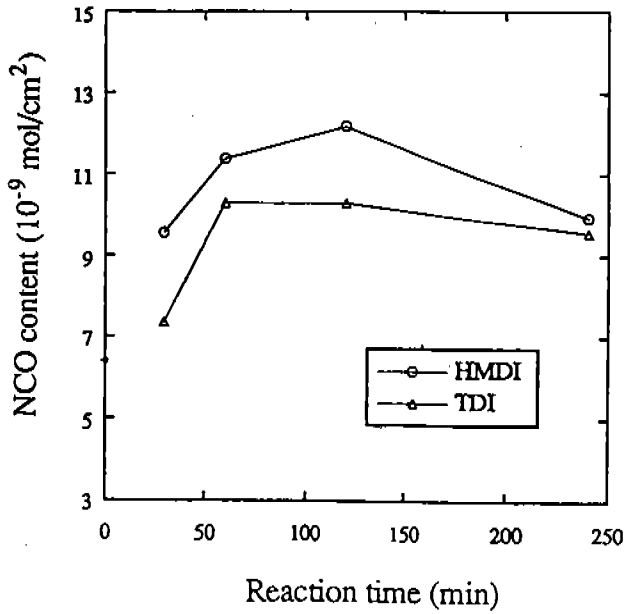


그림 3. Cell-HMDI 및 Cell-TDI의 반응시간에 따른 NCO기의 함량 변화

Fig. 3. Change of NCO content on reaction time in Cell-HMDI and Cell-TDI

표 1. 개질된 celluloses의 NCO기 함량

Table 1. NCO content of modified celluloses

Sample	NCO content (mol/g)*
Cellulose	-
Cell-HMDI	1.66×10^{-4}
Cell-TDI	1.40×10^{-4}
Cell-TDI-PEO1K-TDI	9.00×10^{-5}

* 반응조건: 60 °C, 2시간

1. NCO기가 도입된 cellulose

Cellulose의 hydroxyl기는 HMDI나 TDI의 한 쪽 isocyanate(NCO)기와의 반응을 통해 urethane기를 형성하게 되고 다른 쪽 말단에 남아있는 NCO기가 다음 단계에서 PALA와 반응할 수 있게 남아있다.

도입된 NCO기는 산-염기 역적정으로 확인하였다. 그림 3은 Cell-HMDI 및 Cell-TDI의 반응시간에 따른 NCO기의 함량변화를 나타낸 것이다. HMDI와 TDI의 반응을 각각 비교해 보면 동일한 반응 농도 및 반응 시간에서 HMDI가 더 많은 NCO기 함량을 나타냈는데 이는 TDI가 HMDI 보다 더 bulky하여 입체장애 (steric hindrance)를 더 많이 받기 때문이다. 또한 반응 시간이 증가함에 따라

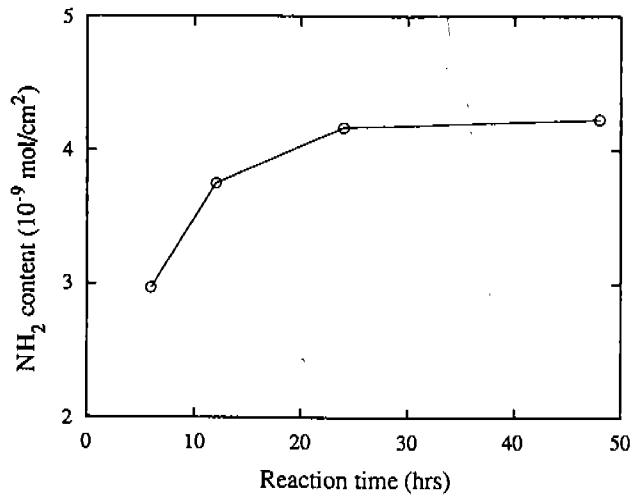


그림 4. Cell-HMDI-PALA의 반응시간에 따른 NH₂기의 함량 변화

Fig. 4. Change of NH₂ content on reaction time in Cell-HMDI and Cell-TDI

표 2. Cellulose beads의 표면적

Table 2. Surface area of the cellulose beads

Sample	표면적 (m ² /g)
Cellulose	2.555
PALA-grafted celluloses	1.358

NCO함량이 증가하다가 120분이 지나면서 감소하는 것을 볼 수 있는데 이것은 cellulose에 그래프트된 NCO기 사이의 가교나 bridging에 의한 영향으로 사료된다.

표 1에 몇가지 방법으로 제조한 NCO기가 도입된 cellulose의 NCO기 함량을 정리하였다. 그 중에서 전술한 바와 같이 HMDI와 반응시킨 경우가 가장 높은 NCO기 함량을 나타내었다. 또한 PEO를 도입시킨 경우 가장 낮은 NCO기 함량을 나타내는데 이는 먼저 TDI-PEO-TDI를 합성한 후 cellulose에 그래프트 시켰기 때문에 PEO 유도체의 상대적 고분자량에 기인한 입체장애로 인하여 반응 물질 중 가장 낮은 그래프트율을 보인 것으로 추측된다. 사용된 TDI-PEO-TDI의 합성은 NCO 적정법으로 인한 정량법 (NCO기 함량, 4.65×10^{-4})과 FT-IR을 이용한 정성분석 (2250 cm^{-1} 에서 NCO기의 특성 피크 흡수띠가 나타남)으로 확인하였다.

2 PALA 가 그래프트된 cellulose

Cellulose에 PALA를 그래프트시킬때 cellulose에 도입된

표 3. PALA가 그래프트된 cellulose의 NH₂기 함량과 흡착된 헤파린의 양

Table 3. NH₂ content and adsorbed amount of heparin in PALA-grafted celluloses

Sample	NH ₂ content (mol/g)	Heparin binding (μg/cm ²)
Cellulose	—	0.024
Cell-PALA10K-I	3.20 × 10 ⁻⁵	0.157
Cell-PALA10K-II	5.66 × 10 ⁻⁵	0.163
Cell-PALA55K	9.90 × 10 ⁻⁵	0.170
Cell-PEO1K-PALA10K	4.39 × 10 ⁻⁵	0.293
Cell-PEO1K-PALA55K	4.59 × 10 ⁻⁵	0.295

NCO기와 PALA의 사슬내에 있는 하나의 아민기가 반응하여 결합을 하고 나머지 아민은 free한 상태로 남아있는 게 바람직하며 이때 말단의 NH₂기를 전위차 역적정으로 확인하였다. 그림 4는 Cell-HMDI-PALA의 반응 시간에 따른 NH₂기의 함량 변화를 나타낸 것이다.

반응시간에 따라 점차 NH₂기의 함량이 증가하다가 24 시간 이후에 level off 되었다. 또한 PALA를 함유한 다른 cellulose 유도체도 이와 유사한 반응 경향을 보였다.

PALA가 고정화된 여러가지 개질 cellulose의 NH₂기 함량을 표 3에 정리하였다. 대체로 PALA의 분자량이 증가함에 따라서 NH₂기의 그래프트율이 증가하는 것은 당연한 것으로 이것은 PALA55K가 PALA10K 보다 아민기가 많아 미반응 아민이 많이 남아있기 때문이다. 또한 가장 낮은 NCO기 함량을 보였던 Cell-PEO1K-PALA 가 비교적 높은 NH₂기 함량을 보이고 있는데 이는 전술한 바와 같이 PEO를 도입시킴으로서 cellulose에서 분자량 만큼 멀리 떨어져 있어서 반응하는데 입체장애를 적게 받고 PEO의 사슬 유동성에 기인하여 말단의 NCO 기가 PALA와의 접촉이 용이해졌기 때문으로 사료된다.

3. 헤파린 흡착능

사용한 헤파린 제거제가 bead 형태이므로 헤파린 흡착량을 더욱 쉽게 평가하기 위해서 bead의 표면적을 구하였다. 표 2는 bead의 표면적 측정결과로, cellulose에 PALA가 결합된 것이 미처리 cellulose에 비해서 약 1/2로 표면적이 감소했는데 이는 고분자량의 PALA가 그래프트 되었기 때문이다. 또한 coupling agent의 종류에 따른 표면적은 큰 변화를 보이지 않았다.

그림 5는 합성된 재료를 0.609% 헤파린 용액에 침적시킨 후 흡착시키는 시간에 따른 헤파린의 흡착 정도를 나타

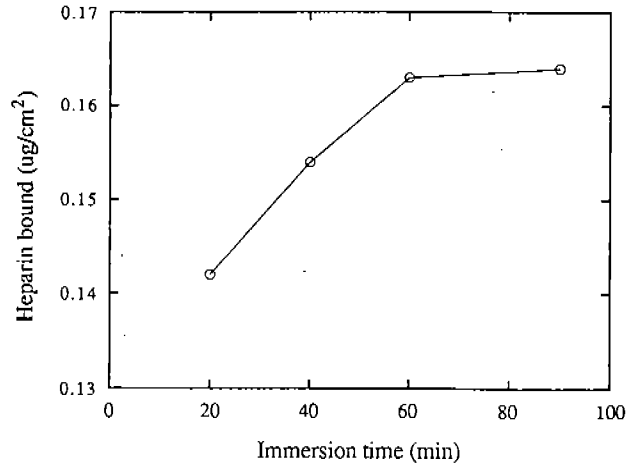


그림 5. 시료의 침적시간에 따른 헤파린의 흡착량

Fig. 5. Heparin-adsorbing amount on immersion time to samples

낸 곡선이다. 60분이 경과될 때까지 흡착능이 점차 증가하지만 그 이후에는 level off되는 것으로 보아 모든 흡착시간은 60분으로 고정해서 평가하였다.

PALA가 고정화된 cellulose의 헤파린 흡착량을 표 3에 나타내었다. Cell-PALA10K-I와 Cell-PALA10K-II, Cell-PALA55K를 비교해볼 때 NH₂기 함량이 2~3배 정도 증가하였음에도 흡착된 헤파린의 양이 거의 변화가 없음을 볼 수 있는데, 이는 헤파린이 매우 bulky하기 때문에 PALA의 아민기 함량이나 분자량에는 크게 영향을 받지 않는다는 것을 의미한다. 이에 비해 Cell-PEO1K-PALA10K, Cell-PEO1K-PALA55K는 PEO가 없는 기존의 시료보다 2배 정도 많은 헤파린 흡착량을 나타내었다. 이러한 PEO 함유 시료의 헤파린 흡착량이 월등한 것은 NH₂기 함량이 전자의 것들 보다 높을 뿐만 아니라 PEO의 도입으로 인한 사슬 유동성의 증가로 헤파린에 접근하기가 쉽기 때문으로 생각된다. 현재 제조된 헤파린 제거제를 이용하여 혈장(plasma) 및 전혈(whole blood)에서의 헤파린 흡착기동을 평가중에 있다.

결 론

혈액으로부터 헤파린을 선택적으로 흡착하기 위하여 cellulose 기질에 PALA를 새로운 방법으로 고정화하여 헤파린 제거제를 제조한 다음 *in vitro* 헤파린 용액에서 흡착 실험을 행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

헤파린 제거제는 양이온성 PALA를 몇 가지 방법으로

cellulose에 그래프트시켜서 제조하였다. 미처리 및 개질된 celluloses의 표면적은 각각 2.56 및 1.36 m²/g으로 개질 처리된 경우 표면적이 약 1/2로 감소하였다. *In vitro* 헤파린 용액의 흡착 실험에서 시료의 침적시간이 60분에서 최고에 이르렀으며 흡착된 헤파린의 양은 개질 방법에 따라 0.16 ~ 0.30 μg/cm²으로 미처리 cellulose (0.03 μg/cm²) 보다 훨씬 우수한 흡착능을 보였다.

이상의 결과로부터 제조된 헤파린 제거제는 각각 혈장 및 혈액내에서 선택적으로 헤파린을 흡착할 수 있을 것으로 기대된다.

참고 문헌

1. L. B. Jaques, Heparin: *An old drug with a new paradigm*, Science, 206, 528-533, 1979.
2. A. A. Horner, *Heparin Chemistry and Clinical Usage*, Academic Press, N. Y., 1976, p.37.
3. L. Yuan and S. S. Stivala, *Three-dimensional model of heparin*, in *Advanced in Experimental Medicine and Biology*, Vol. 52, R. A. Bradshaw and S. Wessler., (Eds.), Plenum Press, N. Y. 1974, p.39.
4. X. Ma, *Ph. D. Dissertation*, University of Utah, 1991.
5. D. N. Kapsch, E. D. Adelstein, G. R. Rhodes, and A. Silver, *Heparin-induced thrombocytopenia, thrombosis and hemorrhage*, Surgery, 86, 148-155, 1979.
6. D. T. Graham, A. R. Pomeroy, and D. B. Smythe, *Measurement on the heparin neutralizing capacity of protamine*, Thromb. Haemostas., 41, 583-589, 1979.
7. R. W. M. Frater, Y. Oka, and Y. Hong, T. Tsubo, P. G. Loubser, and R. Masone, *Protamine-induced circulatory changes*, J. Thorac. Cardiovasc. Surg., 87, 687-692, 1984.
8. S. F. Mohammad, H. Y. K. Chuang, and R. G. Mason, *Quantitative removal of heparin from plasma and other aqueous solutions by affinity adsorption on poly (L-lysine)-Sepharose 4B*, Thromb. Res., 20, 599-609, 1980.
9. K. C. Hou, S. Roy, R. Zaniewski, and E. A. Shumway, *Method for extracorporeal heparin removal from blood by affinity chromatography*, Artif. Organs, 14, 436-442, 1990.
10. R. Langer, R. J. Linhardt, S. Hoffberg, A. K. Larsen, C. L. Cooney, D. Tapper, and M. Klein, *An enzymatic system for removing heparin in extracorporeal therapy*, Science, 217, 261-263, 1982.
11. R. Barbucci, G. Csini, P. Ferruti, and F. Tempesti, *Surface-grafted heparinizable material*, Polymer, 26, 1349-1352, 1985.
12. X. Ma, S. F. Mohammad, and S. W. Kim, *Heparin binding on poly (L-lysine) immobilized surface*, J. Colloid Interface Sci., 147, 251-261 (1991).
13. X. Ma, S. F. Mohammad, and S. W. Kim, *Interaction of heparin with polyallylamine-immobilized surfaces*, J. Biomed. Mater. Res., 27, 357-365, 1993.

=국문초록=

혈액으로부터 헤파린을 선택적으로 제거하기 위하여 cellulose 기질에 양이온 고분자인 poly(allylamine) (PALA)을 새로운 방법으로 고정화하여 헤파린 제거제를 제조한 다음 *in vitro* 헤파린 용액내에서 흡착실험을 행하여, 미처리 cellulose control과의 흡착능을 비교하였다. 제조된 헤파린 제거제와 미처리 cellulose의 표면적은 각각 1.36 및 2.56 m²/g로 개질처리된 경우의 표면적이 약 1/2로 감소하였다. 또한 제조된 헤파린 제거제에 흡착된 헤파린의 양은 개질 방법에 따라 0.16~0.30 μg/cm²로 미처리 cellulose (0.03 μg/cm²)보다 월등히 우수한 헤파린 흡착능을 나타내었다.