

〈研究論文(學術)〉

生體適合性 高分子의 開發과 應用(I)

— Phosphoryl choline기를 가진 셀룰로오즈 그래프트 共重合體의 生體適合性 —

이미경 · 김문식 · 정석규 · 박수민

부산대학교 공과대학 섬유공학과
(1994년 10월 27일 접수)

Development and Application of Biocompatible Polymers(I)

— Biocompatibility of Cellulose Graft Copolymer with Phosphoryl Choline Groups —

Mi Kyung Lee, Moon Sik Kim, Suk Kyu Jung and Soo Min Park

Dept. of Textile Eng., College of Eng., Pusan National Univ., Pusan, 609-735, Korea

(Received October 27, 1994)

Abstract—To improve the blood compatibility of cellulose membrane, 2-(methacryloyloxy)ethyl-2-(trimethylammonium)ethyl phosphate(MTP), which is a methacrylate with phospholipid polar group, and glycidyl methacrylate(GMA) were grafted simultaneously on the surface of membrane and the biocompatibility of grafted membrane was investigated.

There was no difference of permeability between the MTP and GMA-grafted and the original cellulose membrane. The permeation pathway for a solute whose molecular weight was above 10^4 is maintained after grafting on the surface of membrane.

The cellulose membrane grafted with MTP and GMA effectively suppressed thrombogenicity for the rabbit blood. This effect became more clear with increasing the surface distribution of phospholipid polar groups.

1. 서 론

장기간 생체조직이나 혈액과 접촉하는 재료에서는 양호한 생체적합성이 요구된다. 특히 혈액과 접촉하는 경우는 혈전형성이라는 큰 문제가 있게 되는데 지금까지 생체적합성 재료의 연구개발에 대한 분자설계개념은 생체성분과 재료표면에 일어날 수 있는 상호작용을 재료의 화학구조를 설계하는 것에 의해 제어하는 데에 그 초점을 두어왔다.

폴리사카라이드나 폴리펩타이드로 구성된 브록크 및 그래프트 공중합체는 구조적 및 생화학적인 면에서 우수한 복합재료로서 주목을 받고 있다. 특히, 셀룰로오즈 및 그 유도체의 브록크 및 그래프트

공중합체 고분자는 의용재료로서의 응용성이 대단히 높고 평가받고 있다.

셀룰로오즈를 모체로 한 기존의 생의학재료를 보면 재생셀룰로오즈막, 화학개질셀룰로오즈막(Hemophane) 등이 혈액투석막으로, 옥시셀룰로오즈가 흡수성의 지혈제로, 그의 미분화 셀룰로오즈, 여러가지 셀룰로오즈유도체 등이 의약품의 조제코팅제 등으로 이용되고 있다. Miyamoto등¹⁾은 셀룰로오즈의 생체기능화를 두가지 방법에서 고려하였다. 그 한가지는 우수한 생체친화성을 가지는 PIC(Poly Ion Complex)를 셀룰로오즈에 고정화시켰다. 우선 양이온성 셀룰로오즈막을 만들고 여기에 카르복시메틸셀룰로오즈와 황산셀룰로오즈에 의해

피막을 형성시켜 최소한의 혈전형성과 최대한의 보체활성화작용을 가지는 셀룰로오즈막을 만드는 것이다. 두번째는 셀룰로오즈에 polypeptide의 블록 또는 그래프트 공중합에 의해 비교적 간단히 친/소수성의 바란스를 취하여 항혈전성 재료로서의 기능화를 도모하였다.

Inagaki 등²⁾은 poly(γ -benzyl-L-glutamate)와 poly(N-2-hydroxyethyl-L-glutamine)을 가진 셀룰로오즈 그래프트 고분자를 합성하고 in vivo혈액접촉실험으로 생체적합성을 검토하였다. 폴리에스테르 재료 표면 위에 코팅된 셀룰로오즈 그래프트 중합체는 1개월동안 개의 정맥에 삽입한 실험(Implantation)에서 어떠한 혈전응고를 보이지 않고 우수한 생체적합성을 보였음을 보고하였다. 이러한 공중합체와 관련하여 Anvy 등³⁾은 생체적합재료의 특성연구에 관한 그 예의 하나로 아미노산의 N-carboxyanhydrides(NCAs)의 셀룰로오즈알콕시유도체에의 공중합체로서 응용한 바이오재료로서의 응용가능성을 제시하였다.

Feng 등⁴⁾은 셀룰로오즈의 2-OH가 NH₂인 chitosan을 혈액적합성재료로서 보고하고 있다. Chitosan의 NH₂에 술폰산기를 도입하면 항응고제로서 작용되는 heparin과 유사구조가 되고 이것을 PVA와 blend시켜 만든 재료는 혈액응고작용에서 antithrombin III와 결합하여 thrombin의 활동을 억제하여 항혈전성을 나타내게 된다.

한편, 생체막은 Singer-Nicolson의 Fluid mosaic model과 같이 인지질을 주성분으로 하는 지질이 층층으로 되어 있다. 생체내 이식된 polyester가 양호한 혈액적합성을 나타내는 경우 표면에 생체내의 인지질의 흡착으로 이분자막구조를 취하기 때문이라고 보고가 되고 있다. 또, 인지질의 이중막으로 되어있는 lysosome을 혈액중에 넣어도 혈액세포에 주어지는 영향이 작은 것으로 알려져 있다. 이들의 사실로부터 생체막표면과 같이 인지질이 고도로 배향되어 형성된 표면은 극히 우수한 혈액적합성을 가진다고 생각되어진다.

따라서 이 논문에서는 좀더 진보하여 재료표면에 생체성분의 흡착층을 형성시켜 이것을 적극적으로 이용하는 보다 우수한 혈액적합성재료로서 인지질 극성기인 phosphoryl choline기를 가지는 모노머, 즉 2-(methacryloyloxy)ethyl-2-(trimethylammonium)ethyl phosphate(MTP)를 glycidylmethacrylate(GMA)와 함께 셀룰로오즈막에 그래프트 공중합한 고분자재료의 혈액적합성에 대한 연구를 보고한다.

2. 실험

2.1 시 료

인지질단량체 2-(methacryloyloxy)ethyl-2-(trimethylammonium)ethyl phosphate(MTP)는 전보⁵⁾의

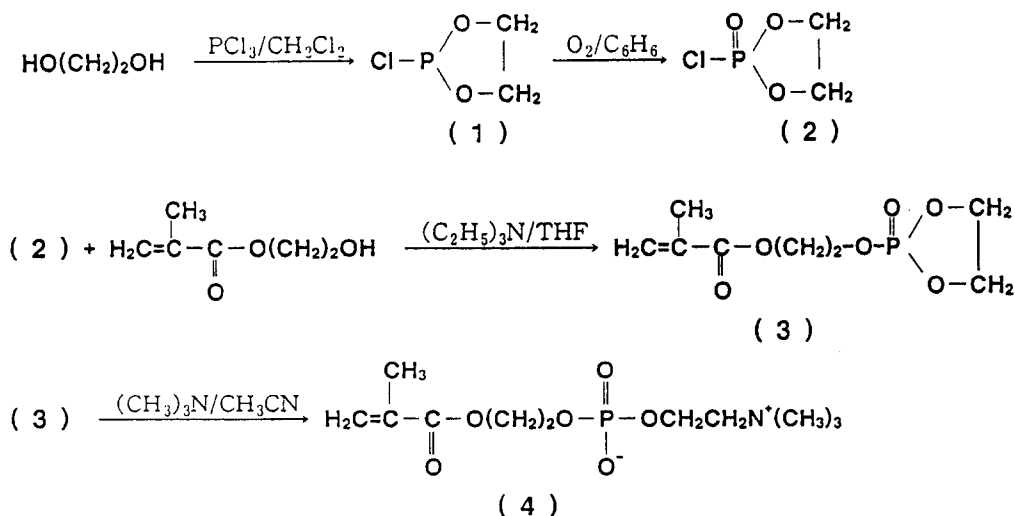


Fig. 1. Synthesis of MTP.

합성방법 Fig. 1에 의해 제조한 것을 이용하였고, glycidyl methacrylate(GMA)는 감압하에서 증류, 정제하여 사용하였다. 셀룰로오즈막으로서 Cuprophane™(Enka.A.G.Wappertal)을 이용하였다.

투과기질로 쓰인 glucose, lysozyme, bovin serum albumin(BSA), bovin serum γ -globulin은 Sigma. Co.Ltd로 부터 구입하였으며, 실험에 사용한 접촉혈액은 토끼의 신선혈을 채취하여 citric acid을 첨가하여 Ca^{2+} 을 제거한 혈액을 혈액점착실험에 사용하였다.

2.2 셀룰로오즈막에의 인지질극성기의 그래프트 중합

0.1 m mol/l Ce^{4+} 의 HNO_3 0.1N수용액을 제조하고 소정크기의 셀룰로오즈막을 넣고 여기에 소정농도의 인지질단량체(MTP) 및 GMA용액을 가한다. 반응계를 10분간 Argon으로 치환하고 40°C에서 1시간 그래프트중합을 하였다. 반응한 막을 충분히 세정하고 미반응의 단량체 및 단독중합체를 제거하였다 (Table 1).

Table 1. Graft polymerization of MTP and GMA onto cellulose membrane^{a)}

Code	[MTP] in feed	[GMA] in feed	[Ce^{4+}] in feed
	(m mol/l)	(m mol/l)	(m mol/l)
C - 0	-	-	-
MGC - I	10.0	40.0	1.0
- II	20.0	30.0	1.0
- III	30.0	20.0	1.0
- IV	40.0	10.0	1.0

- a) Monomer solution total 50ml
- Initiation solution total 1ml
- Membrane area 25cm², 40°C×1hr

셀룰로오즈막에 대한 그래프트 중합체의 구조는 X-ray photoelectron(XPS, Shimatzu, ESCA-750, JPN) 및 FT-IR Spectroscopy(Nicolet DX-20 U.S.A.)로서 확인하였다.

2.3 생체성분의 투과성질

Fig. 2는 생체성분의 투과성질 평가를 위한 투과장치로서 팽윤막을 사이에 둔 2실 투과 cell을 사용하였다. cell 1에 pH 7.4의 인산완충액 50ml의 기질투과액을 넣고 36.5°C를 유지시키면서 완충액 50 ml로 충만된 cell 2에 일정 투과 시간에 따른 기질투과량을 UV spectrophotometer와 HPLC을 이용하여 측정하였다.

2.4 혈액적합성의 평가

막을 혈액과의 소정시간의 접촉 후 2.0 wt% glutaraldehyde를 함유한 식염수용액에 처리하여 점착성분을 고정시키고 인산완충액(pH 7.4)으로 세정 후 건조 후에 금으로 코팅했다. 이 처리막의 표면에 점착성분의 상태를 SEM(Comtec CSM-501)로서 관찰하였다.

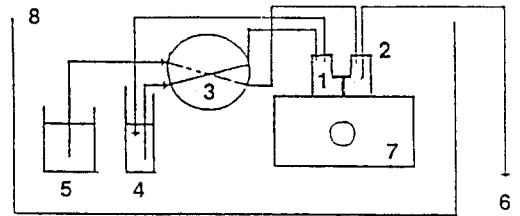


Fig. 2. Permeation apparatus for membrane. 1. Membrane, 2. Diffusion cell, 3. Micro-pump, 4. Penetrant soln., 5. Buffer soln., 6. Sampling tube, 7. Magnetic stirrer, 8. Constant water bath.

3. 결과 및 고찰

3.1 IR 및 ESCA 분석에 의한 그래프팅의 확인

Fig. 3에 셀룰로오즈막(A)과 MTP가 그래프팅된 막(B)의 IR spectrum을 보이고 있다. 1720cm⁻¹에서 C=O, 1250cm⁻¹에서 P=O, 800cm⁻¹에서 P-O-C, 970cm⁻¹에서 phosphoryl choline의 흡수가 관찰되며 이것은 셀룰로오즈막(A)에 있어서는 보여지지 않았다. 따라서 MTP가 셀룰로오즈막에 그래프팅되고 있음을 알 수가 있었다.

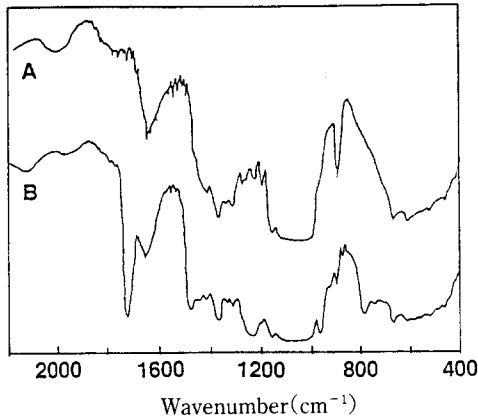


Fig. 3. Representative IR spectra of cellulose membrane(A) and MTP and GMA grafted cellulose membrane(B).

Fig. 4는 그래프트 중합한 막의 ESCA spectrum을 셀룰로오즈막과 비교하고 있는데 셀룰로오즈막에서는 보이지않는 402eV의 N peak와 133eV의 P peak가 관찰되고 있다. 이로부터 MTP가 그 구조를 유지한 채 막표면에 조직적으로 그래프트되고 있음을 확인할 수 있었다.

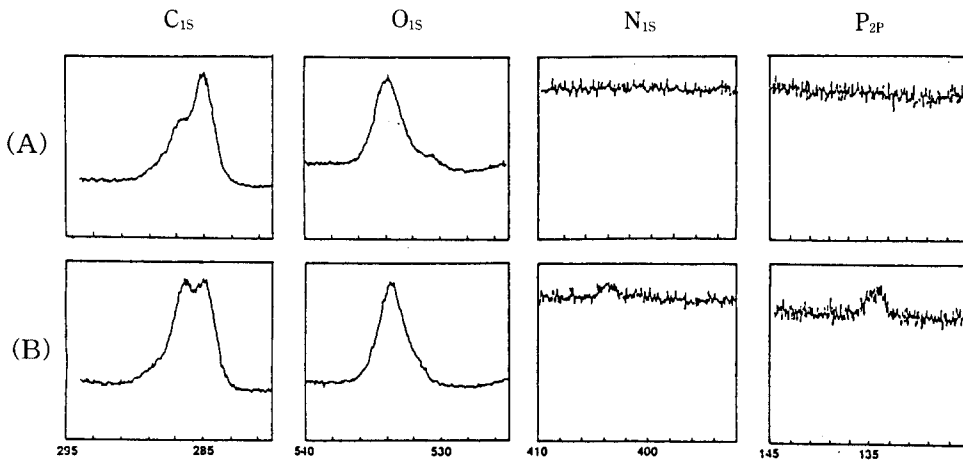


Fig. 4. X-ray photoelectron spectra of cellulose membrane(A) and MTP and GMA grafted cellulose membrane(B). MGC-IV.

3.2 생체성분의 투과성질

막의 물질수송현상은 생의학적 분야, 즉 hemodialysis, biosensor, bioreactor등에 응용되기 위해서는 요구되어지는 중요한 성질중의 하나이다.

Fig. 5는 셀룰로오즈막과 MGC막을 통한 투과 특성으로 여러 생체성분의 투과기질의 분자량과 투과계수와의 관계를 나타낸 것이다. 10⁴이하의 분자량에서는 셀룰로오즈막의 투과계수보다도 MGC의 투과계수가 약간 감소하는 경향을 보이고 있으나 그 차는 아주 미소한 것이며 10⁴ 이상의 분자량에서는 이들의 투과계수가 급격히 감소하는 경향을 나타내고 있다. 따라서 MTP와 GMA가 그래프트된 셀룰로오즈막은 그 투과성에 혈액성분의 분자량에 따른 선택성이 있음을 알 수가 있으며 이러한 선택성을 요구하는 분야에 대한 응용가능성을 시사하고 있다. 이 결과는 Colton등⁶⁾의 hollow fiber dialyser(Cordis Dow Model-3) 막계에서의 생체성분의 물질수송현상의 결과와 잘 일치하고 있다.

이상의 투과특성은 현재 행하여지고 있는 셀룰로오즈계 혈액투석막의 투과특성과 같은 경향을 보이고 있다. 한편 MTP와 BMA와 GMA를 공중합한 고분자⁵⁾의 셀룰로오즈 코팅막에서의

생체성분의 투과특성과 비교할 때 동일정향을 발견할 수 있으며 일련의 연구결과는 생체성분의 수송특성의 유사성으로 생체에 적합한 응용가능성을 시사하고 있다.

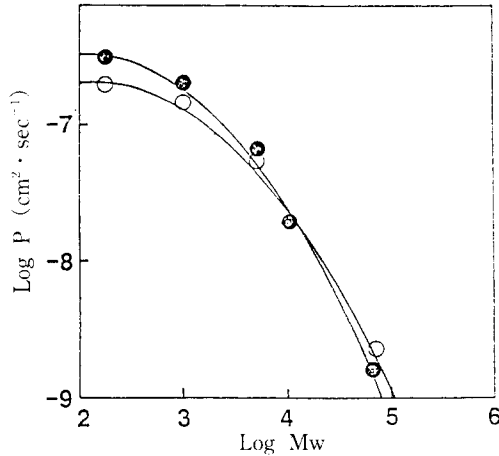


Fig. 5. Relation between molecular weight and permeation coefficient at 35.6°C and pH 7.4.
 (●) MGC-0, (○) MGC-IV

3.3 항혈전성의 평가

토끼의 전혈을 이용한 소정시간 동안의 혈액 점착 실험 결과를 Fig. 6, 7에 나타내었다. 그 결과 MGC-IV에서 가장 억제되고 있는 것을 알 수가 있다. 이것은 MGC막에 혈액과 접촉했을 때 생체 내의 단백질 및 세포와의 상호작용보다도 인지질과 MGC막의 인지질특성기를 가진 MTP와의 상호작용이 커서 먼저 고도로 배향되어 표면에 흡착층을 형성시킨다. 그 결과 생체막과 유사한 구조인 이분자층구조를 형성하여 단백질을 비롯한 다른 생체성분의 흡착을 억제시켜 결국 항혈전성이 생기는 것으로 생각되어진다.

이상의 결과는 인지질고분자의 셀룰로오즈 코팅막의 혈소판성분의 점착실험결과와 유사함을 보이고 있으며 고분자 재료 표면의 인지질의 분포와 크게 관계하고 있음을 보이고 있다. 한편, dimyristoylphosphatidyl choline 인지질 이중층막을 코팅한 polyamide 마이크로캡슐에 대한 혈소판 점착실험은 이상의 고분자상의 인지질 분포의 효과를 암시하고 있다.¹⁰⁾ 또 Noishiki등¹¹⁾의 생체유사막을 polyester 고분자표면에 형성시켜 혈액적합성의 효과를 검증한 결과도 상기실험과 유사성을 찾을 수 있다.

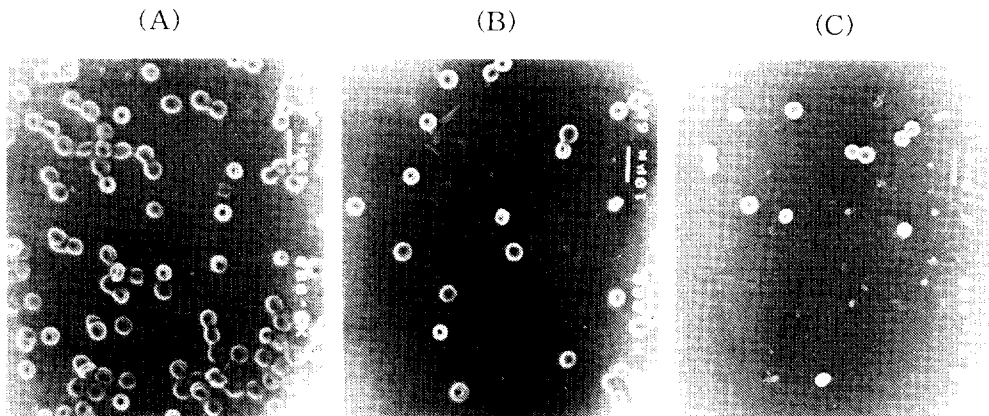


Fig. 6. SEM pictures of whole blood cell adhered on the surface of cellulose membrane grafted with MTP and GMA.
 Treated time : 60min.
 (A) MGC-0, (B) MGC-II, (C) MGC-IV

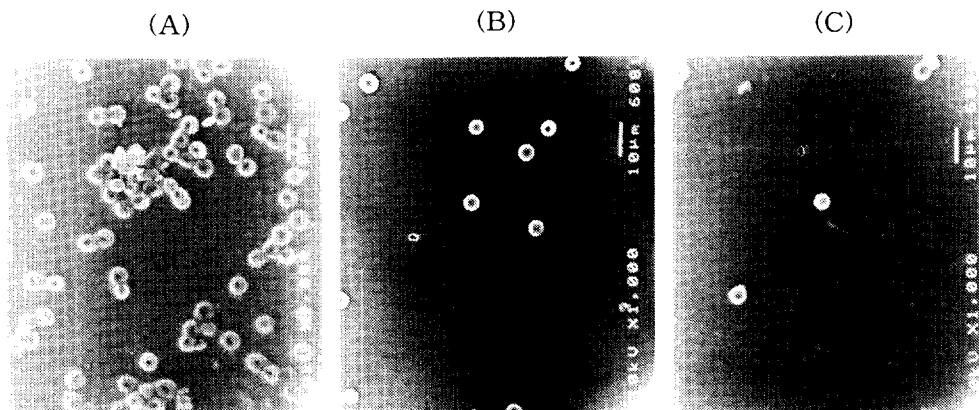


Fig. 7. SEM pictures of whole blood cell adhered on the surface of cellulose membrane grafted with MTP and GMA.

Treated time : 120min.

(A) MGC-0, (B) MGC-II, (C) MGC-IV

4. 결 론

참 고 문 헌

셀룰로오즈막의 혈액적합성을 향상시키기 위해 인지질극성기를 가지는 methacrylate, 즉 2-(methacryloyloxy)ethyl-2-(trimethylammonium) ethyl phosphate (MTP)와 glycidyl methacrylate(GMA)를 막에 그래프트하고 그의 성질을 고찰하였다.

셀룰로오즈막과 MTP와 GMA가 그래프트된 셀룰로오즈막의 투과성에는 차이가 없었고, 그래프트 후에도 10⁴ 이상의 분자량의 기질에 대한 투과경로는 동일하였다.

또, MTP와 GMA가 그래프트된 셀룰로오즈막에서는 토끼의 전혈실험에서 생체성분의 점착이 효과적으로 억제되고 있음을 알 수 있었으며, 이 효과는 인지질극성기의 표면분포가 증가함에 따라 더욱 뚜렷한 양상을 보였다.

감사의 글 : 본 연구는 1993년도 교육부지원 한국학술진흥재단의 자유공모 과제외 학술 조성비에 의하여 수행된 것으로 이에 동재단에 감사의 뜻을 표합니다.

1. 宮本武明, 高分子加工(日本), 38, 269(1989).
2. T. Miyamoto, S. Takahashi, S. Tsuji, H. Ito, and H. Inagaki, *J. Appl. Polym. Sci.*, 31, 2303(1986).
3. Y. Avny and A. Zilkha, *Israel J. Chem.*, 3, 207(1966).
4. X. G. Feng, L. D. Qing, and Z. Han, "*Polymers and Biomaterials*", Elsevier science Publishers B.V.(1991).
5. S. Park, *J. Kor. Fiber Soc.*, 29, 32(1992).
6. C. K. Colton and E. G. Lowrie, "*Hemodialysis in the Kidney*", Vol.2, 2nd Ed.(B. M. Brenner and F. C. Rector Eds), W. B. Saunders Co., Philadelphia(1981).
7. M. Lee, S. Jung, H. Kim, H. Cho, K. Kim and S. Park, *J. Kor. Fiber Soc.*, 30, 823(1993).
8. K. Kono, Y. Ito, S. Kimura, and Y. Imaish, *Biomaterials*, 10, 455(1988).
9. Y. Noishiki, *J. Biomed. Mater. Res.*, 10, 759(1976).