

생체적합성을 가진 천연고분자의 응용 및 기능성에 관한 연구

김태훈·김두언·심아영*

대불대학교 안경광학과

(접수 2009. 7. 31; 수정 2009. 8. 12; 게재확정 2009. 8. 13)

Study on the Functionality and Application of Natural-polymer with Biocompatibility

Tae-Hun Kim, Doo-Eon Kim, and A-Young Sung*

Department of Ophthalmic Optics, Daebul University, Jeomman, 526-702, Korea

(Received July 31, 2009; Revised August 12, 2009; Accepted August 13, 2009)

요 약. 천연고분자물질인 키토산은 생체적합성과 생체활성이 좋은 특성을 가지고 있기 때문에 생체의료용 재료로 중요하게 다루어지고 있다. 본 연구는 수용성 키토산을 교차결합제인 EGDMA (ethylene glycol dimethacrylate)와 HEMA (2-hydroxyethyl methacrylate), MMA (methylmethacrylate), MA (methacrylic Acid) 그리고 개시제인 AIBN을 사용하여 공중합 하였다. 공중합한 안의료용 재료의 물리적 특성을 측정한 결과 함유율 24~59%, 가시광선 투과율 88~89%, 인장강도 0.1~2.4 Kgf를 나타내었다. 또한 포도상구균, 녹농균에 대한 항균성 시험 결과 키토산을 포함하지 않은 고분자에 비해 높은 항균성을 나타내어 향후 이 공중합체가 고기능성을 가진 안의료용 재료로 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

주제어: 키토산, 생체적합성, 천연고분자

ABSTRACT. Chitosan, a natural polymer, has been importantly considered as biomedical materials due to its good biocompatibility and various bio-active characteristics. Water soluble chitosan was then copolymerized EGDMA(ethylene glycol dimethacrylate; used as a cross-linking agent for the free-radical copolymerization), MMA (methylmethacrylate), MA (methacrylic acid) in the presence of AIBN (azobisisobutyronitrile) as a radical initiator. The water content and visible transmissibility, ultimate strength of copolymerized ophthalmic polymer were measured to be 24~59%, 88~89% and 0.1~2.4 Kgf, respectively. And also, we tested for antimicrobial activities against staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa. They showed that in case of antimicrobial activities, the values including chitosan were much higher than that of the polymers of no including chitosan, suggesting that the copolymer can be used as a novel ophthalmic material of high performance.

Keywords: Chitosan, Biocompatibility, Natural polymer

서 론

최근 저탄소 녹색성장 산업이 주목을 받고 있는 상황에서 천연 유래 고분자 재료인 키틴과 키토산은 기능성 신소재로 각광을 받고 있다. 키틴은 계, 새우 등의 갑각류와 조류나 균류와 같은 식물의 세포벽에 함유 되어 있는 고분자로 과거에

는 주로 폐기되었으나, 최근에 들어 생체고분자로서 그 활용이 매우 큰 물질이다.^{1,3} 그러나 키틴은 유기용매에 대한 용해성이 좋지 않아 자연유래 고분자 재료인 셀룰로오스만큼 이용되지 못하였지만, 1970년 키틴의 용매 개발과 함께 키틴을 탈아세틸화하여 제조한 키토산은 생체적합성, 생분해성 및 무독성의 특성으로 인해 다양한 형

태로 활용되고 있다.⁴ 특히 키토산과 그 염산염에 의한 분해물이 식물병원성의 곰팡이에 대해 항균 효과를 나타낸다는 것이 밝혀지면서 기능성 효과에 대한 연구가 급속히 진행되었으며, 최근에도 그 항균성을 다양한 형태로 응용하여 사용하는 연구가 많이 진행되고 있다.^{5,8}

이런 키토산과 키토산의 다양한 응용분야 중 각막 위에 직접 접촉하여 착용되는 콘택트렌즈의 경우 세균과 진균에 의해 여러 가지 안과적 부작용과 안질환을 유발하는 가능성이 매우 크기 때문에 그 활용도가 매우 좋을 수 있다. 실제로 콘택트렌즈로 인해 발생하는 부작용과 안질환은 여러 연구에서 심각한 문제점으로 지적되어 왔으며,^{9,10} 이를 줄이기 위해 재료의 기능성을 부여하는 연구가 활발하게 진행되고 있다.^{11,12}

안의료용 소재로 사용하기 위해서는 이런 기능성뿐만 아니라 시력교정을 위한 광투과율, 착용감을 위한 함수율, 내구성을 위한 인장강도 등을 기본적으로 만족해야 한다. 이에 본 연구는 키토산의 안의료용 고분자로서의 활용성을 알아보기 위해 2-hydroxyethyl methacrylate, methyl methacrylate, ethylene glycol dimethacrylate, methacrylic acid 등의 콘택트렌즈 재료에 키토산을 일정 비율로 공중합하여 콘택트렌즈를 제조하고, 제조된 콘택트렌즈의 기본적인 물성 및 항균효과를 평가하여 기능성 콘택트렌즈에 대한 키토산의 활용 가능성을 알아보았다.

실 험

기기 및 분석

함수율 측정은 ISO 18369-4:2006, Ophthalmic optics-Contact lenses-Part 4: Physicochemical properties of contact lens materials의 gravimetric method를 사용하여 측정하였다. 함수율은 실온에서 0.9%의 염화나트륨 생리 식염수에서 완전히 수화시킨 후 수화된 재료의 물의 무게를 수화된 재료의 무게로 나누어 백분율로 표시하였다.

렌즈 표면의 수분 제거는 Whatman #1 filter paper를 사용한 Wet blotting 방법으로 하였으며, 수화된 시험시료를 CaSO₄가 반쯤 채워진 specimen jar에 넣고 oven에서 110 °C의 온도로 16시간 동안 건조

시킨 후 건조된 무게를 측정하였다. 광투과율은 TOPCON TM-2를 사용하였으며, 광투과율은 가시광선 영역과 UV-A, UV-B를 측정하였다. 특정 파장 λ_1 에서 λ_2 까지의 평균 투과율(τ)은 다음 식(1)을 사용하여 계산하였다.

$$\tau(\lambda_1, \lambda_2) = \frac{1}{\lambda_2 - \lambda_1} \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} \tau(\lambda) d\lambda \quad (1)$$

인장강도는 AIKOH Engineering사의 Model-RX Series를 사용하여 측정하였으며, 24시간 수화시킨 후 렌즈 표면의 수분을 제거한 상태에서 0초에서 30초의 시간 동안 0.03 ~ 2.00 kgf의 힘이 가해졌을 때 렌즈가 파괴 되는 최고값을 인장강도 값으로 나타내었다.

항균성 실험에 사용한 균주는 식품의약품안전청에서 분양받은 E.coli ATCC 10536, staphylococcus aureus ATCC 6538P를 각각 배양하여 사용하였다. 미생물 배양기는 Shaking incubator, Model No. DSK-511, KOMA를 사용하였다. 항균성 검사에 사용된 흡광도 측정기는 UV-Vis. Spectrophotometer, Model No. 8453E를 사용하였다.

고분자 중합 및 제조

실험에 사용된 모든 유리초자는 세제로 깨끗이 세척 후 불꽃 혹은 오븐에서 장시간 완전히 건조 후 사용하였다. 중합에 사용한 열 중탕기는 Vision에서 제조한 KMC-1205이며, 사용한 시약은 Aldrich사에서 구입한 HEMA (2-hydroxyethyl methacrylate), MMA (methylmethacrylate), MA (methacrylic acid), EGDMA (ethyleneglycol dimethacrylate) AIBN (azobisisobutyronitrile) 특급 시약을 사용하였으며, 수용성 chitosan은 효소법에 의해 제조한 순도 99% 제품을 사용하였다. HEMA는 NaCl을 넣어 1시간 동안 교반시켜 수분을 제거한 후 진공 증류를 통해 HEMA를 분리하였으며, HEMA에 들어있는 중합 방지제 hydroquinone 또한 제거하였다. 이 때 순수한 HEMA는 200 °C에서 분리되었다. 건조된 100 mL flask에 수용성 chitosan 10 g을 넣은 후, chitosan이 완전히 용해될 때까지 3차 증류수를 가하면서 교반시켰다. 별도로 잘 건조된 500 mL flask에 HEMA, MA, EGDMA, MMA를 비율에 따라 넣은 후 약 30

분 동안 교반하였다. 이 용액에 HEMA 중량의 5%에 해당되는 chitosan 수용액을 넣어 교반시킨 후 감압 깔때기로 여과하였다.

실험에 사용한 콘택트렌즈 제조 방법으로는 캐스트 몰드법(cast mould)을 사용하여 렌즈를 제조하였으며, 개시제로 AIBN (azobisisobutyronitrile)을 사용하였다. 여과된 용액을 콘택트렌즈 몰드에 주입시키고 70 °C에서 40분간 유지하였으며, 80 °C에서 40분간 가열하였다. 마지막으로 100 °C에서 40분간 일처리 공정을 거쳐 완성하였다. 각각의 콘택트렌즈 sample은 0.9%의 임피나프롬 생리 식염수에 24시간 수화시킨 후 함유율, 광투과율, 인장강도 등의 물리적 특성을 측정하였다. 또한 키토산의 콘택트렌즈 활용 가능성을 다양하게 알아보기 위해 MA (methacrylic acid)의 비율을 약 1 ~ 10%로 변화시켜 저함수 및 고탍수 콘택트렌즈에서의 물리적 특성을 평가하였다.

항균 Test

본 실험에서는 액체배지에 균을 접종하고 여기에 항균성이 기대되는 chitosan을 첨가한 콘택트렌즈와 첨가하지 않은 콘택트렌즈를 각각 넣고 배양시키면서 660 nm 파장의 흡광도에 따른 균의 증식곡선을 통하여 항균성 유무를 확인하였다. 배양시킬 때 액체배지 내에 콘택트렌즈가 가라앉아 정체될 경우 액체 내의 균집성이 감소되기 때문에 이러한 모순을 방지하기 위하여 shaking incubator에서 배양하였다.

항균성을 알아보기 위한 균으로는 포도상구균(staphylococcus aureus)과 녹농균(pseudomonas aeruginosa)을 사용하였다. 포도상구균은 연구에서 외맥립종(external hordeolum), 안검인열(marginal blepharitis), 급성카타르성 결막염(acute catarrhal

conjunctivitis), 만성카타르성 결막염(chronic catarrhal conjunctivitis), 만성세균결막염(chronic bacterial conjunctivitis), 중심각막궤양(central corneal ulcer)등의 여러 가지 질환을 일으키며, 녹농균(pseudomonas aeruginosa)은 콘택트렌즈 보관용기에 오염이 가장 잘되는 병원성 세균으로서 안구에는 녹농균각막궤양(pseudomonas corneal ulcer)의 질환을 유발하는 병원성 균이다.

실험결과를 비교하기 위해 키토산을 포함하지 않은 HEMA를 기본으로 제조된 콘택트렌즈를 대조군으로 하였으며, 이하 Reference 또는 Ref.라 명명하였다. 또한 HEMA와 chitosan(HEMA 중량의 5%) 중합체로 만든 콘택트렌즈(MA의 비율에 따라 이하 Sa.1, Sa.2, Sa.3)에 대하여 항균성 유무를 각각 실험하였다.

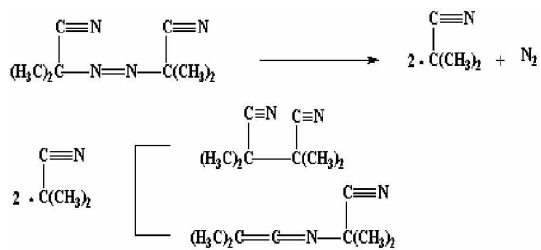
결과 및 고찰

고분자 중합 및 제조

HEMA에 첨가제와 chitosan을 넣고 70 °C에서 1시간 가열한 결과 개시제의 작용에 의해 monomer의 vinyl기에서 연쇄 중합반응이 일어났다. 중합수율은 모두 97% 이상으로 측정되었다. 자유 Radical 개시제에 의한 중합반응 mechanism를 Scheme 1에 나타내었다.

저함수 콘택트렌즈와 고탍수 콘택트렌즈에서의 키토산의 활용도를 알아보기 위해 공중합하는 monomer의 비율을 다르게 조정하였으며, MA의 비율에 따라 Sa. 1, Sa. 2, Sa. 3으로 각각 명명하였으며 그 배합비를 Table 1에 나타내었다.

중합 결과 투명하고 딱딱한 고분자가 생성되었으며, 몰드를 사용하여 표면이 매끄러운 콘택트렌즈가 제조되었으며, 완성된 콘택트렌즈를 Fig. 1에 나타내었다.



Scheme 1. Reaction mechanism by radical initiator.

Table 1. Compositions of samples.

	Unit : %				
	HEMA	MMA	MA	EGDMA	Chitosan
Ref.	93.70	5.00	1.00	0.30	-
Sa.1	88.70	5.00	1.00	0.30	5.00
Sa.2	84.70	5.00	5.00	0.30	5.00
Sa.3	79.70	5.00	10.00	0.30	5.00

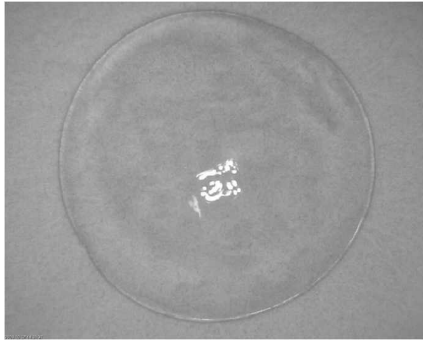
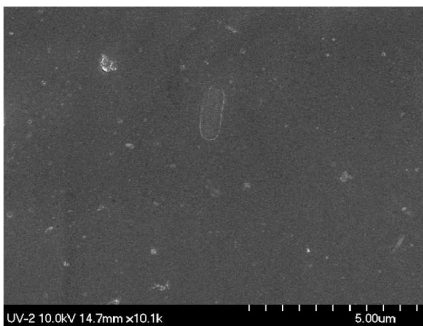
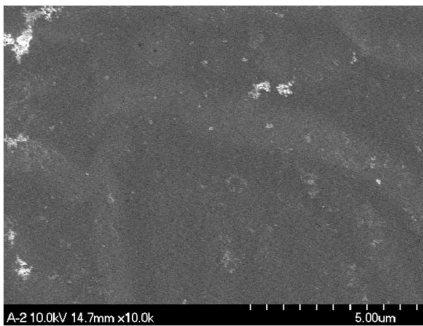


Fig. 1. Sample of contact lens.



(a) Contact lens reference



(b) Contact lens sample

Fig. 2. SEM photograph of contact lens.

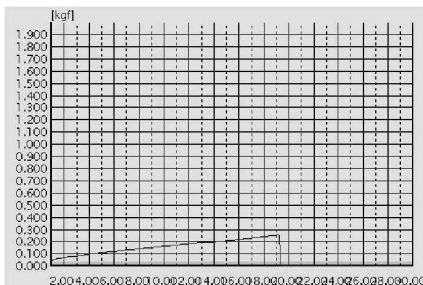


Fig. 3. Ultimate strength of contact lens sample.

제조된 콘택트렌즈를 0.9%의 염화나트륨 생리 식염수에 24시간 흡수시켜 부드러운 하이드로겔 콘택트렌즈 형상으로 만들었으며, 흡수율(water content), 광투과율(optical transmittance), 인장강도(ultimate strength)를 측정하여 각 sample의 평균값을 계산하였다. 제조된 콘택트렌즈 sample과 일반 콘택트렌즈에 대한 각각의 SEM 결과를 Fig. 2와 3에 각각 나타내었으며, 제조된 콘택트렌즈의 물리적 특성을 Table 2에 정리하였다.

실험 결과, 전체적으로 MA의 비율에 따라 물리적 특성이 변화되는 것을 알 수 있었다. 특히 chitosan의 존재 하에서도 MA의 비율이 증가할수록 흡수율이 점차 증가하는 경향을 나타냈으며, 인장강도의 경우는 MA의 비율이 증가할수록 다소 감소하는 경향을 나타냈다. 제조된 콘택트렌즈의 인장강도(ultimate strength)를 Fig. 3에 나타내었다.

광투과율의 경우, 자외선 영역에서 투과율이 모두 80% 이상으로 자외선을 차단하는 기능을 나타내지 않았으며, 가시광선 투과율은 모든 시료의 경우 89% 이상을 나타내어 콘택트렌즈의 광학적 성질을 만족하는 것으로 나타났다. 실험을 통해 저흡수 범위인 Sa.1과 고흡수 범위인 Sa.3에서 키토산으로 인해 콘택트렌즈가 갖추어야 할 기본적인 물성을 크게 변화시키지는 않는 것으로 나타났다. 제조된 콘택트렌즈의 광투과율을 Fig. 4에 나타내었다.

항균 Test

S.aureus균에 대한 항균성

Chitosan을 5% 함유한 콘택트렌즈 시험액(배지 + 항 + Sa.2)의 S.aureus 균증식 여부를 알아보

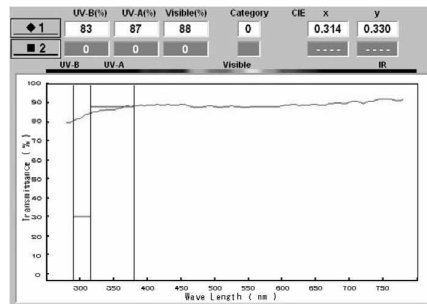


Fig. 4. Optical transmittance of contact lens sample.

Table 2. Physical properties of samples.

	Water content	Visible transmittance	UV-A transmittance	UV-B transmittance	Ultimate strength
Ref.	24.36	89.11	86.44	82.01	0.231
Sa.1	23.89	88.45	84.65	82.65	0.225
Sa.2	35.87	90.94	87.34	83.19	0.143
Sa.3	58.17	89.44	86.84	81.74	0.107

Unit : %

Table 3. Antimicrobial activity of Sa.2 for S.aureus.

		Before culture	1 day	2 days	3 days	4 days
Sa.2	Sa.2-1	0.000	0.000	0.000	0.002	0.098
	Sa.2-2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.048
	Sa.2-3	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Ref.	Ref.-1	0.000	0.108	0.099	0.101	0.188
	Ref.-2	0.000	0.111	0.095	0.135	0.215
	Ref.-3	0.000	0.118	0.126	0.185	0.228

Unit : Abs.

- Sa.2의 샘플 수량 4개, 8개, 16개를 각각 Sa.2-1, Sa.2-2, Sa.2-3로 명명

- Ref.의 샘플 수량 4개, 8개, 16개를 각각 Ref.-1, Ref.-2, Ref.-3로 명명

Table 4. Antimicrobial activity of Sa.2 for P.aeruginosa.

		Before culture	1 day	2 days	3 days	4 days
Sa.2	Sa.2-1	0.000	0.000	0.092	0.185	0.319
	Sa.2-2	0.000	0.000	0.000	0.096	0.263
	Sa.2-3	0.000	0.000	0.000	0.000	0.118
Ref.	Ref.-1	0.000	0.112	0.217	0.306	0.505
	Ref.-2	0.000	0.101	0.201	0.289	0.474
	Ref.-3	0.000	0.092	0.193	0.237	0.456

Unit - Abs.

기 위해 시험액의 흡광도 변화를 24시간 단위로 측정하여 얻은 결과 값을 Table 3에 나타내었다.

흡광도 측정 결과 blank-1(배지)의 값과 blank-3(배지+Ref.)의 값은 시간이 경과해도 변화가 없었고, Ref. 시험액(배지+균+Ref.)의 값은 Ref. 수량과 관계없이 동일하였으며, Ref. 시험액과 blank-2(배지+균)의 흡광도 값은 일치하였다. 따라서 배지의 조제 및 멸균, 균부유액의 조제, 시료(Sa.5와 Ref.)의 무균소독과정, 배양조건 등 모든 시험조작 및 과정에는 이상 없음을 확인하였다.

Ref. 시험액은 Ref. 수량에 관계없이 24시간 후 이미 균증식이 시작되었고, blank-3(배지+Ref.)을 기준으로 한 Sa.2 시험액의 흡광도 값은 시간의 경과에 따라 차이를 보였다. 즉, Sa.2를 4개 넣은 시험액은 3일 경과 후, 8개 넣은 시험액은 4일 경

과 후 이미 균 증식이 시작되었고, 16개를 넣은 시험액은 11일이 경과했어도 균증식이 되지 않았다.

P.aeruginosa균에 대한 항균성

Chitosan 5% 함유한 콘택트렌즈 시험액(배지+균+Sa.5)의 P.aeruginosa에 대한 균증식 여부를 알아보기 위해 시험액의 흡광도 변화를 24시간 단위로 측정하여 그 결과 값을 Table 4에 정리하였다.

흡광도 측정 결과, S.aureus균에 대한 실험결과와 같이 blank-1(배지)과 blank-3(배지+Ref.)의 흡광도 값은 시간이 경과해도 변화가 없었고, Ref. 시험액(배지+균+Ref.)의 흡광도 값은 Ref. 수량과 관계없이 동일하였으며, Ref. 시험액과 blank-2(배지+균)의 흡광도 값은 일치하였다.

Ref. 시험액은 Ref. 수량에 관계없이 24시간 후

이미 균 증식이 시작되었고, blank-3(배지 + Ref.)을 기준으로 한 Sa.2 시험액의 흡광도 값은 시간의 경과에 따라 차이를 보였다. 즉, Sa.2를 4개 넣은 시험액은 2일 경과 후, 8개 넣은 시험액은 3일 경과 후, 16개 넣은 시험액은 4일이 경과 후 이미 균증식이 시작되었다.

결 론

본 연구는 최근 들어 특히 항균성의 특징으로 인해 의료용 재료로 많이 활용 되는 키토산을 HEMA (2-hydroxyethyl methacrylate), MMA (methyl methacrylate), MA (methacrylic acid)와 공중합한 후 캐스트 몰드법을 사용하여 콘택트렌즈를 제조하였으며, 각각의 물리적 특성을 평가하였다. 또한 여러 가지 안과적 질환을 야기하는 포도상구균(staphylococcus aureus)과 녹농균(pseudomonas aeruginosa)에 대한 항균효과를 실험하였다. 실험 결과, 키토산을 포함하는 콘택트렌즈의 물리적 특성은 일반적인 콘택트렌즈와 유사한 특징을 나타내었으며, 고함수와 저함수 콘택트렌즈에서 모두 콘택트렌즈의 기본 물성을 만족하였다. 포도상구균(staphylococcus aureus)과 녹농균(pseudomonas aeruginosa)에 대한 항균성은 키토산의 비율별로 조금 다른 양상을 나타내었으나, 결과적으로 키토산의 첨가 비율이 높을수록 항균성이 뛰어난 것으로 나타났다. 본 연구를 통해 키토산은 콘택트렌즈의 일반적인 특성을 변화시키지 않으면서 항균성을 포함하는 재료로 활용될 가능성이 높다. 그러나 그 항균 지속력이 비교적 짧아 매일 착용 콘택트렌즈(daily wear contact lens) 보다

일회용 콘택트렌즈(disposable contact lens)에 더욱 효과적으로 사용될 수 있을 것으로 판단된다.

Acknowledgments. This research was financially supported by the Ministry of Education, Science Technology (MEST) and Korea Institute for Advancement of Technology (KIAT) through the Human Resource Training Project for Regional Innovation.

REFERENCES

1. Illum, L. *Pharmaceutical Research* **1998**, *15*, 1326.
2. Li, O.; Dunn, E. T.; Grandmaison, E. W.; Goosen, M. F. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* **1992**, *7*, 370.
3. Shahidi, F.; Arachchi, J. K. V.; Jeon, Y. J. *Trends Food Sci. Technol.* **1999**, *10*(1), 37.
4. Shigemasa, Y.; Saito, K.; Sashiwa, H.; Saimoto, H. *Int. J. Biol. Macromol.* **1994**, *16*, 43.
5. Allan, C. R.; Hadwiger, L. A. *Exp. Mycol.* **1979**, *3*, 285.
6. Kendra, D. F.; Hadwiger, L. A. *Exp. Mycol.* **1984**, *8*, 276.
7. Jung, B. O.; Lee, G. W. *J. Chitin Chitosan* **2006**, *11*(1), 34.
8. Han, S. M.; Park, J. K.; Ahn, B. J.; Lee, S. H. *J. Chitin Chitosan* **2008**, *13*(4), 193.
9. Gellatly, K. W.; Brennan, N. A.; Efron, N. *Am. J. Optometry Physiol. Opt.* **1988**, *65*, 934.
10. Soltys-Robitaille, C. E.; Ammon, D. M. Jr.; Valint, P. L. Jr.; Grobe, G. L. III *Biomaterials* **2001**, *22*(24), 3257.
11. Ye, K. H.; Kim, T. H.; Sung, A. Y. *Korean J. Vis. Sci.* **2008**, *9*, 459.
12. Kim, T. H.; Ye, K. H.; Kwon, Y. S.; Sung, A. Y. *J. Korean Oph. Opt. Soc.* **2006**, *11*(3), 259.