

## Copoly(urethane-g- $\gamma$ -benzyl-L-glutamate)에서의 혈소판 점착과 표면특성

장성욱 · 김정학 · 김계용 · 성용길\* · 조종수\*\*

한양대학교 공과대학 공업화학과 · \*동국대학교 화학과 · \*\*전남대학교 고분자공학과  
(1988년 3월 2일 접수)

## Platelet Adhesions on the Copoly(urethane-g- $\gamma$ -benzyl-L-glutamate) and the Surface Properties

Seong-Wook Jang, Jeong-Hak Kim, Kea-Yong Kim, Yong-Kile Sung\*, and Chong-Su Cho\*\*

*Dept. of Industrial Chemistry, College of Eng., Hanyang Univ., Seoul 133-791, Korea*

*\*Dept. of Chemistry, College of Science, Dongguk Univ., Seoul 100-715 Korea*

*\*\*Dept. of Polymer Engineering, Chonnam National Univ., Kwangju 500-757 Korea*

(Received March 2, 1988)

**요 약 :** 폴리우레탄에  $\gamma$ -benzyl-L-glutamate( $\gamma$ -BLG)를 그라프트시켜 공중합체의 혈액적합성을 검토하였다. 그라프트 공중합체는 음이온중합으로 합성하였다. 폴리우레탄을 dimethylformamide에 녹이고 0°C 항온으로 유지시켜 질소기류하에서 sodium hydride를 넣어 우레탄결합의 수소를 나트륨으로 치환시킨 다음 다시 *p*-bromoaniline으로 치환하여 아민기를 도입한 후 이 아민기를 개시제로  $\gamma$ -BLG를 그라프트공중합시켰다. 그라프트체의 길이는  $\gamma$ -BLG *N*-carboxyanhydride 양으로 조절하였다. 혈액적합성을 검토하기 위해 microsphere column법을 이용하였다. 합성한 공중합체를 코팅한 유리구슬을 충전시킨 코팅된 유리관에 혈액을 유출시켜 유리구슬표면에 코팅된 폴리머에 흡착된 혈소판의 모폴로지를 주사전자현미경으로 관찰하였으며 유출된 혈액으로부터 미흡착 혈소판의 수를 측정하였다. 또한 폴리머의 접촉각과 혈액응고시간을 측정하여 항혈전성을 검토하였다.

**Abstract :** Blood compatibility has been studied for copoly(urethane-g- $\gamma$ -benzyl-L-glutamate) which was synthesized by ring opening anionic polymerization of *N*-carboxyanhydride of  $\gamma$ -benzyl-L-glutamate( $\gamma$ -BLG NCA) with polyurethane. Polyurethane was dissolved in dehydrated dimethylformamide and added sodium hydride under nitrogen atmosphere at 0°C. After the hydrogens of urethane bonds were substituted by sodium, *p*-bromoaniline was added and then  $\gamma$ -benzyl-L-glutamate was graftcopolymerized on the amine substituted urethane bonds. In order to adjust the grafted chain length, the amount of  $\gamma$ -BLG NCA added was controlled. The microsphere column method was used for the evaluation of blood compatibility. Human blood was passed through the glass column packed with glass beads precoated with polymers and the behavior of platelet on the polymer surfaces was investigated by scanning electron microscope and average number of eluted platelets was also measured. The contact angle and the clotting time of samples were investigated in order to examine the thromboresistant property of copolymers.

## 서 론

과학의 발달로 여러가지 첨단소재가 개발되고 있으며 그중에서도 특이할만한 것은 고분자 재료를 이용한 의료용재료의 개발이다. 의료용으로 많이 사용되고 있는 재료는 항혈전성이 양호한 실리콘고무, 기계적성질이 우수한 우레탄, 그리고 PVC, PP등과 생체유사물질인 젤라틴 등이 있다. 현재 상품화되어 있는 Biomer,<sup>1</sup> Cardiothane, Avcothane<sup>2,3</sup> 등은 폴리우레탄을 주체원료로 사용한 것으로 인공심장, 인공혈관등의 제조에 사용되고 있다.

현재 국내의 연구기관에서도 의료용 재료에 대한 개발이 활발하게 진행되고 있으며, 본 연구이전에도 Kim 등<sup>4-7</sup>에 의하여 생체와의 친화성을 높이기 위해 생체단백질의 구성 성분인  $\gamma$ -BLG와 L-leucine으로 중합한 펩티드를 사용하여 좋은 결과를 얻은바 있으며 또한 비교적 항혈전성이 우수한 것으로 알려진 실리콘계 모노머와 아미노산을 공중합하여 좋은 결과를 얻고 있다.<sup>5,6</sup> 그러나 이들은 기계적성질과 공중합체의 용해성이 나쁘다는 문제점이 있다.

본 연구에서는 이들 단점을 보완하기 위하여 기계적성질이 우수하고 의료용재료로 널리 쓰이는 폴리우레탄에 생체단백질 구성 성분인 L-glutamic acid에 벤질 알콜을 반응시켜 만든  $\gamma$ -BLG를 그라프트공중합한 시료로 혈액적합성을 실험하였다.

폴리우레탄은 hard segment와 soft segment가 공존하는 불균일 구조로 되어 있으므로 생체와 친화성이 좋을 것이며 펩티드는 생체단백질이므로 이들의 공중합체인 poly(urethane-g- $\gamma$ -benzyl-L-glutamate) (이하 PU-g-BLG라고 함)는 항혈전성이 우수할 것으로 생각된다. 재료의 혈액적합성을 검토하기 위하여 재료표면의 임계표면장력( $\gamma_c$ )을조사하였으며 in vitro법으로 혈소판의 점착실험을 하였다.

## 실 험

## 시 약

폴리우레탄은 미국 Goodrich사의 제품인 Esthane 5707 F1(hard type)을 사용하였다. L-glutamic acid는 일본 Junsei Chemical Co. 제품 특급시약을 사용하였으며 benzyl alcohol은 Junsei Chemical 제품을 사용하였다. p-bromoaniline은 Merk Co. 제품을 사용하였다. 또한 dimethylformamide, tetrahydrofuran, n-헥산, 아세트산에틸 등은 일반적인 방법으로 탈수하여 사용하였다. Sodium hydride (Wako Pure Chemicals, abs, 60% in oil), trichloromethyl chloroformate(TCF, phosgene dimer, Hodogawa Chemical Co.) 등은 그대로 사용하였다.

### 그라프트 공중합체의 합성

$\gamma$ -BLG와  $\gamma$ -BLG NCA는 전보<sup>4,5</sup>와 같은 방법으로 합성하였으며 그라프트 공중합체(PU-g-BLG)는 음이온중합으로 합성하였다. 에스테르형 폴리우레탄 10g을 탈수정제한 DMF 140 ml에 용해시킨 다음 질소기류하에 온도를 0℃ 이하로 유지시키고 일정량의 NaH를 첨가하여 우레탄 결합 중의 수소를 나트륨으로 치환시키고  $\gamma$ -BLG NCA의 개시제 역할을 할 아민기를 도입하기 위하여 p-bromoaniline을 9g 적하하여 25분간 반응시켰다. 이와같이 합성한 aniline치환 폴리우레탄(PU-s-A 라고 함)을 물과 메탄올 1:1 용액에 침전시켜 생성물을 얻었다. 물과 메탄올 용액에 침전시키는 정제과정을 3회 반복하여 순수한 PU-s-A를 얻었다. 아민기가 도입된 것을 FT-IR(Nicolet 5 DX)로 확인하였다. 건조된 생성물을 DMF에 녹인후  $\gamma$ -BLG NCA를 넣어 상온에서 42시간 반응시켜서 그라프트 공중합체, PU-g-BLG를 합성하였다. 합성한 PU-g-BLG를 물과 메탄올용액에 침전시키고 감압건조한 다음 PBLG 단일중합체는 벤젠을 사용하여 soxhlet 장치로 제거하였다. 합성식은 Fig. 1과 같으며, 합성시 폴리우레탄에 대한  $\gamma$ -BLG NCA 첨가량 및 그라프트율을 Table 1에 나타내었다.

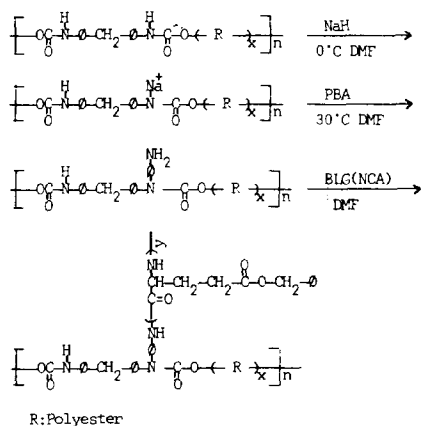


Fig. 1. Reaction scheme.

Table 1. Preparation of Graft Copolymer.

| Sample     | Monomer feed (g) | Grafting eff. (%) | Water content (%) |
|------------|------------------|-------------------|-------------------|
| PU         | —                | —                 | 5.0               |
| PU-g-BLG-1 | 0.7              | 10.7              | 4.3               |
| PU-g-BLG-2 | 1.5              | 22.5              | 2.3               |
| PU-g-BLG-3 | 3.0              | 37.4              | 2.1               |
| PU-g-BLG-4 | 4.5              | 60.0              | 1.6               |

0.02084 g NaH / 10 g PU, 4.5 g PBA / 10 g PU  
reaction time : 42 hr      reaction temperature : 30°C

#### 함수율 및 기계적성질 측정

합성한 PU-g-BLG의 함수율은 각 시료를 37°C로 유지시킨 항온조에서 14일간 팽윤시킨 다음 다음식으로 함수율을 계산하였다.

$$H_w = (W - W_0) / W_0 \times 100(\%)$$

$W_0$ 는 건조상태,  $W$ 는 팽윤상태에서의 PU-g-BLG의 무게이다.

각각의 시료를 THF에 녹여 필름상태로 제조하여 인장강도와 신장율을 측정하였다. 측정장치로는 Instron type의 Universal testing machine (Toyo Baldwin UTM-4-100)을 이용하였으며, cross-head speed는 20 mm/min, head간 거리는

10 mm의 조건에서 측정하였다.

#### 항혈전성 평가실험 및 임계표면장력측정

항혈전성 평가실험은 microsphere column법과 Lee-White법을 이용하여 전보<sup>4~6</sup>와 같은 방법으로 하였으며, 임계표면장력도 일본 Erma 광학사의 model G-1을 사용하여 전보<sup>4~6</sup>와 같은 방법으로 측정하였다.

#### 결과 및 고찰

본 실험에서는 현재 의료용 재료로 널리 쓰이고 있으며 기계적성질이 우수한 폴리우레탄에 단백질 구성 성분인 아미노산을 그래프트시켜 만든 공중합체(PU-g-BLG)에 대하여 혈액적합성을 검토하였다.

#### PU-g-BLG의 구조 확인

합성한 그래프트 공중합체의 구조를 FT-IR로 확인한 결과를 Fig. 2와 Fig. 3에 나타내었다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 아민기가 도입된 PU-s-A는 우레탄 결합중의 -NH기의 신축진동 피크가 3340 cm<sup>-1</sup>에서 3310 cm<sup>-1</sup>로 이동하였으며 피크의 끝부분이 둘로 갈라지는 것을 확인할 수 있었다.<sup>8</sup> 이를 통해 우레탄 결합의 -NH기에 아민기가 치환된 것을 확인할 수 있었다. 다음 Fig. 3에서 PU-g-BLG에서는 1650 cm<sup>-1</sup>부근의 amide I band와 1550 cm<sup>-1</sup>에서 N-H 굽힘 진동에 귀속하는 amide II band가 확인되었으며 여기서 그래프트된 펩티드 양이 증가함에 따라 피크의 강도가 증가하고 또한 1650 cm<sup>-1</sup>와 1550 cm<sup>-1</sup>는  $\alpha$ -helix 구조를 갖는 펩티드의 amide I과 amide II band로서 폴리우레탄에 그래프트된  $\gamma$ -BLG가  $\alpha$ -helix 구조를 갖고 있음을 알 수 있었다.<sup>9</sup>

#### 함수율 및 기계적성질 측정

함수율 및 기계적성질은 그래프트율이 증가함에 따라 감소하는 것을 알 수 있었다.

Table 2 및 Table 3, Fig. 4와 같은 현상이 나타나는 것은 폴리우레탄의 함수율, 인장강도 그리고 신장율이 폴리펩티드 보다 우수하기 때문에

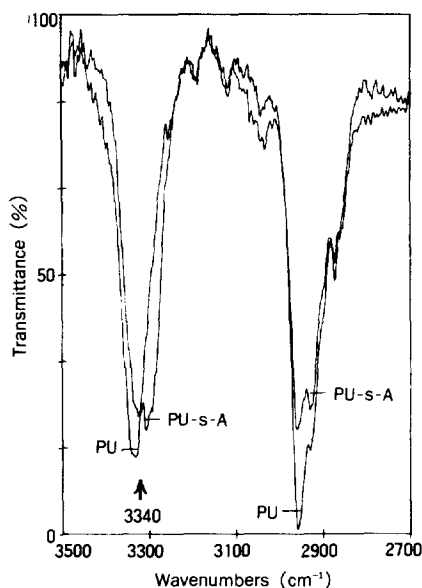


Fig. 2. IR spectra of PU and PU-s-A.

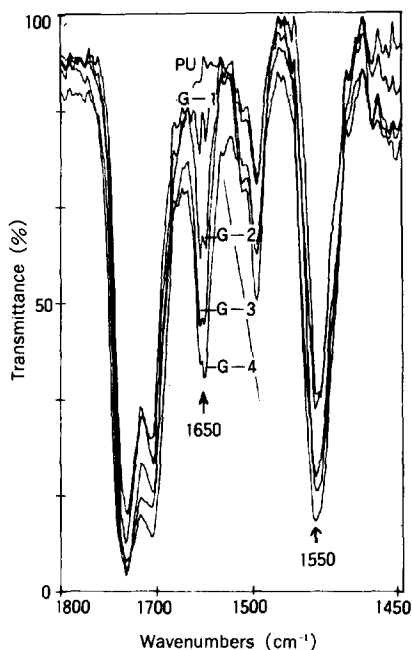


Fig. 3. IR spectra of PU-g-BLG.

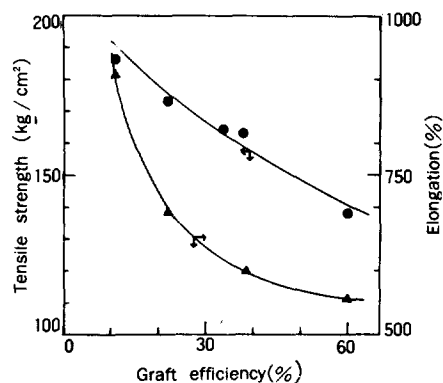
본 실험에서 사용된 공중합체는 폴리우레탄의 특성에 영향을 받는다고 생각된다.

Table 2. Water Content and Critical Surface Tension as a Function of Graft Efficiency.

| Sample     | Water content (%) | Critical surface tension (dyn/cm) | Graft eff. (%) |
|------------|-------------------|-----------------------------------|----------------|
| PU         | 5.0               | 20.0                              | —              |
| PU-g-BLG-1 | 4.3               | 33.0                              | 10.7           |
| PU-g-BLG-2 | 2.3               | 34.0                              | 22.5           |
| PU-g-BLG-3 | 2.1               | 28.0                              | 37.7           |
| PU-g-BLG-4 | 1.6               | 27.0                              | 60.0           |
| PBLG       | —                 | 38.0                              | —              |

Table 3. Mechanical Properties of Polymer Films.

| Sample     | Tensile strength (kg/cm²) | Elongation (%) |
|------------|---------------------------|----------------|
| PU         | 285                       | 1,213          |
| PU-g-BLG-1 | 186                       | 904            |
| PU-g-BLG-2 | 174                       | 688            |
| PU-g-BLG-3 | 164                       | 600            |
| PU-g-BLG-4 | 138                       | 557            |

Fig. 4. Effect of grafting efficiency on the mechanical properties of poly(urethane-g- $\gamma$ -benzyl-L-glutamate).

#### 점착 혈소판 수 측정

의료용재료의 항혈전성 평가 방법에는 in vivo 법과 in vitro 법이 있다. in vivo 평가법이란 생체내에 재료를 삽입하여 항혈전성을 실험하는 방

법이다. In vitro 평가법은 생체외에서 재료를 실험하는 방법인데, 이 중에서도 재료와 혈액을 접촉시켜 응고 시간을 측정하는 Lee-White 법이 간편하므로 많이 이용된다. In vitro 평가법의 단점으로는 혈액이 공기와 접촉하므로 혈액응고가 촉진되어 정확한 평가를 할 수 없다는 것이다. 따라서 본 실험에서는 Lee-White 법과 in vitro 법을 개량하여 혈액이 공기와 접촉하지 않도록 고안한 microsphere column 법을 이용하였다. Lee-White 법에 의한 응고시간을 Table 4에 나타내었다. 그리고 microsphere column 법으로 측정한 잔유혈소판수를 Fig. 5에 나타내었다. 그 결과 그라프트 공중합체에서는 펩티드 양이 증가함에 따라 혈소판 점착이 감소되는 것을 알 수 있었다.

Table 4. Clotting Time.

| Sample     | Clotting time<br>(second) | Clotting time<br>ratio |
|------------|---------------------------|------------------------|
| Glass      | 430                       | 1.00                   |
| PU         | 667                       | 1.55                   |
| PU-g-BLG-1 | 841                       | 1.95                   |
| PU-g-BLG-2 | 728                       | 1.69                   |
| PU-g-BLG-3 | 853                       | 1.98                   |
| PU-g-BLG-4 | 906                       | 2.10                   |
| PBLG       | 617                       | 1.43                   |

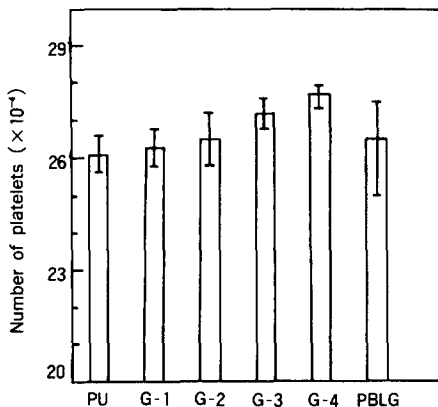


Fig. 5. Number of platelets remained in the sampling bottle.

#### 주사전자현미경에 의한 점착 혈소판의 관찰

각 PU-g-BLG 표면에 대한 혈소판의 점착 거동을 살펴보기 위하여 주사전자현미경으로 관찰한 사진을 Fig. 6에 나타내었다.

생체내의 혈액중의 혈소판의 모양은 원반형태인데 정상적인 혈관벽에서는 점착되지 않지만 혈관벽이 파괴되거나 이물질과 접촉하면 점착이 일어나게 된다. 재료표면에 점착되어 활성화된 혈소판은 형태변화를 일으켜서 구형의 형태로 변화하며 곧 이 구형의 바깥층에서 위축이 돌출한다. 이때 혈소판은 과립 내용물을 방출하여 응집을 촉진시키며 ADP, serotonin 등의 방출에 의하여 1차 혈전이 형성되고 곧이어 생성된 혈전주위에 불용성 fibrin이 생성되고 혈액이 완전히 응고된다.<sup>10</sup> 여기서 같은 시간동안 혈액을 통과 시켰을 때의 각 샘플에서의 모폴로지의 차이점을 Fig.6에서 구별할 수 있다. PU-g-BLG가 PU나 PBLG보다 혈소판점착이 덜 진행되었음을 알 수 있었다.

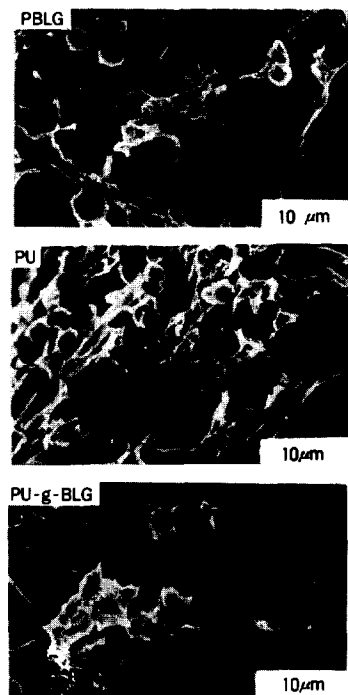


Fig. 6. Appearance of adhered platelets on the various polymer surfaces.

즉 PU-g-BLG가 PU나 PBLG 보다 항혈전성이 우수한 것을 알 수 있었다.

#### 중합체의 표면성질과 항혈전성

접촉각에 의한 임계표면 장력의 측정은 Zisman 등<sup>11</sup>에 의하여 많이 연구되었다. 즉, 고분자 표면 장력이  $\gamma_c = \gamma_s(\gamma_s$ : 고체표면장력)이라는 가정하에 Zisman은 고분자 표면에 대한 여러가지 액체의 접촉각,  $\theta$ 을 측정하여  $\cos\theta$ 와 액체의 표면장력 간에는 정비례 관계가 있다는 것을 밝혔다.

본 실험에서 사용된 중합체 시료의 임계표면장력은 20-40 dyn/cm의 값을 갖는 것을 알 수 있었는데 이 중에서도 G-3와 G-4가 20-30 dyn/cm 값을 나타내고 있으며 G-4가 항혈전성이 가장 좋은 것임을 알 수 있었으며 전보<sup>4~7</sup>에서 사용된 중합체들과 비교해 보면 임계표면장력은 비슷한 범위를 나타내고 있으며 공중합체의 기계적성질과 용해성은 향상되었음을 알 수 있었다. 또한 항혈전성은 전보와 같이 공중합체 일때 단일중합체보다 향상되는 것을 알 수 있었다.

#### 결 론

본 연구에서는 현재 항혈전성 재료로 널리 쓰이며 기계적성질이 우수한 폴리우레탄에 아미노산을 그래프트 공중합하여 혈액적합성을 검토한 결과 다음과 같은 사실을 알았다.

1. Baier나 Lyman이 주장하는 것과 같은 범위인 20-30 dyn/cm를 만족하는 임계표면장력을 갖는 PU-g-BLG가 이 범위를 벗어나는 다른 PU-g-BLG보다 항혈전성이 다소 우수함을 알 수 있었다.

2. 합성한 고분자 재료표면에서의 혈소판 접촉 거동과 평균 접촉 혈소판 수를 측정한 결과 PBLG

나 PU보다 PU-g-BLG의 항혈전성이 우수하며 이 중에서도 펩티드양이 증가함에 따라 조금 우수한 성질을 나타내는 것을 알 수 있었다.

이상의 결과로서 PU-g-BLG가 PU나 PBLG보다 다소 우수한 항혈전성을 갖는 것을 알 수 있었으며,  $\gamma$ -BLG에 친수성기를 도입하거나 친수성기를 갖는 펩티드를 사용하면 보다 좋은 결과를 얻을 수 있을 것으로 생각된다.

본 연구는 한국과학재단 목적 기초연구비로 수행되었으며 이에 감사합니다.

#### 참 고 문 헌

1. J. W. Boretos, et al., *J. Biomed. Mater. Res.*, **9**, 327(1975).
2. E. Nylias, et al., *J. Biomed. Mater. Res. Symp.*, No. 3, 129(1973).
3. R. C. Leinbach, et al., *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs*, **18**, 493(1972).
4. K. Y. Kim, et al., *Polymer(Korea)*, **5**, 44(1981).
5. K. Y. Kim, et al., *Polymer(Korea)*, **9**, 156(1985).
6. K. Y. Kim, et al., *Polymer(Korea)*, **9**, 572(1985).
7. K. Y. Kim, et al., *Polymer(Korea)*, **7**, 53(1983).
8. D. L. Pavia, "Introduction to Spectroscopy : A Guide for Students of Organic Chemistry", p. 63, 1979.
9. N. Minoura and T. Nakagawa, *J. Appl. Polym. Sci.*, **23**, 2729(1979).
10. D. C. B. Mills and J. B. Smith, *Biochem. J.*, **121**, 185(1971).
11. H. Y. Fox and W. A. Zisman, *J. Colloid. Sci.*, **7**, 109(1952).