

Block Copoly (dimethylsiloxane- γ -benzyl-L-glutamate) 의 抗血栓性에 관한 연구

李淳弘 · 金正鶴 · 金啓用

漢陽大學校 工科學 工業化學科

(1985년 1월 22일 접수)

Studies on the Thromboresistance of Block Copoly (dimethylsiloxane- γ -benzyl-L-glutamate)

Soon Hong Lee, Jeong Hak Kim, and Kea Yong Kim

*Dept. of Industrial Chemistry, College of Engineering, Hanyang University,
Seoul, 133, Korea.*

(Received January 22, 1985)

Abstract; The blood compatibility has been studied for block copoly (dimethylsiloxane- γ -benzyl-L-glutamate) which was synthesized by reacting primary amine-terminated living polydimethylsiloxane with N-carboxy anhydrides of γ -benzyl-L-glutamate. The living polydimethylsiloxane was prepared by polymerization of hexamethylcyclotrisiloxane (D_3) using n-butyllithium as initiator in toluene, and primary amine-terminated silicone was obtained from reacting living polydimethylsiloxane with γ -aminopropyltriethoxysilane. The blood compatibility of block copolymer was estimated in comparison with silicone, PBLG, and blendmer of PBLG/silicone by passing human blood through polymer precoated glass beads column. The behavior of platelet on the polymer surfaces was investigated by scanning electron microscopy and average number of eluted platelets was also measured.

1. 序 論

抗血栓性고분자재료를 개발하기 위해서는 소수성표면, 즉 표면자유에너지가 작은 不活性표면¹을 가지게 한다거나 생체물질에 유사한 음전하표면²⁻³을 가지게 하는 방법이 있다. 또 혈관내피조직과 유사한 hydrogel재료를 사용하는 방

법도있다⁴⁻⁵. 1960년대 초에 Lim과 Wichterle은 poly (hydroxyethyl methacrylate) (PHEMA)를 개발하여 hydrogel이 양호한 抗血栓性, 生體組織適合성을 가진다고 보고하였다⁶. hydrogel은 비교적 높은 표면에너지를 가지고 있으나 물과 hydrogel간의 계면에너지는 작게 된다. 이런 성질 때문에 異物반응에 중요한 역할을 하고 있는 단백질과의 상호작용을 작게하여 혈액응고를 일

오리게 하는 혈소판의 점착을 억제시키므로 우수한 抗血栓性을 가지게 된다. 이 밖에도 혈액응고 억제작용을 하는 heparine을 재료에 固定化시키는 방법도 있다⁷⁻⁸. 최근에는 친수-소수성의 불균일계 상분리구조를 가지는 재료가 抗血栓性이 우수하다는 보고가 있다⁹. 특히 재료의 표면특성은 혈소판 및 혈장단백질의 점착에 커다란 영향을 미치고 있기 때문에 표면특성과 抗血栓性과의 관계를 규명하기 위하여 많은 연구가 진행되고 있다. 혈액응고시간과 臨界表面張力(γ_c)의 상관관계를 정량적으로 검토한 결과 Baier와 Lyman 등은 臨界表面張력이 20~30 dyn/cm 범위의 재료가 生体適合性이 좋다고 보고 하였으며¹⁰ Leininger 등은 25 dyn/cm 부근의 값을 갖는 재료가 抗血栓性이 우수하다고 보고하고 있다⁸.

本 實驗에서는 抗血栓性이 비교적 좋은 silicone계 모노머와 생체구조성분인 펩티드계의 모노머를 원료로 block copolymer와 이들의 homopolymer 및 homopolymer blend를 제조하여 이들의 抗血栓性을 비교검토하였다.

2. 實 驗

2-1. 試 藥

Hexamethylcyclotrisiloxane (D₃)은 日本 Chisso社 製品 特級試藥을 실험전에 감압건조하여 사용하였고 L-glutamic acid는 日本 純正化学 製品(特級試藥)을 감압건조하여 사용하였다.

테트라히드로푸란을 비롯한 용매류는 일반법으로 탈수하여 사용하였다.

2-2. Amine terminated polydimethylsiloxane의 合成

Living polydimethylsiloxane은 상온에서 n-butyllithium을 개시제로 다음과 같은 방법으로 음이온 중합하였다¹¹.

3 구플라스크 내에서 hexamethylcyclotrisiloxane (D₃) 10.85g을 15ml 의 톨루엔에 용해시킨 후 질소기류하에서 n-butyllithium 10⁻⁴mol을 주입하였다. 또 중합촉진제로서 디메칠술폭시드를 30%(Vol %) 함유하는 톨루엔용액 2.5ml를 가한

후 상온에서 70시간 중합시켰다. 합성한 living polydimethylsiloxane은 γ -amino propyltriethoxysilane (GAPT)과 16시간 반응시켜 末端에 아미노기를 도입하였다. 아미노기를 도입시킨 중합체는 무수메탄올에 침전시켜 미반응물질을 제거한 후 저온에서 감압탈용매화 시켰다.

2-3. γ -BLG N-carboxy anhydride의 合成

γ -benzyl-L-glutamate (γ -BLG)는 L-glutamic acid와 벤질알코올을 진한 황산촉매하에서 에스테르화하여 합성하였다¹².

L-glutamic acid 88.2g, 벤질알코올 69ml, 물 39ml, 진한 황산 31.6ml를 70°C의 항온조에서 교반하며 반응시켰다. 반응이 완료된 후 감압증류하여 미반응물질을 제거한 후 생성물을 탄산수소나트륨수용액으로 중화시켜 침전된 結晶을 냉수로 씻고 끓는 물에 녹여 再結晶시키는 조작을 3회 반복하여 정제한 다음 생성된 結晶을 赤外線 照射下에서 수일간 감압건조시켜 순수한 γ -BLG를 얻었다.

γ -BLG N-carboxy anhydride (NCA)는 phosgene법¹³으로 합성하였다.

테트라히드로푸란에 포스젠 二量体인 trichloromethyl chloroformate (TCF)를 당량비로 아미노산의 1.3배 정도 과량을 가하여 40°C에서 1시간가량 분해시킨 다음 γ -BLG를 넣는다. 반응액이 투명해지면 감압하에서 탈용매과정을 거쳐 얻은 NCA에 n-헥산을 부어 저온(-20°C)에서 하루동안 방치하여 NCA의 結晶을 생성시켰다. 다시 이 crude NCA를 초산에틸과 n-헥산으로 용해도차에 의해 3회 再結晶하여 순수한 γ -BLG NCA를 얻었다.

2-4. 블록共重合体の 合成

블록공중합체는 중합용매로 클로로포름을 사용하여 polydimethylsiloxane의 末端에 도입된 아미노기를 개시제로 γ -BLG NCA를 질소기류하에 상온에서 180시간 공중합하여 합성하였다¹¹.

합성한 블록공중합체를 메탄올에 침전시켜 감압건조한 후 cyclohexane을 용매로 수일간 환류하여 silicone homopolymer를 제거하고 다시 디옥산을 용매로 같은 방법으로 PBLG homopoly-

mer를 제거하여 블록공중합체를 얻었다.

블록공중합체의 합성식은 다음과 같다.

합성한 블록공중합체는 Beckmann Infrared Spectro photometer Model 18-A를 사용하여 구조를 확인하였다.

Fig. 1에서 보는 바와 같이 1630cm⁻¹에 수소 결합을 한 C=O 이중결합의 신축진동에 귀속하는 amide I band, 1530cm⁻¹에 N-H굽힘진동에 귀속하는 amide II band가 있으며, N-H신축진동은 3300cm⁻¹에서 확인할 수 있었다. 또한 2960cm⁻¹에서 C-H굽힘 band가 강하게 나타났으며, Si-O굽힘 band는 1100~1000cm⁻¹에서 강하고 넓게 나타났다. Si-C peak는 800cm⁻¹에서 확인할 수 있었다.

블록공중합체의 조성측정은 NMR (Varian, 60 MHz)로 하였다. 중합시료를 클로로포름(CDCl₃)에 녹여 실온에서 측정하였다. Mark-Houwink¹⁴의 점도식으로 구한 블록공중합체중의 silicone의 분자량은 약 100,000 정도였다. 점도측점은

톨루엔을 용매로 20°C에서 측정하였다.

$$[\eta] = 2 \times 10^{-4} M_n^{0.66}$$

또 silicone의 methyl양성자의 면적과 PBLG에 붙어 있는 phenyl양성자의 면적비로부터 블록공중합체는 약 140,000 정도의 분자량을 가짐을 알 수 있었다. PBLG의 잔기당의 길이가 α -helix인 때 1.5Å 이므로 공중합체 중의 BLG의 길이는 240Å 이다.

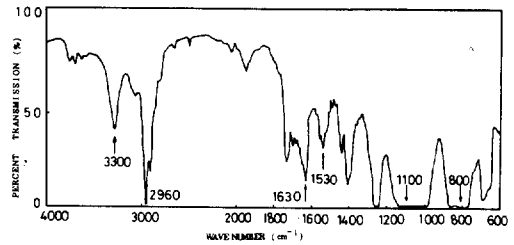
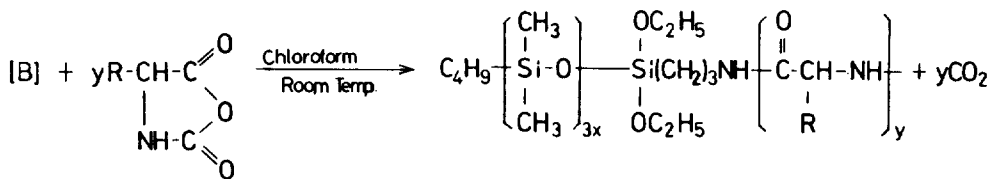
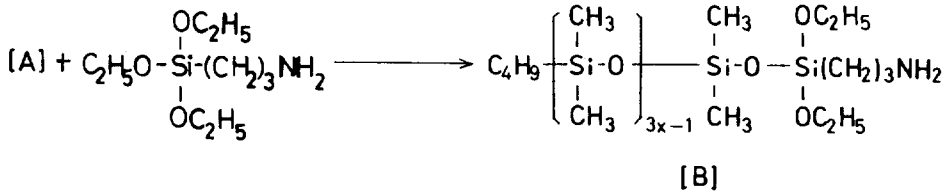
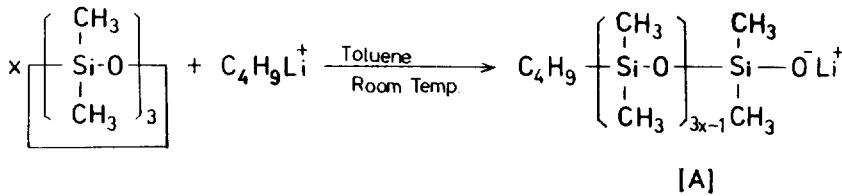


Fig. 1. IR spectrum of block copoly (dimethylsiloxane-g-BLG).



2-5. 試料 製造

블록공중합체와 비교하기 위하여 합성한 silicone의 분자량은 Mark-Houwink¹⁴의 점도식으로 구한 결과 약 700,000 정도였다. 그리고 poly-(γ -benzyl-L-glutamate) (PBLG)는 γ BLG NCA를 均一系 용매인 디옥산 중에서 트리에틸아민[(C₂H₅)₃N]을 개시제로 30°C에서 3일간 均一系 중합시켜 합성하였다.

Doty¹⁵의 점도식으로 구한 PBLG의 평균 분자량은 74,000이었다. 점도 측정엔 dichloro acetic acid (DCA)를 용매로 25°C에서 측정하였다.

$$[\eta] = 2.78 \times 10^{-5} M_n^{0.87} \text{ (cm}^3/\text{g)}$$

그리고 블렌드물은 silicone과 PBLG의 비를 1 : 1 (wt%)로 하였다.

抗血栓性을 검토하기 위하여 각 재료를 1% 클로로포름 용액으로 만든 다음 40~60mesh의 glass beads에 코팅시켜 시료로 사용하였다.

2-6. 抗血栓性的 評價實驗

각 재료에 대한 抗血栓性을 검토하기 위하여 Fig. 2와 같은 장치를 사용하여 실험을 하였다. 재료표면에서의 혈소판점착을 실험하기 위하여 폴리머를 코팅한 glass beads를 채운 column에 혈액을 통과시킨 다음 흡착되지 않고 유출되는 혈액 중의 평균 점착 혈소판수를 측정하였다.¹⁶

Fig. 2에서 (A)는 실린지펌프로서 일정한

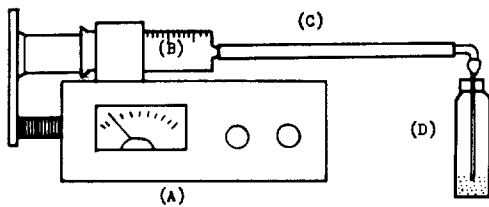


Fig. 2. Apparatus used for the estimation of the degree of interaction between blood platelets and polymer surface. (A); syringe pump, (B); syringe filled with blood, (C); column packed with glass beads precoated with polymer, (D); EDTA sampling bottle.

유속으로 혈액을 통과시키기 위해 사용하였으며, 혈액 채취를 위한 시료병(D) 안에는 혈액 응고를 방지하기 위하여 ethylenediamine-tetraacetic acid(EDTA)를 주입하였다. 또 충전된 glass beads가 빠져 나오지 않도록 column 끝부분에는 nylon mesh를 부착하였다.

각 폴리머를 코팅시킨 glass beads를 길이 10cm, 내경 3mm의 PVC column에 균일하게 충전한 다음 사람의 혈액을 주사기로 채취하여 실린지펌프로 3ml/min의 유속으로 1분간 통과시켰다. 유출된 혈액은 EDTA 샘플병에 채취하여 Coulter Counter (Model S-Plus)로 혈소판수를 측정하였다.

또 혈액을 통과시킨 PVC column 내의 glass beads에 일정량의 생리식염수를 2분간 통과시켜 세척한 후 주사기로부터 3cm 부근에 위치한 PVC column 내의 glass beads를 시료로 채취하여 1.25% glutaldehyde 수용액에 침적시켜 재료 표면에 점착된 혈소판을 고정시킨 다음 냉각건조기로 건조하여 시차주사현미경으로 각 재료표면에서의 혈소판 점착 상태를 관찰하였다.

2-7. 接觸角 · 測定

접촉각은 日本 Erma光學社의 Model G-1을 사용¹⁷하여 실온에서 측정하였다. 한 시료에 대해 10회씩 측정하여 얻은 평균값을 접촉각으로 하였다.

2-8. 옥탄-물-固體系의 接觸角 및 親水性파라미터의 測定

물과 재료와의 계면에서의 옥탄의 접촉각 및 재료의 親水性파라미터(I_{sw})를 측정하기 위해 Fig. 3과 같은 장치¹⁸를 사용하였다.

유리로 투명한 용기를 제작하여 증류수를 채운 다음 각 폴리머 용액을 코팅하여 건조시킨 얇은 유리판을 자석으로 고정하여 용기 속에 담근다. 물과의 상호 작용이 없는 옥탄을 사용하여 중력의 영향을 감소시키기 위해 마이크로실린지로 0.1~0.2ul 되도록 液滴의 크기를 조절하여 시료표면에 띄운 다음 물과 시료의 계면에서의 옥탄의 접촉각을 측정하였다. 이 접촉각은

로부터 親水性 파라미터를 구하였다.

3. 結果 및 考察

3-1. 粘着血小板數의 測定

의용재료의 抗血栓性 평가 방법에는 *in vivo* 와 *in vitro* 법이 있다. *in vivo* 평가법이란 生體內에 재료를 挿入하여 抗血栓性을 실험하는 방법인데 이 중에서는 Gott¹⁹법이 유명하다. *in vitro* 평가법은 生體外에서 재료를 실험하는 방법인데 이 중에서 재료와 혈액을 접촉시켜 응고 시간을 측정하는 Lee White²⁰법이 간편하므로 많이 사용되고 있다. *in vitro* 평가법의 단점으로는 혈액이 공기와 직접 접촉하므로 血液凝固에 영향을 미친다는 것이다. 그러므로 本 실험에서는 *in vitro* 법을 개량하여 혈액이 공기와 접촉하지 않도록 Fig. 2 와 같은 장치를 사용하

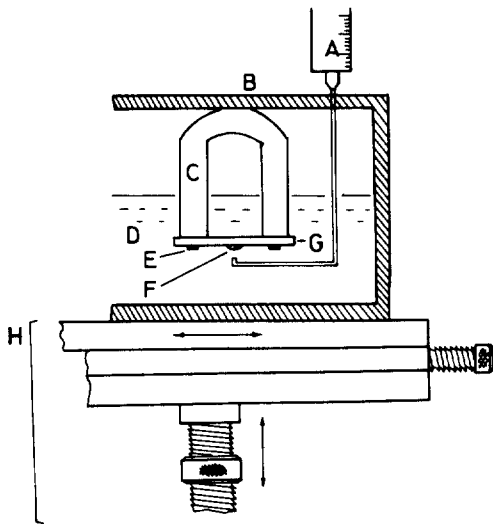


Fig. 3. Measuring apparatus of contact angles for octane/water/solid system. (A), Microsyringe; (B), Transparent glass container; (C), Magnet; (D), Distilled water; (E), Iron support strips; (F), Octane bubble; (G), Polymer-coated glass; (H), Goniometer stage.

었다. PVC column 내에 넣은 폴리머를 코팅한 시료인 glass beads를 통과하여 유출된 혈액 중의 혈소판수를 Coulter Counter (Model S-Plus)로 측정된 후 비교적 生體適合性이 좋은 것으로 알려져 있는 silicone을 코팅한 glass beads를 통과하여 유출된 혈액 중의 혈소판수를 1.0으로 하여 비교한 결과를 Fig. 4에 나타내었다.

그 결과 블록공중합체를 코팅한 glass beads를 통과하여 유출된 혈액 중의 혈소판수가 가장 많았으며, block copolymer > silicone > PBLG > blendmer의 순으로 감소하였다. 이와 같이 블록공중합체를 코팅한 glass beads에 점착된 혈소판수가 가장 적은 것으로 보아 이 재료가 다른 재료보다 혈소판의 흡착력이 제일 작음을 알 수 있었다.

3-2. 시차주사현미경에 의한 粘着血小板의 관찰

각 재료표면에서의 혈소판의 점착거동을 평가하기 위하여 시차주사현미경으로 5000배로 촬영한 사진을 Fig. 5에 나타내었다.

생체 내의 혈액 중의 혈소판은 원반형태로서 정상적인 혈관벽에는 점착하지 않고 혈관벽이 파괴되어 이물질과 접촉하였을 때 점착이 일어나게 된다. 재료 표면에 점착되어 활성화된 혈소판은 형태 변화를 일으켜서 顆粒내용물을 방

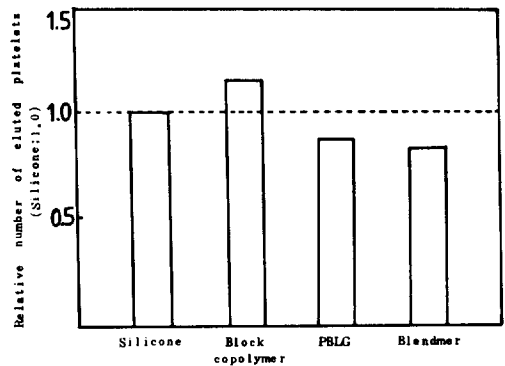


Fig. 4. Platelet adhesion on the various polymer surfaces.

출한다. 이 때 방출물질의 초기 상태를 偽足이라고 하며 이 偽足 위에 나중에 방출된 물질이 원관을 형성하면서 점착하게 된다. 점착이 이루어진 다음 곧 이어 트롬빈이 붙어서 1次血栓을 형성한 후 血栓 주위에 피브린을 석출시켜 2次血栓이 형성되면서 血液凝固가 일어나게 된다. 따라서 혈소판의 점착은 혈액응고에 큰 영향을 미치게 되므로 합성한 폴리머재료에 점착되는 혈소판의 초기상태를 관찰함으로써 抗血栓性을 평가할 수 있다.

Fig. 5의 (A)는 블록공중합체표면에 점착된

혈소판의 모양을 관찰한 것이다. 혈액응고가 일어나지 않아 변형 안된 혈소판도 발견할 수 있으며 대체로 혈액응고의 초기단계이므로 偽足이 형성된 것을 볼 수 있다. (B)는 silicone 표면에 흡착된 혈소판의 끝에서 偽足이 형성되어 있는 것을 볼 수 있으며 PBLG의 표면인 (C)에서는 顆粒 내용물이 방출되어 원관이 형성된 것을 볼 수 있으며 또 주위에 偽足이 형성되는 과정도 관찰할 수 있었다. (D)는 블렌드머표면에서의 혈소판의 점착상태인데 혈액응고가 많이 진행된 것을 볼 수 있었다.

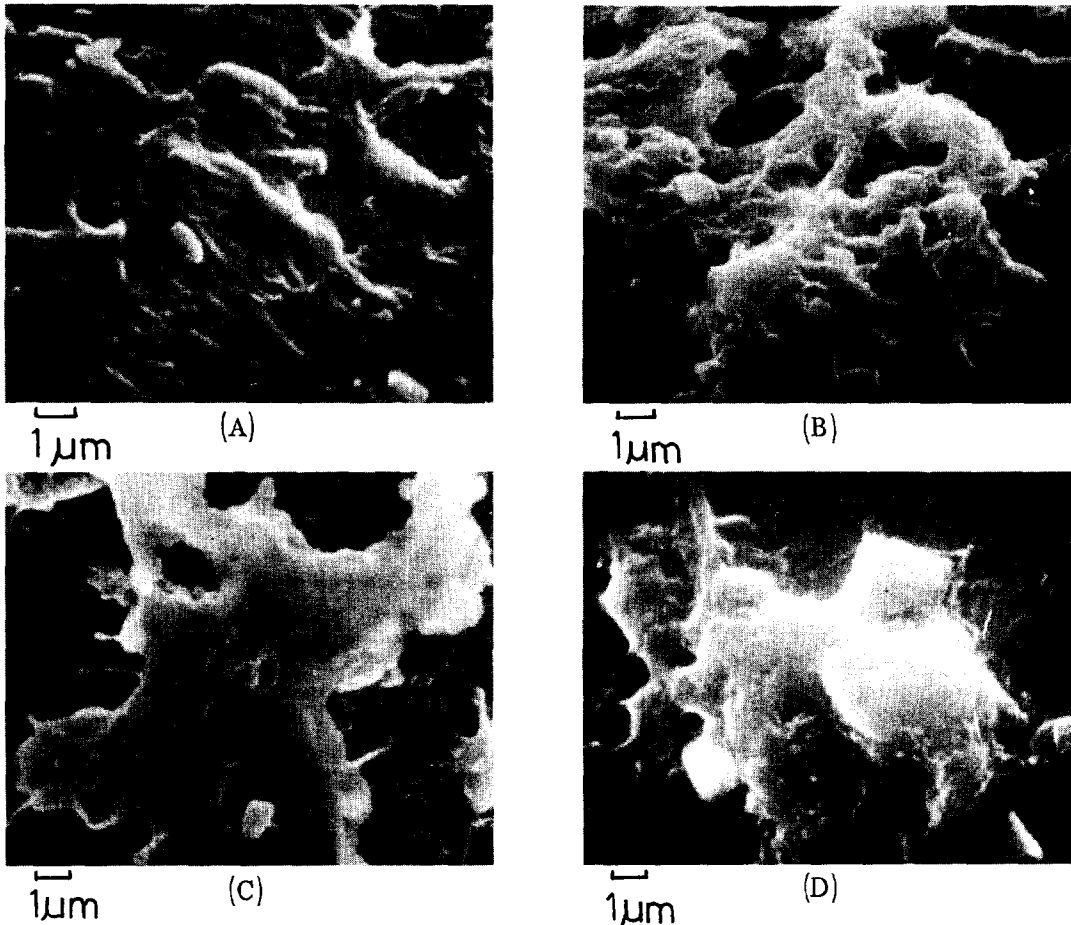


Fig. 5. SEM views of the platlet at the various polymer surfaces.

(A), Blockcopolymer, (B), Silicone, (C), PBLG, (D), Blendmer

이상과 같이 블록공중합체의 표면에서 혈소판의 점착이 가장 적게 일어난 것으로 보아 抗血栓性이 다른 재료보다 우수하다는 것을 알 수

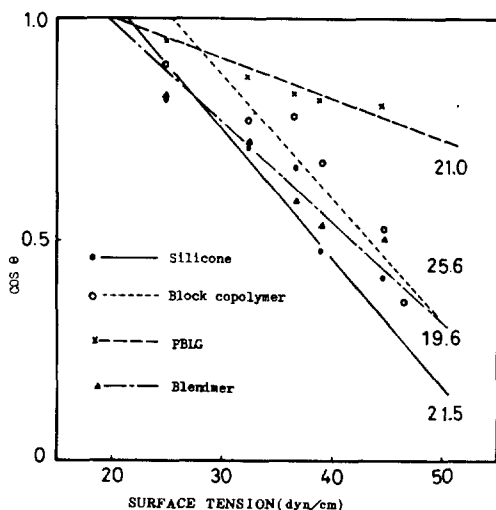


Fig. 6. Critical surface tensions of polymer surfaces by Zisman plot.

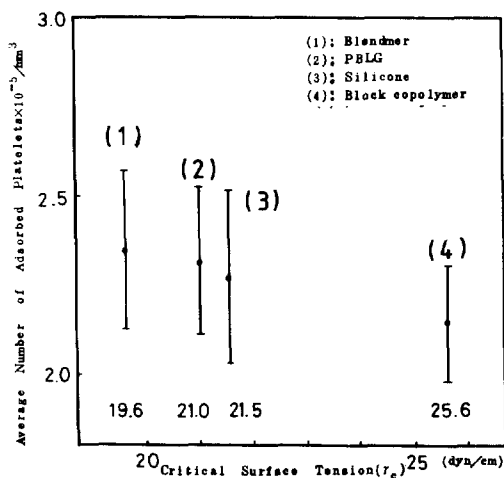


Fig. 7. Relation of average number of adsorbed blood platelets and critical surface tensions.

있었다.

3-3. 臨界面張力

접촉각에 의한 임계표면장력의 측정은 Zisman²¹ 등에 의해서 많이 연구되었다.

즉 고분자의 표면장력이 $\gamma_c \approx \gamma_s$ (γ_s : 고체의 표면장력)이라는 가정하에 Zisman은 고분자표면에 대한 여러 가지 액체의 접촉각 θ 를 측정하여 $\cos \theta$ 와 액체의 표면장력 간에는 직선 관계가 있다는 것을 밝혔다. 이 직선을 $\cos \theta = 1$ 까지 外插하여 얻은 표면장력이 臨界面張力(γ_c)이다.

각 재료의 임계표면장력을 Fig. 6에 나타냈다.

일반적으로 임계표면장력의 값이 抗血栓性에 영향을 미치는 절대적인 因子는 되지 않지만 Lyman이나 Baier 등은 임계표면장력이 20~30 dyn/cm일 때 生體適合性이 좋다고 주장을 하고 있으며 Leiniger는 25 dyn/cm 부근의 임계표면장력값을 갖는 재료가 抗血栓性이 가장 우수하다고 주장하고 있다.

실험에 사용된 폴리머 시료는 모두 20~30 dyn/cm 정도의 임계표면장력값을 가짐을 알 수 있었고 특히 블록공중합체의 γ_c 가 25.6 dyn/cm로 Leiniger의 25 dyn/cm와 거의 비슷하였다.

또 임계표면장력과 재료표면에의 평균점착혈소판수와의 관계를 Fig. 7에 나타내었다.

3-4. 옥탄-물-固體 系에서의 接觸角 및 親水性 파라미터

일반적으로 표면자유에너지 값이 작은 소수성 표면에서는 혈액응고가 잘 일어나지 않는다고 알려져 있으나 자유에너지 값이 아주 작은 공기 중에서도 혈액의 응고가 일어나는데 비하여 자유에너지 값이 상당히 큰 72.8 erg/cm²의 값을 갖는 물에서는 혈액의 응고가 일어나지 않는다. 표면에너지 외에도 생체 내에서의 재료 표면은 물과도 접촉하고 있으므로 물과 재료표면과의 상호작용을 검토하기 위하여 octane-bubble²²법에 의해 옥탄-물-고체 계에서 구한 옥탄의 접

Table 1. Contact Angles and Interfacial Parameters for Polymer Surfaces

polymers	θ	$\cos \theta$	γ_c (dyn/cm)	I_{sw} (erg/cm ²)
Block copolymer	40	0.766	25.6	11.6
Silicone	18	0.951	21.5	2.2
PBLG	38	0.788	21.0	10.5
Blendmer	25	0.906	19.6	4.5

θ : octane/water contact angles (deg)

$I_{sw} : \gamma_w - \gamma_o - 50.8 \cos \theta$

γ_c : critical surface tension

I_{sw} : polar interaction parameter of S-W interfaces

측각으로부터 친수성파라미터 (I_{sw})를 아래와 같은 식으로 구하여 Table 1에 나타냈다.

$$I_{sw} = \gamma_w - \gamma_o - 50.8 \cos \theta$$

이 때 γ_w 와 γ_o 는 각각 물과 옥탄의 표면장력이며 50.8은 물의 극성력 (polarity force)을 나타내는 값이다.

친수성 파라미터를 구한 결과 블록공중합체 = 11.6 erg/cm², silicone = 2.2, PBLG = 10.5, 블렌드머 = 4.5의 값을 가졌으며 이 중에서 블록공중합체가 물과의 親和性이 비교적 좋음을 알 수 있었다.

4. 結 論

以上的 실험결과에서 아래와 같은 결론을 얻었다.

1) 고분자재료표면에서의 혈소판점착거동의 관찰 및 평균점착혈소판수를 측정된 결과 block copoly (dimethylsiloxane - γ -benzyl-L-glutamate)가 silicone, PBLG 및 blendmer보다 抗血栓性이 우수하였는데 이것은 블록공중합체가 불균일 구조를 가지기 때문이라고 생각된다.

2) 친수성 파라미터값이 큰 블록공중합체가 抗血栓性이 좋은 것으로 보아 抗血栓性과 재료

의 친수성과는 상관관계가 있는 것으로 생각된다.

3) 각 재료의 임계표면장력 (γ_c)은 20~30dyn/cm 범위에 있었으며 특히 블록공중합체는 25.6 dyn/cm로 Leininger가 보고한 바 있는 抗血栓性이 좋은 임계표면장력 값과 근사값을 가지고 있었다.

본 연구는 1984년도 학술진흥재단의 첨단과학기술분야 학술연구조성비로 수행되었으며 이에 심심한 사의를 표하는 바이다.

REFERENCE

1. R. E. Baier, *Bull. NY. Acad. Med.*, **48**, 257 (1972).
2. D. M. Lederman, et al, Transaction of American Society for Artificial Internal Organs (이하 TASAIO로 함), **22**, 545(1976).
3. S. D. Bruck, *J. Biomed. Mater. Res.*, **6**, 173 (1972).
4. S. D. Bruck, *J. Biomed. Mater. Res.*, **7**, 387 (1973).
5. J. D. Andrade, ed, Hydrogels for Medical and Related Application, ACS Symposium Ser., **31** (1976).
6. O. Wichterle and D. Lim, *Nature*, **185**, 117 (1960).
7. H. Tanzawa, et al, *TASAIO*, **19**, 188 (1973).
8. R. I. Leininger, et al, *Science*, **152**, 1625 (1966).
9. 岡野光夫, 高分子論文集, **36**, 209 (1979).
10. R. E. Baier, *Federation Proceedings*, **30**, 1526 (1971).
11. C. Kania, et al, *J. Apply Poly Sci.*, **27**, 139 (1982).
12. J. P. Greenstein, "Chemistry of the Amino Acid", J. P. Greenstein Ed. John Wil-

- ly and Sons, Inc. New York, 2. 943 (1961).
13. R. B. Woodward and C. H. Schram, *J. Am. Chem. Soc.*, **69**, 1551 (1947).
14. A. J. Barry, *J. Appl. Phys.*, **17**, 1020 (1946).
15. T. Komoto, K. Y. Kim, and T. Kawai, *Macromol. Chem.*, **179**, 373 (1978).
16. K. Kataoka, et al., *Makromol. Chem.*, **179**, 1121 (1978).
17. 角田光雄, 小石眞純, *工業材料* **28**, 100 (1980).
18. W. C. Hamilton; *J. Colloid and Interface Sci.*, **40** (2), 219 (1972).
19. Gott. V. L., *Bull. N. Y. Acad. Med.*, **48**, 482 (1972).
20. R. I. Lee and D. D. White, *J. Am. Med. Sci.*, **145**, 495 (1913).
21. H. Y. Fox and W. A. Zisman, *J. Colloid Sci.*, **7**, 109 (1952).
22. J. D. Andrade, et al., *J. Poly. Sci. Poly. Symp.*, **66**, 322 (1979).