

Chitosan-g-Poly(2-Hydroxyethyl Methacrylate) 그래프트 공중합체막의 생체적합성

김 공 수 · 조 석 형 · 전 용 철 · 신 재 섭* · 김 경 호** · 임 정 수***
충북대학교 공업화학과, *충북대학교 화학과, **삼영전자(주)삼송 연구소, ***신아화학(주)
(1990년 3월 12일 접수)

Biocompatibility of Chitosan-g- Poly(2-Hydroxyethyl Metacrylate) Membranes

K. S. Kim, S. H. Cho, Y. C. Chun, J. S. Shin,* K. H. Kim,** and J. S. Lim***

Dept. of Industrial and Eng. Chemistry, Chungbuk National University, Cheongju, Chungbuk, 360-763, Korea.

*Department of Chemistry, Chungbuk National University, Cheongju, Chungbuk, 360-763, Korea.

**Mat. Res. Lab., Sam Song Research Institute, Samyoung Electronics Co. Seongnam, Kyonggi, 461-162, Korea.

***Mat. Res. Lab., Shin-a Research Institute, Shin-a Chemical Mfg. Co., Ltd. Anyang, Kyonggi, 430-080, Korea.

(Received March 12, 1990)

요 약 : chitosan-poly(2-hydroxyethyl methacrylate) 그래프트 공중합체를 막으로 제조하고 그 막을 아세틸화 한 후 인공피부로서의 사용가능성을 검토하기 위하여 흡수성, 기계적 성질, 수증기 및 산소 투과성, 효소에 의한 생분해성등을 검토하였다. 흡수성은 130~460%였고 기계적 강도는 242~506 kg/cm²으로서 정상피부 보다 높은 값을 보였으며, 수증기 및 산소 투과성은 $7.4 \times 10^{-9} \sim 3.4 \times 10^{-8}$ (g · cm · cm²s⁻¹)과 $1.4 \times 10^{-8} \sim 3.17 \times 10^{-7}$ (cm³(STP) cm · cm²s⁻¹ · cmHg⁻¹)이었다. 효소에 의한 생분해성은 9~10일 까지는 빠르게 증가하였으나 그 이 후는 거의 증가하지 않았다.

Abstract : The membranes of acetylated chitosan-g-poly (2-hydroxyethyl methacrylate) were prepared for a skin substitute, and water content, tensile strength, elongation, permeability of water vapor and oxygen, and biodegradability of the membrane was determined. The water absorption was 130~460 %, and the tensile strength(242~506 kg/cm²) was higher than that of the normal skin. The coefficients of water vapor and oxygen permeability were $7.4 \times 10^{-9} \sim 3.4 \times 10^{-8}$ (g · cm · cm²s⁻¹) and $1.4 \times 10^{-8} \sim 3.17 \times 10^{-7}$ (cm³(STP) cm · cm²s⁻¹ · cmHg⁻¹), respectively. The biodegradation rate was fast at the initial state, but it became slower after 9~10 days.

서 론

화상이나 외상에 의한 상처가 생겼을 경우 치유와 상피가 재생될 때 까지 상처부위를 보호하는 것이

상처피복 재료인 인공피부의 역할이다. 이 인공 피부의 조건은 이미 보고된 바와 같이¹⁾ 1) 상처부위에 서 피복재의 수증기 투과성과 흡수성이 적당하여 체액이 고이지 말아야 하고 2) 적당한 유연성과 습윤시

기계적 강도를 지녀야 하며 3) 상처부위에 세균감염을 막아줄 수 있어야 하고 4) 적당한 산소투과성을 가지며 5) 재료에서 용출되는 분해물에 독성이 없는 재료이어야 한다.

원래, 피부의 표피층은 각질층으로서 수분증발을 제어하고 있으며 만약 화상이나 외상등으로 피부가 손상되면 노출된 부위에서 수분의 증발이 심해져서 탈수병세를 이르기 뿐 아니라 체온조절에도 문제가 있다. 그러나 수분증발을 극도로 제어하면 조직과 인공피부 사이에 체액이 고이게 되어 치료를 지연시킨다. 그러므로 수증기투과성과 흡수성이 적당하며 습윤시 재료가 유연성을 가지고 있어서 상처면에 잘 밀착하며, 기계적 강도가 좋아야 한다. 이러한 재료로는 silicone,² polycaprolactam,² poly(amino acid),³ collagen,¹ polyurethane³ 등이 많이 이용되고 있다.

chitin 및 chitosan은 생체적합성이 비교적 우수하고 효소에 의한 생분해성이 있기 때문에 약물전달체,⁴ 혈액응고 방지제,⁵ 인공피부⁶로서 이용하려는 연구 뿐 아니라 효소의 정제,⁷ 식품첨가제⁸ 등으로서의 연구도 시도되어 왔다. 특히, 기계적 강도가 우수하며, 요소등의 투과성이 좋으며 상처치료를 촉진시키는 효과를 가지고 있는 것으로 알려져 있다.⁹

본 연구에서는 ceric ammonium nitrate(CAN)를 개시제로 사용하여 chitosan에 생체적합성이 우수한 물질로서 soft contact lens,¹⁰ artificial membrane,¹¹ hemodialysis,¹² pharmaceutical agent¹³ 등의 재료로서 실제 이용되고 있는 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA)을 그래프트 공중합 하였으며,¹⁴ 이를 막으로 제조하여 인공피부로서 요구되는 기본적 물성인 흡수성, 수증기 투과성, 기계적 성질, 산소 투과성 및 효소에 의한 생분해성에 관하여 검토하였다.

실 험

공중합체 막의 제조

전보¹⁴에서 합성한 chitosan/2-hydroxyethyl methacrylate 그래프트공중합체 중 그래프트율이 40%, 80%, 120%인 것을 각각 아세트산-물(50/50 wt

%)에 용해시켜 유리판위에 부은 후 실온에서 자연 건조하여 막을 제조하였으며, 이 막을 0.2% NaOH 용액에 30분간 담가 두었다가 증류수로 중성이 될 때까지 씻고 실온에서 자연건조하여 막을 얻었다.

공중합체 막의 아세틸화

제조된 공중합체 막(4cm×3cm)을 물-메탄올(50/50)(v/v) 20ml에 15분간 팽윤시킨 후 무수 아세트산 5ml을 가하여 실온에서 3시간 동안 정치하여 반응시키고 0.2% NaOH용액에 30분간 침적시켰다가 증류수로 충분히 세척하여 자연건조하였다.

아세틸화 막의 아세틸화도의 정량

막의 아세틸화도는 FT-IR spectrophotometer (Perkin Elmer 7100)를 사용하여 정량하였다. Miya, Minoura등¹⁵의 방법을 참조하여 검량선을 작성하고 내부표준법에 의하여 정량용 특성 흡수띠의 흡광도비를 구하여 아세틸화도를 측정하였다.

전자 현미경 조사

아세틸화된 공중합체막의 표면구조형태를 관찰하기 위하여 막을 금으로 진공증착한 후 전자현미경으로 조사하였다.

흡수율의 측정

완전히 건조시킨 일정무게(Wd)의 막을 37℃의 물속에 일정시간 담그었다가 꺼내어 여과지로 물기를 제거한 후 습윤상태의 무게(Ws)를 측정하고 다음식에 의하여 흡수율을 구하였다.

$$\text{흡수율}(\%) = \frac{W_s - W_d}{W_d} \times 100$$

기계적 성질의 실험

막을 폭 0.5cm, 길이 3cm로 절단한 후 인장시험기(Toyo Balolwin UT H-4-100)을 사용하여 건조상태와 습윤상태에서의 인장강도 및 신장율을 측정하였다.

수증기 및 산소투과성의 측정

수증기투과성은 Aiba등¹⁶의 방법을 참조하여 투과셀에 막을 부착하고 36℃의 항온기 속에서 물의 투과량을 증량변화로서 측정하여 투과계수($g \cdot cm \cdot cm^2s^{-1}$)를 산출하였으며, 산소투과성은 Kim등¹⁷의

방법을 참조하여 산소분배와 압력계가 부착된 투과 셀에 막을 부착하고 20°C에서 막을 투과한 산소를 soap film flowmeter로서 단위부피당 투과시간을 측정하여 투과계수($\text{cm}^3(\text{STP}) \cdot \text{cm} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cmHg}^{-1}$)를 산출하였다.

효소 분해 실험

Pseudo-extro cellular fluid(PECT) 용액을 제조하고 이 용액에 lysozyme (Fluka AG제-22000u/mg acc, Shugon)을 1 mg/ml로 용해시켜 효소액을 만들었다. 막을 효소용액에 담근 후 36°C에서 일정 주기로 꺼내어 분해율을 측정하였다.

결과 및 고찰

막의 제조와 아세틸화

전보에서와 같이 합성된¹⁴ 중합체중에서 그래프트율이 40%, 60%, 120%인 공중합체를 선택하여 아세트산-물 (50/50)(v/v)에 용해시켜 유리판 위에 부은 후 실온에서 자연건조하여 막을 얻었다. 이 막을 다시 고상에서 아세틸화 하였으며 그 아세틸화도를 table 1에 나타내었다.

공중합체막의 고상 아세틸화 반응은 물-메탄올 (50/50)(v/v) 혼합용액속에서 무수초산에 의하여 실온에서 행하였다. 이 반응에 있어서 높은 아세틸화도를 얻으려 할 경우 물이 필요 하지만 물속에서만 반응시킬 경우 미반응한 무수 초산에 의해 막이 변형될 우려가 있기 때문에 막의 변형을 방지하고, -OH기에의 아세틸화 반응을 방지하기 위하여 물-메

탄올 혼합 용액에서 반응시켰으며 또한, 용액중의 물에 의한 팽윤도에 따라 아세틸화가 달라지기 때문에 막의 변형을 방지하면서 팽윤도를 높이기 위하여 물과 메탄올의 혼합비율을 50/50으로 반응시켰다.

또한, 아세틸화도는 반응시 팽윤성에 큰 영향을 주기 때문에 초기의 아세틸화도는 아세틸화 반응에 있어서 큰 요인이며 초기의 아세틸화도가 20~30% 이면 chitosan막의 경우 같은 조건하에서 아세틸화가 90~100% 까지 될 수 있는 것으로 보고 되어 있다.¹⁵

따라서, 본 실험에서는 초기 아세틸화도가 22%인 것을 사용했기 때문에 높은 아세틸화를 예상했지만 그 값이 약 82~85% 정도를 나타내었다. 이것은 p(HEMA)가 그래프트됨에 따라 팽윤성이 저하되기 때문이라고 생각한다.

그래프트 공중합체막의 아세틸화도는 Fig. 1과 같이 IR스펙트럼을 이용하여 추정하였다.¹⁵ 그래프트율이 클 수록 1555 cm^{-1} 와 1655 cm^{-1} 영역에서의 N-아세틸기의 흡수대가 약간 작아졌음을 볼 수 있다. 그리고 내부표준법에 의하여 다당류의 특성 흡수대인 897 cm^{-1} 를 내부표준으로 선택하고 1555 cm^{-1} 에서 나타낸 N-아세틸기의 아미드 II 흡수대와 1655 cm^{-1} 의 아미드 I 흡수대의 내부표준에 대한 흡광비를 구하고 Fig. 2의 검량선을 이용하여 아세틸화도를 추정한 바 약 82~85%의 값을 얻었다.

또한, Fig. 3의 전자현미경 사진에서 보는 바와

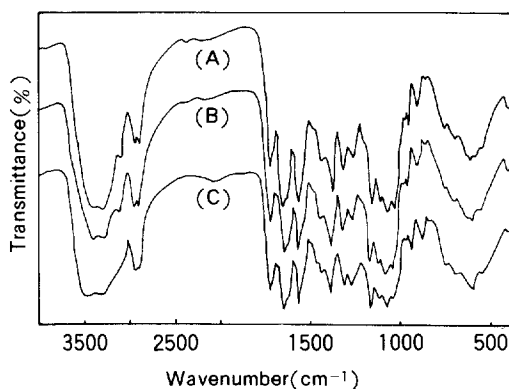


Fig. 1. IR spectra of acetylated CGH-40(A), CGH-80(B), and CGH-120(C).

Table 1. Grafting Percentage and Acetyl Content of Graft Copolymer Membranes

Samples	Grafting Percentage(%)	Acetyl Content(%)
CGH-40	40	22
CGH-80	80	22
CGH-120	120	22
CGH-40AC	40	85
CGH-80AC	80	83
CGH-120AC	120	82

같이 아세틸화가 적은 경우 약간의 주름이 잡혀있는 반면 아세틸화가 80% 이상 많이 된 경우는 주름이 대단히 많이 잡혀 있는 것을 볼 수 있다.

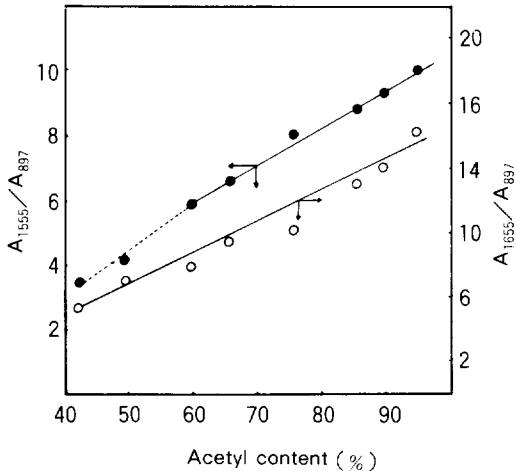


Fig. 2. Calibration curves for determining the degree of acetylation from the relative absorbance of A_{1555}/A_{897} (●) and A_{1655}/A_{897} (○).

막의 생체 적합성

막의 흡수성은 Fig. 4에서 보는 바와 같이 약 15 분이 지나면 평형상태에 도달했으며 평형상태에서의 각 시료의 팽윤도는 140~440%의 값을 보여주고 있고 그래프트율이 증가할 수록 팽윤도가 감소하였으며 아세틸화된 막의 팽윤도는 현저히 감소함을 볼 수 있다. 이것은 아세틸화에 의해 chitin과 같은 미셀을 형성하기 때문이라고 생각된다. 상처 피복재료가 흡수성이 없을 경우 상처부위에서 분비되는 체액이 피복재료와 조직사이에 고이게되어 상처의 치료가 늦어지게 될 뿐 아니라 세균감염 및 탈리를 방지 해야 함으로 좋은 흡수성을 가져야 한다. 본 실험에서 사용된 재료는 100%이상의 흡수율을 가지고 있기때문에 상처부위에서 분비되는 체액을 충분히 흡수할 수 있을 것으로 생각된다.

또한, 인공피부의 재료는 상처부위에서 분비되는 체액이 흡수되더라도 일정한 형태와 강도를 유지해야 한다. Table 2에서 보는 바와 같이 본 시료는 건조상태에서의 인장강도의 값이 약 506~240kg/cm²

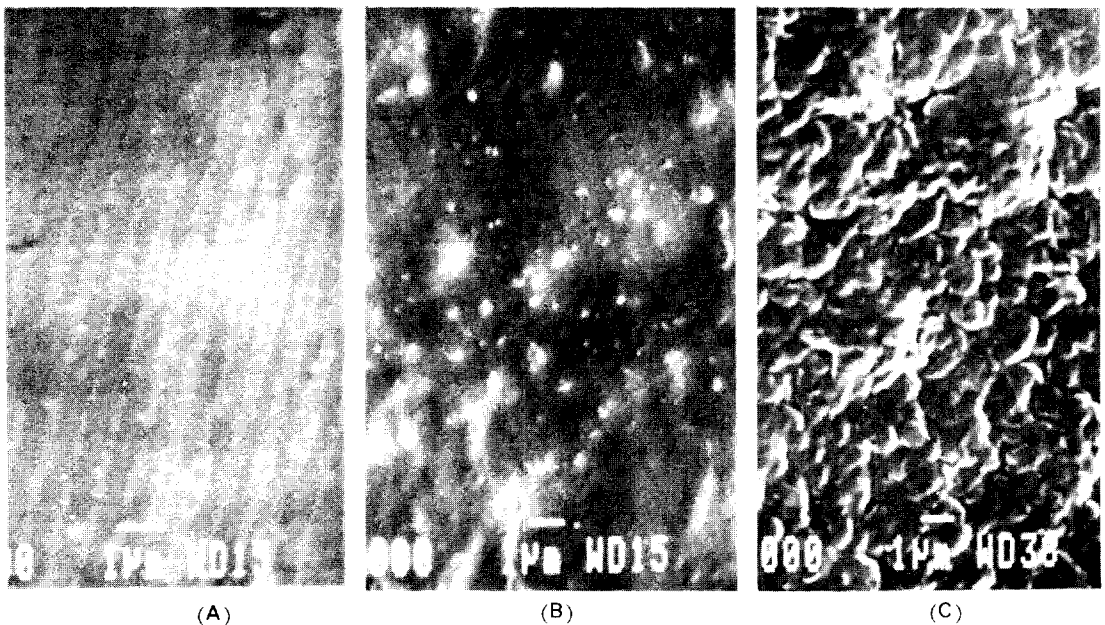


Fig. 3. The scanning electron micrographs of graft copolymer membrane(A), low acetylated graft copolymer membrane(B), and high acetylated graft copolymer membrane(C).

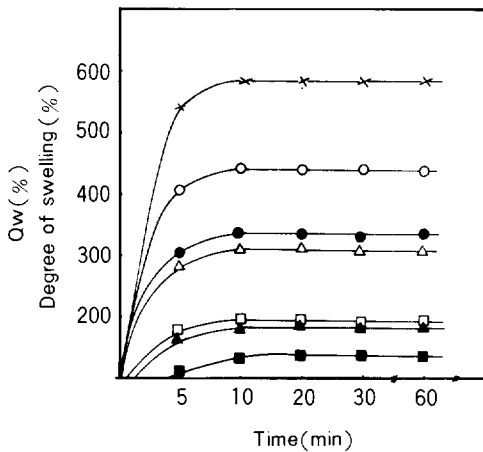


Fig. 4. Degree of swelling vs. swelling time of graft copolymer membranes and acetylated graft copolymer membranes : (○) CGH-40, (●) CGH-40AC, (△) CGH-80, (▲) CGH-80AC, (□) CGH-120, (■) CGH-120AC, (×) Chitosan.

Table 2. Tensile Strength and Elongation of Dried and Swollen Graft Copolymer Membranes

Samples	Tensile Strength(kg/cm ²)	Elongation(%)
CGH-40	349.0	51.5
CGH-40s	37.7	196.0
CGH-80	306.4	43.0
CGH-80s	58.0	135.3
CGH-120	242.5	31.5
CGH-120s	61.1	143.5
CGH-40AC	506.2	11.0
CGH-40ACs	57.5	143.5
CGH-80AC	405.1	8.5
CGH-80ACs	70.2	122.2
CGH-120AC	333.3	6.5
CGH-120ACs	83.3	105.0
Chitosan	183.3	60.0
Chitosans	30.0	73.0

s : swollen polymer.

을 나타내고 있으며 습윤상태의 경우도 약 80~50 kg/cm²의 값을 보여 주었는데, 이것은 현재 인공피부로 사용되고 있는 콜라겐이 건조상태에서 25~45 kg/cm² 습윤상태에서 5~10kg/cm² 정도¹⁹인 것에 비해 훨씬 큰 값을 나타내었고, 특히 신장율에 있어서 습윤상태에서 약 100~150%의 유연성을 보여 줌으로서 상처부위와의 밀착성이 좋아 탈리를 방지할 수 있을 것으로 생각된다. 건조상태에서의 인장강도는 그래프트율이 증가함에 따라 감소하였으며 아세틸화한 경우가 아세틸화하지 않은 것에 비하여 현저히 인장강도가 증가하였으나 신장율은 감소하였다. 이것은 아세틸화에 의해 막의 조직이 치밀해 졌기 때문이라고 생각된다.

37°C에서 측정된 수증기 투과 계수와 산소투과 계수는 Fig. 7에 나타낸 바와 같이 수증기 투과성은 그래프트율이 증가함에 따라 감소하는 경향을 보여 주었으며 아세틸화된 막이 아세틸화 되지 않은 경우보다 좋은 수증기투과성을 보여주고 있다.

산소 투과성에 있어서도 아세틸화 한 경우에 투과

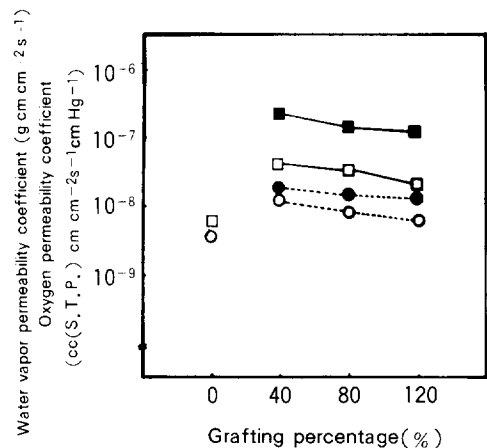


Fig. 5. Effect of grafting percentage in graft copolymer membranes and acetylated graft copolymer membranes on water vapor and oxygen permeability : (○) Water vapor permeability coefficient of membranes, (●) Water vapor permeability coefficient of acetylated membranes, (□) Oxygen permeability coefficient of membranes, (■) Oxygen permeability coefficient of acetylated membranes.

성이 증대되었는데, 이와같은 현상은 아세틸화에 의한 막구조가 변화되었기 때문이라고 생각된다.

정상피부에 비해 상처가 생겼을 경우 수분 증발량이 현격히 증가하기 때문에 탈수 병세가 일어 날 수 있으며 반면 수증기의 증발이 극도로 나빠지면 상처 치료에 오히려 방해가 되므로 적당한 투과성을 갖는 피복재를 사용하여야 한다.

본 실험에서 사용한 시료는 수증기 투과성이 $7.4 \times 10^{-9} \sim 3.4 \times 10^{-8} (\text{g} \cdot \text{cm} \cdot \text{cm}^2 \text{s}^{-1})$ 으로서 정상피부의 수증기 투과성 보다는 약간 떨어지나 산소투과성의 경우는 $1.4 \times 10^{-8} \sim 3.17 \times 10^{-7} (\text{cm}^3 \text{cm}(\text{STP}) \text{cm}^2 \text{s}^{-1} \text{cmHg}^{-1})$ 으로서 투과성이 우수하다고 알려진 실리콘 막 ($6 \times 10^{-8} \text{cm}^3 \text{cm}(\text{STP}) \text{cm}^2 \text{s}^{-1} \text{cmHg}^{-1}$)에 비교하였을 때 비슷하거나 보다 큰 산소 투과성을 나타내었다.

효소에 의한 분해실험은 in vitro로 유사체액속에 존재하는 lysozyme에 의해 행해졌다. Fig. 6에서 보는 바와 같이 아세틸화된 막의 경우 효소에 의한 분해율이 아세틸화 되지 않은 막에 비교하였을 때 상당히 낮았으며 10% 이하의 분해율을 나타내었는데

이것은 아세틸화됨에 따라 유사체액 속에서 막의 팽윤성이 감소하기 때문에 효소가 막속으로 침투되기 어렵기 때문이라고 생각된다.²⁰

또한, 시료의 무게감소율은 9일 까지는 빠른 감소를 보였으나 그 이후는 거의 변화되지 않았다. Chitin 이나 chitosan은 체내에서 단량체나 oligomer로 분해되어 상처치료를 촉진하고 세균감염을 방지하는 것으로 알려져 있으며²¹ 본 실험에서 이용된 막은 흡수성·기계적 강도가 정상피부 보다 높은 값을 보였고 수증기 투과성은 정상피부 보다 약간 떨어지나 산소투과성이 우수하였다. 특히 그래프트율이 40~80%인 그래프트 공중합체 막과 그래프트율이 40%인 아세틸화된 막은 비교적 우수한 생체적합성을 갖는 상처의 피복재료로서 응용성이 기대된다.

참 고 문 헌

1. 藤井忠彦, "80年代の醫用材料", テクマート1980, P. 225.
2. 樓井靖久, "化學 總說 No. 21, 醫用材料の化學", 日本化學會編, 學會出版センター, 1978, P. 243.
3. C. W. Hall, M. Spira, F. Gerow, L. Adams, E. Martin, and S. B. Hardy, *Trans. Amer. Soc. Artif. Intern. Organs*, 16, (1977).
4. R. C. Capozza, *Enzymically Decomposable Biodegradable Pharmaceutical Carrier*, Ger. Pat., 2, 505, 305 (1975).
5. R. J. Wistler and M. Kosik, *Arch. Biochem. Biophys.*, 142, 106 (1971).
6. K. Kojima, S. Iguchi, Y. Kajima, and M. Yoshikumi, *J. Appl. Poly. Sci.*, 28, 87 (1983).
7. R. Bloch and M. M. Burger, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 58, 13 (1974).
8. W. A. Bough, *Food Product Development*, 11, 90 (1977).
9. R. A. A. Muzzarelli, "Chitin", Pergamon Press Ltd., 1977, P. 257.

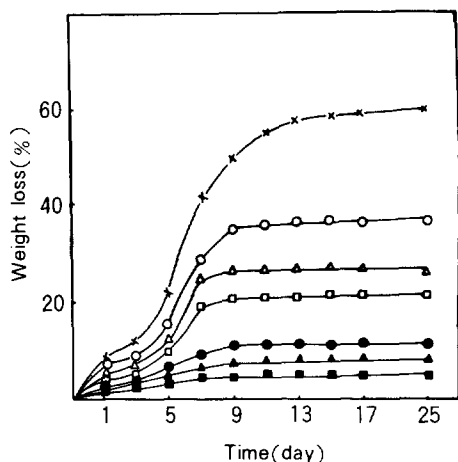


Fig. 6. Biodegradation of graft copolymer membranes and acetylated graft copolymer membranes(Temp. : 36°C, PECE : pH 7.2) : (○) CGH-40, (●) CGH-40AC, (△) CGH-80, (▲) CGH-80AC, (□) CGH-120, (■) CGH-120AC, (×) Chitosan.

10. C. P. Creighton and C. R. Teschemacher., US. Patent. 4. 109,074 (1978).
11. P. Nathan, E. J. Law, B. G. Macmillan, D. F. Murphy, S. H. Ronel, J. D. Andrade, and R. A. Abrahams, *Trans. Amer. Soc. Artif. Int. Organs.*, XXII. 30 (1986).
12. M. Tollar, M. Stol, and K. Kliment., *J. Biomed Mat Res.*, 3, 305 (1969).
13. P. I. Lee., *J. Controlled Release.* 4, 1 (1986).
14. S. H. Cho, K. S. Kim, J. S. Shin, and K. H. Kim. *Polymer(Korea)*, 14, 9 (1990).
15. S. I. Aiba, N. Minoura, and Y. Fujiwara, *Kobunshi Ronbunshu.*, 36, 299 (1982).
16. S. Aiba, N. Minoura, and Y. Fujiwara, *Kobunshi Ronbunshu.*, 39, 299 (1982).
17. J. Y. Kim and K. Y. Kim, *Polymer(Korea)*, 8, 98 (1984).
18. C. A. Homsy, *J. Biomed. Mater. Res.*, 4, 341 (1970).
19. 妹尾學編, 「醫用高分子」, 共立出版, p18, 1978.
20. S. Tokura, N. Nishi, S. Nishimura, and O. Sonorin, *Seni-Gakkaish(報文)*, 39, 45 (1983).
21. L. L. Balassa and J. F. Prudden, Proc. 1st International Conferenc Chitin/Chitosan, MIT, 1977, p. 296.