

## 실크피브로인과 고탄성 폴리우레탄의 블렌드 나노섬유의 합성 및 그들의 생체적합성 평가

홍석민 · 김태성 · 강민실 · 이영철\* · 공명선†

단국대학교 천안캠퍼스 나노바이오의과학과, \*생산기술연구원 그린공정재료연구그룹  
(2015년 6월 26일 접수, 2015년 8월 16일 수정, 2015년 10월 6일 채택)

### Synthesis of Nanofiber Using High Elastic Polyurethane-Silk Fibroin Blends and Their Biocompatible Properties

Suk-Min Hong, Tae-Sung Kim, Min-Sil Kang, Young Chul Lee\*, and Myoung-Seon Gong†

Department of Nanobiomedical Science, Dankook University Graduate School, Chungnam 31116, Korea

\*Green Process and Materials R&D Group, Korea Institute of Industrial Technology, Cheonan, Chungnam 31056, Korea

(Received June 26, 2015; Revised August 16, 2015; Accepted October 6, 2015)

**초록:** 생체적합성 고분자의 물리적 및 화학적 특성을 개선하기 위하여 고탄성 폴리우레탄(PU)과 경직하고 생체친화성 및 무독성을 겸비한 실크 피브로인(SF)과 SF/PU=1/3, 2/2 및 3/1 중량 비를 가진 블렌드를 제조하였다. 고탄성 PU는 헥사메틸렌 디이소시아네이트와 디올로서 isosorbide/폴리카보네이트 디올(4/1)을 사용하여 용융하여 벌크 중합하여 합성하였다. 그리고 전기방사법에 의하여 SF/PU 블렌드로부터 나노섬유 페브릭을 제조하였다. SF의 함유량을 증가시키면 파단변형률(strain at break)이 감소함과 동시에 인장력(tensile strength)도 감소했으며, 실크의 함유량이 가장 높은 SF/PU(3/1) 블렌드의 경우 강성도(stiffness)는 150 MPa를 나타내었으며 SF/PU(1/3) 블렌드 나노섬유 페브릭은 150%의 파단 변형률을 보여주었다. 생분해도 검사는 37 °C 온도의 인산완충액(phosphate buffer solution) 안에서 진행하였으며, 4주후 30%의 질량 감량을 보여주었다. 나노섬유 페브릭 표면에 C2C12(쥐의 근원세포)의 생체 적합성 검사에서 2일 뒤에, 상대적으로 모든 블렌드 페브릭들의 세포 수가 최적화된 조직 배양 형성의 확산 비율보다 높은 것으로 나타났다. 이러한 폴리우레탄들은 부드럽고, 유연하고, 생체 적합한 요소들로 인하여 부드러운 조직의 증대와 재생 연구에 적합한 것으로 예상할 수 있었다.

**Abstract:** As a way to modify both the physical and biological properties of a highly elastic and biodegradable polyurethane (PU), silk fibroin (SF) with rigidity, biocompatibility and non-toxicity was blended with PU having SF/PU=1/3, 2/2 and 3/1 weight ratios. Bio-based high elastic PU was prepared from hexamethylene diisocyanate and isosorbide/polycarbonate diol (4/1) by simple one-shot bulk polymerization and nanofibers were electrospun directly from SF and PU blend. With increasing SF content, the tensile strength decreased as did the strain at break; the stiffness increased to around 150 MPa for the SF/PU (3/1) with highest silk content. On the other hand, SF/PU=1/3 blend nanofiber showed a 150 % strain at break. Degradation tests performed at 37 °C in phosphate buffer solution showed a mass loss of 30% after 4 weeks, which showed an initial rapid weight loss. The *in vitro* cytocompatibility test results following culture of C2C12 (a mouse myoblast cell line) on the nanofiber film surface showed that relative cell number on all of the blend films after 2 days was higher compared to the proliferation rate on the optimized tissue culture plastic. These polyurethanes offer significant promise due to soft, flexible and biocompatible properties for soft tissue augmentation and regeneration.

**Keywords:** nanofiber, silk fibroin, biocompatible polyurethane, isosorbide, blend.

## 서 론

우리 몸이 노화하거나 사고로 생체조직이나 기관들이 손상

되었을 때 재생의학(regenerative medicine)이나 조직공학(tissue engineering) 기술의 발달로 생체 친화성이 좋은 재료에 조직세포를 배양하여 손상된 조직이나 장기를 대체할 수 있게 되었다.<sup>1</sup> 천연 고분자는 매우 우수한 생체 친화성이 좋고 독성이 없는 고유한 특성을 가지고 있다. 따라서 천연 고분자로 제작된 지지체는 생체에 이식 후 염증 반응이 적을

†To whom correspondence should be addressed.

E-mail: msgong@dankook.ac.kr

©2016 The Polymer Society of Korea. All rights reserved.

뿐만 아니라, 뛰어난 생체 기능성과 생분해성 등을 제공할 수 있어 이상적인 조직공학용 지지체의 재료로 평가받고 있다. 그러나 천연 고분자 재료 자체로서는 실제 응용에 물리적 및 기계적 특성이 부합되지 않기 때문에 기능의 향상을 위하여 화학적 개질을 통하여 물성을 보완하여 사용하고 있다.<sup>2,8</sup> 천연 고분자의 제한점을 극복하기 위해서 최근 생체 친화성/생분해성 합성고분자의 도입이 매우 활발하다. 이들은 분자량 등의 고분자 특성을 쉽게 조절 가능하며, 기계적 물성이 우수한 장점이 있으며<sup>7</sup> 특히 일시성 재료로서 유전자 전달, 약물 전달, 이식, 세포부착, 분화 및 증식을 가능하게 하는 재료로서의 잠재성 때문에 특별히 조직 공학이나 생체 의학적 응용이 활발하게 이루어지고 있다.<sup>8,9</sup> 따라서 천연 고분자와 합성 고분자의 장점을 모두 내포한 두 재료들을 블렌드하여 여러 가지 단점을 보완하고 우수한 재료로 응용하고 있다.<sup>10</sup>

폴리우레탄은 *in vitro*와 *in vivo*에서 낮은 독성을 가지기 때문에 조직공학의 스캐폴드로서 널리 사용되고 있는 생분해성 고분자이다. 그러나 대부분의 널리 사용되는 생체적합성 polyurethane(PU)은 반영구적인 용도로 설계되었다.<sup>11</sup> 즉 일정 기간 동안 안정성이 요구되기 때문에 PU를 구성하는 화학 구조를 고려하는 것이 매우 중요하다. 또한 그들의 분해 산물의 무독성 그리고 대사 및 배설가능하거나 또는 독성이 생체 내에서 감소하여야 한다.<sup>12,13</sup> PU는 조직공학 기술의 발달로 인공피부, 인공심장, 인공혈관 및 인공 무릎관절 등의 재료로 실용화되고 있다.<sup>14</sup> 최근에 1000% 이상의 파단변형률 (strain at break)을 가지는 생체 친화성 PU에 대한 연구가 진행되었으며 polycaprolactone diol, isosorbide 및 hexamethylene diisocyanate가 사용되었다. 이 PU의 구조 단위의 분해 생성물은 hexamethylenediamine, 6-hydroxyhexanoic acid 및 isosorbide로 무독성을 보여주어 줄기세포 전달의 cardiac heart patch로서 응용할 수 있음을 보여주었다.<sup>15,16</sup>

실크는 생체 친화성이 좋은 천연 고분자이며 우수한 기계적 성질을 가지고 있다. 또한 회복력이 빠르고 염증 발생률도 적어 인공 장기나 피부에 많이 활용되고 있다.<sup>17,18</sup> 또한 PU와 같이 *in vivo*로 서서히 분해되며 조직이나 세포에서 부가적인 독성을 피할 수 있으며 RGD sequence를 가지고 있어 표면이 활성화되어 세포 부착이 용이하고 PU 용액과 서로 혼합되어 균일한 SF/PU 블렌드 재료를 형성할 수 있다.<sup>19</sup>

실크는 예로부터 외과수술용 봉합사로 널리 사용되어져 왔으며 상대적으로 PU 고분자에 비하여 매우 뻣뻣한(stiff) 편이다. 정제된 silk fibroin(SF)은 매우 우수한 바이오재료이며 조직공학에서 연골, 뼈, 근육, 인대 및 힘줄 조직으로 응용되어왔다.<sup>20-22</sup>

나노섬유는 단위 질량당 표면적이 매우 넓고 유연하며 나노섬유 사이에 미세공간과 단위 면적당 존재하는 섬유의 수가 많아서 타 소재와의 혼화가 가능하며 외부의 응력에 대한 분산성이 크다.<sup>23</sup> 비록 기계적 특성이 상응하는 캐스팅 필름

보다 낮지만 조직공학 분야에서는 인체조직을 보완하고 대체할 목적으로 사용하기 때문에 유연성, 생체적합성, 멸균성 및 생분해성 등의 물성이 보다 엄격히 요구된다. 나노섬유의 구조가 세포의 부착성과 증식력을 촉진하는데 이것은 나노섬유의 구조가 콜라겐 나노섬유의 3차원적 세포외기질(extracellular matrix)과 구조적으로 매우 유사하기 때문이다.<sup>24</sup>

본 연구에서는 *Bombix mori* SF와 PU를 전기방사하여 얻은 나노섬유 페브릭(nanofiber fabrics)의 화학적 및 기계적 성질을 분석하고, 근육모 세포를 지지할 수 있는 가능성을 평가하고자 하였다. SF/PU 블렌드 나노섬유 페브릭의 화학구조 분석, 열적성질 및 모폴로지 등을 적외선 분광분석, 열시차, 열중량분석 및 주사 전자현미경으로 조사하였다. 표면성질 및 생분해도 측정과 C2C12 cell line을 사용한 세포 증식 실험을 진행하여 근육세포 재생의 응용 가능성을 조사하였다.

## 실 험

**시약 및 기기.** *B. mori* 누에는 보은 토종 누에농장(충청북도 보은군)에서 구입하였으며 세리신을 제거하기 위해서 CaCl<sub>2</sub>와 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(덕산순수 약품 공업 (주))를 사용하였다. 에탄올, *N,N'*-dimethylformamide(DMF)와 isopropanol(덕산순수 약품 공업 (주))은 시약용을 정제하지 않고 그대로 사용하였다. 투석막은 dialysis tubing cellulose membrane(flat width 76 mm, Sigma-Aldrich Chem. Co. USA)을 사용하였다. 우레탄 제조에 사용되는 디올은 polycarbonate diol(PCD, Asahi Kasei Chemica, 분자량 2000)을 사용하였으며 isosorbide(98%)와 hexamethylene diisocyanate(HDI, 98%)는 Aldrich사 제품을 정제 없이 그대로 사용하였다. PCD는 사용하기 전에 2시간 동안 70 °C에서 진공상태로 감압하여 잔여 수분을 제거하여 사용하였다. SF와 PU 블렌드 나노 섬유를 뽑기 위해서 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol(99%, HFIP, Aldrich Chem. Co., USA)를 사용하였다.

SF/PU 비율별로 제조한 블렌드 나노섬유의 FTIR 스펙트럼은 FTIR(Varian 640-IR, Resolution: 3 cm<sup>-1</sup>, 16 scans) 분광기를 사용하여 상온에서 800~4000 cm<sup>-1</sup> 범위에서 측정하였다. 열중량 분석(thermogravimetric analysis)은 Shimadzu TGA 50을 사용하였으며 10 °C/min의 승온속도로 10~600 °C의 질소 분위기에서 측정하였다. 열주사 분석(differential scanning calorimetry)은 Shimadzu DSC 60을 사용하여 10 °C/min의 승온속도로 -70~200 °C에서 측정하였다. SF/PU 나노섬유의 기계적 성질은 instron universal testing machine (Model 3344, Instron Engineering Corp, Canton, USA)을 사용하여 측정하였다. 기계적 성질은 상온에서 표준시료를 제작하고 시료의 두께, 넓이 및 길이를 측정하고 4회 반복 실험한 후에 표준편차를 계산하여 나타내었다. SF/PU 블렌드 나노섬유 페브릭의 접촉각은 contact angle equipment(PHX

300, S.E.O., Seoul)로 측정하였으며 샘플을 고정시킨 후에 물을 마이크로 주사기(5000  $\mu\text{L}/5\text{ mL}$ )를 통해 조절하여 한 방울 떨어트린 후에 렌즈로 순간을 이미지로 데이터화하여 접촉각을 측정하였다. 한 가지 시료당 3회 측정하여 평균으로 나타내었다. 전기방사된 SF/PU 블렌드 나노섬유 페브릭의 표면을 관찰하기 위하여 SEM(sanning electron microscope, SM-5410LV, JEOL, Tokyo, Japan)을 이용하였다. 분석 전에 백금 증착 코팅을 하였으며 시료는 500에서 3000배의 배율로 관찰하였고 두께를 확인하였다.

**폴리우레탄 합성.** 열가소성 폴리우레탄은 문헌의 방법으로 PCD/isosorbide=1/4로 촉매없이 벌크 중합으로 진행하였다.<sup>25</sup> 4구 둥근 바닥 플라스크(500 mL)에 mechanical stirrer, 온도계, 냉각기 및 질소 주입기를 설치하고 PCD(47.56 g, 23.78 mmol), isosorbide(13.90 g, 95.12 mmol) 및 HDI(20 g, 118.91 mmol)를 투입한 후 질소를 통과시키면서 서서히 교반하였다. 온도를 서서히 증가시켜 80 °C를 유지하고, 1시간 동안 고형 성분을 용해하여 균일한 용액이 되도록 유지하였다. 그 후 테프론 비이커에 부어 120 °C의 오븐에서 12시간 반응하여 중합을 진행하였다. 이렇게 합성된 폴리우레탄을 DMF에 용해한 후에 isopropanol에 재침전하고 세척한 후에 여과하였다. 합성된 폴리우레탄을 50 °C에서 24시간 진공 건조한 후 시료로 사용하였다.

**실크 피브로인(SF) 제조.** 누에고치를 구성하는 성분에서 세리신을 제거하기 위하여, 고치를 잘게 절단한 후에 10 wt%의  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  수용액(190 g)에 용해하여 80 °C에서 4시간 동안, 가열 처리하여 세리신을 제거하였다. 잔존하는 세리신을 완전하게 제거하기 위해서 3차 증류수로 여러 번 세척한 후에 진공 건조하였다.  $\text{CaCl}_2$ (57.5 g, 0.52 mmol)를 에탄올(47.6 g, 1.04 mmol)과 증류수(74 g, 4.15 mol)의 혼합 용액을 제조하고, 이 용액에 세리신이 제거된 실크 피브로인(20 g)을 넣고 80 °C에서 2시간 동안 가열하여 용해하였다. 그 후에 dialysis tubing cellulose membrane을 이용하여 3차 증류수에서 7일 동안 투석하여 염과 에탄올을 제거하였다. 최종 투석이 된 실크피브로인 용액을 300  $\mu\text{m}$  기공을 가진 glass filter를 사용하여 여과하여 불순물들을 완전 제거하고 -10 °C에서 2주간 동결 건조하여 실크피브로인을 제조하였다.

**SF/PU 블렌드의 전기방사.** SF/PU=4/0, 3/1, 2/2, 1/3 및 0/4(중량 비)의 블렌드를 HFIP에 10 wt%로 용해하여 5시간 동안 상온에서 교반하여 완전히 용해하였다. SF/PU 블렌드 용액을 주사기(10 mL; 바늘: stainless steel, gauge 24)에 넣고 상온에서 고전압(15 kV)으로 인가하였다. Syringe pump로 주사기의 유량(1.5 mL/h)을 제어하였으며, 방사하는 주사바늘과 드럼의 간격을 15 cm로 유지하였다. 드럼에는 알루미늄 호일을 감고 380 rpm으로 회전시켰으며 상기 전압의 조건에서 초극세 섬유가 생성되었으며, SF/PU의 비율에 따른 모든 블렌드의 전기방사를 한 나노섬유 페브릭의 제조는 동일한 조건

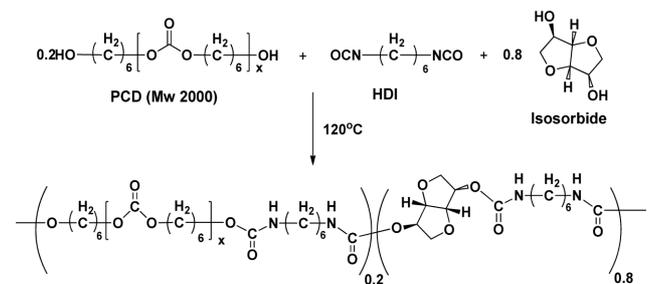
에서 진행하였다.

**생분해 테스트.** SF와 PU의 비율에 따른 블렌드의 나노섬유 페브릭을 충분히 건조시킨 뒤에 동일한 크기( $\Phi=10\text{ mm}$ )로 일정하게 재단하여 무게를 측정하고 phosphate buffer solution(PBS, 2 mL, pH 7.3)이 포함된 원뿔형 튜브에 넣어 37.5 °C의 수조(Daihan Scientific, Korea)에서 분해도를 측정하였다. 일정한 시간이 지난 후에 제거한 시료는 증류수로 세척/건조시킨 후에 각각의 무게 변화를 확인하며 4주 동안 분해도 측정 실험을 진행하였다.

**C2C12 세포를 이용한 배양 실험.** Fetal bovine serum (10%, Gibco, Australia), penicillin/streptomycin(1%, Gibco, USA)이 함유된  $\alpha$ -minimal essential medium(MEM, Hyclone, USA)을 이용하여 C2C12세포를 배양하였다. C2C12세포를 PBS로 세척 후  $1 \times 10^5/\text{well}$ 의 세포 농도로 재부유하여 SF와 PU의 비율별로 블렌드한 나노섬유 페브릭 위에 살포한 후, 세포의 부착을 돕기 위해 3시간 동안 배양하였다. 재료의 특성을 확인하기 위해서 37 °C에서 24 및 48시간 동안 5%  $\text{CO}_2$  농도에서 배양하였다. 배양한 세포들의 DNA 양을 분석하기 위해 0.2% triton solution을 이용하여 전 처리하였으며 얻어진 각 실험군의 샘플을 DNA분석 kit를 사용하여 세포의 확산의 정도를 측정하였다.

## 결과 및 토론

**열가소성 폴리우레탄의 제조.** 열가소성 폴리우레탄은 무촉매로 PCD와 isosorbide를 디올로 HDI와 중부가 반응으로 Scheme 1에 나타난 바와 같이 합성하였다. 고탄성물을 고려하여 PCD/isosorbide의 비는 1/4로 진행하였다.<sup>26-28</sup> 친수성이 큰 isosorbide 단량체는 고결정성으로 상온에서 PCD와 HDI에 용해하지 않으므로 3 가지 단량체를 서서히 가열하여 80 °C로 1시간 가열하여 부분반응을 진행하여 균일한 용액을 형성하였다. 이 혼합 용액을 120 °C에서 12시간 가열하여 중합을 진행하였다. 최종 재침전하여 정제된 PU는 chloroform, DMF, N-methylpyrrolidone 그리고 dimethyl sulfoxide에 잘 용해되었으며 THF에는 부분적으로 용해되었고, toluene과 ethanol



**Scheme 1.** Schematic structure of polyurethane synthesized from polycarbonate diol ( $M_w$  2000), isosorbide and HDI.

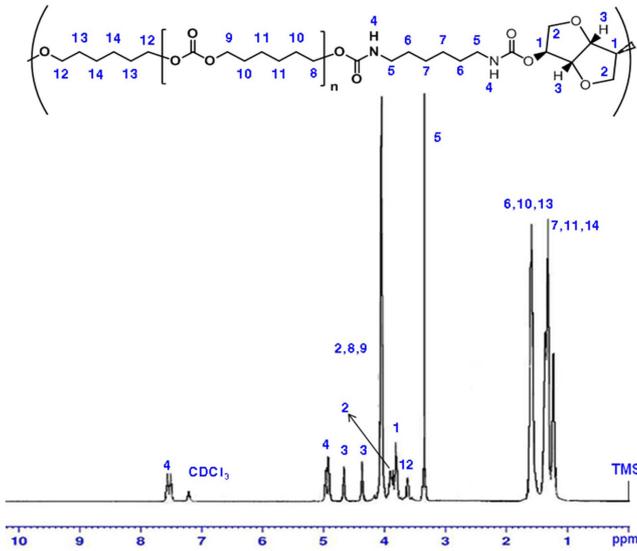


Figure 1. <sup>1</sup>H NMR spectrum of PU with PCD/isosorbide=1/4.

에는 용해되지 않았다. 얻어진 열가소성 PU의 중량 평균분자량( $M_w$ )은 136780,  $M_n$ 은 88200 그리고 다분산도(polydispersity)는 1.55이었다.

FTIR 흡수밴드에서, 우레탄의 N-H 신축 및 굽힘진동이 3324과 1531  $cm^{-1}$ 에서 각각 나타났다. 1736와 1690  $cm^{-1}$ 에서 흡수밴드는 카르보닐의 비대칭 및 대칭 신축진동에 의하여 나타나고 있다.

Figure 1에서 특징적인 우레탄 -NH-의 수소는 7.6 ppm 부근에 나타남을 확인할 수 있으며 PCD 및 HDI에서 유래되는 메틸렌 수소는 1.55, 1.65 및 4.10 ppm 그리고 1.40, 1.65 및 3.28 ppm에서 각각 확인할 수 있었다. 또한 3.50와 5.01 ppm에서 isosorbide의 bicyclic 메틸렌 수소를 확인할 수 있었다.

**폴리우레탄/실크 블렌드 나노섬유 제조.** PU의 경우 PCD/isosorbide=1/4인 경우 신장률이 600% 이상으로 나노섬유가 잘 방사되어 선택하였다. 실크와 폴리우레탄 블렌드의 비율은 SF/PU=3/1, 2/2 및 1/3으로 진행하였으며, 전기방사의 용이성을 고려하여 용매는 HFIP를 사용하였다. SF와 PU의 비율별로 합성한 전기방사 섬유는 직경과 균일성을 확인하기 위해 SEM을 측정하였다. Figure 7은 SF/PU=4:0, 3:1, 2:2, 1:3, 및 0:4을 전압 15 kV, 방사속도 1.5 mL/h 그리고 380 rpm의 동일한 조건 하에 전기방사를 하였다. 드럼 상에 수집된 SF/PU 블렌드의 전기방사 나노섬유는 구슬 형상이 없는 균일한 형상을 얻을 수 있었다. SF/PU(3/1)은 0.869~0.877  $\mu m$ 의 직경을 보여 주었으며 다른 섬유와 서로 융착되어 붙어있지 않은 양질의 섬유상을 보여주었다. Figure 2(a), (b)와 (c)는 각각 x500, x1000 및 x2000 확대한 형상을 나타내주고 있다. Figure 2(d), (e) 및 (f)는 SF/PU(2/2)이며 직경은 0.485~0.667  $\mu m$ 으로 측정되었다. Figure 2(g), (h) 및 (i)는 SF/PU(1/3)이며 두께는 약 0.508~0.533  $\mu m$ 으로 측정되었다. SF/PU(2/

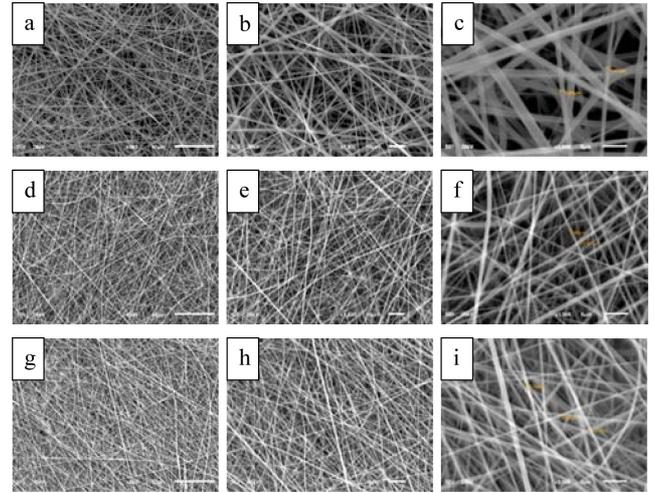


Figure 2. SEM of electrospun fibers from SF/PU(3/1) (a, b and c), SF/PU(2/2) (d, e and f) and SF/PU(1/3) (g, h and i) prepared at 15 kV, spinning rate 1.5 mL/h and 380 rpm.

2)의 평균 두께가 가장 작고 SF의 함량이 많아지면 직경이 약간 커지는 현상을 알 수 있었다.<sup>29</sup> SF와 PU의 블렌드의 경우 모두 나노섬유로서 특성을 보여주었다.

**적외선 분광 분석.** Figure 3에 실크와 PU의 혼합 비율에 따라서 제조한 나노섬유의 적외선 흡수 스펙트럼이 나타나 있다. PU의 함량이 많아질수록 1740(urethane C=O), 1700(carbonate C=O)  $cm^{-1}$  부근에서 우레탄의 카보닐(C=O)과 카보네이트의 C=O 피크가 증가하며 2850과 2933  $cm^{-1}$ 에서 강한 C-H 신축 밴드를 관찰할 수 있다. 또한 우레탄의 N-H 스트레칭 밴드의 폭이 더 넓으며 3340  $cm^{-1}$ 인 단파장 영역에서 나타나고 있다. 반대로 실크 함유량이 많아질수록 SF의 1640

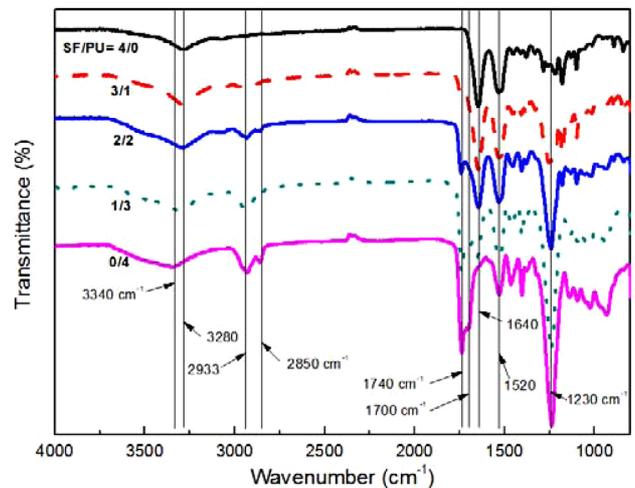
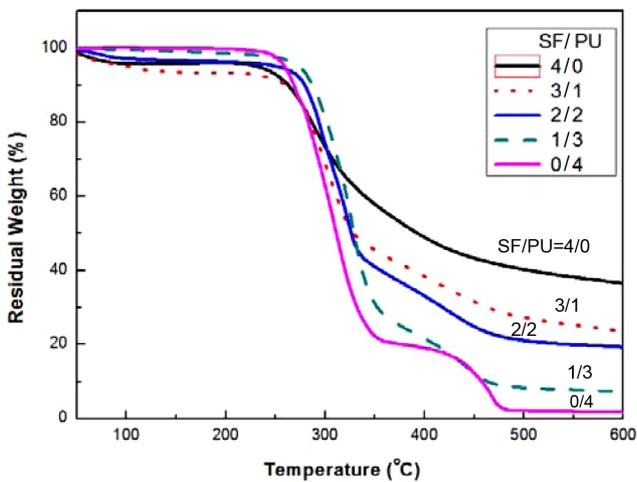


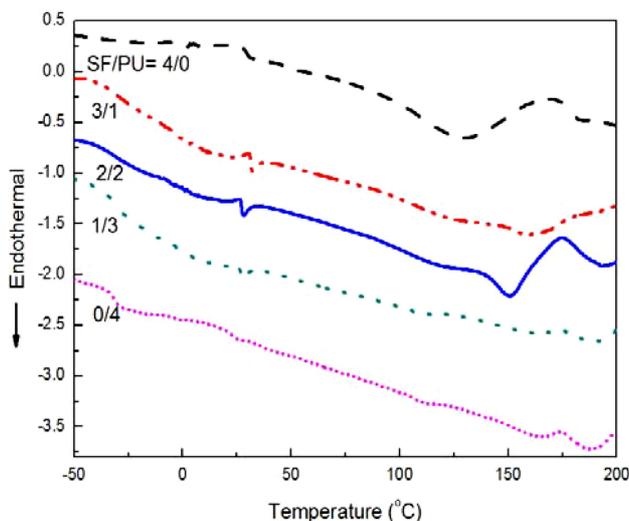
Figure 3. Fourier transform-infrared (FTIR) spectra of SF, bio-based PU and SF/PU blend nanofiber films.

(amide I), 1520(amide II) 및 1230  $\text{cm}^{-1}$ (amide III)의 random coil에 의한 강한 흡수밴드를 관찰할 수 있다.<sup>30</sup> 이것은 *B. mori* SF의 2차 구조가 random coils(silk I)과  $\beta$ -sheet(silk II)로 구성되어 있으며  $\beta$ -sheet에 의한 1527  $\text{cm}^{-1}$ (amide II)와 1265  $\text{cm}^{-1}$ (amide III)는 아주 작은 흔적만 관찰할 수 있었다. 실크피브로인은 아마이드(N-H) 결합의 스트레칭 밴드와 bending도 3280와 1640  $\text{cm}^{-1}$ 에 나타남을 FTIR을 통해 관찰할 수 있다.<sup>31</sup>

**열적성질 분석.** 생체의학 재료로서 열적 거동을 이해하는 것은 매우 중요하다. 왜냐하면 재료의 열적성질이 응용성이나 가공 특성을 결정하는 중요한 성질이기 때문이다. 실크와 폴리우레탄 블렌드 나노섬유의 열적성질의 분석을 위하여 DSC와 TGA를 사용하였으며, 그 결과가 Figure 4와 Figure 5에 나타나 있다. Figure 4는 SF/PU 블렌드의 열분해 안정성



**Figure 4.** Thermogravimetric analysis (TGA) curves of SF and SF/PU blend nanofiber films.



**Figure 5.** DSC thermograms of SF, biobased PU and SF/PU blend nanofiber films.

을 알아보기 위하여 실크와 폴리우레탄의 비율별로 제조한 나노섬유의 TGA 측정 결과이다. 실크와 폴리우레탄의 첫 번째의 열분해는 10과 250 °C 범위에서 나타나는데 남아있는 용매나 나노섬유에 의하여 흡수된 수분이 이탈한 것으로 볼 수 있다. 상온에서 600 °C까지 온도를 증가시켜 질량의 변화를 확인한 결과, SF/PU=4/0, 3/1, 2/2, 1/3 및 0/4는 각각 250, 263, 271, 274 및 256 °C에서 각각 분해가 시작되었으며 10%의 질량감소를 나타내는 온도는 335, 328, 320, 310 및 300 °C로 각각 측정되었다. 600 °C에서도 PU를 제외한 나머지 SF/PU 블렌드는 500 °C 이상에서도 10% 이상의 잔사량을 보여주었다.

실크 단독으로는 40% 이상의 잔사량을 보여주었으며,<sup>32</sup> 실크피브로인은 폴리우레탄보다 열적 안정성이 있어서 실크피브로인 함유량이 많을수록 높은 온도에서 중량 손실이 적고 PU의 함유량이 많을수록 손실이 크게 나타나는 것을 확인할 수 있었다.<sup>33</sup>

순수한 실크피브로인은 100에서 150 °C 부근까지 흡착된 수분이 탈리되는 폭넓은 흡열 피크를 관찰할 수 있으며 200 °C까지 다른 현상은 나타나지 않았다.

순수한 폴리우레탄의 DSC 분석에서 -32.1 °C의 유리 전이 온도를 확인할 수 있으며 170 °C 부근에서 발열피크를 나타냈는데 이것은 결정화에 의하여 나타나는 현상으로 낮은 유리전이온도를 갖는 soft segment를 가지는 반면에 hard segment를 이루는 isosorbide와 우레탄 결합의 내부 결합력으로 인한 전이에 의한 발열 구간이 나타난 것으로 생각된다.

SF와 PU의 비율별로 블렌드하여 제조한 나노 섬유들은 25 °C 부근에 약한 흡열 피크를 보여주었다. 블렌드된 SF/PU(3/1), SF/PU(2/2) 및 SF/PU(1/3)의 유리전이 온도는 -30 °C 부근에 폴리우레탄의 부분에 해당되는 유리전이가 나타남을 확인할 수 있었다.

**기계적 특성 분석.** Soft tissue engineering에서<sup>34</sup> 체온 부근에서 생체 적합성 고분자의 탄성은 여러 가지 기능을 부여할 수 있어 매우 중요하다. 합성된 열가소성 폴리우레탄과 실크의 블렌드 비율에 따라 제조한 나노섬유의 인장강도(ultimate tensile strength), 영률(Young's modulus), 인장응력(tensile stress) 및 파괴 변형률(strain at break) 등의 기계적 특성을 측정하였다(Figure 6(a)-(d)). 폴리우레탄의 함량이 큰 SF/PU(1/3)의 인장강도는  $3.06 \pm 0.29$  MPa, 영률은  $27.92 \pm 11.36$  MPa 그리고 파괴 변형률은 165%를 나타내었다. 반면에, 우레탄의 함량이 작은 SF/PU(3/1)의 인장강도는  $4.94 \pm 0.05$  MPa, 영률은  $109.66 \pm 12.34$  MPa 및 27%의 파괴 변형률을 보여주었다. 순수한 폴리우레탄은 최대 인장강도가  $4.99 \pm 0.49$  MPa로 측정되었는데, 폴리우레탄 함량이 증가할수록 증가하는 경향을 보여주었다. 또한 순수한 우레탄의 영률은  $7.53 \pm 5.95$  MPa로 실크의 함량이 증가할수록 크게 증가하였다. 파괴 변형률(strain at breaking)은 나노섬유의 파단이 일어나는 부분에서

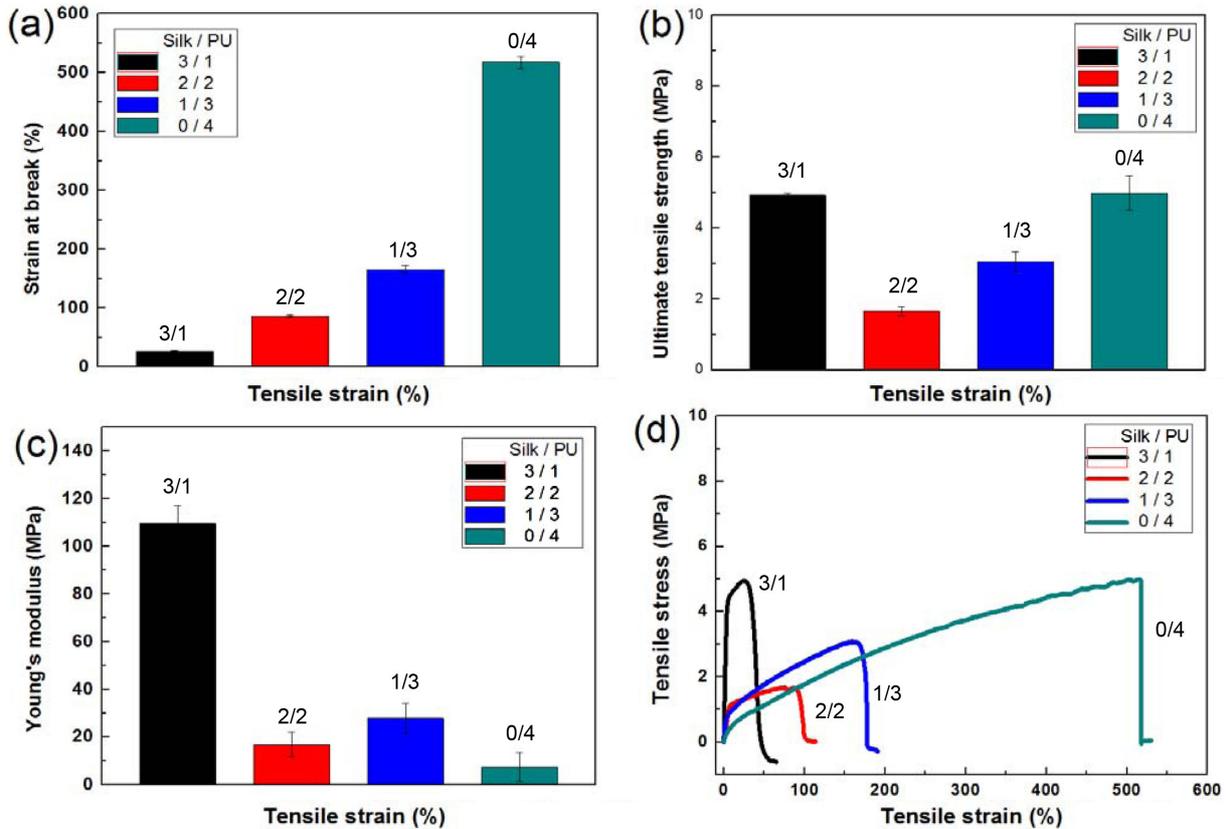


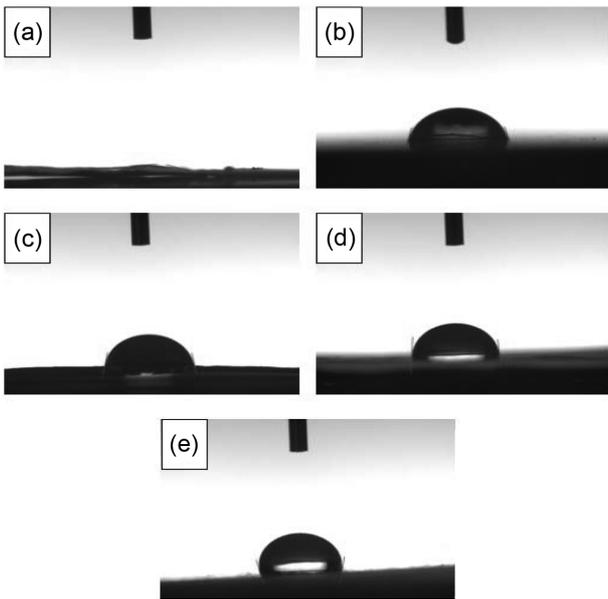
Figure 6. Strain at break (a); ultimate tensile strength (b); Young's modulus (c); tensile stress (d) of blended Silk/PU, Silk and PU.

인장신율을 나타내며 SF/PU(3/1)에서 순수한 우레탄의 경우 27에서 518%까지 큰 값의 영역에서 변화함을 알 수 있었다. 인장응력(tensile stress)은 하중을 가하게 되면 내부에 생기는 응력과 변형관계를 나타내는 곡선으로 SF는 강도가 세고 폴리우레탄은 인장력이 좋기 때문에 각 특성을 보완할 수 있고 또한 이것을 블렌드화할 경우 각 비율에 따라 기계적 특성을 향상시킬 수 있다. 이러한 결과로 실크에 폴리우레탄을 블렌드할 경우 인장강도가 증가하고 이것은 대동맥의 인장강도 값(50-100%)과 비교할 수 있으며 파단력은 크게 증가함을 보여주었다. 블렌드 나노섬유의 기계적 강도는 hard segment와 soft segment의 성질과 비율에 따라 달라진다.<sup>35</sup> 본 연구에서 강성(stiffness)은 실크의 함량이 증가하면 증가하는 현상을 보여주었다. 바이오재료나 약품에 응용되는 생분해성 및 적합성 고분자로 polycaprolacton, polyglycolic acid, poly(L-lactic acid) 및 이들의 유도체들이 널리 응용되고 있는데, 이들은 비록 섬유나 직조 상태일지라도 매우 뻣뻣하여 soft tissue engineering의 용도에 적합하지 않다. 따라서 좀 더 부드럽고 유연한 생분해성 및 적합성 고분자들은 연조직(soft tissue)과 재생(regeneration) 분야에서 그 응용성이 확대될 것이다.

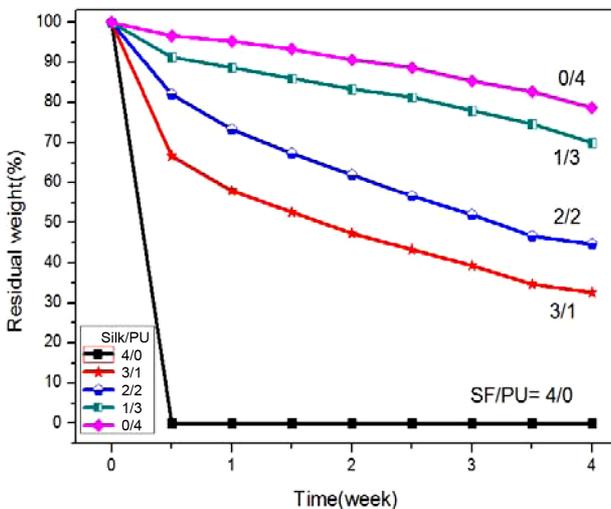
**접촉각.** 생체친화성 고분자 물질의 표면구조와 성질은 매

우 중요한데, 이것은 표면을 구성하는 관능기가 생체분자와 세포 사이에서 상호작용에 커다란 역할을 하기 때문이다.<sup>36,37</sup> 시료 표면의 친수 또는 소수 특성을 확인하기 위하여 접촉각을 측정하였다. 증류수를 표면에 떨어뜨려 접촉각을 확인한 결과 SF/PU(4/0), SF/PU(3/1), SF/PU(2/2), SF/PU(1/3) 및 SF/PU(0/4)의 접촉각은 각각  $10.8 \pm 4.4^\circ$ ,  $73.6 \pm 3.9^\circ$ ,  $79.2 \pm 4.7^\circ$ ,  $85.8 \pm 4.5^\circ$  그리고  $100.8 \pm 2.3^\circ$ 로 측정되었다. 일반적으로 친수성 표면은 접촉각이  $1-30^\circ$ 의 영역에 있으며 소수성 표면은  $>90^\circ$ 의 값을 보여준다. 순수한 실크는 친수성이 매우 큰 물질이기 때문에  $10-15^\circ$ 의 값을 보여주었으며, 실크의 함유량이 많을수록 접촉각이 작은 값을 보여주어 친수성을 확인할 수 있었다. PU는 상대적으로 소수성의 성질을 가지고 있어서, PU의 함유량이 많을수록 접촉각이 증가함을 확인할 수 있었다.<sup>38</sup> 따라서 블렌드 나노섬유 페브릭은 소수/친수 중간으로 생체적합성 재료로서 적합한 특성을 보여주었다.

**In Vitro 분해시험.** SF/PU의 블렌드의 비율에 따른 전기방사한 나노섬유 페브릭의 생분해 실험은 phosphate buffer solution(PBS)에서  $37^\circ\text{C}$ 를 유지하면서 *in vitro*로 진행하였다. Figure 8에 나타난 바와 같이 1주가 지나면서 순수한 SF/PU(4/0)는 즉시 PBS 내에서 팽윤이 일어나며 서서히 형상이 파괴되었으며, 잔류 중량은 SF/PU(3/1), SF/PU(2/2), SF/PU(1/3)

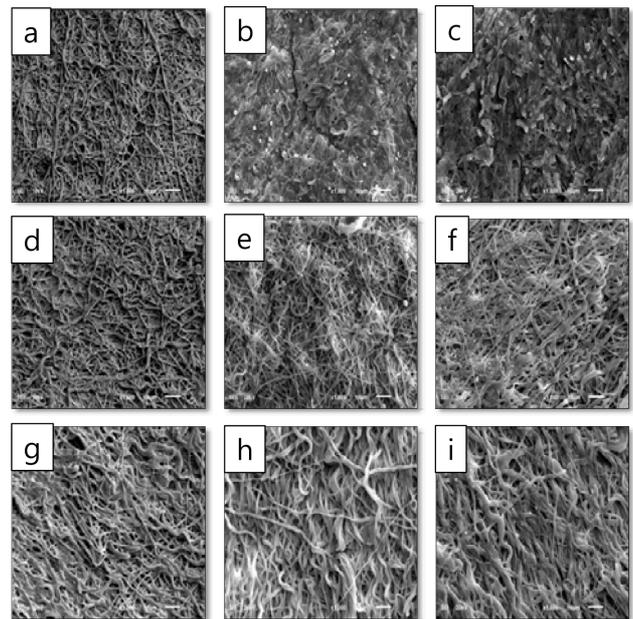


**Figure 7.** Contact angles of (a) SF/PU(4/0); (b) SF/PU(3/1); (c) SF/PU(2/2); (d) SF/PU(1/3); (e) SF/PU(0/4).



**Figure 8.** Residual weights of SF, PU and SF/PU blend nanofiber films after *in vitro* degradation test in phosphate buffer solution.

및 SF/PU(0/4)의 순으로 각각 67, 82, 91% 및 97%임을 확인할 수 있었다. 최종적으로 4 주차에는 각각 33, 45, 70% 및 79%가 잔류하는 것을 알 수 있었다. 이것으로 SF가 친수성이 크기 때문에 SF의 함유량이 많을수록 분해가 더 잘 일어나는 것을 알 수 있으며 PU의 함유량이 클수록 분해가 느리게 일어나서 잔유량이 크게 유지되는 것을 확인할 수 있었다. 수용액에서 폴리우레탄의 분해 속도는 우레탄과 카보네이트기의 가수분해에 크게 영향을 받는다.<sup>39</sup> 특히 가수분해에 있어서 soft segment를 이루는 디올의 탄소 수가 특히 영향



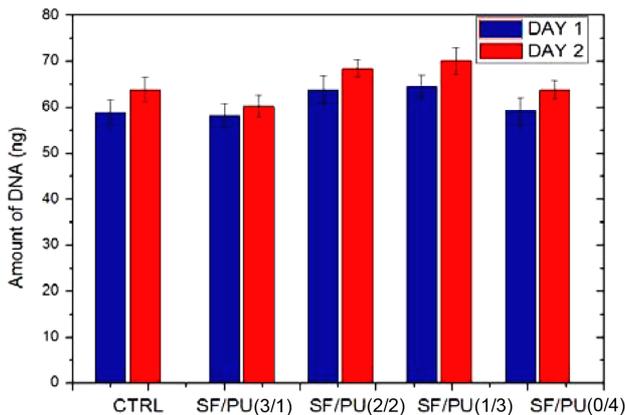
**Figure 9.** *In vitro* disassemble test of SF/PU(3/1)-(a,b and c); SF/PU(2/2)-(d,e and f); SF/PU(1/3)-(g,h and i).

이 크지만 같은 탄소 수에 대하여 분해 속도는 ester > urethane > carbonate > ether의 순으로 알려져 있다.<sup>40</sup>

그러나 hard segment를 이루는 isosorbide도 매우 큰 친수성을 가지고 있어서 PCD의 hexamethylene 단위보다 좀 더 쉽게 가수분해가 진행된다. 특히 나노섬유로 이루어진 페브릭의 경우 원래의 PBS 용액과의 접촉 면적이 크고 표면 활성이 크기 때문에 블렌드로부터 직접 제조한 필름보다 약 2.5 배 정도 더 큰 분해도를 보여주었다.

생분해 후의 SF/PU(3/1), SF/PU(2/2) 및 SF/PU(1/3)의 나노섬유 페브릭의 표면의 변화를 SEM 사진으로 확인한 결과가 Figure 9에 나타나 있다. 모든 표면이 1주(Figure 9(a, d, g))로부터 4주(Figure 9(c, f, i))에 이르기까지 점진적으로 거칠어지고 여러 가지 표면 결함이나 분해 흔적이 나타남을 알 수 있었다.

**셀 테스트.** Figure 10은 여러 가지 비율의 SF/PU 블렌드를 전기방사한 나노섬유 페브릭에 C2C12 cell의 세포 증식 실험 결과를 나타내주고 있다. SF/PU(4/0)은 물에 대한 팽윤성 및 용해성이 크기 때문에 배양을 진행하기 불가능하였다. SF/PU(3/1)는 하루가 지난 후에 컨트롤과 동일한 값을 보여주었지만 2일째에는 약간 낮은 값을 보여주었다. 세포 배양 후에 표면에 용해 또는 분해가 일어나면서 생성된 부산물들이 세포 성장을 방해시켜 배양능력이 저하된 것으로 보여진다. 그러나 PU의 비율이 증가한 SF/PU(2/2)와 SF/PU(1/3)의 경우 배양 특성이 크게 증가하였으며, 높은 DNA의 양을 가지고 있어 생체적합성이 우수하다는 것을 확인할 수 있었다. 순수한 PU의 경우 컨트롤과 매우 유사한 수치로 나타나 무독성을 보



**Figure 10.** Cell proliferation on SF/PU films at 1, 2 and 3 days. At 3 days, the samples with high SF concentration (SF/PU= 3/1 and 2/2) showed significantly increased cell proliferation rate.

여주어 연조직을 위한 블렌드 재료로 응용 가능성을 보여주었다.<sup>41</sup>

## 결론

Isosorbide/폴리카보네이트디올(4/1)과 HDI의 무촉매 부가 축합중합으로 고탄성 폴리우레탄(PU)을 합성하였다. 생체적 합성 및 기계적 성질을 향상시키기 위하여 실크피브로인(SF)과 여러 가지 비율의 SF/PU 블렌드를 제조하였다. 전기방사법을 이용하여 SF/PU 나노섬유 페브릭을 제조하였으며 바이오 재료로서 적합하고 우수한 기계적 성질을 보여주었다. 특별히 SF/PU(2/2) 페브릭은 초기 2주 동안에 38%의 분해 속도를 보여주었으며, 4주 후에는 55%의 분해 속도를 보여주었다. PU의 함량이 증가할수록 소수성이 증가하였으며 분해도가 낮아짐을 확인할 수 있었다. *In vitro*에서 쥐의 근원세포(myogenic C2C12 cell) 배양에서 컨트롤에 비하여 우수한 배양 능력을 보여주었다. 기계적 성질, 생체 친화성, 세포 부착성으로부터 SF/PU 블렌드 나노섬유 페브릭은 근육이나 인대(ligament)와 같은 연조직(soft tissues) 재료로서 응용할 수 있는 가능성을 보여주었다.

**감사의 글:** 본 연구는 2014년도 교육부 대학특성화사업(CK-II) 사업비 중 일부 지원받아 수행되었음.

## 참고 문헌

- R. E. Unger, M. Wolf, K. Peters, A. Motta, C. Migliaresi, and C. J. Kirkpatrick, *Biomaterials*, **25**, 1069 (2004).
- Y. Qu, Y. Yang, J. Li, Z. Chen, J. Li, K. Tang, and Y. Man, *J. Biomater. Appl.*, **14**, 21 (2010).
- K. Zhang, H. Wang, C. Huang, Y. Su, X. Mo, and Y. Ikada, *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, **93**, 984 (2010).
- N. Vachiraroja, J. Ratanavaraporna, S. Damrongsakkula, R. Pichyangkurab, T. Banaprasertc, and S. Kanokpanont, *Int. J. Biol. Macromol.*, **45**, 470 (2009).
- R. Elia<sup>1</sup>, D. R. Newhide, P. D. Pedevillano, G. R. Reiss, M. A. Firpo, E. W. Hsu, D. L. Kaplan, G. D. Prestwich, and R. A. Peattie, *J. Biomater. Appl.*, **27**, 749 (2013).
- J. Kundu, L. A. Poole-Warren, P. Martens, and S. C. Kundu, *Acta Biomater.*, **8**, 1720 (2012).
- J. O. Hollinger and G. C. Battistone, *Clin. Orthop. Relat. Res.*, **207**, 290 (1986).
- B. D. Ratner, A. Hoffman, F. J. Schoen, and J. E. Lemons, *J. Clin. Eng.*, **22**, 26 (1997).
- S. Yang, K. F. Leong, Z. Du, and C. K. Chua, *Tissue Eng.*, **7**, 679 (2001).
- J. O. Hollinger and G. C. Battistone, *Clin. Orthop. Relat. Res.*, **207**, 290 (1986).
- M. D. Lelah, S. L. Cooper, and T. G. Grasel, *Macromol. Chem. Phys.*, **34**, 199 (1986).
- M. Borkenhagen, R. C. Stoll, P. Neuenschwander, U. W. Suter, and P. Aebischer, *Biomaterials*, **19**, 2155 (1998).
- X. J. Loh, K. K. Tan, X. Li, and J. Li, *Biomaterials*, **27**, 1841 (2006).
- T. LaShanda, K. James, P. D. Brian, L. T. Edwin, and P. T. Hammonda, *Polymer*, **47**, 3073 (2006).
- H. S. Park, M. S. Gong, and J. C. Knowles, *J. Biomater. Appl.*, **27**, 99 (2012).
- G. H. Altman, R. L. Horan, H. H. Lu, J. Moreau, I. Martin, J. C. Richmond, and D. L. Kaplan, *Biomaterials*, **23**, 4131 (2002).
- C. Veparia and D. L. Kaplan, *Prog. Polym. Sci.*, **32**, 991 (2007).
- L. K. David, H. J. Jin, and G. Rutledge, US Patent 8071722 B2 (2011).
- S. Sofia, M. B. McCarthy, G. Gronowicz, and D. L. Kaplan, *J. Biomed. Mater. Res.*, **54**, 139 (2001).
- M. Takahashi, K. Tsujimoto, H. Yamada, H. Takagi, and S. Nakamori, *Biotechnol. Lett.*, **25**, 1805 (2003).
- A. Kurioka, M. Yamazaki, and H. Hirano, *Eur. J. Biochem./FEBS*, **259**, 120 (1999).
- J. Lee, S. Lee, S. Kim, K. Kim, Y. Kim, J. Song, D. Lee, and G. Khang, *Polym. Korea*, **37**, 127 (2013).
- G. Panthi, M. Park, H.-Y. Kim, and S.-J. Park, *J. Ind. Eng. Chem.*, **24**, 1 (2015).
- W. K. Son, W. H. Park, and Y. S. Nam, *Polymer Science and Technology*, **14**, 274 (2003).
- H. J. Kim, M. S. Kang, J. C. Knowles, and M. S. Gong, *J. Biomater. Appl.*, **29**, 454 (2014).
- D. I. Lim, H. S. Park, J. H. Park, M. S. Gong, and J. C. Knowles, *J. Bioact. Compat. Polym.*, **28**, 274 (2013).
- H. S. Park, M. S. Gong, and J. C. Knowles, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **24**, 281 (2013).
- H. S. Park, M. S. Gong, J. H. Park, S. I. Moon, I. B. Wall, H. W. Kim, J. H. Lee, and J. C. Knowles, *Acta Biomater.*, **9**, 8962 (2013).

29. R. Vasita and D. S. Katti, *Int. J. Nanomedicine*, **1**, 15 (2006).
30. I. C. Um, H. Y. Kweon, Y. H. Park, and S. Hudson, *Int. J. Biol. Macromol.*, **29**, 91 (2001).
31. K. Y. Lee and W. S. Ha, *Polymer*, **40**, 4131 (1999).
32. K. Wei, Y. Li, K. O. Kim, Y. Nakagawa, B. S. Kim, K. Abe, G. Q. Chen, and I. S. Kim, *J. Biomed. Mater. Res., Part A*, **97A**, 272 (2011).
33. M. Tsukada, G. Freddi, and N. Kasai, *J. Polym. Sci., Part B: Polym. Phys.*, **32**, 1175 (1994).
34. G. A. Holzapfel, "Biomechanics of soft tissue", in *Biomech preprint series*, Graz University of Technology, Graz, Austria, 2000.
35. B. Sharma, H. Keul, H. Hocker, T. Loontjens, and R. V. Benthem, *Polymer*, **46**, 1775 (2005).
36. K. Gorna and S. Gogolewski, *J. Biomed. Mater.*, **60**, 592 (2002).
37. D. Cohn, T. Stern, M. F. Gonzalez, and J. Epstein, *J. Biomed. Mater.*, **59**, 273 (2002).
38. L. Linhao, L. Haibin, Q. Yuna, L. Xian, K. Gurinder, Z. Li, L. Wanqian, L. Yonggang, C. Kaiyong, and Y. Li, *Int. J. Biol. Macromol.*, **49**, 223 (2011).
39. M. Geoghegan and G. Krausch, *Prog. Polym. Sci.*, **28**, 261 (2003).
40. Willy Henri Piret, US Patent 6025073 (1998).
41. M. Lorenz, H. Sandra, K. Vassilis, K. H. Carl, M. John, G. Gloria, Z. Ludwig, L. Robert, V. N. Gordana, and L. K. David, *Biomaterials*, **26**, 147 (2005).