

## 견피브로인/히아론산 블렌드 필름의 적외선 분광 분석 및 시차열분석

권해용\* · 이광길 · 여주홍 · 우순옥 · 한상미 · 이용우 · 이장현<sup>1</sup> · 박영환<sup>2</sup>  
농업과학기술원 농업생물부, <sup>1</sup>서울대학교 수의과대학, <sup>2</sup>서울대학교 농업생명과학대학

### Infrared Spectroscopy and Differential Scanning Calorimetry of Silk Fibroin/Hyaluronic Acid Blend Film

HaeYong Kweon\*, Kwang-Gill Lee, Joo-Hong Yeo, SoonOk Woo, SangMi Han, Yong Woo Lee, Jang Hern Lee<sup>1</sup> and Young Hwan Park<sup>2</sup>

Department of Agricultural Biology, NIAST, RDA, Suwon 441-100, Korea

<sup>1</sup>College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

<sup>2</sup>College of Agriculture and Life Science, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

#### ABSTRACT

*Bombyx mori* silk fibroin/hyaluronic acid blend films were prepared by mixing aqueous solution of *B. mori* silk fibroin and hyaluronic acid. According to the FTIR spectra, no interaction between silk fibroin and hyaluronic acid was found. The conformation of silk fibroin in blend films was changed from random coil to  $\beta$ -sheet structure by treatment of EDC ethanol solution. Thermal degradation peak of silk fibroin and hyaluronic acid was also not altered by blending each other. The average swelling ratio of silk fibroin/hyaluronic acid blend films was 70. Therefore, silk fibroin/hyaluronic acid blend films might be one of possible wound dressing materials.

**Key words** : silk fibroin, hyaluronic acid

#### 서 론

최근에 들어 전통적인 의료용 고분자의 하나인 실크 단백질의 생체적합성 그리고 세포 및 조직친화성 등에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 실크 단백질은 곤충이 생산하는 세포외물질의 일종으로서 글라이신, 알라닌, 세린 등 여러 가지 아미노산으로 구성되어 있으며 생체 내에서는 액상건의 형태로 존재하다가 누에의 영견활동에 의하여 고형화된다. 한번 고형화된 견단백질을 물리화학적으로 매우 안정하므로 일반적인 유기용매에는 잘 용해되지 않는 성질이 있다.

단백질을 용해하는 것으로 알려져 있는 차오트로픽염은 견단백질을 부분적으로 가수분해시키면서 용해시키는 것으로 알려져 있다. 대표적인 견단백질의 차오트로픽염은 염화칼슘, 질산칼슘 등이 있다. 이들 차오트로픽염에 의하여 용해된 견단백질은 겔, 필름, 스폰지, 부직포, 섬유 등

다양한 형태로 성형이 가능하나 액상 견단백질, 고치실 피브로인 등 천연형태의 피브로인에 비하여 분자량, 기계적 강도 등 여러 가지 측면에서 차이가 있는 것으로 보고되어 지고 있다. 특히, 견피브로인 수용액으로부터 얻어지는 필름이나 스폰지는 유연성이 너무 적어 쉽게 부서지거나 기계적 물성이 현저하게 약한 상태이다. 따라서 이러한 문제점을 보완하기 위하여 고분자 자체의 구조나 기능에 큰 변화없이 부족한 성질을 증가시킬 수 있는 방법으로 각광을 받고 있는 고분자 블렌드법 또는 semi-interpenetrating polymer network 등의 방법으로 다른 고분자와의 복합체 형성을 시도하고 있다(Lee *et al.*, 2004; Kweon *et al.*, 2001a; Kweon *et al.*, 2001b; Freddi *et al.*, 1995; Tsukada *et al.*, 1994).

본 연구에서는 창상피복제, 조직공학용 소재 등으로 최근 활발하게 연구되고 있는 히아론산과 실크 피브로인으로 구성된 블렌드 필름을 제조하여 그 구조적 특성의 변

\*Corresponding author. E-mail: hykweon@rda.go.kr

화를 적외선 분광분석법으로 살펴보았으며, 열특성은 시차열분석법으로 확인하였다.

히아론산(hyaluronic acid)은 동물의 결합조직에 많이 존재하며 피부, 힘줄, 근육, 연골 등 다양한 조직의 세포 간 충전물로서 젤리와 비슷한 형태의 세포외 매트릭스로 존재한다. 히아론산은 D-glucuronic acid와 N-acetyl-D-glucosamine이라는 두 개의 당이 반복단위가 되는 음이온성 선상 고분자이며 반복단위당 하나의 음이온성 전하를 띠기 때문에 매우 charge density가 낮다. 히아론산은 분자량이 높음에도 불구하고 물에 녹으며 hyaluronidases, chondroitinase 등의 효소에 의하여 분해되므로 (Abatangelo *et al.*, 1997) 히아론산 벤질 에스터, 가교 히아론산 제조, 또는 고분자 전해질 복합체 등에 대한 연구가 진행되고 있다(Barbuci *et al.*, 2000; Denuziere *et al.*, 1996; Benedetti *et al.*, 1993).

## 재료 및 방법

### 1. 실험재료

가잠(*Bombyx mori*)누에고치를 비누소다법으로 정련하여 얻은 견피브로인을 실험재료로 사용하였다. 누에고치의 정련은 마르세이유 비누 0.5 % (o.w.f), sodium carbonate 0.3 % (o.w.f) 수용액으로 용비 1 : 50의 조건하에서 95°C에서 1시간 동안 2회에 걸쳐서 행하고 따뜻한 물과 찬물로 반복 수세하여 정련제를 제거하는 비누소다법으로 행하였다. 정련한 누에고치를 CaCl<sub>2</sub> : H<sub>2</sub>O : EtOH = (1 : 8 : 2) mol 비의 혼합용매에 용해, 투석하여 제조한 피브로인 용액을 실험재료로 사용하였다. 히아루론산(hyaluronic acid) 와 N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC) 등은 알드리치-시그마사의 제품을 사용하였으며 히아론산의 화학구조는 그림 1과 같다.

### 2. 피브로인/히아론산 브랜드 필름의 제조 및 가교처리

히아론산은 점성이 매우 높은 다당류이므로 0.5 % (w/v) 용액을 제조하여 같은 농도의 실크 피브로인 용액과 70:30, 50:50, 30:70의 부피비로 혼합한 후 이를 통풍건조

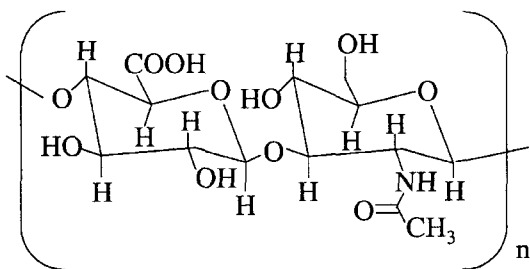


Fig. 1. Chemical structure of hyaluronic acid.

Table 1. Preparation condition and sample IDs of silk fibroin/hyaluronic acid blend films

Sample ID	Silk Fibroin (0.5% (w/v))	Hyaluronic acid (0.5% (w/v))
SF	100	0
SH31	70	30
SH22	50	50
SH13	30	70
Hya	0	100

\*for example, SH31X is SH31 sample treated with EDC/95%ethanol solution

하여 브랜드 필름을 제조하였다. 제조된 피브로인/히아론산 브랜드 필름을 50 mM EDC/95% EtOH 용액에 실온에서 72시간 침지한 후 물로 충분히 수세한 후 동결건조하여 가교 피브로인/히아론산 브랜드 필름을 제조하였다 (표 1).

### 3. 특성 분석

피브로인/히아론산 브랜드 필름의 구조 특성을 분석하기 위하여 적외선 분광분석기 Paragon 1000 FT-IR (Perkin Elmer)를 사용하여 적외선 분광분석을 행하였다. 피브로인/히아론산 브랜드 필름의 시차열특성을 살펴보기 위하여 미국 TA instrument 사의 DSC (Model TA 2910)를 이용하여 질소기류하에서 10°C/min의 승온속도로 50~450°C의 온도범위내에서 시차열분석을 행하였다. 그리고 피브로인/히아론산 브랜드 필름의 팽윤율은 팽윤 시료 무게를 건조 시료 무게로 나누어서 계산하였다. 건조시료의 무게는 동결건조한 시료의 무게로서 측정하였으며 팽윤시료의 무게는 소수성 그물망으로 만들어진 주머니에 시료를 넣은 후 실온에서 24시간 동안 증류수로 처리한 후 여과지로 외부의 수분을 제거한 후 측정하였다.

## 결과 및 고찰

용액혼합법(solution blend technique)에 의하여 제조되는 고분자 브랜드는 사용되는 고분자간의 상호작용 뿐만 아니라 혼합되는 고분자의 용매에 의하여도 영향을 받는 것으로 알려져 있다(Kweon *et al.*, 2001b). 본 연구에서는 실크 단백질과 히아론산의 공용매인 물을 사용하였으므로 용매에 의한 분자구조 보다는 두 고분자 간의 상호작용을 관찰하는 데 용이할 것으로 생각된다.

견피브로인과 히아론산 두 고분자 간의 분자레벨에서의 상호작용을 살펴보기 위하여 브랜드 필름의 조성변화에 따른 적외선 분광곡선을 행한 후 그 결과를 그림 2에 나타내었다. 견피브로인/히아론산 브랜드 필름에서(그림 2(b), (d) 1648의 흡수대 등 아마이드 I과 II의 흡수대가 강하게

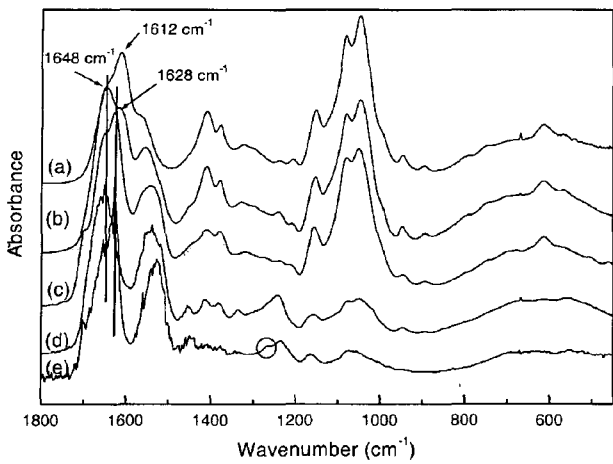


Fig. 2. FT-IR spectra of Hya(a), SH13(b), SH13X(c), SH31(d), and SH31X(e).

나타났다. 히아론산은 (그림 2(a)) 1648 (acetoamide C=O stretching), 1550 (NH stretching) 그리고 1612와 1410 (salt form of carboxylic band)  $\text{cm}^{-1}$  에서 강한 흡수대를 나타내었다(Davé *et al.*, 1995, Barbucci *et al.*, 2000). 실크 피브로인이 혼합되었음에 불구하고 히아론산의 아세트아마이드 카르복실기 1648  $\text{cm}^{-1}$ 와 염 형태의 카르복실기 1410  $\text{cm}^{-1}$  흡광대 그리고 C-O-C backbone을 반영하는 분광흡수대의 위치가 이동하지 않는 것으로 확인되어 실크 피브로인과 히아로산 두 고분자간 혼합비 또는 EDC 처리 여부에 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 실크 피브로인과 히아론산 사이에 수소결합이 존재하지 않음을 나타낸다. 실크 단백질의 아마이드기와 중복되는 히아론산의 아세트아미드 카르복실기의 흡수대와 아마이드 II의 흡수대는 EDC 용액 처리에 의하여 전피브로인의  $\beta$ -sheet 구조를 반영하는 1628  $\text{cm}^{-1}$ 로 이동하였다. 또한 SF/Hya 브랜드 필름(그림 2(b), (d))의 경우 random coil 구조를 반영하는 실크 피브로인 아마이드 IV 영역(1242  $\text{cm}^{-1}$ )의 흡수대가 EDC 용액 처리에 의하여 1264  $\text{cm}^{-1}$ 에서  $\beta$ -sheet 구조를 반영하는 흡수대를 나타내었다(그림 2(c), (e)). 이러한 결과로부터 브랜드내에 존재하는 실크 피브로인이 EDC의 용매인 에탄올에 의하여 결정화되었음을 알 수 있으며 히아론산의 분자체는 알코올 처리에 의하여 영향을 받지 않는다는 것을 확인하였다. 그럼에도 불구하고 생체내에 존재하는 히아론산이 결합조직내에 존재하는 단백질과 소수성 상호작용을 하는 것으로 알려져 있기 때문에(Comper & Laurent 1978) 소수성 아미노산이 많이 존재하는 실크 피브로인과 히아론산 간에는 소수성 결합이 존재할 것으로 추정할 수 있다.

전피브로인/히아론산 브랜드 필름의 열 특성을 살펴보

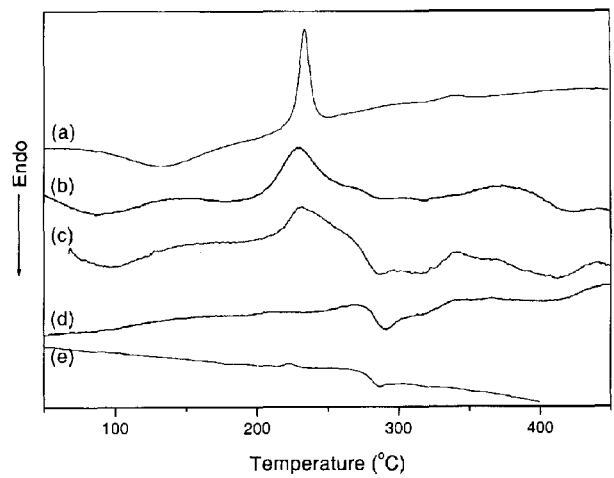


Fig. 3. DSC thermograms of Hya(a), SH13X(b), SH22X(c), SH31X(d), and SF(e).

기 위하여 시차열분석을 행하여 그 결과를 그림 3에 나타내었다. 일반적으로 배향이 잘 된 가잠 견사의 경우 전피브로인의 열분해 흡열피크는 320°C 이상의 온도에서 나타나지만, 배향이 안된  $\beta$ -sheet 구조를 가지고 있는 액상견이나 재상 전피브로인은 280°C 부근에서 열분해 흡열피크를 나타내는 것으로 알려져 있으며(Lee *et al.*, 1999; Kweon & Park 1994; Ishikawa *et al.*, 1972) 히아론산은 235°C 부근에서 열분해 발열 피크를 나타내었다(Davé *et al.*, 1995; Milella *et al.*, 2002). 히아론산의 발열피크가 나타나는 온도는 피브로인/히아론산 브랜드 필름의 혼합비 변화 또는 EDC 용액 처리 여부에 거의 영향을 받지 않은 것으로 나타났다. EDC 용액으로 처리한 실크 피브로인/히아론산 브랜드 필름에 존재하는 히아론산의 열분해 발열피크의 온도에는 큰 변화가 없었으나 열분해 발열피크가 넓어지는 것으로 봐서 실크 피브로인과의 브랜드 또는 EDC 가교처리에 의하여 히아론산의 열분해 반응이 매우 복잡한 환경하에서 진행되고 있는 것으로 사료된다. 그리고, 실크 피브로인의 열분해 거동은 전형적인 미배향  $\beta$ -sheet 의 특성을 나타내고 있었다.

히아론산은 물에 용해되므로 피브로인/히아론산 브랜드 물에 용해 또는 겔화되어 제거되는 특성을 보였다. 이러한 특성은 실크 피브로인/히아론산 브랜드를 창상부위에 적용할 경우 흡수성 소재로 활용 가능성이 높음을 시사한다. EDC 에탄올 용액으로 처리한 전피브로인/히아론산 브랜드의 팽윤율을 측정할 결과 증류수에 침지할 경우 24시간까지 형태를 유지하였으며, 자기 중량 대비 평균 70배의 수분을 흡수하는 것으로 나타났다. 따라서 전피브로인/히아론산 브랜드를 창상피복제로 적용

할 경우 상처부위의 삼출액을 충분히 흡수, 보유하여 상처부위가 습윤상태로 유지되도록 하는 역할을 하여 상처회복효과가 촉진될 것으로 사료된다.

## 적 요

견피브로인의 응용가능성을 높이기 위하여 대표적인 생체고분자인 히아론산을 이용하여 견피브로인/히아론산 브랜드 필름을 제조하였으며 구조 및 열 특성을 살펴보았다.

1. 적외선 분광분석 결과 견피브로인과 히아론산 두 고분자 사이에는 수소결합 등의 상호작용이 존재하지 않는 것으로 나타났다. 또한 브랜드 필름내에 존재하는 실크 피브로인은 EDC 에탄올 용액처리에 의하여 β-sheet 구조로 전이되었다.

2. 견피브로인/히아론산 브랜드 필름에서 견피브로인과 히아론산 각각의 열분해 흡열피크와 발열피크 온도에는 큰 변화가 없었으나, 열분해 피크의 폭이 넓어지는 것으로 봐서 실크 피브로인과의 브랜드 또는 EDC 처리에 의하여 열분해 반응이 매우 복잡한 환경하에서 진행되고 있음을 알 수 있었다.

3. 견피브로인/히아로산 브랜드 필름은 자기 중량 대비 평균 70배의 수분을 흡수하였다.

## 감사의 글

본 연구는 한국과학재단 특정기초연구(R01-2002-000-00391-0)지원으로 수행되었음.

## 인용문헌

Abatangelo, G., R. Barbucci, P. Brun and S. Lamponi (1997) *Biomaterials* **18**: 1441.  
 Barbucci, R., R. Rappuoli, A. Borzacchiello and L. Ambrosio (2000) Synthesis, chemical and rheological characterization of new hyaluronic acid-based hydrogels. *J. Biomater. Sci. Polym.*

*Edn.* **11**(4): 383~399.  
 Benedetti, L., R. Cartivo, T. Berti, A. Berti, F. Pea, M. Mazzo and G. Abatangelo (1993) Biocompatibility and biodegradation of different hyaluronan derivatives (Hyafl) implanted in rats. *Biomaterials* **14**(15): 1154~1160.  
 Comper, W. D. and T. C. Laurent (1979) *Physiol. Rev.* **58**: 255.  
 Davé, V., M. Tamagno, B. Focher and E. Marsano (1995) Hyaluronic acid-(hydropropyl) cellulose blends: A solution and solid state study. *Macromolecules* **28** : 3531~3539.  
 Denuziere, A., D. Ferrier and A. Domard (1996) Chitosan-chondroitin sulfate and chitosan-hyaluronate polyelectrolyte complexes. physico-chemical aspects. *Carbohydrate Polymers* **29**: 317~323.  
 Freddi, G. M. Romano, M. R. Masafra and M. Tsukada (1995) Silk fibroin/cellulose blend films: preparation, structure, and physical properties. *J. Appl. Polym. Sci.* **56**: 1537~1545.  
 Ishikawa, H. M. Tsukada, T. Doizume and K. Hirabayashi (1972) DSC thermograms of silk fibroin. *Sen-i Gakkaishi* **28**: 91~98.  
 Kweon, H. Y., S. H. Park, J. H. Yeo, Y. W. Lee and C. S. Cho (2001a) Preparation of semi-interpenetrating polymer networks composed of silk fibroin and poly(ethylene glycol) macromer. *J. Appl. Polym. Sci.* **80**(10): 1848~1853.  
 Kweon, H. Y., I. C. Um and Y. H. Park (2001b) Structural and thermal characteristics of *Antheraea pernyi* silk fibroin/chitosan blend film. *Polymer* **42**(15): 6551~6556.  
 Kweon, H. Y. and Y. H. Park (1994) Structural characteristics and physical properties of wild silk fibers: *Antheraea pernyi* and *Antheraea yamamai*. *Korean J. Seric. Sci.* **36**(2): 138~146.  
 Lee, K., H. Kweon, J. Yeo, S. Woo, J. Lee and Y. Park (2004) Structural and Physical Properties of Silk Fibroin/Alginate Blend Sponges. *J. Appl. Polym. Sci.* **93**(5): 2174~2179.  
 Lee, K. G., Y. W. Lee, J. H. Yeo, J. Nam, H. Y. Kweon and Y. H. Park (1999) Structural characteristics of silk fibroin gel on the preparation conditions. *Korean J. Seric. Sci.* **41**(1): 41~47.  
 Millela, E., E. Brescia, C. Massaro, P. A. Ramires, M. R. Miglietta, V. Fiori and P. Aversa (2002) Physico-chemical properties and degradability of non-woven hyaluronan benzylic esters as tissue engineering scaffolds. *Biomaterials* **23**: 1053~1063.  
 Tsukada M., G. Freddi and J. S. Crighton (1994) Structure and compatibility of poly(vinyl alcohol)-silk fibroin (PVA/SF) blend films. *J. Polym. Sci. Part B; Polym. Phys.* **32**: 243~248.