Journal of Radiation Industry 5 (4) : 365~370 (2011)

전자선 조사 방법을 통한 생분해성고분자의 표면개질 특성 평가

김우진 · 신영민 · 박종석 · 권희정 · 노영창 · 임윤묵*

한국원자력연구원 첨단방사선연구소 공업환경연구부

Surface Modification of Poly(L-lactide-co-ε-caprolactone) Nanofibers by Electron-beam Irradiation

Woo-Jin Kim, Young Min Shin, Jong-Seok Park, Hui-Jeong Gwon, Young-Chang Nho and Youn-Mook Lim*

Research Division for Industry & Environment, Advanced Radiation Technology Institute, Korea Atomic Energy Research Institute, Jeongeup 580-185, Korea

Abstract - **Electrospun nanofibers prepared with synthetic biodegradable polymer have some limitations in regulating adhesion, proliferation, and spreading of cells because of their surface hydrophobicity and absence of cell-interaction. In this study, we functionalized the electrospun poly(L-lactide-co-ε-caprolactone) (PLCL) nanofibers with acrylic acid (AAc) to modulate their surface hydrophilicity using electron-beam irradiation method and then measured grafting ratio of AAc, water contact angle, and ATR-FTIR of AAc-grafted nanofibers. A grafting ratio of AAc on the nanofibers was increased as irradiation dose and AAc concentration were increased. AAc-grafted nanofibers also have higher wettability than non-modified nanofibers. In conclusion, those surface-modified nanofibers may be an essential candidate to regulate cell attachment in tissue engineering applications.**

Key words : Poly(L-lactide-co-ε-caprolactone), Electrospinning, Electron-beam irradiation, Nanofiber

서 론

조직공학적인 측면에서 지지체는 세포의 부착과 증식 및 분화에 관련하여 매우 중요한 역할을 하기 때문에 많은 연구자들은 전기방사법, salt leaching, fiber bonding 및 phase separation과 같은 다양한 방법을 활용하여 세포지지체를 개발해왔다(Park *et al.* 2007; Shor *et al.* 2007). 최근 10년간 전기방사법을 이용하여 세포지지체를 개발하는 연구가 활발히 진행 중인데 전기방사법은 DC 고전압 발생기, 실린지 펌프 및 콜렉터와 같은 간단한 장비를 이용하여 간결하면서도 효과적으로 나노 섬유형 세포 지지체를 제조할 수 있는 기술이다. 또한, 방출용액의 농도, 표면장력, 방출용액의 속도 및 전기장의 세기, 노즐의 크기와 같은 다양한 공정변수를 조절하여 원하는 다공성 지지체를 제조할 수 있다. 본 전기방사법의 기본원리로는 노즐 끝에서 노즐의 끝에 맺히는 반구형 방울이 표면에서 발생되는 전하와 쌍극자 반발작용에 의해 테일러 콘을 형성하면서 방출될 때 용매가 증발되면서 집적판으로 고분자 섬유가 집적되는 현상을 이용한 기술이다.

* Corresponding author: Youn-Mook Lim, Tel. +82-63-570-3082, Fax. +82-63-570-3079, E-mail. ymlim71@kaeri.re.kr

특히, 이 기술을 사용하여 제작되는 지지체는 삼차원적인 구조를 지니고 있으며 이 구조는 생체의 세포외기질(extracellular matrix, ECM)과 유사한 구조를 띄고 있기 때문에 조직공학적인 측면에서 매우 유용한 기술이다. 최근에, 이와 같은 전기방사법을 이용하여 제작되는 조직공학용 지지체의 대표적인 합성고분자 물질로는 polycaprolactone (PCL), poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA), poly(L-lactic acid) (PLLA)와 poly(L-lactide-co-ε-caprolactone) (PLCL) 등이 있으며, 콜라겐, 젤라틴, 키토산 등과 같은 천연고분자도 사용되고 있다(Reneker *et al.* 2002; Jayakumar *et al.* 2005; Song *et al.* 2008; Dong *et al.* 2009). 일반적으로, 생분해성 합성 고분자들은 뛰어난 기계적인 강도를 지니고 있으며 혼합비율에 따라 생분해능력을 조절할 수 있지만, 합성고분자의 소수성 표면기질 때문에 세포의 증식력과 분화능을 제한하는 문제점을 갖고 있다. 이 때문에 많은 연구자들은 ozone 처리, 감마선, ultraviolet (UV)와 플라즈마 처리 및 전자선 조사방법을 이용하여 생분해성 합성 고분자 물질의 낮은 표면 친수성을 개선하기 위한 연구를 진행해 오고 있다(Benson *et al.* 2002).

이중에서 방사선을 활용한 고분자의 표면 개질 연구는 다양한 장점을 지니고 있다. 첫째로, 다양한 단량체를 이용하여 쉽게 고분자의 표면에 관능기를 도입할 수 있으며, 이를 활용하여 생체 물질을 쉽게 고분자 표면에 도입시킬 수 있다. 둘째로, 단량체의 농도 및 용매의 구성비, 방사선량의 조절을 통해서 고분자 표면에 그라프팅되는 단량체의 정도를 조절할 수 있다. 마지막으로, 방사선 조사 방법은 의료용 재료 및 장비들을 안전하게 멸균시킬 때도 효과적으로 사용될 수 있다. 이와 같은 방사선 조사방법의 장점들 때문에 대다수의 연구자들은 고분자 물질의 표면 개질에 감마선을 활용한 연구를 진행해왔다. 하지만 감마선은 높은 에너지 때문에 시료에 직접적으로 미치는 영향이 크며, 느린 처리 시간과 고비용에 의해서 상업적으로 이용하는 데 한계를 지니고 있다. 반면에 전자선은 감마선과 유사한 효과를 지니고 있으며 처리 시간이 매우 빠르다는 측면에서 상용화에 적합한 기술이라고 할 수 있다(Benson *et al.* 2002).

이에 본 연구에서는 고분자 재료의 표면개질을 위해서 전자선 조사방법을 사용하여 실험을 진행하였다. 먼저 전기방사법을 이용하여 PLCL 나노섬유를 제작하였으며, 제작된 나노섬유는 다양한 농도의 아크릴산 단량체 용액에 담지하여 전자선 동시조사 방법을 사용하여 표면개질을 실시하였다. 조사된 나노섬유의 표면의 변화를 확인하기 위해서 표면의 젖음성과 화학적인 변화를 관찰하였다.

재료 및 방법

1. 시약 및 재료

L-lactide는 Purac Biochem (Netherlands)에서 구입하였으며, 2,2,2-trifluoroethanol (TFE), toluidine blue O, ε-caprolactone, stannous octoate, toluene, and acrylic acid (AAc)는 Sigma-Aldrich (USA)에서 구입하였다. NaOH, HCl, methanol과 dichloromethane은 Showa chemical (Japan)에서 구입하여 사용하였다.

2. Poly(L-lactide-co-ε-caprolactone) (PLCL) 합성 및 나노섬유 제조

PLCL는 L-lactide와 ε-caprolactone을 stannous octoate를 촉매로 사용하여 150°C에서 개환중합반응을 실시하여 합성하였다. 합성된 PLCL은 2,2,2-trifluoroethanol과 dichloromethane (20 : 80)의 용매에 5 wt% 농도로 용해시켰고, 용해된 PLCL 용액은 18 kV의 전압에서 노즐과 집적판과의 거리는 20 cm를 유지하면서, 1 ml h^{-1}의 방출속도로 전기방사를 실시하였다.

3. 전자선 조사방법을 이용한 아크릴산 그라프팅

아크릴산을 나노섬유의 표면에 그라프팅시키기 위해서 0.01 M의 Mohr's salt가 포함된 1, 5, 10 wt%의 아크릴산 용액에 PLCL 나노섬유를 담지하여 1 kGy에서 20 kGy까지 다양한 조사선량을 이용하여 전자선 조사를 실시하였다. 조사된 나노섬유는 반응을 하지 않은 단량체를 제거하기 위해 12시간 동안 세척을 실시하였다.

4. 감쇠 전반사 분광법 측정 (ATR-FTIR)

PLCL과 AAc-PLCL 나노섬유는 ATR-FTIR spectrophotomer (Truker TEMSOR 37, Bruker AXS. Inc., Germany)를 이용하여 측정하였다. 본 측정은 500 ~ 4000 cm^{-1}의 resolution에서 4 cm^{-1} ATR mode로 측정하였다.

5. 접촉각 측정

PLCL과 AAc-PLCL 나노섬유는 접촉각 측정기 (Phoenix-300, surface electro optics Ltd., Korea)를 이용하여 정적, 동적 접촉각을 측정하였다. 동적 접촉각은 1초 간격으로 5초 동안 측정하였으며, 물방울의 크기는 10 μl로 유지하였으며, 측정은 다섯 개의 샘플로 실시하였다.

6. 주사전자현미경 (SEM) 측정

고해상도의 나노섬유 표면확인을 위해서 sputter coating을 60초간 실시하여 나노섬유를 골드코팅을 실시하였다. 10～15 kV의 전자빔 세기, 10～12 mm의 측정거리 조건하에 주사전자현미경 (JSM-6390, JEOL, Japan)을 이용하여 관찰하였다.

7. 그라프팅된 아크릴산의 정량 분석

나노섬유에 그라프트된 아크릴산의 정량을 확인하기 위해서 toluidine blue O 염색방법을 사용하였다. 아크릴산이 그라프팅된 나노섬유를 toluidine blue O 용액 (4 mg toluidine blue O chloride, 20 mg NaCl, 0.01 M HCl)에 6시간 동안 상온에서 담지하였다. 염색된 샘플들은 2차 증류수를 이용하여 염색되지 않은 toluidine blue O를 제거한 뒤, 0.1 M NaOH와 ethanol (1 : 4, v/v) 혼합용액에서 염색된 toluidine blue O를 완전히 용출시켰다. 용출된 용액은 microplate spectrophotometer (PowerWave XS, Bioteck, USA)를 이용하여 630 nm에서 흡광도를 측정하였다.

결과 및 논의

1. PLCL의 합성과 나노섬유의 제조

L-lactide와 ε-caprolactone의 molar ratio는 핵자기 공명장치 (NMR)를 이용하여 측정하였다 (L-lactide/ε-caprolactone=5.5 : 4.5). 또한, 겔 투과 크로마토그래피 (GPC)를 이용하여 수평균 분자량 (Mn: 3.09×10^5 g mol^{-1})과 중량평균 분자량 (MW: 5.04×10^5 g mol^{-1})을 측정하였다. 합성된 PLCL를 이용하여 전기방사법을 이용하여 나노섬유를 제작하였으며, 전자선 동시 조사법을 사용하여 아크릴산을 표면에 그라프팅시켰다 (Fig. 1).

2. ATR-FTIR

아크릴산으로 그라프팅시킨 나노섬유의 표면상의 관

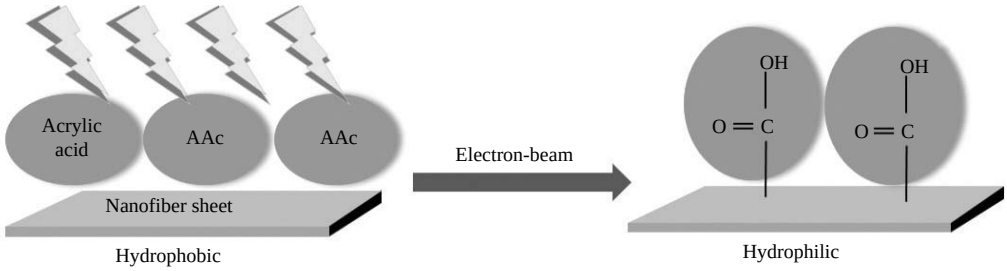

Fig. 1. Schematic diagrams of surface modification of nanofibers using electron-beam irradiation.

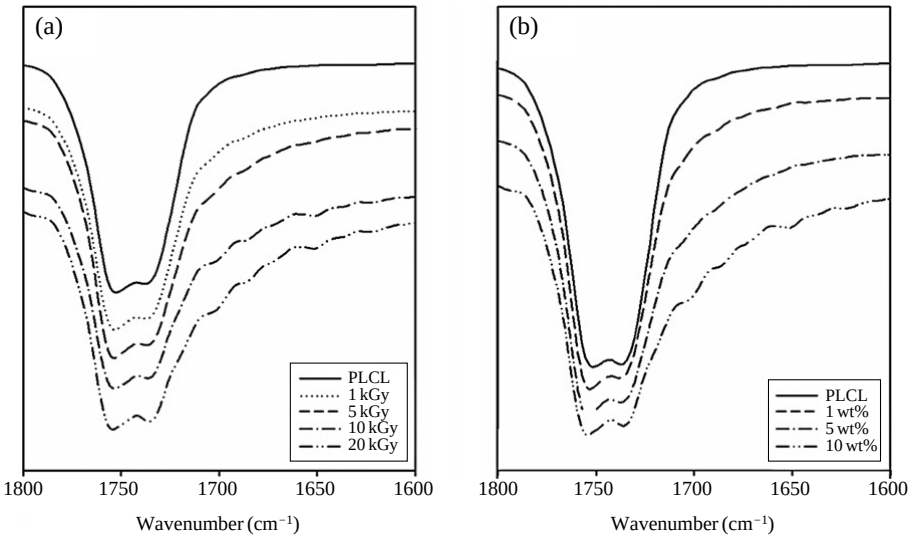

Fig. 2. ATR-FTIR spectra of AAc-PLCL nanofibers as a function of (a) concentration of AAc and (b) electron-beam irradiation doses.

능기의 변화를 확인하기 위해서 ATR-FTIR을 실시하였다. 아크릴산이 그라프팅된 나노섬유의 표면의 ATR 스펙트럼을 통해서 1740 cm^{-1}에서 PLCL의 카르보닐기(C=O)의 존재를 확인할 수 있었으며 또한, 1700 cm^{-1}에서 아크릴산의 카르복실기(−COOH)가 관찰되었다(Fig. 2). 이를 통해서 전자선 조사를 통한 아크릴산의 그라프팅이 이루어졌다는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 전자선의 조사 선량과 아크릴산의 농도에 비례하여 카르복실기가 증가하는 경향을 확인할 수 있었다.

3. 물 접촉각 측정 실험

세포의 접착력과 증식력을 조절하는 데 중요한 요소로 고분자 표면의 젖음성을 들 수 있다. 전기방사법을 이용하여 제작된 세포 지지체들은 높은 기공때문에 동일 재료로 준비된 필름보다 높은 물 접촉각을 나타낸다. 일반적으로, PLCL 나노섬유 지지체는 대략 80～100°의 접촉각을 지니고 있으며, 이는 세포가 지지체에 정착하는 데 제한적인 영향을 미친다. 본 실험에서는 전자선 조사에 의한 표면의 변화를 육안으로 확인하기 위해서 물 접촉각 측정을 실시하였으며, Fig. 3에서는 아크릴산의 농도 변화에 따른 PLCL 나노섬유표면에 맺힌 물방울의 형태학적인 모습을 관찰하였다. 이를 통해서 그라프팅되는 아크릴산의 농도가 높을수록 나노섬유 표면의 친수성이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 정적인 접촉각 측정 실험을 통해서 조사 전 80°였던 PLCL 나노섬유의 접촉각 값이 20 kGy 전자선에 의해 그라프팅된 후에 약 30°까지 낮아졌다는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 이와 같은 결과를 토대로 아크릴산의 농도뿐만 아니라 전자선의 조사 선량에 의해서도 그라프팅되는 정도가 변화된다는 사실을 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과는 동적 접촉각 실험에서도 동일한 경향을 나타내는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 5).

4. 주사 전자 현미경 측정

PLCL 나노섬유의 전자선 조사 전과 조사 후의 형태학적인 모습을 주사전자현미경을 통해서 그라프팅에 의한 섬유의 변화를 육안으로 확인할 수 있었다(Fig. 6). 주사전자현미경을 통해서 700 nm에서 1200 nm 정도의 직경

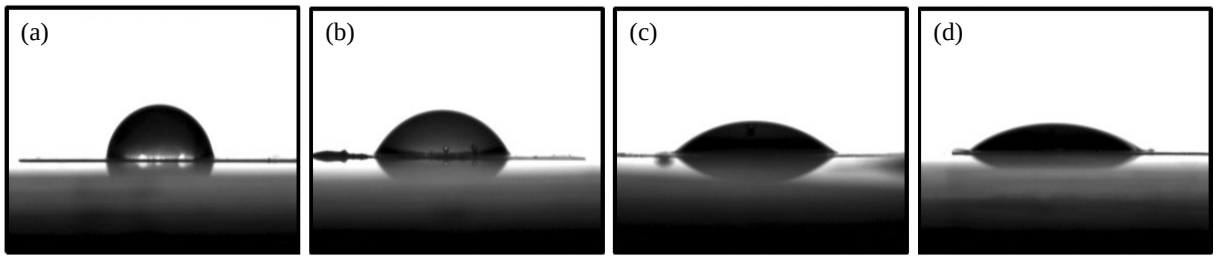

Fig. 3. The morphologies of water droplet on (a) non-grafted, (b) 1 wt% AAc-, (c) 5 wt% AAc-, and (d) 10 wt% AAc-grafted PLCL nanofibers.

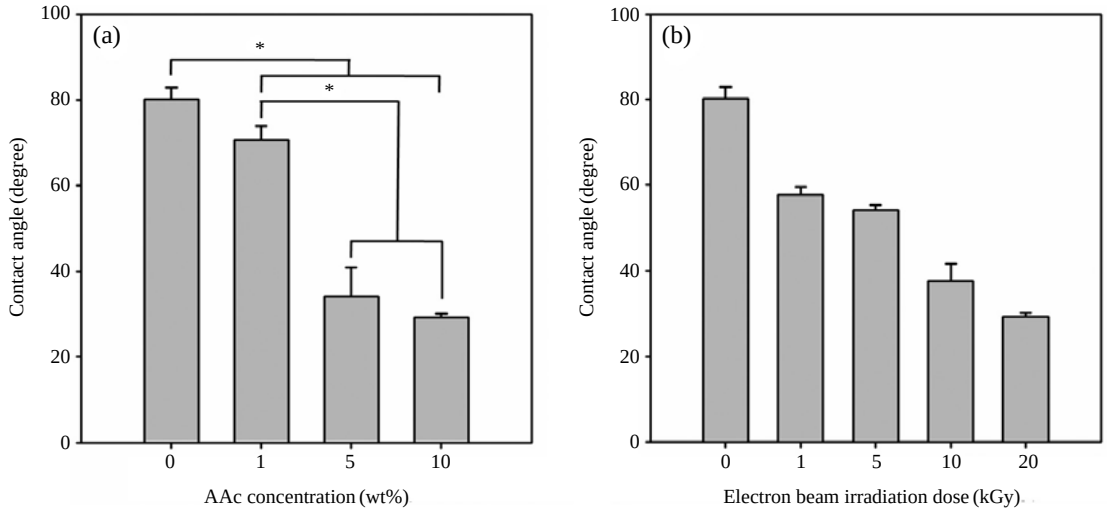

Fig. 4. Static water contact angles of AAc-grafted PLCL nanofibers as a function of (a) AAc concentration at 20 kGy of irradiation dose (Asterisk "*" indicates statistical significance ($p < 0.05$)) and (b) electron-beam irradiation doses at 10 wt% AAc.

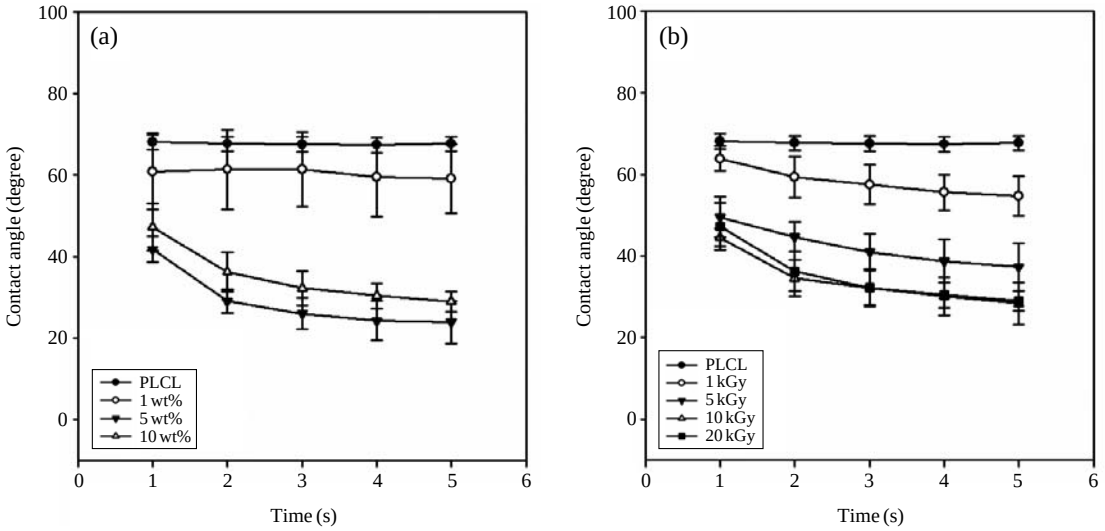

Fig. 5. Dynamic water contact angles of AAc-PLCL nanofibers as a function of (a) AAc concentration at 20 kGy of irradiation dose and (b) electron-beam irradiation dose at 10 wt% AAc.

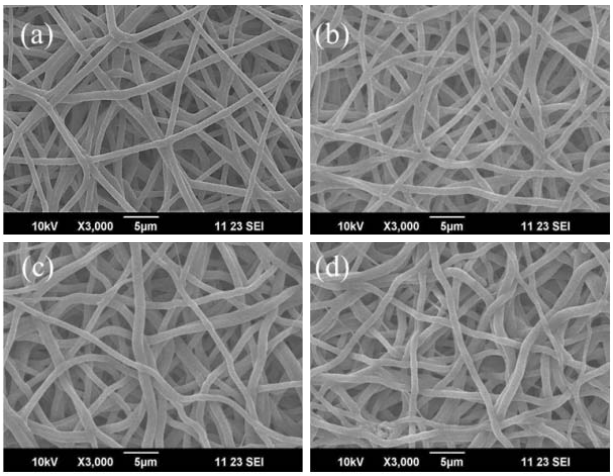

Fig. 6. Scanning electron microscopic images of the nanofibers (a) pristine PLCL nanofibers, (b) 1 wt% AAc-grafted, (c) 5 wt% AAc-grafted, and (d) 10 wt% AAc-grafted PLLA nanofibers at 20 kGy of electron-beam irradiation dose.

을 갖는 PLCL 나노섬유를 확인할 수 있었으며, 이는 다른 연구에 비해서 상대적으로 큰 직경이라고 할 수 있다. 또한, 조사 전후의 PLCL 나노섬유의 형태의 변형이나 끊김을 발견할 수 없었다. 그러므로, 본 실험에서 실시한 전자선을 이용한 표면개질 공정을 이용한다면 나노섬유의 관능기를 조절하는 데 유용할 것으로 판단된다.

5. 그라프팅된 아크릴산의 정량 분석

그라프팅된 아크릴산의 정량분석을 실시하기 위해서

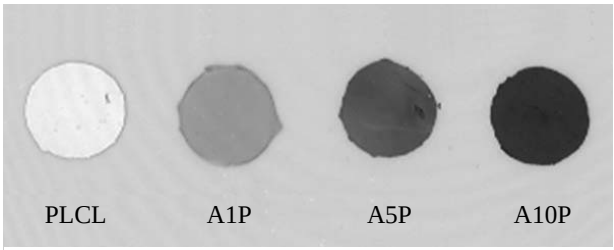

Fig. 7. Scanning images of toluidine blue O stained PLCL nanofibers (A1P: 1 wt% AAc-grafted, A5P: 5 wt% AAc-grafted, and A10P: 10 wt% AAc-grafted PLCL nanofibers).

toluidine blue O 염색법을 실시하였다. Toluidine blue O solution은 정전기적인 상호작용으로 아크릴산의 카르복실기와 1 : 1의 비율로 반응을 일으키며 반응이 이루어지면 카르복실기와 반응하는 toluidine blue O에 의해서 아크릴산이 그라프팅된 나노섬유의 표면은 푸른색으로 염색이 되는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 7). 나노섬유에 염색된 toluidine blue O는 NaOH를 이용하여 용출시켜 530 nm의 파장에서 UV spectrophotometer를 이용하여 실시한 흡광도 측정을 통해서 정량분석의 결과를 도출할 수 있었다. 그 결과, Fig. 8에서 아크릴산의 농도가 증가함에 따라서 toluidine blue의 농도가 0.064 ± 0.019 mM mg^{-1}에서 0.429 ± 0.079, 0.490 ± 0.135 그리고 0.499 ± 0.185 mM mg^{-1}로 증가되는 것을 확인할 수 있었으며, 이 같은 결과를 통해서 아크릴산의 농도가 증가할수록, 조사선량이 증가할수록 아크릴산의 그라프팅률이 증가됨을 확인할 수 있었다.

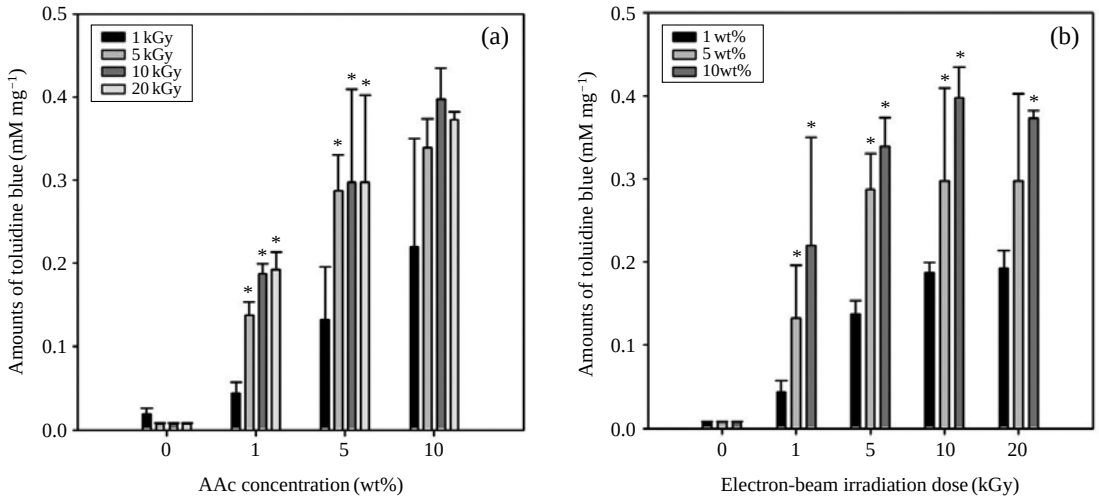

Fig. 8. Quantification of grafted AAc on the PLCL nanofibers as a function of AAc concentration at different electron-beam irradiation doses (Asterisk "*" indicates statistical significance as compared with 1 kGy (a) or 1 wt% (b) of AAc ($p < 0.05$)).

결 론

본 연구에서는 전기방사법을 사용하여 제작한 생분해성 합성고분자 PLCL 나노섬유의 낮은 친수성 표면을 개선시키기 위해서 전자선 동시조사 방법을 실시하여 표면개질을 실시하였다. 감마선을 이용한 생분해성 합성 고분자의 표면개질에 관한 보고는 활발하였으나 전자선을 이용한 보고가 미흡하기에 본 연구를 실시하였다. 그 결과, 아크릴산의 농도가 증가할수록 조사선량이 높을수록 합성고분자 표면상의 아크릴산의 그라프트율이 증가하는 것을 toluidine blue O 염색을 통해서 정량적으로 확인할 수 있었으며, 물 접촉각 실험을 통해서 고분자표면의 젖음성의 변화를 육안으로 확인할 수 있었다. 또한, 이 같은 전자선 조사방법이 나노섬유의 형태학적인 변화를 발생시키지 않은 결과를 확인할 수 있었다. 이 같은 결과를 통해서 전자선 조사를 이용한 생분해성 고분자의 표면개질을 조직공학적 측면에서 활용하게 된다면 낮은 친수성 특성 때문에 조직공학적 측면에서 제한적인 생분해성 합성 고분자에 관한 연구에 새로운 발판을 마련할 수 있을 것으로 판단된다.

사 사

본 연구는 교육과학기술부 지원 원자력연구개발사업에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

Benson RS. 2002. Use of radiation in biomaterials science. *Nuci. Instrum. Methods Phys. Res. Sect. B*. **191**:752-757.

Dong B, Arnoult O, Smith ME and Wnek GE. 2009. Electrospinning of collagen nanofiber scaffolds from benign solvents. *Macromol. Rapid Commun*. **20**:539-542.

Jayakumar R, Prabaharan M, Reis RL and Mano JF. 2005. Graft copolymerized chitosan-present status and applications. *Carbohydr. Polym*. **62**:142-158.

Kaetsu I, Kumakura M, Fujimura T, Yoshica M, Asano M, Kasai N and Tamada M. 1986. Studies on the immobilization of biofunctional components by radiation polymerization and their applications. *Radiat. Phys. Chem*. **27**:245-263.

Park K, Ju YM, Son JS, Ahn KD and Han DK. 2007. Surface modification of biodegradable elctrospun nanofiber scaffolds and their interation with fibroblasts. *J. Biomater. Sci. Polymer. Edn*. **18**:369-382.

Reneker DH, Kataphinan W, Theron A, Zussman E and Yarin AL. 2002. Nanofiber garlands of polycaprolactone by electrospinning. *Polymer*. **43**:6785-6794.

Shor L, Guceri S, Wen X, Gandhi M and Sun W. 2007. Fabrication of three-dimensional polycaprolactone/hydroxyapatite tissue scaffolds and osteoblast-scaffold interactions in vitro. *Biomaterials*. **28**:5297-5297.

Song JH, Kim HE and Kim HW. 2008. Production of electrospun gelatin nanofiber by water-based co-solvent approach. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **19**:95-102.

Manuscript Received: November 14, 2011
Revised: December 5, 2011
Revision Accepted: December 12, 2011