

양전하와 음전하를 띄며 pH 감응성인 카본나노튜브-콜라젠 Hydrogel의 합성

서재원 · 신원상*

단국대학교 조직재생공학 연구소

*단국대학교 나노바이오의과학과 & BK21 플러스 글로벌사업단

(접수 2015. 12. 31; 게재확정 2016. 3. 18)

Preparation of Positively and Negatively Charged Carbon Nanotube-Collagen Hydrogels with pH Sensitive Characteristic

Jae-Won Seo and Ueon Sang Shin*

Institute of Tissue Regeneration Engineering (ITREN), Dankook University, Korea.

**Department of Nanobiomedical Science & BK21 PIUS NBM Global Research Center for Regenerative Medicine,*

*Dankook University, Chungnam 31116, Korea. *E-mail: usshin12@dankook.ac.kr*

(Received December 31, 2015; Accepted March 18, 2016)

요 약. 다양한 pH 환경에서 감응 할 수 있는 CNTs/Collagen Hydrogel들을 양이온성 CNT인 CNT-NH₂와 그리고 음이온성 CNT인 CNT-COOH를 Collagen(CG)과의 접목을 통하여 양이온성 또는 음이온성 Hydrogel들을 합성하는데 성공하였다. 구체적으로 pH 4에서 크게 Swelling되는 양이온성 CNT-NH₂/CG Hydrogel과 pH 10에서 크게 Swelling되는 음이온성 CNT-COOH/CG Hydrogel들을 합성하였다. pH 4~10 범위에서의 제타전위 값 측정을 통해 사용된 CNT(CNT-NH₂와 CNT-COOH)들, CG, 합성된 CNT-NH₂/CG Hydrogel 및 CNT-COOH/CG Hydrogel들의 표면전하 값 변화를 추적하였다. 서로 다른 pH 조건에서 Swelling 변화 실험을 통해 CG의 Fibril사이 공극 변화를 예측해 약물 방출 가능성을 체크하였다. 양전하성 CNT-NH₂/CG Hydrogel의 경우 pH 4에서 가장 높은 Swelling(pH 7 대비 5% 상승)을 보였으며, 반대로 음전하성 CNT-COOH/CG Hydrogel의 경우에는 pH 10에서 가장 높은 Swelling(pH 7 대비 10% 상승)을 보였다. 이러한 결과는 본 연구에서 개발 한 pH 감응성 Hydrogel들이 산성(pH ~2의 위장) 또는 알칼리성(pH ~9의 소장)에서 특이적으로 확장된 다공성 구조를 통해 약물을 쉽게 방출 할 수 있는 pH 감응성 약물전달 시스템에 적용 가능성을 확인 하였다.

주제어: 구강투여 약물전달체, pH 민감성, 콜라젠, 하이드로겔, 탄소나노튜브

ABSTRACT. In this study, preparation of positively and negatively charged carbon nanotube (CNT)-collagen (CG) hydrogels with pH sensitive characteristic was reported. The positive and negative characteristics of the prepared hydrogels were created by introduction of positively functionalized CNT-NH₂ and negatively functionalized CNT-COOH, respectively, into the collagen hydrogel. The surface charge of CNTs (CNT-NH₂ and CNT-COOH), CG and CNTs/CG hydrogels was measured by Zetasizer. The swelling ratios of CNT-NH₂/CG and CNT-COOH/CG hydrogels in aqueous solution were checked by measuring of weight changes of the hydrogels in the range of pH 2~10. In detail, the positively charged CNT-NH₂/CG hydrogel swelled up to 5% at pH 4 in comparison to the weight at pH 7, while the negatively charged CNT-COOH/CG hydrogel swelled up to 10% at pH 10. The prepared CNT-NH₂/CG and CNT-COOH/CG hydrogels will be very useful as pH sensitive oral drug-delivering systems for gastrointestinal (pH ~2) and small intestine (pH ~9), respectively.

Key words: Oral drug carrier, pH sensitive, Collagen, CNTs, Hydrogel

서 론

경구 투여 방식의 약물 전달은 가장 쉽고 특정 시간에 약물을 인체 내로 투입 할 수 있는 가장 흔한 방법 중 하나이다. 또한, 환자에게 고통 없이 투약 할 수 있기 때문에 많은 약물들이 경구 투여 방식으로 개발 되고 있다.^{1,2} 소화계의 흡수를 통해 약물 전달이 진행되는데 약물 전달 속도의

조절은 소화 과정에서의 약물 전달체 분해 속도 조절에 따라 가능하다는 것이다.^{3,4} 그러나 특정 부위에 특이적으로 약물을 전달 하려는 목적 하에서는 개발이 더 진행되어야 할 것으로 생각된다. 위와 장 등 특정 부위에서 특이적으로 약물을 배출 할 수 있는 지능형 약물 전달체의 개발은 현재 활발히 연구가 많이 진행되고 있으며, 특히 효소 및 pH 변화에 따른 전달체의 분해 또는 구조 변경이 특정부위에

약물을 전달하기 위한 주된 접근 방법이라 할 수 있겠다.⁵ pH 감응 방식의 약물 전달체는 단지 구강 투여법 만이 아니라 혈관 주사 또는 국부 주사 등의 주사를 이용한 방법으로도 응용 되고 있으며 항암제의 지능형 약물 전달체 개발에서 정상 세포와 암세포를 선별하는 표지로 응용 되고 있다.^{6,7} 콜라겐(Collagen or CG)과 같은 천연고분자 기반의 pH 감응성 Hydrogel은 특정 주사 부위에 존재해 있다가 주변 조직의 pH 변화에 따라 약물을 방출하는 방식으로 병변시에 pH 변화 시그널을 감지해 선택적으로 약물을 방출 할 수 있다.⁸⁻¹⁰

대표적인 국부 주사의 예로 난소 암의 경우를 들 수 있는데, 복강에 항암제가 담지 된 약물 전달체를 주사함으로써 복강 내에서 일정량의 약물을 지속적으로 방출 할 수 있도록 하는 약물 전달체를 응용 하고 있다.¹¹ 이때의 가장 큰 문제점으로 복강 내부에 장기간 존재하게 되는 약물 전달체 잔여물은 차후에 또 다른 병변을 일으킬 수 있는 원인이 될 수 있다.¹² 따라서, 생분해성을 갖는 천연 고분자 기반의 Hydrogel들은 인체 내로 약물을 투여하는 루트와는 관계없이 위와 같은 유사 문제점들을 전반적으로 해결 할 수 있는 최적의 생체 재료 중 하나라고 할 수 있다.

CG는 천연고분자 물질로써 인체의 연결 조직 또는 세포외기질(Extracellular Matrix)를 이루는 대표적인 단백질 중 하나이다. 또한, 생체 유래 물질이기 때문에 생체 적합성이 높으며 생분해가 가능한 재료이다.¹³ CG Hydrogel을 이용한 약물 전달 연구는 스캐폴드 등의 형태 등으로 이미 넓은 범위에서 수행되고 있다.¹⁴⁻¹⁶ 그러나 CG Hydrogel의 가장 큰 단점은 생체 유래 고분자이기 때문에 기계적 특성이 낮다는데 있다. 특이적 구조를 갖는 단백질인 CG는 추출한 모체의 종 그리고 추출 조직의 부위에 따라 아미노산의 서열에 차이가 나기 때문에 특정 부분만을 화학적으로 변화 시켜 어떤 기능성을 부여하기에 어려운 단점을 갖고 있다. 이러한 이유로 합성 고분자를 포함하여 유기물질과의 혼합물 형태로 주로 이용되고 있다.^{17,18}

카본 나노튜브(CNTs)는 높은 기계적 특성, 높은 전기 전도도 그리고 튜브 형태의 특이적인 구조로 인한 높은 표면적 등의 다양한 기능적인 장점들을 갖고 있기 때문에 넓은 분야에서 약물 전달체에의 응용연구가 활발히 진행 되고 있다.¹⁹ 개질 되지 않은 CNTs 경우 표면이 소수성이어서 물에 잘 분산되지 않아 약물을 흡착하여 생체 내로 직접 전달 하는 방법으로는 잘 이용하지 않는다. 더욱이 생분해가 되지 않는 단점과 생체 독성에 대한 명확한 보고가 알려져 있지 않기 때문에, CNT를 단독으로 약물 전달체로 사용하는 경우는 보고 되지 않고 있지 않다. 그래서 표면을 화학적 개질을 통해 또는 계면활성제와 같은 유기물의 흡착을 통해 수용성 표면으로 기능화한 후에 지

용성 약물, 단백질 또는 핵산 등을 생체 내로 전달 할 수 있는 전달체로 응용 되어 왔다.¹³⁻¹⁶

본 연구에서는 체내 pH 환경에 감응 할 수 있는 CNTs/Collagen Hydrogel의 개발을 목적으로 하고 있다. 특히 CNTs를 양이온성(CNT-NH₂) 그리고 음이온성(CNT-COOH)으로 개질 한 후에 Collagen의 접목을 통하여 양이온성 Collagen 섬유를 함유한 CNT-NH₂/CG Hydrogel과 음이온성 Collagen 섬유를 함유한 CNT-COOH/CG Hydrogel을 합성하였다. Collagen Hydrogel에 pH 감응성을 도입하기 위하여 pH 감응성 고분자를 합성하는 과정에서 단량체 용액에 Collagen을 녹여 라디칼 중합방법으로 시도된 연구결과가 보고 된 바 있다.²⁰ 단백질의 특성상 라디칼 중합에 의한 구조 변화 등의 부작용 등이 예상 될 수 있기 때문에, 외부에서 독립적으로 양이온성 또는 음이온성 기능이 도입 된 CNTs, 즉 CNT-NH₂와 CNT-COOH를 Collagen Hydrogel에 혼합해 줌으로서 낮은 pH <4에서 감응성을 갖는 CNT-NH₂/CG 섬유와 높은 pH >9에서 감응성을 갖는 CNT-COOH/CG 섬유를 만들었다. 본 연구에서 합성 된 CNT-NH₂/CG Hydrogel은 및 CNT-COOH/CG Hydrogel은 모두 경구 투여 방식의 약물 전달체로 활용이 가능하며, 특히 CNT-NH₂/CG Hydrogel은 pH 2-4의 약산성 특성을 보이는 위장 타겟용 약물 전달체로 그리고 CNT-COOH/CG Hydrogel은 pH 8-10의 약알칼리성 특성을 보이는 소장 타겟용 약물전달체로 활용될 수 있을 것이다.

실 험

시약

다중벽 카본 나노튜브(CNTs)는 EM-POWER(Korea)에서 구입 하여 사용하였으며, 표면 개질을 위해 사용된 HNO₃, H₂SO₄, Ethylene Diamine은 Sigma-Aldrich사(USA)의 시약을 사용하였다. Collagen (CG) Solution은 First Link사(UK)의 Rat Tail Collagen (Type I)제품을 사용 하였으며, PBS Solution은 Medicago사(Sweden)의 제품을 사용 하였다. Collagen 겔화에 사용된 NaHCO₃는 Sigma-Aldrich사(USA)의 시약을 사용하였다. 상기 화학약품들은 추가적인 정제 과정 없이 사용 되었다. 그 외 화학약품들도 정제 과정 없이 사용 하였으며, 사용된 용매들은 95% 이상의 순도를 사용하였다.

양이온성 CNTs (CNT-NH₂)와 음이온성 CNTs(CNT-COOH)의 제조

CNTs의 표면이 양이온 또는 음이온으로 대전 되도록 개질 하기 위해 CNT의 표면에 Carboxyl기(-COOH) 또는 Amine기(-NH₂)를 도입하였다. 우선 CNTs의 표면에 카르보닐기(-COOH)를 도입하기 위하여 다음과 같이 진행하

었다. 200 mg의 CNTs, 50 mL의 진한 HNO₃, 50 mL의 진한 H₂SO₄를 250 mL 용량의 2구 둥근 바닥 플라스크에 넣고 4 일간 80°C에서 반응 하였다. 간압 필터를 이용하여 반응 생성물인 Carboxyl기(-COOH)가 도입 된 CNT-COOH를 수득 하였고 증류수를 이용하여 여과액이 중성이 될 때까지 세척 후 건조 하였다.

두 번째로 CNT의 표면에 Amine기(-NH₂)를 도입하는 반응은 다음과 같이 진행하였다. 표면에 Carboxyl기로 개질 된 CNT-COOH 50 mg을 500 mL의 3차 증류수에 분산 시킨 후에 분산액을 pH~3으로 맞추어 준 다음 25 mg의 EDC를 넣어주었다. 상온에서 30분 동안 2 g의 Ethylene Diamine을 천천히 가하되 교반하여 주변 표면에 Amine기가 형성된다. 3시간 후에 간압 필터를 이용하여 반응 생성물인 Amine기(-NH₂)를 도입 된 CNT-NH₂를 수득하였고 증류수를 이용하여 여과액이 중성이 될 때까지 세척 후 건조 하였다.

CNT-COOH/CG 및 CNT-NH₂/CG Hydrogel의 제조

Table 1에서 보여준 것처럼 CNT-COOH/CG 및 CNT-NH₂/CG Hydrogel을 제조하기 위하여 1 mL CG 수용액(5% CG, 50 mg CG)에 0.25, 0.5, 2.5, 5 mg/CG 질량의 0.5, 1, 5, 10 질량 %에 해당)의 CNT-COOH 및 CNT-NH₂를 각각 서로 다른 Collagen Solution에 가하였다. CNT-COOH 및 CNT-NH₂를 CG 수용액에 균질 하게 분산 시키기 위하여 일음불 조건에서 12 시간 동안 초음파 파쇄기를 이용해 분산 시켰다. 겔 형성용 Media를 제조하기 위해 10 mL의 PBS 수용액에 0.111 g의 NaHCO₃를 용해시켰다. CNT-COOH/CG 및 CNT-NH₂/CG 수용액과 겔 형성용 Media를 2:1(v:v)의 비율로 섞은 뒤 상온에서 30분 동안 전하를 진행 시켰다.

물리화학적 특성 분석

상기 방법으로 제조 된 CNT-COOH/CG 및 CNT-NH₂/CG Hydrogel의 물리화학적 특성 분석은 FT-IR 분광법을 이용

하여 표면의 작용기들을 확인하였다. 또한 제타 전위 측정법을 이용하여 CNT-COOH/CG 및 CNT-NH₂/CG의 pH 변화에 따른 표면 전하를 측정하였다. 표면 전하의 변화를 측정하기 위하여 pH 4-10범위의 PBS 완충액과 CNT-COOH/CG 및 CNT-NH₂/CG 용액을 9:1(v:v)로 섞은 후에 37°C에서 30분간 방치한 후에 측정 하였다. CNT-COOH/CG 및 CNT-NH₂/CG Hydrogel 내에 CNTs와 CG의 무게 비율은 봉질 건조 후 열중량 분석법(Thermogravimetric Analysis, TGA)을 이용하여 분석 하였다. pH 변화에 따른 CNT-COOH/CG 및 CNT-NH₂/CG Hydrogel의 다공성 구조 변화, 즉 pH 감응성을 확인 하기 위하여 중성 조건(pH 7.4)에서 제조 한 CNT-COOH/CG 및 CNT-NH₂/CG Hydrogel 60 mg을 pH 4-10의 PBS 완충액에 넣고 1 시간 동안 방치 하였다. 그 후에 각각의 Hydrogel 무게변화를 측정함을 통하여 Hydrogel 내부로 흡수 된 수분의 양을 측정 하였다. 각 실험에서 사용 된 PBS 완충액의 pH의 조절은 0.1 N Phosphoric Acid와 0.1 N KOH 수용액을 이용하여 조절 하였다.

결과 및 고찰

본 연구에서 목적으로 하는 pH에 감응하는 CNT-COOH/CG 및 CNT-NH₂/CG Hydrogel을 제조하기 위하여 표면이 양이온 또는 음이온으로 대전된, 즉 Carboxyl기(-COOH) 또는 Amine기(-NH₂)가 도입된 CNT들 (CNT-COOH 및 CNT-NH₂)을 사용하였다. Fig. 1에서 보여준 것처럼, CNT-COOH 및 CNT-NH₂는 Collagen 섬유가 형성될 때 섬유들 사이로 끼어들어 갈 것으로 예상된다. CNT-COOH 또는 CNT-NH₂를 함유하고 있는 Collagen 섬유들은 결국 서로 다른 pH(-10 또는 ~4) 환경에서 음전하 또는 양전하를 띠는 섬유들로 대전된다. 음전하 또는 양전하를 띠는 섬유들로 이루어져있는 CNT-COOH/CG 및 CNT-NH₂/CG Hydrogel들을 제조하기 위해 겔 형성용 Media (0.111 g의 NaHCO₃가 용해된 10 mL의 PBS 수용액)를 이용하였다.

CNT-COOH 및 CNT-NH₂는 각각 질산/황산을 이용한

Table 1. Amounts of CNTs and collagen within 1 mL CNT/CG hydrogels

Sample name	CNT amount (mg/%)	Collagen amount (mg)
CNT-COOH/CG/0.5	0.25/0.5	50
CNT-COOH/CG/1.0	0.5/1	"
CNT-COOH/CG/5.0	2.5/5	"
CNT-COOH/CG/10	5/10	"
CNT-NH ₂ /CG/0.5	0.25/0.5	"
CNT-NH ₂ /CG/1.0	0.5/1	"
CNT-NH ₂ /CG/5.0	2.5/5	"
CNT-NH ₂ /CG/10	5/10	"

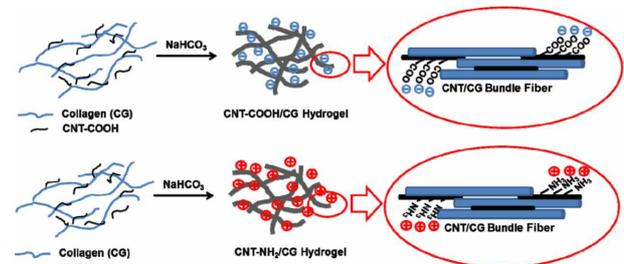


Figure 1. Schematic illustration of the preparation of Negatively charged CNT/CG hydrogel (CNT-COOH/CG hydrogel) and positively charged CNT (CNT-NH₂/CG hydrogel).

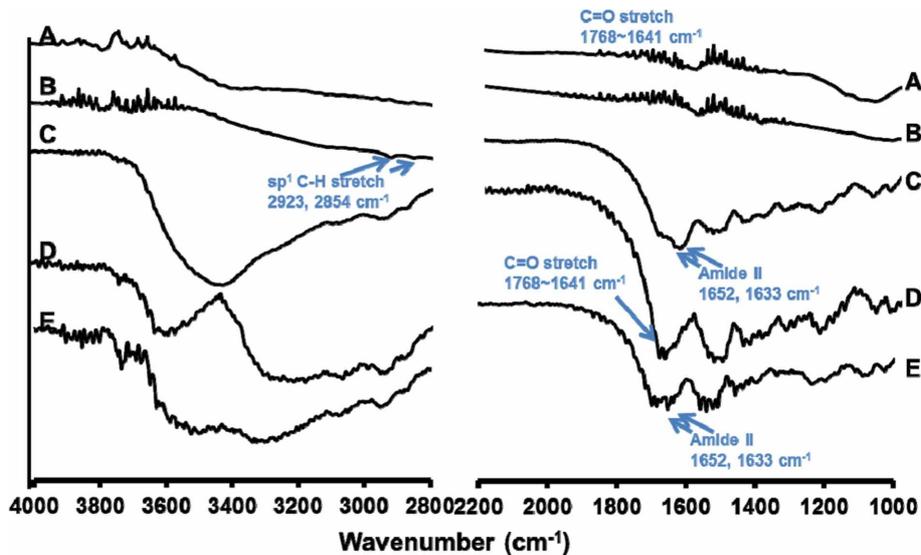


Figure 2. FT-IR spectra for A) CNT-COOH, B) CNT-NH₂, C) CG, D) CNT-COOH/CG, E) CNT-NH₂/CG.

산화반응 그리고 EDC를 사용한 아미이드 형성 반응 등을 통하여 제조하였다. 표면에 형성된 Carboxyl기(-COOH) 또는 Amine기(-NH₂)를 확인하기 위해 FT-IR 분광법을 이용하였다. Fig. 2에서 보여준 것처럼, CNT-COOH의 스펙트럼에서는 산화 과정을 통해 도입된 Carbonyl 관련 피크들을 1768~1641 cm⁻¹ 영역에서 확인 할 수 있었다. 또한, CNT-NH₂의 경우에는 Ethylene Diamine Moiety의 존재를 의미하는 추가적인 sp³ 혼성 C-H 피크들을 2923과 2854 cm⁻¹에서 확인 함으로써 Amine기능기가 표면에 존재함을 간접적으로 확인 할 수 있었다.

단백질인 CG은 모든 화학 작용기를 하나 하나 구분 하는 것은 매우 어렵지만, 3700~3300 cm⁻¹ 범위에 걸친 -OH, -NH₂ 관련 피크들과 단백질의 주요 특징인 Amide 작용기를 1652와 1633 cm⁻¹에서 확인 할 수 있었다. CNT-COOH/CG의 경우 CG 결과와 비교 하였을 때 도입된 CNT-COOH에 의해 Amide 작용기 피크 보다 Carboxylic Acid (1697~1681 cm⁻¹) 피크가 두드러지게 나타났으며, CNT-NH₂/CG의 경우에는 Amide 작용기의 피크가 1652와 1633 cm⁻¹에서 다시 증가함을 보였다. 이러한 모든 결과들을 종합 할 때 CNT-COOH 및 CNT-NH₂는 각각 Carboxyl기(-COOH)와 Amine기(-NH₂)를 함유하고 있는 것으로 생각되며, 동시에 이들 성분들이 포함돼 있는 CG Hydrogels내에도 동일한 결과들이 확인 되었다.

이번에는 합성된 CNT-COOH 및 CNT-NH₂의 pH 변화(4~10)에 따른 표면전하 변화를 확인하기 위해 제타전위 값 측정법을 사용하였다. Fig. 3에서 보여준 것처럼, CNT-COOH의 경우 pH 4~10의 범위에서 -52.1~-76.7 mV의 변화를 보였으며 등전점(Isoelectric Point, IP)이 나타나지 않았다. 특히

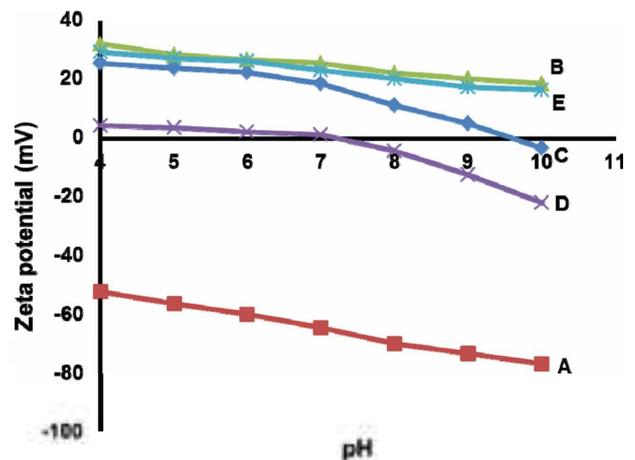


Figure 3. Zeta potential values at pH 4~10 for A) CNT-COOH, B) CNT-NH₂, C) CG, D) CNT-COOH/CG, E) CNT-NH₂/CG.

pH=10에 가까울수록 제타전위 값이 -76.7 mV로 가장 큰 음의 값을 나타내는 것으로 분석됐다. Carboxyl기(-COOH)가 알칼리성 조건에서 Carboxylate기(-COO⁻) 형태로 전환됨으로써 나타나는 결과라 할 수 있다. 이는 알칼리 환경에서 CNT-COOH를 함유한 Collagen 섬유도 역시 음전하 값들을 나타낼 것으로 생각 할 수 있다.

CNT-NH₂의 경우에도 pH=4~10 범위에서는 등전점(Isoelectric Point, IP)이 나타나지 않았으며, 결국 pH=4~10 범위에서는 전반적으로 양전하를 띠는 것으로 확인됐다. 특히 pH=4 부근에서는 32.1 mV로 가장 높은 제타전위 값을 나타내는 것으로 분석됐다. Amine기(-NH₂)가 산성 조건에서 Ammonium기(-NH₃⁺) 형태로 전환됨으로써 나타나는 결과라 할 수 있다. 순수 CG의 경우 pH 9.5 부근에서 등전점을 보인 반

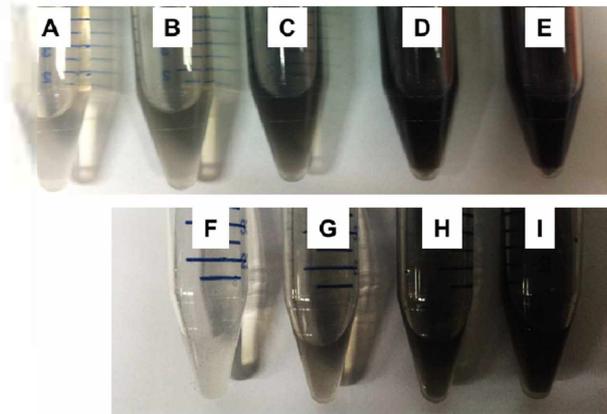


Figure 4. Photos of CNT-COOH/CG (B-E) and CNT-NH₂/CG (F-I) solutions with different CNT concentration: (A) CG, (B) CNT-COOH/CG/0.5, (C) CNT-COOH/CG/1, (D) CNT-COOH/CG/5, (E) CNT-COOH/CG/10, (F) CNT-NH₂/CG/0.5, (G) CNT-NH₂/CG/1, (H) CNT-NH₂/CG/5, and (I) CNT-NH₂/CG/10.

변에, 음이온성 또는 양이온성CNT를 포함하는 Hydrogel 인 CNT-COOH/CG 또는 CNT-NH₂/CG의 경우, pH 4~10에서의 제타 전위값 변화는 CG값을 기준으로 볼 때 사용된 CNT에 의해 매우 크게 영향 받는 것으로 나타났다. 예를 들어, CNT-COOH/CG의 경우는 등전점이 pH 7.5로 내려왔으나, CNT-NH₂/CG의 경우는 사용된 양이온성CNT에 의해 등전점이 나타나질 않았다. 이 결과들은 CG Hydrogel 내에 CNT-COOH와 CNT-NH₂의 존재가 pH변화에 따라 전하의 성질 및 전하량에도 크게 영향을 준다는 것을 의미한다 하겠다.

CNT-COOH/CG와 CNT-NH₂/CG Hydrogel 제조에 사용된 CNT-COOH/CG와 CNT-NH₂/CG 수용액은 Fig. 4 같이 Collagen 무게의 0.5, 1, 5, 10%에 해당하는 CNT-COOH와 CNT-NH₂를 함유하고 있다. CNT-COOH와 CNT-NH₂의 분산 방법은 얼음물 안에서 12 시간 동안 초음파 파쇄기를 이용하였고, 분산 후에는 4°C에서 보관 하였다. 제조된 CNT-COOH/CG와 CNT-NH₂/CG 수용액은 내부에 CNT의 뭉침 없이 안정적 분산되어 투명한 것을 확인 할 수 있었다. 또한 CNT의 농도가 높아 질수록 진흙 색깔이 진해지는 것도 확인 할 수 있었다. CNT-COOH/CG 또는 CNT-NH₂/CG 수용액과 Concentration Media를 각각 부피 비 2:1로 섞은 후 상온에서 30분간 방치하여 겔화할 진행 하였다(Table 1).

위에서 만들어진 CNT-COOH/CG와 CNT-NH₂/CG 수용액을 사용하여 다양한 CNT 농도를 포함하고 있는 CNT-COOH/CG와 CNT-NH₂/CG Hydrogel들을 제조하였다. Fig. 5A~5I의 Hydrogel 사진들에서 잘 보여주고 있는 것처럼 CNT-COOH/CG Hydrogel과 CNT-NH₂/CG Hydrogel에 포함된 CNT의 양이 증가함에 따라 색깔 변화가 뚜렷하였다. 그러나 겔화 시간들은 약 20분으로 비슷한 것으로 나타났

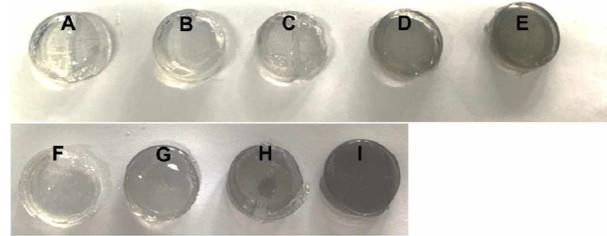


Figure 5. Photos of CNT-COOH/CG (B-E) and CNT-NH₂/CG (F-I) hydrogels with different CNT concentration: (A) collagen, (B) CNT-COOH/CG/0.5, (C) CNT-COOH/CG/1, (D) CNT-COOH/CG/5, (E) CNT-COOH/CG/10, (F) CNT-NH₂/CG/0.5, (G) CNT-NH₂/CG/1, (H) CNT-NH₂/CG/5, and (I) CNT-NH₂/CG/10.

다. 일반적인 CG Hydrogel 형성 방법은 Concentration Media의 NaHCO₃를 이용하여 Collagen 분자들을 가교시키는 것이다. Triple Helix 구조의 CG 분자들이 Self-Assembly 방식을 통해 Fibrils을 형성 할 때 CNT 분자는 CG 분자들 사이에 존재 하게 되는 것으로 판단된다. CG 분자들의 Fibrils 형성 속도는 CNT 첨가 전후에 전혀 차이가 없는 것으로 보이며, 비슷한 겔화 시간들이(약 20분) 이 사실을 뒷받침한다. 이러한 현상은 Triple Helix 구조의 CG 분자들은 Self-Assembly를 위해 표면의 특정 Domain을 사용하는데, 첨가된 CNT가 최소한 이들 Domain들을 방해하지 않는다는 의미가 된다. 이는 CNT 분자들이 Fibrils 내부에 끼어들어가 있는 형태 인으로 Fibril 표면 Domain역할에는 영향을 주지 않는다는 의미라 할 수 있다. 단지 CNT 분자들이 Fibrils 내부에 끼어들어가 있어 CNT-COOH/CG와 CNT-NH₂/CG Fibrils들이 각각 음전하 및 양전하를 갖도록 하는 역할만 한다는 것을 의미한다.

제조된 Hydrogel내에 CNT와 CG의 무게 비율을 확인 하기 위하여, CNT-COOH/CG Hydrogel Sample을 선택하였고 열중량 분석법을 이용하여 분석 하였다(Fig. 6). 동결 건조를 통해 얻어 진 CNT-COOH/CG Hydrogel Sample를 5 mg씩을 25-900 °C의 범위, 그리고 분당 10 °C의 승온 조건에서 열분해에 의한 중량 분석을 실시하였다. CNT-COOH와 CNT-NH₂는 400 °C를 기준으로 무게의 감소를 보이다가 500 °C 이후 급격한 감소를 보였으며, 650 °C에 이르러 모든 재료가 다 연소된 것을 확인 할 수 있었다. CG은 280 °C 부근을 기준으로 급격한 무게의 감소를 보이다가 320 °C 부근부터 서서히 무게가 감소 하는 패턴을 보였으며 650 °C에 이르러서는 역시 모든 재료가 다 연소되는 것으로 확인 되었다. CNT-COOH/CG와 CNT-NH₂/CG Hydrogel Sample들의 공통적인 열 분해 패턴을 보면, CG 과는 다르게 420 °C에서 급격한 무게 감소를 보이고 있으며, 500 °C에서 750 °C까지 서서히 무게의 감소를 보이고 있다. 열 분해온도가 750 °C까지의 고온 방향으로 이동한 이유는 CNT의 영향으로 해석되

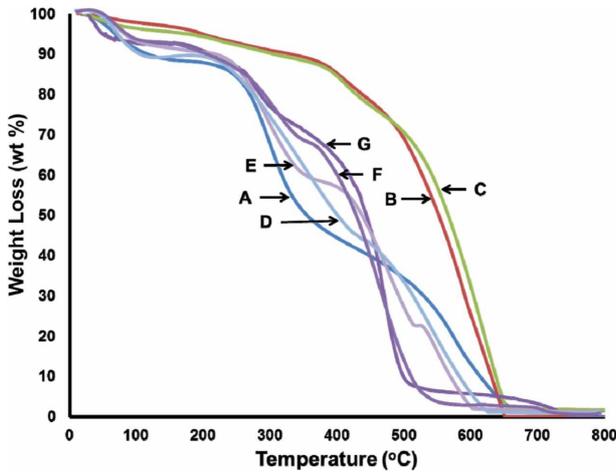


Figure 6. Thermo gravimetric analysis: (A) CG (B) CNT-COOH, (C) CNT-NH₂, (D) CNT-COOH/CG/0.5, (E) CNT-COOH/CG/1, (F) CNT-COOH/CG/5, (G) CNT-COOH/CG/10.

며, 500 °C부터 분해되는 부분의 질량 %가 Sample 내 CNT농도에 따라서 약 0.5~10 wt %로 변화하는 것으로 나타났다. 결국은 열중량 분석법을 통해 CG내에 첨가된 CNT의 질량%를 검증 할 수 있었다.

pH 변화에 따라 수용액 내에서 Hydrogel의 Swelling 차이가 어떻게 나타나는지를 알아보기 위해 다양한 pH에서 CNT-COOH/CG와 CNT-NH₂/CG Hydrogel의 무게 변화를 측정 하였다(Fig. 7). CNT-COOH/CG와 CNT-NH₂/CG Hydrogel 60 mg을 pH 4~10 범위로 준비 된 PBS 용액 10 mL에 1시간 동안 각각 방치 한 후에 무게 변화를 측정 하였다. 그 결과, CNT-COOH/CG는 pH 10 에서 생리 pH인 7.4 보다 10% 증가하였고, pH 4에서는 오히려 10% 가량 감소함을 보였다. 이와 반대로, CNT-NH₂/CG는 pH 4에서 pH 7.4에서 보다 5%

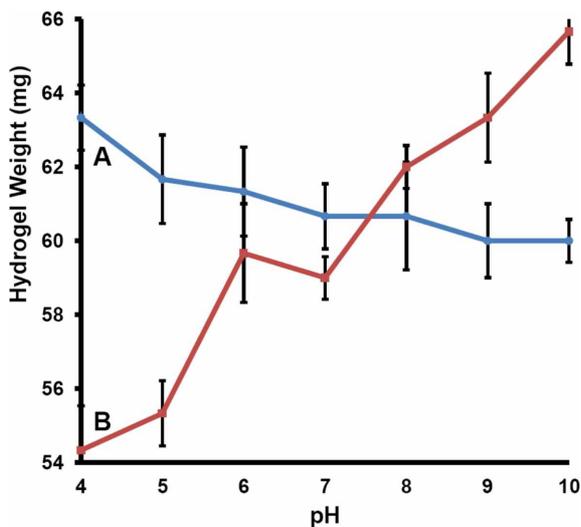


Figure 7. Water uptake of CNT/CG hydrogel at different pH conditions. A) CNT-NH₂/CG/10, B) CNT-COOH/CG/10.

증가함을 보였으며, pH 10에서는 5% 감소함을 보였다. 이 결과는 CNT/CG 내에 도입된 CNT-COOH와 CNT-NH₂의 영향으로 Hydrogel 내부 Fibril간의 다공 구조가 넓어짐에 따라 수분 함량이 증가함을 간접적으로 보여준다.

결론

본 연구에서는 양전하 또는 음전하를 띠는 CNT(CNT-NH₂ 또는 CNT-COOH)의 도입을 통해 pH에 감응 하는 CNT-NH₂/CG 또는 CNT-COOH/CG Hydrogel을 개발하였다. pH 4~10 범위에서의 제타전위 값 측정을 통해 사용 된 CNT (CNT-NH₂와 CNT-COOH)를, CG 합성 된 CNT-NH₂/CG Hydrogel 및 CNT-COOH/CG Hydrogel들의 표면전하 값 변화를 추적하였다. CNT-COOH의 경우 pH 4~10의 범위에서 -52.1~ -76.7 mV의 변화를 보였으며 등전점(Isoelectric Point, IP)이 나타나지 않았다. CNT-NH₂의 경우에도 pH=4~10 범위에서는 등전점(Isoelectric Point, IP)이 나타나지 않았으며, pH=4 부근에서는 32.1 mV로 가장 높은 제타전위 값을 나타내는 것으로 나타났다. 순수 CG의 경우 pH 9.5 부근에서 등전점을 보인 반면에, CNT-COOH/CG 또는 CNT-NH₂/CG의 경우, pH 4~10에서의 제타 전위값 변화는 CG값을 기준으로 볼 때 사용된 CNT에 의해 매우 크게 영향 받는 것으로 나타났다. CNT-COOH/CG의 경우는 등전점이 순수 CG의 pH 9.5로부터 pH 7.5로 내려왔으며, 그러나 CNT-NH₂/CG의 경우는 사용된 양이온성CNT에 의해 등전점 없이 전 범위에서 양의 값을 나타내었다. 이 결과들은 CG Hydrogel 내에 CNT-COOH와 CNT-NH₂의 존재가 pH변화에 따라 전하의 성질 및 전하량에도 크게 영향을 준다는 것을 의미한다 하겠다. 서로 다른 pH 조건에서 Swelling 변화 실험을 통해 CG의 Fibril사이 공극 변화를 예측해 약물 방출 가능성을 체크하였다. 양전하성 CNT-NH₂/CG Hydrogel의 경우 pH 4에서 가장 높은 Swelling (pH 7 대비 5% 상승)을 보였으며, 반대로 음전하성 CNT-COOH/CG Hydrogel의 경우에는 pH 10에서 가장 높은 Swelling (pH 7 대비 10% 상승)을 보였다. 경구 투여용 약물 전달 시스템에서 위장과 소장에서의 pH 특성을 고려 할 때 이 재료의 적용이 가능할 것으로 보인다. 또한, 압조직 부위의 낮은 pH에서의 항암제 전달과 같은 나노전달체 개발에 있어서도 낮은 pH에 감응하는 CNT-NH₂/CG Hydrogel이 응용될 수 있을 것으로 생각된다.

REFERENCES

1. Chugh, I.; Seth, N.; Rana, A. C.; Gupta, S. *International Research Journal of Pharmacy* **2012**, 5, 57.

2. Bhagwat, R. R.; Vaidhya, I. S. *International Research Journal of Pharmacy Science and Research* **2013**, *4*, 970.
3. Vinay, K.; Prajapati, S. K.; Girish, C. S.; Mahendra, S.; Neerajkumar. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* **2012**, *1*, 934.
4. Balamuralidhara, V.; Pramodkumar, T. M.; Srujana, N.; Venkatesh, M. P.; Gupta, N. V.; Krishana, K. L.; Ganagadharappa, H. V. *American Journal of Drug Discovery and Development* **2011**, *1*, 24.
5. Michael, C. K.; Joseph, F. G.; Malvika, G.; Annie, Z.; Nicholas, A. P. *Journal of Controlled Release* **2016**, *221*, 18.
6. Mohamed, S. M. E.; Elbadawy, A. K.; Mamdough, A. S.; Smaher, M. E. *Arabian Journal of Chemistry* **2015**, *8*, 355.
7. Yu, C. Y.; Ling, Y. D.; Kai, D.; Wei, X.; Yan, Y.; Lu, Z.; Ke, W.; Feng, J. X. *Carbohydrate Polymers* **2015**, *130*, 243.
8. Nannan, G.; Shaoyu, L.; Chunmei, G.; Xinggang, W.; Xiubin, X.; Xiao, B.; Chen, F.; Mingzhu, L. *Chemical Engineering Journal* **2016**, *287*, 20.
9. Dong, M.; Jiantao, L.; Yuyun, C.; Wei, X.; Li, M. Z. *Carbon* **2012**, *50*, 3001.
10. Mara, G.; Priscilla, F.; Dina, M.; João, R.; Xue, Q.; Changsheng, L.; Helena, T.; Yulin, L. *Acta Biomaterialia* **2014**, *10*, 300.
11. Cho, E. J.; Sun, B.; Doh, K. O.; Wilson, E. M.; Torregrosa-Allen, S.; Elzey, B. D.; Yeo, Y. *Biomaterial* **2015**, *37*, 312.
12. Kraemer, J.; Ludwig, J.; Bickert, U.; Owczarek, V.; Traupe, M. *Ideas And Technical Innovations* **1997**, *6*, 357.
13. Lofthouse, S.; Nagahara, S.; Sedgmen, B.; Barcham, G.; Brandon, M.; Sano, A. *Vaccine* **2001**, *19*, 4318.
14. Hicks, B. G.; Lopez, E. A.; Eastman Jr., R.; Simonovsky, F. I.; Ratner, B. D.; Wessells, H.; Voelzke, B. B.; Bassuk, J. A. *Biomaterials* **2011**, *32*, 797.
15. Xanthippi, C.; Rameshwar, R. R.; David, J. C.; Alexis, W. P.; Blake, M. A.; Yuan, Y. W.; Li, Z.; Fenno, J. C. F.; Jan, P. S.; Petros, P. *Journal of Non-Crystalline Solids* **2016**, *432*, 143.
16. Tsai, M. C.; Hung, K. C.; Hung, S. C.; Hsu, S. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2015**, *125*, 34.
17. Pourjavadi, A.; Ayyari, M.; Amini-Fazl, M. S. *European Polymer Journal* **2008**, *44*, 1209.
18. Isabelle, B.; Marek, K.; Sylvie, R.; Bhuvanesh, G.; Jons, H.; Florian, W.; Peter, F. *Biomaterials* **2002**, *23*, 3149.
19. Pinto, V. C.; Ramos, T.; Alves, S.; Xavier, J.; Tavares, P.; Moreira, P. M. G. P.; Guedesa, R. M. *Procedia Engineering* **2015**, *114*, 635.
20. Yoon, I. K.; Hwang, J. Y.; Seo, J. W.; Jang, W. C.; Kim, H. W.; Shin, U. S. *Carbon* **2014**, *77*, 379.