

은 나노입자를 담지한 collagen/silica microsphere 복합체의 제조

정효정 · 김연범 · 장윤호[†]

인하대학교 공과대학 화학공학과
402-751 인천시 남구 용현동 253
(2008년 4월 10일 접수, 2008년 5월 8일 채택)

Preparation of Silica/collagen Microsphere Composit Doped with Silver Nanoparticles

Hyo Jung Jung, Yeon Bum Kim and Yoon Ho Chang[†]

Department of Chemical Engineering, Inha University, 253 Yonghyun-dong, Nam-gu, Incheon 402-751, Korea
(Received 10 April 2008; accepted 8 May 2008)

요 약

실리카 microsphere는 HPLC를 위한 흡착 충전제와 같은 용도로 사용하기에 적합한 혁신적인 소재로 널리 알려져 있다. microsphere을 기능성고분자나 금속, 생리활성 물질과 같은 특정한 성질을 지닌 물질로 표면 개질시킴으로 다양한 용도로 활용할 수 있다. 콜라겐은 생체조직을 구성하는 기본 단백질로 생체적합성이 뛰어난 물질로 주목받고 있는 기능성 소재이다. 본 연구에서는 50% 이상의 세공부피를 지닌 다공성 silica microsphere를 고분자 응집법인 PICA 법을 이용하여 colloidal silica로부터 제조하고 콜라겐 hydrogel을 사용하여 표면 개질시킴으로 생체적합성을 증진시키는 방법을 연구하였다. 실리카/콜라겐 microsphere 에 은 나노입자를 담지시킨 microsphere 복합체를 만들고 특성을 조사하므로 생체소재로의 활용 가능성을 조사하였다.

Abstract – Silica microsphere is a world leading innovative material used in adsorbent packing materials in HPLC technology. The application of microsphere lies in the ability to the surface modification of silica with the special materials such as polymers, metals and bio-active materials. Collagen is a major structural protein of connective tissues and has a good biocompatibility. In this study, we prepared the purified silica porous microsphere, having micro diameters in the range of a pore volume at least 50% by the aggregation procedure of colloidal silica with the polymerization method (PICA). The microspheres were modified by collagen hydrogel to improve the biocompatible properties for biomedical product. The silica/collagen microsphere composite doped with silver nanoparticles was prepared and investigated the capabilities of biomaterial application through the evaluation of the structure characteristics of the microsphere composit.

Key words: Silica, Collagen, Silver, Microsphere, Biomaterial

1. 서 론

실리카는 내약품성과 hydrophilicity가 우수한 대표적인 무기소재로 공업적으로 중요한 기능성 소재이다. 특히 다공성 microsphere 형태의 실리카는 오래전부터 촉매의 담체나 크로마토그래피용 흡착제나 HPLC 분석 및 고순도 분리를 위한 충전제로 많이 사용되어 왔다. 근래에는 실리카 microsphere를 immunoassays[1-3] 나 flow cytometry, microarrays[4-5]용으로 생물학분야에서 응용하고 있으며, 표면의 binding kinetics를 변환시켜 antibody 나 capture molecule의 흡착소재, targeted cell population 이나 isolation을 위한 기능성소재, fluorescence의 기능이나 surface binding 특성을 부여하여 biochemical reaction 이나 생체소재로 활용하기 위한 연구

에 사용되고 있다. 또한 암치료제의 약물전달체계, 화장품, 전자소재와 같은 다양한 응용 분야에도 사용된다[6-10].

콜라겐은 천연기질로서 동물 조직 내의 다른 단백질에 비하여 훨씬 많은 양이 포함되어 있는데, 특히 피부나 연골, 혈관 벽, 근육 등에는 콜라겐성분이 다량으로 함유하고 있다. 콜라겐은 각 분자의 분자량이 약 10만인 폴리펩티드 사슬 3개가 엮인 나선형의 2차적 구조를 가지면서 다시 2중 나선형 구조(3중 나선형 형태)를 가지고 있는 단백질이다. 이것은 인공 조직 대체물의 주요성분으로 흔히 쓰이고 있으며, 손상된 조직이 재생 및 치유되는 동안 콜라겐 재료는 생물학적 적합성과 생분해성이 우수하다는 특성을 가지고 있다[11-13].

최근에 주목받고 있는 복합 생체재료는 유기/무기 복합체, 생체/유기 복합체, 생체/무기 복합체들은 다양한 재료의 표면 개질을 통한 복합화까지를 포함하고 있으며 이러한 재료를 이용함으로써 기존의 천연생체재료만을 이용함에 의한 단점이나 이종의 조직/장기

[†]To whom correspondence should be addressed.

E-mail: yhchang@inha.ac.kr

[‡]이 논문은 인하대학교 정성택 교수님의 정년을 기념하여 투고되었습니다.

이식시의 문제점까지도 해결하고자 하는 연구들이 수행되고 있다. 즉, 여러 재료간의 복합체에 의한 의료용 대체체의 개발이나 생체 재료와 세포의 복합화에 의한 조직공학을 이용함으로써 새로운 복합재료를 개발하고 복합 생체재료와 이를 이용한 응용기술은 향후 생체조직학을 이용한 의료용 소재의 핵심기술이다.

본 연구에서는 기능성 의용소재를 개발하기 위하여 비표면적과 세공부피가 큰 친수성 실리카 microsphere를 합성하고 이것을 이용하여 생체재료인 콜라겐(type I)과 collagen/silica microsphere 복합체를 제조한 다음 복합체입자 표면에 항균성은 은 나노입자로 표면 개질시켜 기능성 의용소재 혹은 약물전달체제 등으로 활용이 가능한 다공성 구형 실리카/collagen 복합체를 제조하여 기능성재료로 전환하기 위한 방법을 연구하였다.

2. 실험

2-1. 실리카 microsphere 제조

다공성 구형의 실리카 microsphere를 제조하기 위하여 나노크기의 콜로이드입자를 고분자 수지를 구조결합제로 사용하여 aggregation시켜 무기입자를 제조하는 PICA법(Polymerization-Induced Colloid Aggregation Method)을 이용하였다[14]. 실험에 사용한 콜로이드 실리카 원료는 순도가 높은 Dupont (Ludox[®]AS-40, 40 wt%, Dupont)의 시약으로 10~20 nm 크기의 콜로이드 입자를 aggregation시켜 microsphere 크기로 성장시키기 위하여 urea (CO(NH₂)₂, Aldrich), formaldehyde (HOCH, 37 wt%, Aldrich) 수지로 polymerization 시킴으로서 균일한 크기의 microsphere 입자를 제조하였다. PICA 방법으로 제조된 입자내에 함유된 고분자수지를 제거하기 위하여 600 °C에서 탄화시키고 1,000 °C의 소성로에서 고온으로 가열하여 구조결합용으로 사용한 고분자수지를 연소시켜 순수한 다공성 실리카 microsphere 을 제조하였다.

2-2. 콜라겐의 분리 정제

콜라겐은 천연단백질 소재로 동물의 조직세포를 구성하는 물질이다. 본 연구에서는 사용한 동물성 유래 생체소재인 콜라겐, type I은 돼지 피부껍질로부터 직접 고순도 분리, 정제된 것을 사용하였다. 피부껍질에서 부착되어 있는 지방을 제거하기 위한 전처리 과정으로 acetone과 KOH, NaOH를 함유한 세정용액에 넣고 6시간 동안 탈지과정을 거쳤다. 그 후, 염기성화 된 피부시료를 boric acid 용액에 침지시켜 중화시켰다. 시료를 분쇄 한 후, 원심 분리하여 콜라겐을 분리정제하기 위한 조직 pellet을 얻었다. 조직 pellet에 함유되어 있는 proteoglycan과 glycol-protein을 제거하기 위하여 tris-buffer 와 guanidine을 첨가하여 24시간 동안 돌려준 다음, guanidine을 제거하기 위해 증류수로 세척한 후 원심분리 하였다. 산가용성 콜라겐을 얻기 위하여 acetic acid와 NaCl 수용액에 넣어 가용화시킨 후 산성용액에 녹아있는 콜라겐성분을 원심분리기를 사용하여 acid soluble collagen 용액을 모았다. 이 용액을 cellulose 투석막안에 넣고 0.5 M acetic acid에 0.9 M NaCl이 첨가된 용액을 넣고 투석하여 용액에 잔류하는 모든 전해질성분을 제거한 후 동결 건조하여 fiber 형태인 고순도 콜라겐(type I)을 얻어 사용하였다.

2-3. Microsphere 복합체의 제조

고순도의 콜라겐을 산에 가용화 시켜 hydrogel 형태의 용액을 만

든 다음 콜라겐 수용액에 초음파 분산기를 이용하여 실리카 microsphere를 에탄올에 분산시킨 용액을 가하여 균일 하게 교반해준다. 0.2%의 poly(vinyl alcohol)이 포함된 100 ml의 PBS 용액과 혼합하고 이 용액을 상온에서 교반시킨 후에 상등액을 제거하고 침전된 시료를 분리하여 이물질질을 초순수로 세척하여 제거한 후 콜라겐/실리카 microsphere 복합체를 제조하였다[15-17].

항균성을 지닌 microsphere 복합체를 만들기 위하여 사용한 은 나노 입자는 AgNO₃와 에탄올이 함유된 수용액상에서 환원제를 이용하여 은 입자를 환원시켜 콜로이드형태의 은 나노입자를 제조하였다. 은 나노 입자를 실리카/콜라겐 복합체의 표면에 균일하게 담지된 복합체를 제조하기 위하여 먼저 vaccum aspirator를 사용하여 다공성 콜라겐/실리카 microsphere 세공 안의 모든 공기와 여분의 수분을 제거한 다음, 은 나노입자를 함유한 용액에 1시간 동안 상온에서 교반시킨 후에 상등액과 침전된 복합체를 분리하여 초순수로 세척하여 냉장 보관하면서 수분을 제거하여 제조한다. 은 나노입자를 담지한 콜라겐/실리카 microsphere 복합체의 표면을 EDX (Energy Dispersive X-ray Spectroscopy), XRD (X-ray Diffractometer; Rigaku, DMAX-250)로 분석하고 전위차계를 이용하여 복합체로부터 방출되는 은 이온의 양을 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

3-1. 콜라겐의 특성분석

돼지피부로부터 분리, 정제한 콜라겐시료를 표준시료(Type I, commercial pig collagen)와 비교하기 위하여 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) method을 사용하여 분석한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 그림에서 보는 바와 같이 분리정제한 콜라겐의 electrophoresis patterns은 표준시료(type I)와 동일한 $\alpha 1$, $\alpha 2$ bands와 polypeptide chain을 가지고 있음을 알 수 있다.

Fig. 2는 분리, 정제한 콜라겐시료와 다른 동물성 유래 콜라겐(type I) 시료들과의 성분분석을 위한 FT-IR spectra 이다. 3,400~3,440 cm⁻¹ 영역에서 amide band인 N-H stretching frequency and N-H stretching vibration을 볼 수 있다.

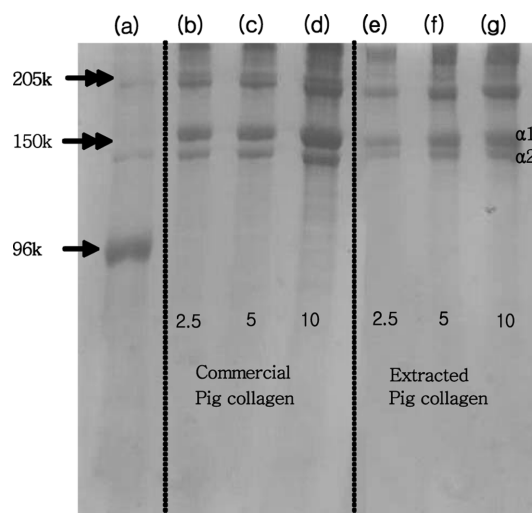


Fig. 1. SDS-PAGE electrophoresis of various preparation of collagen; (a) molecular weight standard (b) commercial pig skin 2.5 µl (c) 5 µl (d) 10 µl (e) extracted pig skin 2.5 µl (f) 5 µl (g) 10 µl

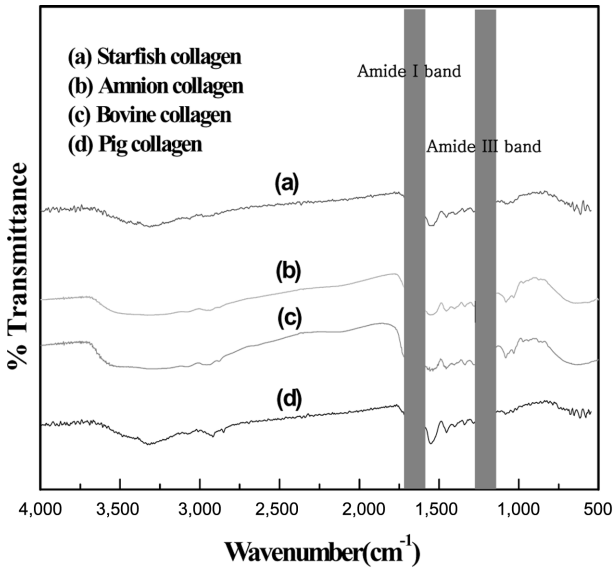


Fig. 2. FT-IR spectra for various species collagen.

3-2. Silica microsphere의 입도분포 및 SEM

본 연구에서 PICA법으로 제조한 silica microsphere의 입자분포를 dynamic light scattering을 이용한 PSA(Particle size analyzer)로 구형 실리카입자와 실리카/콜라겐 복합체의 입자 크기 변화 Fig. 3에 나타내었다. 다공성 구형 실리카의 경우 평균 입경이 4~5 μm의 크기였으며, 실리카 표면을 콜라겐으로 개질한 다공성 구형 실리카/콜라겐 복합체의 평균 입경은 6~7 μm의 크기를 나타내는 것을 확인 할 수 있다.

PICA법으로 제조한 다공성 구형 실리카 microsphere와 microsphere의 표면을 콜라겐으로 개질시켜 얻은 실리카/콜라겐 복합체의 SEM 사진을 Fig. 4에서 보여주고 있다. 제조한 실리카 microsphere의 경우 10~20 nm의 작은 콜로이드실리카 입자들이 고분자수지에 흡착, aggregation 되어 5~6 μm 크기의 구형 실리카 microsphere를 형성하고 있음을 알 수 있으며, 비표면적은 대략 259.99 m²/g, 세공부피는 0.611 cm³/g을 나타내었다. 일반적으로 고순도 콜라겐의 경우

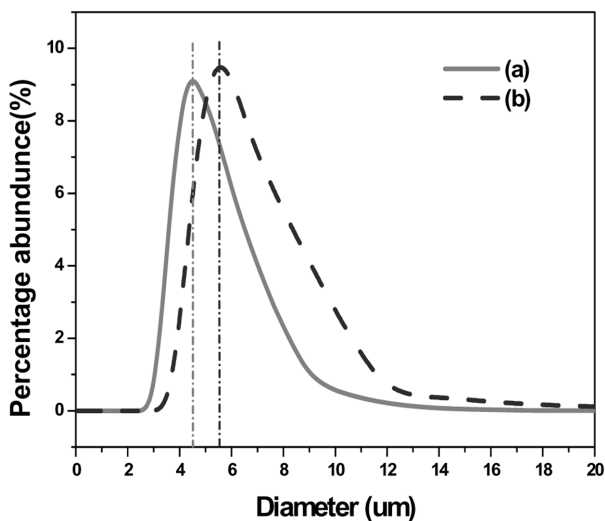


Fig. 3. Particle size of (a) silica microsphere (b) silica/collagen microsphere.

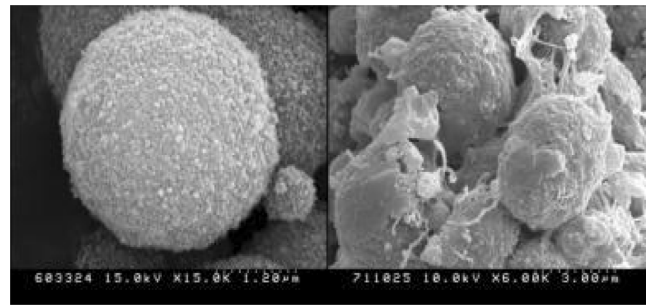


Fig. 4. SEM morphology of (a) silica (b) collagen.

fiber 형태의 구조를 갖고 있는 천연 단백질소재이다. hydrogel 형태의 콜라겐수용액을 사용하여 실리카 microsphere의 표면을 개질시킨 결과 실리카 표면에 균일하게 콜라겐이 둘러싸고 있음을 볼 수 있다.

3-3. Ag 담지된 실리카/콜라겐 복합체의 특성

3-3-1. XRD 분석

은 이온이 강력한 살균력과 항균력을 지니고 있다는 사실은 잘 알려져 있다. 따라서 실리카/콜라겐 microsphere 복합체에 항균력을 부여하기 위하여 colloid형태의 은 나노입자를 복합체표면에 담지시키고 그 결과를 Fig. 5에 나타내었다. Fig. 5는 실리카, 실리카/콜라겐, 은 이온 담지 복합체의 X-선 회절 패턴을 나타낸 그림이다. PICA 콜로이드 응집법을 이용하여 만든 다공성 구형 실리카 microsphere(a)인 경우에 특정 피크가 나타나지 않으며, $\Theta=22^\circ$ 부근에서 무정형(amorphous) 형태의 피크를 볼 수 있다. 이것으로 보아 본 실험에서 제조한 다공성 실리카 microsphere는 결정성 silica의 형태가 아님을 알 수 있다.

다공성 구형 실리카/은 나노 입자 microsphere(b)의 X-선 회절 패턴을 보면, 무정형 형태의 실리카 피크와 동시에 3개의 강한 피크가 나타나 있는 것을 알 수 있다. 3개의 주 피크는 (1 1 1), (2 0

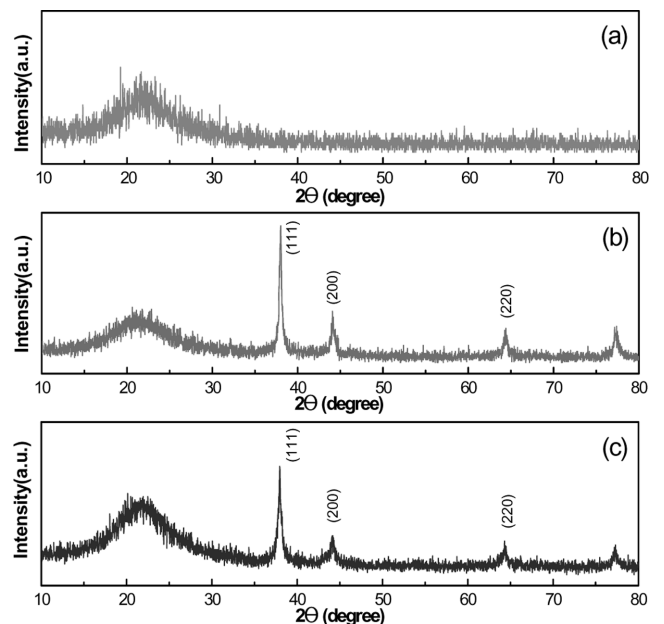


Fig. 5. XRD pattern of microsphere (a) silica (b) silica/Ag (c) silica/collagen/Ag.

Table 1. Voltammogram data of released Ag ion

Day	Data (mA/V)	Concentration (ppm)
2	0	0
6	0.00116664	14.48
8	0.00150971	15.31
10	0.014658725	47.22
14	0.013073603	43.38
16	0.00304883	9.82

0), (2 2 0) 은의 crystalline의 존재를 의미하는 형태이며, 이 분산된 은 나노 입자의 평균 crystallite 크기는 Scherrer's formula, $D=k\lambda/\beta\cos\theta$ 에 의해 정의된다. 이것으로 보아 다공성 구형 실리카 표면에 은 나노 입자가 microsphere의 표면에 잘 담지되어 있다는 것을 확인할 수 있다.

3-2-2. Ag ion의 방출효과

은 이온의 살균 및 항균 메카니즘은 과학적으로 정확히 밝혀지는 않았지만 현재는 은이 세균의 호흡과 신진대사를 조절하는 효소의 작용을 억제하는 촉매로 작용해 결과적으로 세균의 생명활동을 정지시킨다는 설명이 가장 유력하다. 은 이온이 세균과 접촉하면 세균의 세포막을 터뜨려 세균을 살 수 없게 한다고 알려져 있다. 수용액상에서 방출된 은 이온이 살균 및 항균효과를 발휘하기 위한 함량은 대략 ppb 단위의 농도만 있어도 충분하다고 알려져 있다[18-19].

Microsphere 복합체의 살균 및 항균효과는 표면에 담지된 은 나노입자로부터 수용액상에서 얼마나 많이 지속적으로 은 이온을 방출할 수 있는가에 달려있다. 실험을 통하여 microsphere 복합체의 항균특성을 조사하기 위하여 은 이온의 방출량을 정량할 수 있는 potentiostat-galvanostat (Princeton Applied Research, VSP)를 이용한 전기화학적 방법인 anode stripping voltammetry (ASV) method를 통해 그 양을 정량 하였다. Table 1을 통해서 알 수 있듯이 microsphere의 표면에 담지된 은 이온은 15일 이후까지 지속적으로 방출 되는 것을 확인할 수 있었다. 이로서 실리카/콜라겐/은 나노입자 복합체는 항균성 생체재료로 장시간동안 지속적인 항균작용을 할 수 있음을 알 수 있다.

4. 결 론

(1) PICA법(Polymerization-Induced Colloid Aggregation Method)을 이용하여 제조한 다공성 구형 실리카는 평균 입경은 4~5 μm 큰 비표면적(259.99 m^2/g)과 큰 기공 크기(95.99Å)를 가지고 있어, 약물 전달체(DDS)로도 활용이 가능한 microsphere임을 확인할 수 있었다.

(2) 돼지의 피부겉질로부터 분리, 정제실험을 통하여 양질의 콜라겐을 수득하여 상용화된 콜라겐과 그 특성을 비교, 조사한 결과 고순도의 콜라겐, type I 임을 확인하였으며, 이것을 이용하여 산가용성 collagen hydrogel을 제조할 수 있었다.

(3) 콜라겐 hydrogel을 이용하여 실리카 microsphere의 표면을 개질시켜 실리카/콜라겐 복합체를 제조하고 여기에 은 나노 입자를 이용하여 다공성 구형 실리카/콜라겐/은 나노입자 복합체를 제조하므로 이 복합체가 향후 의학용 소재로 활용이 가능함을 확인하였다.

참고문헌

1. Yang, L. J. and Li, Y. B., "Quantum Dots as Fluorescent Labels for Quantitative Detection of Salmonella Typhimurium in Chicken Carcass Wash Water," *J. Food Prot.*, **68**, 1241-1245 (2005).
2. Miller, D. K., et al., "Development of a High-capacity Homogeneous Fluorescent Assay for the Measurement of Leukotriene B-4," *Anal. Biochem.*, **349**, 129-135(2006).
3. Murakami, Y., Endo, T., Yamamura, S., Nagatani, N., Takamura, Y. and Tamiya, E., "On-chip Micro-flow Polystyrene Bead-based Immunoassay for Quantitative Detection of Tacrolimus (FK506)," *Anal. Biochem.*, **334**, 11-16(2004).
4. Yang, L., Tran, D. K. and Wang, X., "BADGE, Beads Array for the Detection of Gene Expression, a High-throughput Diagnostic Bioassay," *Genome Res.*, **11**, 1888-1898(2001).
5. Marquette, C. A. and Blum, L. J., "Immobilisation of DNA on Chips Ii (Berlin: Springer)," 113-129(2005).
6. Huang, Z. L., Zhao, Y. D. and Luo, Q. M., "Quantum-dot-tagged Microbeads and Their Use as Fluorescent Biological Probes. Curr," *Anal. Chem.*, **2**, 9-66(2006).
7. Kim, T. H., Kim, J. Y., Kim, M. J., "Preparation of Silica Nanoparticles Using Water in Oil Microemulsion," *HWAHAK KONG-HAK*, **41**(2), 174-185(2003).
8. van, Sark. W., Frederix, P., Bol, A. A., Gerritsen, H. C. and Meijerink, A., "Blueing, Bleaching, and Blinking of Single CdSe/ZnS Quantum dots," *Chem. Phys. Chem.*, **3**, 871-879(2002).
9. Nirmal, M., Dabbousi, B. O., Bawendi, M. G., Macklin, J. J., Trautman, J. K., Harris, T. D. and Brus, L. E., "Fluorescence Intermittency in Single Cadmium Selenide Nanocrystals," *Nature*, **383**, 802-804(1996).
10. Kirchner, C., Liedl, T., Kudera, S., Pellegrino, T., Javier, A. M., Gaub, H. E., Stolzle, S., Fertig, N. and Parak, W. J., "Cytotoxicity of Colloidal CdSe and CdSe/ZnS Nanoparticles," *Nano Lett.*, **5**, 331-338(2005).
11. Hoshino, A., Fujioka, K., Oku, T., Suga, M., Sasaki, Y. F., Ohta, T., Yasuhara, M., Suzuki, K. and Yamamoto, K., "Physicochemical Properties and Cellular Toxicity of Nanocrystal Quantum Dots Depend on Their Surface Modification," *Nano Lett.*, **4**, 2163-2169(2004).
12. Wang, F., Zhang, Y., Fan, X. P. and Wang, M. Q., "One-pot synthesis of Chitosan/LaF3:Eu3+nano-crystals for Bio-applications," *Nanotechnology*, **17**, 1527-1532(2006).
13. Wang, F., Zhang, Y., Fan, X. P. and Wang, M. Q., "Facile Synthesis of Water-soluble LaF3:Ln(3+) Nanocrystals," *J. Mater. Chem.*, **16**, 1031-1034(2006).
14. Lee, S. W., Lee, C. I., Lee, Y., Chang, Y. H. and Hahm, Y. M., "Study on the Size Control of Spherical Silica Particles Prepared by Colloid - Aggregation Method," *Appl. Chem.*, **5**(2), 256-259 (2001).
15. Thibaud, Coradin., Marie-Madeleine Giraud-Guille., Christophe, Helary., Jacques, Livage. and Clment Sanchez., "Association of Silica with Biopolymers for the Design of New Biocomposites," *Mat. Res. Soc. Symp. Proc.*, 726(2002).
16. Fagundes, L. B., Sousa, T. G. F., Sousa, A., Silva, V.V., Sousa, E. M. B., "SBA-15-collagen Hybrid Material for Drug Delivery Applications," *J. Non-Crystal. Solids*, **352**, 3496-3501(2006).

17. Izquierdo-Barba, África Martínez., Antonio L. Doadrio, Joaquin Pérez-Pariente, María Vallet-Reg., "Release Evaluation of Drugs from Ordered Three-dimensional Silica Structures;" *Eur. J. Pharm. Sci.*, **26**, 365-373(2005).
18. Ryu, J. H., Chang, D. S., Choi, B. G., Yoon, J. W., Lim, C. S., Shim, K. B., "Fabrication of Ag Nanoparticles-coated Macroporous SiO₂ Structure by Using Polystyrene Spheres;" *Mat. Chem. Phys.*, **101**, 486-491(2007).
19. Radhesh, Kumar., Steve, Howdle., Helmut, Munstedt., "Polyamide/silver Antimicrobials: Effect of Filler Types on the Silver Ion Release;" *J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomater.*, **75B**, 311-319(2005).