

전기방사를 이용한 히알루론산 멤브레인의 제조 및 금 나노입자 촉매 담체로의 응용

Fabrication of hyaluronic acid membrane using electrospinning method and its application as a catalyst support for gold nanoparticles

이남훈^a, 박현민^b, 이상명^{b*}, 이대원^{b*}

Namhun Lee^a, Hyun-Min Park^b, Sang-Myung Lee^{b*}, Dae-Won Lee^{b*}

^a Super Ultra Low Energy and Emission Vehicle (SULEEV) Center, Korea University, Anam-ro 145, Seongbuk-gu, Seoul 02841, Republic of Korea

^b Department of Chemical Engineering, Division of Chemical and Biological Engineering, Kangwon National University, Gangwon-Do 24341, Republic of Korea

Received 20 September 2018; Revised 16 October 2018; Accepted 19 October 2018

Abstract

In this study, hyaluronic acid (HA) was electro-spun to fabricate nanofibrous membranes for support materials. Because HA is very hygroscopic, it is difficult to obtain enough viscosity to apply electrospinning method. Therefore, we mixed HA with polyethylene oxide (PEO) to obtain proper viscosity and added adipic acid (ADH) to promote cross-linking of PEO/HA during electrospinning. The morphology of PEO/HA membrane was optimized according to PEO/HA concentration ratio and spinning rate. Finally, we fabricated gold-nanoparticle-embedded PEO/HA membranes and their catalyst activities were evaluated in tetramethylbenzidine (TMB) oxidation.

Keywords: Electrospinning, Hyaluronic acid, Cross-linking, ADH, TMB oxidation

1. 서론

히알루론산은 선형의 폴리사카라이드계 물질로써 글루코사민 (β -1-3-N-acetyl-D-glucosamine)과 글루쿠론산 (β -1-4-D-glucuronic acid)이 반복되어 나타나는 자연에서 유래한 생체고분자 중 하나이다. 히알루론산을 구성하는 두 개의 이당류 중, 글루코사민은 하이드록시기 (Hydroxy group, -OH)가 존재하여 히알루론산 무게 대비 수백 배에 달하는 수분을 포집할 수 있는 능력을 보여주고 있으며 글루쿠론산은 카르복실기 (Carboxyl group, -COOH)가 존재하여 다른 작용기의 도입이나 다른 분자와의 결합이 용이하다는 특징을 갖고 있다^[1-3].

일반적으로 제조 및 정제방법에 따라 저분자부터 고분자까지 다양한 분자량을 갖는 히알루론산으로 합성할 수 있으며, 이를 기반으로 화장품 원료, 미용제품 등에 사용되고 있다. 또한 세포 외 기질 (Extracellular matrix, ECM)을 형성하는 성분 중 하나로써 생체적 합성, 생분해성 및 치유능력 증대 등의 우수한 성질을 나타내기 때문에 의학적 용도 (상처치료용, 치과용소재, 약물전달체, 조직공학 등)의 재료로 각광받는 추세이다. 생체의료 재료로서 히알루론산의 응용성을 높이기 위해 히알루론산 구조체 제조에 대해 많은 연구가 진행되고 있으며, 특히 비표면적이 넓은 멤브레인 (Membrane) 또는 시트 (Sheet)형태의 히알루론산 구조체 연구가 많은 관심을 받고 있다^[1-3].

이러한 멤브레인 또는 시트형태의 히알루론산 구조체 개발을 위해 전기방사를 이용한 연구가 주로 진행되어 왔으며, 이는 다공성 형태의 구조체가 형성되어 비표면적을 비약적으로 증대시켜 약물이나 나노입자의 도입이 용이해진다는 장점이 존재한다.

* Corresponding author. Tel.: +82-2-250-6331

fax: +82-2-251-3658

E-mail address: stayheavy@kangwon.ac.kr (Dae-Won Lee).

E-mail address: sangmyung@kangwon.ac.kr (Sang-Myung Lee).

또한 전압, 방사속도, 팁과 집전판과의 거리 및 점도 등을 조절하여 형태 (morphology)를 제어할 수 있다는 점이 전기방사를 이용한 구조체 형성의 장점이라 할 수 있다. 그러나, 히알루론산의 높은 수분 친화력 때문에 점도 조절이 어려우며 이에 전기방사를 이용한 구조체 형성에 한계점이 존재하였다. 이를 극복하기 위해 많은 연구가 진행되어 왔으며 젤라틴 (Gelatin), 콜라겐 (Collagen), 키토산 (Chitosan) 등 천연고분자를 이용하거나 또는 다양한 유기용매를 사용하여 히알루론산의 점도를 조절, 전기방사를 이용한 구조체를 형성하는 방법에 대한 연구가 진행되었다^{4,8)}.

본 연구에서는 폴리에틸렌옥사이드 (Polyethylene Oxide, PEO)를 이용하여 히알루론산의 점도를 조절, 전기방사를 통해 다공성 나노구조를 갖는 히알루론산 멤브레인을 형성하였다^{9, 10)}. 이를 이용하여 금 나노입자가 담지 된 촉매를 형성하여 멤브레인 구조의 히알루론산 구조체의 촉매 지지체 역할에 대해 알아보았다.

2. 실험 방법 및 분석

2.1 PEO가 첨가된 히알루론산 용액 제조

증류수 2 mL에 20, 60, 및 100 mg의 Polyethylene oxide (PEO, M_n: 300,000, Sigma Aldrich)를 녹인 후, 20 mg의 히알루론산 (Hyaluronic acid, 670KDa, GL biochem)과 4.8 mg의 ADH (Adipic acid, Sigma Aldrich)를 넣은 후 30분간 교반하여 완전히 녹여 제조하였다.

2.2 히알루론산 용액 전기방사

PEO가 첨가된 히알루론산 용액의 가교를 위해 230 mg의 EDC (*N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N*'-ethylcarbodiimide hydrochloride, Sigma aldrich)를 에탄올 50 mL 에 녹인 후 반응용기에 담아 가교용 용기 (bath)를 준비하였다. 가교용 용기는 전기방사 집전판 위에 위치시키며 히알루론산 용액은 내경 12.8 mm 인 주사기에 채워 전기방사 기기에 장착하고 집전판 사이의 거리는 10 cm 로 설정하였다. 방사 조건은 전압 (30 kV) 및 방사속도 (10, 50, 및 70 μ L/min)를 변수로 설정하여 실시하였다. 방사 후 가교가 진행될 수 있도록 가교용 용기에 1시간 방치 후 원심분리를 이용해 에탄올로 잔여 반응물을 씻어 낸 후 분석을 위해 진공오븐에 건조시켜 사용하였다.

2.3 FT-IR 분석

히알루론산과 PEO의 가교결합을 확인하기 위해 순수한 히알루론산 및 ADH를 이용한 PEO/히알루론산 구조체에 대한 FT-IR 분석을 실시하였다. 이때에 사용한 PEO/히알루론산 구조체는 1:5 비율로

형성한 구조체를 사용하였으며, 각각의 시료에 대해 0.5 mg 시료와 5 mg의 KBr을 이용하여 펠렛형성 후 분석을 실시하였다. 이때의 측정 조건으로 500 ~ 4000 cm^{-1} 의 흡수파장 범위에서 1 cm^{-1} /s 분해능 조건하에 측정하였으며 10번의 반복 측정을 통한 평균을 이용하여 결과 값을 도출하였다.

2.4 TMB 산화반응을 이용한 지지체 역할 평가

PEO가 첨가된 히알루론산 용액 제조에서 증류수를 대신하여 2 mL의 금 나노입자가 분산되어 있는 용액을 넣어준 후 전기방사를 실시하였다.

10 mM의 TMB를 에탄올에 녹인 후, Sodium acetate 수용액 (pH 3.5, 100 mM)과 혼합하여 TMB의 농도가 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 및 1.0 mM이 되도록 반응 용액을 제조하였다. 최종적으로 48 Well Plate에 금 나노입자 담지 히알루론산 멤브레인이 포함된 슬러리 100 μ L, 각 농도 별 TMB 용액 100 μ L 및 10 mM 과산화수소 100 μ L 을 넣어 주고 25 $^{\circ}$ C, 20분마다 Tetramethylbenzidine (TMB) 산화반응에 따른 색 변화를 UV/vis 흡광 스펙트럼을 통해 관찰하였다^{11, 12)}.

3. 결과 및 고찰

고점도 히알루론산 전기방사의 한계를 극복하고자 친수성 고분자인 PEO를 도입하였다. 구조의 안정성 증대를 위해서 가교구조가 필요하나, 가교된 히알루론산은 더욱 높은 점도를 가지기 때문에 전기방사가 더욱 제한된다. 따라서, 커플링제 (EDC)를 가교용 용기에 녹여 전기방사 후에 섬유 안에 존재하는 히알루론산과 ADH의 펩타이드 결합을 통해 가교가 이루어지도록 고안하였다(Fig. 1).

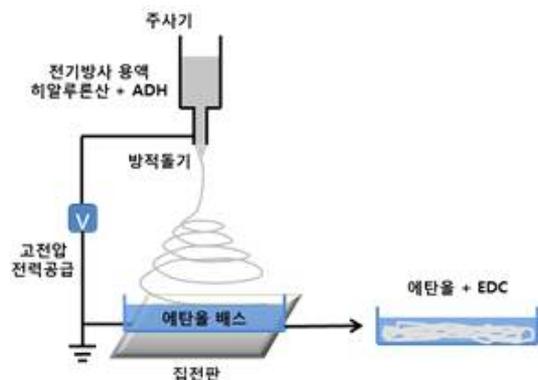


Fig. 1 Schematic of electrospinning of HA

3.1 PEO농도 및 전기방사 조건에 따른 구조체 변화

PEO가 전기방사에 미치는 영향을 알아보기 위하여 히알루론산의 양을 고정 후, 히알루론산과 PEO 를 1:1, 1:3 및 1:5 농도비로 혼합하여 용액을 준비하였다. 방사전압과 방사속도는 각각 30 kV, 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ 로 고정하여 전기방사를 진행하였으며 주사전자현미경을 통해 세부 구조를 확인하였다(Fig. 2). 히알루론산과 PEO 의 비율이 1:1 인 경우, 비드 형태가 섬유형을 나타내는 다공성 구조의 히알루론산 구조체 관찰되었다(Fig. 2(a)). PEO 의 비율을 높여 방사한 1:3 조건의 경우, 섬유형태의 히알루론산 구조체는 확인하였으나 섬유에 비드가 형성되는 것을 확인하였다(Fig. 2(b)).

이에 PEO를 더욱 증가시켜 1:5 가 되었을 때에 형성된 섬유 구조체에 비드형 구조체가 감소하는 것을 확인하였으나 높은 PEO 농도로 인해 굵은 섬유형 구조체 및 일부분 비드형태가 존재함을 확인하였다(Fig. 2(c)). 이후 히알루론산과 PEO 의 비율을 1:5 로 고정하고 방사속도를 10, 50, 70 $\mu\text{L}/\text{min}$ 로 변화시켜 방사를 진행하였다(Fig. 3). 방사 속도 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ 의 경우, 섬유구조를 관찰할 수 없었으며 이는 용액을 토출시키는 속도가 너무 낮아 섬유를 형성하지 못하기 때문이라 판단하였다(Fig. 3(a)). 반면 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ 의 방사속도로 방사한 경우 섬유형태를 갖춘 최적화된 다공성 구조를 보였다(Fig. 3(b)). 방사속도를 더욱 높인 70 $\mu\text{L}/\text{min}$ 에서는 다시 조직이 뭉치는 것을 확인하였으며, 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ 일 때와는 달리 섬유형 구조가 유지되는 것으로 보아 빠른 방사속도에 의해 얇게 연신된 섬유들이 형태를 보존하지 못하고 가교에 의해 뭉쳐진 것으로 판단하였다(Fig. 3(c)).

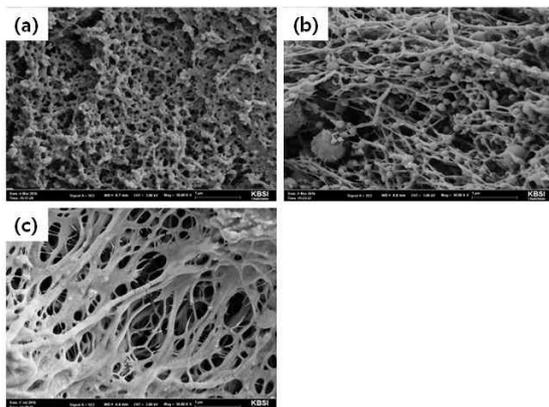


Fig. 2 SEM image of PEO/HA membrane according to concentration ratio; (a) PEO/HA = 1:1, (b) PEO/HA = 1:3, and (c) PEO/HA = 1:5

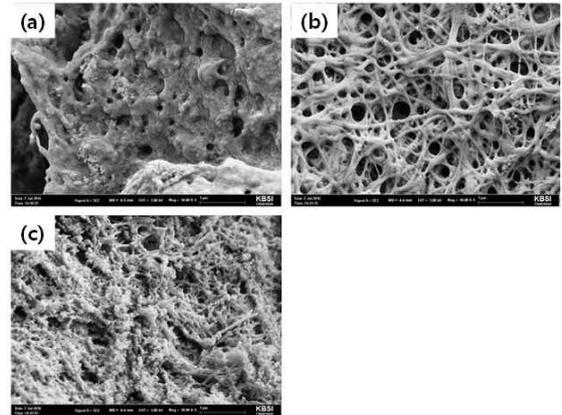


Fig. 3 SEM image of PEO/HA membrane according to spinning rate; (a) 10 $\mu\text{L}/\text{min}$, (b) 50 $\mu\text{L}/\text{min}$, and (c) 70 $\mu\text{L}/\text{min}$

3.2 FT-IR 분석

섬유형의 다공성 구조를 보인 1:5 조건에서 ADH에 의한 히알루론산과 PEO의 가교구조 형성에 따른 펩타이드 결합을 확인하기 위해 FT-IR 분석을 실시하였다(Fig. 4). 히알루론산의 경우, 많은 하이드록시기에 신축진동 의해 3445 cm^{-1} 에서 강한 피크를 보이고, 1616 cm^{-1} 과 609 cm^{-1} 에서 각각 N-H 굽힘진동과 C-O-C 신축진동에 의한 피크가 확인되었다.

반면, 전기방사 이후에는 히알루론산과 ADH 간에 펩타이드 결합을 통해 가교구조를 형성하여 펩타이드 결합의 C=O 신축진동에 의한 피크가 1654 cm^{-1} 에서 새로 관찰되었으며 이로써 방사된 히알루론산 멤브레인은 가교구조가 형성된 것을 확인하였다.

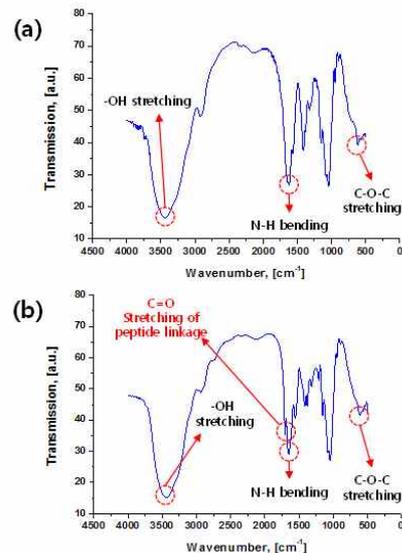


Fig. 4 FT-IR analysis of (a) hyaluronic acid, and (b) cross-linked hyaluronic acid (PEO/HA membrane, Fig. 3(b))

3.3 TMB 산화반응을 이용한 지지체 역할 평가

다공성 구조로 인해 넓은 비표면적을 가지는 멤브레인의 가능성을 평가하기 위해 금 나노입자를 전기방사 용액에 혼합하여 금 나노입자가 담지된 히알루론산 다공성 멤브레인을 제작하였다. 평가방법으로는 TMB 산화반응을 이용하였으며 TMB는 촉매에 의해 과산화수소로부터 형성된 라디칼에 의해 산화되며 1차 산화로 380 nm 과 652 nm, 2차 산화로 450 nm인 자외선/가시광선 영역에서 흡광하기 때문에 육안 및 UV/vis를 통해 반응을 확인 할 수 있다는 장점이 존재한다.

Fig 5는 TMB 농도 별 20분 간격으로 1시간 동안 관찰한 결과이며, TMB 산화반응은 40 ~ 60 분 사이에 급격하게 진행되어 색 변화가 관찰되었다. 이러한 이유는 금 나노입자가 히알루론산 섬유 내부에 존재하여 반응용매와 접촉하는데 시간이 소요되기 때문이라 판단하였다.

Fig 6는 1 시간 반응 후 TMB 농도별 UV/vis 흡광 스펙트럼을 관찰하였다. TMB의 1차 산화를 의미하는 380 nm 와 652 nm 에서 흡광을 보이고 있으며, 육안으로는 구분할 수 없었던 0.4 mM TMB 이하에서도 값의 차이를 보였다. 이로써 금 나노입자가 담지된 히알루론산 다공성 멤브레인 구조가 지지체로서의 활용가능성을 확인하였다.

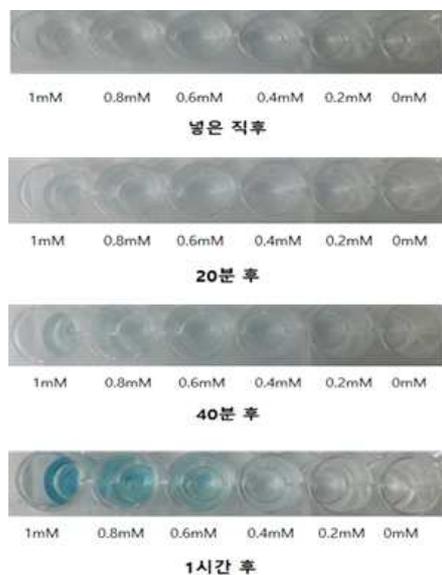


Fig. 5 Optical image of TMB oxidation according to reaction times (Each mM value implies the concentration of TMB; Catalyst: Gold - nanoparticle-embedded PEO/HA membrane)

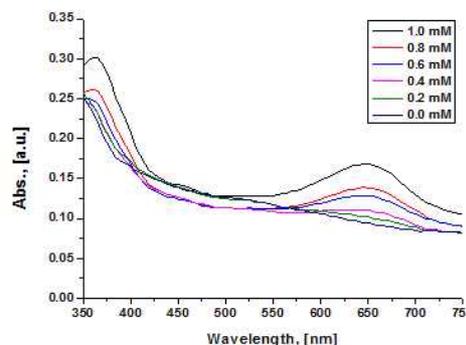


Fig. 6 UV/Vis spectra of TMB oxidation after 1 hours

4. 결론

본 연구에서는 고점도로 인하여 단독적인 전기방사의 어려움을 갖는 히알루론산의 문제점을 극복하고자 친수성고분자인 PEO를 혼합하여 다공성의 히알루론산 멤브레인을 제작하였다.

멤브레인의 구조는 방사 속도와 PEO/HA의 농도 비에 따라 점도 차에 의해 구조적 차이가 발생하는 것을 확인하였으며, FT-IR 분석에서 1654 cm⁻¹에서 새로운 피크가 나타나는 것을 통해 가교구조가 성공적으로 이루어졌다는 것을 확인하였다.

마지막으로 표면적이 넓은 다공성의 장점을 살린 지지체로서의 활용 가능성을 확인하기 위해, 금 나노입자를 멤브레인에 담지하여 그 실효성을 증명하였다. 마지막으로, 본 히알루론산 다공성 지지체는 담지물을 화학적으로 담지하는 것이 아니기 때문에 세포, 약물, 생리활성물질 등 다양한 분야에서 담지 및 지지체로 활용 가능할 것으로 판단된다.

References

[1] Eric K. Brenner, Jessica D. Schiffman, Ebony A. Thompson, Laura J. Toth, Caroline L. Schauer, 2012, Electrospinning of hyaluronic acid nanofibers from aqueous ammonium solutions, Carbohydr. Polym., 87 926-929.

[2] Maurice N. Collins, Colin Birkinshaw, 2013, Hyaluronic acid based Scaffolds for tissue engineering-A review, Carbohydr. Polym., 92 1262-1279.

[3] Eun Ju Oh, Kitae Park, Ki Su Kim, Jiseok Kim, Jeong-A Yang, Ji-Hyun Kong, Min Young Lee, Allan S. Hoffman, Sei Kwang Hahn, 2010, Target specific and long-acting delivery of protein,

- peptide, and nucleotide therapeutics using hyaluronic acid derivatives, *J. Control Release*, 141 2-12.
- [4] Guiping Ma, Yang Liu, Dawei Fang, Jie Chen, Cheng Peng, Xu Fei, Jun Nie, 2012, Hyaluronic acid/chitosan polyelectrolyte complexes nanofibers prepared by electrospinning, *Mater. Lett.*, 74 78-80.
- [5] Xuefen Wang, In Chul Um, Dufei Fang, Akio Okamoto, Benjamin S. Hsiao, Benjamin Chu, 2005, Formation of water-resistant hyaluronic acid nanofibers by blowing-assisted electro-spinning and non-toxic post treatments, *Polymer*, 46 4853-4867.
- [6] Shanshan Xu, Junxing Li, Aihua He, Wenwen Liu, Xingyu Jiang, Jianfen Zheng, Charles C. Han, Benjamin S. Hsiao, Benjamin Chu, Dufei Fang 2009, Hyaluronic acid based Scaffolds for tissue engineering-A review Chemical crosslinking and biophysical properties of electrospun hyaluronic acid based ultra-thin fibrous membranes, *Polymer*, 50 3762-3769.
- [7] Yang Liu, Guiping Ma, Dawei Fang, Juan Xu, Hongwen Zhang, Jun Nie, 2011, Effects of solution properties and electric field on the electrospinning of hyaluronic acid, *Carbohydr. Polym.*, 83 1011-1015.
- [8] Taek Gyoung Kim, Hyun Jung Chung, Tae Gwan Park, 2008, Macroporous and nanofibrous hyaluronic acid/collagen hybrid scaffold fabricated by concurrent electrospinning and deposition/leaching of salt particles, *Actabiomat.*, 4 1611-1619.
- [9] Yuan Ji, Kaustabh Ghosh, Xiao Zheng Shu, Bingquan Li, Jonathan C. Sokolov, Glenn D. Prestwich, Richard A.F. Clark, Miriam H. Rafailovich, 2006, Electrospun three-dimensional hyaluronic acid nanofibrous scaffolds, *Biomaterials*, 27 3782-3792.
- [10] Guangkai Chen, Junxia Guo, Jun Nie, Guiping Ma, 2016, Preparation, characterization, and application of PEO/HA core shell nanofibers based on electric field induced phase separation during electrospinning, *Polymer*, 83 12-19.
- [11] Yaqing Chang, Zhe Zhang, Jinhui Hao, Wenshu Yang, Jilin Tang, 2016, BSA-stabilized Au clusters as peroxidase mimetic for colorimetric detection of Ag^+ , *Sens. Actuators B Chem.*, 232 692-697.
- [12] Gang-Wei Wu, Shao-Bin He, Hua-Ping Peng, Hao-Hua Deng, Ai-Lin Liu, Xin-Hua Lin, Xing-Hua Xia, Wei Chen, 2014, Citrate-Capped Platinum Nanoparticle as a Smart Probe for Ultrasensitive Mercury Sensing, *Anal. Chem.*, 86 10955-10960.