

GABA를 담지한 자성 키토산 나노입자 제조와 약물의 흡수 및 방출 연구

윤희수 · 강익중[†]

가천대학교 화공생명공학과
13120 경기도 성남시 수정구 성남대로 1342
(2020년 8월 24일 접수, 2020년 9월 21일 수정본 접수, 2020년 9월 21일 채택)

The Preparation of Magnetic Chitosan Nanoparticles with GABA and Drug Adsorption-Release

Hee-Soo Yoon and Ik-Joong Kang[†]

Department of Chemical & Bio Engineering, Gachon University,
1342, Seongnam-daero, Sujeong-gu, Seongnam-si, Gyeonggi-do, 13120, Korea
(Received 24 August 2020; Received in revised form 21 September 2020; Accepted 21 September 2020)

요 약

약물 전달 시스템(Drug Delivery System, DDS)은 인체에 발생한 질환을 치료를 할 때 약물을 효과적으로 투약함으로써 약물성분에 의한 부작용을 최소화하고, 약물의 효능을 최대한으로 크게하기 위해 기존의 알려진 성분의 약물이거나 새로운 성분의 제형을 설계하여 환자의 약물치료 과정을 최적화하는 목적을 지향하는 기술로 정의된다. 본 연구에서는 Tripolyphosphate (TPP)의 농도가 키토산과의 가교결합을 통하여 제조되는 Chitosan nanoparticles (CNPs)의 크기에 미치는 영향을 측정하여 TPP의 농도가 낮을수록 작은 크기의 입자가 형성되는 것을 확인하였다. 그리고 산화철(Fe_3O_4)의 양에 따른 CNPs- Fe_3O_4 의 특성을 측정하여 Fe_3O_4 의 양이 많을수록 자성 약물 전달체로서의 특성이 잘 나타남을 확인하였다. 닐히드린 반응(Ninhydrin test)를 통하여 저농도 구간(0.004~0.02 wt%)에서는 $Y = 0.00373 \exp(179.729X) - 0.0114$ ($R^2 = 0.989$), 고농도 구간(0.02~0.1 wt%)에서는 $Y = 21.680X - 0.290$ ($R^2 = 0.999$)의 γ -aminobutyric acid (GABA)의 농도에 따른 검량선을 얻었다. 이 검량선을 사용하여 흡수를 위하여 넣어주는 GABA의 양에 따른 최대 흡수율의 관계식 $Y = -136.527 \exp[(-90.0862)X] + 64.724$ ($R^2 = 0.997$)을 얻었으며, 초기에 넣어주는 GABA의 양이 약 0.04 g인 지점부터는 약 62.5%로 흡수율이 일정해 지고, 시간에 따른 GABA- Fe_3O_4 -CNPs로부터 방출되는 GABA의 양을 측정하여 약 24 hr 이후부터 약물 방출이 종료되는 것을 확인하였다. 또한 최적의 조건에서 만들어진 GABA- Fe_3O_4 -CNPs는 약 150 nm의 구형 입자이며, 그에 따른 입자의 특성이 잘 나타나는 것을 확인하여 약물 전달체로서 적합함을 알 수 있었다.

Abstract – The Drug Delivery System (DDS) is defined as a technology for designing existing or new drug formulations and optimizing drug treatment. DDS is designed to efficiently deliver drugs for the care of diseases, minimize the side effects of drug, and maximize drug efficacy. In this study, the optimization of tripolyphosphate (TPP) concentration on the size of Chitosan nanoparticles (CNPs) produced by crosslinking with chitosan was measured. In addition, the characteristics of Fe_3O_4 -CNPs according to the amount of iron oxide (Fe_3O_4) were measured, and it was confirmed that the higher the amount of Fe_3O_4 , the better the characteristics as a magnetic drug carrier were displayed. Through the ninhydrin reaction, a calibration curve was obtained according to the concentration of γ -aminobutyric acid (GABA) of $Y = 0.00373 \exp(179.729X) - 0.0114$ ($R^2 = 0.989$) in the low concentration (0.004 to 0.02 wt%) and $Y = 21.680X - 0.290$ ($R^2 = 0.999$) in the high concentration (0.02 to 0.1 wt%). Absorption was constant at about 62.5% above 0.04 g of initial GABA. In addition, the amount of GABA released from GABA- Fe_3O_4 -CNPs over time was measured to confirm that drug release was terminated after about 24 hr. Finally, GABA- Fe_3O_4 -CNPs performed under the optimal conditions were spherical particles of about 150 nm, and it was confirmed that the properties of the particles appear well, indicating that GABA- Fe_3O_4 -CNPs were suitable as drug carriers.

Key words: Drug delivery system, Chitosan nanoparticles, Fe_3O_4 , GABA

[†]To whom correspondence should be addressed.

E-mail: ijkang@gachon.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

1. 서 론

일반적인 약물 전달은 경구 혹은 정맥주사 등을 통하여 이루어지며, 그로 인해 약물의 표적부위까지 도달하는 시간이 길고 그 과정에서 손실되는 약물이 많았다. 또한 약물 농도가 정상 범위 이상으로 높아지거나 낮아짐을 반복하게 되어 혈중 약물 농도가 일정하게 유지되지 않아서 약물의 지속적인 투여가 필요하게 되는 등 여러 문제점이 발생하였다. 이러한 문제점을 보완하기 위한 여러 의학 및 의약관련 연구가 진행되었으며, 그 중 DDS란 기존 약물의 부작용을 줄이고 약물을 원하는 부위에 효과적으로 전달하도록 제형을 설계하는 기술이다[1-5]. 대부분의 약물 전달 시스템은 PZT, 실리콘, 고분자 등의 재료가 사용되며 대부분은 약물의 방출 종료 후 따로 제거가 되어야 한다. 이러한 불편을 해소하기 위하여 생분해성 고분자인 Chitosan을 사용하였다[6-10].

게나 새우 등의 갑각류에서 얻을 수 있는 키틴(Chitin)의 N-아세틸기를 탈아세트화 시켜서 만든 키토산(Chitosan)은 천연 고분자로서 독성이 적고, 생분해성의 특성을 지니고 있으며 항생능력 및 뛰어난 생체 적합성으로 인하여 다양한 바이오 분야의 연구에 적용되고 있다. Chitosan은 용매에 대한 용해성이 좋아 성분의 변형이 용이하고, 강한 흡착력을 가지고 있으므로 약물, 금속 및 특성의 나노입자 등을 쉽게 흡수담지시킬 수 있다[11-14]. Chitosan의 말단기에 존재하는 아민기(-NH₂)로 인해 여러 물질을 쉽게 도입시킬 수 있으며, 양전하를 띄어서 음전하를 띄는 TPP와 반응시키면 가교결합을 통하여 CNPs를 만들 수 있다. 위의 특성들 때문에 Chitosan은 약물과 복합체를 이루며 약물을 잘 보호하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. Chitosan의 아민기(-NH₂)는 산성 조건인 pKa ≤ 6.5에서 활성화된다고 알려져 있다[15-18].

우수한 생체 적합성 및 항균성으로 인하여 생체 고분자의 기계적 특성과 항균성을 향상시킬 수 있는 Fe₃O₄는 저렴하면서 자원이 풍부한 친환경적 나노입자로 많이 쓰이고, 다른 금속보다 안정하고 독성성분을 거의 가지고 있지 않아 표적 약물 전달체 및 조직 공학과 같은 다양한 생의학 분야에서 사용되고 있다[19-21]. 초상자성 입자의 특성을 지니는 Fe₃O₄는 자기장이 없을 때는 자성을 띄지 않지만, 자기장이 존재하면 강한 자성을 나타내어 뛰어난 자기 특성을 나타낸다. Fe₃O₄를 약물 전달체에 도입하면 약물 전달체가 자성을 띄게 되어, 표적 위치로 약물을 쉽게 전달 할 수 있다[22].

GABA는 포유류의 뇌 속에서 글루탐산으로부터 글루탐산 탈탄소효소(GAD, glutamic acid decarboxylase)에 의해 만들어지는 특이한 아미노산으로, 중추신경계에 존재하여 신경세포의 흥분을 억제하는 신경 전달 물질로 알려져 있다. GABA는 미생물부터 고등생물까지 자연에 널리 존재하는 비단백질 구성 아미노산으로, 사람의 신체 내에서는 신경체계, 혈액내에 함유되어 있고 많은량이 골수내에 존재하여 아세틸콜린이라는 신경 전달 물질의 농도를 증가시켜 뇌기능을 향상시키고, 혈압상승, 당뇨 증가 등의 생활습관으로 부터 발생하는 질병을 예방하거나 개선하고, 불면증세, 우울증세 등으로부터의 심신 안정을 가져다 주는 작용과 비만을 억제하는 효과 등의 여러 방면에서 도움을 주는 기능성 성분이다. GAD에 의해 억제되는 신경 전달 물질인 GABA와 흥분성 신경 전달 물질인 글루탐산의 농도가 조절된다. 건강한 인간은 GABA 필요량을 모두 자체 생산하지만, 그 농도가 부족한 사람들은 외부 식품으로부터 또는 의약품으로부터 섭취해야 하며 섭취량은 하루에 약 500~3000 mg

이다[23-27].

순수한 GABA의 흡광도는 180~195 nm의 넓은 파장 범위에서 측정되어 일정하게 나타나지 않아 농도를 알기 어려워 수용액에서의 그 존재 여부를 알기 어렵다. 때문에 추가적인 과정을 통하여 그 존재 여부를 확인해야 하며, 대표적인 방법으로 아미노산의 정색반응 중의 하나인 닐히드린 반응(Ninhydrin Test)은 중성의 아미노산 시료 용액에 닐히드린 용액(물 또는 수용성 용매)을 가하고 가열해주면, 흡수파장 570 nm에서 적자색을 나타낸다. 아미노산 외에도 단백질, 아민류도 정색된다. 그러나 proline과 같은 환상 아미노산은 나타나는 색이 다르고 감도도 보다 낮게 관찰된다. 닐히드린은 아미노산의 종이 크로마토그래피, 이온 크로마토그래피의 검출 시약으로서 중요하며, 아미노산의 자동분석계용으로 조제된 시약도 있다. 닐히드린과 아민 화합물이 반응하여 케티민이 생성되며, 케티민에서 탈탄산이 일어나면서 알데히드가 생성되고, 알데히드가 유리되면서 아민이 생성된다. 아민은 또 다른 닐히드린 분자 하나와 반응하여 루만자색(Ruhemann's purple)을 생성하며 아미노산의 정색반응이 일어난다[28,29].

본 연구에서는 TPP의 농도가 Chitosan과 TPP의 가교결합을 통하여 제조되는 CNPs의 크기에 미치는 영향을 측정하였다. 그리고 Fe₃O₄의 양을 변화시키며 CNPs-Fe₃O₄의 특성을 측정하여 Fe₃O₄의 양에 따른 입자의 특성을 확인하였다. 약물의 흡수를 위하여 초기에 넣어주는 GABA의 양을 변화시키며 흡수율을 측정하고, 그에 따라 방출되는 GABA의 양을 측정하여 GABA-Fe₃O₄-CNPs의 약물 전달체로써 적합했음을 알 수 있었다.

2. 실 험

2-1. 재료 및 장치

본 실험에서 사용된 Sodium Tripolyphosphate, γ -aminobutyric acid, Iron (II, III) oxide는 시그마-알드리지사(USA)에서 구입하였고, HPLC Water, 99.9% Ethyl alcohol, Sodium hydroxide는 Duksan사(Korea)에서 구입하였고, Glacial acetic acid, Sodium acetate anhydrous, Hydrochloric acid는 Daejung (Korea)의 제품을 사용하였다. PBS (Phosphate Buffered Saline)은 Welgene (Korea)의 제품을 사용하였고, Ninhydrin (Triketohydrindene Hydrate)은 Wako (Japan)의 제품을 사용하였다. 구입한 시약들은 추가 정제 과정 없이 사용하였다.

실험 진행중의 변화되는 수소이온농도를 측정하기 위하여 pH meter (Thermo, USA), 제조된 입자의 크기를 분석하기 위하여 Dynamic Light Scattering (BI-9000AT, Brookhaven, USA), 형태 및 성분 분석을 위하여 Scanning Electron Microscope-Energy Dispersive Spectrometer (S-4700, Hitachi's, Japan)를 사용하였다. 관능기의 존재여부를 확인하기 위하여 Fourier Transform Infrared Spectroscopy (Vertex70, Bruker, German), 열에 의한 입자들의 변화 및 분해 온도 관찰을 위하여 Thermogravimetric Analysis-Differential Scanning Calorimeter (SDT-Q600, TA instrument, USA), 결정구조 분석을 위하여 X-ray Diffraction (D/Max-2200, Rigaku, USA), 자성 분석을 위하여 Vibrating-sample magnetometer (VSM 7404, LakeShore, USA)를 사용하였다. Ninhydrin test 후 흡광도 측정을 위하여 Ultraviolet-Visible Spectroscopy (HP 8453, Agilent Technologies, USA)를 사용하였다.

2-2. 실험방법

2-2-1. CNPs의 제조

Chitosan powder 0.06 g을 50 ml vial에 넣은 후, Acetic acid 30 μ l, HPLC water 29.91 ml를 넣고 1시간 동안 60 $^{\circ}$ C에서 교반한다. 그 후 농도가 다른 TPP 수용액(0.1~0.5 wt%) 20 ml를 뷰렛을 이용하여 일정한 속도로 떨어뜨리고 1시간 동안 추가로 교반한다. 5500 rpm, 20 $^{\circ}$ C에서 20분 간 원심분리하여 상등액을 분리해 준 후, HPLC water 29.91 ml에 고르게 분산시키면 CNPs를 얻을 수 있다.

2-2-2. Fe_3O_4 -CNPs의 제조

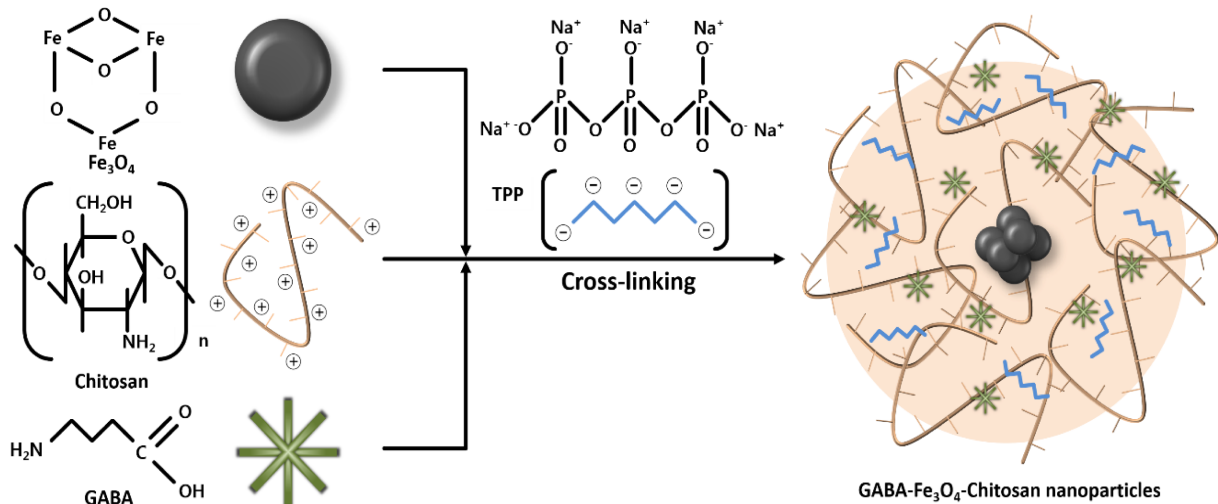
Chitosan powder 0.06 g을 50 ml vial에 넣은 후 Fe_3O_4 powder (0.001~0.005 g)와 HPLC water 200 μ l를 넣고 잘 섞어준 후 냉장고에서 1시간동안 안정화를 위하여 보관한다. 그 후 Acetic acid 30 μ l, HPLC water 29.91 ml를 넣고 1시간동안 60 $^{\circ}$ C에서 교반한다. 0.1 wt% TPP 수용액 20 ml를 뷰렛을 이용하여 일정한 속도로 떨어뜨리고 1시간 동안 추가로 교반한다. 5500 rpm, 20 $^{\circ}$ C에서 20분 간 원심분리하여 상등액을 분리해 준 후, HPLC water 29.91 ml에 고르게 분산시키면 Fe_3O_4 -CNPs를 얻을 수 있다[30,31].

2-2-3. GABA- Fe_3O_4 -Chitosan nanoparticles 제조

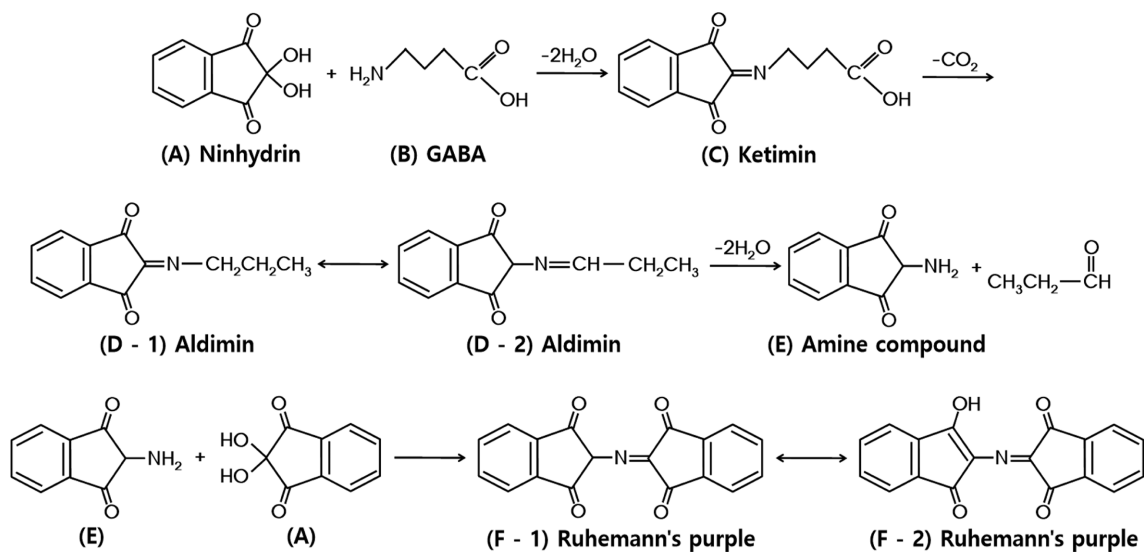
Chitosan powder 0.06 g을 50 ml vial에 넣은 후 Fe_3O_4 powder 0.005 g과 농도가 다른 GABA 수용액 200 μ l (0.01~0.05 g GABA / 200 μ l solution)을 넣고 잘 섞어준 후 냉장고에서 1시간동안 안정화를 위하여 보관한다. 그 후 Acetic acid 30 μ l, HPLC water 29.91 ml를 넣고 1시간동안 60 $^{\circ}$ C에서 교반한다. 0.1 wt% TPP 수용액 20 ml를 뷰렛을 이용하여 일정한 속도로 떨어뜨리고 1시간 동안 추가로 교반한다. 5500 rpm, 20 $^{\circ}$ C에서 20분간 원심분리하여 상등액을 분리해 준 후, HPLC water 29.91 ml에 고르게 분산시키면 GABA- Fe_3O_4 -CNPs를 얻을 수 있다.

2-2-4. Ninhydrin test

10 ml vial에 농도가 다른 GABA 수용액(0.004~0.1wt%) 1 ml와 pH 7의 0.2 M Acetate buffer 3 ml를 1분간 교반시켜준 뒤, 0.5 wt% Ninhydrin solution 1ml를 첨가하여 1분간 교반시킨다. 그 후, 95 $^{\circ}$ C에서 15분간 물 증발을 해주면 루만자색(Ruhemann's purple)으로 정색 반응이 일어나며, 상온에서 식혀준 뒤 흡광도를 측정하여 GABA 수용액의 농도에 따른 검량선을 작성한다.



Scheme 1. Synthetic procedures of GABA- Fe_3O_4 -CNPs prepared by crosslinking.



Scheme 2. Ninhydrin test mechanism of GABA.

GABA-Fe₃O₄-CNPs 제조 시 원심분리를 통해 분리한 상등액을 사용하여 위와 같은 방법으로 Ninhydrin test를 진행한다. 흡광도를 측정한 뒤, 검량선을 사용하여 Chitosan에 흡수된 GABA의 양과 그에 따른 흡수율을 계산한다.

GABA-Fe₃O₄-CNPs 제조 시 원심분리를 통해 분리한 나노입자를 HPLC water 대신에 PBS (Phosphate Buffered Saline)에 고르게 분산시킨 뒤 35 °C에서 교반을 하며, 일정 시간 간격마다 용액을 1 ml씩 분리하여 Ninhydrin test를 진행한다. 흡광도를 측정한 뒤, 검량선을 사용하여 GABA-Fe₃O₄-CNPs에서 방출된 GABA의 양과 그에 따른 방출율을 계산한다.

3. 결과 및 고찰

Fig. 1은 TPP 수용액의 농도를 0.1 wt%부터 0.5 wt%까지 변화시켰을 때 제조되는 CNPs의 입자 크기를 DLS로 측정한 결과이다. TPP 수용액의 농도가 증가할수록 큰 크기의 CNPs가 형성되는 것을 알 수 있다. 일반적으로 약물 전달체는 200 nm 이하의 입자를 주로 사용하며, 0.1 wt% TPP 수용액을 사용했을 때 제조된 입자 크기는 164.9 nm로 약물 전달체로 적합한 것을 확인하였다. 추후 실험에서는 0.1 wt%의 TPP solution을 사용하여 나노입자를 제조하였다.

Fig. 2는 CNPs, Pure Fe₃O₄, Fe₃O₄-CNPs, GABA-Fe₃O₄-CNPs의 모양과 크기 및 원소의 조성을 SEM과 EDX를 통하여 측정한 결과

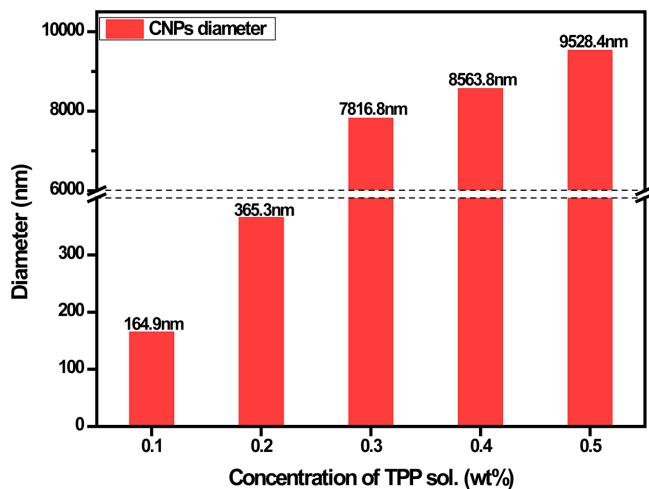


Fig. 1. Diameter distribution of CNPs for the different concentration of TPP.

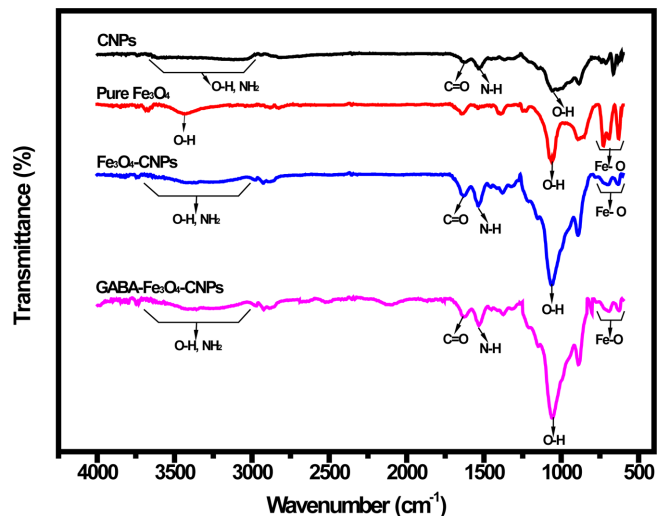


Fig. 3. FT-IR spectra of CNPs, Pure Fe₃O₄, Fe₃O₄-CNPs, GABA-Fe₃O₄-CNPs.

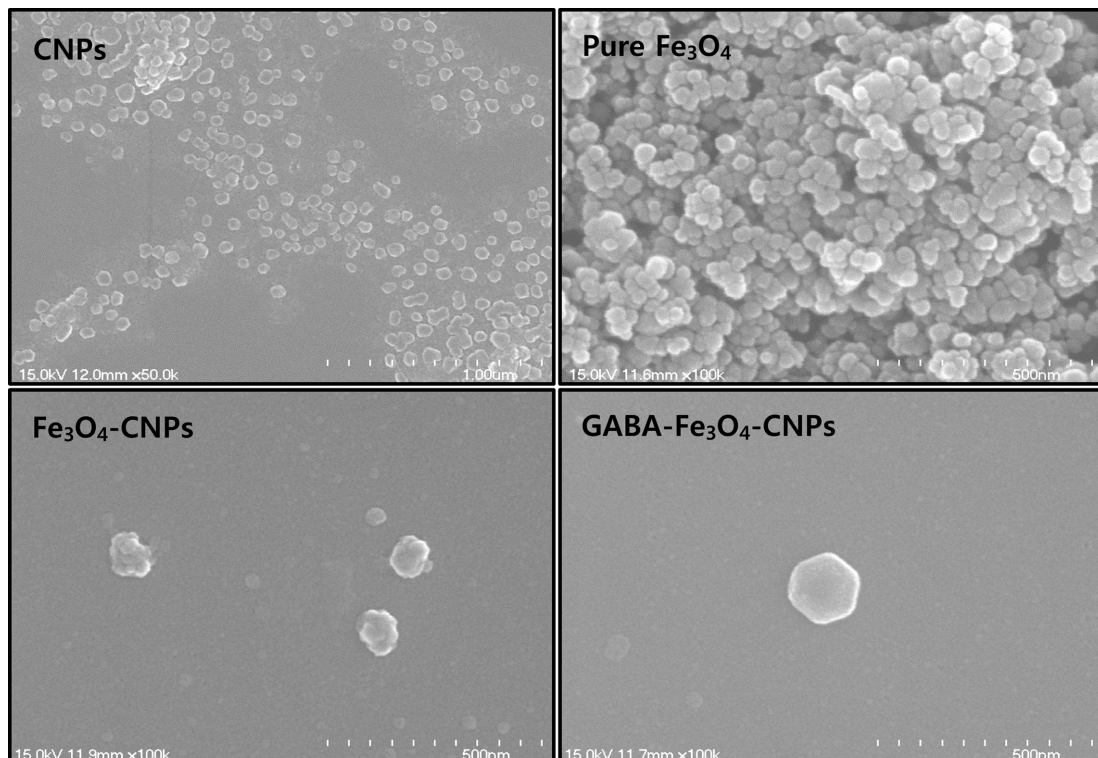


Fig. 2. SEM images of CNPs, Pure Fe₃O₄, Fe₃O₄-CNPs, GABA-Fe₃O₄-CNPs.

이다. CNPs는 약 100 nm의 구형이며 성분 분석에서 Chitosan과 TPP의 원소인 C와 O, P가 측정되었고, Pure Fe_3O_4 는 50 nm의 구형으로 Fe와 O가 측정되었다. Fe_3O_4 -CNPs와 GABA- Fe_3O_4 -CNPs는 약 120 nm의 구형으로 CNPs의 성분 원소와 함께 Fe_3O_4 의 원소인 Fe도 같이 측정된 것으로 보아, Fe_3O_4 가 Chitosan과 결합이 잘 이루어졌고, Chitosan에 결합하는 성분이 많아질수록 입자의 크기가 커지는 것을 알 수 있다. SEM 측정 시 액화 질소를 사용하므로 EDX에서 N의 조성이 크게 측정되기 때문에 결과에서 N을 배제하였다. GABA는 C, H, O, N으로 이루어져 있지만, EDX 결과에서는 N의 조성이 배제되어 있기 때문에 GABA의 결합 여부는 판단하지 못하였다.

Fig. 3은 CNPs, Pure Fe_3O_4 , Fe_3O_4 -CNPs, GABA- Fe_3O_4 -CNPs의 관능기 변화를 IR spectroscopy를 이용하여 측정한 결과를 나타낸다. CNPs 그래프에서 $3600\sim 3200\text{ cm}^{-1}$ 와 1525 cm^{-1} 파장은 Chitosan의 작용기인 O-H와 NH_2 를 나타내고, Pure Fe_3O_4 그래프에서 $750\sim 600\text{ cm}^{-1}$ 파장은 Fe-O를 나타내는 특징적인 파장이다. Fe_3O_4 -CNPs와 GABA- Fe_3O_4 -CNPs 그래프에서 Chitosan의 특징적인 파장인 $3600\sim 3200\text{ cm}^{-1}$, 1525 cm^{-1} 와 Fe_3O_4 의 특징적인 파장인 $750\sim 600\text{ cm}^{-1}$ 가 함께 측정된 것으로 보아, Fe_3O_4 가 Chitosan과 결합이 잘 이루어진 것을 알 수 있다. 하지만 GABA의 작용기는 Chitosan의 작용기와 동일하거나 비슷하기 때문에 FT-IR 결과에서 GABA의 결합 여부는 판단하지 못하였다.

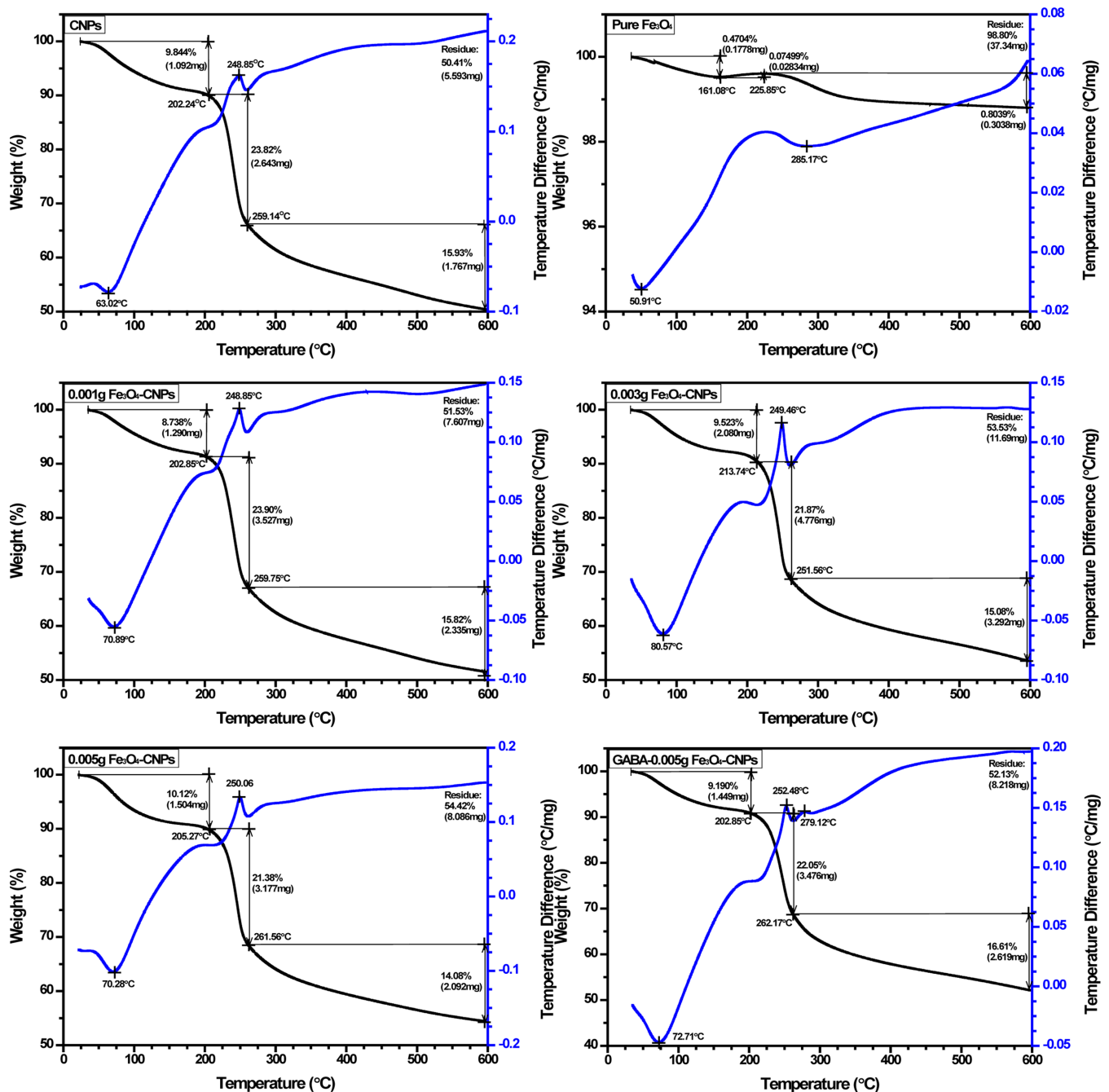


Fig. 4. TGA curves of CNPs, Pure Fe_3O_4 , Fe_3O_4 -CNPs with different amount of Fe_3O_4 , GABA-0.005 g Fe_3O_4 -CNPs.

Fig. 4는 CNPs, Pure Fe_3O_4 , Fe_3O_4 -CNPs, GABA- Fe_3O_4 -CNPs의 온도에 따른 무게 변화를 TGA로 측정한 결과로, 검은색 그래프의 변곡점은 입자가 분해되는 온도를 의미하며 파란색 그래프는 그에 따른 온도 변화를 의미한다. CNPs의 열 분해 온도는 248.85°C 이며 초기 무게의 50.41%가 잔류물로 남았고, Pure Fe_3O_4 는 열에 의하여 분해가 잘 일어나지 않으며 입자 안에 포함된 소량의 수분만이 제거된 것을 초기 무게의 98.80%가 잔유물로 남은 것으로 알 수 있다. Fe_3O_4 -CNPs는 결합되는 Fe_3O_4 의 양이 0.001 g, 0.003 g, 0.005 g으로 변화함에 따라 열 분해 온도는 각각 248.85°C , 249.46°C , 250.06°C , 잔유물은 각각 51.53%, 53.53%, 54.42%로 점차 증가하는 것을 확인할 수 있다. GABA- Fe_3O_4 -CNPs의 열 분해 온도는 252.48°C 로 결합하는 성분이 많아질수록 열에 대한 안정성이 높아지며, 잔유물은 52.13%로 열에 의해 분해가 잘 일어나는 GABA에 의해 0.005 g Fe_3O_4 -CNPs 보다 적은 것을 알 수 있다.

Fig. 5는 CNPs, Pure Fe_3O_4 , Fe_3O_4 -CNPs, GABA- Fe_3O_4 -CNPs의 결정 구조를 XRD로 측정한 결과이다. CNPs는 무정형 입자이기 때문에 특정한 피크가 나타나지 않았으며, Pure Fe_3O_4 는 (220),

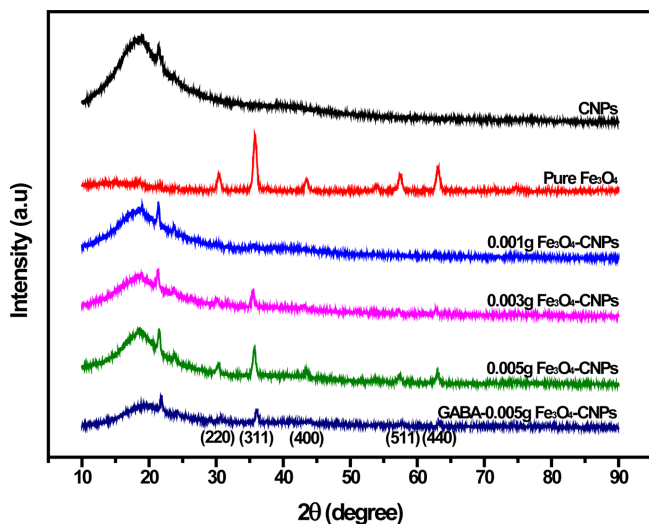


Fig. 5. XRD patterns of CNPs, Pure Fe_3O_4 , Fe_3O_4 -CNPs with different amount of Fe_3O_4 , GABA-0.005 g Fe_3O_4 -CNPs.

(311), (400), (511), (440)에서 특정 피크가 나타나는 것을 알 수 있다. Fe_3O_4 -CNPs의 경우 Fe_3O_4 의 양을 0.001 g, 0.003 g, 0.005 g으로 변화 시 제조되는 Fe_3O_4 -CNPs의 결정 구조를 비교하였을 때, Fe_3O_4 의 특징적인 피크가 관찰되며 Fe_3O_4 의 양이 많을수록 피크의 높이가 커지는 것으로 보아 Fe_3O_4 와 Chitosan의 결합이 잘 이루어진 Fe_3O_4 -CNPs가 제조되었고, 결합하는 Fe_3O_4 의 양이 증가할수록 그 특성이 잘 나타나는 것을 확인하였다. GABA- Fe_3O_4 -CNPs에서도 Fe_3O_4 의 특징적인 피크가 관찰되었지만, 0.005 g Fe_3O_4 -CNPs 보다 피크의 높이가 낮아진 것으로 보아, Fe_3O_4 가 Chitosan과 결합이 잘 이루어졌지만 GABA의 결합으로 인하여 입자의 결정 구조에 영향을 미친 것을 알 수 있다.

Fig. 6은 Pure Fe_3O_4 , Fe_3O_4 -CNPs, GABA- Fe_3O_4 -CNPs의 자화값을 VSM으로 측정한 결과로, -16 kG에서 +16 kG의 외부 자기장 하에서 측정을 실시하였다. Pure Fe_3O_4 의 최대 자화값은 +16 kG에서 10 emu/g으로 측정되었다. Fe_3O_4 -CNPs의 경우 Fe_3O_4 의 양을 0.001 g, 0.003 g, 0.005 g으로 변화 시 제조되는 자화값을 비교하였을 때, Pure Fe_3O_4 에 비하여 작은 자화값을 가지지만 Fe_3O_4 의 양이 많을수록 Fe_3O_4 -CNPs의 자화값이 각각 약 1.5 emu/g, 3.0

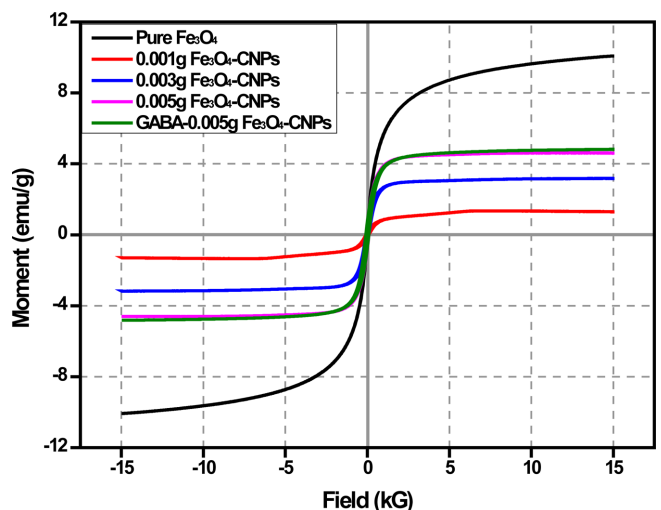


Fig. 6. VSM magnetization curves of Pure Fe_3O_4 , Fe_3O_4 -CNPs with different amount of Fe_3O_4 , GABA-0.005 g Fe_3O_4 -CNPs.

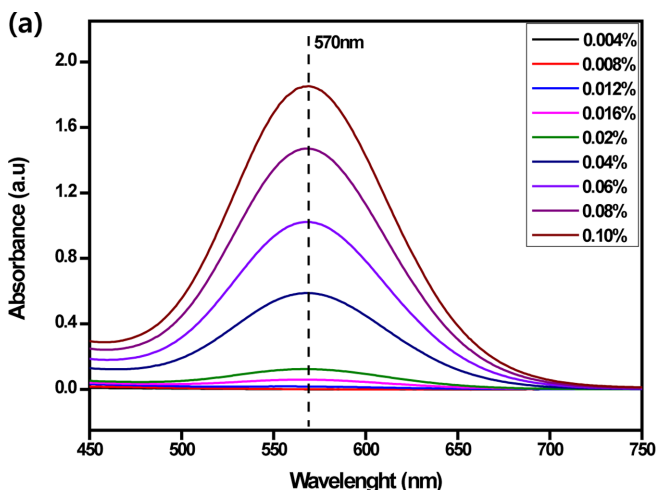


Fig. 7. (a) UV-vis spectra of ninhydrin test with different GABA concentrations, (b) function of GABA concentrations at 570 nm.

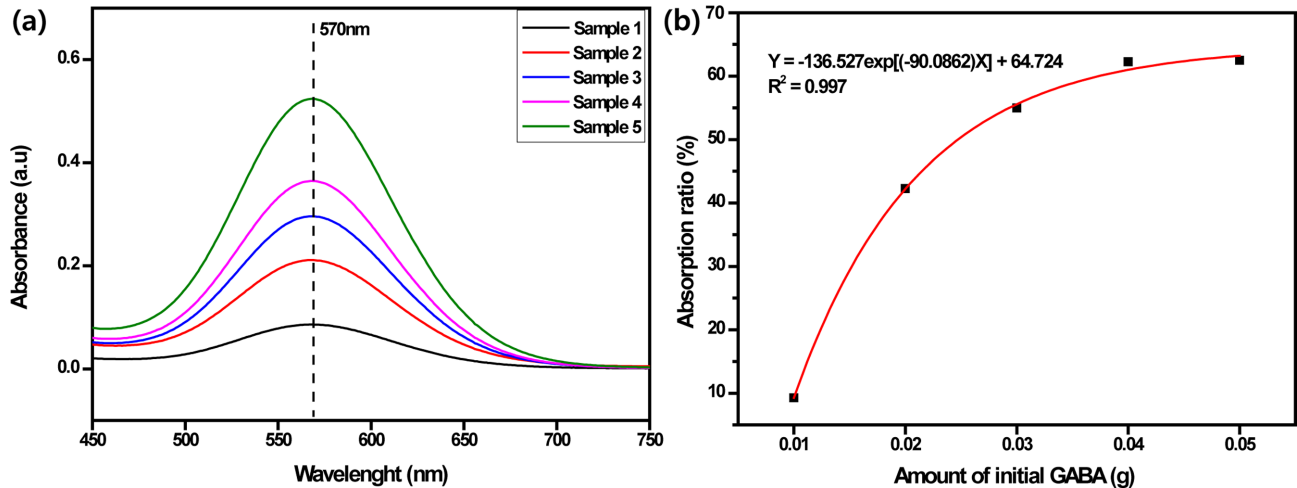


Fig. 8. UV spectra of ninhydrin test of GABA release.

Table 1. EDX analysis of CNPs, Pure Fe₃O₄, Fe₃O₄-CNPs, GABA-Fe₃O₄-CNPs

		C K	O K	P K	Fe K	Totals
CNPs	Weight (%)	35.48	56.87	7.65	-	100.00
	Atomic (%)	43.72	52.62	3.66	-	-
Pure Fe ₃ O ₄	Weight (%)	-	60.76	-	39.24	100.00
	Atomic (%)	-	84.39	-	15.61	-
Fe ₃ O ₄ -CNPs	Weight (%)	29.97	62.71	7.00	0.31	100.00
	Atomic (%)	37.54	58.97	3.40	0.08	-
GABA-Fe ₃ O ₄ -CNPs	Weight (%)	22.66	71.21	5.82	0.31	100.00
	Atomic (%)	28.79	68.29	2.84	0.08	-

emu/g, 4.5 emu/g로 일정하게 커지는 것으로 보아 Chitosan이 Fe₃O₄의 자기 밀도에 영향을 미치지만 Fe₃O₄와 Chitosan의 결합이 잘 이루어진 Fe₃O₄-CNPs가 제조되었고 결합하는 Fe₃O₄의 양이 증가할수록 입자의 자성이 강해지는 것을 알 수 있다. GABA-0.005 g Fe₃O₄-CNPs의 자화 값은 0.005 g Fe₃O₄-CNPs와 비슷하게 측정된 것으로 보아 GABA의 존재는 나노입자의 자화 값에 영향이 거의 없다는 것을 알 수 있다. 또한 모든 입자에서 자기장을 가해주면 자화 값을 가지지만 자기장을 제거하면 자화 값이 '0'이 되는 초상자성 거동을 보이는 것을 확인했다.

Fig. 7은 GABA 수용액의 농도와 Ninhydrin test 후 흡광도의 관계식으로, Ninhydrin test를 거친 GABA는 570 nm에서 최대 흡수 파장을 나타내었으며 농도 변화에 따른 일정한 흡광도 변화를 확인하였다. 0.004~0.02 wt%의 저농도 구간에서는 $Y = 0.00373 \exp(179.729X) - 0.0114$ ($R^2 = 0.989$), 0.02~0.1 wt%의 고농도 구간에서는 $Y = 21.680X - 0.290$ ($R^2 = 0.999$)의 GABA의 농도에 따른 검량선을 얻었다.

Fig. 8은 초기에 흡수시키기 위하여 넣어주는 GABA의 양이 0.01~0.05 g로 변환에 따라 GABA-Fe₃O₄-CNPs 제조 시 원심분리하여 얻은 상등액의 Ninhydrin Test 결과이다. 이는 나노입자에 흡수되지 못하고 상등액에 존재하는 GABA의 양을 의미하고, 최종적으로는 Fig. 7의 검량선을 사용하여 나노입자에 흡수된 GABA의 양과 그 때의 흡수율을 Table 1에 나타내었다. 초기 GABA 양과 그에 따른 흡수율의 관계식 $Y = -136.527 \exp[(-90.0862)X] + 64.724$ ($R^2 = 0.997$)를 얻었으며, 0.05 g 이후부터는 초기 GABA 양에 대

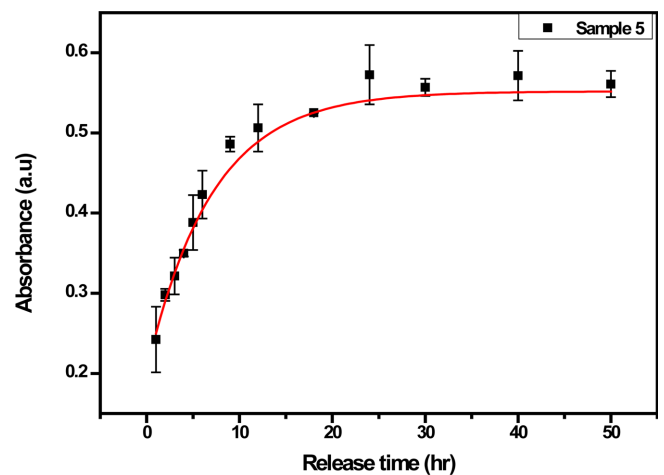


Fig. 9. (a) UV-vis spectra of ninhydrin test of supernatant after GABA absorption with different amount of initial GABA, (b) absorption ratio depending on amount of initial GABA.

한 흡수율이 약 62.48%로 일정해 지는 것을 확인할 수 있다.

Fig. 9는 Table 2의 결과로부터 흡수율이 일정해지는 Sample 5의 GABA-Fe₃O₄-CNPs를 pH 7.4의 PBS 29.94 ml에 고르게 분산시킨 뒤 35 °C에서 교반을 하며, 일정 시간 마다 용액을 1 ml씩 분리하여 Ninhydrin Test 후, 570 nm 파장에서의 흡광도 변화를 나타낸 결과이다. 24 hrs 이후부터 흡광도 변화가 거의 없는 것으로 보아 키토산 나노입자로부터의 GABA의 방출이 종료된 것을 알 수 있

Table 2. Adsorption ratio depending on amount of initial GABA

Sample	1	2	3	4	5
Initial GABA (g/200 ul)	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05
Ninhydrin absorbance of supernatant (a.u)	0.085883	0.21076	0.29582	0.36424	0.5235
X (wt%)	0.018145	0.023098	0.027021	0.030177	0.037523
GABA in supernatant (g/50 ml)	0.009073	0.011549	0.013511	0.015089	0.018762
Adsorbed GABA (g)	0.000927	0.008451	0.016489	0.024911	0.031238
Adsorption rate (%)	9.27	42.26	54.96	62.28	62.48

Table 3. Release ratio of GABA at 24 hr

Adsorbed GABA (g)	0.031238
Absorbance at 24 hr (a.u)	0.57265
X (wt%)	0.03979
GABA in PBS buffer (g/30 ml)	0.011937
Release rate (%)	38.21%

며, Fig. 7의 검량선을 사용하여 이 때의 방출율을 Table 3에 나타내었다. 24 hr에서 방출된 GABA의 양은 약 0.01194 g이며 흡수된 GABA의 양에 대하여 방출율이 38.21%인 것을 확인할 수 있다.

4. 결 론

본 연구에서는 Chitosan nanoparticles(CNPs)를 제조하여 자성을 띄게 하는 Fe_3O_4 와의 결합을 통해 약물을 표적 위치로 운반할 수 있는 Fe_3O_4 -CNPs를 제조하였다. 또한 GABA- Fe_3O_4 -CNPs를 제조하였을 때, 입자 안에 흡수되어 있는 GABA의 양과 그 입자로부터 GABA가 방출되는 정도를 측정하여 GABA- Fe_3O_4 -CNPs가 약물 전달체로써 적합한지를 확인해보았다.

CNPs 제조 시 DLS를 이용하여 측정한 입자 크기는 164.9 nm로써 인체에 충분히 흡수 가능한 약물 전달체가 제조된 것을 확인하였다. Fe_3O_4 -CNPs 제조 후 Fe_3O_4 와 Chitosan의 결합 여부를 확인하기 위해 XRD, VSM, TGA로 측정하여 Fe_3O_4 와 Chitosan의 결합이 잘 이루어졌고, 결합하는 Fe_3O_4 의 양이 증가할수록 입자의 자성 및 열 안정성이 증가하는 것을 확인하였다. 또한, GABA- Fe_3O_4 -CNPs를 제조하여 GABA가 입자에 흡수 및 방출되는 정도를 측정한 결과 초기 GABA의 양이 증가함에 따라 흡수율이 높아지며, 0.05 g의 초기 GABA를 사용하였을 때 흡수율은 약 62.5%이며, 방출 시작 24 hr 이후부터 흡광도의 변화가 거의 없는 것으로 보아 방출이 종료되었으며 흡수된 GABA 양의 38.2%가 방출된 것을 확인하였다.

감 사

본 연구는 가천대학교의 연구비지원으로 수행하였습니다.

References

- Han, T. H. and Lee, H. H., "Gojani, A. B. and Yoh, J. I., "New Drug Delivery System Based on a Laser-Induced Shockwave," *Transactions of the Korean Society of Mechanical Engineers B*, **34**, 67-71(2010).
- Singh, R. and Lillard, J. W., "Nanoparticle-based Targeted Drug Delivery," *Exp Mol Pathol.*, **86**, 215-223(2009).
- Chu, W. S., Kim, S. G., and Ahn, S. H., "Micro/Nano Fabrication Technique in Drug Delivery System (DDS)," *Journal of the Korean Society for Precision Engineering*, **23**, 125-131(2006).
- Allen, T. M. and Cullis, P. R., "Drug Delivery Systems: Entering the Mainstream," *Science*, **303**, 1818-1822(2004).
- Brocchini, S. and James, K., "Structure-property Correlations in a Combinatorial Library of Degradable Biomaterials," *Journal of Biomedical Materials Research*, **42**, 66-75(1998).
- Ahmed, A., Bonner, C. and Desai, T. A., "Bioadhesive Microdevices with Multiple Reservoirs: a New Platform for Oral Drug Delivery," *Journal of Controlled Release*, **81**, 291-306(2002).
- Santini, J. J. T., Richards, A. C., and Scheidt, R., "Microchips as Controlled Drug-Delivery Devices," *Angewandte Chemie International Edition*, **39**, 2396-2407(2000).
- Desai, T., Hwa Chu, W., Hayek, A. and Ferrari, M., "Microfabricated Immunoisolating Biocapsules," *Biotechnology and Bioengineering*, **57**, 118-120(1998).
- Reed, M. L., Wu, C., Kneller, J. and Watkins, S., "Micromechanical Devices for Intravascular Drug Delivery," *J. Pharm. Sci.*, **87**, 1387-1394(1998).
- James, L. W., Amit, K., Hans, A. B., Enoch, K. and George, M. W., "Microcontact Printing of Self-assembled Monolayers: Applications in Microfabrication," *Nanotechnology*, **7**, 452(1996).
- Lim, J. W. and Kang, I. J., "Chitosan-gold Nano Composite for Dopamine Analysis using Raman Scattering," *Bulletin of the Korean Chemical Society*, **34**, 237-242(2013).
- Dash, M., Chiellini, F., Ottenbrite, R. M. and Chiellini, E., "Chitosan—A Versatile Semi-synthetic Polymer in Biomedical Applications," *Progress in Polymer Science*, **36**, 981-1014(2011).
- Chen, L. and Subirade, M., "Chitosan/beta-lactoglobulin Core-shell Nanoparticles as Nutraceutical Carriers," *Biomaterials*, **26**, 6041-6053(2005).
- Finch, C. A., "Advances in Chitin and Chitosan," *Polymer International*, **31**, 401-404(1993).
- Kim, B. G. and Kang, I. J., "Evaluation of the Effects of Biodegradable Nanoparticles on a Vaccine Delivery System Using AFM, SEM, and TEM," *Ultramicroscopy*, **108**, 1168-1173(2008).
- Pusateri, A. E., McCarthy, S. J., Gregory, K. W., Harris, R. A., Cardenas, L., Mcmanus, A. T. and Goodwin, C. W., "Effect of a Chitosan-based Hemostatic Dressing on Blood Loss and Survival in a Model of Severe Venous Hemorrhage and Hepatic Injury in Swine," *J. Trauma*, **54**, 177-182(2003).
- Ilium, L., "Chitosan and Its Use as a Pharmaceutical Excipient," *Pharmaceutical Research*, **15**, 1326-1331(1998).
- Dodane, V. and Vilivalam, V. D., "Pharmaceutical Applications

- of Chitosan," *Pharmaceutical Science & Technology Today*, **1**, 246-253(1998).
19. Das, B., Mandal, M., Upadhyay, A., Chattopadhyay, P. and Karak, N., "Bio-based Hyperbranched Polyurethane/Fe₃O₄ Nanocomposites: Smart Antibacterial Biomaterials for Biomedical Devices and Implants," *Biomed Mater.*, **8**, 35-53(2013).
 20. Gong, T., Li, W., Chen, H., Wang, L., Shao, S. and Zhou, S., "Remotely Actuated Shape Memory Effect of Electrospun Composite Nanofibers," *Acta Biomater.*, **8**, 1248-1259(2012).
 21. Weinstein, J. S., Varallyay, C. G., Dosa, E., Gahramanov, S., Hamilton, B., Rooney, W. D., Muldoon, L. L. and Neuwelt, E. A., "Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles: Diagnostic Magnetic Resonance Imaging and Potential Therapeutic Applications in Neurooncology and Central Nervous System Inflammatory Pathologies, a Review," *J. Cereb. Blood. Flow. Metab.*, **30**, 15-35(2010).
 22. Unsoy, G., Yalcin, S., Khodadust, R., Gunduz, G. and Gunduz, U., "Synthesis Optimization and Characterization of Chitosan-coated Iron Oxide Nanoparticles Produced for Biomedical Applications," *Journal of Nanoparticle Research*, **14**, 156-164(2012).
 23. Gironell, A., Figueiras, F. P., Pagonabarraga, J., Herance, J. R., Pascual-Sedano, B., Trampal, C. and Gispert, J. D., "Gaba and Serotonin Molecular Neuroimaging in Essential Tremor: a Clinical Correlation Study," *Parkinsonism Relat Disord.*, **18**, 876-880(2012).
 24. Buzzi, A., Chikhladze, M., Falcicchia, C., Paradiso, B., Lanza, G., Soukupova, M., Marti, M., Morari, M., Franceschetti, S. and Simonato, M., "Loss of Cortical GABA Terminals in Unverricht-Lundborg Disease," *Neurobiol Dis.*, **47**, 216-224(2012).
 25. Cho, S. C., Kim, D. H., Park, C. S., Koh, J. H., Pyun, Y. R. and Kook, M. C., "Production of GABA-rich Tomato Paste by *Lactobacillus* Sp. Fermentation," *The Korean Journal of Food And Nutrition*, **25**, 26-31(2012).
 26. Farahmandfar, M., Zarrindast, M. R., Kadivar, M., Karimian, S. M. and Naghdi, N., "The Effect of Morphine Sensitization on Extracellular Concentrations of GABA in Dorsal Hippocampus of Male Rats," *Eur. J. Pharmacol.*, **669**, 66-70(2011).
 27. Vehovszky, A., Bokisch, A. J., Krogsgaard-Larsen, P. and Walker, R. J., "Pharmacological Profile of Gamma-aminobutyric Acid (GABA) Receptors of Identified Central Neurones from *Helix Aspersa*," *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, **92**, 391-399(1989).
 28. Moore, S., "Amino Acid Analysis: Aqueous Dimethyl Sulfoxide as Solvent for the Ninhydrin Reaction," *Journal of Biological Chemistry*, **243**, 6281-6283(1968).
 29. Yemm, E. W., Cocking, E. C. and Ricketts, R. E., "The Determination of Amino-acids with Ninhydrin," *The Analyst*, **80**, 209 (1955).
 30. Lim, J. W. and Kang, I. J., "Fabrication of Chitosan-Gold Nanoshells for γ -Aminobutyric Acid Detection as a Surface-enhanced Raman Scattering Substrate," *Bulletin of the Korean Chemical Society*, **36**, 672-677(2015).
 31. Lim, J. W. and Kang, I. J., "Fabrication of Chitosan-gold Nanocomposites Combined with Optical Fiber as SERS Substrates to Detect Dopamine Molecules," *Bulletin of the Korean Chemical Society*, **35**, 25-29(2014).