

실란 기능화 양친성 고분자 전구체를 이용한 소수성 항균물질 담지 나노 입자 제조 및 항균 특성

김나혜 · 김주영[†]

강원대학교 기능소재공학과
(2017년 2월 14일 접수, 2017년 2월 27일 수정, 2017년 3월 2일 채택)

Preparation of Hydrophobic Antimicrobial Compounds Encapsulated Nanoparticles Using Alkoxysilane-functionalized Amphiphilic Polymer Precursor and Their Antimicrobial Properties

Nahae Kim, and Juyoung Kim[†]

Department of Advanced Materials Engineering, Kangwon National University, Samcheok 25931, Gangwon-do, Korea
(Received February 14, 2017; Revised February 27, 2017; Accepted March 2, 2017)

요약: 본 연구에서는 50 wt%의 매우 높은 담지량과 70%의 높은 고형분을 가지면서도 물속이나 다양한 제품에 나노 입자 형태로 분산이 가능한 새로운 형태의 소수성 항균 물질 담지 나노 입자를 제조하였다. 실란 기능화 양친성 고분자 전구체(Alkoxysilane-functionalized Amphiphilic Polymer Precursor; 이하 AAPP)와 다양한 실란 화합물을 이용하여 전형적인 Hydrolytic Sol-Gel 공정으로 제조된 수분산 유-무기 하이브리드 나노 입자들을 제조하고, 이를 이용하여서 나노 침전법을 사용하여 소수성 항균물질을 고함량으로 담지할 수 있는 새로운 공정으로 소수성 항균물질인 Eugenol이 담지된 유-무기 하이브리드 형태의 나노입자 제조하였다. 나노 입자 제조시 제조 조건의 변화에 따른 나노 입자들의 크기, 담지량, 항균 활성 및 방출거동 등에 영향을 미치는 인자들을 조사하였다. 나노 입자의 종류에 관계없이 Minimal Inhibitory Concentration (MIC)는 50 mg/ml로 동일하였고, 모든 균주에서 99 %에 해당하는 우수한 항균력과 *Pseudomonas aeruginosa* (PSE)를 제외하고는 2주 이상의 항균 지속력을 나타내었다. 특히, Tetraethoxysilane (TEOS)를 첨가한 경우에는 견고한 무기물 도메인으로 인해 가장 높은 담지량 (50 wt.%)과 서방출 (Sustained release)을 나타내었고, Hexanediol (HD)을 첨가한 경우에는 HD 자체의 항균력과 용매로서의 역할도 하였기 때문에 가장 높은 항균력과 70%의 고형분을 나타내었다.

Abstract: In this study, nanoparticles which encapsulated hydrophobic antimicrobial compounds with 50wt% of payload and 70%of solid content were prepared. These nanoparticles could be dispersed at water as well as various medium. Water dispersible organic-inorganic (O-I) hybrid nanoparticles were first prepared using alkoxysilane-functionalized amphiphilic polymer precursors through a conventional sol-gel process. Hydrophobic antimicrobial compound, Eugenol encapsulated nanoparticles were prepared using these O-I hybrid nanoparticles through a new nanoprecipitation process. The effect of various preparation on the size of nanoparticles, amount of payload, antimicrobial activity, and release rate of encapsulated compounds was investigated. All eugenol-encapsulated O-I nanoparticles regardless of preparation condition showed the same minimal inhibitory concentration (MIC) (50mg/ml) and 99% of antimicrobial activity for every strain. Their antimicrobial activity could maintain longer than two weeks. Especially, eugenol-encapsulated O-I nanoparticles prepared using tetraethoxysilane (TEOS) exhibited the highest payload (50wt%) and the lowest release rate which was owing to higher inorganic content in the O-I nanoparticles. And these O-I nanoparticles dispersed in hexanediol (HD) showed the highest antimicrobial activity and solid content (70wt%) because HD acted as a solvent as well as a antimicrobial agent.

Keywords: O-I hybrid nanoparticles, Antimicrobial compounds, Encapsulation, Sol-Gel reaction

[†] Corresponding author: Juyoung Kim (juyoungk@kangwon.ac.kr)

1. 서 론

현재, 실생활에서 유해 세균의 제거를 위해 화학 항균제 및 천연 항균제 등 여러 종류의 항균제가 사용되고 있다. 항균 물질들은 액상이나 고분자 물질에 첨가된 혼합형이었기 때문에 사용 중 항균활성이 급격히 저하되어 지속성의 문제 및 섭취나 흡입 시 구토나 복통, 토혈, 피부알레르기 반응 등 많은 부작용이 발생하고 있다[1-5]. 이에 따라 응용하기가 쉽고 사용에 편리하면서 항균 활성이 뛰어난 항균 물질의 개발이 요구되고 있는 실정이다. 미용과 화장품 산업에서 미생물의 오염을 방지하기 위해 사용되고 있는 파라벤(Paraben)류, 페녹시에탄올(Phenoxyethanol) 등과 같은 화학약품 방부제들은 독성 성분들을 띄고 있어 피부에 부작용을 일으킬 뿐만 아니라 미생물들의 내성을 일으켜 많이 문제가 되고 있으며[1,5], 식품 산업에서 미생물에 의한 변패를 억제하기 위해 사용되는 데하이드로아세트산(Dehydroacetic Acid), 소르빈산(Sorbic Acid), 벤조산(Benzoic Acid), p-히드록시벤조산에스테르(p-Oxbenzoic Acid Ester) 등과 같은 보존료들은 그 안전성에 대해 우려를 갖고 있어 근래에는 건강에 대한 요구가 증가함에 따라 점차 사용량을 제한하는 추세이다[1, 4-5]. 이러한 문제점들로 인하여 인체에 해가 없으며, 제품의 안정성과 경제성이 우수한 천연 성분을 이용한 항균 및 방부제의 개발 등이 활발하게 이루어지고 있으며, 향신료 및 어류 등의 식품류, 천연식물의 정유(Essential Oil), 한약재 등으로부터 많은 천연 항균성물질이 보고되고 있다. 그러나 보고된 천연유래 항균성물질의 대부분은 특이냄새, 색, 안정성 저하, 좁은 항균 스펙트럼, 제형상의 문제점, 많은 사용량 등의 물질적·경제적 문제로 인하여 상용화되지 못하고 있다[1, 6-11].

최근에는 메밀, 작약근, 장미꽃, 콩나물 자엽, 정향, 백자인, 녹차, 강황(심황, 울금), 검정콩 종피, 도라지(길경), 동백 꽃잎 추출물 등과 같은 유용성 천연유래 항균 물질(Antimicrobial)을 전달체(Delivery System)에 담아 생리활성 및 효능을 극대화하기 위하여 나노크기(Nano-Size)의 전달체를 만들려는 연구가 활발히 진행되고 있다[12-21]. 일반적으로 항균력이 높은 물질들은 피부에 자극을 주어 알레르기(Allergy)나 염증을 유발하는 성분을 포함하고 있는 경우가 많기 때문에, 이러한 유용성 항균 물질의 보호 및 저장 안정성 향상을 위하여 캡슐화(Encapsulation)하는 것이 가장 일반적인 방법으로 알려져 있으며[22-23], 항균 물질을 캡슐화함으로써 물리적 장벽을 제공해 주어 외부 환경으로부터 보호하고 피부에 직접 닿을 시에도 자극과 독성을

감소시키거나 없앨 수 있다[22,24]. 캡슐화에 의해 다양한 나노 단위의 입자 크기를 갖는 나노 캡슐의 제조를 위하여 열안정화 공정 또는 가교 과정을 포함하는 분무 건조법(Spray Drying Technique)과 에멀전/용매 증발법(Emulsion-Solvent Diffusion Technique), 상분리법(Phase Separation Technique), 탈용매(Desolvation Technique)법 등이 전통적으로 사용되어져 왔으나, 사용할 수 있는 고분자가 제한되어있고 독성을 갖는 가교제(Surfactant)의 사용에 의한 고분자 물질의 변성 및 시간이 경과함에 따라 입자의 안정성 문제를 일으키는 단점이 있어 사용이 제한적으로 사용되어져 왔다. 이를 해결하기 위하여 최근에는 양친성 블록 공중합체를 기반으로 나노 침전법(Nanoprecipitation)[25-28]을 통하여 수분산이 가능한 유용성 천연유래 항균 물질이 담지된 나노입자를 제조하는 연구가 활발히 진행되고 있으나, 고함량의 유용성 천연유래 항균 물질을 담지하는 것이 어렵고, 양친성 블록 공중합체는 매우 복잡한 합성 과정을 통해서 제조되므로 가격이 고가이고 실용화되기 어려운 단점이 있다[29-31]. 또한 양친성 블록 공중합체 나노입자들도 계면활성제와 마찬가지로 일종의 물리적 회합을 통해서 형성되기 때문에, 극한 환경(고온, pH 변화, 큰 전단응력)이나 외부 환경에 의해서 그 나노 회합구조가 쉽게 파괴되는 피할 수 없는 단점이 존재한다[32-33]. 따라서 고함량의 유용성 천연유래 항균 물질담지와 수분산이 동시에 가능한 나노입자를 형성시킬 수 있으면서도 매우 견고한 나노 구조를 가지는 새로운 형태의 양친성 고분자 나노입자의 개발이 지속적으로 요구되고 있다.

이전 연구에서 반응성 양친성 고분자 전구체(RAPP)를 합성하고 이를 이용하여서 코어 가교 양친성 고분자 나노입자(CCAP)를 제조한 후, 나노 침전법 공정을 사용하여 항암제 및 유용 약물을 담지하였다[34]. 본 연구를 수행하기에 앞서 본 연구에서 사용할 유용성 천연유래 항균 물질을 선택하기 위하여, 천연 항균소재 추출, 분석 및 응용분야 조사(국내/외 논문) 및 천연 항균소재 추출물 실험방법 조사를 진행하였으며, 천연 항균 물질(IPC: A01N, A23L, A61K) 관련 최근 5년간 한국, 미국, 유럽 및 일본에서의 출원 동향을 분석하였다[35]. 그 결과, 메밀, 정향, 백자인, 강황(심황, 울금) 등을 포함하여 약 20여 가지의 천연유래 항균 물질들을 확보하였고, 이들 중 항균 활성이 우수한 백자인 추출물(Carvacrol), 정향 추출물(Eugenol), 강황추출물(Curcumin)을 선택하여 실험을 진행하였으며[35], 실험 결과를 바탕으로 가장 우수한 항균력을 나타낸 정향 추출물인 Eugenol을 천연유래 항균 물질로 선택하였다.

따라서 본 연구에서는 유용성 천연유래 항균 물질들을 담지 할 수 있는 기능을 가지면서도 수용액에서 매우 안정적인 나노입자를 형성할 수 있는 물질로서, 친수성 세그먼트와 소수성 세그먼트가 화학적으로 결합된 물질이면서 소수성 세그먼트의 Hydrolysis-Polycondensation 반응을 통해서 Si-O 결합을 생성시킬 수 있는 알콕시실란기가 존재하는 형태를 가지는 실란 기능화 양친성 고분자 전구체를 합성하고 이를 이용하여서 One-shot공정으로 Eugenol이 담지된 유-무기 하이브리드 형태의 나노입자 제조를 제안하였다. 또한 고함량의 Eugenol이 담지된 나노입자를 제조하기 위하여 4관능성 실란화합물인 TEOS(Tetraethyl orthosilicate)와 3관능성 실란화합물인 APTES(3-Aminopropyltriethoxysilane)를 다양한 혼합비로 혼합하여 유-무기 하이브리드 형태의 나노입자 용액을 제조하였고, 유용 성분 100%로 제조하기 위하여 자체 항균특성을 가지고 있는 헥산디올(Hexanediol; HD)을 첨가하였다. 이를 위해서 폴리에틸렌 옥사이드(Polyethylene oxide)(PEO) 기반 친수성 세그먼트와 폴리프로필렌 옥사이드(Polypropylene oxide)(PPO) 기반 소수성 세그먼트를 가지고 있으면서 반응성 알콕시 실란을 가지고 있는 실란 기능화 양친성 고분자 전구체(Alkoxysilane-functionalized Amphiphilic Polymer Precursor; 이하 AAPP)를 합성하고, 이를 전형적인 Hydrolytic Sol-Gel 공정을 통하여 수분산이 가능하면서 고함량의 Eugenol의 담지가 가능한 유-무기 하이브리드 형태의 나노입자 제조하는 공정을 제안하였으며, Eugenol의 담지효율 및 분자 설계(나노입자 제조 시 제조 조건의 변화)에 따른 나노입자들의 크기, 담지량, 항균 활성 및 방출거동 등에 영향을 미치는 인자들을 조사하였다.

2. 실험

2.1. 시약 및 재료

AAPP 물질의 합성에는 (본 연구에서는) Glycerol Propoxyrate(GP, Mw = 1000 g/mol, Sigma Aldrich Co., Ltd, USA), Isophorone Diisocyanate(IPDI, Sigma Aldrich Co., Ltd, USA), 3-Aminopropyltriethoxysilane(APTES, Sigma Aldrich Co., Ltd, USA), Polyethylene Glycol (PEG, Mw = 1500 g/mol), 용매는 아세톤(Acetone, Sigma Aldrich Co., Ltd, USA)이 사용되었으며, Sol-Gel 반응에 함께 사용한 알콕시실란은 Tetraethoxysilane (TEOS), APTES, Hexanediol(HA, Sigma Aldrich Co., Ltd, USA)가 사용되었고 유용성 천연유래 항균 물질로는 백자인 추출물(Carvacrol)과 정향 추출물(Eugenol),

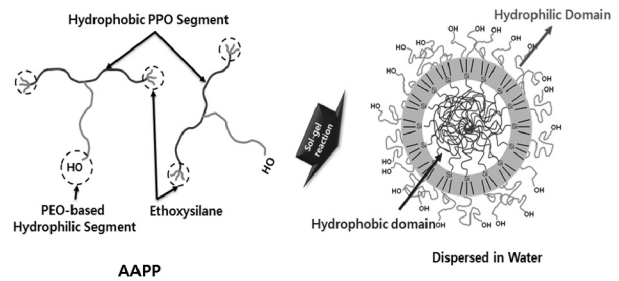


Figure 1. Schematic representations of Alkoxysilane-functionalized Amphiphilic Polymer Precursor, AAPP and WD-SHP nanoparticles.

강황추출물(Curcumin) 중에서 가장 우수한 항균력을 나타내었던[35] 정향 추출물인 Eugenol을 Sigma Aldrich Co., Ltd, USA에서 구입해서 대표적으로 사용하였다. GP와 PEG는 합성 24시간 전 80°C에서 감압하에 건조 후 사용하였고, 그 외의 시약은 별도의 정제 과정을 거치지 않고 사용하였다.

2.2. 실란 기능화 양친성 고분자 전구체 (AAPP)의 합성

AAPP는 3단계 합성 공정을 통해서 제조되었으며, 기계교반기, 질소 유입구, 온도계가 장착된 3구 유리 반응기내에서 진행하였다. 질소 분위기 하에 GP와 IPDI를 반응 몰비 1:3으로 70~80°C에서 4 시간 동안 교반 반응시켜 우레탄 결합을 형성시킨다. 앞서 합성된 프리폴리머 (Prepolymer)에 아민기를 갖는 APTES를 반응 몰비 1:2로 첨가하여 50°C에서 다시 4 시간 교반 반응시킨다. 상기 과정으로 얻어진 합성물에 분자량이 1500 g/mol인 PEG를 1:1의 반응 몰비로 첨가 후 12 시간 동안 반응시켜 최종적으로 양친성 고분자 사슬을 가지는 실란 기능화 양친성 고분자 전구체를 합성하였다. 합성된 반응성 전구체인 AAPP의 자세한 분석 및 분자량 측정은 이전의 논문에서 자세하게 기술하였고[36], 모식도를 Figure 1에 나타내었다.

2.3. 항균 물질(Eugenol)이 담지된 유-무기 하이브리드 형태 (WD-SHP)의 나노입자 용액 제조

AAPP를 이용한 유-무기 하이브리드 형태의 나노입자 용액 제조에는 전형적인 Sol-Gel 공정이 사용되었으며, 제조되는 유-무기 하이브리드 나노입자의 크기는 분자설계에 따라서 다양하게 조절이 가능하다. AAPP를 사용하여서 유용성 천연유래 항균 물질이 담지된 유-무기 하이브리드 나노입자 용액을 제조하는 공정은 AAPP를 Ethanol에 1:4의 무게비율로 상온에서 혼합한 후 항균 물질인 Eugenol을 AAPP와 1:1, 1:2, 1:3, 1:4의

Table 1. Particle size and payload based on molecular design

AAPP								
AAPP :Eugenol		AAPP	Eugenol	Ethanol	0.1M HCl (aq)	Particle size (nm)	Payload (wt. %)	
1:1		2.50g	2.50g	40g	10g	Coagulation	20	
2:1		3.33g	1.67g	40g	10g	Coagulation		
3:1		3.75g	1.25g	40g	10g	Coagulation		
4:1		4.00g	1.00g	40g	10g	85		
AAPP-TEOS								
AAPP-TEOS :Eugenol	AAPP:TEOS	AAPP	TEOS	Eugenol	Ethanol	0.1M HCl (aq)	Particle size (nm)	Payload (wt. %)
1:1	1:1	1.25g	1.25g	2.5g	40g	10g	Coagulation	50
	1:2	0.83g	1.67g	2.5g	40g	10g	Coagulation	
	2:1	1.67g	0.83g	2.5g	40g	10g	Coagulation	
AAPP-APTES								
AAPP-APTES :Eugenol	AAPP:APTES	AAPP	APTES	Eugenol	Ethanol	0.1M HCl (aq)	Particle size (nm)	Payload (wt. %)
1:1	0.3:0.7	0.75g	1.75g	2.5g	40g	10g	Coagulation	50
	0.5:0.5	1.25g	1.25g	2.5g	40g	10g	160.35	
	0.7:0.3	1.75g	0.75g	2.5g	40g	10g	88.97	
AAPP-HD (solvent-free)								
AAPP :Eugenol	AAPP:HD	AAPP	Eugenol	HD	0.1M HCl (aq)	Particle size (nm)	Payload (wt. %)	
1.25:1	1:6.4	1.25g	1g	8g	3g	150	67.92	
	1:3.2	1.25g	1g	4g	0.5g	87	79.37	
2:1	1:1	2g	1g	2g	0.2g	Coagulation		
3:1	1:1	3g	1g	3g	0.2g	Coagulation		
4:1	1:1	4g	1g	4g	0.2g	Coagulation		

무게비로 첨가하여 용해시켜서 균일한 용액을 제조하고, 제조된 용액에 AAPP와 1:1의 무게비율을 갖는 촉매를 함유한 수용액에 천천히 적하시킨 후 (0.1M의 염산 수용액을 서서히 적하시켜) 60°C에서 48 시간 동안 반응시켜 Eugenol이 담지된 유/무기 하이브리드 형태의 용액을 제조하였고, 자세한 조성은 Table 1에 나타내었다. 즉 AAPP와 Eugenol의 혼합물을 물속에 적하하면 소수성 향균 물질과 AAPP의 소수성 세그먼트인 Polypropylene oxide 세그먼트는 회합하여서 입자 내부(Core)를 형성하게 되고, 친수성 세그먼트인 Polyethylene oxide 세그먼트는 입자 외부로 배향하면서 미셀(Micelle)과 같은 나노입자를 형성하게 된다. 이후 알콕

시 실란기간의 Sol-Gel 반응이 진행됨에 따라서 실록산(Si-O-Si)결합이 형성되어 무기 실록산 층(Inorganic layer)이 형성되고, 이로 인해서 향균 물질이 담지된 나노입자의 구조가 화학적으로 고정된다. 제조된 용액을 탈이온 증류수에 적하하면, 결과적으로 Eugenol이 담지된 유-무기 하이브리드 형태의 나노입자가 물속에 분산된 형태로 형성된다. 예상되는 Eugenol이 담지된 유-무기 하이브리드 나노입자의 구조는 Figure 2에 나타내었고, Water-dispersible Silica-polymer Hybrid (WD-SPH) 나노입자라고 명명하였다.

Table 2. Strains and Culture Conditions

Strains		ATCC #.	Media	Temp.(°C)
Bacteria Gram(-)	Escherichia coli (ESC)	8739	MHA	37
	Pseudomonas aeruginosa (PSE)	9027	MHA	37
	Klebsiella pneumoniae (kLE)	4352	MHA	37
Bacteria Gram(+)	Bacillus subtilis (BAC)	6633	MHA	37
	Staphylococcus aureus (STA)	6538	MHA	37
Fungi	Candida albicans (CAN)	10231	MHA	37

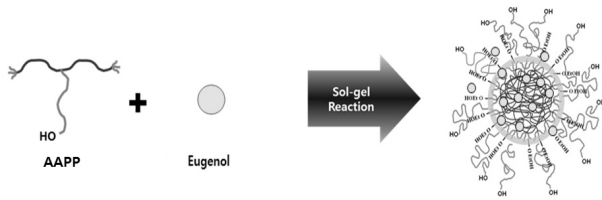


Figure 2. Schematic representations of Eugenol-encapsulated WD-SPH nanoparticles prepared using AAPP.

2.4. AAPP와 실란화합물을 혼합한 Eugenol이 담지된 WD-SPH-A, WD-SPH-T 나노입자 용액 제조

WD-SPH 나노입자 내 항균제의 담지량(payload)를 향상시키기 위하여 WD-SPH 나노입자 제조시 실란화합물(APTES 및 TEOS)을 첨가하였다. 먼저 10 g의 AAPP를 40 g의 에탄올에 상온에서 혼합한 후 혼합 용액에 실란화합물(APTES 및 TEOS)을 다양한 조성비로 첨가하고 0.1M의 염산 수용액을 서서히 적하시켜 60°C에서 48 시간 동안 반응시켰으며, 자세한 조성은 Table 1에 나타내었다. 새롭게 설계하여 제조된 WD-SPH-X 나노입자는 각각 WD-SPH-A, WD-SPH-T로 명명하였고, 실란화합물의 첨가에 의해 입자 크기, 분산성 및 담지량이 변할 것으로 생각되며 무기 층이 강화될 것으로 예상된다.

2.5. AAPP와 Hexanediol (HD)을 혼합한 Eugenol 이 담지된 WD-SPH-HD 나노입자 용액 제조

고형분 및 유용성분을 향상시키기 위하여 Hexanediol (HD)을 용매로 사용하여 WD-SPH-HD 나노입자 용액을 제조하였다. HD 자체도 약간의 항균성을 가지고 있기 때문에 실제로 화장품 제조시 방부 첨가제, 용제의 목적으로 사용되고 있다. 제조방법은 전술한 것처럼, 10 g의 AAPP를 40 g의 HD에 상온에서 혼합한 후 혼합 0.1M의 염산 수용액을 서서히 적하시켜 60°C에서 48 시간 동안 반응시켰으며, 자세한 조성은 Table 1에 나타내었다. 제조된 WD-SPH-HD 나노입자의 유용성분은 100 %이다.

2.6. 분자설계에 따른 WD-SPH-X 나노입자의 최소저해농도 (MIC) 측정

분자설계에 따른 WD-SPH-X 나노입자의 최소저해농도(Minimal Inhibitory Concentration; MIC)를 확인하기 위하여 한국미생물센터에서 균주 6종을 분양받아 Mueller Hinton Agar (MHA) 배지를 이용하여서 균주를 각각 100 mL의 액체배지에 접종하고 37°C에서 24 시간씩 3 회 계대 배양하여서 시험균주로 사용하였다 [37]. 시험균주 및 배양조건은 Table 2에 자세히 나타내었다. WD-SPH, WD-SPH-X 나노입자들을 각 농도 별로 첨가한 액체 배지에 2 x 10⁵ CFU/ml의 균수의 현탁액을 접종하고 37°C에서 24~48 시간 동안 배양하였다. 이후 배양액을 취하여 분광 광도계(Spectrophotometer)로 620 nm에서의 흡광도를 측정하여 각 균주의 증식 여부를 검증함으로써 최소저해농도(MIC)를 확인하였다.

2.7. 분자설계에 따른 WD-SPH-X 나노입자 용액의 항균력 및 항균 지속력 평가

먼저, 분자설계에 따른 WD-SPH-X 나노입자에 대한 항균력을 확인하기 위하여 KS J 4206 규격에 준하여 항균 시험(Antimicrobial test)을 진행하였다. 각 균주는 100 mL의 액체배지에 접종하고 37°C에서 24 시간씩 3 회 계대 배양하여 항균활성 시험균주로 사용하였으며, 항균성은 각각의 시험균 농도를 2 x 10⁵ CFU/ml가 되게 한 후, 각각의 나노캡슐화 항균소재를 첨가하여 37°C에서 24 시간 동안 배양하였다. 배양 후 배양액을 10⁻¹~10⁻⁴로 희석하여 생존 균수를 측정하였고, 이 생존 균수를 대조군의 생존 균수와 비교하여 항균력을 분석하였다.

항균 지속력 또한 항균력 시험과 마찬가지로 각 균주를 100 mL의 액체배지에 접종하고 37°C에서 24 시간씩 3회 계대 배양하여 항균활성 시험균주로 사용하였다. 분자 설계에 따른 항균 지속력을 확인하기 위하여 제조된 WD-SPH-X 나노입자들을 각각 액체배지에 희석하여 농도를 맞춘 후 멸균한 용기에 담고 여기에 2 x 10⁵ CFU/ml의 균수의 현탁액을 접종하여 37°C에

서 14 일 동안 배양 하였다. 시간이 경과함에 따라 육안으로 변화를 관찰하고 분광 광도계를 이용하여 항균 지속력을 측정하였다.

2.8. 분자설계에 따른 WD-SPH-X 나노입자들의 Eugenol 담지량과 방출거동

분자설계에 따른 Eugenol의 담지량과 방출거동에 미치는 영향을 관찰하기 위하여, Mw 3,500 membrane 안에 2 ml의 샘플을 넣고 밀봉한 뒤 100 ml의 PBS에 넣어 일정 시간에 따라 방출 용액을 취하여 고성능 액체 크로마토그래피(High Performance Lipid Chromatography ; HPLC, 254 nm)로 분석하였다. 농도(%)의 경우 WD-SPH-X 나노입자 안에 담지 되어있는 Eugenol 양만을 이용하여 수치화 하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 분자 설계에 따른 WD-SPH-X 나노입자의 입자 크기

유-무기 하이브리드 형태의 양친성 반응성 전구체인 AARP의 실란기간의 Sol-Gel 반응을 이용하여서 유용성 천연유래 항균 물질 담지를 시도한 것은 휘발성이 높은 천연 항균 물질의 휘발성과 독성을 크게 감소시키기 위해서이다. 전술한 것처럼, Eugenol을 선택하여 실험을 진행한 것은 20여 가지 천연 유래 항균물질 들 중 캡슐화가 가능하였던 백자인 추출물(Carvacrol)과 정향 추출물(Eugenol), 강황추출물(Curcumin)을 선정하여 실험을 진행한 결과, 3 가지 항균 물질 중에서 가장 우수한 항균력을 나타내었던[35] 정향 추출물인 Eugenol을 Sigma Aldrich Co., Ltd, USA에서 구입해서 대표적으로 사용하였다. AAPP만을 사용하여 제조된 WD-SPH 나노입자는 전술한 것처럼, Sol-Gel 반응 동안 회합반응에 의하여 내부 소수성도메인을 갖고 외부에 친수성도메인이 위치하며 두 도메인 사이에 무기 실록산층이 존재하는 형태로, 물에 적하하면 물과 혼화가 가능한 PEG가 수상으로 확산 이동함에 따라서 AARP의 소수성 세그먼트들은 “Hydrophobic interaction”으로 인해서 서로 회합하게 되고 친수성 세그먼트들은 소수성 세그먼트들과 미세상분리(Microphase-separation)되어서 수상으로 이동하게 된다. 이러한 과정을 통해서 AAPP 사슬들은 자가 조립되어서 WD-SPH 나노입자를 형성시키는 것으로 생각된다. AAPP만을 사용하여 Eugenol이 담지된 WD-SPH 나노입자를 제조할 경우, 다양한 조성 중에서 Eugenol과 AARP의 무게비가 1:4 인 조성에서만 85 nm 크기의 안정한 입자가 제조되었다. AAPP만을 사용하여 제조된 WD-SPH 나노입자의

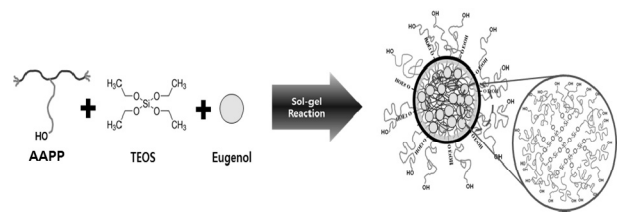


Figure 3. Schematic representations of Eugenol-encapsulated WD-SPH-T nanoparticels prepared using AAPP and TEOS.

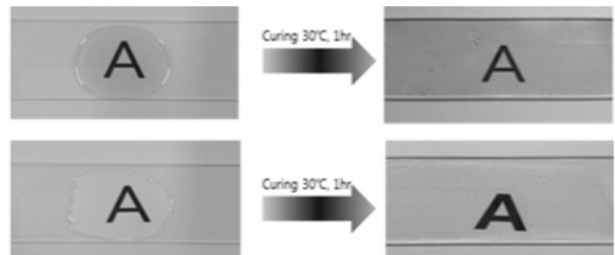


Figure 4. Curing film of Eugenol-encapsulated SPH-T solution prepared using AAPP and TEOS.

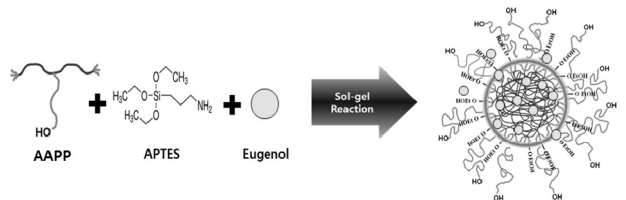


Figure 5. Schematic representations of Eugenol-encapsulated WD-SPH-A nanoparticels prepared using AAPP and APTES.

경우에는 무기 층인 실록산층을 형성 할 수 있는 APTES의 양이 작고, Sol-Gel 반응이 완벽히 진행되어도 실리카(SiO2) 층이 아닌 SiO1.5 층을 형성하기 때문에 견고한 무기 층을 형성하지 못하여 20 wt.% 이상의 Eugenol을 담지하지 못하고 불안정해져서 입자가 파괴 되는 것으로 생각된다. 이를 해결하기 위하여 (담지량 (payload)을 향상시키기 위하여) TEOS와 APTES를 각각 첨가하여서 무기 실록산 층이 강화된 Eugenol이 담지된 WD-SPH-T와 WD-SPH-A 나노입자를 제조하였고, 모식도를 Figure 3에 나타내었다.

먼저 TEOS를 첨가하여 제조된 경우, 무기 실록산 층이 강화됨에 따라 Eugenol의 담지량을 50 wt.%까지 향상시킬 수 있었으나 물에 분산되지 않고 석출되었다. 이는 Sol-Gel 반응이 진행됨에 따라 견고한 실리카 (SiO2) 층을 형성하기 때문에 소수성도메인과 무기 실록산 층이 친수성도메인보다 커지므로 물에 분산되지

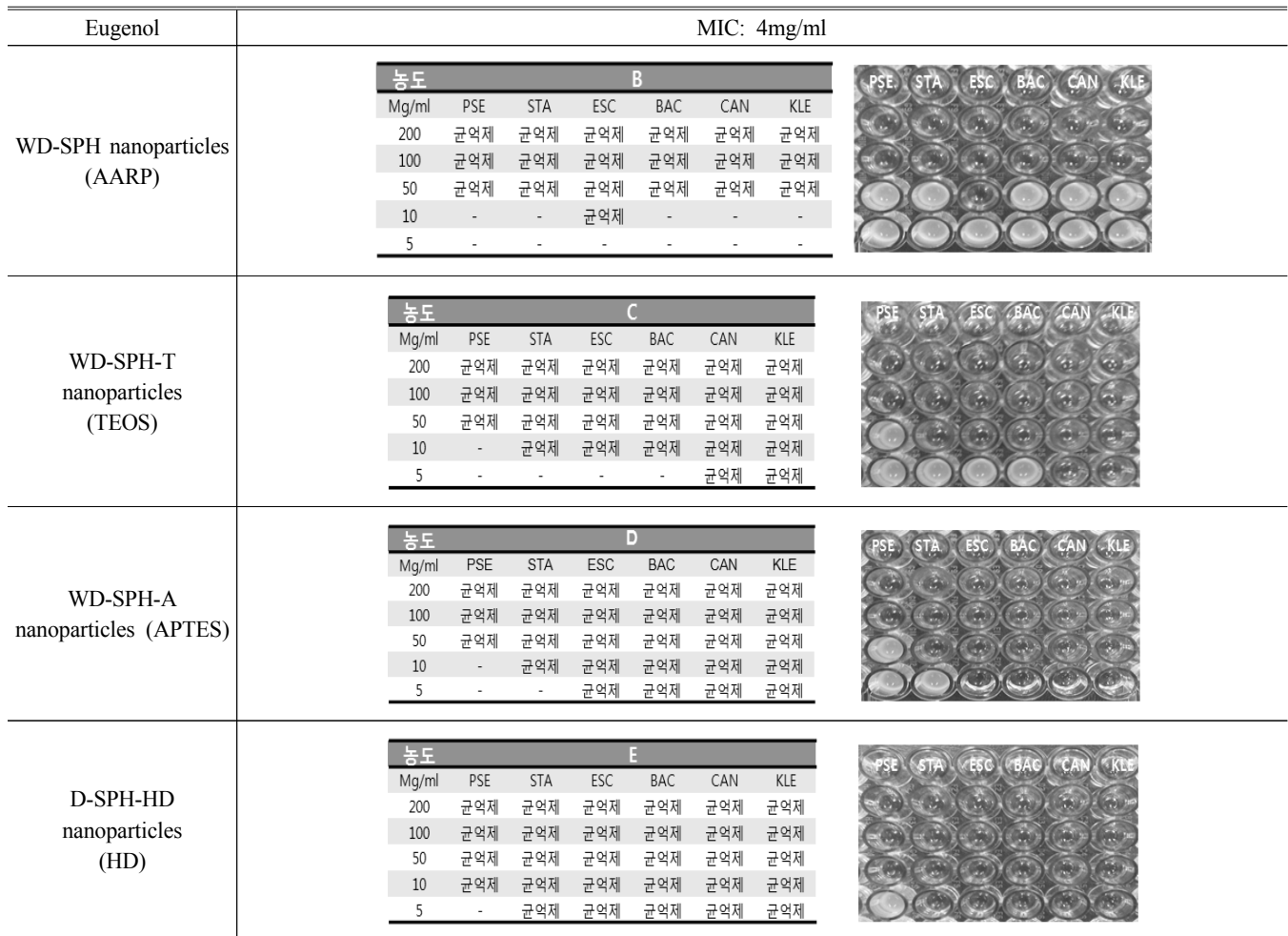


Figure 6. MIC test on molecular design.

못하고 석출된 것으로 생각된다. TEOS를 첨가하여 제조된 용액의 경우에는 물에는 분산되지 않기 때문에 최소화농도(MIC) 및 항균력을 확인하기 위하여 필름 형태로 제조하였다. 제조된 필름은 Figure 4에 나타난 것처럼 투명하였다.

Figure 5에 나타난 것처럼, APTES를 첨가하여 제조된 경우에도 TEOS를 첨가한 것과 마찬가지로 무기 실록산 층이 강화됨에 따라 Eugenol의 담지량을 50 wt.% 까지 향상시킬 수 있었다. Table 1에 나타난 것처럼 입자 크기는 85 - 160 nm 범위에 있었고, APAS와 APTES의 조성비에 따라서 형성되는 WD-SPH-A 나노입자 크기가 변화하였다. APTES 함량이 증가함에 따라 입자 크기가 커지는 것은 무기 실록산 층에 형성되는 실라놀 그룹이 증가하므로 이들이 수상으로 확산 이동함에 따라서 입자 크기가 커지는 것이라고 생각된다. 그러나 여전히 Eugenol의 고유 향이 잔존하였는데, 이는 전술한 것처럼 3관능기를 가지는 APTES는 Table 3. MIC

test on molecular design. Sol-Gel 반응이 완벽히 진행되어도 실리카(SiO₂) 층이 아닌 SiO_{1.5} 층을 형성하기 때문에 견고한 무기 실록산 층이 형성되지 못하여 Eugenol이 휘발되어 냄새가 잔존하는 것으로 생각된다. 따라서 전술한 문제점들을 해결하기 위해서 방부 효과를 가지고 있어서 현재 화장품 방부용 첨가제 및 용제로 사용되고 있는 Hexanediol(HD)을 반응 용매로 사용하여 무용매(solvent-free)공정으로 Eugenol이 담지된 WD-SPH-HD 나노입자를 제조하였다. 제조된 WD-SPH-HD 나노입자의 경우, 약 80-150 nm 정도의 크기를 나타내었고 다른 나노입자들보다 Eugenol의 냄새가 많이 감소하였는데, 이는 용매로 사용된 HD 고유의 냄새가 Eugenol의 냄새를 약하게 만든 것으로 생각된다. HD를 첨가함으로써 잔존 용매 제거 문제를 해결할 수 있었고, 동시에 고함량의 유효 성분(Eugenol+HD)을 담지 할 수 있었다.

Table 3. MIC test on molecular design.

Eugenol	MIC: 4mg/ml						
WD-SPH nanoparticles (AARP)	Concentration B						
	(mg/ml)	PSE	STA	ESC	BAC	CAN	KLE
	200	O	O	O	O	O	O
	100	O	O	O	O	O	O
	50	O	O	O	O	O	O
	10	X	X	O	X	X	X
	5	X	X	X	X	X	X
WD-SPH-T nanoparticles (TEOS)	Concentration C						
	(mg/ml)	PSE	STA	ESC	BAC	CAN	KLE
	200	O	O	O	O	O	O
	100	O	O	O	O	O	O
	50	O	O	O	O	O	O
	10	X	O	O	O	O	O
	5	X	X	X	X	O	O
WD-SPH-A nanoparticles (APTES)	Concentration D						
	(mg/ml)	PSE	STA	ESC	BAC	CAN	KLE
	200	O	O	O	O	O	O
	100	O	O	O	O	O	O
	50	O	O	O	O	O	O
	10	X	O	O	O	O	O
	5	X	X	O	O	O	O
WD-SPH-HD nanoparticles (HD)	Concentration E						
	(mg/ml)	PSE	STA	ESC	BAC	CAN	KLE
	200	O	O	O	O	O	O
	100	O	O	O	O	O	O
	50	O	O	O	O	O	O
	10	O	O	O	O	O	O
	5	X	O	O	O	O	O

3. 2. 분자설계에 따른 WD-SPH-X 나노입자의 최소저해농도 (MIC) 확인

Table 3과 Figure 6에 분자설계에 따른 최소저해농도 (MIC)를 나타내었으며, 각 균주에 대한 순수 Eugenol의 최소저해농도(MIC)는 4mg/ml이었다[35]. Table 3과 Figure 6에 나타낸 바와 같이 AAPP만을 사용하여 제조된 WD-SPH 나노입자(B)의 경우에는 50 mg/ml의 MIC를 확인하였으며, TEOS를 첨가하여 제조된 필름(C)과 APTES를 첨가하여 제조된 WD-SPH-A 나노입자(D)의 경우에도 50 mg/ml의 MIC를 나타내었지만 PSE 균주를 제외하고는 10 mg/ml의 MIC를 나타내었다. 마지막

으로 HD를 첨가하여 WD-SPH-HD 나노입자(E)의 경우에는 다른 나노입자들 보다 낮은 10 mg/ml의 MIC를 나타내었고, PSE 균주를 제외하면 5 mg/ml의 MIC를 나타내었다. 결과적으로 분자설계의 종류에 관계없이 50 mg/ml의 MIC를 확인하였으며, 항균제를 사용하고 있는 산업에서 통상적으로 사용되는 농도인 0.5 - 2 %를 만족하는 것을 확인 할 수 있었다.

3.3. 분자설계에 따른 WD-SPH-X 나노입자의 항균력 및 항균 지속력 변화

분자설계에 따른 항균 시험 결과를 Table 4에 나타

Table 4. Antimicrobial activity on molecular design

Eugenol	MIC: 4mg/ml						
WD-SPH nanoparticles (AARP)	Concentration B						
	%	PSE	STA	ESC	BAC	CAN	KLE
	20	99	99	99	99	99	99
	10	99	99	99	99	99	99
	5	99	99	99	99	99	99
	1	-	99	99	99	99	99
	0.5	-	-	-	-	99	99
WD-SPH-T nanoparticles (TEOS)	Concentration C						
	%	PSE	STA	ESC	BAC	CAN	KLE
	20	99	99	99	99	99	99
	10	99	99	99	99	99	99
	5	99	99	99	99	99	99
	1	-	-	99	-	-	-
	0.5	-	-	-	-	-	-
WD-SPH-A nanoparticles (APTES)	Concentration D						
	%	PSE	STA	ESC	BAC	CAN	KLE
	20	99	99	99	99	99	99
	10	99	99	99	99	99	99
	5	99	99	99	99	99	99
	1	-	99	99	99	99	99
	0.5	-	-	99	99	99	99
WD-SPH-HD nanoparticles (HD)	Concentration E						
	%	PSE	STA	ESC	BAC	CAN	KLE
	20	99	99	99	99	99	99
	10	99	99	99	99	99	99
	5	99	99	99	99	99	99
	1	99	99	99	99	99	99
	0.5	-	99	99	99	99	99

내었다. 분자설계에 따른 항균력은 MIC(1 mg/ml)와 마찬가지로 다양한 농도(0.5 - 20 %)에서 99 %에 해당하는 우수한 항균력을 나타냄을 확인할 수 있었다. Table 4에 나타난 것처럼, 가장 우수한 항균력을 나타내는 입자는 예상한 했던바와 같이 HD를 용매로 사용하여서 제조된 WD-SPH-HD(E) 나노입자였다. 이러한 결과는 HD 자체의 항균력과 무용매 공정으로 제조되어 유효 성분이 상대적으로 높기 때문에 다른 WD-SPH-X 나노입자들 보다 항균력이 우수한 것으로 생각된다. TEOS를 첨가하여 제조된 필름(C)의 경우에는 전술한 것처럼 견고한 실리카(SiO₂) 층이 형성되었기 때문에 Eugenol이 방

출되지 못하여 AARP만 사용하여 제조된 WD-SPH 나노입자 보다 상대적으로 낮은 항균력을 나타내는 것으로 생각된다. 분자설계에 따른 WD-SPH-X 나노입자(농도 1 %)에서 각 균주에 대한 항균 지속력 결과를 Figure 7에 나타내었다. 가장 우수한 항균 지속력을 나타내는 나노입자는 MIC 및 항균력 시험 결과와 일치하는 결과로, HD를 첨가하여 제조된 WD-SPH-HD 나노입자(E)였으며 모든 균주에서 2 주 이상의 항균 지속력을 나타냄을 확인할 수 있었다. WD-SPH-HD 나노입자를 제외한 나머지 나노입자들의 경우에는 PSE를 제외한 나머지 균주에서 2 주 이상의 항균 지속력을 나타내었다.

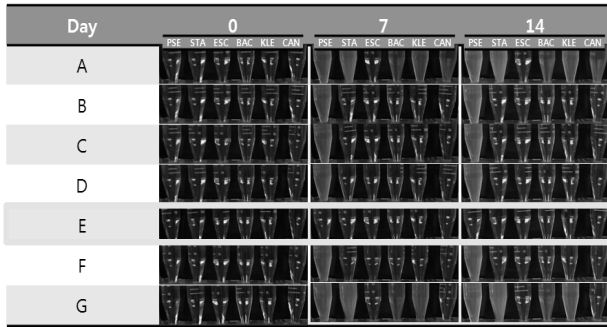


Figure 7. Schematic representations of Eugenol-encapsulated WD-SPH-A nanoparticles prepared using AAPP and APTES.

3.4. 분자설계에 따른 Eugenol의 담지량과 Eugenol이 담지된 WD-SPH-X 나노입자의 방출거동

Figure 8에 분자설계에 따른 Eugenol의 담지량과 Eugenol이 담지된 WD-SPH-X 나노입자의 방출거동을 조사한 결과를 나타내었다. Eugenol의 표준검량곡선을 작성하기 위해 Eugenol의 최대 흡광도를 측정하고 254 nm에서 관찰되었으며, 일정시간 마다 시료를 채취하여서, 측정된 용액의 흡광도를 근거로 측정된 방출된 Eugenol의 농도는 Figure 8과 같이 누적 방출 경향을 나타내었다. 분자설계에 따른 Eugenol 담지량은 무기 실록산 층이 가장 조밀하게 형성된 TEOS를 첨가하여 제조된 경우에서 가장 높은 담지량을 나타내었다. HD를 첨가하여 제조된 WD-SPH-HD 나노입자(E)의 경우에는 AAPP만 이용하여 제조된 WD-SPH 나노입자(B)와 마찬가지로 가장 낮은 담지량을 나타내었는데, 이는 유효 성분은 높지만 무기 실록산 층이 얇고 견고하지 못하기 때문에 코어 안에 Eugenol이 가장 적게 담지된 것으로 생각된다. 방출거동을 보면, 실란 화합물의 종류, 즉 무기 실록산 층의 견고함에 따라 좌우되었다. 즉, APTES를 첨가하여 제조된 WD-SPH-A 나노입자(D)의 경우, 5 시간까지는 빠르게 방출이 되다가 5 시간 이후부터는 서서히 방출되었다. 이러한 결과는 미반응 실라놀들이 물속에서 다시 한 번 축합반응(Condensation)이 진행되면서 무기 실록산 층이 한층 더 강화되어 5 시간 이후부터는 서서히 방출되는 것으로 생각된다. TEOS를 첨가하여 제조된 WD-SPH-T 나노입자(C)의 경우에는 상대적으로 서서히 방출되었는데, 이러한 결과는 견고한 무기 실록산 층이 형성되므로 코어 내에 Eugenol을 더 효과적으로 가둬 둘 수 있기 때문에 오랜 시간 동안 물속으로 방출되는 것으로 생각된다.

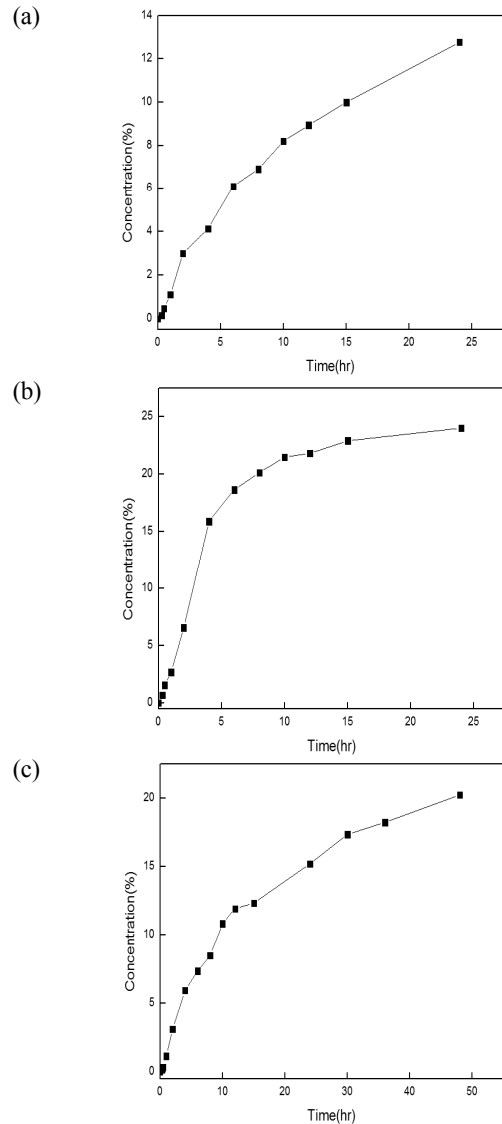


Figure 8. Release behaviors of Eugenol loaded WD-SPH-X nanoparticles prepared using molecular design; (a) WD-SPH-HD, (b) WD-SPH-A, (c) WD-SPH-T.

4. 결론

본 연구에서는 알콕시실란기가 존재하는 형태를 가지는 실란 기능화 양친성 고분자 전구체(AAPP)를 이용하여서 분자설계에 따른 유용성 천연유래 향균 물질인 Eugenol의 담지량, 항균력, 항균지속력 및 방출거동을 관찰하였다. AAPP와 실란 화합물을 사용하여서 One-shot 공정으로 소수성 향균물질인 70%의 높은 고형분을 가지면서도 Eugenol이 고농도 (50 wt%)로 담지된 수분산 유-무기 하이브리드 나노 입자들을 제조할 수 있었다. 기존의 연구와 비교하여 상대적으로 높은

담지율과 고형분을 나타내는 것은 항균 물질 담지에 사용된 유-무기 하이브리드 나노입자들이 화학적으로 매우 견고한 구조를 가지고 있기 때문인 것으로 생각된다. 분자설계의 종류에 관계없이 MIC는 50 mg/ml 임을 확인 할 수 있었고, 99 %에 해당하는 우수한 항균력과 PSE를 제외하고는 2주 이상의 항균 지속력을 나타내었다. 특히, TEOS를 첨가한 경우에는 견고한 무기물 도메인으로 인해 가장 높은 담지량과 서방출 (Sustained release)을 나타내었고, HD를 첨가한 경우에는 HD 자체의 항균력과 용매로서의 역할도 하였기 때문에 가장 높은 항균력과 고형분을 나타냄을 확인 할 수 있었다. 본 연구를 통하여 유/무기 하이브리드형 양친성 반응성 전구체를 이용한 WD-SPH-X 나노입자를 제조함에 있어 분자설계가 중요하며, Eugenol의 담지량, 항균력, 항균지속력 및 방출 거동이 가장 우수한 조건은 자체 항균력을 가지는 HD를 첨가하여 제조된 용액임을 확인할 수 있었다.

References

1. J. Weiss, S. Gaysinsky, M. Davidson, and J. McClements, *Global Issues in Food Science and Technology* **24**, 425 (2009).
2. Lee DS, *Innovations in Food Packaging*, **65**, 108 (2005).
3. P. Appendini and J. H. Hotchkiss, *Innovative Food Science Emerging Technol.* **3**, 113 (2002).
4. C. Silvestre, D. Duraccio, and S. Cimmino, *Prog In Polymer Sci*, **36**, (2011).
5. T.V. Duncan, *J Colloid Interface Sci*, **363**, 1 (2011).
6. F. Bakkali, S. Averbeck, D. Averbeck, and M. Idaomar, *Food and Chemical Toxicology*, **46**, 446 (2008).
7. Prow TW, Grice JE, Lin LL, Fay R, Butler M, Becker W, Wurm EM, Yoong C, Robertson TA, Soyer HP, Roberts Ms, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **63**, 470 (2011).
8. L. Sánchez-González, M. Cháfer, M. Hernández, A. Chiralt, and C. González-Martínez, *Food Control*, **22**, 1302 (2011).
9. P. Chaliar, A.B. Arfa, L.P. Belloy, and N. Gontard, *J. Appl. Polym. Sci.*, 106, 611 (2007).
10. T.K. Biji and R.H. Scofield, *Trends Pharmacol. Sci.*, **307**, 334 (2009).
11. Shin SB, *한국산학기술학회논문지* **9**, 1344 (2008).
12. L. Rojo, B. Vazquez, J. Parra, A.L Bravo, S. Deb, and J.S. Roman, *Biomacromolecules* **7**, 2751 (2006).
13. L. Rojo, J. M. Barcenilla, B. Vazquez, R. Gonzalez, and J.S. Roman, *Biomacromolecules*, **9**, 2530 (2008).
14. L. Rojo, J. M. Barcenilla, B. Vazquez, R. Gonzalez, and J.S. Roman, *Dental Materials* **24**, 1709 (2008).
15. L. Keawchaon and R. Yoksan, *Colloid Surface B* **84**, 163 (2011).
16. F. Nazzaro, P. Orlando, F. Fratianni, and R. Coppola, *Current Opinion in Biotechnology*, **23**, 182 (2011).
17. J. Safaei-Ghomi, Abdolrasoul H. Ebrahimabadi, Z. Djafari-Bidgoli, and H. Batooli, *Food Chemistry*, **115**, 1524 (2009).
18. Rejinold NS, Muthunayanan M, Divyarani VV, Sreerekha PR, Chennazhi KP, Nair SV, Tamura H, Jayakumar R, *J Colloid Interface Sci*, **360**, 39 (2011).
19. K. Pan, Q. Zhong, and S.J. Baek, *J. Agric. Food Chem.*, **61**, 6036 (2013).
20. Yallapu MM, Gupta BK, Jaggi M, Chauhan SC., *J Colloid Interface Sci*, **351**, 19 (2010).
21. (Environmental Toxicology and Pharmacology 32 (2011) 63) Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary / Jianga Y, Wu N, Fu YJ, Wang W, Luo M, Zhao CJ, Zu YJ, Liu XL., *Environ Toxicol Pharmacol* 32, 63 (2011).
22. Bell LN, "Stability testing of nutraceuticals and functional foods, In: Handbook of nutraceuticals and functional foods", Wildman REC, 501, CRC Press, New York, (2001).
23. Jhonson KA, *Adv. Drug Deliv Rev*, **26**, 3 (1997).
24. Reis CP, Neufeld RJ, Ribeiro AJ, Veiga F, *Nanomedicine*, **2**, 8 (2006).
25. Park SJ, Kim SH, *J Colloid Interface Sci*, **271**, 336 (2002).
26. O'Donnell PB, McGinity JW, *Adv Drug Deliv Rev*, **28**, 25 (1997).
27. Bilati U, Allemann E, Doelker E, *Eur J Pharm. Sci.* **24**, 67 (2005).
28. Quintanar-Guerrero D, Allémann E, Fessi H, Doelker E, *Drug Dev Ind Pharm*, **24**, 1113 (1998).
29. Rosler A, Vandermeulen GW, Klok HA, *Adv drug deliv Rev*, **3**, 95 (2001).

30. Letchford K, Burt H, *Eur J. Pharm Biopharm.*, **65**, 259 (2007).
31. Quaglia F, Ostacolo L, De Rosa G, La Rotonda MI, Ammendola M, Nese G, Maglio G, Palumbo R, Vauthier C, *Int. J. Pharm.*, **324**, 56 (2006).
32. Metha RC, Thanoo BC, Deluca PP, *J Controlled. Release*, **41**, 249 (1996).
33. Brigelius-Flohe, R., Traber, *MG, FASEB J*, **13**, 1145 (1999).
34. Kim NH, Kim JY, *Appl. Chem. Eng.* **27**, 26 (2016).
35. Kim HJ, Kim JY, Kim JH, Park JY, 유해균 80% 이상 차단을 위한 휴먼케어용 습식환경 저항성 항균소재 개발”, 지식경제부 산업원천기술개발사업 (2012-2013).
36. Cho SK, Kim NH, Lee SJ, Lee HS, Lee SH, Kim JY, Choi JW, *Chemosphere*, **156**, 302 (2016).
37. Jang HS, Choi I, *J Korean Soc Food Sci Natr*, **41**, 261 (2012).