

호흡기를 통한 약액 전달을 위한 진세노사이드 초미세입자 분무장치 제작

이병철^{1*}, 박진수¹, 양웅모²

¹한국과학기술연구원 뇌과학연구소

²경희대학교 한의과대학 융합한의학교실

Fabrication of an ultra-fine ginsenoside particle atomizer for drug delivery through respiratory tract

Byung Chul Lee^{1*}, Jin Soo Park¹, Woong Mo Yang²

¹Brain Science Institute, Korea Institute of Science and Technology, Seoul 02792, Republic of Korea

²Department of Convergence Korean Medical Science, College of Korean Medicine, Kyung Hee University, Seoul 02447, Republic of Korea

Objectives: The purpose of this study is to fabricate an ultra-fine ginsenoside particle atomizer that can provide a new treatment method by delivering ginsenoside components that have a therapeutic effect on respiratory diseases directly to the lungs.

Methods: We fabricated the AAO vibrating mesh by using the micromachining process. The starting substrate of an AAO wafer has a 350nm pore diameter with 50 μ m thickness. A photomask having several 5 μ m opening holes with a 100 μ m pitch was used to separate each nanopore nozzle. The photoresist structure was optimized to pattern the nozzle area during the lift-off process precisely. The commercial vibrating mesh was removed from OMRON's NE-U100 product, and the fabricated AAO vibrating mesh was installed. A diluted sample of 20mL with 30% red ginseng concentrate was prepared to atomize from the device.

Results: As a result of liquid chromatography analysis before spraying the ginsenoside solution, ginsenoside components such as 20S-Rg3, 20R-Rg3, and Rg5 were detected. After spraying through the AAO vibrating mesh, ginsenosides of the same component could be detected.

Conclusion: A nutrient solution containing ginsenosides was successfully sprayed through the AAO vibrating mesh with 350 nm selective pores. In particular, during the atomizing experiment of ginsenoside drug solution having excellent efficacy in respiratory diseases, it was confirmed that atomizing through the AAO vibrating mesh while maintaining most of the active ingredients was carried out.

Keywords : Atomizer; Anodic Aluminum Oxide (AAO); Ginsenoside; Aerosol; Ultra-fine particle

서론

현재 미세먼지 및 신종 바이러스 등으로 인한 호

· Correspondence to : 이병철(Byung Chul Lee)
서울시 성북구 화랑로 14길 5 KIST 뇌과학연구소
Tel : +82-2-958-5748, E-mail:bclee@kist.re.kr

흡기질환들이 급격하게 증가하는 추세로 이러한 질환들은 글로벌 정치·경제·사회 전 분야에 걸쳐 천문학적인 피해를 주고 있다. 아직 미세먼지 및 신종 바이러스 등으로 인한 호흡기질환에 의한 피해는 구체적으로 집계되지는 않았지만, 대표적인 호흡기질환인 천식(asthma)과 만성 폐쇄성 폐질환(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)으로 인한 사망은 전 세계적으로 증가하고 있다. Global Burden of Disease Study에 의하면 전 세계적으로 COPD는 1990년 사망원인 6위였지만 2030년에는 사망원인 4위를 차지할 것으로 예측하고 있다¹⁾. 특히, 미국의 경우, 2008년 COPD는 사망원인 3위에 이르렀으며, 141,090명이 사망한 것으로 집계되었다. 이에 따른 경제적 비용을 집계하면, COPD로 인한 경제적 비용은 2010년 499억 달러에 이르렀으며, 직접적인 의료 지출경비는 295억 달러에 달했다²⁾. 우리나라의 경우, 2010년 통계청 자료에 따르면, COPD로 인해 남자 3,526명, 여자 1,476명이 사망하였으며, 만성 하기도 질환으로도 남자 4,473명, 여자 2,619명이 사망한 것으로 보고 되었다³⁾. 건강보험심사평가원 자료에 의하면 2,840억 원 정도가 이러한

COPD 치료를 위해 직접 의료비용으로 사용이 되었으며, 1인당 약 323만 원에 달하는 비용이 소요되었다⁴⁾. 더욱 무서운 점은 2000년대에 들어 2002년 중증급성호흡기증후군(severe acute respiratory syndrome, SARS), 2009년 신종플루, 2015년 중동호흡기증후군(middle east respiratory syndrome, MERS), 2020년 코로나-19(COVID-19)까지 새로운 바이러스로 인한 호흡기질환이 전 세계적으로 단기간 내에 점점 더 잦은 빈도로 유행하는 점이다.

다양한 천연물질 중 전통적으로 한의학에서 한국인삼(Panax ginseng)은 유효성분인 진세노사이드(ginsenoside)의 약리작용 및 임상효과로 면역력강화, 항노화, 항피로 및 항스트레스, 동맥경화 예방, 혈당강하 작용, 지구력강화, 우울증 개선 등에 뛰어난 효과를 가지는 것으로 보고가 되고 있으며, 특히 COPD의 진행을 막을 수 있다는 연구가 발표되었다⁵⁾. 더불어 홍삼(Korea Red Ginseng)의 진세노사이드인 Rc, Re, Rg1, Rh2의 성분들이 호흡기 감염과 급성 폐 질환에 탁월한 효과를 보인다는 연구 결과도 보고가 되었다⁶⁾. 하지만, 대부분의 연구 모두 호흡기질환에 효과적인 약리작용을 가지는 진세노사이드의 유효성분을 경구 투입을 통한 소화기 섭취로

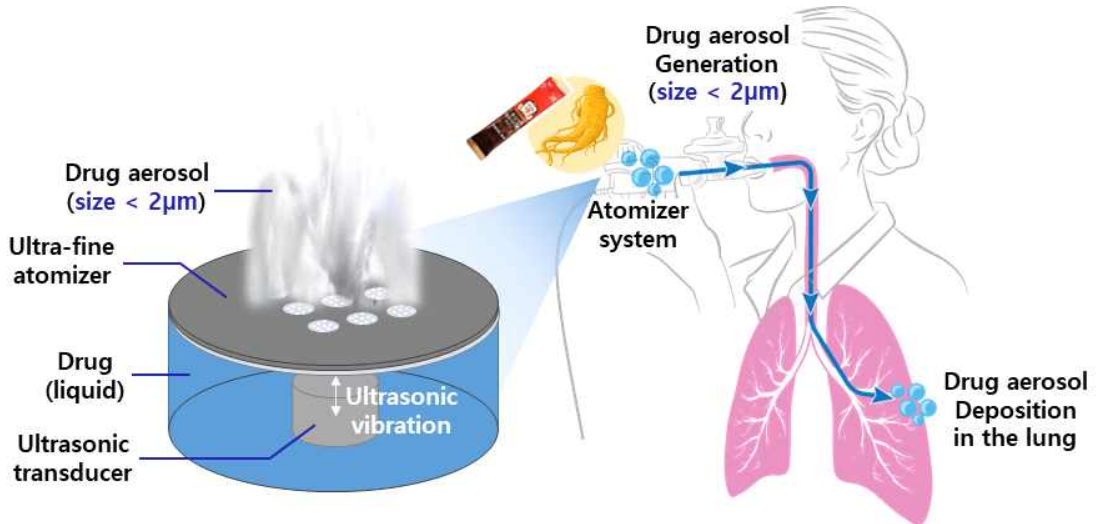


Fig. 1. Schematic of an ultra-fine ginsenoside atomizer system and its application for drug delivery to the lung.

효과를 입증하였다⁵⁶⁾.

의료용 흡입기는 액체 약물을 안개같이 작은 미세 분자 또는 에어로졸(aerosol) 형태로 분산시켜 호흡기에 직접적으로 전달하는 기기로 천식 및 만성 폐 질환 등 호흡기질환의 약물 치료에 주로 사용되어왔다. 이러한 의료용 흡입기는 약물을 혈관을 통해 전신에 투여하지 않고 기관지나 폐에 직접 투여함으로써 부작용을 줄이고 병소에서의 약물 농도를 높게 유지할 수 있는 장점이 있다. 하지만, 일반적인 의료용 흡입기의 경우, 레이저로 가공한 진동 메쉬(mesh) 구멍으로 인해 대부분 $5\mu\text{m}$ 내외의 에어로졸을 분무하여 상당한 부분의 약물이 폐에 직접적으로 도달하지 못하고 기관지에 머물게 되어 집중적인 치료가 어려운 문제점이 있다. 에어로졸의 크기가 $2\mu\text{m}$ 이하로 되면 이러한 문제점은 해결이 되며, 약물이 병소가 있는 폐까지 직접 도달할 수 있어 소량의 약물 투여만으로 특정 부위에 고농도의 약물 전달이 가능하다⁷⁾. 이는 약물의 유독성 및 부작용을 최소화하고 기존에 적용되지 못한 약제의 활용이 가

능하여 새로운 치료법에도 적용할 수 있는 방법을 제공할 수 있다.

본 연구는 호흡기질환에 치료 효과가 있는 진세노사이드 성분들을 폐에 직접적으로 전달하여 새로운 치료 방법을 제공할 수 있는 진세노사이드 초미세입자 분무장치를 제작하는 데 있다 (Fig. 1). 이를 위해 $2\mu\text{m}$ 이하의 에어로졸을 발생시킬 수 있는 나노미터의 구멍을 가지는 다공성 anodic aluminum oxide (AAO) wafer를 활용한 진동 메쉬를 제작하였다. 노즐 수를 조절하기 위해 반도체 공정 중 하나인 lift-off 공정을 이용하여 간격 $100\mu\text{m}$, 직경 $5\mu\text{m}$ 의 구멍이 뚫려있는 알루미늄(aluminum) 박막을 이용하여, 직경 350nm 을 가지는 AAO 노즐(nozzle)을 가지는 진동 메쉬를 구현하였다. 제작된 진동 메쉬를 기존 초음파 압전분무장치에 결합하여 진세노사이드가 포함된 용액을 분무하였으며, 액체 크로마토그래피를 통해 각각 진세노사이드 에어로졸이 형성되는 것을 검증하였다.

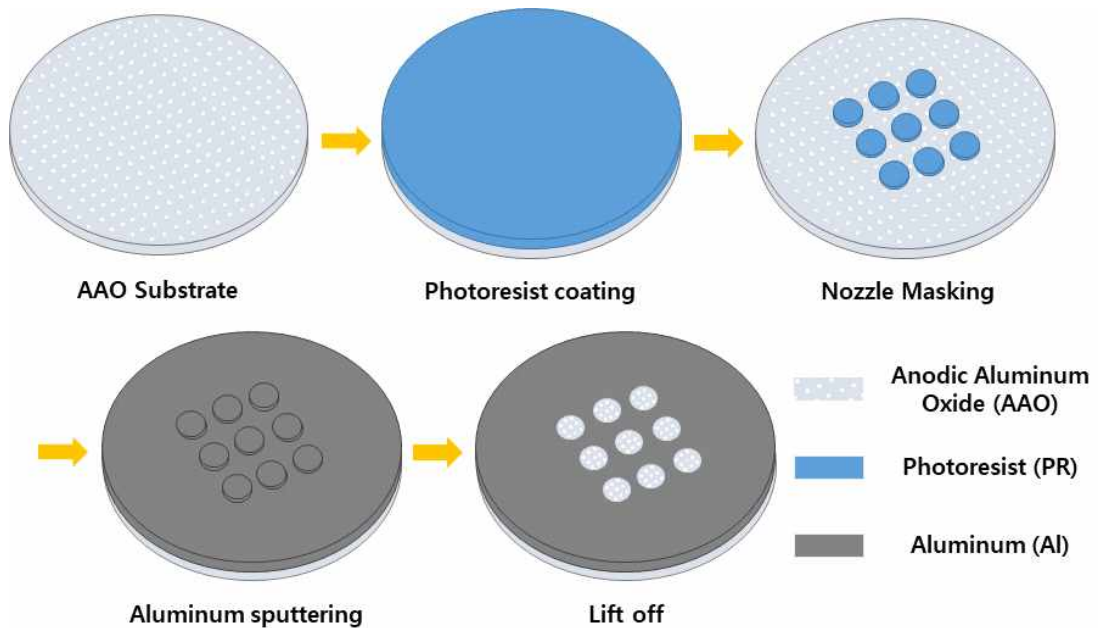


Fig. 2 Fabrication process of an AAO vibrating mesh for the ultra-fine ginsenoside atomizer.

재료 및 방법

1. 기존 미세입자 분무장치 분석 및 새로운 진동 메쉬 디자인

가장 많이 판매되는 기존 미세입자 분무장치인 OMRON社의 NE-U100 제품을 분석하여 이를 토대로 본 연구에서는 새로운 진동 메쉬를 디자인하였다. 기존 OMRON社의 NE-U100 제품에 사용한 진동 메쉬는 구멍 크기가 직경 10 μm 이며 간격은 60 μm 으로 측정이 되었다. 통상적으로 분무되는 에어로졸 입자의 직경은 노즐구멍 직경의 약 2배가 되어 노즐의 직경을 줄임으로써 입자의 직경을 작게 할 수 있다⁸⁾. 본 연구에서는 직경 2 μm 이하의 에어로졸 입

자를 형성하기 위해 노즐 구멍의 직경이 최소 1 μm 이하로 가져가야 하는 조건을 충족하기 위해 평균적으로 350nm의 다공(pore)을 가지는 AAO wafer를 InRedox社 (Longmont, CO, USA)에서 구매하였다. 이러한 다공에서 각자 분무되는 미세 입자들끼리 다시 결합하는 것을 막기 위해, 직경 5 μm 의 구멍을 가지고 각 간격이 기존 OMRON社와 비슷한 조건인 100 μm 의 간격을 가지는 알루미늄 박막을 형성할 수 있는 마스크를 디자인하였다.

2. Lift-off 공정을 통한 알루미늄 박막이 증착된 AAO 진동 메쉬 제작

Figure 2는 반도체 공정을 통해 간격 100 μm , 직경 5 μm 의 구멍을 가지는 알루미늄 박막을 다공성

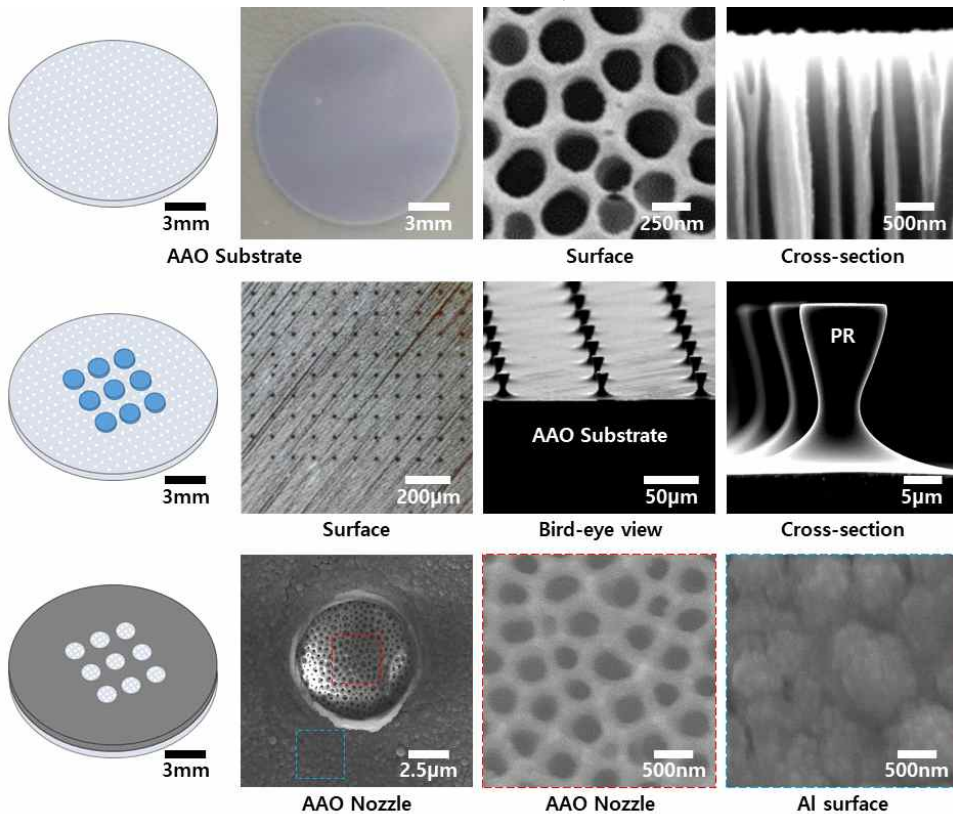


Fig. 3. Optical and SEM pictures of an AAO wafer(top). Optical and SEM pictures of patterned PR on the AAO wafer(middle). SEM pictures of the fabricated AAO vibrating mesh(bottom).

AAO wafer 위에 형성하는 제작 공정도이다. AAO wafer 위에 감광제인 photoresist(PR)을 도포하고 그 위에 디자인한 마스크를 통해 간격 100 μm , 직경 5 μm 을 가지는 PR 구조를 형성할 수 있도록 노광을 한다. 현상액을 통해 노광된 PR을 제거하고, 이후에 금속 박막을 증착할 수 있는 Sputter장비 (ULVAC社, SME-200E)를 통해 알루미늄 박막을 500nm 두께로 증착한다. PR이 없는 부위의 AAO wafer 영역은 500nm 두께의 알루미늄으로 인해 350nm의 다공이 모두 덮이고 약 20 μm 높이차를 가지는 PR에 증착된 알루미늄은 아세톤을 통해 lift-off하여 제거한다.

3. 각 공정 평가를 위한 전자 현미경 관찰

각 공정의 제작 여부를 평가하기 위해 단위 공정마다 주사 전자 현미경(scanning electron microscopy, SEM)을 통해 이미지를 촬영하였다. 사용한 주사 전자 현미경은 1.0nm의 해상도를 가지는 FEI社의 Nova Nano SEM 200을 이용하였다. 각각 촬영된 SEM 이미지는 원본 사진에서 중요 부위만 잘라 내고 각 실측에 맞는 눈금자를 표시하였다.

4. 진세노사이드 용액 샘플 제작

시중에서 판매하는 홍삼농축액 (6년근, 고품분 64%, 홍삼성분 70mg/g 이상, 국산) 30%를 포함하고 있는 인삼공사에서 판매하는 홍삼정 에브리타임 제품을 활용하여, 증류수 양액 0.01%의 샘플 20mL로 제작하였다. 분무하기 전의 진세노사이드 용액 샘플을 고성능 액체 크로마토그래피 시스템(Agilent 1260 HPLC system)으로 분석하여 각 성분의 대조군에 대한 데이터를 확보하였다.

5. AAO 진동 메쉬를 통한 진세노사이드 용액 분무 평가 방법

기존 OMRON社의 NE-U100 제품에서 본체의 진동 메쉬를 제거하고 본 연구에서 제작한 AAO 진동 메쉬를 장착하였다. 우선 증류수를 이용하여 AAO

진동 메쉬를 통해 에어로졸을 분무할 수 있는지 평가하였다. 증류수의 에어로졸이 반사가 잘될 수 있게 녹색 레이저 빛을 이용하여 분무를 평가하였다. 이후 증류수의 용액을 교체하여 용액을 담을 수 있는 통에 주사기를 통해 제작한 20mL의 진세노사이드 용액 샘플을 주입하였다. AAO 진동 메쉬를 통해 분무되는 용액의 에어로졸이 약 15mL의 양이 포집되었을 때 제품 조작을 멈추었다. 포집된 시료는 감압 농축 후 50% 에탄올 200 μL 로 녹여 고성능 액체 크로마토그래피 시스템으로 분석하였다.

결 과

1. Lift-off 공정을 통한 알루미늄 박막이 증착된 AAO 진동 메쉬 제작 평가

Figure 3는 각 단위 공정에 대응하는 광학 현미경 사진과 SEM 사진을 나타내고 있다. 가장 윗줄에 있는 그림들은 13mm 직경을 가지는 AAO wafer의 광학 현미경과 SEM을 통한 350nm 다공의 표면 사진과 각 다공의 단면 SEM을 나타낸다. 그 다음 줄에 나타난 그림들은 AAO wafer의 각 다공을 선택적으로 막을 수 있고 알루미늄 박막을 쉽게 lift-off할 수 있도록 하는 PR 패턴을 보여준다. 간격 100 μm 을 가지는 패턴을 광학 현미경 사진과 대각선으로 보이는 SEM 사진을 통해 확인할 수 있고, 직경 5 μm 을 가지고 높이는 약 20 μm 을 가지는 PR의 단면을 가장 오른쪽 그림에서 볼 수 있다. 아래 줄에는 최종적으로 500nm 두께를 가지는 알루미늄 박막을 증착하고 이후에 알루미늄을 lift-off하여 최종적으로 선택적인 350nm의 다공을 가지는 노즐(nozzle)을 만든 SEM 사진들을 보여준다. 아래 쪽 중간에 있는 SEM 사진의 빨간색 점선 부분은 PR로 알루미늄 도포를 막은 부분으로 350nm의 다공이 존재하는 부분이고, 파란색 점선 부분은 500nm 알루미늄 박막을 통해 350nm 다공을 덮은 부분이다. 이를 통해 선택적으로 나노미터의 구멍을 가지는 AAO 진동 메쉬가 최종적으로 잘 제작된 것을 확인하였다.

2. AAO 진동 메쉬를 통한 진세노사이드 용액 분무 평가 결과

제작된 AAO 진동 메쉬를 통해 증류수 에어로졸 발생을 녹색 레이저로 평가를 하였다. 초음파 진동자의 진동을 멈추었을 때는 녹색 레이저를 통해 반사되는 에어로졸이 보이지 않았으나, 초음파 진동자의 진동을 켜는 순간, 증류수의 에어로졸이 발생하였으며, Fig. 4의 위쪽 사진에서 보이는 것과 같이, 녹색 레이저에서 반사되는 에어로졸을 볼 수 있었다. 또한, 진세노사이드 용액을 분무하기 전의 액체 크

로마토그래피 분석 결과(Fig. 4A), 20S-Rg3, 20R-Rg3, Rg5와 같은 진세노사이드 성분이 검출되었으며, 이후 제작한 AAO 진동 메쉬를 통해 분무한 후에 포집된 표본에서도 동일한 성분의 진세노사이드를 검출할 수 있다는 결과가 나왔다(Fig. 4B).

고찰

350nm의 선택적 다공을 가지는 AAO 진동 메쉬를 통해 증류수 및 진세노사이드를 포함한 양액이 분무 되는 결과를 얻을 수 있었다. 실제로 형성되는

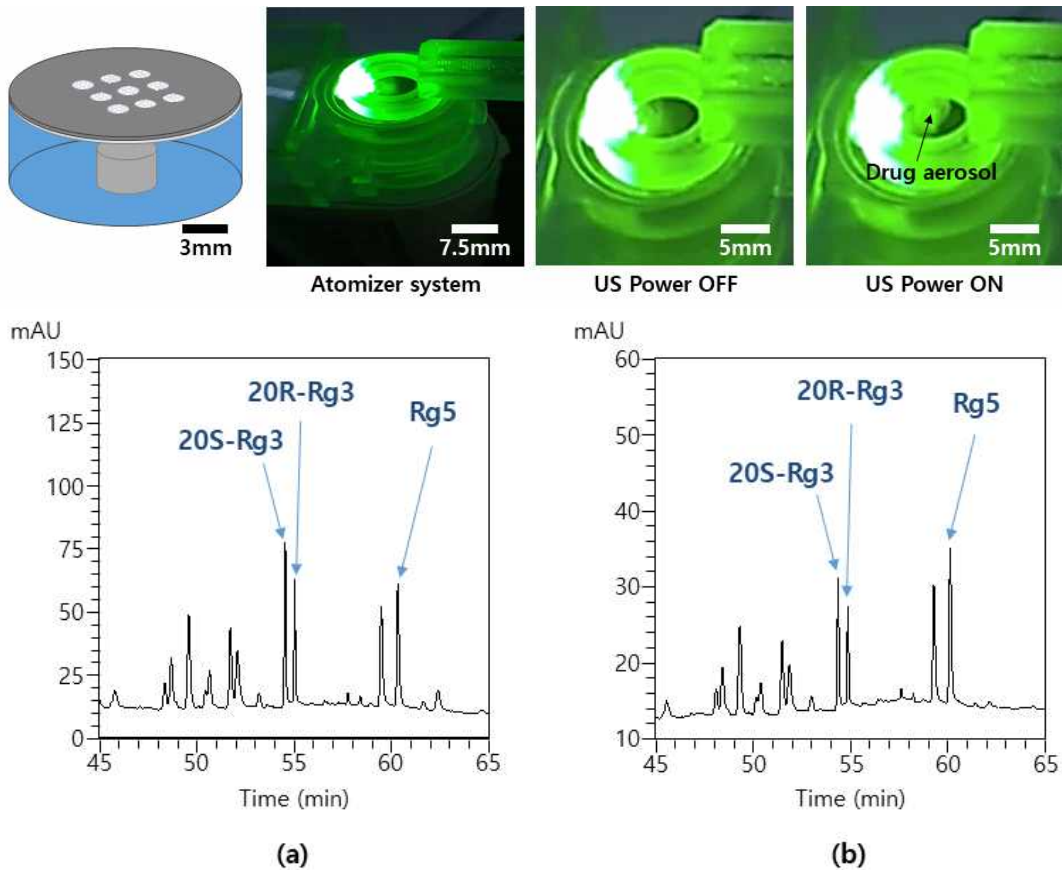


Fig. 4. Optical pictures of the atomizer system mounted on the NE-U100. Before powering on the ultrasonic transducer, no mist appeared on the surface of the AAO vibrating mesh. When the ultrasonic transducer was turned on, the mist cloud was generated from the AAO vibrating mesh. The HPLC chromatograms of the ginsenoside-containing sample before (a) and after (b) atomizing through the AAO vibrating mesh.

에어로졸의 크기인 mass median aerodynamic diameter(MMDA)를 측정하려고 시도하였으나, 100 μm 간격의 다공 노즐의 분포로 인해 분무 되는 양이 현저히 적어 측정에 실패하였다. 하지만, 액체 크로마토그래피를 통한 약액의 성분에 대한 변화가 거의 없다는 것을 확인할 수 있었으며, 20mL 전체 양에서 손실되는 현상은 분무 후 포집할 당시 완벽한 밀봉이 되지 않아서 발생한 오차로 추측된다. 또한, 용기 내에 용액의 수위가 낮은 경우, 초음파 진동자가 밀어낼 수 없어 용액 샘플 전부를 분무하여 포집할 수 없었다. 증류수의 분무현상을 보면, 측정되는 환경의 습도와 매우 밀접한 연관이 있다는 점을 발견할 수 있었다. 측정 시 이러한 오차를 줄이기 위해 항온항습실에서 측정을 수행하였으나, 여전히 25 $^{\circ}\text{C}$, 75%의 습도에도 불구하고 증류수의 에어로졸의 크기와 양으로 인해 포집률을 부착하지 않으면 눈에 보이지 않게 바로 증발 되는 현상을 관찰할 수 있었다. 이는 제작된 AAO 진동 메쉬를 통해 분무 되는 에어로졸의 크기가 1 μm 이하의 MMDA를 가진다는 방증으로 추측된다. 현재는 AAO 진동 메쉬의 다공 크기가 단일 크기인 350nm로 제작이 되었으나, AAO wafer의 다공 크기를 변화하여 각 에어로졸의 크기를 조절할 수 있게 하고 또한 분무량을 조절할 수 있도록 알루미늄 박막에 직경을 5 μm 에서 다양한 직경으로 변경할 예정이다. 또한 각 노즐의 개수가 결정되는 간격도 100 μm 에서 다양한 간격을 가지는 형태로 만들어 볼 예정이다. 앞서 이야기한 디자인들을 토대로 제작한 AAO 진동 메쉬를 통해 다양한 점도 및 성분을 가지는 약물의 분무를 시도해 볼 수 있을 것으로 기대된다. 이러한 실험을 통해, 특히, AAO 진동 메쉬의 다공 크기에 따라 선택적으로 분자량이 큰 물질이나 극성이 있는 약액 성분 등을 선택적으로 여과·분무가 동시에 된다면, 다양한 치료제 및 한방 의약품에 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

결론

본 연구는 균일한 미세 입자를 분무하기 위해 알루미늄 금속 박막을 증착한 AAO 진동메쉬를 이용한 미세입자 분무장치 제작에 관한 것으로, 기존의 진동메쉬 분무장치에 쓰이는 직경 5 μm 의 노즐 안에 350nm의 다공들을 형성하여 분무되는 입자의 크기를 줄이는 방법을 제시하였다. 특히, 호흡기 질환에 탁월한 효능을 가지는 진세노사이드 약액의 분무 실험에서는 대부분의 유효성분을 유지한 채 분무가 진행이 되는 것을 확인하였다. 아직은 직접적으로 측정이 되지는 않았으나, 간접적으로 진세노사이드 성분들을 포함한 매우 작은 입자의 에어로졸을 통해 환부인 폐에 직접적으로 전달이 가능할 것으로 보인다. 현재는 이러한 의료용 흡입기를 통한 직접적인 독성 평가를 동물 실험으로 수행하고 있으며, 다양한 방법을 통한 직접적인 MMDA 측정을 시도하고 있어, 향후 새로운 호흡기 질환의 치료 방법을 제시할 수 있는 기기로 개발이 될 것으로 생각이 된다.

감사의 글

- 본 연구는 과학기술정보통신부의 재원으로 한국연구재단 바이오·의료기술개발사업의 지원을 받아 수행된 연구입니다(NRF-2018M3A9G5075749).
- 본 연구는 정부 (과학기술정보통신부, 산업통상자원부, 보건복지부, 식품의약품안전처)의 재원으로 범부처전주기 의료기기연구개발사업단의 지원을 받아 수행된 연구입니다(KMDF_PR_20200901_0064).
- AAO 진동 메쉬의 제작은 한국과학기술연구원 마이크로나노랩에서 진행이 되었으며, 각 SEM 사진과 HPLC의 데이터는 한국과학기술연구원 특성분석센터에서 획득하였다.
- 본 연구를 위해 다양한 의료용 흡입기 정보 및 상용화 정보를 제공해주신 크루셀텍(주)에도 감사의 인사를 드립니다.

참고문헌

반 약물전달시스템 개발 최종 보고서, 2018

- 1) Mathers CD, Loncar D, Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. PLoS Medicine, 2006 ; 3(11) : e442(2011-2030).
- 2) National Heart L, and Blood Institute. Morbidity and mortality chartbook on cardiovascular, lung and blood diseases. Bethesda, Maryland: US department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, 2009.
- 3) 통계청. 2010년 사망원인통계 결과. 대전: 통계청, 2011.
- 4) Kim C, Yoo KH, Rhee CK, Yoon HK, Kim YS, Lee SW, Oh Y-M, Lee S-D, Lee JH, Kim K-J, Kim J-H, Park YB, Health care use and economic burden of patients with diagnosed chronic obstructive pulmonary disease in Korea. The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease, 2014 ; 18(6) : 737-743.
- 5) Shergis JL, Di YM, Zhang AL, Vlahos R, Helliwell R, Ye JM, Xue CC, Therapeutic potential of Panax ginseng and ginsenosides in the treatment of chronic obstructive pulmonary disease. Complementary Therapies in Medicine, 2014 ; 22 : 944-953.
- 6) Lee JH, Min DS, Lee CW, Song KH, Kim YS, Kim HP, Ginsenosides from Korean Red Ginseng ameliorate lung inflammatory responses: inhibition of the MAPKs/NF- κ B/c-Fos pathways. Journal of Ginseng Research, 2018 ; 42 : 476-484.
- 7) Carvalho TC, Peters JI, Williams RO 3rd, Influence of particle size on regional lung deposition --what evidence is there? International Journal of Pharmaceutics, 2011 ; 406(1-2) : 1-10.
- 8) 동국대학교 경주캠퍼스 산학협력단, 미세분무기술기