

퀴세틴 담지 나노캡슐을 함유한 알지네이트 스펀지의 제조 및 생리활성 특성

Preparation and Study of Bioactive Characteristics of Alginate Sponge Containing Quercetin-encapsulated Nanocapsules

*Corresponding author

Han Do Ghim
(hdghim@knu.ac.kr)

김우진, 시우슈원¹, 노현수², 이현주, 전재우, 김한도^{1*}

DYETEC연구원, ¹경북대학교 섬유시스템공학과, ²한국나노기술원

Woo Jin Kim, Shuwen Xu¹, Hyun Soo Noh², Hyun Ju Lee, Jae Woo Jeon and Han Do Ghim^{1*}

Korea Dyeing and Finishing Technology Institute, Daegu, Korea

¹Department of Textile System Engineering, Kyungpook National University, Daegu, Korea

²Korea Advanced Nano Fab Center, Suwon, Korea

Received_November 20, 2019

Revised_December 05, 2019

Accepted_December 13, 2019

Textile Coloration and Finishing

TCF 31-4/2019-12/341-353

©2019 The Korean Society of Dyers and Finishers

Abstract Quercetin is one of flavonoids widely distributed in the plants and well known to have antioxidants, antiinflammatory, antimicrobial properties. In this study, alginate sponge containing quercetin-encapsulated nanocapsules was prepared by miniemulsion polymerization, drying/crosslinking method and their bioactive characteristics were investigated. Alginate sponge containing quercetin-encapsulated nanocapsules were evaluated using a field emission scanning electron microscope(FE-SEM), a high performance liquid chromatography, cell viability, DPPH radical scavenging activity and antibacterial activity. The study indicates that alginate sponge containing quercetin-encapsulated nanocapsules had significant antioxidant, antiinflammatory and antibacterial activities. This study suggested that alginate sponge containing quercetin-encapsulated nanocapsules can be a potential candidate for medical materials.

Keywords nano capsules, quercetin, alginate sponge, antioxidant, antiinflammatory, antibacterial, cytotoxicity, medical material

1. 서 론

첨단 과학 산업분야에서 나노기술의 등장은 여러 산업에 큰 영향을 미칠 것으로 인식되어 많은 관심이 모아지고 있다. 섬유분야에서는 나노크기의 섬유제조가 가능한 전기방사 기술과 나노에서 마이크로 단위의 캡슐 합성기술이 이러한 관심을 받고 있다. 마이크로캡슐의 근본기술은 담지화(encapsulation)를 통해 불안정하거나 지속성이 약한 유효성분을 고분자, 세라믹 또는 유무기 복합체로 둘러싸거나 코팅하여 심물질(core material)을 보호하고 방출속도를 제어하는 기술이다¹⁾.

캡슐의 구성인자 중 벽물질(wall material)을 형성하는 재료로 멜라민, 스타이렌, 우레탄, 아크릴수지, 전분질, 젤라틴, 키토산과 같은 천연 또는 합성고분자를 사용하는 방법에 대하여 연구가 지속되고 있다.

최근에는 약물, 생리활성물질의 기능성 발현을 향상시키기 위하여 체내에서의 방출조절이나 생체이용률을 향상시키고자 하는 캡슐화기술 연구가 활발하게 진행되고 있으며, 나노기술이 발전함에 따라 다양한 천연 생리활성성분의 전달시스템으로써 나노입자를 이용하고자 하는 연구가 본격적으로 진행되기 시작했다²⁻⁵⁾.

나노캡슐의 장점은 일반적인 미세캡슐과 마찬가지로

불안정한 합성성분을 외부환경인 빛, 산소, 수분, 온도 등으로부터 보호할 수 있고 방출조절 및 생체효율을 증진시킬 수 있다는 것이다. 미세캡슐과 비교했을 때 유효성분을 내부에 포집한 상태로 세포 내로 유입될 수 있는 장점을 지니고 있어 세포 외부에서 유효성분을 방출시키는 기존의 캡슐보다 활성 유지 및 향상 효과가 우수하다고 알려져 있다⁶⁾. 나노캡슐을 제조하는 방법에는 유화, 현탁 등 다양한 중합방법이 사용되고 있지만 유화중합이 최근 가장 큰 주목을 받고 있는 방법 중 하나이다. 유화중합은 용매에 용해되는 계면활성제와 단량체를 혼합하여 유화액을 제조한 후 용매에 용해되는 중합개시제를 사용하여 라디칼중합을 수행하는 방법을 말한다. 유화중합에서 계면활성제는 임계미셀농도(critical micelle concentration; CMC) 이상에서 중합반응이 일어나는 장소로서 반응기의 역할을 하게 되며 개시된 라디칼과 용매 내의 단량체들이 미셀 내부로 확산해 들어와 중합이 수행된다. 이러한 유화중합은 대량생산에 적합하고 제조과정이 간단한 멜라민 벽물질 기반의 캡슐이 주로 상용화되어 있으나 최근 들어 멜라민에서 기인되는 포르말데히드가 유해물질로 지정됨에 따라 비멜라민계 벽물질인 스타이렌을 기반으로 한 캡슐을 나노크기로 제조하여 기능성물질 등을 서서히 방출하는 연구가 활발해지고 있다⁷⁾.

식물계에 널리 존재하는 폴리페놀계 화합물인 퀘세틴(querctin)은 다른 식물성물질보다 독성이 낮고 항염작용, 항산화작용이 우수하며 높은 생리활성을 가지고 있어 의료용 치료 목적의 원료로 점차 각광받고 있다⁸⁻¹⁰⁾.

그러나 퀘세틴의 다양한 장점에도 불구하고 매우 낮은 안정성 때문에 이를 개선하기 위한 다양한 노력이 요구된다¹¹⁻¹⁶⁾. 빛, 온도 및 산, 알칼리와 같은 외부의 다양한 조건에 의해 변하기 쉬운 화합물들을 보호하면서 효과적인 약물전달을 위해서는 앞서 설명한 캡슐의 담지화가 효과적일 것으로 판단된다.

본 연구에서는 퀘세틴을 담지한 나노캡슐을 창상피복재나 조직공학용 지지체 및 약물운반체 등 생의학적인 분야에 널리 이용되고 있는 재료인 알지네이트 스펀지에 적용시켜 나노캡슐의 방출거동, 항산화활성, 항염증활성, 항균성에 대해 알아보고 메디컬소재로서의 응용가능성을 연구하였다.

2. 실험

2.1 시료 및 시약

본 연구에서는 중합금지제를 제거한 스타이렌(Styrene, Dae-jung Chem., Korea)시약을 단량체 상태로 사용하였으며, 캡슐담지물질인 퀘세틴(Quercetin hydrate)과 가교제로 사용된 (Divinylbenzene, Sigma-Aldrich, USA)의 제품을, 공유화제로 사용된 n-hexadecane(Alfa Aesar, USA)의 제품을 사용하였다. 유화분산제는 비이온 계면활성제인 SDS(Sodium dodecyl sulfate, Dae-jung Chem., Korea)를 사용하였고 개시제는 AIBN(2,2-azobisisobutyronitrile, Junsei, Korea), 수상층 용매로 2차 증류수(Milipore, Mili-Qplus, France)를 사용하였다. 스펀지 제조에는 알긴산나트륨(Sodium alginate, Viscosity 375mPa.s, pH 6.7, Nanjing Xiangshengtai Industry CO., LTD., China)과 가교제인 염화칼슘(Calcium chloride, OCI Company Ltd., Korea)을 사용하였다.

2.2 나노캡슐 제조

퀘세틴 나노캡슐의 기본적인 함량과 제조방법은 Table 1 및 Figure 1에 나타내었다. 증류수에 계면활성제인 SDS를 넣은 A용액을 60℃에서 1시간 동안 300rpm에서 교반시켰다. 그리고 스타이렌, 퀘세틴, n-hexadecane 및 DVB를 넣은 B용액은 상온에서 1시간 동안 300rpm으로 교반시킨 후 A용액에 첨가하

Table 1. The standard recipe for the preparation of nanocapsule

A solution			B solution			Initiator
DI Water (g)	SDS (mol)	Quercetin (g)	n-hexadecane (mol)	Styrene (mol)	DVB (mol)	AIBN (mol)
80	0.8×10^{-4}	1	1.1×10^{-3}	0.173	2.0×10^{-3}	2.0×10^{-3}

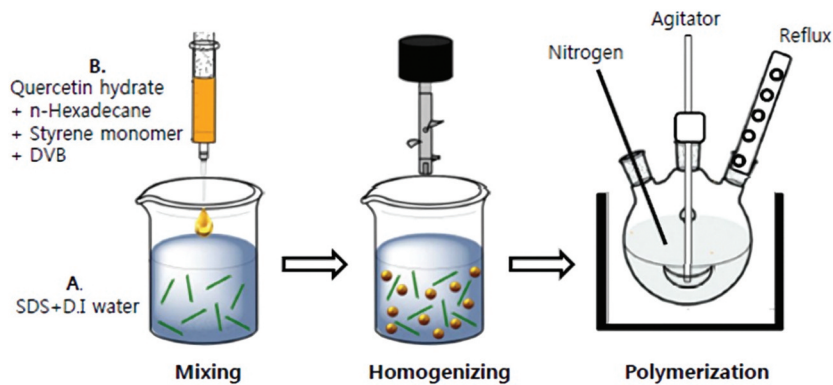


Figure 1. Experiment procedure of emulsion polymerization.

였다. 그 후 호모제나이저(IKA, T25 digital ULTRA TURRAX, Germany)를 사용하여 10분 동안 19000 rpm 속도로 균질화한 후 개시제를 첨가하고 60℃에서 5시간 동안 중합하여 나노캡슐을 제조하였다. 제조된 캡슐용액은 잔여 퀴세틴 제거를 위해 10000rpm에서 10분 동안 원심 분리한 후 상층액을 제거하고 동일한 양의 2차 증류수를 넣어주는 세정 과정을 3회 반복하였다.

2.3 알지네이트 스펀지 제조

분말형태의 알긴산나트륨 0.5, 1.0 및 1.5 wt% 농도(이하 농도 A, B, C)로 3차 증류수에 천천히 넣은 후 500 rpm으로 1시간 가량 충분히 교반하여 알긴산나트륨 수용액으로 만들었다. 제조된 알긴산나트륨 수용액에 퀴세틴 캡슐용액을 1.0, 3.0, 5.0 wt%(이하 농도 1, 2, 3) 첨가한 후 2시간 동안 충분히 교반하여 퀴세틴 나노캡슐이 함유된 알긴산나트륨 수용액을 만들었

다. 이를 패트리디쉬에 각각 15mL씩 담은 후 영하 20℃ 냉동고에서 24시간 얼리고 동결건조기(Lyophilizer, Labconco Co., USA)에 72시간 동안 건조시켰다. 1차 건조된 알지네이트 스펀지는 3.5% 염화칼슘으로 상온에서 3분 동안 가교시키고 3차 증류수로 1분 동안 세척하여 불순물을 제거하였다. 가교된 알지네이트 스펀지는 다시 한번 영하 20℃ 냉동고에서 24시간 급냉시킨 후 72시간 동결건조하여 퀴세틴 나노캡슐이 함유된 최종 알지네이트 스펀지를 제조하였다. 제조된 퀴세틴 나노캡슐 함유 알지네이트 스펀지의 사진을 Figure 2에 제시하였다.

2.4 퀴세틴 나노캡슐 입도 분석

합성한 퀴세틴 나노캡슐의 평균크기 및 입도분포를 측정하기 위해서 캡슐용액을 증류수에 희석하고 Electrophoretic light scattering spectro-photometer(Otsuka Electronics Co., ELS-8000,

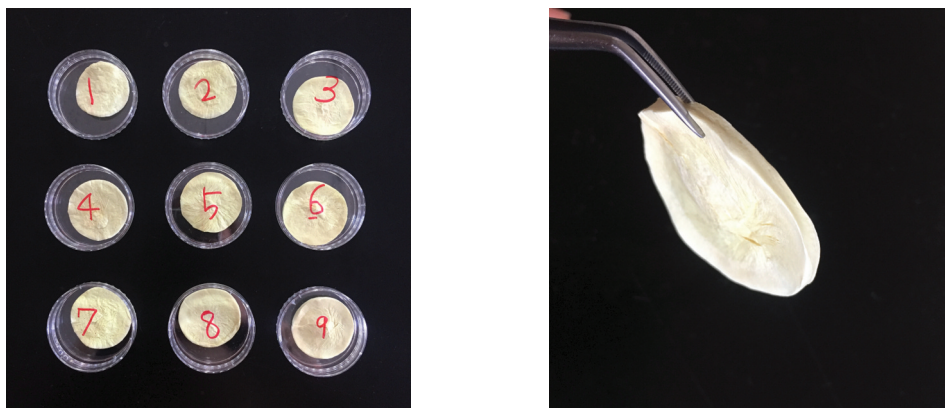


Figure 2. Images of alginate sponges containing quercetin-encapsulated nanocapsules.

Japan)를 사용해 입자크기 및 입도분포를 분석하였다. 캡슐의 화학적 구조는 Fourier-transform infrared spectrometer(FT-IR, PerkinElmer, Frontier, USA)를 이용해 확인하였으며, 캡슐용액을 원심분리 후 진공건조기에서 24시간 건조시킨 분말을 사용하여 분석하였다.

2.5 캡슐, 알지네이트 스펀지 형태 및 구조 확인

퀴세틴 나노캡슐 및 이를 함유한 알지네이트 스펀지의 형태 및 구조는 전계방사형 주사전자현미경(Field Emission Scanning Electron Microscope, FE-SEM)을 통해 확인하였다. 캡슐은 원심분리 후 진공건조기에서 건조시킨 분말을 사용하였으며 모든 시료는 백금 코팅 후 관찰하였다.

2.6 캡슐의 방출거동

퀴세틴의 특성피크와 방출거동을 확인하기 위해 UV-Visible Spectrophotometer(Shimadzu Co., UV-1700, Japan)를 사용하여 최대흡수파장 및 농도에 따른 표준검량선을 작성하였다. 그리고 80mL의 PVA 용액에 제조된 알지네이트 스펀지를 넣은 후 300 rpm으로 교반시키며 상온에서 21일 동안 정해진 시간을 간격으로 0.4mL씩 채취 후 High performance liquid chromatography(HPLC, Younglin, UV730D, Korea)를 사용하여 퀴세틴 특성피크에서 나타난 흡수 피크의 비를 미리 작성된 검량선과 비교하여 방출량을 확인함으로써 방출거동을 알아보았다.

2.7 세포독성 분석

평가에 사용된 피부섬유아세포(Human skin fibroblasts, ATCC® CRL-2522)는 10wt% FBS(fetal bovine serum)와 1wt% penicillin-streptomycin을 포함한 MEM(Minimum Essential Medium Eagle)에서 37°C, 5wt% CO₂ 조건하에 계대배양하여 사용하였다. MEM배지에서 알지네이트 스펀지 시료를 24시간 동안 용출하는 방식으로 실험용액을 조제하였으며, 배양된 세포는 세포농도가 1.0×10⁵개가 되도록 조정 한 다음 96-well plates에 각각 접종하였다. 24시간 동안 배양 후 기존배지는 제거하고 세포생존율을 측정하기 위해 시약 처리한 MTS 용액(3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-

2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt) 20uL와 배지 80uL, 총 100uL씩을 투여하고 37°C의 조건 하에 인큐베이터에서 3시간 동안 배양 후 ELISA reader(Multiskan™ FC Microplate Photometer, Thermo Scientific™, USA)로 490nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.8 항산화성 평가

퀴세틴 나노캡슐을 함유한 알지네이트 스펀지의 항산화 활성을 측정하기 위해 DPPH(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) assay를 실시하였다. 준비된 DPPH 용액을 10mL씩 퀴세틴 나노캡슐을 함유하지 않은 control을 포함하여 각각 시료에 처리하였으며, 양성대조군인 퀴세틴은 1mM 농도로 DMSO에 용해시킨 후 1mM 퀴세틴 500uL에 DPPH 용액 9500uL를 처리하였다. 그리고 퀴세틴의 vehicle control로서 500uL DMSO에 마찬가지로 DPPH 용액 9500uL를 처리하였다. 처리된 시료는 90분간 실온의 어두운 곳에서 반응시킨 후 96-well plates에 반응시킨 용액을 50uL씩 옮기고 95% 에탄올을 150uL씩 첨가한 뒤 microplate reader를 이용하여 517nm에서 흡광도를 측정하고 아래와 같은 식(1)으로 DPPH radical scavenging activity를 계산하였다.

$$DPPH\ radical\ scavenging\ activity(\%) = \frac{1 - (O.D_{517\ of\ A})}{O.D_{517\ of\ B}} \times 100 \dots\dots\dots (1)$$

where,
 O.D₅₁₇ of A : Absorbance of samples
 O.D₅₁₇ of B : Absorbance of control

2.9 항염증성 평가

알지네이트 스펀지 내 퀴세틴 나노캡슐이 가지는 항염증 활성을 측정하기 위해 nitric oxide assay를 실시하였다. 먼저 증류수에 30%로 희석한 아세트산 300mL에 1-naphthylamine 3g, sulfanilic acid 2g을 용해시킨 Griess 시약을 준비하였다. 양성대조군인 퀴세틴과 control을 포함한 각 시료에 DMSO를 첨가하고 실온에서 20분간 방치 후 100uL씩 e-tube에 옮기고 2.5mM, pH 1.2로 조정 한 NaNO₂용액을

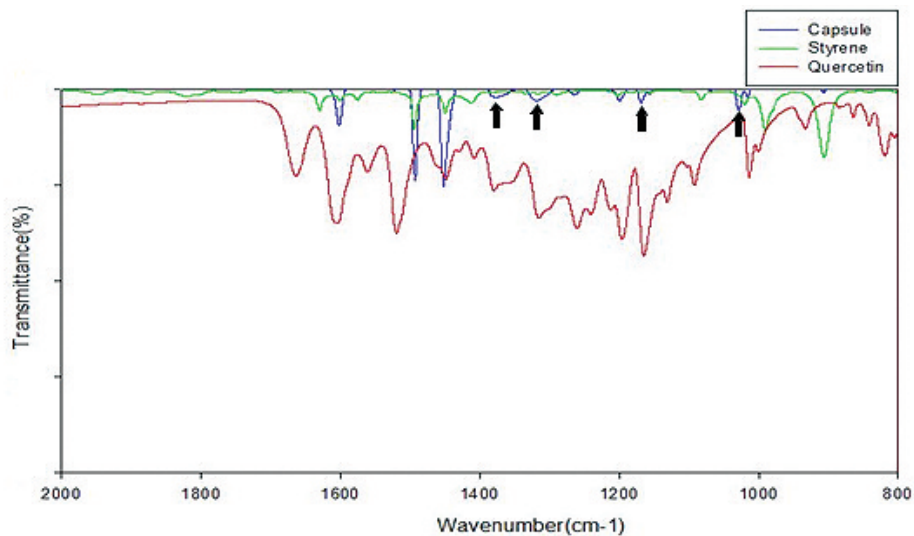


Figure 3. FT-IR spectra of quercetin-encapsulated nanocapsules, styrene monomer and quercetin hydrate.

400 uL씩 첨가하여 vortexing하고 실온에서 1시간 동안 방치한 후 새로운 e-tube에 반응액을 50uL씩 옮기고 준비된 Griess시약을 950uL씩 첨가하여 다시 vortexing하였다. 96-well plates에 well당 100uL 옮긴 후 Microplate reader기를 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정하고 항산화성 평가와 같은 방식으로 Nitric oxide scavenging activity를 계산하였다.

2.10 항균성 평가

항균성 평가에는 포도상구균(*Staphylococcus aureus*, ATCC 6538)과 폐렴간균(*Klebsiella pneumoniae*, ATCC 4352)를 사용하였다. 보존 균주를 뉴트리엔트 배지 10mL에 이식하고 인큐베이터에서 하루 동안 배양하였으며, 배양된 균을 20배로 희석한 뉴트리엔트 배지를 접종액으로 하였다. 대조편과 시험편을 같은 크기로 각각 0.4g씩 준비 후 배양된 공시균 0.2mL를 대조편과 시험편이 들어있는 시험관에 접종하여 37°C에서 24시간 동안 배양시켰다. 18시간 배양한 대조편과 시험편을 중화시킨 후 식염수로 균액을 희석하고 페트리디쉬에 골고루 떨어뜨린 다음 한천 배지 (NA)를 부어 37°C에서 24시간 배양 후 생균수와 균 감소율을 아래와 같이 식(2)에 계산하였다.

$$Growth\ inhibition\ rate(\%) = \frac{M_b - M_c}{M_b} \times 100 \dots\dots\dots (2)$$

where,

M_b : Total microbial count of control

M_c : Total microbial count of samples

3. 결과 및 고찰

3.1 퀴세틴 나노캡슐의 구조 및 입도

제조된 나노캡슐의 형성구조를 확인하기 위하여 FT-IR을 이용하였다.

Figure 3은 스타이렌, 퀴세틴 및 퀴세틴을 함유시킨 스타이렌 나노캡슐의 FT-IR 흡수스펙트럼을 나타낸 것이다. 벽물질인 스타이렌의 방향족 C=C 신축진동은 1600cm⁻¹~1450cm⁻¹에서 진동피크를 가지는 것으로 나타났다. 제조된 나노캡슐의 경우 퀴세틴, 스타이렌과 비교하였을 때 1372cm⁻¹~1167cm⁻¹부분에서 스타이렌에서 나타나지 않은 페놀 OH의 작은 굽힘진동이 단량체인 스타이렌 흡수스펙트럼보다 큰 흡수강도로 나타난 것을 확인하였는데, 이러한 결과로부터 심물질로 사용된 퀴세틴이 벽물질로 사용된 스타이렌 내부에 함유되었음을 확인할 수 있었다.

Figure 4는 입도분석기를 이용하여 측정한 퀴세틴 나노캡슐의 평균크기 및 크기별 분포도를 나타낸 것으로 측정결과 평균크기 181.9±66.5nm를 나타내었다. 1900nm 부근에서 나타난 피크의 경우 캡슐이 나노사이즈로 제조됨에 따라 반데르발스 힘 등에 의해 일부가 회합하여 나타난 것으로 생각된다.

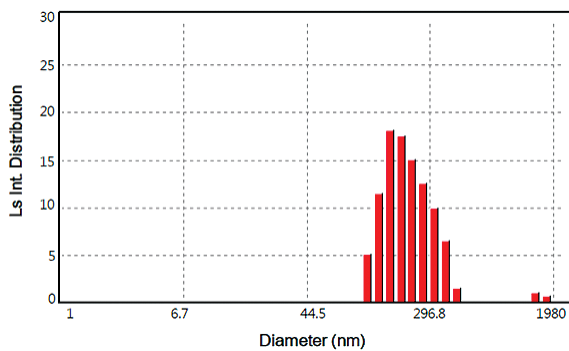


Figure 4. Particle size and distribution of quercetin-encapsulated nanocapsules.

3.2 캡슐, 알지네이트 스펀지 형태 및 구조 확인

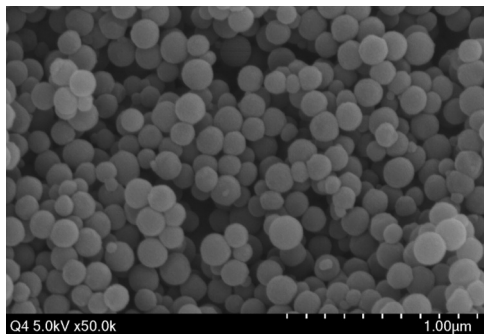
퀴세틴 담지 스타이렌 나노캡슐과 알지네이트 스펀지의 SEM 분석결과를 Figure 5에 나타내었다. 이미지에서 볼 수 있듯이 캡슐의 경우 표면이 매끄럽고 균일하며 고른 구형의 나노사이즈 캡슐이 형성되는 것을

확인할 수 있었다. 각 농도별로 제조된 알지네이트 스펀지의 경우 각각의 스펀지에서 다공이 잘 형성되어 있으며, 다공 대부분이 상호 연결되어 있고 3차원적 다공 구조가 스펀지 매트릭스 전반에 형성되어 있었다. 그러나 알지네이트 농도가 높아질수록 전반적으로 다공 크기 및 다공의 분포가 작아지는 것이 확인되었는데, 이는 농도가 높아질수록 스펀지의 밀도가 높아졌기 때문으로 사료된다.

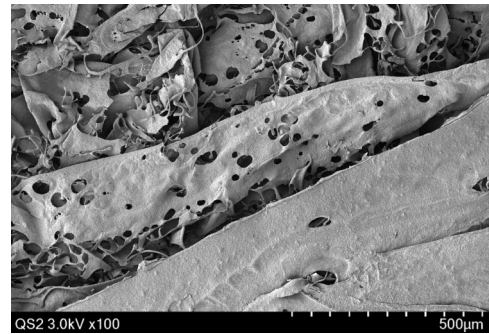
Figure 6은 각 농도별 알지네이트 스펀지의 나노캡슐 함유 형태를 나타낸 것으로써 캡슐의 농도가 증가함에 따라 알지네이트 스펀지 표면에 다량의 캡슐이 포함되어 있는 것을 확인하였다.

3.3 캡슐의 방출거동 결과

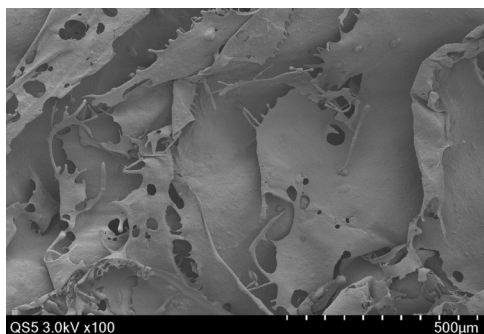
퀴세틴 나노캡슐이 함유된 알지네이트 스펀지의 방출거동을 알아보기 위하여 UV-Visible 분광광도계를 이용하여 심물질인 퀴세틴의 특성피크를 확인하였다. 퀴세틴의 분석 가능한 최대흡수파장은 225nm에서 얻



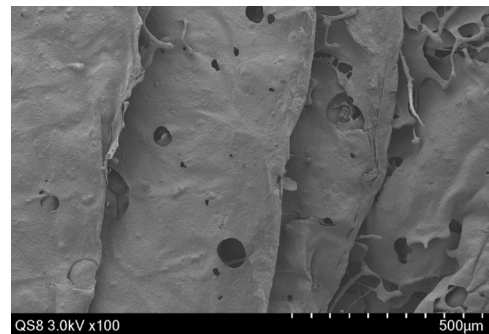
(a)



(b)



(c)



(d)

Figure 5. SEM images of (a) quercetin-encapsulated nanocapsules, (b) 0.5 wt% alginate sponge, (c) 1.0 wt% alginate sponge and (d) 1.5 wt% alginate sponge.

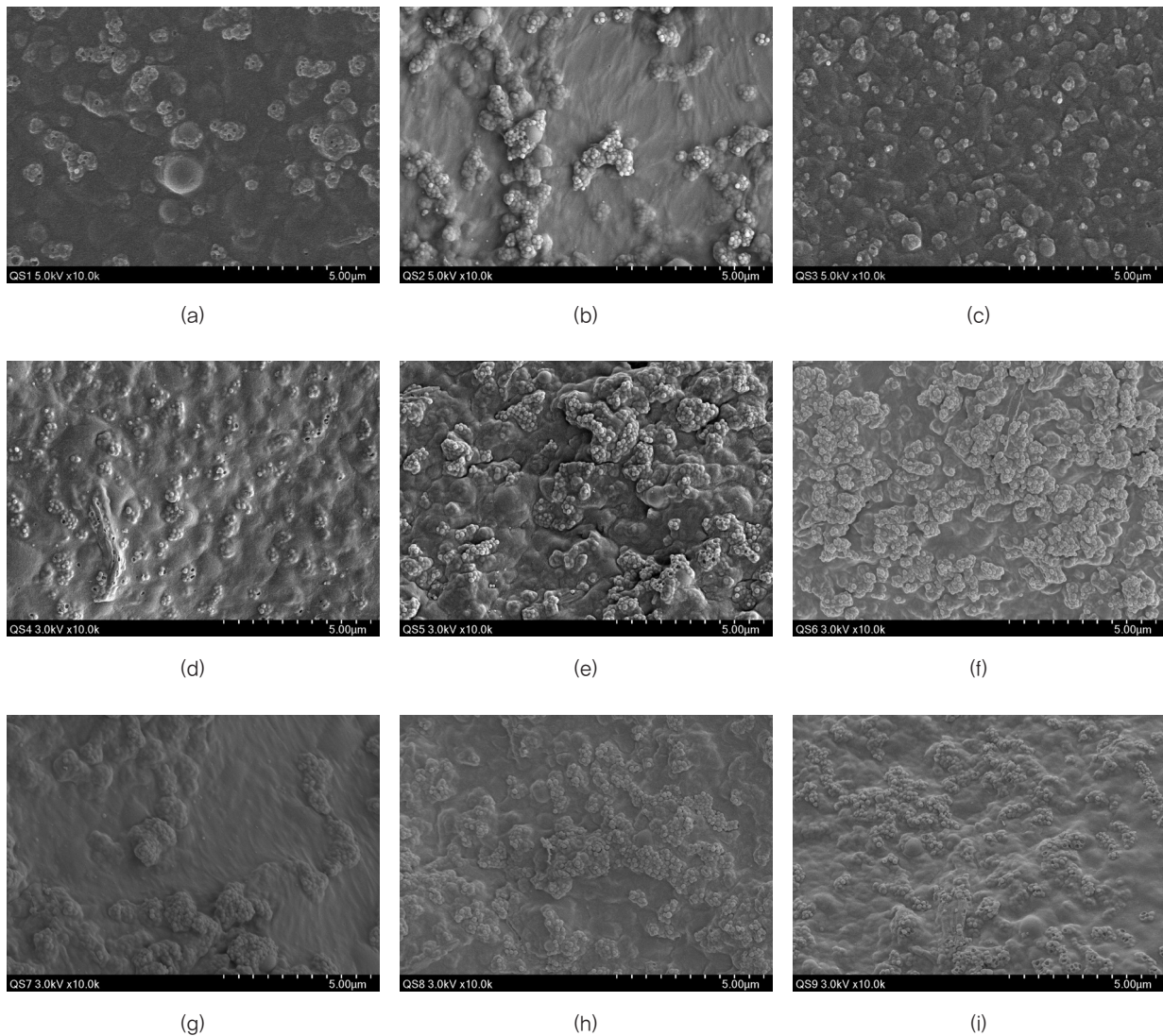


Figure 6. SEM images of 0.5 wt% alginate sponges containing (a) 1.0 wt% (b) 3.0 wt% (c) 5.0 wt% quercetin-concapped nanocapsules, 1.0 wt% alginate sponges containing (d) 1.0 wt% (e) 3.0 wt% (f) 5.0 wt% quercetin-concapped nanocapsules and 1.5 wt% alginate sponges containing (g) 1.0 wt% (h) 3.0 wt% (i) 5.0 wt% quercetin-concapped nanocapsules.

어지는 것을 확인하였고 HPLC를 이용해 용출된 퀴세틴의 양을 정량함으로써 심물질의 방출특성을 조사하였다(Figure 7).

본 실험에서는 알지네이트 스펀지의 각 농도별 퀴세틴 나노캡슐의 함량을 제어하여 이에 따른 방출거동을 Figure 8~Figure 10에 비교하여 나타내었다. 방출거동을 살펴보면 초기부터 24시간까지는 퀴세틴의 방출이 빠르게 진행되며 약 72시간 이후부터 방출량이 서서히 감소되는 것으로 나타났는데, 이는 일부 불안정하게 형성된 나노캡슐과 세정 후에도 입자의 표면에 극미량 남아있던 퀴세틴으로 인해 초기방출이 빠르게 나타

났으며 이후에는 안정된 것으로 생각된다.

Figure 8은 주어진 시간동안 1.0wt%의 퀴세틴 나

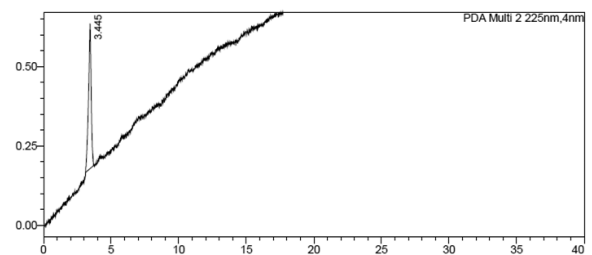


Figure 7. HPLC chromatogram for quercetin hydrate.

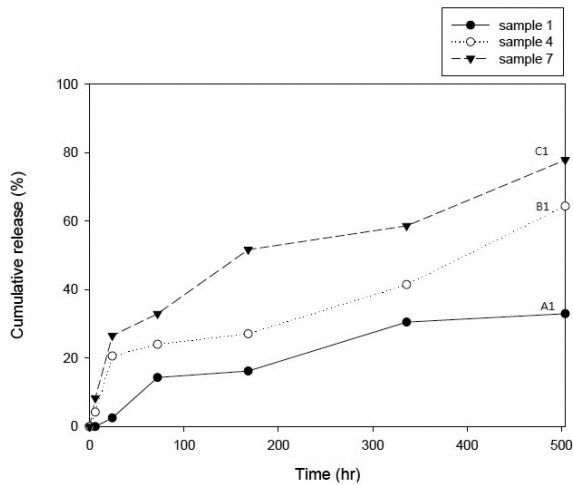


Figure 8. Cumulative release(%) of 1.0 wt% quercetin-encapsulated nanocapsules from (A1) 0.5 wt%, (B1) 1.0 wt% and (C1) 1.5 wt% alginate sponge.

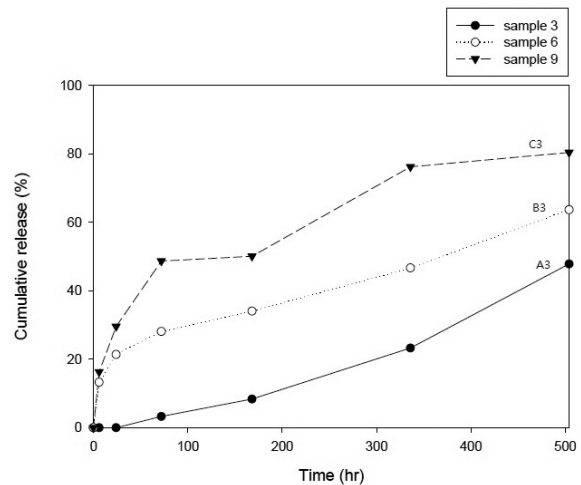


Figure 10. Cumulative release(%) of 5.0 wt% quercetin-encapsulated nanocapsules from (A3) 0.5 wt%, (B3) 1.0 wt% and (C3) 1.5 wt% alginate sponge.

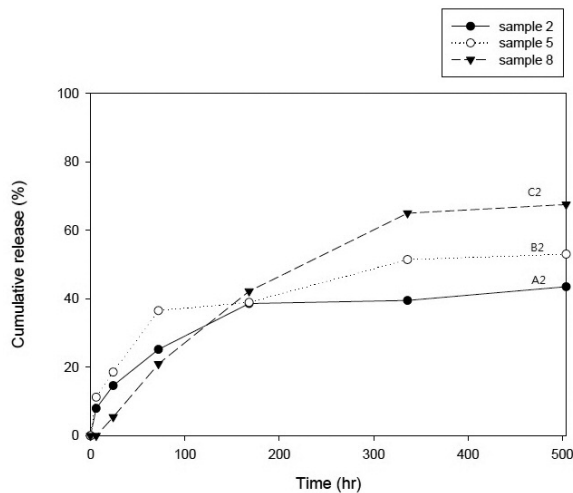


Figure 9. Cumulative release(%) of 3.0 wt% quercetin-encapsulated nanocapsules from (A2) 0.5 wt%, (B2) 1.0 wt% and (C2) 1.5 wt% alginate sponge.

노캡슐이 함유된 알지네이트 스펀지의 농도에 따른 방출거동 변화를 나타낸 것이다. 다공이 많이 형성된 0.5wt% 알지네이트 스펀지가 외부의 영향을 많이 받아 누적방출량이 가장 높을 것으로 예상하였으나 오히려 알지네이트 스펀지의 농도가 낮을수록 누적방출량이 적은 것으로 확인되었다.

Figure 8~Figure 10을 통해 동일한 알지네이트 스펀지 농도에서 퀘세틴 나노캡슐의 농도 변화에 따른 방출거동을 살펴보면, 퀘세틴 나노캡슐의 농도가 높아짐에도 같은 농도의 알지네이트 스펀지의 경우 누적방출

량의 경향이 유사하게 나타났다. 이러한 결과를 토대로 보았을 때, 퀘세틴 나노캡슐의 방출거동은 캡슐의 농도보다 알지네이트 스펀지의 농도에 의존하는 것으로 생각되며, 퀘세틴의 방출을 느리게 제어하여 총 방출시간을 증가시키기 위해서는 알지네이트의 농도가 낮은 것이 좋을 것으로 예상된다.

3.4 세포독성 분석 결과

실험에 사용된 알긴산나트륨 및 퀘세틴 나노캡슐의 농도에 따른 세포독성을 알아보기 위하여 피부 섬유아 세포를 이용한 MTS assay를 진행하였다. MTS assay의 경우 시료가 control값에 비교하여 80% 이상의 생존율을 가지면 의료적으로 사용되는 분야에 대해 독성이 없다고 정의할 수 있는데, 측정결과 0.5wt% 알지네이트 스펀지에서 퀘세틴 캡슐 농도별로 각각 147.7%, 145.0%, 147.8%, 1.0wt% 알지네이트의 농도에서는 102.1%, 103.5%, 132.0%, 1.5wt% 알지네이트 스펀지에서는 105.9%, 83.9%, 88.0%의 생존율을 나타내었다. 알지네이트의 농도가 높아질수록 세포의 평균생존율이 낮아지기는 하였으나 모든 시료에서 80% 이상의 세포생존율을 나타내는 것을 확인하였다(Figure 11).

3.5 항산화성 평가 결과

퀘세틴 나노캡슐을 함유하고 있는 알지네이트 스펀

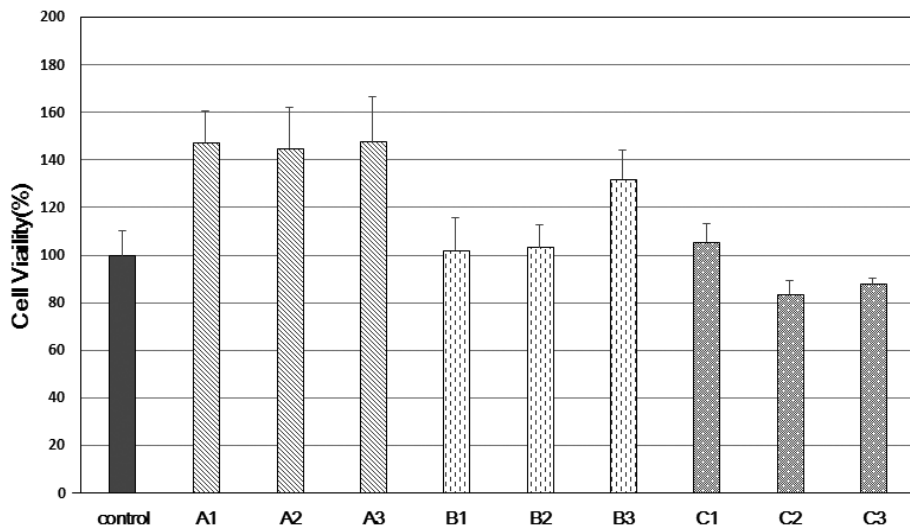


Figure 11. Cell viability of control(cell) and alginate sponges containing quercetin-encapsulated nanocapsules on human skin fibroblast.

지에 대한 항산화 활성은 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)에 대한 전자공여능(electron donating ability)으로 추출물에 대한 환원력을 측정하였다. 즉 추출액에 DPPH 용액을 넣고 실온에서 일정 시간 방치 후 517nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 라디칼 소거법은 항산화물질의 전자공여능으로 인해 방향족화합물 및 방향족아민류에 의해 환원되어 에탄올용액에서 짙은 보라색을 띠다가 항산화 활성을 갖는 물질을 만나면 노란색으로 탈색되며 흡광도가 감소되

는 지표로 항산화 활성도를 나타내는 척도로 이용된다. control을 포함한 각 시료에 관한 자유라디칼의 소거 활성을 측정한 결과를 Figure 12에 나타내었다. 각 농도별 알지네이트 스펀지에서 퀴세틴 캡슐의 함유량이 증가할수록 모두 농도의존적으로 radical scavenging activity가 증가하였으며, 이를 통해 퀴세틴 캡슐의 농도가 높아질수록 항산화 성능이 향상된 것을 확인하였다.

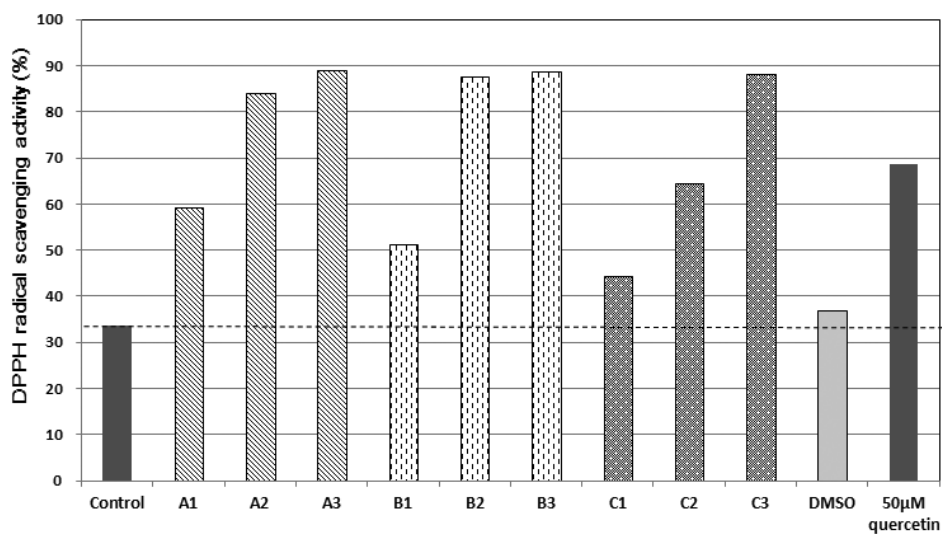


Figure 12. DPPH free radical scavenging ability of control(alginate sponge only) and alginate sponges containing quercetin-encapsulated nanocapsules.

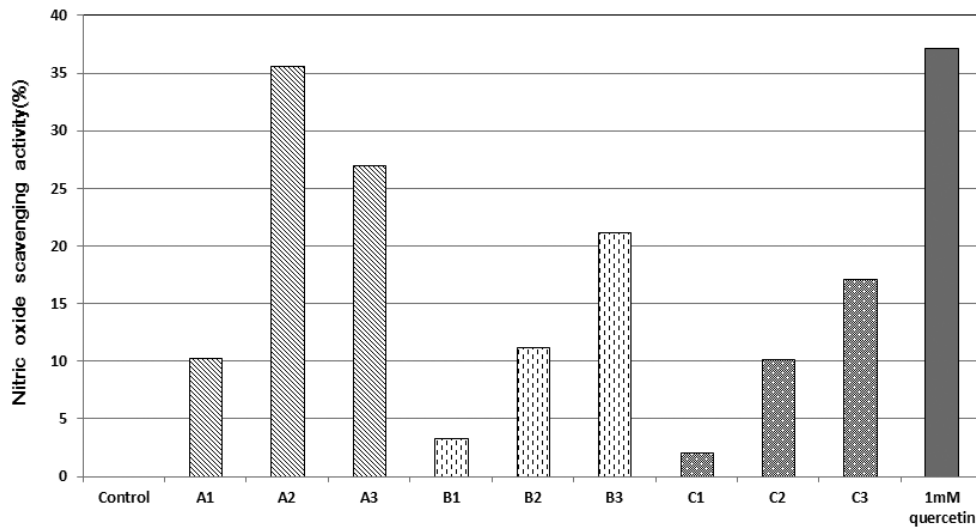


Figure 13. Nitric oxide scavenging activity of control(alginate sponge only) and alginate sponges containing quercetin-encapsulated nanocapsules.

3.6 항염증성 평가 결과

Nitric oxide assay를 통해 항염증 활성을 측정한 결과 Figure 13에서 나타나듯이 퀴세틴 캡슐의 농도가 높아질수록, 알긴산나트륨의 농도가 낮아질수록 항염증 활성이 높아지는 경향을 확인하였다. 또한 control 시료에 대비하여 모든 시료에서 NO의 생성을 유의적으로 감소시키는 것으로 나타나 퀴세틴 담지 나노캡슐을 함유한 알지네이트 스펀지가 나노캡슐을 함유하지 않은 알지네이트 스펀지와 비교하여 약리적인 현상으로 항염증효과를 나타냄을 확인하였다.

3.7 항균성 평가 결과

퀴세틴 나노캡슐을 함유한 알지네이트의 항균성능 발현을 확인하기 위하여 대조편과 시험편 스펀지의 포도상구균 (*Staphylococcus aureus*)과 폐렴간균 (*Klebsiella pneumoniae*)에 대한 항균성을 측정하여 비교하였다.

Figure 14와 Figure 15는 두 가지 균주에 대한 각 농도별 퀴세틴 나노캡슐 함유 알지네이트 스펀지의 항균성시험 진행 후의 사진이다. 24시간 후 control을 제외한 모든 시료에서 두 가지 균주에 대한 균감소율이 99.9%로 나타났으며 농도간의 유의성 있는 차이는 나타나지 않아 퀴세틴 나노캡슐을 함유한 알지네이트 스펀지의 항균력이 우수하다는 것을 확인하였다.

4. 결 론

본 연구에서는 안정성에 한계점을 가지는 퀴세틴을 안정화시키기 위한 기술로서 퀴세틴을 나노캡슐로 제조하여 생체적합성과 생분해성이 우수한 천연고분자인 알긴산나트륨과 혼합하여 동결건조법으로 스펀지를 제조하였으며 알지네이트 스펀지 제조 시 알긴산나트륨의 농도에 따른 나노캡슐의 방출거동, 세포독성, 항산화성, 항염증성 및 항균성을 알아보았다.

분석을 통해 유화중합법에 의해 제조된 스타이렌 나노캡슐이 부드러운 표면을 갖는 구의 형태를 가지며, 내부에 퀴세틴을 담지하고 있는 것을 확인하였다. 또한 알긴산나트륨에 캡슐용액을 첨가함으로써 다량의 캡슐이 스펀지에 도입되는 것을 확인하였다. 퀴세틴 담지 나노캡슐을 함유한 알지네이트 스펀지의 경우 나노캡슐을 함유하지 않은 알지네이트 스펀지에 비해 우수한 세포생존율, 항산화성, 항염증성 및 항균성을 가지는 것을 확인하였으며, 3가지 농도군에서 가장 낮은 농도인 0.5wt% 알지네이트 스펀지에서 가장 지속적인 방출거동 및 높은 항산화활성, 항염증활성을 가지는 것을 확인할 수 있었다.

따라서 알긴산나트륨의 농도를 조절하여 나노캡슐의 효능발현 및 방출속도를 제어하여 적절한 성능을 나타내는 의료용 소재로서의 응용가능성을 확인하였다.

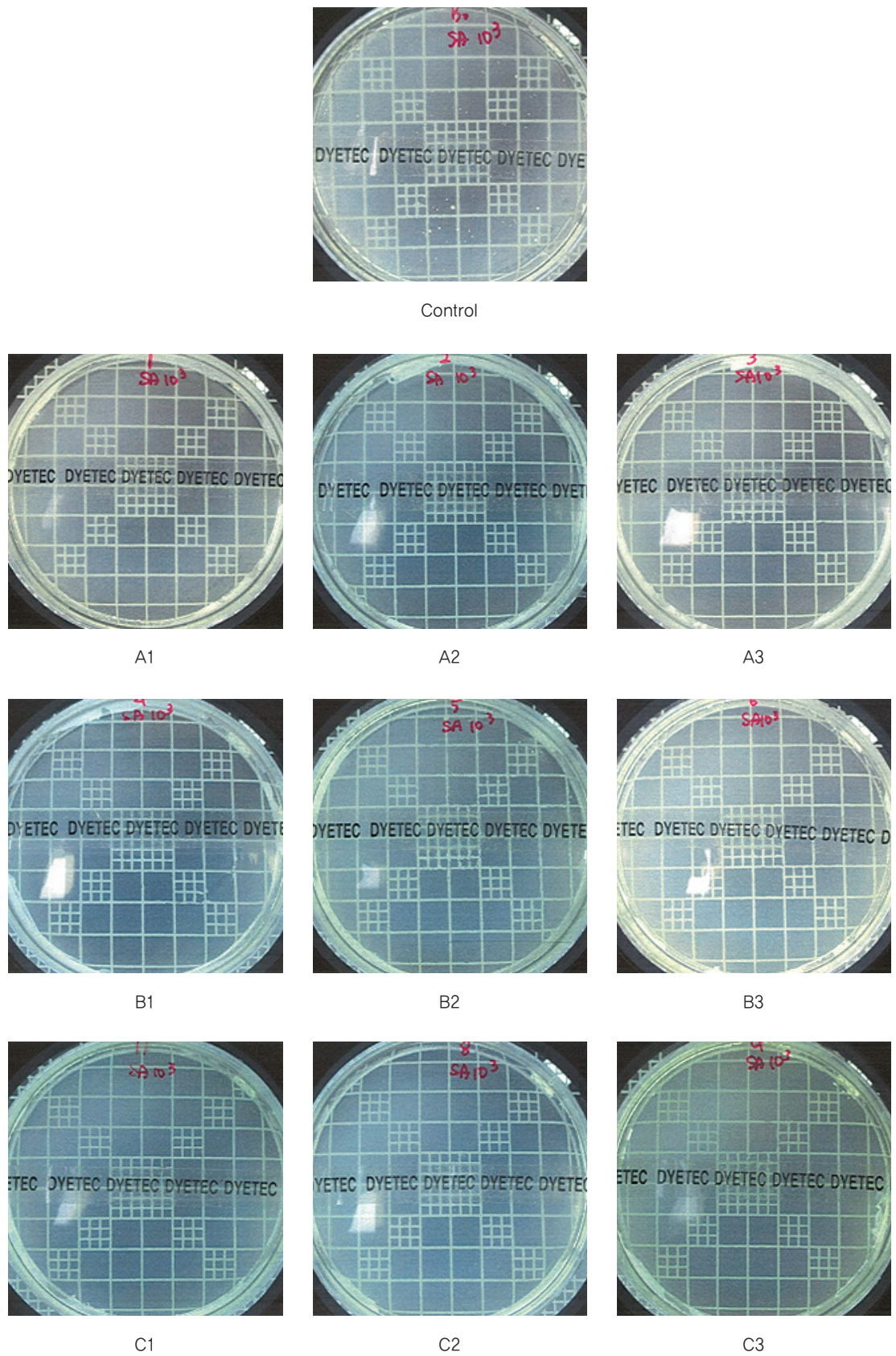


Figure 14. Antibacterial activity of alginate sponge containing quercetin-encapsulated nanocapsules against *S.aureus*.

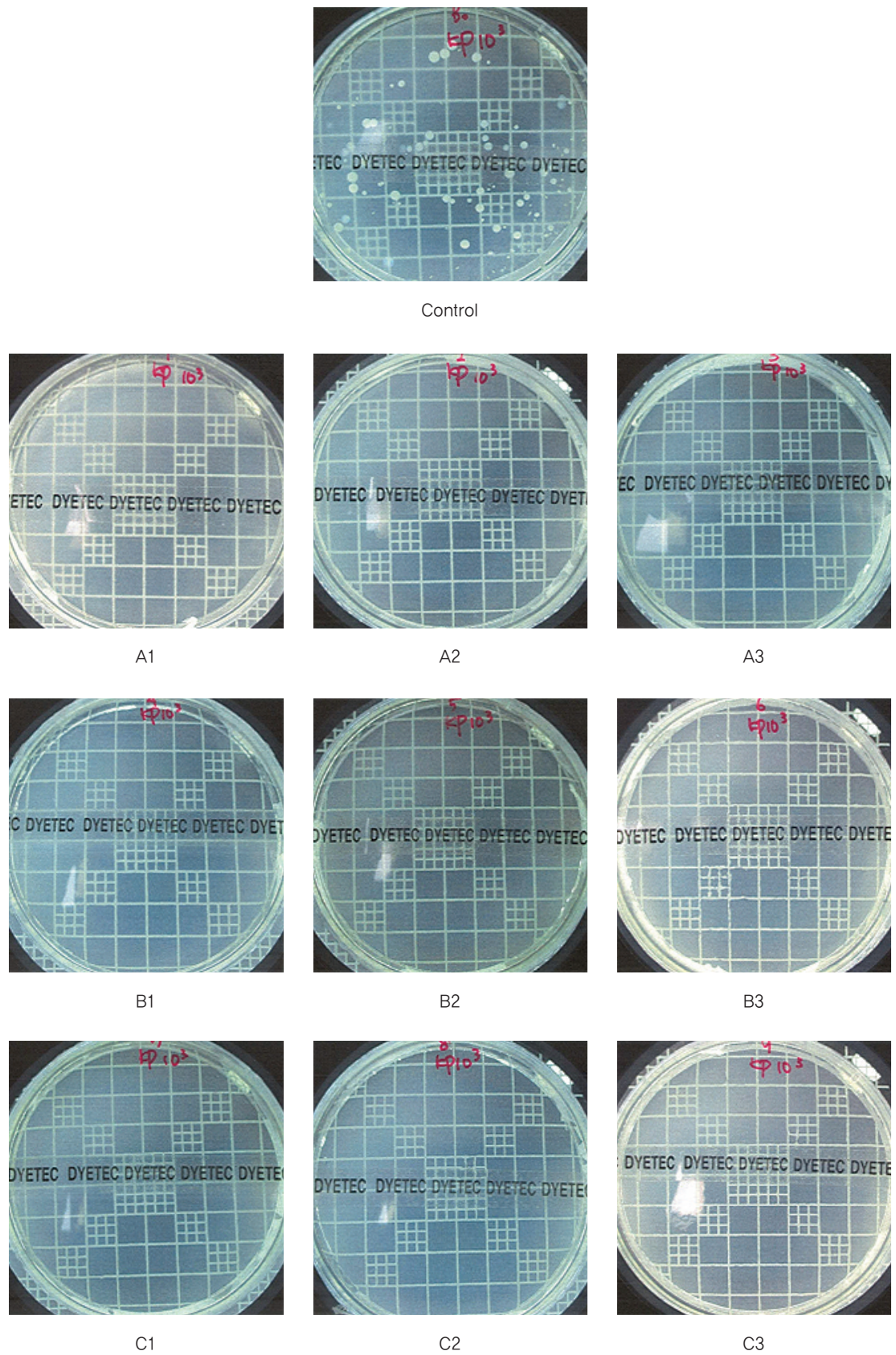


Figure 15. Antibacterial activity of alginate sponge containing quercetin-encapsulated nanocapsules against *K.pneumonie*.

감사의 글

본 연구는 산업통상자원부 “창의산업전문기술개발 사업”으로 수행된 연구의 일부 결과입니다(과제번호 : 10076598, 과제명 : 향산화물질을 적용한 마이크로 캡슐레이션을 통해 수면 중 인체 내, 외 노화 지연 건강 고기능성 프리미엄 칩구류 개발).

References

1. V. Rodriguez, H. Scott, A. Hoffman, P. Stayton, X. Li, and S. Pun, Encapsulation and Stabilization of Indocyanine Green within Poly(Styrene-Alt-Maleic Anhydride) Block-Poly(Styrene) Micelles for Near-Infrared Imaging, *J. of Biomedical Optics*, **13**(1), 10(2008).
2. S. J. Park, Y. J. Yang, and H. B. Lee, Effect of Acid-Base Interaction Between Silica and Fragrant Oil in the PCL/PEG Microcapsules, *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, **38**(1/2), 35(2004).
3. S. J. Park and S. J. Seok, Release Behaviors of Poly(ϵ -caprolactone)/Poly(ethyleneimine) Microcapsules, *Korean Chem. Eng. Res.*, **43**(4), 482(2005).
4. L. Qi, Z. Xu, X. Jiang, C. Hu, and X. Zou, Preparation and Antibacterial Activity of Chitosan Nano Particles, *Carbohydr. Res.*, **339**(16), 2693(2004).
5. S. J. Park and K. S. Kim, Release Behaviors of Poly(ϵ -caprolactone) Microcapsule Containing Tocopherol, *J. Korean Ind. Eng. Chem.*, **14**(8), 1104(2003).
6. D. B. Dubal, S. W. Rau, P. J. Shughrue, H. Zhu, J. Yu, A. B. Cashion, S. Suzuki, L. M. Gerhold, M. B. Bottner, S. B. Dubal, I. Merchanthaler, M. S. Kindy, and P. M. Wise, Differential Modulation of Estrogen Receptors (ERs) in Ischemic Brain Injury, *Endocrinology*, **147**(6), 3076(2006).
7. H. Wang, Y. Yuan, M. Rong, and M. Zhang, Microencapsulation of Styrene with Melamine-Formaldehyde Resin, *Colloid Polym. Sci.*, **287**(9), 1089(2009).
8. A. Kumari, S. C. Yadav, S. K. Yadav, Y. B. Pakade, and B. Singh, Development of Biodegradable Nanoparticles for Delivery of Quercetin, *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, **80**(2), 184(2010).
9. J. P. Spencer, Flavonoids: Modulators of Brain Function?, *British J. Nutr.*, **99**(E-S1), 60(2008).
10. M. Schuier, H. Sies, B. Illek, and H. Fischer, Cocoa-related Flavonoids Inhibit CFTR-mediated Chloride Transport Across T84 Human Colon Epithelia, *J. Nutr.*, **135**(10), 2320(2005).
11. G. Berglier, L. Gastaldi, E. Ugazio, I. Miletto, P. Iliad, and S. Sapino, Stabilization of Quercetin Flavonoid in MCM-41 Mesoporous Silica: Positive Effect of Surface Functionalization, *J. Colloid Interface Sci.*, **393**(1), 109(2013).
12. H. Chen, C. Khemtong, X. Yang, X. Chang, and J. Gao, Nanonization Strategies for Poorly Water-soluble Drugs, *Drug Discovery Today*, **16**(7), 354(2011).
13. D. H. Lee, G. S. Sim, J. H. Kim, G. S. Lee, H. B. Pyo, and B. C. Lee, Preparation and Characterization of Quercetin-loaded Polymethyl Methacrylate Microcapsules using a Polyol-in-oil-in-polyol Emulsion Solvent Evaporation Method, *J. Pharm. Pharmacol.*, **59**(12), 1611(2007).
14. A. D. Roberts and H. Zhang, Poorly Water-soluble Drug Nanoparticles via Solvent Evaporation in Water-soluble Porous Polymers, *Int. J. Pharm.*, **447**(1-2), 241(2013).
15. M. S. Hong, Y. M. Yoon, S. K. An, I. S. An, and B. H. Byun, Protective Effects of the Natural Ingredient Quercetin in Human Dermal Fibroblasts, *Kor. J. Aesthet. Cosmetol.*, **10**(3), 571(2012).
16. G. N. Lim, S. Y. Kim, M. J. Kim, and S. N. Park, Physical Characteristic and In vitro Transdermal Delivery of PCL-b-PEG Micelles Containing Quercetin and Rutin, *Polymer(Korea)*, **36**(4), 420(2012).

Authors

- 김우진 DYETEC연구원 연구원
 시우슈원 경북대학교 섬유시스템공학과 석사과정 학생
 노현수 한국나노기술원 연구원
 이현주 DYETEC연구원 선임연구원
 전재우 DYETEC연구원 팀장
 김한도 경북대학교 섬유시스템공학과 교수