

형광 나노입자를 수용하는 마이크로캡슐의 제작 및 수용 가시화

김은영* · 김형훈** · 고정상†

Fabrication of Microcapsules Encapsulating Fluorescent Nanoparticles and Visualization of Their Inclusion

Eun Young Kim, Hyoung Hoon Kim and Jeung Sang Go

Abstract. This paper presents a fabrication method of microcapsules encapsulating fluorescent nanoparticles sensitive to an organic liquid, which is potentially applicable to the encapsulation of protein, cell and drug. It uses the supra-molecular self-assembly of a block copolymer at the interface of the stable and controllable droplets of water suspended with fluorescent nanoparticles and the polymer solved organic. The size and uniformity of the microcapsules were examined for the various polymer concentrations by using SEM image analysis. The maximum standard deviation of the produced microcapsules of less than 3.5% was obtained from the microcapsules produced from the same conditions. The inclusion of fluorescent nanoparticles was visualized in the fluorescence microscope and by using TEM image. It is shown that this fabrication method can provide the uniform size microcapsules with a higher inclusion.

Key Words: Microcapsule(마이크로캡슐), Fluorescent nanoparticle(형광 나노입자), Microchannel flow(마이크로채널 유동), Polymer self-assembly(폴리머 자기조립), Encapsulation(수용)

1. 서 론

1940년대에 약물 전달 시스템(Drug Delivery System) 분야에서 정립된 마이크로캡슐은 그 크기가 수 μm 에서 수백 μm 정도의 크기를 가지며, 불안정하거나 지속성이 약한 활성 성분을 고분자, 세라믹 또는 유무기 복합체로 둘러싸거나, 코팅하는 기술이다¹⁾. 특히 고분자 마이크로캡슐은 약제, 염료, 및 효소와 같은 활성 약물을 캡슐에 담아 온도나 pH와 같은 외부 자극으로부터 민감한 활성 약물을 보호하고 특정한 환경에서 약물의 방출을 조절하여 기능성을 극대화 할 수 있는 장점 때문에 약물전달 영역에서 우수한 수용체로써 연구되고 있다^{2,3)}.

그 기능은 내부 공간에 활성 물질의 수용, 외부 환경으로부터 내부 활성 물질의 보호, 특정 조건에서의 내

부 물질의 방출 제어, 제조 공정에서 손실되는 것을 최소화시킬 수 있으며, 서로 반응성이 있는 물질들을 같이 교반 할 수 있고, 필요에 따라 캡슐을 파괴하여 원하는 부분에서 반응을 할 수 있게 유도하거나, 독성이나 자극성이 강한 물질, 취급과정에서 손실되기 쉬운 물질 등 마이크로캡슐 제작에 이용되는 내부 활성 물질에 따라 다양한 기능을 부여할 수 있는 장점이 있다.

이러한 고분자 마이크로캡슐의 제조에는 여러 방법들이 쓰이고 있다. 고분자를 용매에 녹인 뒤 마이크로캡슐 제조 후 용매를 증발시키는 용매 증발법, 서로 불용성인 두 용액의 계면에서 반응 시키는 계면 중합법, 유화제를 이용하는 유화 중합법, 및 친수성 콜로이드 용액에 이물질을 첨가하거나, 온도 조건을 달리하여 농도가 서로 다른 두 액상을 이용하는 코아셀법 등이 있으며, 각각의 방법으로 제작되는 마이크로캡슐의 크기 범위를 Table 1에 정리하였다^{4,5)}. 이처럼 마이크로캡슐을 제작하는 방법이 다양한 이유는 사용되는 고분자와 용매의 특성에 따라 마이크로캡슐 제조 공정 조건 및 환경이 다르기 때문이다.

†부산대학교 기계공학부
E-mail : micros@pusan.ac.kr

*부산대학교 기계공학부

**부산대학교 기계공학부

Table 1. Various capsule sizes produced from the conventional fabrication techniques

기존 제조 방법	크기(mm)
유화 중합	0.01~1
분산 중합	0.5~10
현탁 중합	50~500
침강 중합	mm

일반적으로 마이크로캡슐은 교반기의 온도와 교반 속도를 조절하여 제작하는데, 이는 내부에 수용되는 활성 물질 및 수용 방법의 적용 범위를 제한하는 주된 원인이 된다⁶⁾. 최근 각광을 받고 있는 세포나 단백질과 같은 생체분자의 수용에 높은 온도와 유기 용액을 이용하는 기존 마이크로캡슐의 제조공정은 생체분자를 변질시킬 수 있기 때문에 직접 사용이 어려운 단점이 있다. 또한 교반 속도와 온도를 조절하여 활성 물질의 정량적인 수용을 위해 균일한 크기를 갖는 마이크로캡슐의 제작이 어려운 단점이 있다.

현재까지 연구된 마이크로캡슐의 수용 효율은 제작 온도와 사용된 고분자의 농도, 그리고 고분자의 성질과 관련이 있음이 여러 연구에서 소개되었으며⁷⁾. 위에서 소개된 제조 방법으로 제작된 마이크로캡슐 수용 효율은 마이크로캡슐 수용량의 약 50% 이하로 수용 효율이 낮은 문제점을 가지고 있다.

기존의 마이크로캡슐 제조 방법이 가지고 있는 넓은 크기 분포, 고온 및 유기용액에 의한 생체 활성 물질의 변질 및 낮은 수용 효율의 문제점들을 해결하기 위해 본 연구에서는 마이크로채널 유동을 이용하여 내부에 형광 입자를 수용하는 마이크로캡슐을 제작하고자 한다. 특히, 기존 제조 방법에 비해 형태 및 크기가 일정하고, 캡슐 내부에 생체 활성 물질 수용을 향상하기 위해 온도 및 유기 용액에 변질되기 쉬운 형광 나노입자를 수용함으로써 수용 성능을 가시화하고자 한다. 또한 생체 활성 물질의 수용 가능성을 확인하기 위해 기존 유기 용액의 액적 유동이 아닌 형광 나노입자를 포함한 물 용액을 액적화하여 상온에서 마이크로캡슐을 제조하였다.

2. 형광 나노입자 마이크로캡슐 제조

2.1 활성 물질 수용 메커니즘

마이크로채널에서 액적 유동을 이용한 마이크로캡슐의 제작 원리는 Fig. 1과 같다. 서로 섞이지 않는 친

수성 및 소수성의 두 용액을 마이크로채널에 주입하면 액적 유동이 얻어진다. 이때 액적의 크기는 주입하는 두 액체의 유량 비를 조절함으로써 안정적으로 제어가 가능하다. 특히 유기용액에 민감한 세포나 단백질과 같은 생체 활성 물질의 정량적 수용을 위해 기존 유기 액적(Oil-in-water) 유동 형태가 아닌 친수성의 물 액적(Water-in-oil) 유동을 형성한다.

캡슐의 형성 방법은 유화 중합과 그 원리가 비슷하나 온도를 이용하여 폴리머 합성을 하는 대신, 활성 물질이 미리 분산된 물 액적과 고분자 물질이 용해되어 있는 유기용액의 경계면에서 초분자 자기 배열(supermolecular self-assembly) 현상을 통하여 폴리머 캡슐 벽을 형성한다.

최종적으로 폴리머 벽이 형성된 액적은 출구를 통해 외부 저장조로 나오면서 에너지를 최소화하기 위해 자연스럽게 구형의 모양을 갖는다. 이렇게 얻어진 액적을 저온 증발시켜 고체화 하면 구형의 마이크로캡슐이 얻어진다⁸⁾. 이러한 제조방법은 기존 마이크로캡슐에 활성 물질을 수용하는 방법과 달리, 수용체의 종류, 농도 및 그 양을 쉽게 조절할 수 있을 뿐 아니라 활성 물질 수용 공정의 효율 또한 높일 수 있다는 장점이 있다.

2.2 PS-b-PMMA 공중합체의 합성

마이크로캡슐 제작에 이용되는 고분자는 액적의 계

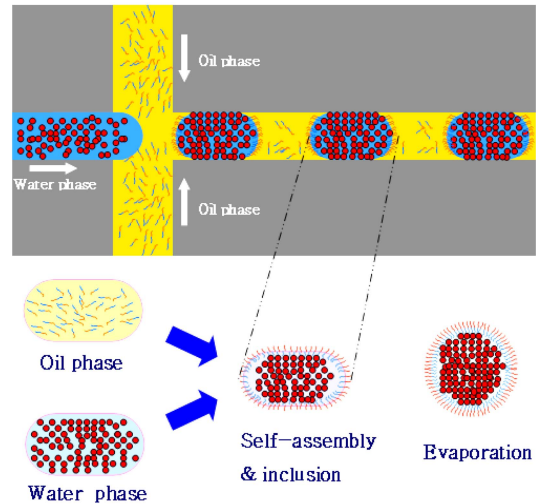


Fig. 1 Microcapsule fabrication and inclusion mechanism of fluorescent nanoparticles sensitive to an organic liquid using water droplet phase flow in the microchannel.

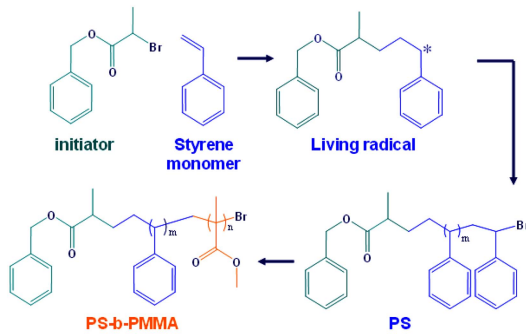


Fig. 2 Synthesis process of PS-b-PMMA block copolymer by using ATRP method and its chemical structures.

면에서 얻어지는 고분자 자기조립을 특성을 이용하기 위해 소수성과 친수성의 양쪽성 성질을 가져야 한다. 또한 마이크로캡슐 벽을 형성하는 고분자 물성은 분자량 및 분자 구조에 직접적인 영향을 받기 때문에 블록 공중합체의 정밀한 합성이 요구된다.

최근 전이 금속을 이용하여 쉬운 반응 조건에서 분자량과 구조를 정확하게 제어할 수 있고 분자량 분산도(PDI: poly dispersity index)가 균일한 원자 이동 라디칼 중합법(ATRP: atomic transfer radical Polymerization)을 사용하여 양쪽성 성질을 갖는 고분자를 합성하였다.

Fig. 2는 ATRP중합법을 이용하여 PS-b-PMMA 블록 공중합체를 합성하는 과정을 나타낸다. 질소를 주입한 쉬렌크 플라스크 내에 복합 촉매인 브롬화 구리(CuBr, Aldrich 99.999%)와 PMDETA(Aldrich 99%), 유기용제인 부틸 아세테이트(butyl acetate, Aldrich 99%), 스티렌 모노머(Aldrich 99%)와 개시제인 브롬화 벤질(benzyl bromide, Aldrich 98%)를 정량씩 순차적으로 넣고 구리 복합체가 생성 될 때까지 섞는다. 플라스크를 110°C로 가열하여 스티렌이 80% 이상 중합되면 폴리스티렌을 형성한다. 이차 모노머인 메틸 메타 크릴레이트(Aldrich 99%)를 주입하여 60°C에서 2 시간 동안 가열하면 PS-b-PMMA 공중합체가 얻어 얻어진다 ATRP 중합법을 이용하여 제조된 블록 공중합체의 분자량과 분자량 분산도(PDI)를 겔 침투 크로마토그래피(gel permeation chromatography, GPC)를 사용하여 측정하였다. 합성된 PS-b-PMMA 공중합체는 분자량 9,837 g/mole, PDI는 1.08로 각각 측정되었으며 이는 PDI값이 1에 가까운 높은 순도를 가졌다.

2.3 마이크로채널 제작 및 형광 나노입자 수용 마이크로캡슐 제조

마이크로채널은 실리콘 기판에 사진작업을 이용하여 채널 패턴을 형성하고, 건식 비등방성 반응이온 식각을 이용하여 선택적으로 채널 형상을 식각하였다. 다음으로 실리콘과 현미경에서 액적 유동을 가시화 하기 위해 투명한 파이렉스 유리(#7740) 기판을 400°C에서 5분동안 양극 접합하여 십자형의 마이크로채널을 제작하였다. Fig. 3은 채널의 폭과 깊이가 각각 100 μm 인 단면을 갖는 마이크로채널의 주사형 전자현미경(SEM: scanning electron microscopy) 사진을 보여준다.

마이크로채널에서 서로 섞이지 않는 두 유체의 액적 유동을 이용하여 마이크로캡슐 내부에 형광 입자를 수용하는 원리는 앞서 설명되었다. 마이크로채널 내에서 형광 나노입자가 분산된 친수성 성질의 물과 고분자가 용해된 소수성 성질의 유기용액을 주입하면 활성 물질이 수용된 마이크로 액적 유동이 형성된다.

특히 친수성의 물 액적을 유도하기 위해 마이크로채널 표면을 접촉각 약 100°를 갖는 소수성의 DDMS(Dichloro DiMethylSilane)로 나노막 코팅하였다. 코팅 공정은 밀폐 용기에 채널시편을 넣고 DDMS 용액을 스포이드를 이용하여 1~2방울을 떨어뜨리고 용기를 밀폐시킨다. 오븐을 100°C까지 가열한 후 밀폐용기를 넣고 DDMS용액이 충분히 기화하여 채널 표면을 고르게 코팅할 수 있도록 10분간 놓아둔다. 밀폐용기를 오븐에서 꺼내어 뚜껑을 열고 대기 중의 수분과 충분히 반응하여 메틸기의 단분자막을 형성할 수 있도록 24시간 방치한다.

실험에서는 유기 용매에 민감한 800 nm크기의 폴리 스티렌 형광 입자를 30:1 부피 비율로 미리 3% 폴리 비닐 알코올 수용액에 분산시켰다. 그리고 합성된 PS-b-PMMA 블록공중합체를 0.44 cP 점도를 갖는 디클로로메탄 유기용액에 마이크로캡슐의 크기를 조절하기 위해 다양한 농도(mg/ml)로 용해시켰다. 중앙으로는

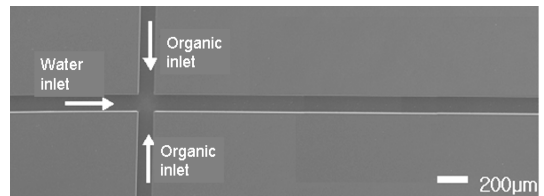


Fig. 3. SEM image of a cross network microchannel to form the water droplet flow.

형광입자가 분산된 수용액을 6 $\mu\text{l}/\text{min}$ 의 유량으로 주입하였고, 고분자가 용해된 디클로로메탄 용액은 양측면 채널을 통해 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ 의 유량으로 각각 주입하여 액적 유동을 형성하였다.

액적의 크기는 두 액체의 입력 유량 비를 조절하여 제어 가능하나 실험에서는 위와 같이 유량 비를 고정하고 고분자 농도를 조절하여 제작하였다. 형성된 마이크로액적은 마이크로채널 내부에서 유기용액에 분산된 폴리머의 농도가 임계농도 이상이 되면 자동적으로 물액적의 표면을 따라 자기 조립이 발생하고 출구를 통해 밖으로 배출시킨 후 진공 오븐에서 증발시키면 형광 나노입자를 내포한 마이크로캡슐을 제조하였다.

Fig. 4는 고분자 농도 50 mg/ml에서 제조된 형광 나노입자를 수용하는 마이크로캡슐의 SEM 사진을 보여준다. 특히, 마이크로캡슐 표면에 잔류하는 폴리비닐을 제거하기 위하여 구리 박막 필터를 이용하여 초순수로 가압하여 3회 반복 세정하였다. 이때 구리 박막 필터는 25 μm 였으며, 레이저 가공을 이용하여 10 μm

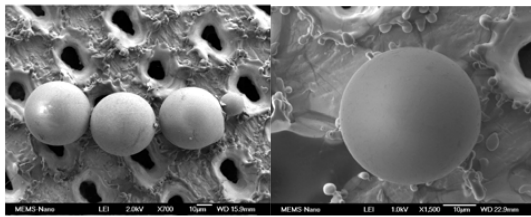


Fig. 4. SEM images of the microcapsules containing the fluorescent microparticles produced at the concentration of 50 mg/ml.

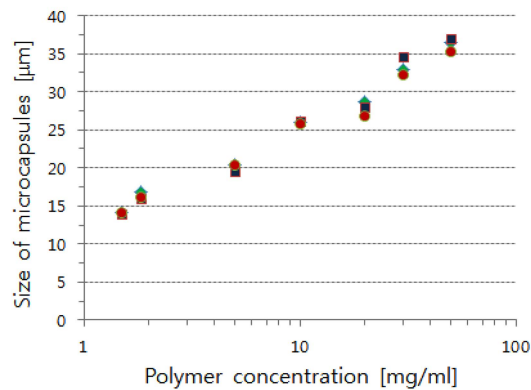


Fig. 5. Size control of microcapsules obtained at the various polymer concentrations and their uniformity measured from three microcapsules.

크기의 구멍을 배열 형태로 가공하였다. Fig. 5에서는 고분자 농도의 로그 축에 대해 캡슐의 크기가 선형적으로 증가 함을 실험적으로 보였다. 또한 동일한 농도 조건에서 제작된 마이크로캡슐의 크기 분포도 평균크기의 3.5% 이내로 매우 작은 표준편차로 측정되었다.

3. 형광 나노입자 수용 마이크로캡슐 가시화

형광 나노입자를 수용한 마이크로캡슐의 평가에는 투과 전자 현미경(TEM: transmission electron microscopy)을 이용한 마이크로캡슐의 외형 및 나노입자 수용 가시화와 다중 광자 초점 주사현미경(MPCLSM: multiphoton confocal laser scanning microscope)를 이용한 마이크로캡슐 형광 나노입자 수용 성능을 각각 평가하였다.

마이크로캡슐의 외형 및 나노입자 수용을 가시화 하기 위해 100 keV의 높은 에너지를 조사하였다. Fig. 6(a)는 완벽한 구형의 마이크로캡슐이 제조되었음을 보여준다. 또한 마이크로캡슐을 고 에너지에 장시간 노출시켜 고분자 캡슐 벽면이 열에 의해 제거되었고 내부에 나

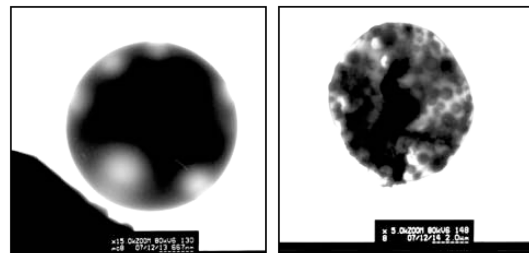


Fig. 6. The TEM images of microcapsule including fluorescent nanoparticles and visualization of the capsuled nanoparticles through the removed microcapsule wall.

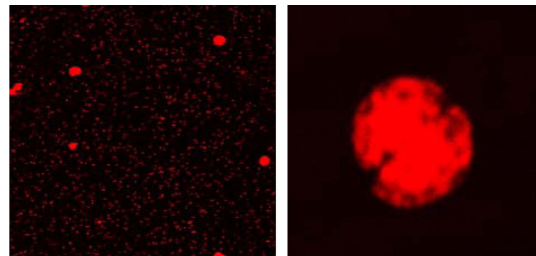


Fig. 6 Visualization of fluorescence property of microcapsules with the wave length of 612 nm, identical to that of fluorescent nanoparticles.

노입자들이 조밀하게 수용되었음을 Fig. 6(b)와 같이 가시화 하였다.

마지막으로 형광현미경을 이용한 마이크로캡슐의 형광 촬영에서 보였듯이 마이크로캡슐 내부에 수용된 형광 나노입자의 형광 특성과 동일하게 612 nm의 붉은 색 파장이 마이크로캡슐로부터 방출됨을 Fig. 7과 같이 가시화하였다.

4. 결 론

기존의 마이크로캡슐 제조 방법의 넓은 크기 분포, 고온 및 유기 용액에 의한 생체 활성 물질의 변질 및 낮은 수용 효율의 문제점들을 해결하기 위해 마이크로 채널 내부에서 기존 유기 액적 형태가 아닌 친수성의 물 액적 유동을 형성하고 임계 이상의 고분자 농도에서 얻어지는 자기 조립 성질을 이용하여 온도나 유기 용액에 민감한 세포나 단백질 등의 활성 물질의 정량적 수용이 가능한 마이크로캡슐을 성공적으로 제작하고 그 외형 및 내부 수용 효율을 가시화하였다.

내부 수용 형광 나노입자는 온도 및 유기 용액에 민감한 형광입자를 함유한 나노크기의 폴리스티렌을 이용하여 활성 물질의 수용에 관한 실험을 수행하였다. 주사 및 투과 전자현미경 측정과 형광 특성 가시화를 통해 기존 제조 방법에 비해 형태 및 크기가 일정한 마이크로캡슐의 제작이 가능함을 보였고 또한 높은 내부 수용 효율의 가능성을 확인 하였다.

향후 이 연구 결과는 세포나 단백질과 같은 생체 활성 물질 수용한 마이크로캡슐을 제작하여 3차원 배양을 통한 신약 개발에 적용이 가능할 것으로 기대된다.

후 기

“이 논문은 부산대학교 자유과제 학술연구비(2년)에 의하여 연구되었음.”

참고문헌

- 1) Khang, G., Cho, J. C., Rhee, J. M., Lee, J. S. and Lee, H. B., 2000, “Fentanyl-Loaded PLGA Microspheres for Long Acting Anesthesia,” In *Controlled Drug Delivery: Designing Technologies for the Future*, ACS Symp. Series, pp. 752.
- 2) Gill, I. and Ballesteros, A., 1998, “Encapsulation of Biologicals within Silicate, Siloxane, and Hybrid Sol-Gel Polymers: An Efficient and Generic Approach,” *J. Am. Chem. Soc.*, Vol 120, pp. 8587-8598.
- 3) Guo, J., Yang, W., Deng, Y., Wang, C. and Fu, S., 2005, “Organic-dye-coupled Magnetic Nanoparticles Encaged inside Thermoresponsive PNIPAM Microcapsules,” *Small*, Vol. 1, pp. 737-743.
- 4) Vasir, J. K., Tambwekar, K., and Garg, S., 2003, “Bioadhesive Microspheres as A Controlled Drug Delivery System,” *Int. J. Pharm.*, Vol. 255, pp. 13-32.
- 5) Masters, K., 1985, *Spray Drying Handbook*, 4th ed, George Goodwin Ltd..
- 6) Jalil, R. and Nixon, J. R., 1990, “Microencapsulation Using Poly(l-lactic acid) II: Preparative Variables Affecting Microcapsule Properties”, *J. Microencapsule.*, Vol. 7, pp. 25-39.
- 7) Yang, Y. Y., Chung, T. S., Bai, X. L., et al., 2002, “Effect of Preparation Conditions on Morphology and Release Profiles of Biodegradable Polymeric Microspheres Containing Protein Fabricated by Double-Emulsion Method,” *Chem. Eng. Sci.*, Vol. 55, pp. 2223-2236.
- 8) Choi, H. S., Khang, G., Shin, H., et al., 2002, “Preparation and Characterization of Fentanyl-Loaded PLGA Microspheres; In vitro Release Profiles.” *Int. J. Pharm.*, Vol. 234, pp.195-203.