(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0099795
(43) 공개일자 2010년09월15일

(51) Int. Cl.
C09K 15/18 (2006.01) *C09K 15/06* (2006.01)
C09K 15/02 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2009-0018308
(22) 출원일자 2009년03월04일
심사청구일자 2009년03월04일

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울 서대문구 대현동 11-1 이화여자대학교내
(72) 발명자
이민영
서울 서대문구 홍은동 현대아파트 101동 1505호
지아영
서울특별시 강남구 도곡동 타워팰리스 B동 3105
(74) 대리인
유종완

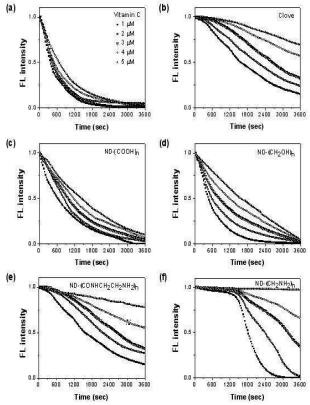
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 기능성 나노다이아몬드의 항산화 효과 및 그 응용

(57) 요 약

본 발명은 표면기능화 나노다이아몬드 화합물 (surface functionalized nanodiamond compounds)로 이루어지는 항산화제 또는 산화 방지제를 제공한다. 상기 화합물은 나노다이아몬드 표면을 화학적으로 개질한 기능성 나노입자이다. 항산화효과는 산소라디칼흡수용량 (oxygen radical absorbance capacity; ORAC) 방법을 사용하여 측정하였다. 상기 화합물은 나노다이아몬드의 표면에 화학적으로 결합된 부분(moiety)의 화학구조에 따른 다소의 차이는 있으나 전반적으로 항산화효과를 가지고 있음을 확인하였다. 특히 아민기를 가진 나노다이아몬드 화합물의 경우 동일한 몰농도에서 비타민 C의 25배 수준의 ORAC 수치를 나타내었다. 상기 나노다이아몬드 화합물은 물, 음료, 주류, 식품, 화장품, 의약품, 식용유지류, 또는 곡물의 항산화특성을 증진시키거나 산업용오일, 폴리머, 세라믹, 또는 금속의 산화방지를 위해 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도7



특허청구의 범위

청구항 1

하기 화학식 I로 표시되는 표면 기능화 나노다이아몬드 화합물(surface functionalized nanodiamond compouns) 또는 그의 염으로 이루어지는 항산화제.

화학식 I: ND-$(R)_n$,

여기서 n은 2 이상의 정수이다.

상기 화학식 I에서, ND는 나노다이아몬드 단일입자를 나타내며, 복수개의 R은 각각 상기 나노다이아몬드 표면에 화학결합된 부분(moiety)를 나타내되, 상기 R은 아민기(NH_2), 수산기(OH), 카르복실기(COOH), 및 이들의 조합으로 이루어진 일군에서 선택된 하나를 적어도 1개 이상 포함하는 화학구조를 가진다.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 R은 하기 화학식 II인 것을 특징으로 하는 항산화제.

화학식 II: X-NH_2,

상기 화학식 II에서, X는 나노다이아몬드 표면에 아민기를 공유 결합으로 연결시키기 위한 링커(linker)로서, 하나 또는 다수의 메틸렌기, 카르복실기, 에테르기, 아마이드기, 에스테르기, 및 이들의 조합으로 이루어진 일군에서 선택된 하나를 포함한다.

청구항 3

제 2 항에 있어서,

상기 R은 상기 화학식 II의 식품영양학적 또는 약학적으로 허용 가능한 염을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 항산화제.

청구항 4

제 1 항 내지 제 3 항의 어느 하나에 있어서,

물, 음료, 주류, 커피로 이루어진 일군에서 선택된 하나에 사용되어 산화 예방, 항산화, 또는 항산화 증진 효과를 나타내는 것을 특징으로 하는 항산화제.

청구항 5

제 1 항 내지 3 항의 어느 하나에 있어서,

식품 첨가제로 사용되어 산화 예방, 항산화, 또는 항산화 증진 효과를 나타내는 것을 특징으로 하는 항산화제.

청구항 6

제 1 항 내지 3 항의 어느 하나에 있어서,

화장품 원료로 사용되어 산화 예방, 항산화, 또는 항산화 증진 효과를 나타내는 것을 특징으로 하는 항산화제.

청구항 7

제 1 항 내지 3 항의 어느 하나에 있어서,

약제 조성물로 사용되어 산화 예방, 항산화, 또는 항산화 증진 효과를 나타내는 것을 특징으로 하는 항산화제.

청구항 8

제 1 항 내지 3 항의 어느 하나에 있어서,

담배에 사용되어 산화 예방, 항산화, 또는 항산화 증진 효과를 나타내는 것을 특징으로 하는 항산화제.

청구항 9

제 1 항 내지 3 항의 어느 하나에 있어서,

비누, 샴푸, 세정제, 입욕용품으로 이루어진 일군에서 선택된 하나에 사용되어 산화 예방, 항산화, 또는 항산화 증진 효과를 나타내는 것을 특징으로 하는 항산화제.

청구항 10

제 1 항 내지 3 항의 어느 하나에 있어서,

식용유지류 또는 산업용오일의 산패 방지를 위해 사용되는 것을 특징으로 하는 항산화제.

청구항 11

제 1 항 내지 3 항의 어느 하나에 있어서,

동물사료에 첨가제로 사용되는 것을 특징으로 하는 항산화제.

청구항 12

제 1 항 내지 3 항의 어느 하나에 있어서,

곡물의 보존을 위해 첨가제로 사용되는 것을 특징으로 하는 항산화제.

청구항 13

제 1 항 내지 3 항의 어느 하나에 있어서,

꽃, 과일, 채소, 육류, 가금류, 및 어류로 이루어진 일군에서 선택된 하나의 산화 방지를 위해 사용되는 것을 특징으로 하는 항산화제.

청구항 14

제 1 항 내지 3 항의 어느 하나에 있어서,

플라스틱, 고무, 접착제, 섬유, 폴리머막, 및 폴리머코팅제로 이루어진 일군에서 선택된 하나의 산화 방지를 위해 사용되는 것을 특징으로 하는 항산화제.

청구항 15

제 1 항 내지 3 항의 어느 하나에 있어서,

세라믹재료, 금속재료, 및 이들이 조합된 복합재료로 이루어진 일군에서 선택된 하나의 벌크 또는 표면의 산화 방지를 위해 사용되는 것을 특징으로 하는 항산화제.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 기능성 나노다이아몬드에 관한 것이며, 특히 나노다이아몬드의 표면을 화학적으로 개질하여 제조된 표면기능화 나노다이아몬드 화합물로 이루어진 항산화제에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 기존의 항산화제가 갖는 열적안정성 및 생체독성문제를 해결하기 위한 새로운 항산화제 개발이 요구되고 있는바, 나노기술에 기반을 둔 항산화제가 이를 해결할 수 있는 유력한 대안으로 제시되고 있다. 금, 은, 백금 나노입자를 항산화제로 이용하려는 시도가 있어 왔지만 분산성, 안전성, 가격 등이 해결해야 할 문제로 남아 있다.

[0003] 나노다이아몬드에 대한 항산화 효과는 아직 알려진 바가 없는데 본 발명은 이제까지 알려 지지 않은 새로운 개념의 항산화제인 기능성 나노다이아몬드에 관한 것이다.

[0004] 산화의 기본 메커니즘은 자유라디칼(free radical)의 형성으로 시작되는데, 자유라디칼은 짝을 이루지 못한 전자들을 가지고 있는 분자로서 매우 불안정이기 때문에 다른 분자를 공격하여 화학 구조를 변화시킬 수 있다. 자유라디칼의 대부분은 활성산소종(reactive oxygen species)으로 하이드록시 라디칼(hydroxyl radical), 수퍼옥사이드 라디칼(superoxide radical), 일중항 산소(singlet oxygen), 알코옥시 라디칼(alkoxy radical) 등이 이에 해당한다. 물질의 산화는 생체 내에서 다양한 질병을 일으킬 뿐만 아니라 노화의 원인이기도 하며 많은 산업 소재의 수명을 단축시키는 요인으로 알려져 있다.

[0005] 항산화제(antioxidant) 또는 산화방지제란 물질의 자동 산화를 억제하거나 지연시키는 화합물이다. 항산화제는 작용기전에 따라 예방적 항산화제, 일차 항산화제, 이차 항산화제로 구분된다. 예방적 항산화제는 글자 그대로 항산화의 요인이 되는 자유 라디칼의 생성을 미연에 방지하는 화합물이다. 일차 항산화제는 이미 생성된 자유라디칼(free radical)이나 퍼록시 라디칼 (peroxy radical)을 빠르게 소거하는 연쇄절단형 항산화제 (chain-breaking antioxidant)를 말한다. 이차 항산화제는 스스로 산화방지 효과는 없지만 자유라디칼 저해제와 공존하여 항산화작용을 증가시키는 화합물로서 항산화 상승제라고도 한다.

[0006] 항산화제는 또한 천연 항산화제와 합성 항산화제와 나눌 수 있다. 천연 항산화제로는 비타민 C, 토코페롤, 천연 아스코르빈산, 폴리페놀, 각종 식물 추출물 등이 사용되고 있으며 합성 항산화제로는 페놀계 화합물인 BHA (butylhydroxyanisole), BHT (butylhydroxytoluene) 등이 대표적으로 사용되고 있다.

[0007] 항산화제의 중요성에도 불구하고 화학적으로 합성되어 사용되는 합성 항산화제는 종류가 많지 않은 편이다. 최근 들어 나노기술의 비약적인 발전에 의해 금 은 백금등의 나노입자를 항산화제로 이용하려는 연구가 활성화되고 있지만 여러 가지 문제점 때문에 아직 연구 개발단계에 머물러 있다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0008] 본 발명의 첫 번째 목적은 항산화 효과가 극대화된 표면기능화 나노다이아몬드 화합물을 제조하여 이들의 항산화 효과를 ORAC 방법으로 측정하는 것이다. 본 발명의 두 번째 목적은 상기 나노다이아몬드 화합물을 물, 음료, 주류, 식품, 화장품, 의약품 원료, 유지류 등의 항산화 첨가제로서, 그리고 도료, 폴리머, 세라믹, 금속 등의 산화방지 용도로 사용할 수 있도록 하는 것이다.

과제 해결수단

[0009] 본 발명에 따르면, 하기 화학식 I로 표시되는 표면 기능화 나노다이아몬드 화합물(surface functionalized nanodiamond compounds) 또는 그의 염으로 이루어지는 항산화제를 제공한다.

[0010] 화학식 I: ND-$(R)_n$, 여기서 n은 2 이상의 정수이다.

[0011] 상기 화학식 I에서, ND는 나노다이아몬드 단일입자를 나타내며, 복수개의 R은 각각 상기 나노다이아몬드 표면에 화학결합된 부분(moiety)를 나타내되, 상기 R은 아민기(NH_2), 수산기(OH), 카르복실기(COOH), 및 이들의 조합으로 이루어진 일군에서 선택된 하나를 적어도 1개 이상 포함하는 화학구조를 가진다.

[0012] 다른 방법으로, 상기 R은 하기 화학식 II일 수 있다.

[0013] 화학식 II: X-NH_2

[0014] 상기 화학식 II에서, X는 나노다이아몬드 표면에 아민기를 공유 결합으로 연결시키기 위한 링커(linker)로서, 하나 또는 다수의 메틸렌기, 카르복실기, 에테르기, 아마이드기, 에스테르기, 및 이들의 조합으로 이루어진 일군에서 선택된 하나를 포함한다.

[0015] 또 다른 방법으로, 상기 R은 상기 화학식 II의 식품영양학적 또는 약학적으로 허용 가능한 염을 더 포함할 수 있다.

[0016] 또 다른 방법으로, 상기 항산화제는 물, 음료, 주류, 커피로 이루어진 일군에서 선택된 하나에 사용되어 산화예방, 항산화, 또는 항산화 증진 효과를 나타낼 수 있다.

[0017] 또 다른 방법으로, 상기 항산화제는 식품 첨가제로 사용되어 산화 예방, 항산화, 또는 항산화 증진 효과를 나타낼 수 있다.

[0018] 또 다른 방법으로, 상기 항산화제는 화장품 원료로 사용되어 산화 예방, 항산화, 또는 항산화 증진 효과를 나타낼 수 있다.

[0019] 또 다른 방법으로, 상기 항산화제는 약제 조성물로 사용되어 산화 예방, 항산화, 또는 항산화 증진 효과를 나타낼 수 있다.

[0020] 또 다른 방법으로, 상기 항산화제는 담배에 사용되어 산화 예방, 항산화, 또는 항산화 증진 효과를 나타낼 수 있다.

[0021] 또 다른 방법으로, 상기 항산화제는 비누, 샴푸, 세정제, 입욕용품으로 이루어진 일군에서 선택된 하나에 사용되어 산화 예방, 항산화, 또는 항산화 증진 효과를 나타낼 수 있다.

[0022] 또 다른 방법으로, 상기 항산화제는 식용유지류 또는 산업용오일의 산패 방지를 위해 사용될 수 있다.

[0023] 또 다른 방법으로, 상기 항산화제는 동물사료에 첨가제로 사용될 수 있다.

[0024] 또 다른 방법으로, 상기 항산화제는 곡물의 보존을 위해 첨가제로 사용될 수 있다.

[0025] 또 다른 방법으로, 상기 항산화제는 꽃, 과일, 채소, 육류, 가금류, 및 어류로 이루어진 일군에서 선택된 하나의 산화 방지를 위해 사용될 수 있다.

[0026] 또 다른 방법으로, 상기 항산화제는 플라스틱, 고무, 접착제, 섬유, 폴리머막, 및 폴리머코팅제로 이루어진 일군에서 선택된 하나의 산화 방지를 위해 사용될 수 있다.

[0027] 또 다른 방법으로, 상기 항산화제는 세라믹재료, 금속재료, 및 이들이 조합된 복합재료로 이루어진 일군에서 선택된 하나의 벌크 또는 표면의 산화방지를 위해 사용될 수 있다.

효 과

[0028] 본 발명에 따른 표면기능화 나노다이아몬드 화합물이 분산된 수용액에 대하여 ORAC 방법을 이용하여 항산화효과를 측정한 결과 나노다이아몬드의 표면에 화학적으로 결합된 부분(moiety)의 화학구조에 따른 다소의 차이는 있으나 전반적으로 항산화효과를 가지고 있음을 확인하였다. 특히 말단기가 아민으로 부착된 화합물이 가장 우수한 항산화 효과를 나타내었다. 표면기능화 시키지 않은 프리스틴(pristine) 나노다이아몬드와 비교하여, 본 발명의 나노다이아몬드 화합물은 액상에서 우수한 분산성을 보여 주므로 먹는 물, 음료, 주류, 식품, 화장품, 의약, 코팅재료, 구조재료 등에 첨가제로 사용되어 항산화 효과를 나타낼 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0029] 나노다이아몬드는 물리적, 화학적으로 안정할 뿐만 아니라 생체 독성이 없기 때문에 새로운 나노소재로 각광받고 있다. 특히 나노다이아몬드 중에서도 10 nm 이하의 크기를 갖는 입자들을 특별히 Ultrananocrystalline diamond(UNCD) 정의하여 이의 응용 범위가 급속도로 확산되고 있다. UNCD는 직경이 5 nm 내외의 비교적 균일한 입도분포를 가지는 초미세 크기의 다이아몬드 결정으로서 주로 폭약 폭발법에 의해 합성된다. 그러나 분산성의 문제로 인하여 제한적인 범위에서 사용되어 왔는데 이를 극복하기 위하여 표면을 개질하는 다양한 방법이 제시되어 왔다. 수 나노미터 크기의 나노다이아몬드는 큰 표면적으로 인하여 기체상 또는 액상에서 여러 화학적 합성 방법을 통해 다양한 기능성기를 나노다이아몬드의 표면에 다량으로 부착시킬 수 있다. 이러한 기능성 나노다이아몬드의 항산화 효과에 대하여는 아직 발표된 바가 없다.

[0030] 항산화 효과를 측정하는 방법으로서 FRAP(ferric reducing/antioxidant power)와 TEAC(Trolox equivalent antioxidant capacity), ORAC(oxygen radical absorbance capacity) 등이 알려져 있다. FRAP과 TEAC은 single electron transfer 를 이용하는 방법이며 ORAC은 hydrogen atom transfer를 이용하는 방법이다. FRAP과 TEAC은 연쇄 반응의 메커니즘에 근거를 두고 발전된 것이 아니기 때문에 반드시 항산화 활성을 측정한다고 보기 어렵다. 항산화 연쇄반응을 제어하는 메커니즘에 근거를 둔 ORAC은 1993년 미국 NIH 산하 국립 노화 연구소의 연구자들에 의해 처음 개발되었으며, 그 이후로 항산화 효과를 측정하는 골드 스탠다드 방법으로 인식되고 있다.

[0031] ORAC 프로토콜을 이용한 항산화 효과 측정 방법은 다음과 같다. 형광염료중의 하나인 disodium fluorescein(F

L)은 산화제의 존재하에서 표백 효과에 의하여 형광이 소거된다. 이 용액에 항산화 효과가 있으리라고 기대되는 시료를 같이 혼합하게 되면 FL의 산화를 막아 주게 되어 형광이 더 오래 지속한다. 즉 형광물질이 산화제에 의해 산화 반응이 일어나게 되면 형광의 강도가 감소한다. 그러나 용액 속에 항산화제가 존재하게 되면 형광 물질의 파괴 속도가 감소하여 형광 강도는 증가한다. 형광의 세기를 시간의 함수로 측정하여 얻는 감쇄 곡선 그래프로부터 하부 면적을 계산한다. 실제 실험에서는 산화제로는 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH)를 사용한다. AAPH의 반감기는 중성 pH 및 37 °C에서 175시간 정도이다. 형광 세기를 측정하는 시간은 조건에 따라 다르지만 대략 30-60분 정도이다.

[0032] 형광의 산화적 파괴 정도를 표준 항산화제인 Trolox(항산화제인 수용성 비타민 E 유사물질)와 비교하여 얻는 값이 ORAC 값이다. 상이한 Trolox 농도를 사용하여 표준 곡선을 만든 다음 이것과 샘플을 비교한다. 최종 결과를 Trolox Equivalent(TE)로 표시한다. ORAC 지수는 현재 전세계적으로 가장 주목받고 있는 항산화 효과 측정 방법이며, ORAC 수치가 높을 수록 활성 항산화력이 높다는 것을 의미한다.

[0033] 본 발명에서는 나노다이아몬드의 표면을 화학적으로 개질한 기능성 나노다이아몬드를 항산화제 또는 산화방지제로 사용할 목적으로 ORAC 실험을 수행하였다. 먼저 프리스틴 나노다이아몬드에 대한 ORAC 실험을 수행하였는데, 분산성이 높지 않음에도 불구하고 일정 수준의 항산화 효과가 있음을 보여주고 있다. 기능성 나노다이아몬드의 항산화 효과의 정도는 표면에 부착되어 있는 작용기의 종류에 따라 달라지는데, 특히 아민기가 부착된 부분(moiety)을 갖는 나노다이아몬드 (이하 아민화 나노다이아몬드라 한다)가 가장 우수한 항산화 효과를 보이는 것으로 나타났다. 이러한 항산화 나노다이아몬드는 식품, 화장품, 의약, 농업, 석유화학제품, 폴리머, 세라믹, 금속 등 다방면의 분야에 응용될 수 있을 것으로 보인다.

[0034] 도 1은 아민기를 갖는 나노다이아몬드 (ND) 화합물 중 하나의 모식도이다. 상기 모식도의 중심부는 나노다이아몬드를 나타내며 표면에는 아민기가 공유결합에 의하여 다량으로 부착되어 있다. 본 발명에서, 아민화 나노다이아몬드 화합물은 액상에서 프리스틴 나노다이아몬드로부터 하기 여러 실시예들에서 보여 주는 바와 같이 여러 단계의 제조 공정을 거쳐 합성한다. 이러한 기능화 나노다이아몬드는 프리스틴 나노다이아몬드와 비교하여 우수한 분산성을 보여주며, 항산화 효과 즉 ORAC 지수가 대단히 높다.

[0035] 이하의 실시예는 본 발명의 이해를 돕기 위한 구체적인 예를 상세히 설명하는 것으로서 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0036] <실시예 1>

[0037] HNO_3(70%)와 H_2SO_4(98%)를 1:3 중량비로 배합한 강산 용액에 직경 5 nm 내외의 프리스틴 나노다이아몬드를 첨가하여 40 °C에서 3시간 초음파 처리한다. 이 용액을 증류수로 희석한 후 막 필터를 사용하여 여과시킨 후 80 °C 오븐에서 4시간 건조시켜 나노다이아몬드 표면에 복수개의 카르복실기가 부착된 ND-$(COOH)_n$ 화합물 분말을 얻는다.

[0038] <실시예 2>

[0039] BH_3/THF 30mL에 상기 ND-$(COOH)_n$ 화합물 100mg을 첨가한 후 1시간 동안 초음파 처리한 후 상기 실시예 1과 동일한 여과 건조 과정을 거쳐 나노다이아몬드 표면에 수산기를 포함한 부분(moiety)이 복수개 부착된 ND-$(CH_2OH)_n$를 얻는다.

[0040] <실시예 3>

[0041] 100 mg의 상기 ND-$(COOH)_n$ 분말을 50 mL의 ethylenediamine에 녹인 후 50 mg HATU 시약을 첨가하고 4시간 동안 초음파 처리하여 아마이드기를 갖는 나노다이아몬드를 제조한다. 상기 반응물을 200 mL의 methanol을 사용하여 희석시킨 후 여과, 건조하여 나노다이아몬드 표면에 아마이드기 및 아민기를 포함한 부분(moiety)이 복수개 부착된 ND-$(CONHCH_2CH_2NH_2)_n$ 화합물 분말을 얻는다.

[0042] <실시예 4>

[0043] 나노다이아몬드 표면에 아민기(NH_2)를 도입하기 위하여 100 mg의 상기 ND-$(CH_2OH)_n$ 분말을 30 ml THF 내에서 30분간 초음파 처리한다. 여기에 10 mg의 diethylazodicarboxylate coupling agent와 50 mg의 phthalimide를 첨가하여 2시간 동안 초음파 처리한 후 300 mL의 methanol를 부어 희석시킨 후 여과, 건조한다. 이 분말을 50 mL의 trifluoroacetic acid (TFA)에 넣은 후 3시간 동안 초음파 처리한 후에 여과, 건조하여 나노다이아몬드 표

면에 아민기를 포함한 부분(moiety)이 복수개 부착된 ND-$(CH_2NH_2)_n$ 분말을 얻는다.

[0044] <실시예 5>

[0045] 상기 표면기능화 ND 화합물들의 표면 개질 여부는 FTIR (Varian)을 이용하여 KBR pellet 의 형태로 시료를 만들어 분석하였다.

[0046] 도 2는 ND-$(R)_n$ 화합물들의 IR 스펙트럼들을 도시한 것이다.

[0047] 도 2의 ND-$(COOH)_n$ 화합물의 스펙트럼상 1670 cm^{-1}에서 나타나는 강한 peak는 C=O stretching에 의한 것이다. ND-$(CH_2OH)_n$ 화합물에서는 C=O stretching 피크가 사라지고 methylene group에서의 C-H stretching 진동모드를 보여주는 2923 cm^{-1}와 2845 cm^{-1}에서 피크가 나타난다. ND-$(CONHCH_2CH_2NH_2)_n$ 화합물의 IR 스펙트럼을 보면 C-N stretching 진동모드가 1030 cm^{-1}에서 나타난다. 또한 carbonyl stretching에 해당하는 진동 모드가 1679 cm^{-1}에서 나타남을 알 수 있다. 마지막으로, ND-$(CH_2NH_2)_n$ 화합물은 아민기의 in-plane bending mode가 1624 cm^{-1}에서, out-of-plane bending mode가 737 cm^{-1}에서 관찰됨을 알 수 있다.

[0048] <실시예 6>

[0049] 도 3은 수용액에서 프리스틴 나노다이아몬드와 아민화 나노다이아몬드의 입도 분포를 보여준다. 입도 분석에 대한 측정은 동적 광산란 장치(Scatteroscope, Qudix)를 이용하였다. 프리스틴 나노다이아몬드는 평균 입자의 직경이 16 nm와 20 μm에서 나타나는 bimodal 패턴이 나타나는데 이는 다수의 나노다이아몬드가 액상에서 응집체로 존재하고 있음을 의미한다. 반면에, 나노다이아몬드는 평균 입자의 직경이 8 nm로서 수용액에서 응집체를 형성함이 없이 단일 입자들로 분포함을 보여주고 있다. 결론적으로, 나노다이아몬드 표면의 화학적 개질은 나노다이아몬드에 화학적 기능성은 물론 우수한 분산성도 함께 제공하는 효과가 있다.

[0050] <실시예 7>

[0051] 아민기가 수용액상에서 염기성을 나타내므로 아민화 나노다이아몬드를 물에 분산시키면 염기성을 나타낸다. 표 1은 ND-$(CH_2NH_2)_n$ 0.001~10 μM 농도 범위에서 측정한 수용액의 pH이다. 농도 계산에 필요한 나노다이아몬드의 분자량 값은 입자의 크기를 고려하여 산정한 값인 100,000을 사용하였다.

표 1

[0052]

Conc. (μM)	0.001	0.05	0.1	0.5	1	10
pH	7.06	7.27	7.39	7.51	7.83	7.99

[0053] 표 1을 참조하면, 수용액의 pH는 ND-$(CH_2NH_2)_n$ 농도의 $\log_{10}$ 값에 선형적으로 비례하지는 않음을 알 수 있는바, 이는 약염기성 용질의 전형적인 특징이다. 표 1에서 보여주는 결과는 아민화 나노다이아몬드를 물이나 주류, 또는 식품 등에 첨가하여 pH를 높일 수 있으며, 필요한 경우 산성 또는 중성의 물을 약알칼리성으로 변환시키는데 사용될 수 있음을 의미한다. 한 예로, 중성의 물 1 L에 아민화 나노다이아몬드 10 mg 을 첨가하면 생리적인 pH 값인 7.4 에 가까운 산도의 수용액을 만들 수 있다.

[0054] <실시예 8>

[0055] ORAC assay는 다음 방법으로 진행되었다. 형광 측정은 형광 분광 광도계(F-4500, Hitachi)를 사용하였다. 여기 및 형광측정 파장은 각각 480 nm 와 520 nm를 사용하였고 모든 실험은 상온에서 수행되었다.

[0056] 0.0263 g의 fluorescein(FL)을 pH 7.4의 phosphate buffer 1 ml에 녹여서 70 μM 의 stock solution을 만들었다. 이 저장 용액(stock solution)은 어두운 곳에서 보관한 후 측정 전에 70 nM의 용액으로 희석하여 사용하였다. 0.1356 g의 2,2' -azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH)를 phosphate buffer에 녹여서 50 mM의 수용액을 만들었다. 트롤록스(Trolox) 0.0125 g을 10mL의 phosphate buffer에 녹여서 5 mM의 트롤록스 저장 용액을 준비하였다. 이를 1~5μM로 희석하여 트롤록스 calibration curve를 구하는데 사용하였다. 트롤록스의 calibration curve는 FL 용액 (240 μL), AAPH (240 μL), trolox (120 μL) 혼합 용액을 37 ℃ 에서 10분간 incubation한 후 측정하였다. 즉 FL과 AAPH의 buffer 용액의 시간에 따른 형광 세기를 측정한 후, 트롤록스

용액을 1μM 간격으로 5 μM 까지 혼합한 용액의 형광 감쇄 그래프를 일련적으로 얻는다.

[0057] 형광 측정에 사용한 최종 전체 용액의 부피는 600 μL 이며 형광 세기는 25초 간격으로 3,600초(60분)까지 측정하였다. 항산화제의 형광 감쇄 그래프를 얻을 때의 부피비는 FL: AAPH: sample = 2:2:1을 사용하였으며 형광 측정 전에 37°C에서 10분간 incubation 하였다. 형광을 찍기 위하여 FL 용액(240 μL), AAPH (240 μL), antioxidant 용액 (120 μL)을 혼합하여 37 ℃ 에서 10분간 incubation 하여 형광을 60분간 측정하였다. Blank는 buffer (120 μL), fluorescein solution (240 μL), 및 AAPH (240 μL)의 혼합액을 37 ℃ 에서 10분간 incubation 한 후 측정하였다.

[0058] <실시예 9>

[0059] 형광 감쇄 그래프의 하부곡선 면적(area under curve;AUC)을 계산하기 위하여 모든 형광 감쇄 그래프를 최대 규격화(peak normalization)한 후 AUC는 다음 식을 사용하여 계산하였다.

[0060] $$AUC = \sum_{i=0}^{n-1} f_i / f_0$$

[0061] 여기서, f_0는 시간 0에서의 형광 세기이며 n은 형광 감쇄 그래프를 얻기 위한 데이터 개수이다.

[0062] AUC로부터 상대적 ORAC 수치(Trolox equivalent)는 다음 식으로 계산된다.

[0063] $ORAC = [(AUC_{sample}-AUC_{blank})/(AUC_{sample}-AUC_{blank})]$

[0064] x (molarity of trolox / molaraity of sample)

[0065] 도 4는 트롤록스 농도에 따른 FL 형광 감쇄 그래프를 보여주며, 도 5는 이로부터 계산한 trolox calibration curve이다. 최소 자승법으로 얻은 caclibration curve는 y = 4.45x - 7.56이다. 여기서 x는 트롤록스 농도(μM)를, y는 AUC를 나타낸다. 상관계수 (R^2) 값은 0.99 이상으로서 아주 만족할 만한 수준의 값을 보여 주고 있다.

[0066] <실시예 10>

[0067] 도 6은 프리스틴 나노다이아몬드의 형광 감쇄 그래프이다. 농도 계산에 필요한 프리스틴 다이아몬드의 분자량 값은 나노입자의 사이즈를 고려하여 계산한 100,000을 사용하였다. 도 6으로부터 1~5μM 농도 범위에서 AUC를 각각 계산하였으며 이로부터 얻은 상대적 ORAC 수치의 평균값은 5.2이다. 프리스틴 나노다이아몬드가 항산화 효과를 보여주는 것은 주로 표면의 sp^2 구조에 의한 라디칼 제거 기능에 의한 것으로 보이지만 자세한 메카니즘은 아직 알려져 있지 않다.

[0068] <실시예 11>

[0069] 도 7은 비타민 C, 정향(clove), 표면기능화 나노다이아몬드들의 형광 감쇄 그래프를 보여준다. 비타민 C의 항산화 효과는 잘 알려져 있으므로 하나의 대조군(control)으로 선택하였고, 정향은 지금까지 알려진 천연물 중에 가장 ORAC 수치가 높다고 알려져 있으므로 상대적 비교를 위해 선택하였다. 이들의 항산화 정도의 상대적인 비교를 위하여 특별히 5 μM에서의 각 샘플의 형광 감쇄 그래프를 도 8에 나타내었다. 이 농도에서 아민화 나노다이아몬드는 60분간 형광 세기가 거의 변하지 않고 일정한 값을 유지하고 있음을 보여준다. 도 9는 각 샘플의 AUC를 측정 농도별로 도시한 것이다.

[0070] <실시예 12>

[0071] 표 2는 상기 식으로 계산한 ORAC 수치를 농도별로 표시한 것이며, 이들의 평균값을 함께 나타내었다. 표면 기능화를 통하여 나노다이아몬드의 분자량이 약간 변할 수 있으나 일관성을 유지하기 위하여 프리스틴 나노다이아몬드와 같은 값인 100,000을 사용하였다.

표 2

[0072]

Conc. (uM)	Vitamin C	Clove	ND-$(COOH)_n$	ND $-(CH_2OH)_n$	ND-$(CONHCH_2-CH2NH_2)_n$	ND-$(CH_2NH_2)_n$
1	0.79	17.83	4.94	1.38	8.62	18.12
2	0.78	18.89	1.22	1.17	8.18	18.94
3	0.74	16.76	0.70	1.02	7.88	18.17
4	0.61	14.22	0.76	1.12	5.65	16.47
5	0.51	11.05	0.73	1.01	4.84	12.16
Avg.	0.69	15.75	1.67	1.14	7.03	16.77

[0073] 표 2를 참조하면, 본 발명에서 측정한 모든 기능성 나노다이아몬드들이 유의미한 수준의 항산화 효과를 보여주지만 그 중에서 아민기를 가진 나노다이아몬드의 ORAC 값이 가장 크다. 주목할 만한 것으로, 긴 사슬을 갖는 아마이드의 말단에 아민기를 가진 나노다이아몬드 화합물에 비하여, 아마이드기가 없이 표면을 $-CH_2NH_2$로 기능화한 아민화 나노다이아몬드가 더 높은 항산화 효과를 나타낸다.

[0074] 도 10는 비타민 C, 정향(clove) 및 기능성 나노다이아몬드의 ORAC 지수를 나타낸 것이다. 아민화 나노다이아몬드는 비타민 C와 비교하여 같은 농도에서 25배의 항산화 효과를 나타내며 또한 정향보다 ORAC 값이 높음을 알 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0075] 도 1. 아민기를 갖는 표면기능화 나노다이아몬드 (ND) 화합물 중 하나의 모식도.

[0076] 도 2. 표면기능화 나노다이아몬드 화합물의 FTIR 스펙트럼.

[0077] 도 3. 프리스틴 다이아몬드와 표면기능화 나노다이아몬드 화합물의 입도 분포.

[0078] 도 4. Trolox 농도에 따른 fluorescein 형광 감쇄 그래프.

[0079] 도 5. ORAC assay에 있어서 trolox의 표준 그래프.

[0080] 도 6. 프리스틴 나노다이아몬드의 형광 감쇄 그래프.

[0081] 도 7. 시료의 농도에 따른 형광 감쇄 그래프.

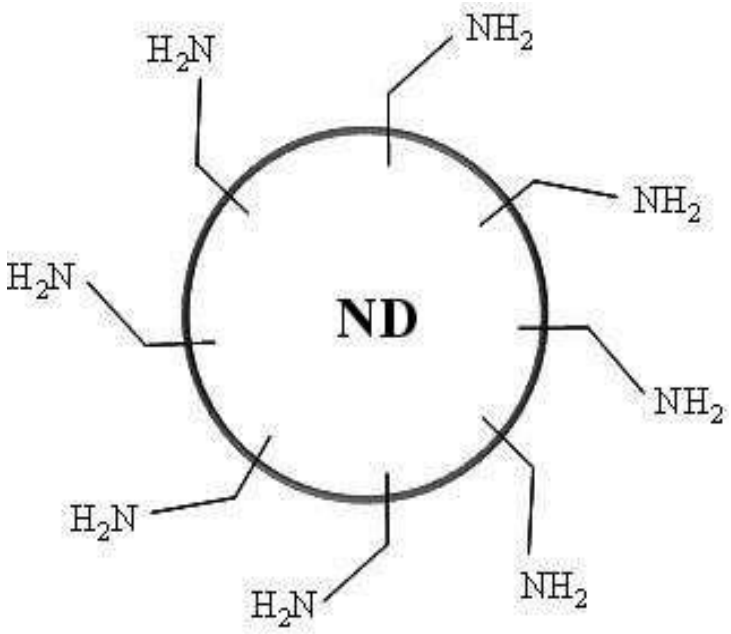
[0082] 도 8. 5 uM 표면기능화 나노다이아몬드 화합물에 의한 형광 감쇄 그래프.

[0083] 도 9. 농도 및 시료에 따른 형광 감쇄 그래프의 면적 비교.

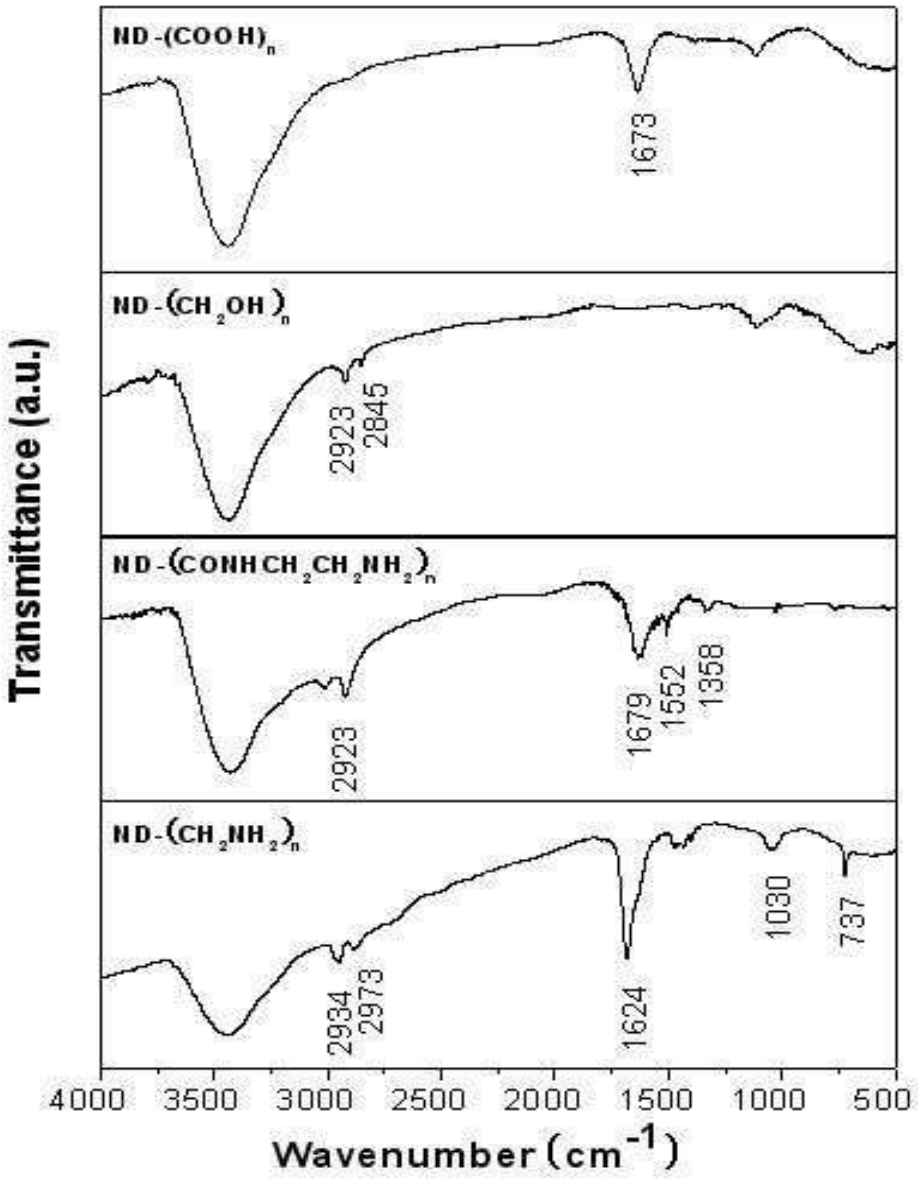
[0084] 도 10. 비타민 C, 정향, 및 기능성 나노다이아몬드 화합물의 ORAC 지수.

도면

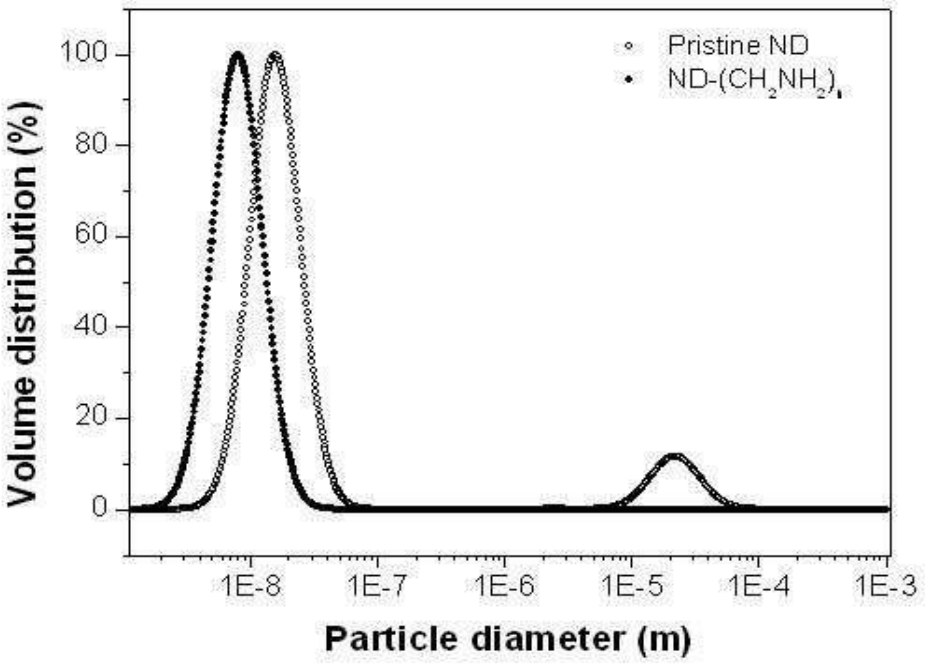
도면1



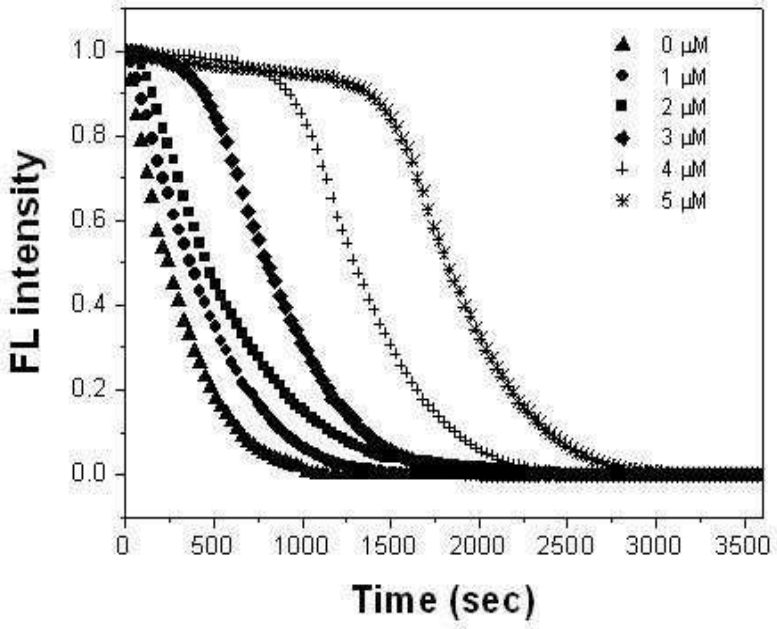
도면2


ND-(COOH)n
1673
ND-(CH2OH)n
2923
2845
ND-(CONHCH2CH2NH2)n
2923
1679
1552
1358
ND-(CH2NH2)n
2934
2973
1624
1030
737
Transmittance (a.u.)
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
Wavenumber (cm-1)

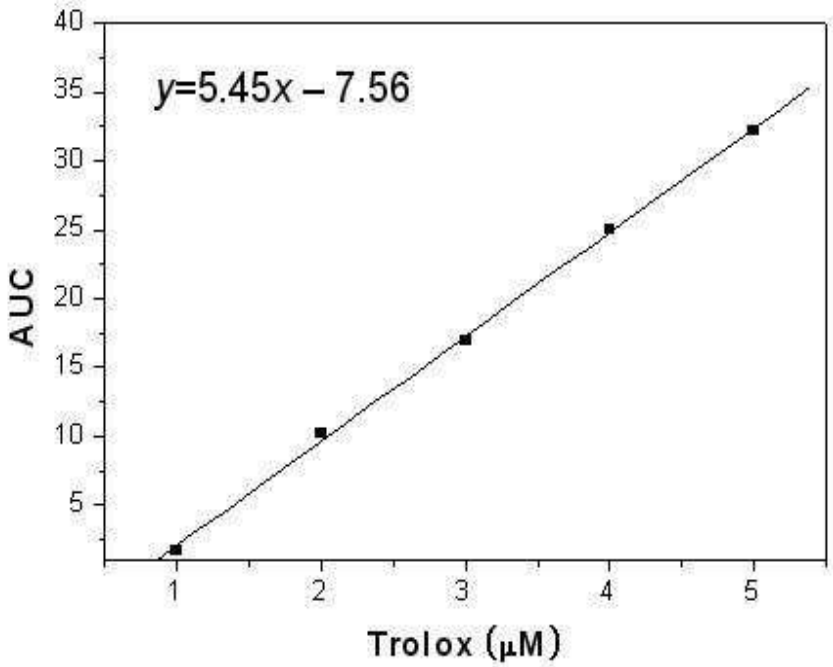
도면3


Pristine ND
ND-(CH2NH2)4
Volume distribution (%)
100
80
60
40
20
0
1E-8
1E-7
1E-6
1E-5
1E-4
1E-3
Particle diameter (m)

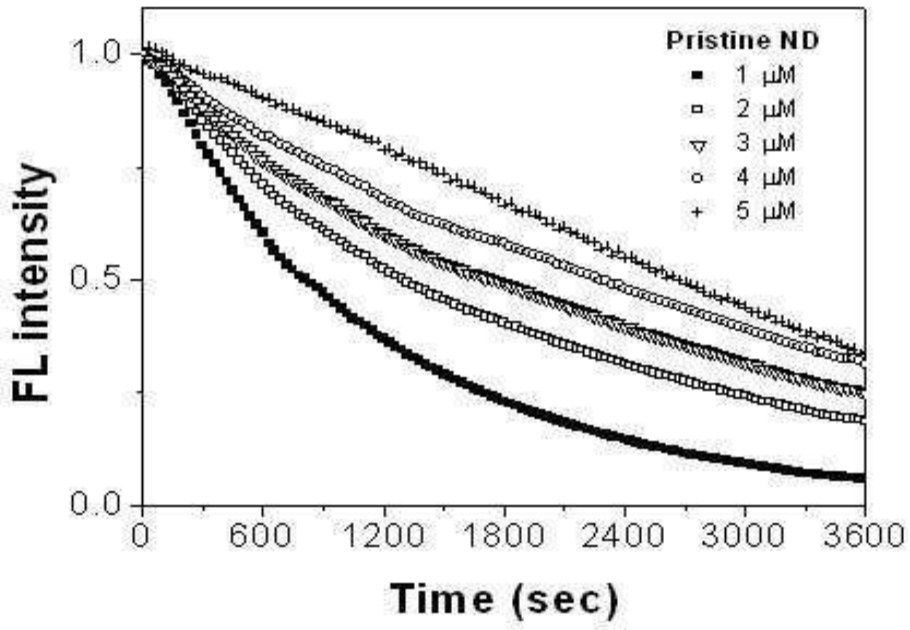
도면4


0 μM
1 μM
2 μM
3 μM
4 μM
5 μM
FL intensity
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0
500
1000
1500
2000
2500
3000
3500
Time (sec)

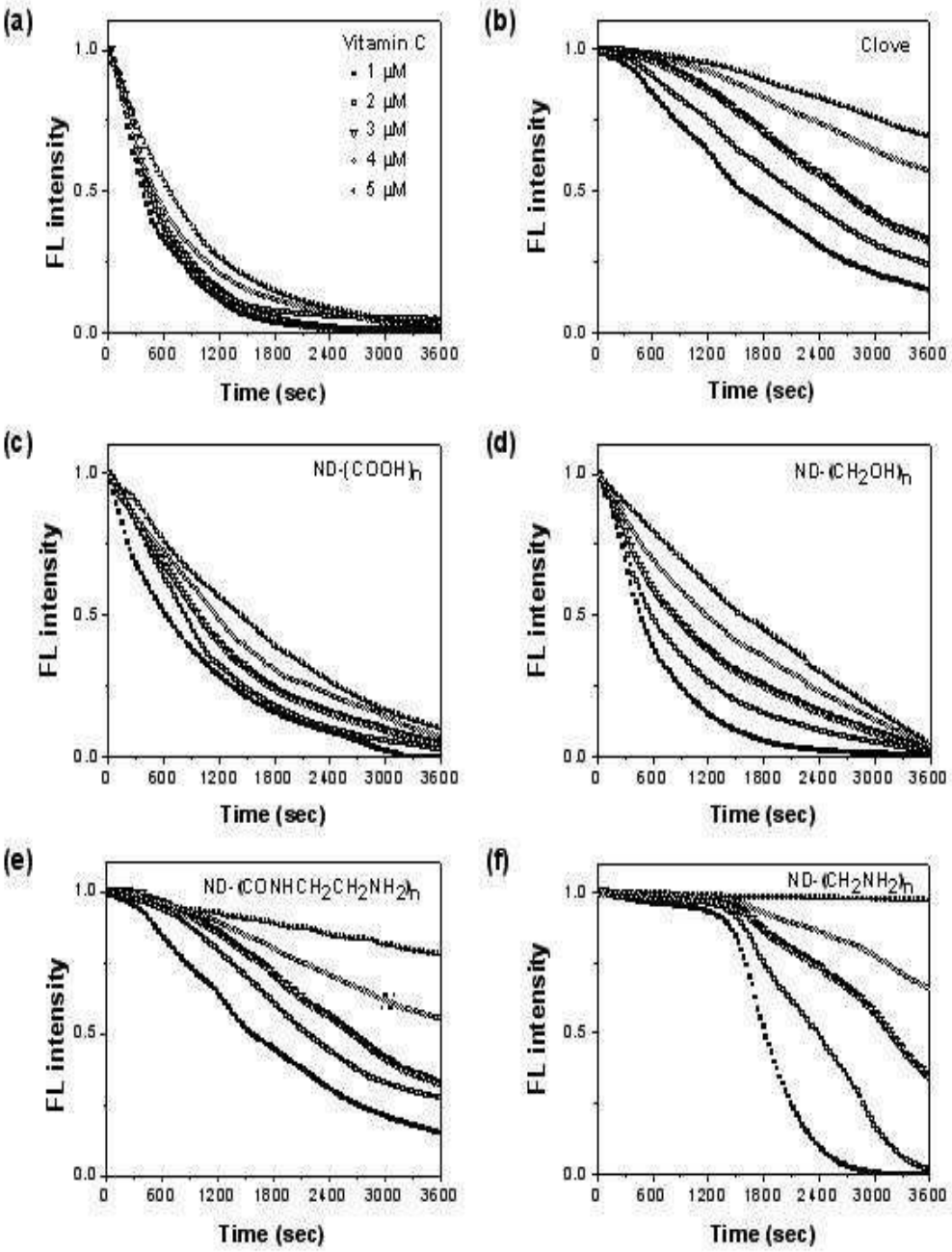
도면5


y=5.45x – 7.56
AUC
Trolox (μM)
40
35
30
25
20
15
10
5
1
2
3
4
5

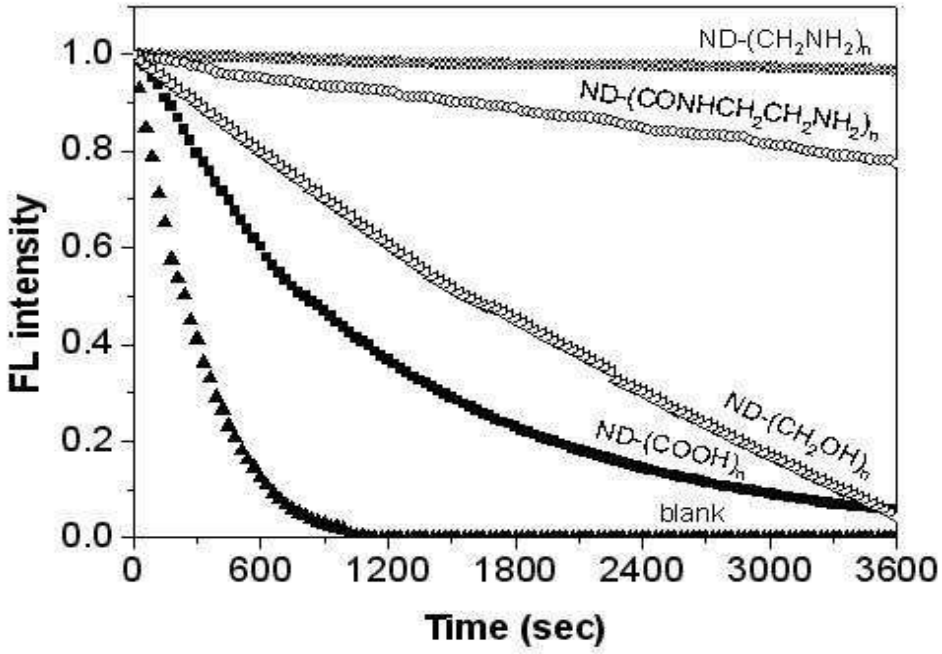
도면6


Pristine ND
1 μM
2 μM
3 μM
4 μM
5 μM
FL intensity
Time (sec)
1.0
0.5
0.0
0
600
1200
1800
2400
3000
3600

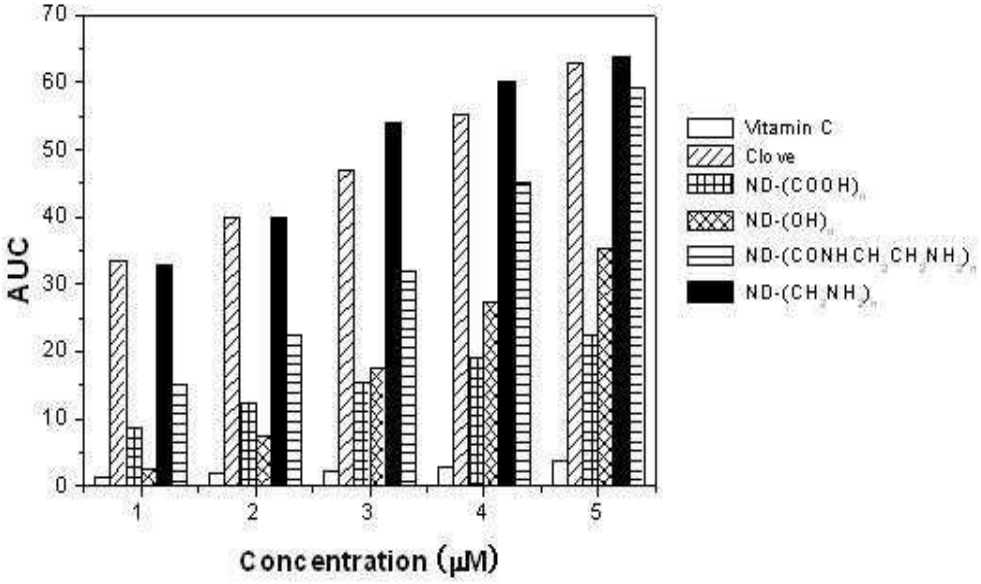
도면7


(a)
Vitamin C
1 μM
2 μM
3 μM
4 μM
5 μM
FL intensity
Time (sec)
(b)
Clove
FL intensity
Time (sec)
(c)
ND-(COOH)n
FL intensity
Time (sec)
(d)
ND-(CH2OH)n
FL intensity
Time (sec)
(e)
ND-(CONHCH2CH2NH2)n
FL intensity
Time (sec)
(f)
ND-(CH2NH2)n
FL intensity
Time (sec)

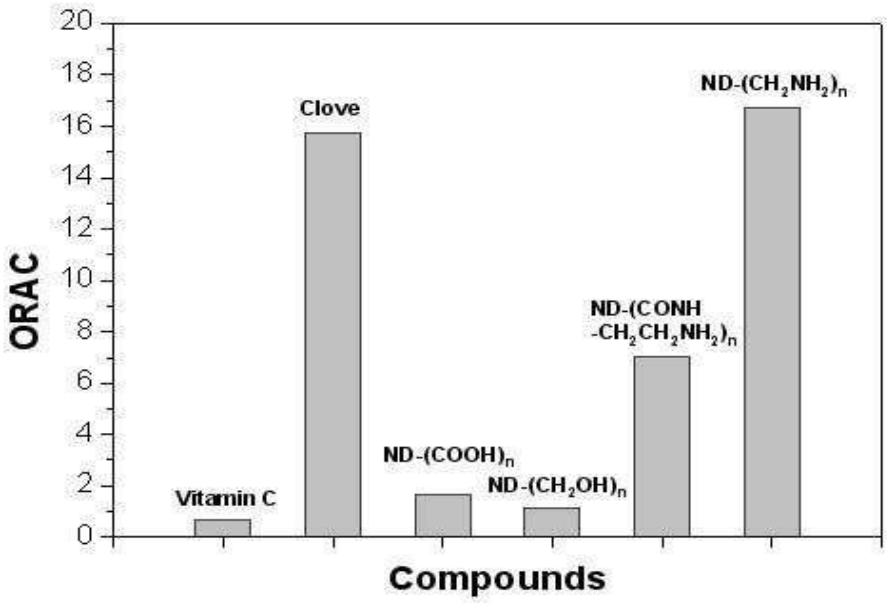
도면8


ND-(CH2NH2)n
ND-(CONHCH2CH2NH2)n
ND-(CH2OH)n
ND-(COOH)n
blank
FL intensity
Time (sec)
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
0
600
1200
1800
2400
3000
3600

도면9


AUC
Concentration (μM)
Vitamin C
Clove
ND-(COOH)n
ND-(OH)n
ND-(CONHCH2CH2NH)n
ND-(CH2NH)n
0
10
20
30
40
50
60
70
1
2
3
4
5

도면10


ORAC
Compounds
Vitamin C
Clove
ND-(COOH)n
ND-(CH2OH)n
ND-(CONH-CH2CH2NH2)n
ND-(CH2NH2)n
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20