(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0063920
(43) 공개일자 2025년05월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C08K 5/134 (2006.01) *A61K 47/26* (2017.01)
A61K 47/36 (2017.01) *A61K 9/06* (2006.01)
A61L 27/18 (2006.01) *A61L 27/20* (2006.01)
A61L 27/26 (2006.01) *A61L 27/52* (2006.01)
C08J 3/075 (2006.01) *C08L 5/08* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C08K 5/134 (2013.01)
A61K 47/26 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0146524
(22) 출원일자 2023년10월30일
심사청구일자 2023년10월30일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
허강무
대전광역시 유성구 어은로 57, 131동 1503호 (어은동, 한빛아파트)
조우경
대전광역시 유성구 죽동로 321, 107동 302호 (죽동, 금성백조예미지)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 천지

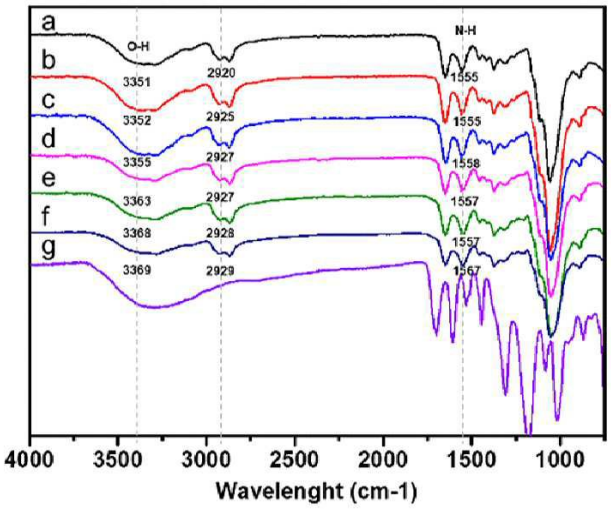
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 **폴리페놀을 포함하는 써모젤 조성물**

(57) 요 약

폴리페놀 함유 아실 글리콜 키토산 써모젤은 단일 성분 아실 글리콜 키토산 써모젤에 비해 세포 독성이 낮고, 폴리페놀과 아실 글리콜 키토산 써모젤의 물리적-화학적 가교 작용을 통해 기존의 취약한 기계적 물성을 개선할 수 있다. 폴리페놀의 피로갈롤기로 인해 자가 치유가 관찰되고, 물리적 안정성과 생분해성이 쉽게 제어되며, 단일 성분으로는 구현하기 어려웠던 항산화 및 항균 특성도 관찰할 수 있었다. 결과적으로 폴리페놀을 기능성 첨가제로 사용함으로써 단일 써모젤 특성의 한계를 보완하고, 폴리페놀의 특성을 부여하여 기존 써모젤의 성능을 향상시키게 되었다.

대 표 도 - 도3



(52) CPC특허분류
A61K 47/36 (2013.01)
A61K 9/06 (2013.01)
A61L 27/18 (2013.01)
A61L 27/20 (2013.01)
A61L 27/26 (2013.01)
A61L 27/52 (2013.01)
C08J 3/075 (2013.01)
C08L 5/08 (2013.01)
C08L 2203/02 (2013.01)

(72) 발명자
박서영
대전광역시 유성구 대학로141번길 1, 301호 (궁동)
김선희
대전광역시 유성구 한밭대로313번길 40, 403호 (장대동)
신세연
부산광역시 부산진구 거제대로 37, 202동 403호 (양정동, 현대아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711191588
과제번호	2022R1A4A1028372
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	집단연구지원
연구과제명	바이오액티브 써모젤 설계응용 기초연구실
기 여 율	1/2
과제수행기관명	충남대학교
연구기간	2022.06.01 ~ 2025.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711199818
과제번호	2023-KOITA-RND3-1-09
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	(사단)한국산업기술진흥협회
연구사업명	기업부설연구소R&D역량강화지원
연구과제명	태반 줄기세포 유효 인자 및 엑소좀 기반 하이드로겔형 염증치료제
기 여 율	1/2
과제수행기관명	충남대학교
연구기간	2023.07.01 ~ 2025.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

아실 글리콜 키토산(Acyl Glycol Chitosan)과 폴리페놀(Polyphenol)을 포함하는 써모겔 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 아실 글리콜 키토산 100 중량부를 기준으로 상기 폴리페놀이 0.1 내지 10 중량부를 갖는 것을 특징으로 하는 써모겔 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 아실 글리콜 키토산 100 중량부를 기준으로 상기 폴리페놀이 5.0 내지 10 중량부를 갖는 것을 특징으로 하는 써모겔 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 아실 글리콜 키토산이 헥사노일 글리콜 키토산(Hexanoyl Glycol Chitosan; HGC)인 것을 특징으로 하는 써모겔 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 아실 글리콜 키토산이 옥타노일 글리콜 키토산(Octanoyl Glycol Chitosan; OGC)인 것을 특징으로 하는 써모겔 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 폴리페놀이 탄닌산(Tannic Acid; TA)인 것을 특징으로 하는 써모겔 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 폴리페놀이 갈산(Gallic Acid; GA)인 것을 특징으로 하는 써모겔 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 40kPa 이상의 압축강도를 갖는 것을 특징으로 하는 써모겔 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서, DPPH 분석법에서 80% 이상의 라디칼 소거능을 갖는 것을 특징으로 하는 써모겔 조성물.

청구항 10

제1항에 있어서, ABTS 분석법에서 95% 이상의 라디칼 소거능을 갖는 것을 특징으로 하는 써모겔 조성물.

청구항 11

제1항에 있어서, 군집 형성 단위 (Colony forming unit, CFU) 실험에서 10% 이하의 군집 형성 단위를 갖는 것을 특징으로 하는 써모겔 조성물.

청구항 12

제1항의 써모겔 조성물을 포함하는 약물 전달체.

청구항 13

제1항의 써모겔 조성물을 포함하는 조직공학용 생체재료.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 약물 전달체 및 조직공학용 생체재료로 사용되는 써모겔에 관한 것으로, 구체적으로 아실 글리콜 키토산(Acyl Glycol Chitosan)과 폴리페놀(Polyphenol)을 포함하는 써모겔 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 온도에 민감한 하이드로겔로 분류되는 써모겔은 온도 변화에 따라 물리적 상태를 변경할 수 있는 독특한 졸-겔 전이 기능을 가지고 있다. 일반적으로 3차원 네트워크를 형성하기 위해 서로 얽혀 있는 폴리머 사슬로 구성되는 이러한 써모겔은 낮은 임계 농도 온도(LCST)와 일치하는 농도에서 졸-겔 전이 현상을 나타낸다. 이러한 전이 역학은 재료의 물리적 특성과 안정성에 큰 영향을 미친다. 써모겔은 약물 전달, 조직 공학 및 상처 치유와 같은 분야에서 다양한 잠재적 응용 분야를 가지고 있다. 이러한 광범위한 활용성에도 불구하고 기존의 써모겔은 겔 안정성 저하, 분해 저항성, 생체 내 부작용 가능성 등의 문제를 안고 있었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0003] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 높은 기계적 강도를 갖고, 겔 안정성이 높고, 분해 저항성이 높은 써모겔 조성물을 제공하는 것이다. 구체적으로, 아실 글리콜 키토산과 폴리페놀을 포함하는 써모겔 조성물을 제공할 수 있다.

[0004] 다만, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 상기 언급한 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 하기의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0005] 본 발명의 일 실시상태는 아실 글리콜 키토산과 폴리페놀을 포함하는 써모겔 조성물을 제공한다.

[0006] 본 발명의 일 실시상태에 있어서, 상기 아실 글리콜 키토산 100 중량부를 기준으로 상기 폴리페놀이 0.1 내지 10 중량부를 갖는 것일 수 있다.

[0007] 본 발명의 일 실시상태에 있어서, 상기 아실 글리콜 키토산 100 중량부를 기준으로 상기 폴리페놀이 5.0 내지 10 중량부를 갖는 것일 수 있다.

[0008] 본 발명의 일 실시상태에 있어서, 상기 아실 글리콜 키토산이 헥사노일 글리콜 키토산(Hexanoyl Glycol Chitosan; HGC)인 것일 수 있다.

[0009] 본 발명의 일 실시상태에 있어서, 상기 아실 글리콜 키토산이 옥타노일 글리콜 키토산(Octanoyl Glycol Chitosan; OGC)인 것일 수 있다.

[0010] 본 발명의 일 실시상태에 있어서, 상기 폴리페놀이 탄닌산(Tannic Acid; TA)인 것일 수 있다.

[0011] 본 발명의 일 실시상태에 있어서, 상기 폴리페놀이 갈산(Gallic Acid; GA)인 것일 수 있다.

[0012] 본 발명의 일 실시상태에 있어서, 40kPa 이상의 압축강도를 갖는 것일 수 있다.

[0013] 본 발명의 일 실시상태에 있어서, DPPH 분석법에서 80% 이상의 라디칼 소거능을 갖는 것일 수 있다.

[0014] 본 발명의 일 실시상태에 있어서, ABTS 분석법에서 95% 이상의 라디칼 소거능을 갖는 것일 수 있다.

[0015] 본 발명의 일 실시상태에 있어서, 군집 형성 단위(Colony forming unit, CFU) 실험에서 10% 이하의 군집 형성 단위를 갖는 것일 수 있다.

[0016] 본 발명의 일 실시상태는 상기 써모겔 조성물을 포함하는 약물 전달체를 제공한다.

[0017] 본 발명의 일 실시상태는 상기 써모겔 조성물을 포함하는 조직공학용 생체재료를 제공한다.

발명의 효과

[0018] 폴리페놀 함유 아실 글리콜 키토산 써모젤은 단일 성분 아실 글리콜 키토산 써모젤에 비해 세포 독성이 낮고, 폴리페놀과 아실 글리콜 키토산 써모젤의 물리적-화학적 가교 작용을 통해 기존의 취약한 기계적 물성을 개선할 수 있다. 폴리페놀의 피로갈롤기로 인해 자가 치유가 관찰되고, 물리적 안정성과 생분해성이 쉽게 제어되며, 단일 성분으로는 구현하기 어려웠던 항산화 및 항균 특성도 관찰할 수 있었다. 결과적으로 폴리페놀을 기능성 첨가제로 사용함으로써 단일 써모젤 특성의 한계를 보완하고, 폴리페놀의 특성을 부여하여 기존 써모젤의 성능을 향상시키게 되었다.

도면의 간단한 설명

[0019] **도 1**은 글리콜 키토산(Glycol Chitosan; GC) 및 HGC의 1H-NMR 및 ATR-FTIR 스펙트럼의 특성화를 나타낸다.

도 2는 GC 및 OGC의 1H-NMR 및 ATR-FTIR 스펙트럼의 특성화를 나타낸다.

도 3은 HGC와 TA 혼합 후 수산기 특성 피크의 신호 변화를 나타낸다.

도 4는 OGC와 GA 혼합 후 수산기 특성 피크의 신호 변화를 나타낸다.

도 5는 HGC/TA 써모젤에서의 물리적 결합과 화학적 결합을 나타내는 모식도이다.

도 6은 시간에 따른 HGC 및 HGC/TA 써모젤의 외관을 나타낸다.

도 7은 시간에 따른 OGC 및 OGC/GA 써모젤의 외관을 나타낸다.

도 8은 (a) 25° C 및 (b) 37° C에서의 HGC 및 HGC/TA 써모젤의 시간에 따른 저장 모듈러스를 나타낸다.

도 9는 37° C에서의 OGC 및 OGC/GA 써모젤의 시간에 따른 저장 모듈러스를 나타낸다.

도 10은 HGC/TA 써모젤이 자가 치유 능력을 가지고 있는지 확인하기 위한 거시적 자가 치유 테스트를 나타낸다.

도 11은 HGC/TA의 유변학적 회복 분석 결과를 나타낸다.

도 12는 HGC/TA 및 HGC 써모젤의 압축 강도를 나타낸다.

도 13은 37° C에서 PBS 내 HGC/TA 및 HGC 써모젤의 시험관 내 겔 안정성 테스트를 나타낸다.

도 14는 37℃에서 10mg/mL의 리소자임을 함유한 PBS에서 HGC 및 HGC/TA 써모젤의 효소 분해 프로파일을 나타낸다.

도 15는 HGC/TA의 가교 형태를 보여주는 FE-SEM 이미지이다.

도 16은 HGC 및 TA 혼합의 DPPH 분석 결과를 나타낸다.

도 17은 OGC 및 GA 혼합의 DPPH 분석 결과를 나타낸다.

도 18은 HGC 및 TA 혼합의 ABTS 분석 결과를 나타낸다.

도 19는 HGC/TA의 시험관 내 항균 활성을 나타낸다. **도 19a**는 다양한 샘플에 대한 *E. coli* 및 *S. aureus*의 억제 구역(왼쪽) 및 콜로니(오른쪽)를 나타낸다. **도 19b**는 억제 영역, 광학 밀도 및 상대 콜로니 형성 단위(%)의 정량 분석을 나타낸다.

도 20은 HGC/TA의 시험관내 세포독성을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 본 명세서에 있어서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함" 한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0021] 본원 명세서에서, "A 및/또는 B"는 "A 및 B, 또는 A 또는 B"를 의미한다.

[0022] 이하, 본 발명에 대하여 더욱 상세하게 설명한다.

[0023] 본 발명의 일 실시상태는 아실 글리콜 키토산과 폴리페놀을 포함하는 써모젤 조성물을 제공한다.

[0024] 본 발명의 일 실시상태에 있어서, 아실 글리콜 키토산 100 중량부를 기준으로 폴리페놀이 0.1 내지 10 중량부를 갖는 것일 수 있다. 아실 글리콜 키토산 100 중량부를 기준으로 폴리페놀이 5.0 내지 10 중량부를 갖는 것일 수 있다. 아실 글리콜 키토산과 폴리페놀의 비율은 0.1 내지 20, 0.5 내지 15, 1.0 내지 10 또는 5.0 내지 10일 수

있다. 아실 글리콜 키토산과 폴리페놀의 비율은 0.1 이상, 0.5 이상, 1.0 이상 또는 5.0 이상일 수 있다. 아실 글리콜 키토산과 폴리페놀의 비율은 20.0 이하, 15.0 이하 또는 10 이하일 수 있다. 아실 글리콜 키토산과 폴리페놀의 비율은 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 또는 10일 수 있다.

[0025] 본 발명의 일 실시상태에 있어서, 상기 아실 글리콜 키토산이 헥사노일 글리콜 키토산인 것일 수 있다. 본 발명의 일 실시상태에 있어서, 상기 아실 글리콜 키토산이 옥타노일 글리콜 키토산인 것일 수 있다. 아실 글리콜 키토산은 아세틸, 프로피오닐, 부티릴, 발레릴, 헥사노일, 헵타노일, 옥타노일, 올레오일기와 같은 다양한 아실기로 치환된 글리콜 키토산일 수 있다.

[0026] 본 발명의 일 실시상태에 있어서, 상기 폴리페놀이 탄닌산인 것일 수 있다. 본 발명의 일 실시상태에 있어서, 상기 폴리페놀이 갈산인 것일 수 있다.

[0027] 본 발명의 일 실시상태에 있어서, 40kPa 이상의 압축강도를 갖는 것일 수 있다. 본 발명의 일 실시상태에 있어서, 상기 압축강도는 10kPa 이상, 20kPa 이상, 30kPa 이상, 40kPa 이상 또는 50kPa 이상일 수 있다.

[0028] 본 발명의 일 실시상태에 있어서, DPPH 분석법에서 80% 이상의 라디칼 소거능을 갖는 것일 수 있다. 상기 DPPH 분석법에서의 라디칼 소거능은 70% 이상, 80% 이상 또는 90% 이상일 수 있다.

[0029] 본 발명의 일 실시상태에 있어서, ABTS 분석법에서 95% 이상의 라디칼 소거능을 갖는 것일 수 있다. 상기 ABTS 분석법에서의 라디칼 소거능은 70% 이상, 80% 이상 또는 90% 이상일 수 있다.

[0030] 본 발명의 일 실시상태에 있어서, 군집 형성 단위 (Colony forming unit, CFU) 실험에서 10% 이하의 군집 형성 단위를 갖는 것일 수 있다. 상기 군집 형성 단위는 20% 이하, 15% 이하, 10% 이하 또는 5% 이하일 수 있다.

[0031] 본 발명의 일 실시상태는 상기 써모겔 조성물을 포함하는 약물 전달체를 제공한다.

[0032] 본 발명의 일 실시상태는 상기 써모겔 조성물을 포함하는 조직공학용 생체재료를 제공한다.

[0034] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명하기 위해 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 그러나, 본 발명에 따른 실시예들은 여러 가지 다른 형태로 변형될 수 있으며, 본 발명의 범위가 아래에서 기술하는 실시예들에 한정되는 것으로 해석되지 않는다. 본 명세서의 실시예들은 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0035] **제조예**

[0036] **재료**

[0037] GC(DP ≥ 400)는 Wako Pure Chemical Industries (일본, 오사카)에서 구입했다. 탄닌산은 Alfa Aesar Co. Ltd. (중국 톈진)에서 구입했다. 닭고기 달걀 흰자에서 추출한 헥사노산 무수물(97%)과 리소자임은 Sigma-Aldrich (미국 미주리주세인트루이스)에서 조달했다. DPPH(자유 라디칼, 순도 95%), ABTS 및 인산염 완충 식염수 분말은 GibcoTM(Thermo Fisher Scientific, 미국)에서 제공했다. 투석 멤브레인(12~14kDa)은 Spectrum Laboratories (미국)에서 구입했다. 아세톤과 메탄올은 삼천 화학(한국)에서 구입했다. 모든 증류수는 3차 증류수를 사용했다.

[0039] **제조예 1. HGC 합성**

[0040] GC(3 g)를 375 mL의 증류수에 용해한 다음 375 mL의 메탄올로 희석했다. 미리 정해진 양(1.06mL)의 헥사노산 무수물을 교반하면서 GC 용액에 첨가했다. 그런 다음 실온에서 24시간 동안 계속 교반한 후 아세톤에서 침전하여 생성된 HGC 생성물을 수집한 다음 투석막을 사용하여 2일 동안 증류수에 대해 투석했다(MWCO = 12-14 kDa). 마지막으로 5일간 동결 건조 후 분말 형태로 HGC를 얻었다.

[0042] **제조예 2. HGC/TA 써모겔 제조**

[0043] **표 1**과 같이 HGC와 TA를 준비했다: 먼저, HGC를 증류수에 4.5 wt% 농도로 용해했다. 다음 TA를 0.1ml의 증류수에 0.1%, 0.5%, 1%, 5%, 10%의 HGC 중량 비율에 따라 조성에 따라 용해시켰다. 혼합 튜브를 통해 HGC 1ml 표준 용액에 TA 0.1ml 용액을 추가했다. 그 후 37° C의 수조에서 4일 이상 산화시켰다.

표 1

[0044]

샘플	HGC:TA (중량비)	HGC(mg)	TA(mg)	전체 HGC 농도(wt%)	전체 TA 농도(wt%)
HGC36		40		4	
HGC/TA0.1	100/0.1	45	0.045	4	0.04
HGC/TA0.5	100/0.5	45	0.225	4	0.25
HGC/TA1.0	100/1	45	0.45	4	0.4
HGC/TA5.0	100/5	45	2.25	4	2.5
HGC/TA10	100/10	45	4.5	4	4.0

[0046] **제조예 3. OGC 합성**

[0047] GC(1.5 g)를 170 mL의 증류수에 용해한 다음 170 mL의 메탄올로 희석했다. 미리 정해진 양(0.401mL)의 옥타노산 무수물을 교반하면서 GC 용액에 첨가했다. 그런 다음 실온에서 24시간 동안 계속 교반한 후 아세톤에서 침전하여 생성된 OGC 생성물을 수집한 다음 투석막을 사용하여 2일 동안 증류수에 대해 투석했다. 마지막으로 5일간 동결 건조 후 분말 형태로 OGC를 얻었다.

[0049] **제조예 4. OGC/GA 써모겔 제조**

[0050] **표 2**와 같이 OGC와 GA를 준비했다: 먼저, OGC를 증류수에 6 wt% 농도로 용해했다. 다음 GA를 OGC 중량을 기준으로 0.1%, 1%, 10%의 중량으로 용해시켰다. 혼합 튜브를 통해 OGC 표준 용액에 GA 용액을 추가했다. 그 후 37° C의 수조에서 보관하였다.

[0052] **실시예 1. HGC 및 OGC의 특성 분석**

[0053] HGC의 화학적 조성은 600MHz에서 작동하는 1H-NMR(AVANCE III 600, 독일 브루커)을 사용하여 특성화했다. HGC 써모겔을 D_2O 0.5 wt%에 용해시켰다. 4.85ppm의 D_2O 피크가 기준 피크로 사용되었다. HGC의 헥사노일화 정도는 1H-NMR 분광법에 의해 35.8%로 계산되었다.

[0054] HGC 써모겔은 GC의 N-아실화를 통해 합성하였다. 합성된 HGC의 합성 결과는 1H-NMR 및 ATR-FTIR 분석을 통해 확인하였다. **도 1**의 (a)는 헥사노일기의 도입을 확인하기 위해 GC와 HGC의 1H-NMR 분석 결과를 비교한 것이다. GC의 경우 글리코프라노실 고리의 H2-H8에 해당하는 특징적인 피크가 δ = 3.9~3.5 ppm 범위에서 관찰되는 반면, HGC 스펙트럼의 경우 도입된 헥사노일기의 메틸기 및 메틸렌기에 해당하는 수소의 특징적인 피크가 관찰됨을 알 수 있다. 각각 δ = 0.9 ppm, δ = 1.3 ppm, δ = 1.6 ppm, δ = 2.3 ppm이다. 헥사노일기의 헥사노일화 정도는 1H-NMR 스펙트럼에서 헥사노일기의 수소 적분율과 GC의 글루코프라노실 고리의 수소 적분율을 비교하여 35.8%로 계산되었다. 기존 합성 HGC와 유사한 결과를 얻었다.

[0055] **도 1**의 (b)는 ATR-FTIR 분석 결과를 통해 HGC 합성을 확인한 것이다. GC와 HGC의 경우 두 스펙트럼 모두에서 수산기의 연신진동과 N-H기의 연신진동에 의한 특징적인 피크가 3300 cm^{-1} 부근에서 넓게 관찰된 반면, HGC의 경우 헥사노일 피크가 2870 cm^{-1} 부근에서 관찰되었다. 이는 해당 그룹에 존재하는 메틸기($-CH_3$)와 메틸렌($-CH_2-$)의 C-H 연신 진동으로 인해 특징적인 피크가 나타나는 것을 관찰할 수 있었다. 또한, 헥사노일기의 도입을 위한 아실화 반응 후 GC에 비해 1차 아민의 굽힘 진동 피크(1588 cm^{-1})는 감소한 반면, 아미드기의 굽힘 진동 피크(1558 cm^{-1})와 카르보닐기의 연신 진동(1652 cm^{-1})이 뚜렷이 나타나는 것을 관찰할 수 있었다.

[0056] OGC 써모겔도 GC의 N-아실화를 통해 합성하였다. 합성된 OGC의 합성 결과는 1H-NMR 및 ATR-FTIR 분석을 통해 확인하였다. **도 2**의 (a)는 옥타노일기의 도입을 확인하기 위해 GC와 OGC의 1H-NMR 분석 결과를 비교한 것이다. OGC 스펙트럼의 경우 도입된 옥타노일기의 메틸기 및 메틸렌기에 해당하는 수소의 특징적인 피크가 관찰됨을 알 수 있다. 옥타노일기의 옥타노일화 정도는 1H-NMR 스펙트럼에서 옥타노일기의 수소 적분율과 GC의 글루코프라노

실 고리의 수소 적분율을 비교하여 16.8%로 계산되었다.

[0057] **도 2**의 (b)는 ATR-FTIR 분석 결과를 통해 OGC 합성을 확인한 것이다. OGC의 경우 옥타노일 피크가 2890 cm^{-1} 부근에서 관찰되었다. 이는 해당 그룹에 존재하는 메틸기(-CH_3)와 메틸렌(-CH_2-)의 C-H 연신 진동으로 인해 특징적인 피크가 나타나는 것을 관찰할 수 있었다.

[0059] **실시예 2. HGC/TA 및 OGC/GA의 특성 분석**

[0060] HGC 및 HGC/TA 써모젤의 감쇠 총 반사율 ATR-FTIR 스펙트럼은 Nicolet iS 5 분광계(Thermo Scientific, 미국)를 사용하여 기록했다. 4000~750cm^{-1}의 주파수 범위에서 4cm^{-1}의 해상도로 32회의 스캔을 수행하여 ATR-FTIR 분석을 수행하여 HGC 및 HGC/TA 써모젤을 확인했다.

[0061] HGC에 TA를 첨가하여 HGC/TA 써모젤을 제조했다. 이는 각 써모젤에 대한 ATR-FTIR 분석을 통해 확인되었다. **도 3**은 TA 첨가 후 수산기 특성 피크(3351-3369ppm)의 신호가 강화되었음을 보여준다. 이는 TA에 페놀 수산기(-OH)가 많이 존재하기 때문임을 알 수 있었다. **도 3**은 (a)는 HGC 단독, (b) HGC/TA0.1, (c) HGC/TA0.5, (d) HGC/TA1.0, (e)HGC/TA5.0, (f) HGC/TA10, (g) 탄닌산에 대한 특성 피크를 나타낸다. 특성 피크의 신호 강도는 단일 HGC에서 2920 cm^{-1}에서 2929 cm^{-1}로 증가 및 이동하여 TA가 CS 구조에 성공적으로 도입되었음을 나타낸다. N-H 결합의 굽힘 진동 피크 (1555 ~ 1567 cm^{-1})가 이동하는 경향은 HGC와 유사한 거동을 나타내면서 N-H와 탄닌산 사이의 화학 결합에 기인한다. 이러한 결과를 통해 HGC와 탄닌산은 화학 결합에 의해 가교됨을 알 수 있다.

[0062] OGC에 GA를 첨가하여 OGC/GA 써모젤을 제조했다. 이는 각 써모젤에 대한 ATR-FTIR 분석을 통해 확인되었다. **도 4**는 GA 첨가 후 수산기 특성 피크(3351-3369ppm)의 신호가 강화되었음을 보여준다. 이는 GA에 페놀 수산기(-OH)가 많이 존재하기 때문임을 알 수 있었다. **도 4**는 OGC 단독, OGC/GA0.1, OGC/GA1.0, OGC/GA10, GA 단독에 대한 특성 피크를 나타낸다. GA 함량이 증가함에 따라 카르보닐의 신축 진동으로 나타나는 1650cm^{-1}의 피크가 감소하였기 때문에 쉬프 염기 반응에 의해 화학적 가교가 성공적으로 형성되었음을 알 수 있다.

[0064] **실시예 3. 써모젤의 시간에 따른 유변학적 거동**

[0065] 산화에 의한 시간 의존적 저장 탄성률을 관찰하기 위해 레오미터(HR-10 rheometer, TA Instruments, New Castle, DE, USA)를 사용하여 HGC 및 HGC/TA 써모젤의 시간 의존적 유변학적 분석을 수행했다. 25 ° C 및 37 ° C에서 10 Pa의 일정한 응력, 1Hz의 주파수 하에서 직경 20mm, 간격 1mm의 두 개의 평행 플레이트 사이에 HGC(4wt%, 증류수)와 HGC/TA를 배치했다. 시간 의존적 저장 탄성계수는 60초의 스윕 시간에서 시간 스윕 방법을 사용하여 분석했다. 각 샘플에 대해 0시간, 6시간, 12시간, 24시간, 48시간, 96시간, 192시간 후 유변학적 거동을 측정했다.

[0066] HGC는 TA가 제공하는 추가적인 가교 효과로 인해 TA 농도가 증가함에 따라 TA 처리 하이드로겔에서 크게 증가했다. 이 반응은 탄닌산의 페놀기가 퀴논으로 산화되는 것으로 시작된다. 이때 퀴논과 HGC 사이의 수소 결합, 소수성 결합 등의 물리적 결합과 HGC의 아민기와의 마이클 첨가, 쉬프 염기 반응 등의 화학적 결합을 통해 가교가 일어난다. **도 5**는 HGC/TA 써모젤에서의 물리적 결합과 화학적 결합을 나타내는 모식도이다. **도 6**은 시간에 따른 HGC 및 HGC/TA 써모젤의 외관을 나타낸다. 탄닌산 함량이 증가함에 따라 각 시료가 진한 갈색으로 변하고 시간이 지남에 따라 불투명해지는 것이 확인되었다. 이 메커니즘은 아레니우스 방정식에 의해 온도에 영향을 받기 때문에 상온(25 ºC)과 체온(37 ºC)을 비교하여 관찰했다. **도 7**은 시간에 따른 OGC 및 OGC/GA 써모젤의 외관을 나타낸다. GA 함량이 증가함에 따라 각 시료가 진한 갈색으로 변하고 시간이 지남에 따라 불투명해지고 유동성도 감소하는 것이 확인되었다.

[0067] **도 8**은 (a) 25° C 및 (b) 37° C에서의 HGC 및 HGC/TA 써모젤의 시간에 따른 저장 모듈러스를 나타낸다. 그 결과 37° C에서 저장 탄성계수가 25° C보다 2배 더 높게 나타났다. 탄닌산 함량이 증가할수록 저장탄성계수가 증가하여 최종적으로 37 ºC 그래프를 통해 96일 후 저장탄성계수가 기존 HGC 대비 최대 약 100배까지 향상된 것을 확인할 수 있었다. **도 9**는 37° C에서의 OGC 및 OGC/GA 써모젤의 시간에 따른 저장 모듈러스를 나타낸다. OHC/GA10의 경우 저장탄성계수가 현저히 증가하였다. 기존 써모젤의 취약한 기계적 특성이 저장탄성계수 값을 증가시킴으로써 개선된 것을 확인했다. 이는 상처 치유 및 조직공학용 생체재료로 활용될 수 있을 것으로 기대

된다.

[0069] **실시예 4. 자가 치유 특성**

[0070] **4.1 써모겔의 거시적 회복 분석**

[0071] HGC/TA 써모겔의 자가 치유 능력을 평가하기 위해 거시적 자가 치유 테스트를 수행했다. HGC/TA 써모겔을 두 조각으로 잘라 25℃에서 함께 배양했다. 1시간 후 핀셋으로 HGC/TA 써모겔을 들어 올려 자체 무게를 지탱할 수 있는지 확인했다.

[0072] HGC/TA 써모겔은 고유의 자가 치유 특성을 가지고 있어 손상 시 자율적으로 구조적 무결성을 복구하고 회복할 수 있다. HGC/TA 써모겔의 자가 치유 능력은 탄닌산 분자 간 상호 작용의 가역적 특성에 기인한다. 자가 치유 능력은 피롤갈롤기를 갖는 탄닌산 간의 분자 간/분자 내 상호 작용 또는 이 수산기와 HGC 백본 사이의 많은 수소 결합에 의해 발생한다. HGC/TA 써모겔이 자가 치유 능력을 가지고 있는지 확인하기 위해 먼저 거시적 자가 치유 테스트를 수행했다(**도 10**). 외부 개입 없이 HGC/TA 써모겔을 두 조각으로 절단하고 서로 다른 하이드로겔 조각을 25ºC에서 전체 개체로 접합했다. 그 후 1시간 이내에 완전히 치유되었다.

[0073] **4.2 써모겔의 유변학적 회복 분석**

[0074] 레오미터를 사용하여 HGC/TA 써모겔의 자가 치유 능력에 대한 정량 분석을 수행했다. 직경 20mm, 간격 1.0mm의 평행한 플레이트 사이에 HGC/TA 써모겔을 로드했다. 임계 변형 포인트를 얻기 위해 변형 진폭 스윕 테스트(변형 [γ] = 0.1-5000%, 25℃에서 1Hz 고정 주파수)를 수행했다. 그런 다음 대체 단계 스트레인 스윕 테스트를 수행했다. 25℃에서 1Hz의 고정 주파수로 60초 간격으로 작은 변형률(γ = 0.1%)에서 큰 변형률(γ = 1000%)로 변형률을 전환했다. 써모겔이 유지되는 변형률 범위는 시료마다 다르며, 실험은 큰 변형률 값인 1000%를 기준으로 진행했다.

[0075] HGC/TA 써모겔의 스트레인 스윕 결과에서 유변학적 회복 분석을 추가로 사용하여 HGC/TA 써모겔의 자가 치유 특성을 평가했다. 변형 진폭 그래프는 탄성 겔 상태(G′ >G″)에서 점성 액체와 같은 상태(G″ >G′)로의 전환이 관찰되는 재료의 유동점을 보여준다. 이 실험 결과에서 HGC/TA 써모겔의 G′ 곡선과 G″ 곡선은 1000%의 변형률에서 교차하여 변형률이 1000%보다 클 때 써모겔 구조가 완전히 파괴됨을 보여주었다. 그런 다음 0.1%에서 1000%까지 연속적인 변형률 사이클 변화를 사용하여 써모겔의 유변학적 회복 거동을 평가했다. **도 11**은 HGC/TA의 유변학적 회복 분석 결과를 나타낸다. 0.1%에서 1000%까지 1Hz의 동일한 주파수에서 각 단계 사이에 60초 간격으로 연속적으로 변형 주기를 변화시켰다. 더 큰 변형률(1000%)에 노출되었을 때는 써모겔 구조가 붕괴되었지만, 더 작은 변형률(0.1%)에서는 하이드로겔이 형태를 회복할 수 있었음을 알 수 있었다. 그 결과 각 샘플의 자가 치유 능력을 확인할 수 있었다.

[0077] **실시예 5. 압축강도 시험**

[0078] HGC 및 HGC/TA 써모겔의 압축 강도 시험은 500kN 로드셀이 장착된 범용 시험기(Texture analyzer(EZ-SX, 500 N, 일본 Shimadzu)를 사용하여 수행했다. 테스트할 HGC 및 HGC/TA 써모겔을 위해 10mm(직경) × 10mm(높이) 크기와 원통형 모양의 써모겔을 준비했다. 샘플을 테스트 기계에 넣고 분당 5mm의 크로스 헤드 속도로 압축했다. 이전 실험에 이어 각 압축 강도 테스트를 세 번 반복했으며, 오차 막대는 이러한 데이터의 변화를 보여준다.

[0079] 탄닌산을 함유한 HGC 써모겔은 기존 HGC의 소수성 결합에 더해 탄닌산 간의 상호작용, 탄닌산과 HGC 백본 간의 물리적 결합 및 화학적 결합에 의해 가교 결합이 이루어진다. 그 결과 압축강도 역시 저장탄성계수가 증가할수록 높은 강도를 나타내어 기계적 물성이 우수한 써모겔이 될 것으로 추론했다. **도 12**는 HGC/TA 및 HGC 써모겔의 압축 강도를 나타낸다. HGC의 압축강도는 1kPa인 반면 탄닌산을 함유한 HGC는 HGC보다 높은 압축강도를 나타냈다. 탄닌산 함량이 증가할수록 압축강도는 HGC/TA5.0의 경우 최대 47kPa까지 증가했다. 그러나 HGC/TA10의 경우 탄닌산 간의 상호작용이 커져 써모겔이 부서지기 쉬운 것으로 보인다. 그 결과, TA를 함유한 HGC 써모겔의 기계적 물성이 상호 상호작용에 의해 개선되는 것을 확인하였다.

[0081] **실시예 6. 물리적 안정성 시험**

[0082] 37° C에서 4일 이상 산화시킨 HGC/TA 써모겔을 준비했다. 이 실험은 이전 실험을 참고하여 진행하였다. 5mL 바이알에 0.5mL의 HGC 및 HGC/TA 써모겔을 준비하여 37ºC로 유지된 인큐베이터에 두어 겔화를 유도했다. 30분 후, 같은 온도의 PBS 2mL를 각 바이알에 넣고 다시 인큐베이터에 보관한 후 6, 12, 24시간 간격으로 PBS를 교체한 다음 젤이 완전히 녹을 때까지 교체했다. 써모겔의 잔류 중량은 PBS를 교환하기 직전에 측정했다. 측정된 잔류 중량과 초기 중량의 비율을 백분율로 환산하고 다음 공식을 사용하여 시간 경과에 따른 잔류량(%)을 구했다.

[0083] 37° C에서 HGC/TA 써모겔의 시간 경과에 따른 겔 안정성을 평가했다. **도 13**은 37° C에서 PBS 내 HGC/TA 및 HGC 써모겔의 시험관 내 겔 안정성 테스트를 나타낸다. **도 13**에서 보는 바와 같이 단일 HGC는 약 20일 만에 분해되었으며, 탄닌산 함량이 가장 낮은 HGC/TA0.1도 거의 유사한 거동을 보였다. HGC/TA0.5의 경우 기존 HGC에 비해 2배 이상 높은 물리적 안정성을 보였으며, HGC/TA1.0의 경우 4배 이상 팽창 거동이 진행되어 2개월 후에도 물리적 안정성이 유지되는 것을 확인하였다. HGC/TA5.0 및 HGC/TA10의 경우 2개월 후에도 처음과 비슷한 상태를 유지했다. 이와 같이 HGC와 TA의 화학적 결합에 의해 겔의 안정성이 크게 증가하여 2개월 이상 써모겔이 유지되는 것을 관찰할 수 있었다. TA를 첨가함으로써 기존 합성 써모겔에 비해 물리적 안정성을 크게 향상시킬 수 있음을 확인했다.

[0085] **실시예 7. 시험관 내 생분해 시험**

[0086] 닭 달걀 흰자에서 추출한 리소자임(10 mg/mL)을 함유한 PBS를 사용하여 HGC/TA 혼합 써모겔의 생분해성을 평가했다. 각 샘플은 5mL 바이알에 0.5mL씩 준비했다. 각 샘플을 37° C의 인큐베이터에 보관하고 겔화가 발생한 후 무게를 측정했다. 무게를 측정한 후 각 써모겔 샘플에 리소자임이 포함된 PBS 용액 2mL를 첨가하고 3, 6, 12, 24, 36, 48, 60시간 후 써모겔의 무게를 측정한 후 같은 양의 새 PBS를 첨가했다. 시간 경과에 따른 써모겔의 잔류량(%)을 구하여 서로 비교했다.

[0087] GC로 제조된 HGC는 다양한 화학적 변형에 의해 생분해율이 변화하는 것으로 알려진 GC와 마찬가지로 라이소자임에 의해 생분해된다. 다양한 양의 탄닌산을 함유한 써모겔을 분해 효소가 있는 상태에서 시간이 지남에 따라 분해성을 관찰하고 단일 써모겔과 비교했다. **도 14**는 37℃에서 10mg/mL의 리소자임을 함유한 PBS에서 HGC 및 HGC/TA 써모겔의 효소 분해 프로파일을 나타낸다. **도 14**에서 볼 수 있듯이 HGC 써모겔은 하루 만에 분해가 완료되었다. 반면 탄닌산을 함유한 HGC 써모겔의 경우 0.1~1%는 36시간 이내, 5%는 48시간 이내, 10%는 60시간 이내에 분해되는 것으로 관찰되었다. 이러한 결과는 탄닌산 첨가에 따른 입체 장애의 영향으로 분해 속도가 느려졌기 때문인 것으로 추정된다. 단일 써모겔은 고유의 특성에 따라 분해성이 결정되는 반면, 탄닌산 함유 써모겔은 탄닌산 함량에 따라 분해성을 조절할 수 있다.

[0089] **실시예 8. HGC/TA의 FE-SEM 이미지**

[0090] **도 15**는 HGC/TA의 가교 형태를 보여주는 FE-SEM 이미지이다. 기존 HGC 써모겔은 서로 연결된 다공성 구조를 보이는 형태를 보였다. 이 HGC에 TA를 첨가하면 화학적, 물리적 가교 형태에 변화가 있을 것으로 추론했다. 측정 결과, HGC 써모겔에 TA를 첨가한 후 기공 크기가 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 형태가 다양해진 것은 TA 함량이 증가함에 따라 가교 정도가 증가했기 때문이다.

[0092] **실시예 9. 항산화 활성**

[0093] HGC 및 HGC/TA 써모겔의 방사형 소거 활성을 평가하기 위해 DPPH 및 ABTS 분석을 수행했다. 간단히 말해, DPPH 수용액(0.2mM)을 준비하여 어두운 방에 보관했다. 0.5mL의 써모겔을 5mL의 DPPH 용액에 넣고 어두운 곳에서 30분간 방치한 후, 일정 시간 간격으로 써모겔을 제거하여 DPPH 용액의 흡광도를 기록했다. 대조군으로 순수한 DPPH 용액을 사용했다. 자외선 분광광도계 UV-VIS 분광광도계(SINCO, 한국)를 사용하여 517nm에서 DPPH 용액의 흡광도를 기록하고, 써모겔 침지 전후 용액의 흡광도 차이(n = 3)로부터 라디칼 소거 활성을 측정했다.

[0094] ABTS 분석은 ABTS(7mM)와 과황산칼륨(2.4mM) 용액을 1:0.5 비율(v/v)로 혼합하여 ABTS 용액을 제조하고 12-16시간 동안 암실에서 보관한 후 증류수로 희석하여 734nm에서 흡광도 0.7(±0.1)이 되도록 했다.

[0095] DPPH 분석과 유사하게, 0.5mL의 써모겔을 5mL의 ABTS 용액에 넣고 30분 동안 어두운 곳에 둔 다음 필름 샘플을 제거하여 ABTS 용액의 흡광도를 기록했다. 순수한 ABTS 용액을 대조군으로 사용했으며, 734nm(n = 3)에서 용액

의 흡광도 차이를 기준으로 라디칼 스캐닝 활성을 분석했다. 써모젤의 항산화 활성은 다음 수학식 1과 같이 계산되었다:

[0096] [수학식 1]

[0097] $$\text{Antioxidant activity (\%)} = \frac{Ai - Af}{Ai} \times 100$$

[0098] 여기서, Ai는 순수한 DPPH 또는 ABTS 용액의 흡광도이고 Af는 써모젤을 침지한 후 동일한 용액의 흡광도이다.

[0099] DPPH 라디칼(보라색)은 항산화 화합물에서 수소 원자를 받아들여 안정한 DPPH-H 분자(무색)가 될 수 있는 안정한 자유 라디칼이다. 항산화능을 평가하기 위해 DPPH 분석법을 많이 사용하며, **도 16**은 517nm의 DPPH 분석 결과를 나타낸 데이터이다. **도 16**의 (a)는 써모젤과 30분의 접촉 시간 후 DPPH 용액의 UV-vis 스펙트럼을 나타내고, **도 16**의 (b)는 HGC 및 HGC/TA 써모젤의 DPPH 소거 활성을 나타낸다. 단일 HGC의 경우 항산화 활성이 거의 관찰되지 않은 반면, TA의 경우 항산화 활성이 관찰되었다. HGC/TA5.0 이상의 경우 80% 이상의 라디칼 소거능이 확인되어 항산화 능력의 가능성을 확인하였다. **도 17**은 OGC 및 GA 혼합의 DPPH 분석 결과를 나타낸다. **도 17**의 (a)는 써모젤과 접촉 후 DPPH 용액의 UV-vis 스펙트럼을 나타내고, **도 17**의 (b)는 OGC 및 OGC/GA 써모젤의 DPPH 소거 활성을 나타낸다.

[0100] ABTS 분석법에서 ABTS+ 라디칼(청록색)은 전자를 받아 안정한 ABTS(무색)가 될 수 있다. ABTS 분석은 DPPH와 함께 사용되는 항산화 능력 평가 시험이다. **도 18**은 734nm의 ABTS 분석 결과를 보여준다. **도 18**의 (a)는 써모젤과 30분의 접촉 시간 후 ABTS 용액의 UV-vis 스펙트럼을 나타내고, (b)는 HGC 및 HGC/TA 써모젤의 ABTS 소거 활성을 나타낸다. HGC/TA0.5 이상에서 거의 100%에 가까운 항산화 능력이 확인되었다. 예상대로 TA가 함유되지 않은 HGC는 활성을 보이지 않거나 상대적으로 낮은 활성을 보여, TA의 함량에 의해 항산화능이 인정되는 것을 확인하였다.

[0102] **실시예 10. 항균 실험**

[0103] HGC 및 HGC/TA의 항균 능력은 그람 음성균 *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5α와 그람 양성균 *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)을 이용하여 실험하였다. 박테리아 현탁액 (1.0×10^8 cells/mL for *E. coli* 와 6.2×10^8 cells/mL for *S. aureus*)은 10분의 1로 희석하여 항균 실험에 사용되었다. 희석한 박테리아 용액을 LB/KAN 고체 배지 (*E. coli*)와 LB 고체 배지 (*S. aureus*)에 100 μL씩 분주하였다. 그 후, HGC 및 HGC/TA 하이드로겔을 고체 배지의 중앙에 두고, 37℃에서 24시간 배양하였다. 24시간 후, 억제 영역(Inhibition zone)을 자를 이용하여 측정하였다. 고체 배지에 놓인 하이드로겔을 떼어 LB/KAN 배지 용액 (*E. coli*) 과 LB 배지 용액 (*S. aureus*) 3mL에 넣은 후, 37℃에서 3시간 동안 배양하였다. 배양한 용액을 UV-분광광도계(Optizen pop)를 이용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하여 균 성장 정도를 확인하였다. 배양한 용액을 이용하여 콜로니 형성 유닛(Colony forming unit, CFU) 실험을 진행하였다. 배양한 용액을 10^5까지 희석시킨 후, LB/KAN 고체 배지 (*E. coli*)와 LB 고체 배지 (*S. aureus*)에 100 μL씩 분주하여 도말한 뒤, 37℃에서 21시간 배양한 후 콜로니 형성을 Image J 프로그램을 이용하여 정량화하였다.

[0104] 억제 영역과 군집 형성 단위 (Colony forming unit, CFU) 실험을 통해 HGC/TA의 항균 능력을 평가하였다. **도 19**는 HGC/TA의 시험관 내 항균 활성을 나타낸다. **도 19a**는 다양한 샘플에 대한 *E. coli* 및 *S. aureus*의 억제 구역(왼쪽) 및 콜로니(오른쪽)를 나타낸다. **도 19b**는 억제 영역, 광학 밀도 및 상대 콜로니 형성 단위(%)의 정량 분석을 나타낸다. 통계 분석은 일원 분산 분석(*p < 0.05; **p < 0.01, ***p < 0.001, NS; 유의하지 않음)으로 수행되었다. 억제 영역은 그람 음성균인 *E. coli*와 그람 양성균인 *S. aureus*에 대해 탄닌산 함량에 따라 증가되는 경향을 보였다. 억제 영역 실험 시 중앙에 놓인 하이드로겔을 떼어 3시간 동안 배지에 배양했을 경우, 광학 밀도가 탄닌산 함량이 증가함에 따라 감소하는 경향을 보여 HGC/TA가 박테리아 성장을 억제한다는 것을 확인할 수 있었다. 명확한 균 성장 억제를 확인하기 위해 군집 형성 단위 실험을 진행하였다. 콜로니의 형성 양상을 보면 대조군인 HGC에 대해서는 균성장이 억제되지 않았으나, *E. coli*에 대해선 HGC/TA0.5, *S. aureus*대해서는 HGC/TA1.0부터 균 성장이 확연히 억제되는 것을 확인할 수 있었다.

[0106] **실시예 11. 세포독성 평가**

[0107] 쥐의 섬유아세포 (fibroblast)에서 유래된 NIH3T3 세포를 이용하여 HGC 및 HGC/TA의 생체적합성 시험을 수행하였다. 정량 평가 및 세포 이미지 관측을 위하여 WST-8 세포 생존성 어세이 키트 (Biomax) 및 LIVE/DEAD™ 생존성/세포독성 어세이 키트 (Invitrogen)를 이용하였다. HGC 및 HGC/TA는 실험 전 3시간 동안 자외선 조사 하에서 멸균되었고 그 후 10% (v/v) FBS와 1% (w/v) 페니실린/스트렙토마이신이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco) 2 mL가 있는 24-웰 플레이트에 넣어 용출시켰다. WST-8 분석 실험에서 NIH3T3 세포는 96-웰 배양 플레이트 ($1X10^4$ cell/well)에 분주하여 37℃ 인큐베이터에서 24시간 동안 배양하였다. 24시간 배양 후, 앞서 용출시킨 용액을 DMEM 용액으로 10분의 1 희석시킨 다음 세포에 첨가하여 37℃에서 24시간 배양시켰다. WST-8 용액을 10 μL씩 각 웰에 추가한 뒤, 37℃에서 2시간 추가 배양하였다. 흡광도는 마이크로플레이트 리더 (VersaMax, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 450 nm 파장에서 측정하였다. 세포 생존도는 450 nm에서 흡광도 차이를 이용하여 정량화하였다.

[0108] 세포 생존도 (%)=($Abs_{sample}/Abs_{control}$) X 100 (%).

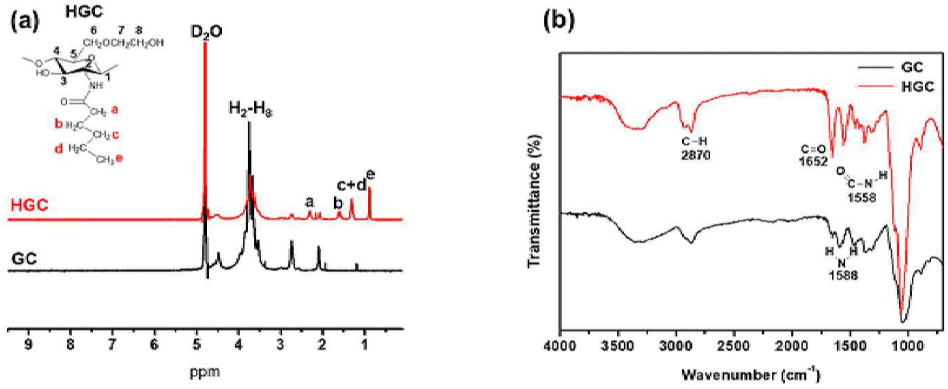
[0109] 세포의 생존/사멸 어세이는 NIH3T3 세포를 24 웰 배양 플레이트 ($2X10^4$ cell/well)에 분주한 다음 24시간 동안 배양하였다. 희석한 용출액을 각 웰에 가해준 뒤, 24시간 및 48시간 동안 배양하였다. 그 후, 2 μM 칼세인-AM (Calcein-AM), 4 μM 에티듐 호모다이머-1 (Ethidium homodimer-1)이 함유된 스테이닝 용액으로 처리하고 37℃에서 15분 동안 유지시킨 후, PBS로 세척하고 공초점 레이저 스캐닝 현미경 (confocal laser scanning microscopy) (LSM 880 with Airyscan, Zeiss)를 통해 세포 생존도를 측정하고 분석하였다.

[0110] 세포 생존도 = {(생존 세포)/(비-생존 세포 + 생존 세포)} X 100 (%).

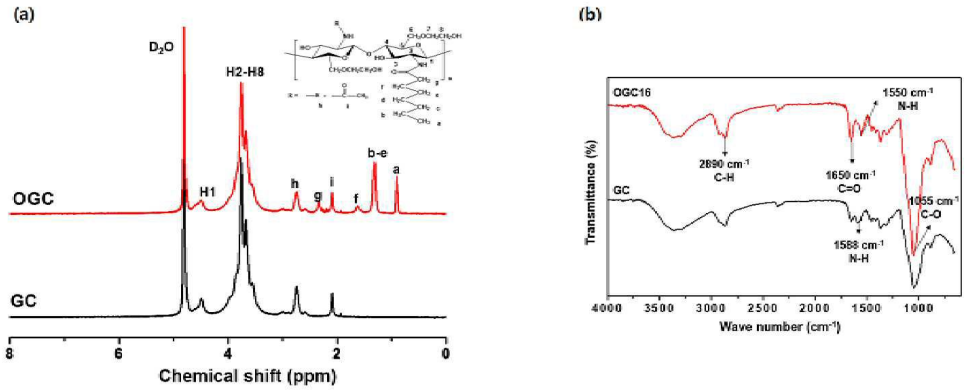
[0111] WST-8 assay 결과를 보면 HGC/TA 샘플을 아무런 처리하지 않은 대조군과 비교하였을 때, 모든 샘플군에서 85% 이상의 세포 생존율을 보여 독성이 없다는 것을 확인할 수 있었다. 세포가 HGC/TA 물질에 의한 손상 없이 잘 성장하는지를 확인하기 위해 생존/사멸 스테이닝을 이용하여 세포의 형태를 확인하였다. 그 결과 세포가 잘 뻗어 나와 서로 붙어 성장하는 양상을 확인할 수 있었다. 세포의 양상과 정량 분석 결과를 통해 HGC/TA 물질이 독성이 없다는 것을 확인하였다. **도 20**은 HGC/TA의 시험관내 세포독성을 나타낸다. **도 20**의 (a)는 24시간 및 48시간 동안 하이드로겔 용출로 배양된 NIH3T3 세포의 생존/사멸 이미지를 나타내고, 눈금 막대는 50 μm를 나타낸다. **도 20**의 (b) 상부는 생존/사멸 이미지에서 HGC/TA의 세포 생존 가능성을 나타내고, 하부는 WST-8 분석에서 HGC/TA의 세포 생존율을 나타낸다. WST-8 분석을 위해 NIH3T3 세포를 HGC/TA 용출로 24시간 동안 처리하였다.

도면

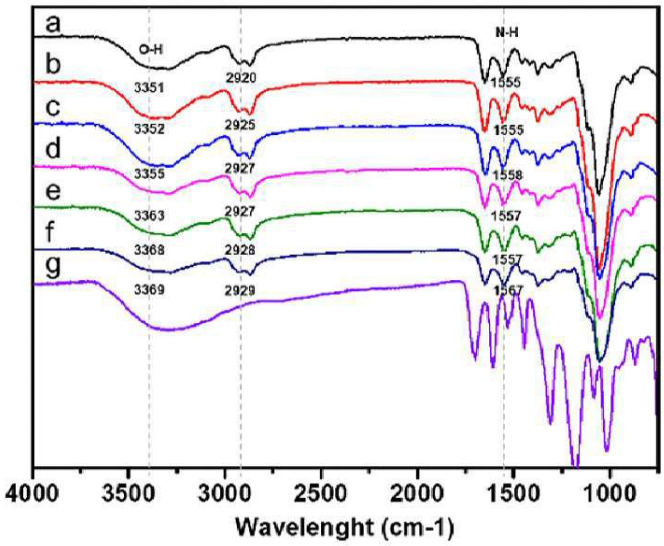
도면1



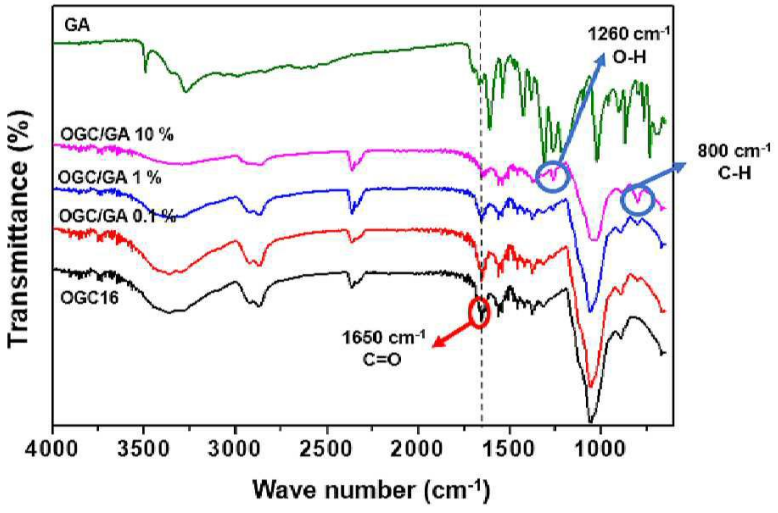
도면2


(a)
D2O
H2-H8
H1
b-e
a
h
g
i
f
OGC
GC
8
6
4
2
0
Chemical shift (ppm)
(b)
OGC16
1550 cm-1
N-H
2890 cm-1
C-H
1650 cm-1
C=O
GC
1055 cm-1
C-O
1588 cm-1
N-H
Transmittance (%)
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
Wave number (cm-1)

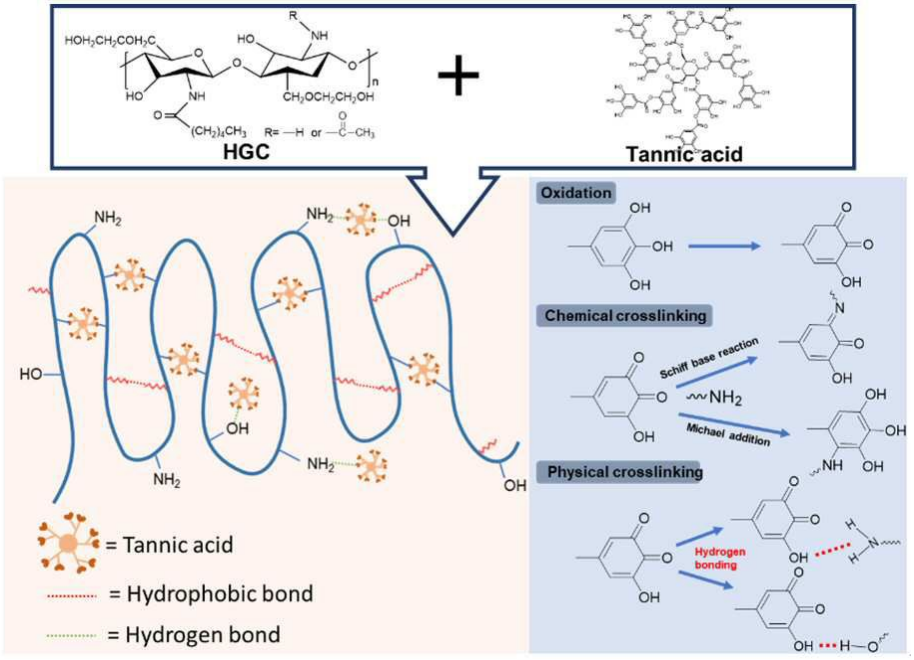
도면3


a
b
c
d
e
f
g
O-H
N-H
3351
2920
1555
3352
2925
1555
3355
2927
1558
3363
2927
1557
3368
2928
1557
3369
2929
1567
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
Wavelenght (cm-1)

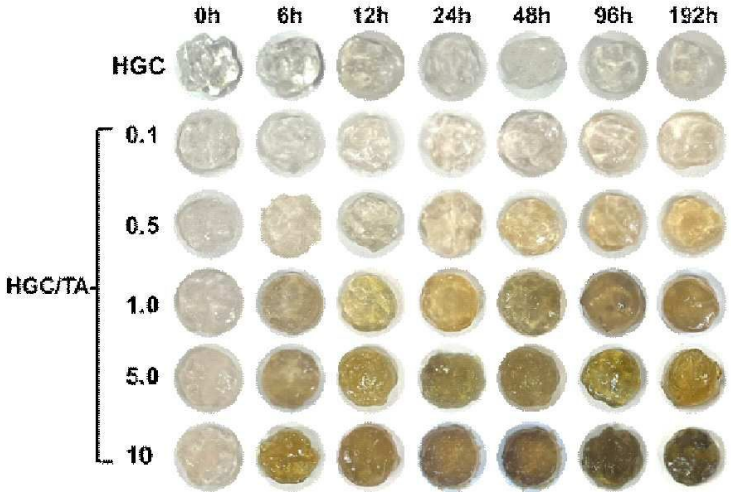
도면4


GA
1260 cm-1
O-H
OGC/GA 10 %
OGC/GA 1 %
OGC/GA 0.1 %
OGC16
800 cm-1
C-H
1650 cm-1
C=O
Transmittance (%)
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
Wave number (cm-1)

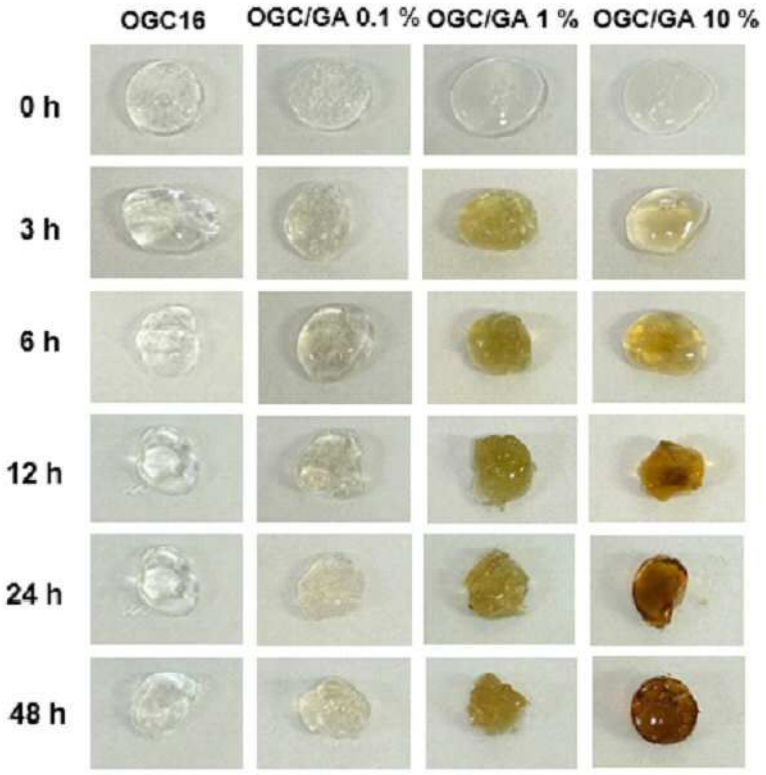
도면5


HGC
Tannic acid
Oxidation
Chemical crosslinking
Schiff base reaction
Michael addition
Physical crosslinking
Hydrogen bonding
= Tannic acid
= Hydrophobic bond
= Hydrogen bond

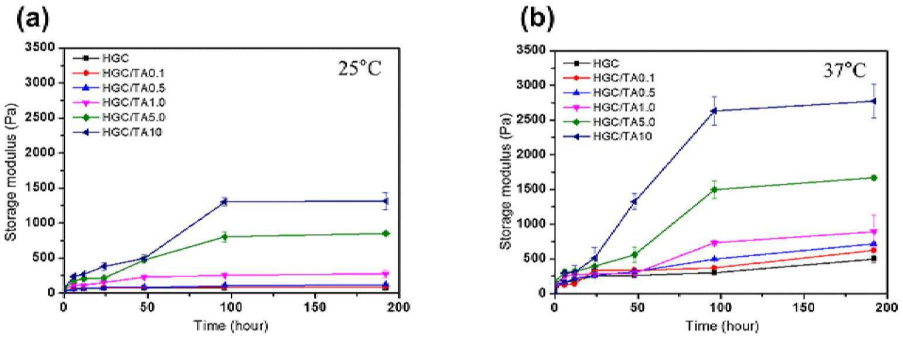
도면6


0h
6h
12h
24h
48h
96h
192h
HGC
HGC/TA
0.1
0.5
1.0
5.0
10

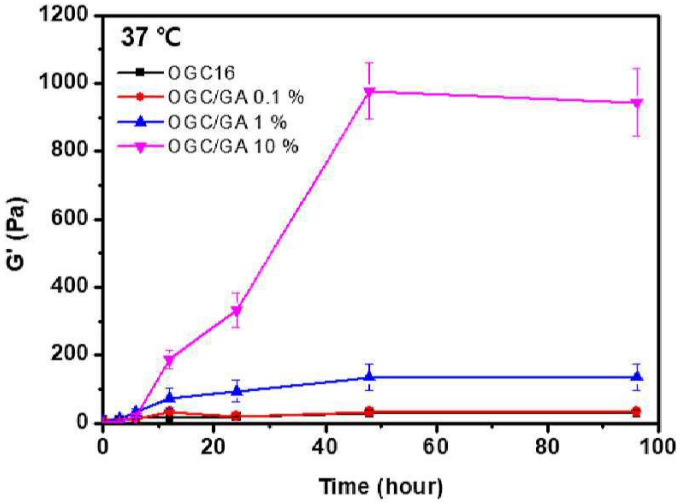
도면7


OGC16
OGC/GA 0.1 %
OGC/GA 1 %
OGC/GA 10 %
0 h
3 h
6 h
12 h
24 h
48 h

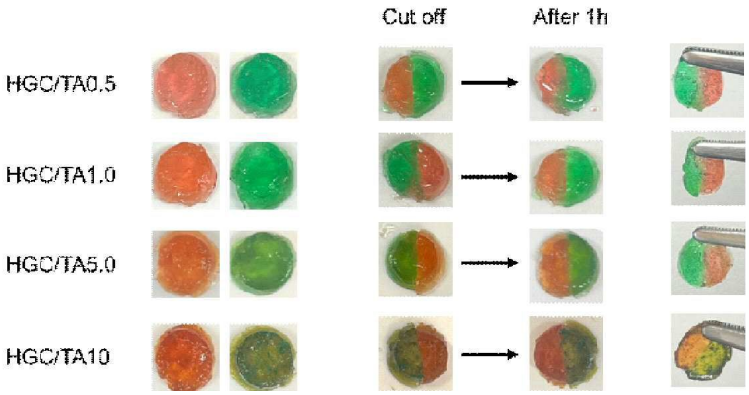
도면8


(a)
25°C
HGC
HGC/TA0.1
HGC/TA0.5
HGC/TA1.0
HGC/TA5.0
HGC/TA10
Storage modulus (Pa)
Time (hour)
(b)
37°C
HGC
HGC/TA0.1
HGC/TA0.5
HGC/TA1.0
HGC/TA5.0
HGC/TA10
Storage modulus (Pa)
Time (hour)

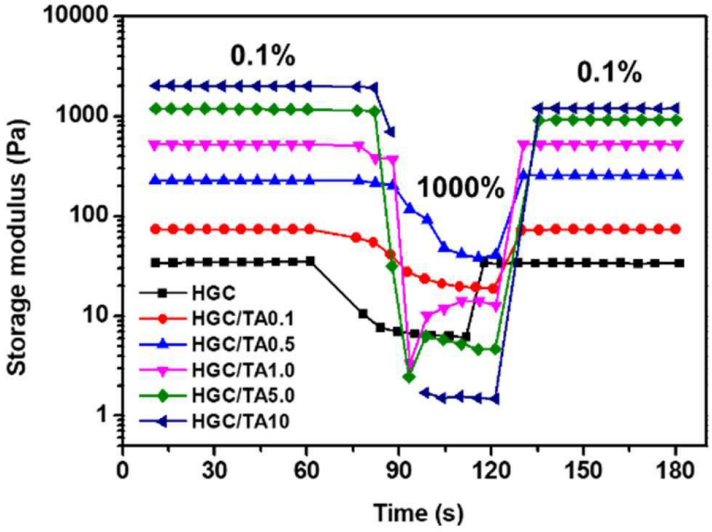
도면9



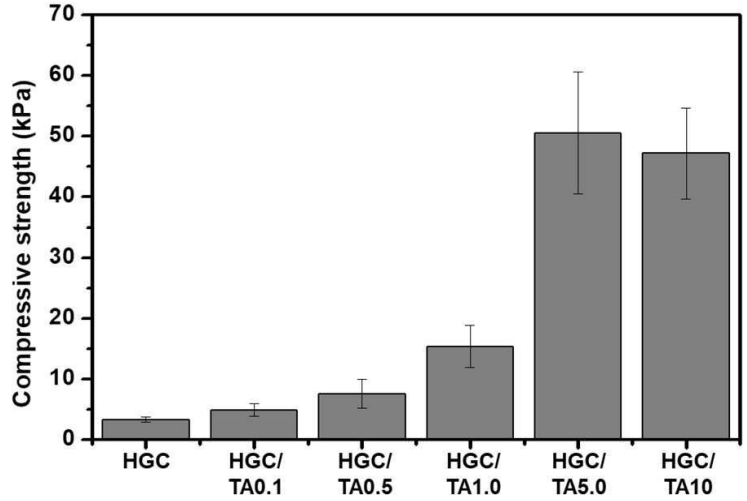
도면10



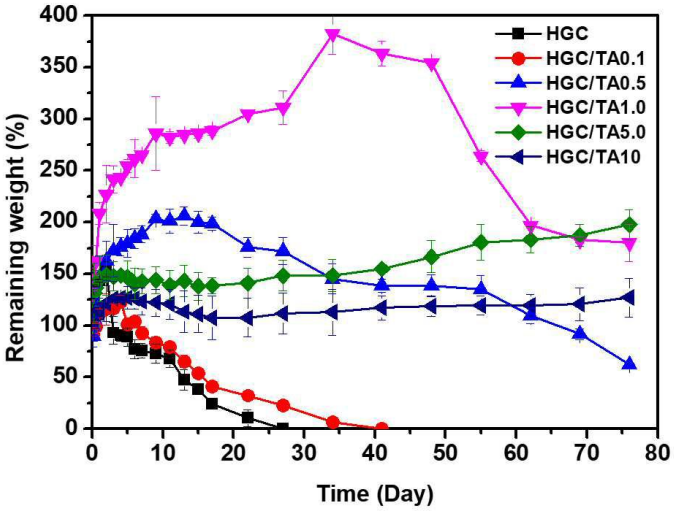
도면11



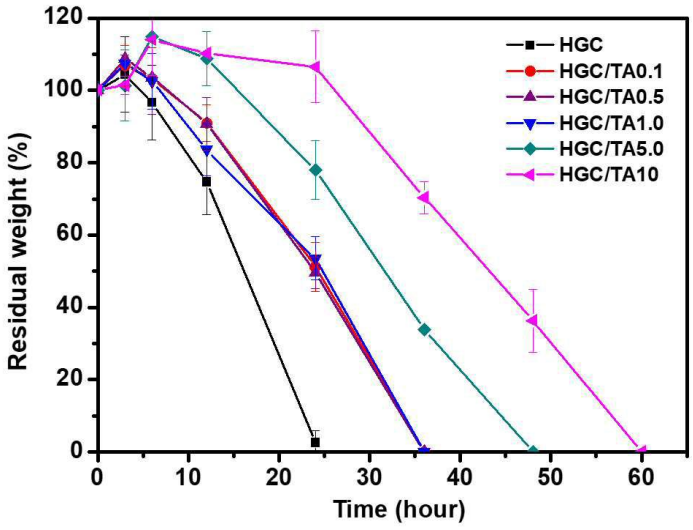
도면12



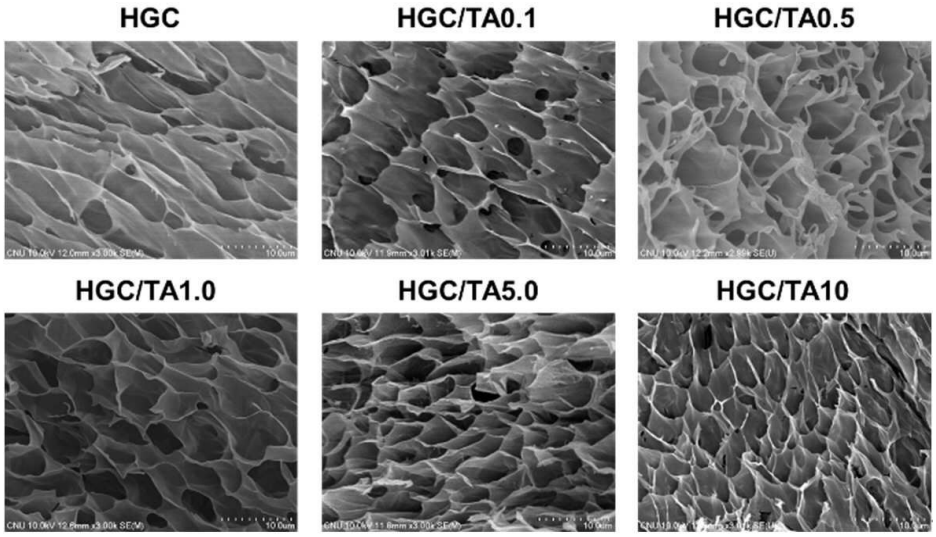
도면13



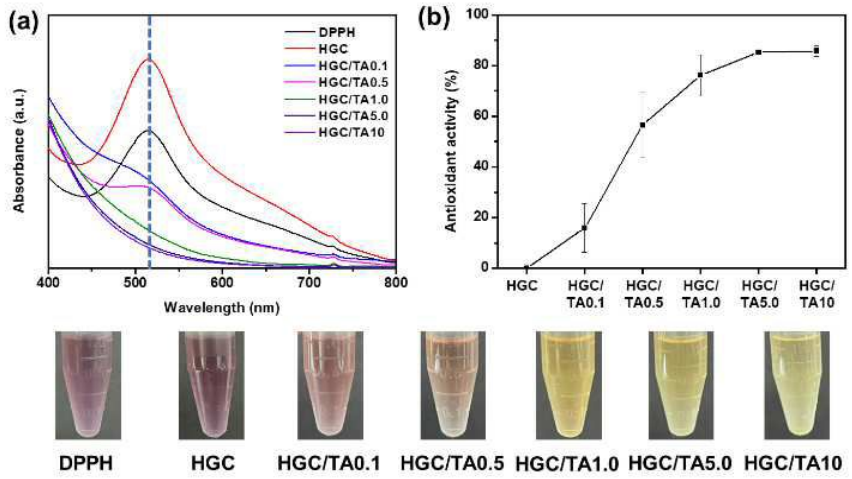
도면14



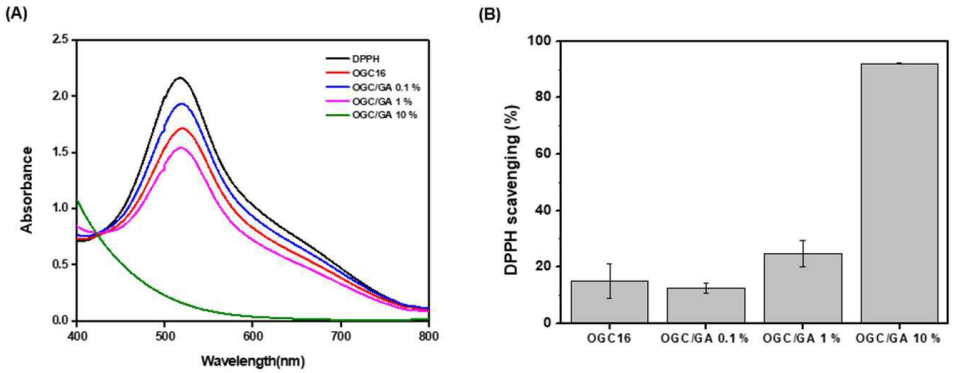
도면15



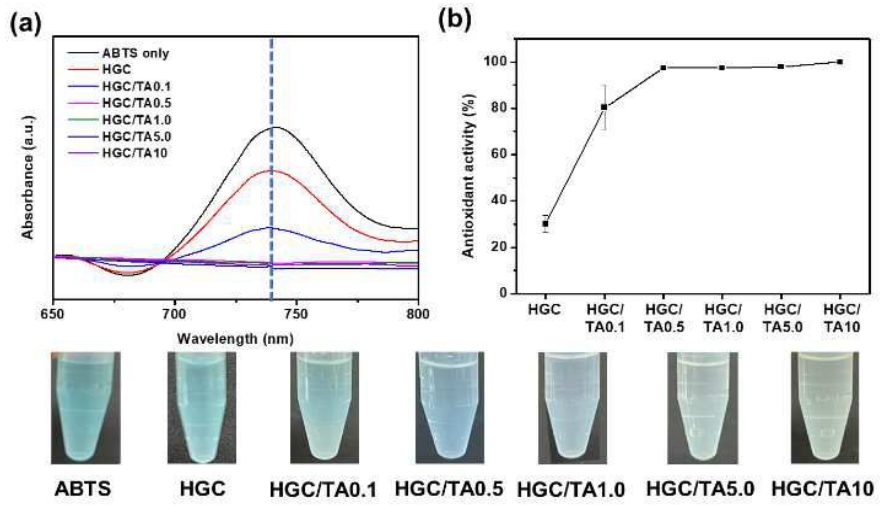
도면16



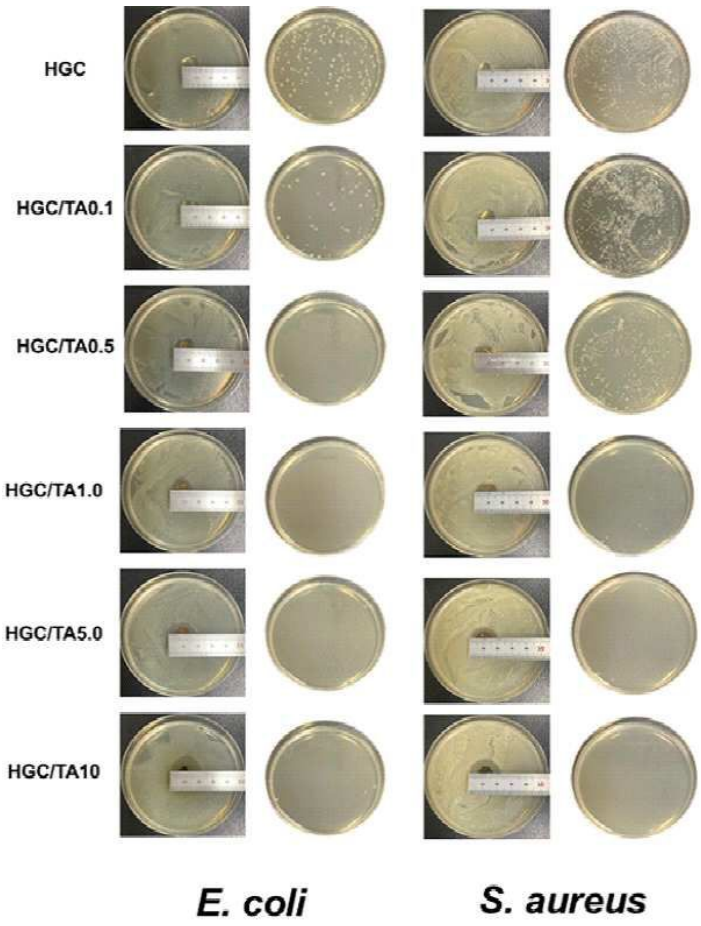
도면17



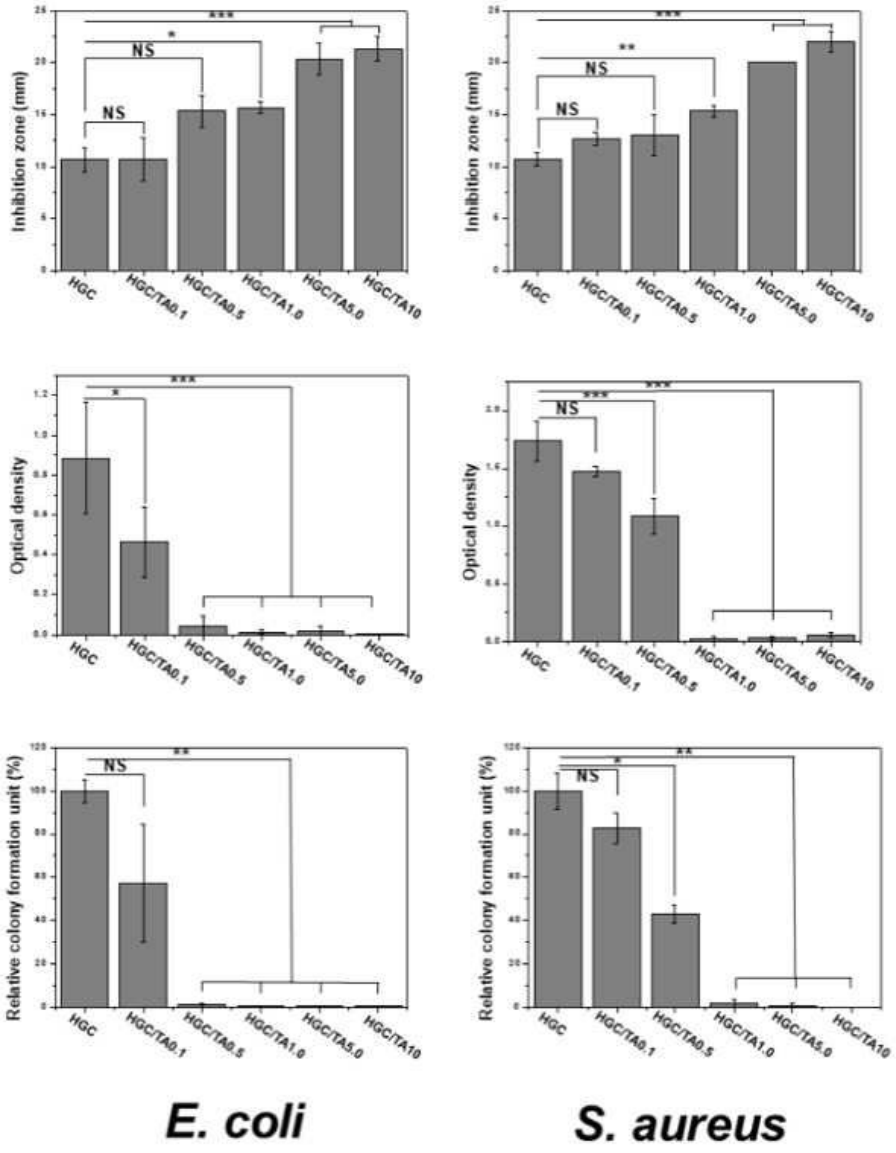
도면18


(a)
ABTS only
HGC
HGC/TA0.1
HGC/TA0.5
HGC/TA1.0
HGC/TA5.0
HGC/TA10
Absorbance (a.u.)
650
700
750
800
Wavelength (nm)
(b)
Antioxidant activity (%)
0
20
40
60
80
100
HGC
HGC/ TA0.1
HGC/ TA0.5
HGC/ TA1.0
HGC/ TA5.0
HGC/ TA10
ABTS
HGC
HGC/TA0.1
HGC/TA0.5
HGC/TA1.0
HGC/TA5.0
HGC/TA10

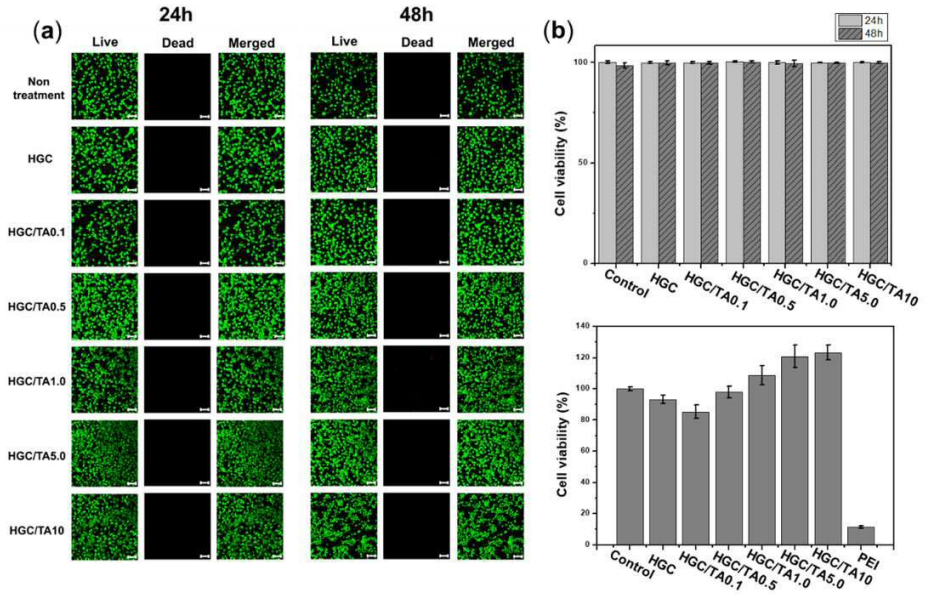
도면19a


HGC
HGC/TA0.1
HGC/TA0.5
HGC/TA1.0
HGC/TA5.0
HGC/TA10
E. coli
S. aureus

도면19b


Inhibition zone (mm)
Optical density
Relative colony formation unit (%)
NS
HGC
HGC/TA0.1
HGC/TA0.5
HGC/TA1.0
HGC/TA5.0
HGC/TA10
E. coli
S. aureus

도면20


(a)
24h
48h
Live
Dead
Merged
Non treatment
HGC
HGC/TA0.1
HGC/TA0.5
HGC/TA1.0
HGC/TA5.0
HGC/TA10
(b)
24h
48h
Cell viability (%)
Control
HGC
HGC/TA0.1
HGC/TA0.5
HGC/TA1.0
HGC/TA5.0
HGC/TA10
PEI