Journal of Radiation Industry 7 (2~3) : 171~176 (2013)

감마선을 이용하여 제조한 농업용 나노제제의 보존성 및 환경안전성

박 해 준*·김 화 정·최 진 수

한국원자력연구원 첨단방사선연구소

Stability and Environmental Safety of a Nanosized Agroformulation by Using Gamma-irradiation Technique

Hae-Jun Park*, Hwa-Jung Kim and Jin-Su Choi

Advanced Radiation Techology Institute, Korea Atomic Energy Research Institute, Jeongeup 580-815, Korea

Abstract - In previous study, the novel nanosized curdlan-silica complex for a sustain-releasing effect was developed by using gamma-irradiation. It can be applicable to use in various sustain-releasing formulation in agriculture industry. This study was conducted to investigate its storage stability and environmental toxicity in an accelerated condition. The complex samples were treated with high temperature condition (65°C) during 3 weeks, and then sustain-releasing property of complex was verified thereby using Ion Chromatography on a weekly basis. The morphology of the complex was characterized using scanning electron microscopy (SEM). Results of Ion Chromatography analysis showed that sample treated for 3 weeks was similar to sustain-releasing pattern of non-treatment sample. We verify concluded that the complex is able to keep its sustain-releasing property and sustained-releasing in 3 years. Also the formulation has no environmental toxicity.

Key words : Curdlan, Gamma irradiation, Nanosized complex, Sustain-releasing formulation, Accelerated test

서 론

환경문제 대두와 안전농산물에 대한 소비자의 요구가 급증함에 따라 우리나라를 비롯한 OECD 국가들은 화학농약 및 화학비료의 사용량을 40%를 감축하여야 하나 새로운 기술적 돌파구가 마련되지 않아 사용량이 오히려 증가하고 있다. 다국적기업과 외국 국책연구기관에서는 DDS (Drug delivery system) 기술을 응용하여 자연환경적인 변이요소가 많은 외부환경에서도 사용할 수 있는 첨단 제형개발에 힘을 기울이고 있다. 최근 첨단 나노기술의 발달로 의약분야에서는 나노제형기술을 이용하여 인체에 무해한 DDS 제제들이 많이 출시되고 있다. 그러나 이러한 DDS 제형의 개발은 인체환경에 국한되어 있어 극한환경이나 농업현장과 같은 자연환경적인 변이요소가 많은 외부환경에서는 보존성 및 성능 안정성문제로 그 사용이 제한되고 있다 (Ohtsubo 2003; Park *et al.*

* Corresponding author: Hae-Jun Park, Tel. +82-63-570-3190, Fax. +82-63-570-3195, E-mail. hjpark@kaeri.re.kr

2007).

이러한 문제의 돌파구를 마련하기 위하여 선진국들은 국책 연구소 및 다국적 기업을 중심으로 DDS 기술 및 나노기술 등 신기술을 융합한 PDS (Pesticide delivery system), 생물농약을 위한 제형 및 나노제제 개발 등 자연환경적 변이요소가 많은 외부환경에서도 사용할 수 있는 첨단 제형개발에 힘을 기울이고 있다.

종래 비료는 물과 혼합된 액상형태 또는 부형제와 혼합된 입상형태의 농약 제제를 사용하게 되면 살포된 지역의 외부로 유출되는 등 유효성분의 농도가 빠르게 감소하여 유효성분의 지속시간이 짧아지기 때문에 특히 미량원소비료의 경우 과도한 양으로 여러 번 시비하게 된다. 그 결과 염류집적, 과영양화 등에 따른 환경오염을 유발하여 농업환경에 불리한 영향을 미치고 있다. 따라서, 고체상 또는 액체상의 각종 농약, 비료 등에 서방성을 부여하여 한 번에 적정한 농도의 농약 또는 비료를 살포하여 오랜 기간 동안 그 효과가 유지될 수 있도록 유효성분의 활성 발현 시기를 제어하기 위한 연구가 진행되어 왔다 (Tsuji 2003; Park *et al.* 2007).

앞선 연구에서 방사선 기술을 이용하여 미량원소 비료 유효성분을 편리하게 살포할 수 있으며 효율적으로 방출할 수 있고, 방출을 용이하게 제어할 수 있는 새로운 서방성 농업용 나노제제 개발하였다. 이 나노 제제는 유무기 복합소재로 실리카 성분과 올리고머화된 1,3-β-글루칸의 유무기 복합체 조성으로 만들어졌으며 50 nm 급 이하의 콜로이드 입자상의 방출제어 나노입자형태로 되어 있으며 서방성 제제의 사용으로 미량원소 유효성분의 방출을 효과적으로 제어할 수 있고 다공성 담체와 생분해성 고분자의 복합구조로 이루어지기 때문에 내구성이 매우 우수하여 외환경적 요소에 특히 강한 특성을 가진다 (박 등 2010).

비료는 제제화 후 일시에 소비되는 것이 아니고 상당기간 보관되는 것이 일반적이므로 저장기간 동안에 주성분의 분해가 일어나거나 약제의 물리성이 악화되어 품질의 변화가 쉽게 일어나면 약효저하 또는 약해 발생의 원인이 될 수 있다. 따라서 약제의 보증기간 이내에는 주성분 함량의 변화 등 물리화학적 변화가 없어야 한다 (정 등 2000). 대부분의 농약은 유기 및 무기 성분으로 구성된 화학물질로서 시간이 경과함에 따라 물리화학적 변화가 일어나는데 변화정도는 화합물의 이화학성, 온도, 습도 및 보관 조건 등의 요인에 따라서 다양하게 나타난다. 실온에서의 농약 제품의 주성분 안정성 시험은 오랜 시간이 소요되기 때문에 현실적으로 어렵고 경제적이지 못하다. 따라서 실온보다 가혹한 조건에서 농약의 주성분 안정성을 평가하여 짧은 기간 내에 제품의 약효보증기간을 설정하는 것이 일반적이다. 본 연구에서는 앞서 개발된 서방성 나노 제제의 가혹화 실험을 통하여 제제의 보존성을 확인하였다.

또한 최근 나노물질의 환경안전성 문제가 대두됨에 따라 제제의 상용화를 위하여 본 개발된 서방성 농업용 나노제제의 환경급성독성을 검토하여 고분자 소재와 방사선 기술을 이용하여 외부환경에서도 안전하고도 그 기능을 발휘할 수 있는 친환경 첨단 방출제어형 제형기반 기술을 마련하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 시약 및 기기

제제를 제조하기 위하여 삼전화학사의 규산 나트륨 (Na_2SiO_3)과 식품공업용으로 사용되고 있는 Kirin사의 커드란을 사용하였으며 미량원소비료 유효성분으로 황산마그네슘 ($MgSO_4$)은 Junsei사의 특급시약을 사용하였다. 나노제제의 형태를 분석하기 위하여 전방계주사현미경 (FE-SEM, SU-70, HITACHI Ltd., Japan)을 사용하였으며 제형의 서방성 방출분석을 하기 위하여 이온 크레마토그래피 (IC: ICS-3000, Dionex, USA)를 사용하였다 (박 등 2010).

2. 제제 제조

증류수 190 ml에 규산 나트륨 2 g을 녹인 후, 용액을 교반하면서 커드란 1 g을 서서히 투여하여 녹였다. 커드란이 완전히 용해한 다음 이소프로판올 10 ml를 가하고, 감마선 (30 kGy)을 조사하였다. 감마선을 조사한 후 상기 용액에 유효성분으로 황산마그네슘 4 g을 투여하여 제제 입자 현탁 용액을 생성하게 한 후, 50°C에서 24시간 이상 풍건 건조하여 최종 제제를 수득하였다 (박 등 2010).

3. 가혹화 실험

시료를 가혹조건인 65°C 항온기 (incubator, VISION)에 넣고 보관하면서 1주 간격으로 매회 0.1 g씩 3개의 시료를 채취하여 3반복으로 서방성 분석을 수행하였다.

서방성을 분석하기 위하여 제제 30 μg을 증류수 1 ml에 현탁하여 부유액을 만들고 투석막 (Spectra/Por, Spectrum laboratories Inc, USA) 안에 넣었다. 즉시 부유액이 담긴 투석막을 증류수 499 ml에 넣고, 시간에 따라 샘플을 0.5 ml씩 회수하여 이온 크로마토그래피로 제제로부터 방출되어 나온 SO_4^- 이온을 분석하였다.

4. 환경급성독성시험 조건

본 시험은 농촌진흥청 고시 제2012-13호(2012년 2월 7일), “농약 및 원제의 등록기준”의 [별표 13] “환경생물 독성 시험기준과 방법”, “13-1-2. 물벼룩급성독성시험”과 “OECD Guideline for Testing of Chemicals”의 No. 202 “*Daphnia* sp., Acute Immobilisation Test (adopted: April 13, 2004)”에 준하여 실시하였다.

환경급성독성시험에 사용한 물벼룩 (*Daphnia magna*)은 Carolina Biological Supply Company (USA)에서 입수하여, 한국화학연구원 부설 안전성평가연구소 미래환경연구센터에서 사육한 개체를 사용하였다. 물벼룩 어미 (brood stock)는 3 l의 M4 배지에서 사육을 하였으며, 수온은 18～22°C, 광주기는 광조건 16시간, 암조건 8시간으로 하였고, 30분간의 전환기간 (transition period)을 주었다. 먹이는 실험실에서 계대배양한 *Pseudokirchneriella subcapitata*를 매일 0.1～0.2 mg carbon/*Daphnia*/day 비율로 공급하였으며, YCT (yeast, cerophyll and trout feed suspension)을 1 ml l^{-1}씩 2회/주 공급하였다. 사육조건의 적절성 여부는 단위무성생식에 의해 번식하는 것으로 확인하였으며 어미는 시험시작 24시간 전에 따로 분리하여 그 다음 날 생산된 생후 24시간 미만의 어린 물벼룩을 시험에 사용하였다. 각 시험용기 당 물벼룩을 무작위로 5마리씩 4반복으로 노출시켜, 각 시험농도 당 총 20마리의 물벼룩을 노출시켰다. 시험위하여 10 ml conical tube에 1 ml 시험물질을 넣은 후 희석수 4 ml을 채워 10,000 mg l^{-1}의 stock solution을 조제하였다. 100 ml 용량의 비커에 99 ml 희석수를 채우고 stock solution 1 mL을 넣어 100 mg l^{-1}의 시험용액을 사용하였다.

시험기간 동안 시험용액의 pH 및 용존산소농도는 시험 시작 시와 시험 종료 시에 모든 시험용기에서 측정하였으며, 수온은 대조군에서 24시간 간격으로 측정하였다. 평가 결과는 시험용액을 가볍게 저어 준 다음, 약 15초 후에 물의 흐름을 벗어나지 못하는 개체를 유영저해를 받은 것으로 간주하였다.

결과 및 논의

1. 나노제제의 형태 및 구성

상기 재료 및 방법에 따라 제조한 황산마그네슘 서방성 나노제제의 형태를 주사전자현미경 (FE-SEM)을 이용하여 분석하였다. 분석 결과, 50 nm의 구형상의 나노 입자가 형성되었음을 확인할 수 있었다 (Fig. 1(a)), 나노 입자에 대한 EDS 스펙트럼 (Fig. 1(b))을 분석해 본 결과, 탄소, 산소, 마그네슘, 규소, 황 성분이 모두 제제 내에 함유되어 있음을 확인할 수 있었다.

이 나노 서방성 제제의 기본적인 제조 프로세스는 소듐 실리케이트가 용해되어 있는 염기성 수용액에 생분해성 고분자중 미생물 유래의 커드란 (1,3-β 글루칸) 폴리머를 용해시키고 이 용액에 (30 kGy)의 감마선을 조사하여 커드란을 올리고머화 함과 동시에 이 폴리머를 실리카 생성구조의 게스터로 들어가게 한 새로운 겔 상태의 메트릭스를 개발하였고 여기에 마그네슘 이온을 투여함에 따라 나노사이즈의 입자가 형성되었다 (Fig. 2).

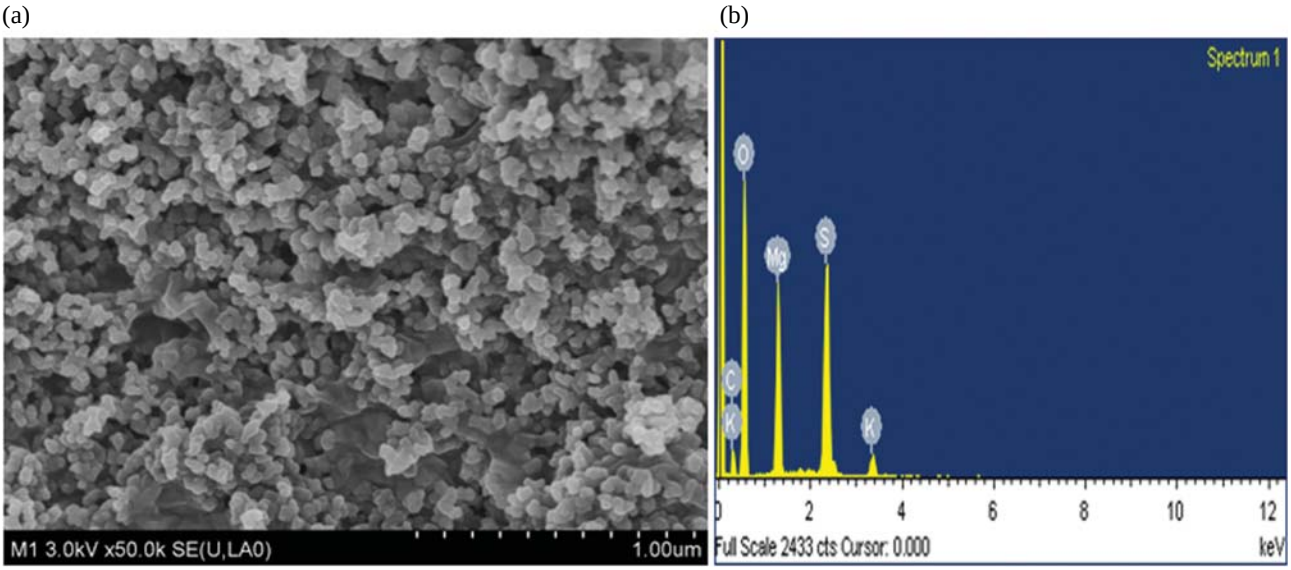

Fig. 1. An analysis of elements in the nanosized curdlan-silica formulation contained $MgSO_4$. (a) SEM analysis, (b) EDS analysis.

실록산 골격에 유기 고분자가 게스트로 포함시켜 유무기복합구조의 매트릭스를 제조한 예가 보고되어 있다(배 2001). 또한 최근 방사선 조사가 β-glucan 고분자의 폴리머사슬을 절단하여 저분자화한다는 보고가 있다(Byun *et al.* 2008). 이상의 내용으로 방사선 조사에 의해 일정크기의 고분자 커드란(curdlan)가 방사선의 적정량이 조사에 의해 알맞은 크기로 저분자화되어 전체 골격에 게스트로 함유되었을 것으로 추측하였다(박 등 2010).

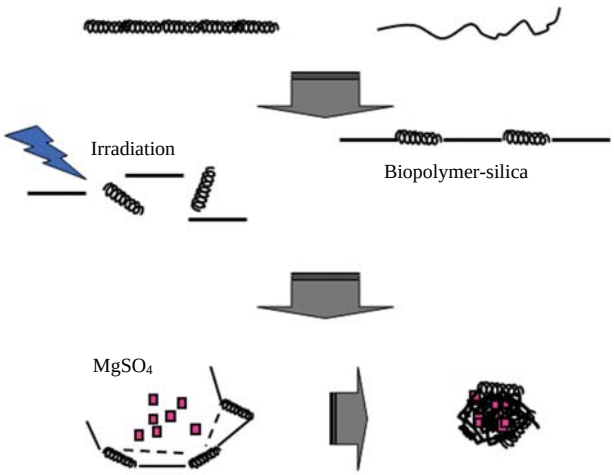

Fig. 2. Preparation procedure of the curdlan-silica nano-complex to sustain-release $MgSO_4$ by γ-irradiation.

환경 및 인축의 안전성을 위하여 친환경적이고 독성이 없는 가장 효율적인 게스트를 찾는 과정에서 식품공업용으로 사용되고 있는 커드란을 주목하게 되었다. 커드란은 *Alcaligenes faecalis, Agrobacterium* 속에서 생산된 다당류로, 글루코오스환의 제1, 제3 탄소원자가 β 결합으로 연결된 글루코오스 반복단위를 갖고 있다. 커드란의 일차적인 구조는 긴 사슬이지만, 분자 내 및 분자간 수소결합으로 인해 복잡한 삼차원 구조를 형성하게 된다. 커드란은 자연적인 상태에서는 거의 결정화되지 않고 분말 상태로 존재하나 알칼리 용액에 잘 용해되며 수용액 내에 마그네슘 이온이나 칼슘 이온의 존재 시 이온을 중심으로 뭉치는 성질을 가지고 있다(Saito *et al.* 1977; Saito *et al.* 1978; Fulton and Atkins 1980; Stone and Clark 1992). Fig. 1의 결과내용은 실록산골격에 게스트로 들어간 커드란이 마그네슘 이온 성분을 중심으로 둘러싸져 나노제제화가 된 것을 시사한다. 따라서, 향후 본 나노제형기술 기반으로 하여 비료뿐만 아니라 약물전달

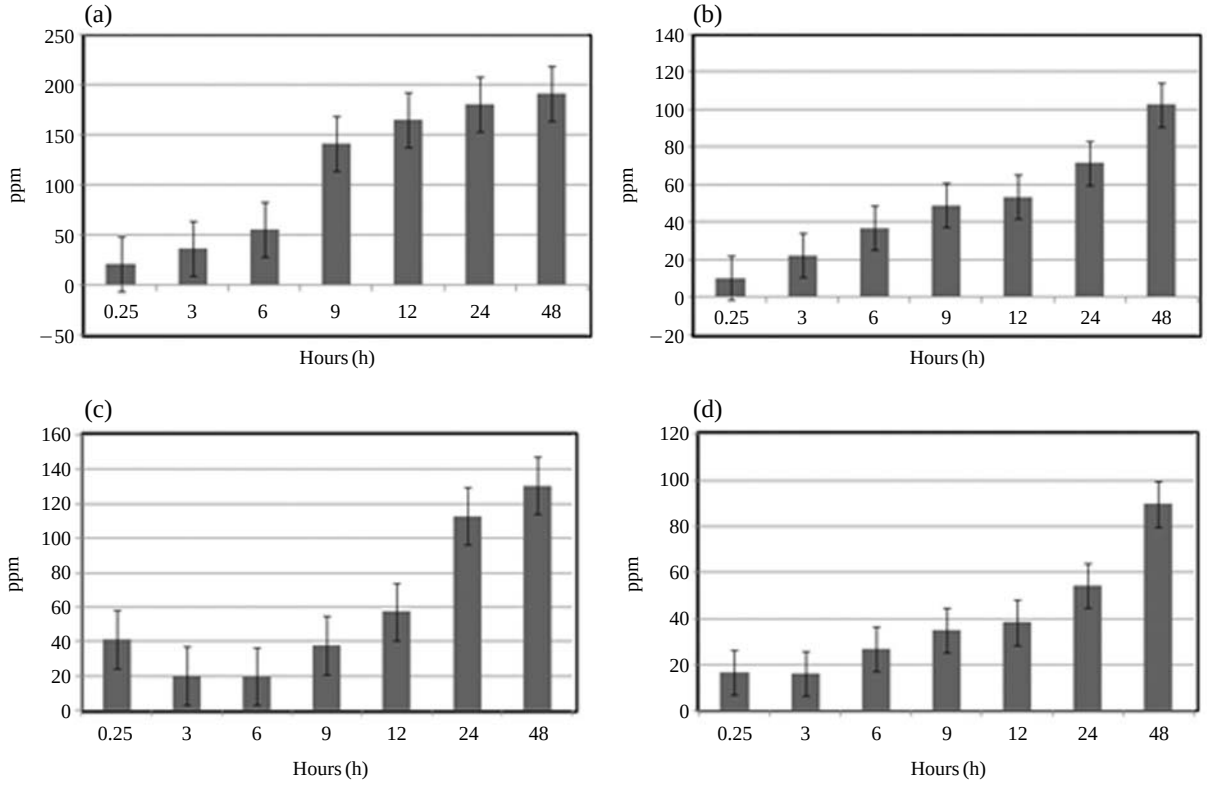

Fig. 3. Measurement of sustained-releasing $MgSO_4$ from the nanosized curdlan-silica formulation contained $MgSO_4$ under 65˚C condition for (a) 0 week, (b) 1 week, (c) 2 weeks and (d) 3 weeks.

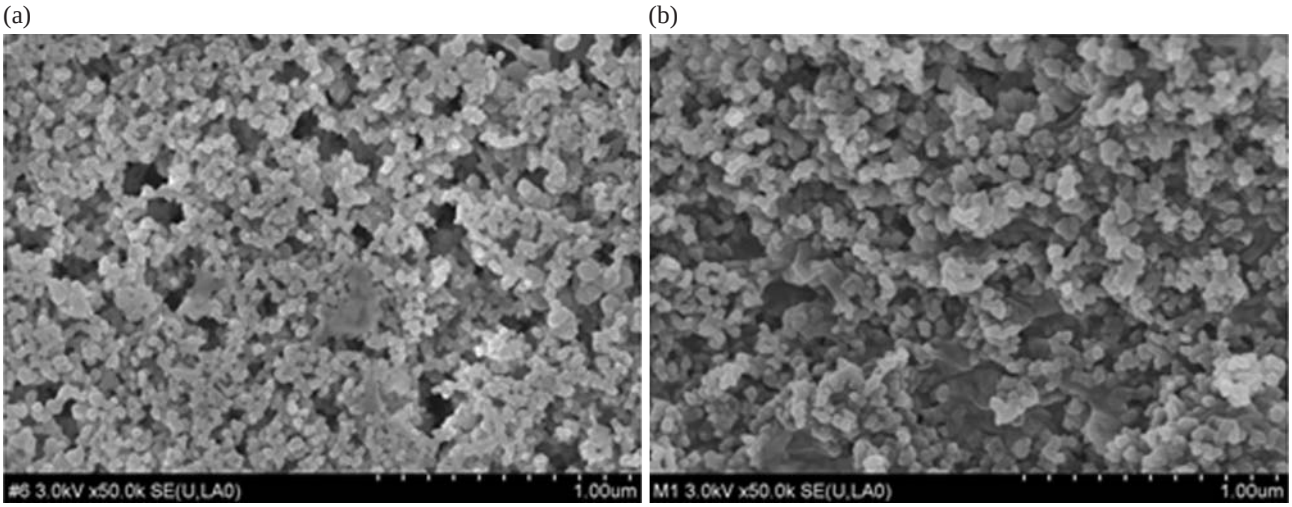

Fig. 4. SEM analysis of nanosized curdlan-silica complex contained $MgSO_4$. (a) control and (b) 3 weeks under 65˚C condition.

시스템, 나노소재에 대한 다양한 응용연구 및 개발이 가능할 것으로 생각한다.

2. 나노제제의 보존성

나노제제의 보존성을 검토하기 위하여 가혹조건인 65 ˚C 항온기에서 1, 2, 3주간 저장된 나노제제의 서방성 기능의 유무를 확인하기 위해 상기 재료 및 방법에서 기술한 내용대로 실행한 후 이온크로마토그래피를 통하여 서방성 방출 양상을 분석하였다.

가혹화하지 않은 제제와 비교하여 방출되는 이온 양의 차이는 있으나 시간이 지남에 따라 서서히 방출되는 서방성의 패턴은 유사하였다. 1, 2, 3주차 샘플 모두 가혹화되지 않은 샘플과 마찬가지로 서방성 기능이 유지되는 것으로 확인되었다(Fig. 3).

가혹조건 하에 보관되어진 제제와 처리하지 않은 제제를 주사전자현미경 상에서 형태를 확인하였다. 주사전자현미경상에서 가혹 조건에서 보관된 제제를 확인한 결과, 가혹화하지 않은 제제와 차이가 없었으며, 제형이 녹아내리거나 변형이 일어난 부분을 확인할 수 없었다 (Fig. 4).

이상의 결과로 3년 정도는 안정할 것으로 예상되며 열풍건조의 공정조건에서도 대량생산에도 문제없을 것으로 생각한다. 다만 시간이 지남에 따라 서방성 방출량이 줄어드는 경향이 있다(Fig. 3). 이는 포화수분량에 의해 방출되는 제제의 성질상 가혹화 조건 내에서 제제 내 수분이 감소함에 따라 방출량이 달라졌을 것으로 생각되므로 향후 여기에 대한 기술적 보완이 이루어져야 하겠다.

Table 1. Cumulative immobilisation data for *Daphnia magna* treatment with curdlan-silica complex contained $MgSO_4$

Nominal concentration (mg l^{-1})	Number of organisms tested	Cumulative No. of immobilized *Daphnia magna*	
		24-hour	48-hour
0.1	5	0	0
1	5	0	0
10	5	0	0
100	5	0	0

Table 2. Symptoms of intoxication of the test substance to *Daphnia magna*

Exposure time	24-hour	48-hour
EC_{50} values	＞100	＞100
95% confidence limits	NA	NA

NA: Not available (Unit: mg l^{-1}, arithmetic mean measured concentration)

3. 환경급성독성시험

모든 시험농도에서 물벼룩의 유영저해가 관찰되지 않았다(Table 1). 시험기간 동안 수온은 22.0±0.1˚C, 용존산소는 8.7～8.8 mg l^{-1} (포화농도의 98～99%), pH는 8.34～8.41로 측정되었으며, 조도는 813～818 Lux이었다. 한계시험 (limit test)에서 대조군과 100 mg l^{-1} 시험농도에서 유영저해가 관찰되지 않았다. 설정농도로 나타낸 나노 PDS제형의 물벼룩 (*Daphnia magna*)에 대한 24시간 EC_{50}값은 ＞100 mg l^{-1}이었고, 48시간 EC_{50}값은 ＞100 mg l^{-1}이었다(Table 2).

이상의 결과에서 미량원소 마그네슘이 함유된 서방성 농업용 나노제제는 환경에 대해 급성독성은 보이지 않

았다. 제제의 제형소재가 친환경물질이고 제조공정상에 유독한 용매 등을 사용하지 않았기 때문에 기인한 것으로 생각한다. 따라서, 향후 다양한 유효성분을 탑재하여 유효성분의 환경독성 감소 양상을 검토할 필요가 있는 것으로 사료된다.

결 론

미량원소 비료 유효성분을 효율적으로 방출할 수 있고, 방출을 용이하게 제어할 수 있는 나노사이즈(50 nm 급)의 서방성 미량원소 제제를 개발하여 장기보존성을 검토한 결과 3년 이상의 보존성을 나타내었으나 서방성 방출량에 차이가 있었으며 사용량의 100배의 고농도에서도 환경급성독성은 없는 것으로 나타났다. 향후 환경친화적이면서도 외환경적 요소에 강한 특성을 나타내는 농업용 서방성 제제로 상용화되리라 기대된다.

사 사

본 연구는 2012년도 미래창조과학부 원자력기술개발사업의 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다. 저자들은 전자현미경 사용을 도와주신 (재)대구나노테크노파크 나노융합실용화센터 이병찬 님과 윤영목 님께 감사드립니다. 또한 환경독성평가를 해주신 한국화학연구원 부설 안전성평가연구소에 감사드립니다.

참 고 문 헌

박해준, 김화정. 2010. 감마선 조사기술을 이용한 미량원소 비료 나노제제 제조. 한국방사선산업학회지. **4**(4):347-352.

배영수. 2001. 유무기 하이브리드 코팅제. 고분자과학과 기술지. **12**(5):716-723.

Byun EH, Kim JH, Sung NY, Choi J, Lim ST, Kim KH, Yook HS, Byun MW and Lee JW. 2008. Effect of gamma irradiation on the physical and structural properties of β-glucan. *Radiat. Phys. Chem.* **77**:781-786.

Fulton WS and Atkins EDT. 1980. The Gelling mechanism and relationship to molecular structure of microbial polysaccharide curdlan. Fibre diffraction methods. Washington. D.C., American Chemical Society. pp.385-410.

Marchessault RH, Deslandes Y, Ogawa K and Sundararajan PR. 1977. X-Ray diffraction data for beta-1,3-D-glucan. *Can. J. Chem*. **55**:300-303.

Ohtsubo T. 2003. Controlled Release in pesticide formulations. *J. Pestic. Sci.* **28**:376-378.

Park HJ, Kim SH and Jee HJ. 2007. Development of a new formulation system for sustainable slow releasing of phosphorous acid in soils to control phytophthora diseases. *Plant Pathol. J.* **23**(1):26-30.

Saito H, Ohki T and Sasaki T. 1977. A 13C nuclear magnetic resonance study of gel-forming (1,3)-beta-D-gulucans. Evidence of the presence of singal-helical conformation in a resilient gel of a curdlane-type polysaccharide 13140 from *Alcaligenes faealis* var. myxogenes IFO13140. *Biochemistry* **16**:908-914.

Saito H, Okumura K and Harada T. 1978. Character of curdlan and its application for food. *New Food Ind*. **20**:49-57.

Stone BA and Clark AE. 1992. Chemistry and Biology of (1,3)-beta-glucan. Victoria, Austrailia, La Trobe Univ. Press.

Tsuji K. 2003. Pesticide formulation-Its role and resent trend. *J. Pestic. Sci.* **28**:371-375.

Manuscript Received: October 29, 2013
Revised: November 19, 2013
Revision Accepted: November 20, 2013