

## 투과도 조절용 고분자화된 Vesicles 의 합성

신 재 섭

충북대학교 자연과학대학 화학과  
(1991년 2월 25일 접수)

### Synthesis of Permeability-Controllable Polymerized Vesicles

Jae-Sup Shin

Department of Chemistry, Chungbuk National University,  
Cheongju, Chungbuk 360-763, Korea  
(Received February 25, 1991)

#### 요 약

1, 2-Dithiolane 기를 갖는 lipid 를 합성하여 vesicle 을 형성시킨 다음 이것을 ring opening polymerization 하여 고분자화된 vesicle 을 합성하였다. 중합반응의 반응속도를 UV 를 이용하여 측정한 결과, 반응속도가 1 차반응 속도식을 만족하였으며 반응속도 상수값은  $3.84 \times 10^{-2} \text{min}^{-1}$  이었다. 또한 sucrose 를 이용한 투과도 실험에서 고분자화된 vesicle 의 투과도는  $4.7 \times 10^{-8} \text{cm hr}^{-1}$  이었으며 이 값은 고분자화되지 않은 경우보다 1.5 배 낮은 것이다.

**Abstract :** A lipid containing a 1, 2-dithiolane group was synthesized, and polymerized vesicle was prepared from the vesicle of this lipid by ring-opening polymerization. Reaction rate of the polymerization was monitored by UV absorption, and the results showed that it followed the first order kinetics and the rate constant  $3.84 \times 10^{-2} \text{min}^{-1}$ . Permeation rate of sucrose through the polymerized vesicle was  $4.7 \times 10^{-8} \text{cm hr}^{-1}$ , which is 1.5 times lower than that of monomeric analog.

#### 1. 서 론

고분자화된 vesicle 들에 관한 연구는 biological membrane 의 model system 으로서 뿐만이 아니라 의학의 운반체 등 많은 분야에서 연구가 이루어지고 있다[1-11]. Biological membrane 의 가장 중요한 특성은 생물체에 필요한 화합물을 투과시키는 성질이므로 투과성을 조절할 수 있는 고분자화된 vesicle 의 개발은 이러한 점에 있어서 매우 중요하다. 또한 controlled

released drug delivery system 에 있어서 투과되는 속도를 조절하는 것은 매우 중요한 문제이다.

Disulfide 기를 갖는 고분자화된 vesicle 은 Regen 등[3] 에 의해 처음 시도 되었으며 최근에는 surface-activated polymerized vesicle 등에 응용되고 있다[4]. 본 연구에서는 disulfide 기를 lipid 의 ammonium ion 부근에 갖는 lipid (1) 를 합성하여 이것으로부터 고분자화된 vesicle 을 형성시키고 또한 이것의 투과 특성을 살펴보았다.



1

## 2. 실험

### 2. 1. 시약 및 기기

본 실험에 사용된 dodecyl bromide, 2-(methylamino) ethanol, 6, 8-dithiooctanoic acid는 Aldrich 제품을 사용하였으며, [<sup>14</sup>C] sucrose는 ICN Laboratories 제품을 사용하였다. Infrared spectrophotometer는 Perkin-Elmer X 98을, nuclear magnetic resonance spectrometer는 Varian EM 360 L을, 전자현미경은 Zeiss EM 109를, liquid scintillation counter는 Beckman LS 5000 TA를, sonicator는 Braun Sonic probe-type sonicator를 사용하였다.

### 2. 2. N, N-Di-dodecyl-N-methyl-N-(2-hydroxyethyl) ammonium Bromide (2)의 합성[12]

12.5g (50.2 mmol)의 dodecyl bromide와 31.0g (413 mmol)의 2-(methylamino) ethanol을 60 ml의 acetone에 넣고 3시간 동안 reflux시켰다. 이 반응물을 separatory funnel에 옮겨 아래층을 버리고 윗층을 취하여 ether에 녹인 후 30 °C의 sodium bicarbonate 수용액으로 두번 wash했다. 이 ether 용액을 무수 MgSO<sub>4</sub>로 처리한 후 진공 건조시켰다. N-methyl-N-(2-hydroxyethyl)-dodecylamine이 viscous한 oil 형태로 얻어졌다. 9.53 g (78% yield)

NMR(CDCl<sub>3</sub>): 0.95 (t, 3 H, CH<sub>3</sub>), 1.27 (s, 20 H, -(CH<sub>2</sub>)<sub>10</sub>-), 2.25 (s, 3 H, N-CH<sub>3</sub>), 2.40 (m, 4 H, -CH<sub>2</sub>-N-CH<sub>2</sub>-), 3.42 (s, 1 H, OH), 3.60 (t, 2 H, -CH<sub>2</sub>-OH)

위에서 얻어진 tertiary amine 8.03 g (33.0 mmol)과 12.5 g (50.2 mmol)의 dodecyl bromide를 100 ml의 ethanol에 넣고 24시간 동안 reflux시켰다. 이 용액을 진공 건조시키면 하얀 고체를 얻게 되는데 이것을 ethyl acetate에서 두번 재결정한 후 진공 건조하였다. 10.2 g (24.7 mmol, 75% yield), mp 66-67 °C

NMR(CDCl<sub>3</sub>): 0.92 (t, 6 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.27 (s, 40 H, ((CH<sub>2</sub>)<sub>10</sub>)<sub>2</sub>), 3.3-3.9 (m, 9 H, CH<sub>3</sub>-N(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>), 4.13 (t,

2 H, CH<sub>2</sub>OH), 4.90 (s, 1 H, OH)

### 2. 3. 6, 8-Dithiooctanoic anhydride의 합성[13]

2.56 g (12.4 mmol)의 6, 8-dithiooctanoic acid와 1.52 g (7.37 mmol)의 dicyclohexylcarbodiimide를 40 ml의 dry methylene chloride에서 24시간 동안 반응시켰다. 형성된 urea를 걸러 내기 위하여 filter한 후 그 filtrate를 그대로 다음 합성 실험에 이용하였다. 이 filtrate의 IR은 1735 cm<sup>-1</sup>와 1805 cm<sup>-1</sup>에서 acid anhydride에 의한 band를 보여 주었으며 1700 cm<sup>-1</sup>에서 나타나는 free carboxylic acid에 의한 band는 사라졌다.

### 2. 4. [2-((6, 8-Dithiooctanoyl)oxy)ethyl]dododecylmethylammonium bromide (1)의 합성

위에서 얻어진 6.2 mmol의 6, 8-dithiooctanoic anhydride가 용해되어있는 40 ml의 methylene chloride 용액에 1.02 g (2.42 mmol)의 2를 더했다. 그리고 여기에 0.324 g (2.65 mmol)의 4-(dimethylamino)pyridine을 넣고 24시간 동안 반응시켰다. 반응 후 형성된 salt를 filter하고 filtrate를 감압하에서 용매를 제거하여 농축시킨 다음 chromatographic한 방법으로 정제하였다. R<sub>f</sub> 0.3 [silica, CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH(9/1, V/V)] 1.24 g (2.06 mmol, 85% yield)의 1가 노란색의 oil 형태로 얻어졌다.

NMR(CDCl<sub>3</sub>): 0.93 (t, 6 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.28 (s, 40 H, ((CH<sub>2</sub>)<sub>10</sub>)<sub>2</sub>), 1.5-1.8 (m, 6 H, (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>), 1.8-2.5 (m, 2 H, S-CH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S), 2.5 (t, 2 H, -CH<sub>2</sub>-CO-), 3.1-3.3 (t, 2 H, CH<sub>2</sub>S), 3.4-3.9 (m, 10 H, CH<sub>3</sub>N(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>), 4.1 (t, 2 H, CH<sub>2</sub>-O)

### 2. 5. Vesicle의 합성(Sonication 방법)

50 ml의 비이커에 100 mg의 1을 아주 소량의 클로로포름에 녹여 용액으로 만든 다음, 진공하에서 용매를 증발시켜 얇은 막이 비이커의 바닥에 형성되게 하였다. (25 °C, 4 hr, 1 mmHg) 그 다음 10 ml의 10

mM borate 완충용액(pH 8.5, 0.14 M NaCl, 2.0 mM  $\text{NaN}_3$ )을 이 비이커에 넣고 sonication 을 이용하여 vesicle 을 형성시켰다. (10 min, 50 °C)

## 2. 6. Vesicle 의 형성(Ethanol Injection 방법)

10 ml 의 비이커에 50 mg 의 1 을 아주 소량의 클로로포름에 녹여 용액으로 만든 다음, 진공하에서 용매를 증발시켜 얇은 막이 비이커의 바닥에 형성되게 하였다. (25 °C, 4 hr, 1 mmHg) 여기에 2.40 ml 의 ethanol 을 가하여 용액을 만들었다. 그 다음 0.18 ml 의 이 용액을 가는 유리관으로 주사 바늘 앞을 처리한 주사기로 150 ml 의 10 mM borate 완충용액(pH 8.5, 0.14 M NaCl, 2.0 mM  $\text{NaN}_3$ ) 에 injection 하여 vesicle 을 형성시켰다.

## 2. 7. Polymerized Vesicle 의 합성

중합 반응은 1 을 기준으로 하여 100 mg 당 0.83 ml 의 0.01 M dithiothreitol 용액을 첨가해서 ring opening 을 시킴으로써 실시한다. 반응온도는 25 °C 로 하였으며 thin-layer chromatography 로 확인한 결과, 중합 반응은 4 시간이 지나면 거의 완전히 끝나는 것으로 확인되었다.

## 2. 8. Transmission Electron Microscopy

2% uranyl acetate 용액을 vesicle 용액과 1 : 1 로 혼합한 후, copper grid 위에 이 용액 한 방울을 살짝 묻힌다. 이것을 2 시간 정도 hood 에서 조심스럽게 건조시킨 후, transmission electron microscopy(Zeiss EM 109)를 사용해서 vesicle 의 크기와 모양을 관찰한다.

## 2. 9. Gel Permeation Chromatography 실험

Sephadex G-50 로 column(1×40 cm) 을 채운 뒤 30 ml 의 10 mM broate 완충용액(pH 8.5) 로 처리한 뒤 6 시간 정도 놓아 둔 후 사용하였다. 여기에 vesicle 용액 0.5 ml 를 더한 후 borate 완충용액(pH 8.5) 을 elute 하였다. 1.16 ml 씩 받았을 때, 11 번째와 12 번째에서 주로 vesicle 용액이 나왔다.

## 2. 10. 투과도 측정

위에서와 같이 vesicle 을 형성시키려할 때, 즉 sonication 을 하기 전에 우선 [ $^{14}\text{C}$ ] sucrose 를 substrate 로

첨가한다. 즉 surfactant 1 의 5 mg 당, 20  $\mu\text{Ci}$  의 [ $^{14}\text{C}$ ] sucrose 가 녹아있는 borate 완충용액을 첨가한다. 그러면 sonication 후 vesicle 이 형성되었을 때 [ $^{14}\text{C}$ ] sucrose 가 vesicle 의 외부와 내부에 모두 존재하게 된다. 그리고 나서 중합 반응을 시킨다. 이렇게 해서 얻어진 고분자화 된 vesicle 용액을 가지고 sephadex G-50 를 이용하여 gel filtration 을 하면 vesicle 부분과 외부의 free [ $^{14}\text{C}$ ] sucrose 를 분리할 수 있다. 이렇게 분리한 vesicle 부분 즉 [ $^{14}\text{C}$ ] sucrose 를 내부에 함유하고 있는 vesicle 용액을 가지고 투과도 측정을 실시한다. Vesicle 용액 1 ml 를 dialysis bag 에 넣고 200 ml 의 borate 완충용액 (pH 8.5) 에 대하여 20 °C 에서 dialysis 를 실시한다. 그리고 일정한 시간마다 40  $\mu\text{l}$  씩 dialysis bag 내에서 sampling 을 해서 liquid scintillation counter 를 이용하여 남아있는 [ $^{14}\text{C}$ ] sucrose 의 양을 측정한다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3. 1. 고분자화 된 Vesicle 의 형성

본 연구에서는 vesicle 을 형성시키는 방법으로 sonication 을 이용하는 방법과 ethanol 용액을 injection 하는 방법 등을 사용하였다.

Sonication 을 사용하여 얻어진 vesicle 은 전자현미경 사진으로부터 지름이 500-900 Å 정도임이 밝혀졌고 ethanol injection 방법을 이용하여 얻어진 vesicle 은 지름이 600-1300 Å 정도로 ethanol injection 방법으로부터 조금 더 큰 vesicle 이 형성되었다. Ethanol injection 방법으로 얻은 vesicle 은 그 크기의 폭이 sonication 방법으로 얻은 vesicle 보다 컸으며 투과도 실험 등의 결과에서도 재현성이 많이 떨어졌다. 그래서 본 실험에서는 sonication 방법을 주로하여 실험하였다. Ethanol injection 방법으로부터 얻은 vesicle 의 경우 재현성이 떨어지는 이유는 unilamellar 한 vesicle 과 multilamellar 한 vesicle 이 섞여있기 때문으로 생각된다[1].

중합반응은 위에서 얻어진 vesicle 용액에 dithiothreitol 을 첨가해 ring opening 을 시킴으로써 행하였는데 1, 2-dithiolane 부분의 UV 흡수가 333 nm 에서 나타나기 때문에[14] 333 nm 에서 UV 흡수를 계속 측정하면 중합반응의 속도를 측정할 수 있다. UV 흡수 측정은 같은 농도의 dihexadecyldimethylammonium

bromide 에 의해 형성된 vesicle 용액의 UV 흡수를 blank 로 하여 측정하였다. Sonication 을 해서 얻은 vesicle 용액을 가지고 dithiothreitol 을 첨가한 후 333 nm 에서의 UV 흡수 변화를 기록한 결과가 Fig. 1 에 나타나 있다.

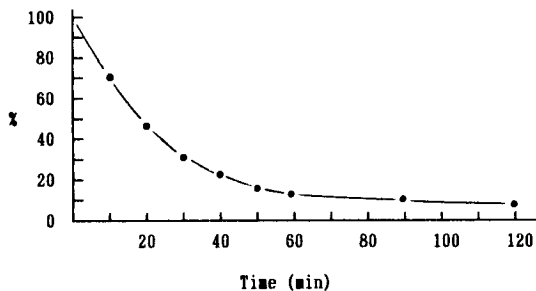


Fig. 1. Percent of 1, 2-dithiolane remaining.

Fig. 1 에서 보는 바와같이 60 분이 지나면 90 % 정도의 1, 2-dithiolane ring 이 열려졌고 120 분 정도 지나면 거의 모든 1, 2-dithiolane ring 이 열려져 중합 반응에 참여하였다. Fig. 1 에 보여진 data 를 1 차 반응 속도식에 대입하여 도시한 것이 Fig. 2 에 나타나 있다. 1 차 반응 속도식  $\log([A]_0/[A]_t) = kt/2.303$  에서  $[A]_0 = 100\%$  로 하였으며  $[A]_t$  는 t 분 후의 1, 2-dithiolane 의 % 로 하였다.

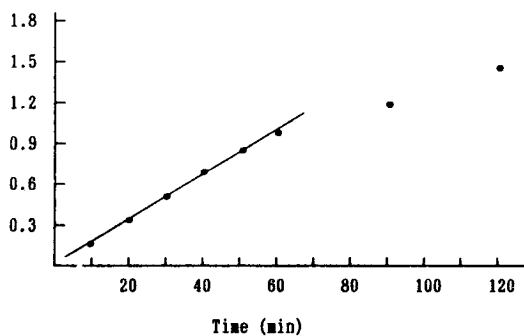


Fig. 2. Semilogarithmic plot of percent of 1, 2-dithiolane remaining.

Fig. 2 에서 보는 바와같이 60 분까지는 1 차 반응 속도식에 아주 잘 맞았으며 반응속도 상수 k 는  $3.84 \times 10^{-2} \text{min}^{-1}$  이었다.

또한 중합반응 이후에 TLC 로 detect 해 본 결과 4 시간 후에는 monomeric 한 1 이 거의 완전히 사라지는 것이 확인 되었다. 이렇게 얻어진 고분자화 된 vesicle 의 전자 현미경 사진을 찍어 본 결과가 Fig. 3 에 나타나 있다.

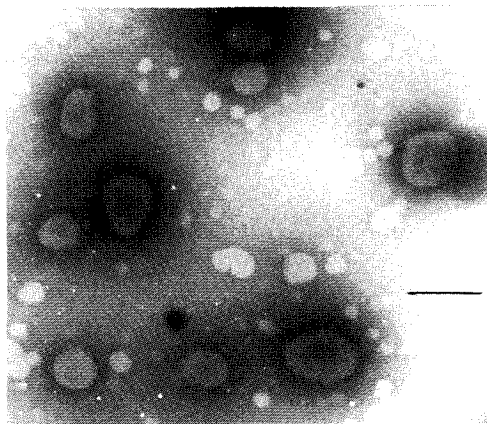


Fig. 3. Electron micrograph of the polymerized vesicle from 1. (2 % uranyl acetate stain, bar represents 1000 Å)

Fig. 3 에서 보는 바와같이 지름이  $500-900 \text{Å}$  정도인 고분자화된 vesicle 이 형성되었음을 알 수 있었고 중합 반응을 하기 전과 한 후의 전자 현미경 사진을 비교해 본 결과 별 차이를 발견할 수 없었으며 vesicle 의 크기도 거의 같았다. 그러므로 중합 반응이 vesicle 의 크기에 영향을 주지 않는다고 생각된다.

### 3. 2. 투과도 실험

Vesicle 의 투과도를 실험하는 방법은 여러가지가 있지만 그중에서 가장 좋은 방법은  $[^{14}\text{C}]$  sucrose 와 같은 radio active 한 substrate 를 이용하는 것이다. 실험 방법은  $[^{14}\text{C}]$  sucrose 가 함께 들어있는 vesicle 용액을 gel filtration 하여,  $[^{14}\text{C}]$  sucrose 를 vesicle 내에만 갖고있는 vesicle 용액을 분리한다. 위에서 얻은 vesicle 용액을 dialysis bag 에 넣고 200 ml 의 증류수에 대해 dialysis 하여 투과도를 측정한다. 일단 vesicle 을 투과해 나온  $[^{14}\text{C}]$  sucrose 는 vesicle 을 투과해 나온 속도보다 5 배 이상의 빠른 속도로 dialysis

bag의 membrane을 투과해 나간다. 그러므로 dialysis bag 내의  $^{14}\text{C}$  sucrose의 양을 측정하면 바로 그 값을 vesicle 내의  $^{14}\text{C}$  sucrose의 양을 측정된 값으로 환산할 수 있다.

Captured volume은 vesicle이 용액 내에서 차지하는 부피를 나타내는 값으로 vesicle에 entrap된 substrate의 양을 이용하여 부피 분율을 구해, 이것을 사용한 lipid의 mole수로 나눈 값을 말한다. 즉 vesicle 용액을 gel filtration하여 vesicle에 entrap된  $^{14}\text{C}$  sucrose의 양과 용액에 남아있는 free  $^{14}\text{C}$  sucrose의 양을 비교하여 vesicle이 차지하는 부피 분율을 구한 후 이것을 사용된 lipid의 mole수로 나누어 captured volume을 구한다. 본 실험에서 얻은 고분자화된 vesicle의 captured volume은  $1.8 \pm 0.2 \text{ l/mol}$ 이었다.

투과도 측정에서 얻은 data는 Johnson과 Bangham [15]의 방법을 이용하여 처리하였다.

$$\ln \left[ \frac{N_0 V_0}{V_1 + V_0} - N_t \right] = \ln \frac{N_0 V_0}{V_1 + V_0} - k \frac{V_1 + V_0}{V_0} t \quad (1)$$

$$k = (A/V_2)P \quad (2)$$

$N_0$  = 초기의 vesicle 내부의 counts

$N_t$  = t 시간 후의 vesicle 내부의 counts

$V_0$  = dialysate의 부피

$V_1$  = dialysis bag 내부의 부피

$V_2$  = vesicle 내부의 부피

$A$  = vesicle 내부의 표면적

$P$  = vesicle의 permeability

$$\ln \left[ \frac{N_0 - N_t}{N_0} \right] = -kt \quad (3)$$

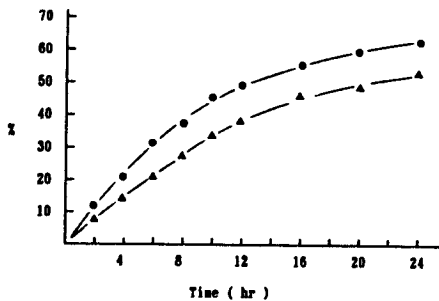


Fig. 4. Percent release of  $^{14}\text{C}$  sucrose vs. time at  $20^\circ\text{C}$ , polymerized :  $\blacktriangle$ , unpolymerized :  $\bullet$ .

Fig. 4에 시간에 따른  $^{14}\text{C}$  sucrose의 % release가 나타나 있다. 고분자화된 vesicle과 고분자화 되지 않은 vesicle의 투과도를 비교해보면 고분자화된 vesicle의 투과도가 작음을 알 수 있다. 이 data를 (3) 식으로 처리하여 다시 도시한 그림이 Fig. 5에 나타나 있다. 그리고 이 Fig. 5로 부터 계산한 k 값과 P 값이 Table 1에 나타나 있다.

Table 1. Estimated Permeability of Unpolymerized and Polymerized Vesicles to  $^{14}\text{C}$  sucrose at  $20^\circ\text{C}$

	$k(\text{hr}^{-1})$	$P^*(10^{-8}\text{cm hr}^{-1})$
Unpolymerized	$0.059 \pm 0.005$	$6.9 \pm 0.6$
Polymerized	$0.040 \pm 0.005$	$4.7 \pm 0.6$

\* Calculated by using a mean vesicle diameter of  $700 \text{ \AA}$

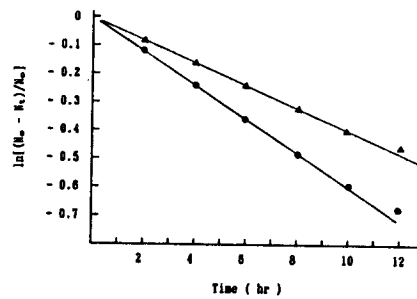


Fig. 5. Semilogarithmic plot of the fraction  $\ln[(N_0 - N_t)/N_0]$  vs. time for  $^{14}\text{C}$  sucrose permeation, polymerized :  $\blacktriangle$ , unpolymerized :  $\bullet$ .

Fig. 5에서 보듯이 10 시간까지는 (3) 식에 아주 잘 맞았으나 10 시간 이후에는 직선 관계에서 벗어났다. 10 시간 이후의 data가 (3) 식을 벗어나는 이유는 아직 명확하지 않으며 계속 연구 중이다. Table 1의 결과로부터 고분자화된 vesicle이 고분자화되지 않은 경우보다 k 값이 1.5 배 작음을 알 수 있었다.

#### 4. 결 론

본 실험으로부터 얻은 결론은 다음과 같다.

- 1) 1, 2-Dithiolane기를 갖는 lipid를 합성하여 vesicle을 형성시킨 다음 이것을 ring opening polymerization하여 고분자화된 vesicle을 합성하였다.

- 2) 이 고분자화된 vesicle 의 합성을 위한 중합반응의 반응속도를 UV 를 이용하여 측정한 결과, 반응속도 상수값이  $3.84 \times 10^{-2} \text{min}^{-1}$ 임을 알 수 있었다.
- 3) 투과도 실험에서 고분자화된 vesicle 이 고분자화되지 않은 경우보다 투과도가 1.5 배 낮았다.

### 감사의 말

이 논문은 1990 년도 문교부 지원 한국학술진흥재단의 지방대 육성 학술연구조성비에 의하여 연구되었음을 감사드립니다.

### 참 고 문 헌

1. J. H. Fendler, *Acc. Chem. Res.*, **17**, 3(1984).
2. Y. Yuan, P. Tundo, and J. H. Fendler, *Macromolecules*, **22**, 29(1989).
3. N. K. P. Samuel, M. Singh, K. Yamaguchi, and S. L. Regen, *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 42(1985).
4. N. Dodrer and S. L. Regen, *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 2829(1990).
5. S. Takeoka, H. Ohno, H. Iwai, and E. Tsuchida, *J. Polym. Sci., Chem. Ed.*, **28**, 717(1990).
6. I. Cho and K. C. Chung, *Macromolecules*, **21**, 565(1988).
7. S. L. Regen, J. S. Shin, and K. Yamaguchi, *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 2446(1984).
8. S. L. Regen, J. S. Shin, J. F. Hainfeld, and J. S. Wall, *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 5756(1984).
9. Y. K. Shin, H. S. Yoo, and J. S. Shin, *Polymer (Korea)*, **10**, 695(1986).
10. J. S. Shin, *Polymer(Korea)*, **12**, 156(1988).
11. I. Cho and J. S. Shin, *Polymer(Korea)*, **13**, 198(1989).
12. R. A. Moss and G. O. Bizzigotti, *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 6512(1981).
13. N. Nambu, T. Endo, and M. Okawara, *J. Polym. Sci., Chem. Ed.*, **18**, 2793(1980).
14. A. Sadownik, J. Stefely, and S. L. Regen, *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 7789(1986).
15. S. Johnson and A. D. Bangham, *Biochim. Biophys. Acta*, **193**, 82(1969).