

## 단분자 막의 실험에 의한 콜레스테롤을 갖는 고분자의 분자량 측정

조 의 환 · 정 상 원 · 신 재 섭\*†

한국과학기술원 서울분원 신소재공학과, \*충북대학교 자연과학대학 화학과  
(1993년 10월 12일 접수)

### Molecular Weight Determination of Cholesterol-Containing Polymer by Monolayer Study

Iwhan Cho, Sang Won Jeong, and Jae Sup Shin\*†

Department of Advanced Materials Engineering, Korea Advanced Institute of Science and Technology,  
P. O. Box 201, Cheongryang, Seoul 130-650, Korea

\*Department of Chemistry, Chungbuk National University, Cheongju, Chungbuk 360-763, Korea  
(Received October 12, 1993)

**요 약 :** 콜레스테롤을 갖는 단량체와 N-vinylpyrrolidone를 공중합하여 amphiphilic 고분자를 합성하였으며 이 고분자를 이용하여 단분자막 실험을 하였다. Trough를 이용하여  $\pi$ -A curve를 얻었으며 이 결과로부터  $\pi$ A- $\pi$  관계식을 유도하여 이 고분자의 분자량을 측정하였다. 이 결과로부터 측정된 분자량 값과 GPC 실험으로 부터 얻은 분자량 값은 거의 비슷하였다.

**Abstract :** Copolymerization of cholesterol-containing monomer and N-vinylpyrrolidone was carried out to make amphiphilic polymer. Using a trough monolayer study for this polymer was done and  $\pi$ -A curves were obtained. The molecular weight of this polymer was determined from  $\pi$ A- $\pi$  relationship. These results were almost similar with the molecular weight obtained by GPC.

## 서 론

콜레스테롤은 생체막에 중요한 한 성분이며 이와 같이 생체막에 들어있는 sterol들은 매우 중요한 생물학적인 역할을 수행하고 있다. 콜레스테롤은 bile salts나 lecithin과 같은 다른 amphiphile들의 도움이 없으면 물에 녹기가 매우 어렵다. 콜레스테롤은 정상적인 사람의 피 속에 약 200 mg/100 mL의 농도로 존재하며, 담성증과 동맥경화증의 중요 요인 중 하나로 알려져 있다.<sup>1~5</sup>

본 연구팀은 콜레스테롤을 갖는 monomeric amphiphile들을 합성하여 고분자화된 vesicle들을 형성시켜 보고하였으며<sup>6~8</sup> 이 vesicle들을 콜레스테롤을 추출하는데 이용하였다.<sup>9</sup> 또한 콜레스테롤을 갖는 비이온성 amphiphilic 고분자를 합성하여 이 고분자를 콜레스테롤을 추출하는데 이용하였다.<sup>10</sup>

본 연구에서는 콜레스테롤을 갖는 새로운 amphiphilic 고분자를 합성하고 이러한 고분자로 형성된 단분자막의 물성을 이용하여 고분자의 분자량을 결정할 수 있는 방법에 대해 보고하려고 한다. 단분자

막에 대한 연구는 최근에 매우 활발히 연구되는 분야로서 과거에는 저분자량의 유기 분자들이 주요 대상이 되어 왔으나 최근에는 고분자 물질들에 관한 연구도 활발히 진행되고 있다.<sup>11~13</sup> 고분자의 분자량과 단분자막의 물성과의 관계에 관한 연구는 Kawaguchi 등이 poly(methyl methacrylate)<sup>14</sup>와 poly(ethylene oxide)<sup>15</sup>를 이용하여 시도하였다.

본 연구에서는 정확한 분자량 측정이 매우 어려운 amphiphilic한 공중합체를 대상으로하여 단분자막의 물성으로부터 측정된 분자량 값과 gel permeation chromatography(GPC)를 이용하여 측정된 분자량 값을 비교하여 보았다.

## 실 험

**시 약.** 본 실험에 사용된 cholesterol, 1,6-hexanediol, N-vinylpyrrolidone(NVP), hexamethylphosphoric triamide(HMPT), diisopropylamine, 2,2'-azobisisobutyronitrile(AIBN), n-butyllithium은 Aldrich 제품을 사용하였다.

**기 기.** Nuclear magnetic resonance spectrometer는 Varian T-60A와 Bruker AM-300을 사용하였으며, infrared spectrophotometer는 Bomem FT-IR MB-100 spectrometer를 사용하였다. Thin-layer chromatography는 Merck 60 F-254를 사용하였다. Chromatography를 이용한 분리는 Merck silica gel 60 particle size 0.063~0.200 mm(70~230 mesh ASTM)를 이용하여 실시하였다. 분자량 결정을 위한 gel permeation chromatography는 Waters Model 510을 이용하여 측정하였다. 원소 분석은 CARLO ERBA elemental analyzer MOD 1106을 사용하였다.

**1-Ethenyl-3-(6-(cholest-5-en-3 $\beta$ -yloxy)hexyl)-2-pyrrolidone(1a)의 합성.** 0.118 mole의 n-butyllithium을 갖는 hexane용액(2.5 M) 47.3 ml에 10.6 ml(75.4 mmole)의 diisopropylamine을 100 ml의 tetrahydrofuran에 녹인 용액을 argon 대기하의 -78°C에서 더한다. 이 용액의 온도를 0°C로 올려 15

분동량 동안 둔 후 이 용액의 온도를 -78°C로 낮춘다. 이 용액에 0.0150 mole의 hexamethylphosphoric triamide(HMPT)를 더한 후 8.4 g(76 mmole)의 N-vinylpyrrolidone을 한방울씩 가한다. 이 때 노란색의 용액이 형성되는데 -78°C에서 두시간동안 더 반응시킨다. 이 용액에 23.7 g(37.8 mmole)의 6-(cholest-5-en-3 $\beta$ -yloxy)hexyl bromide<sup>16</sup>를 100 ml의 tetrahydrofuran에 녹인 용액을 -78°C에서 12시간 동안 놓아 둔 후 상온으로 온도를 올리고 12시간동안 stirring한다. Diethyl ether를 이용해 용액을 묽힌 다음 5 N NH<sub>4</sub>Cl 수용액을 이용해 반응을 멈추게 한다. Ether 층을 1 N HCl 수용액을 이용해 씻어준 후, NaHCO<sub>3</sub> 수용액과 포화 NaCl 수용액과 물을 이용해 차례차례로 씻어준다. 물을 완전히 제거한 후 용매를 완전히 제거하면 crude한 어두운 갈색의 syrup이 얻어진다. 이것을 silica gel을 이용한 column chromatography를 사용하여 정제한다. 이 때 사용한 용매는 petroleum ether와 tetrahydrofuran이 4 : 1로 섞여 있는 혼합 용매를 사용하였다. 원하는 생성물만 분리한 후 진공하에서 건조하면 하얀색의 1a가 얻어진다. (14.5 g, yield : 58.0%)

H-NMR(CDCl<sub>3</sub> : 300 MHz)  $\delta$  0.63~2.50(m, 56 H), 3.25~3.31(m, 1 H), 3.31~3.45(m, 4 H), 4.31~4.39(t, 2 H), 5.30(b, 1 H), 6.94~7.02(q, 1 H)

C<sub>39</sub>H<sub>65</sub>NO<sub>2</sub> Calc. C 80.77, H 11.30, N 2.42

Found C 80.77, H 11.48, N 2.88

**1-Ethenyl-3-(8-(cholest-5-en-3 $\beta$ -yloxy)-3,6-dioxaoctyl)-2-pyrrolidone(1b)의 합성.** 1a의 합성에서 사용된 방법과 같은 방법으로 합성하였다. 마지막 분리 단계에서 column chromatography에 사용한 용매는 petroleum ether와 tetrahydrofuran이 5 : 2로 섞여 있는 혼합 용매를 사용하였다. 10.8 g의 1b가 얻어졌다. (yield : 43.5%)

H-NMR(CDCl<sub>3</sub> : 300 MHz)  $\delta$  0.58~2.25(m, 48 H), 3.25~3.31(m, 1 H), 3.37~3.55(m, 12 H), 4.31~4.39(t, 2 H), 5.22~5.23(d, 1 H), 7.01~7.09(q, 1 H)

$C_{39}H_{65}NO_4$  Calc. C 76.55, H 10.71, N 2.29

Found C 76.64, H 11.04, N 2.68

**공중합.** NVP와 1a 또는 1b를 이용하여 공중합하였다. 개시제로는 2 mole %의 AIBN을 사용하였으며 용매로는 2-propanol을 사용하였다. 위의 monomer들을 glass ampoule에 넣고 얼림과 녹임을 반복하면서 진공을 걸어 녹아있는 기체까지 완전히 제거한 후 ampoule을 봉하였다. 중합반응은 70°C의 oil bath 안에서 24시간동안 실시하였다. ampoule을 개봉한 후 용매를 증발시키고 남은 물질을 diethyl ether에서 결정화시켰다. 형성된 공중합체를 거르고 진공하에서 건조시켰다.

**Monolayer Study를 이용한 분자 측정.** 컴퓨터에 의해 조절되는 film balance(San-esu Keisoku model FSD-50)을 사용하여  $\pi$ -A curve를 얻었다. Trough의 크기는  $600 \times 150 \text{ mm}^2$ 이고  $20.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ 를 유지하였다.

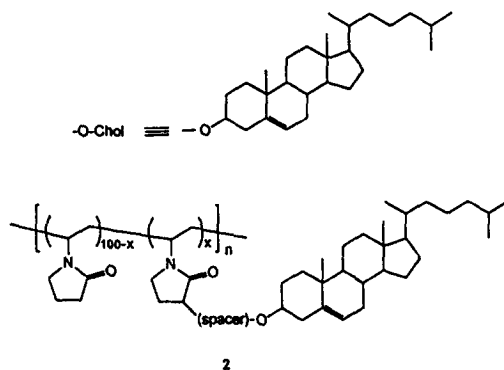
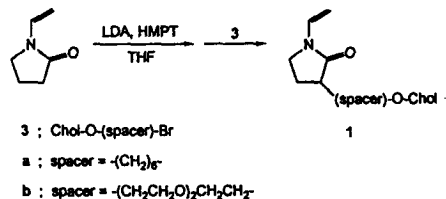
10 ml의  $\text{CHCl}_3$ 에 정확하게 무게를 측정한 10 mg 정도의 고분자 물질을 녹인 후  $30 \mu\text{l}$ 의 이 용액을 trough 위에 조심스럽게 spreading하였다. Compress 속도는  $0.2 \text{ mm/sec}$ 이었다.

**GPC를 이용한 분자량 측정.** Waters model 510을 이용하여 측정하였으며 용매로는 tetrahydrofuran을 사용하였으며 flow rate는  $1 \text{ ml/min}$ 이었다. 분자량 계산은 polystyrene standard를 이용하여 실시하였다.

## 결과 및 고찰

**공중합체 합성.** 1a와 1b의 합성 과정을 Scheme 1에 나타내 보였으며 또한 이들로 부터 형성한 공중합체의 구조도 역시 Scheme 1에 나타내었다.

이 중합체에서 친수성 부분은 poly(N-vinylpyrrolidone)(PVP) 부분이며 콜레스테롤을 갖고 있는 부분이 소수성 부분이다. 이 공중합체를 합성한 목적은 이 공중합체를 콜레스테롤을 추출할 수 있는 system으로서 이용하려는 것이다. 콜레스테롤은 인간의 핏줄 속에 축적되어 고혈압 등과 같은 성인병의 주요



Scheme 1.

원인이 되고 있다. 본 연구의 결과가 이러한 인간의 핏줄 속에 축적되어 있는 콜레스테롤을 추출할 수 있는 의약의 개발에 좋은 model system이 될 수 있을 것으로 생각한다.

본 연구에서 PVP를 선택하게 된 이유는 PVP가 독성이 매우 낮으며 화학 반응성 또한 매우 적기 때문이다. 실제로 PVP는 plisma의 대용물로 사용되고 있다.

본 실험에서 합성한 공중합체는 친수성 부분인 PVP 부분과 소수성 부분인 콜레스테롤 결사슬을 갖는 부분의 비를 조절하여 각각의 monomer의 몰비에 따라 N-vinylpyrrolidone(NVP) : 1a=5 : 1인 경우 합성된 공중합체를 5A로, NVP : 1a=10 : 1인 경우 합성된 공중합체를 10A로, NVP : 1a=20 : 1인 경우 합성된 공중합체를 20A로 각각 명하였다. 1b에 대해서도 1a에서와 같은 방법으로 합성하여 얻어진 공중합체를 각각 5B, 10B, 20B로 명하였다.

**Monolayer Study를 이용한 분자량 측정.** Trough 위에 공중합체를 chloroform에 녹여 spreading한 후에 compress를 하여  $\Pi$ A curve를 얻었다. 이  $\Pi$ A curve의 초기 상태, 즉 막 compress를 시작

하였을 때의 상태를 gaseous 상태라고 말할 수 있다. 이 때 적용할 수 있는 two dimensional 기체 방정식은 다음과 같다.

$$\Pi A = nRT + nA_0\Pi \quad (1)$$

A : Area(m<sup>2</sup>)

$\Pi$  : Surface pressure(N/m)

R : Gas constant(J/K)

T : Temperature(K)

여기서  $\Pi \rightarrow 0$ 일 때의 상태를 이상 기체의 상태로 볼 수 있으며 이 때 위의 방정식은 다음과 같이 된다.

$$(\Pi A)_{\Pi \rightarrow 0} = nRT = \frac{W}{M_w}RT \quad (2)$$

W : Weight(g)

M<sub>w</sub> : Molecular weight

$\Pi$ 값을 x축으로  $\Pi A$ 값을 y축으로 해서 그래프를 그리면 y축의 절편 값으로부터  $(\Pi A)_{\Pi \rightarrow 0}$ 값을 얻을 수 있다. Fig. 1은 5A, Fig. 2는 10A, Fig. 3는 20A 각각의 경우의 공중합체로부터 얻은 실험 결과이다. 이 그래프들로부터  $(\Pi A)_{\Pi \rightarrow 0}$ 을 구해 각각의 경우에 분자량 값을 구한 결과가 Table 1에 나타나 있다. 5B, 10B, 20B에 대해서도 위에서와 같은 방법으로 실험하고 결과를 처리하여 각각의 경우의 분자량을

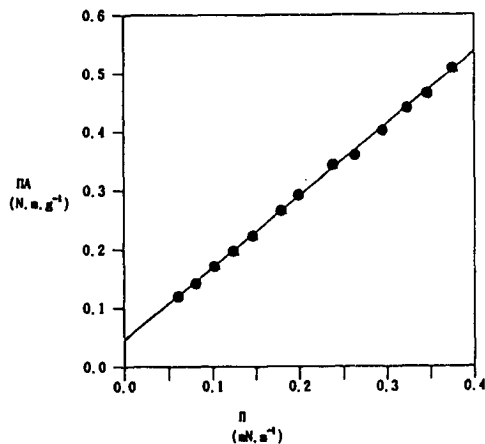


Fig. 1.  $\Pi A$ - $\Pi$  relationships for monolayer of copolymer 5A.

구하였으며 그 결과들을 Table 1에 함께 나타내었다.

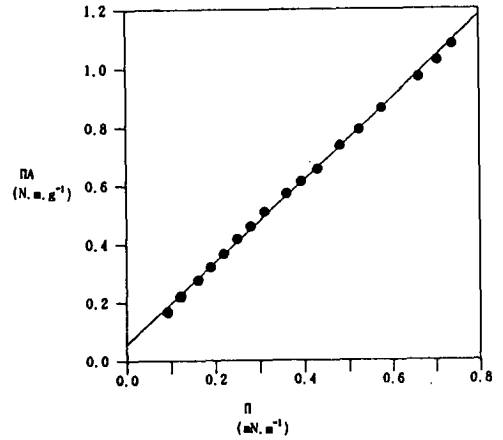


Fig. 2.  $\Pi A$ - $\Pi$  relationships for monolayer of copolymer 10A.

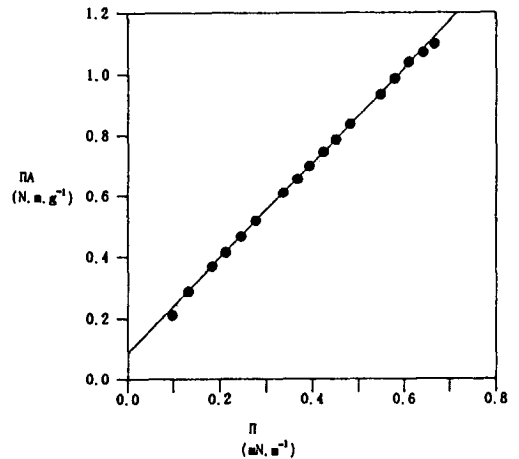


Fig. 3.  $\Pi A$ - $\Pi$  relationships for monolayer of copolymer 20A.

Table 1. Molecular Weight of Cholesterol-Containing Copolymers

|     | Monolayer study | GPC    |
|-----|-----------------|--------|
| 5A  | 12,800          | 10,500 |
| 10A | 10,300          | 8,600  |
| 20A | 9,400           | 7,200  |
| 5B  | 7,800           | 6,200  |
| 10B | 5,400           | 4,800  |
| 20B | 2,900           | 2,500  |

Table 1의 결과에서 보듯이 monolayer 연구에서 얻은 분자량 값은 GPC로 부터 얻은 수 평균 분자량 값보다 조금 큰 값들이기는 하지만 비교적 비슷한 값들이 얻어졌음을 보여주고 있다. 물론 GPC로 부터 얻은 수 평균분자량 값은 polystyrene을 standard로 이용한 상대적인 값으로 절대적인 값이라고 보기는 어렵지만 GPC의 결과와 본 연구의 결과는 같은 경향을 보여주었다.

**감사의 글 :** 이 연구는 1993년도 한국과학재단 특정기초 연구비 지원에 의한 결과임을 감사드립니다. (과제번호 : 91-03-00-09)

또한 실험에 많은 도움을 주신 Kyushu 대학의 Kunitake 교수에게 감사드립니다.

## 참 고 문 헌

1. D. Mufson, K. Meksuwan, J. E. Zarembo, and L. J. Ravin, *Science*, **177**, 701 (1972).
2. R. Lester, M. C. Carey, J. M. Little, and S. R. Dowd, *Science*, **189**, 1098 (1975).
3. R. A. Burns and M. F. Roberts, *Biochemistry*, **20**, 7102 (1981).
4. S. Pal and S. P. Moulikkk, *J. Lipid Res.*, **24**, 1281 (1983).
5. H. Schott and F. A. A. Sayeed, *J. Colloid Interface Sci.*, **112**, 274 (1986).
6. I. Cho and K. C. Chung, *Macromolecules*, **17**, 2935 (1984).
7. I. Cho and K. C. Chung, *Macromolecules*, **21**, 565 (1988).
8. I. Cho and J. G. Park, *Chem. Lett.*, 977 (1987).
9. I. Cho, S. H. Kim, and J. S. Shin, *J. Kor. Ind. Eng. Chem.*, **3**, 273 (1992).
10. I. Cho and Y. W. Kim, *Polymer Bulletin*, **24**, 545 (1990).
11. I. F. Chi, R. R. Johnston, H. Ringsdorf, N. Kimizuka, and T. Kunitake, *Thin Solid Film*, **210/211**, 111 (1992).
12. J. B. Peng, G. T. Barnes, A. Schuster, and H. Ringsdorf, *Thin Solid Film*, **210/211**, 16 (1992).
13. M. N. Teerenstra, E. J. Vorenkamp, A. J. Schouten, R. J. M. Nolte, C. A. Walree, J. F. Pol, and J. W. Zwicker, *Thin Solid Film*, **210/211**, 496 (1992).
14. M. Kawaguchi, A. Yoshida, and A. Takahashi, *Macromolecules*, **16**, 956 (1983).
15. M. Kawaguchi, S. Komatsu, M. Matsuzumi, and A. Takahashi, *J. Colloid Inteface Sci.*, **102**, 356 (1984).
16. M. M. Ponpipom, R. L. Bugianesi, T. Y. Shen, A. Friedman, *Med. Chem.*, **23**, 1184 (1980).