

반상호침투 구조체 형성을 이용한 막대형 양자물질의 분산과 안정화

리스트리아나 옥타비아 · 김성진* · 김종형** · 박해인 · 이창환*[†] · 곽민석[†]

부경대학교 화학과, *서울아산병원, **Iridos

(2015년 9월 9일 접수, 2015년 9월 25일 수정, 2015년 9월 30일 채택)

Dispersion and Stabilization of Quantum Rod Through Semi-interpenetrating Network Formation

Listiana Oktavia, Seong-Jin Kim*, Jong Hyung Kim**, Haein Park,
Peter Chang-Whan Lee*[†], and Minseok Kwak[†]

Department of Chemistry, Pukyong University, Busan 48513, Korea

*Department of Biomedical Sciences, University of Ulsan College of Medicine, Seoul 05505, Korea

**Iridos Ltd., Ulsan 45010, Korea

(Received September 9, 2015; Revised September 25, 2015; Accepted September 30, 2015)

초록: PEO-*b*-PPO-*b*-PEO를 기본 구조로 한 F127, L64 등의 pluronic은 수용액에서 미세상분리에 의하여 자기조립하고 그 중심부에 소수성의 분자들을 담지할 수 있는 응용가능성이 높은 고분자이다. 수십 나노 미터의 길이를 가진 막대모양 나노결정인 막대형 양자물질(quantum rod; QR) 콜로이드를 소수성 상호작용으로 담지한 뒤, 곧바로 반상호침투 구조체를 제조하여 장기간 형광 세기의 현저한 저하가 없는 안정한 유-무기 복합 나노소재를 수월하게 만들 수 있다. 우리가 제조한 F127-QR-sIPN 나노구조체는 표면이 poly(ethylene oxide)(PEO)로 둘러싸여 생체적합성이 우수하며 형광특성을 가진 QR이 세포섭취됨에 따라 형광 이미징도 가능성을 보였다.

Abstract: Pluronic (e.g. F127 and L64) are linear triblock copolymers capable of loading hydrophobic moieties within the core of aggregates via micro-phase separation. We demonstrate semi-interpenetrating network formation of organic-inorganic hybrid composites consist of quantum rod (QR) firmly encapsulated by F127. The stabilized nanoobjects are stable for a long period. Furthermore, we report that QR-IPN is promising material applicable in fluorescent cell-imaging with guaranteed biocompatibility.

Keywords: encapsulation, hybrids, fluorescence, biocompatible, cell imaging.

서론

상호침투 구조체(interpenetrating network; IPN)는 고분자 사슬들이 공유결합이 아닌 물리적으로 서로 얽혀 있는 구조로 각각의 고분자들과 비교하여 향상된 기계적 특성을 가질 수 있도록 하는 물성 개질 방법이다. IPN은 고분자들이 마치 쇠사슬 모양(concatenated)과 같이 연결되어 각각의 사슬을 분리할 수 없는 반면 반상호침투 구조체(semi-interpenetrating network; sIPN)는 고분자끼리의 상호침투가 아니라 보조적 망상구조의 도움을 필요로 한다. 가령 물리적으로 하나의 사슬을 끄집어 낼 수 있다고 가정하면, 가교된 망상구조에 얽혀 있는 사슬이 분리된다는 점으로 서로 구별될 수 있다.¹ 예를

들어 고분자의 뭉침(aggregation)으로 미셀(micelle) 구조 등을 형성한 분자체가 온도와 농도에 따라 해리(dissociation)되는 현상을 원치 않는 경우, sIPN은 다수의 아크릴레이트를 미셀의 소수성 중심에 담지하여 자외선 조사를 통한 가교 형성으로 안정화된 연성 나노입자를 제조하는 간단하면서도 효율적인 방법으로 사용되어 왔다.²

반도체 나노결정(semiconducting nanocrystal) 중 하나인 양자점(quantum dots)은 형광을 가지는 0차원 나노결정으로 다른 양자역학적 띠 간격(band gap)의 중심과 껍질이 존재하는 형태로 합성한다. 양자점은 일반적으로 CdSe 등의 중심을 가져 반응성과 독성이 매우 크므로 ZnS와 같은 껍질층을 입히고 양자점 표면에 유기 계면활성제 등을 표면 보호층(passivation layer)으로 사용하여 콜로이드 형태로 용액 내 안정성을 확보할 수 있다. 양자점은 물질과 구조에서 유래한 특성으로 유기형광분자에 비해 빛의 퇴색현상(photobleaching)

[†]To whom correspondence should be addressed.
E-mail: pcleee@amc.seoul.kr; mkwak@pknu.ac.kr
©2016 The Polymer Society of Korea. All rights reserved.

의 정도가 현저히 적으며 2-10 nm 직경 내에서 서로 다른 띠 간격을 가짐에 따라 광학적 특성을 달리하는 나노형광체로 여러 분야에 응용되어 왔다.³⁻⁵ 따라서 높은 양자효율을 가지는 양자점을 생분자 검출 등 생의학 분야에 응용하기 위하여 표면을 친수성으로 변환할 필요성이 대두되어 왔는데, 한 방법으로 수용액에서 표면 보호층에 사용할 수 있도록 개별적으로 합성한 친수성 말단 작용기의 계면활성제를 양자점 합성시에 사용하는 방법이 있다. 다른 방법으로는 상용 소수성 보호층(trioctylphosphine oxide 등)을 사용하여 양자점 합성 시 높은 수율을 기대하는 동시에 계면활성제를 이용한 분산을 통하여 용매 특성을 향상하는 방법을 사용할 수 있다. 양자점의 경우 다양한 양친매성 고분자들을 이용하여 수분산하는 방법이 보고되었으며⁶ 태양전지, 디스플레이 생체이미징 등의 응용 분야에 잠재적 가능성을 보였다. 한편, 점(0-D) 형태와 선(wire, 1-D) 형태의 중간 나노결정인 막대형 양자물질(quantum rod; QR)은 구형의 중심에 껍질을 한 방향으로 자라나게 한 구조로 에너지 간격과 전자 준위를 크기와 장폭비에 따라 조절할 수 있는 특징을 가지고 있다. 게다가 외부의 전기장에 따라 편광특성을 가지는 형광체로써 사용할 수 있다고 보고되었다. 그러나 등방형(isotropic)의 양자점에 비해 합성시 비등방성 결정 성장단계를 가지므로 콜로이드 QR의 보호층에 사용할 수 있는 분자들이 상당히 제한적이며, 수 나노미터의 두께에 수십나노미터의 길이를 가지는 모양과 크기의 특성상 분산이 쉽지 않고, 분산을 하더라도 안정성을 확보하기 어려운 것으로 알려져 있다.⁷

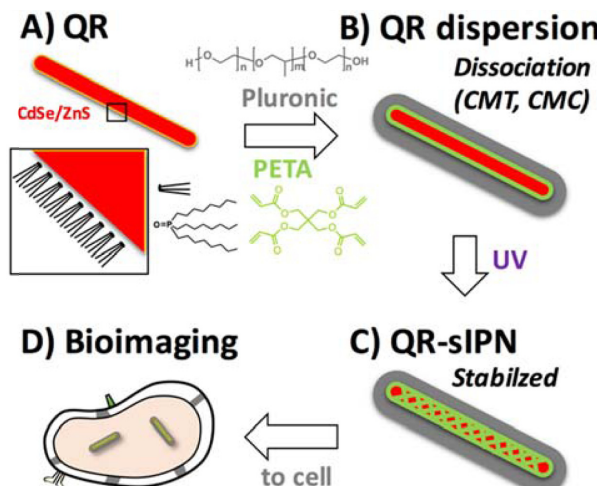


Figure 1. Schematic diagram of dispersion and stabilization of QR through semi-interpenetrating network formation: (A) QR used in this study has hydrophobic surface; (B) Pluronic, nonionic polymer surfactant, disperses QR in the presence of PETA within the hydrophobic volume; (C) UV irradiation induces crosslinking of PETA, which results in sIPN covering the surface of QR; (D) Stabilized QR-sIPN in aqueous atmosphere is capable of fluorescence imaging of cell with the moderate biocompatibility.

본 연구에서는 양자점과 중심-껍질 기본 구조는 유사하면 서도 1차원적 형태를 가지는 나노결정인 QR을 생체시료에 사용 가능한 고분자로 분산하였다. 그리고 QR의 분산 뿐만 아니라 sIPN 방법을 이용하여 수십 나노미터 길이의 QR이 수용액 환경, 낮은 온도에서도 장기간 안정성을 가지는 유-무기 복합 물질을 보고한다. 나아가 QR-sIPN이 생의학 분야에 응용 가능성이 있음을 보이기 위해 기초적인 세포실험을 실시하였다(Figure 1).

실 험

시약. QR은 Alivisatos가 보고한 방법으로 합성하였다.⁸ Pentaerythritol tetraacrylate(PETA)는 Sigma Aldrich 사에서 구매하였으며, Pluronic F127과 L64는 BASF사에서 공급받았다. 모든 물질은 정제 없이 구입한 그대로 사용하였다.

QR 분산. Pluronic 공중합체를 사용하여 수화법(hydration)을 사용하였다.⁹ QR과 Pluronic을 각각 클로로포름에 주어진 농도로 녹인 상태에서 5 mL 바이알 용기에 정량을 넣고 섞는다. 바이알 바닥에 고분자와 QR의 필름이 남도록 용매를 건조한다. Pluronic의 최종 농도에 맞는 물을 가하여 30°C에서 수화와 동시에 3분간 초음파 처리하고 10분간 방치한 후 분산되지 않은 고체를 분리하고자 0.45 μ m 시린지 필터(Sartorius)로 여과 후 투명한 주황색 용액을 얻었다.

QR-sIPN 제조. 상기 분산액에 정량의 PETA를 가하고 PETA가 상분리되어 있는 채로 빛을 차단한 후 실온에서 오비탈 셰이커(200 rpm)를 이용하여 혼합하였다. 50°C로 예열한 자외선 조사 상자에서 1.5 W/cm² 세기의 자외선(Lumen Dynamics, Omnicure S2000, 320-500 nm 필터 장착)을 6분간 쬔어준 뒤, 0.45 μ m 시린지 필터로 여과하여 투명한 주황색의 용액을 얻었다.

QR 분산액과 sIPN의 안정화도 시험. QR을 담지하고 PETA간의 가교를 통하여 sIPN을 형성한 용액을 임계미셀온도(critical micelle temperature; CMT) 이하 저온(4°C)에 보관한 후 형광광도계로 형광 세기의 변화를 측정하였다.

분광학적 분석. 석영 큐벳에 담긴 용액을 UV/Vis(Shimadzu, UV-2600)과 형광(Jasco, F6-6300) 분광기로 각각 실온에서 측정하였다. QR은 특별한 최고 형광파장이 피크로 존재하지 않으므로 QR의 형광을 측정했을 때 최대 세기를 sIPN의 담지 용량과 안정성 비교 등의 분석에 사용하였다.

전자투과현미경. Transmission electron microscope(TEM, JEOL, JEM-2010) 측정을 위하여 Formvar-Carbon Cu grid에 용액을 점적하고 여과지로 흡수한 후 즉시 측정하여 화상을 저장하였다.

TC1 세포실험. 세포증식 실험은 Titer-Glo luminescent assay 법으로 세포생존율을 정하여 5×10⁴ 세포에 phosphate buffer saline(PBS)로 희석한 QR-sIPN을 처리하였다. 세포 이

미징은 5×10^3 세포를 주어진 농도로 18시간 처리하고 confocal 형광현미경(Zeiss, LSM 7100)으로 측정하였다.

결과 및 토론

현재까지 생체적합성이 검증된 Pluronic으로 QD를 분산한 연구들은 보고되었으나¹⁰ QD를 sIPN으로 안정화하거나 같은 고분자로 QR을 분산한 연구는 보고된 바가 없다. 그러므로 Pluronic으로 QR 분산이 가능한지, 나아가 분산이 가능하다면 sIPN을 형성하여 안정성을 확보할 수 있는지 알아보하고자 다음과 같은 실험을 수행하였다.

QR 분산에 적합한 Pluronic 선택. 다양한 poly(ethylene oxide) (PEO)와 poly(propylene oxide) (PPO) 조성을 가지는 십여 개의 Pluronic 삼중블록 공중합체($\text{PEO}_n\text{-}b\text{-PPO}_m\text{-}b\text{-PEO}_n$)들 중 친수성이며 분자량이 큰 F127($\text{PEO}_{100}\text{-}b\text{-PPO}_{65}\text{-}b\text{-PEO}_{100}$, MW: 12600)과 소수성이며 분자량이 작은 L64($\text{PEO}_{26}\text{-}b\text{-PPO}_{30}\text{-}b\text{-PEO}_{26}$, MW: 2900)를 분산제로 이용, QR을 분산하였다. 최종 분산액의 농도는 수화시 가한 물에 대한 고분자의 질량비가 0-20% 되도록 2% 간격으로 조절하였다. 각각 11개의 분산액을 욕안으로 관찰하였는데, Pluronic을 사용하지 않은 0% 분산은 QR 특유의 주황색이 전혀 나타나지 않았으며, 바이알 바닥의 필름과 수화 조건에 따라 흡광도와 형광 세기가 다르게 나타났다. 특히 두 고분자 모두 농도가 극

히 높거나(16% 이상, 수화 후 점도가 증가함) 낮은 경우(6% 미만) 욕안으로 관찰하더라도 분산의 상태가 확연히 저하됨을 알 수 있었다(Figure 2(A)). 특히 농도가 높은 18, 20% 분산액의 색이 다른 이유는 단시간 수화가 효율적으로 이루어지지 않았기 때문이다(온도에 따라 sol-gel transition이 생길 수 있는 고농도 F127 수용액은 실온보다 낮은 온도에서 12 시간 이상 용해 필요). 그러므로, QR 분산에 적합한 고분자 농도를 10%로 결정하였다. F127과 L64를 이용한 분산액의 형광을 각각 측정한 결과 F127을 분산제로 이용하였을 때 약 6배 높은 형광 세기가 관찰되었다(Figure 2(B)). 이와 같이 QR 분산이 가능한 F127은 친수성 정도가 매우 높고, 이미 식 의약품 등에 널리 사용되고 있는 생체적합성이 여러 연구를 통해 검증된 Pluronic들 중 하나이다.

QR-sIPN – 최적의 QR과 PETA 함량 결정. 위 실험에서 결정한 10% 농도의 F127으로 혼합하는 QR과 PETA의 양을 달리하여 sIPN 형성을 위한 최적의 조건을 결정하고자 하였다. 이전 실험에서 PETA가 과량 사용될 경우 분산액과 PETA 간 상분리가 일어나므로 분산액 대비 PETA 양이 각각 0, 2, 3, 4 wt%인 구간에서 자외선 조사를 거쳐 sIPN을 형성하였다. 안정한 sIPN이 형성되었음은 용액을 임계미셀온도(critical micelle temperature; CMT, 17 °C, 10% F127) 이하의 저온(4 °C)에 하루동안 보관하여 실온에 보관한 용액과 형광 세기를 각각 비교하는 방식으로 확인하였다. 측정 결과 상온에 보관한 용액 대비 저온 보관 용액의 잔여 형광 세기는 약 0.42-0.62로 나타났으며, 2 wt%의 PETA를 사용한 경우 3 wt% 보다 절대 형광 세기가 약 84 A.U. 높게 나타났으므로 향후 sIPN 제조에 2 wt%의 PETA를 사용하였다(Table 1). PETA가 없으므로 sIPN을 형성하지 못하는 0% 용액의 경우 현저히 잔여 형광세기가 낮는데, 이 결과는 CMT 이하의 온도에서 보관한 미셀 중심부의 형광 유기 단분자가 배출되는 원리와 유사하다. 그러므로 고분자의 CMT를 이용하여 구형 고분자 sIPN의 안정화도를 측정하는 방법이 QR-sIPN에도 적용 가능하다고 볼 수 있다. 같은 CMT 실험을 QR의 wt%를 달리하여 분산액 대비 0.4 wt%의 QR을 사용하였을 때, 절대

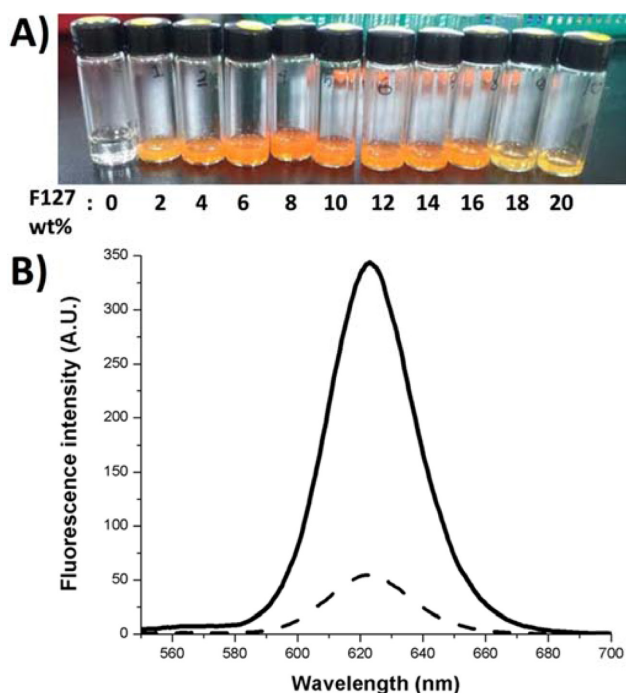


Figure 2. (A) Photograph of QRs dispersed with varied F127 wt% in water; (B) Fluorescence spectra of QR dispersed with F127 (solid) and L64 (dashed) in water.

Table 1. Determination of Optimal PETA Content for sIPN Formation (F127 10%, QR 0.5%)

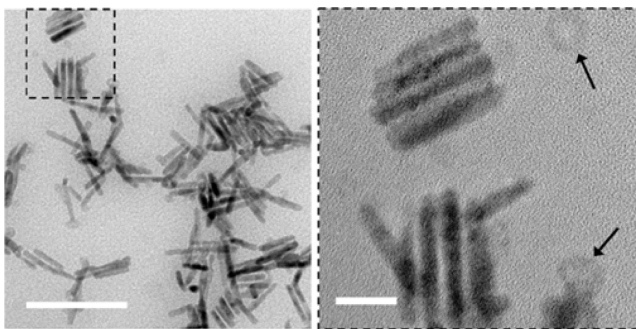
PETA (wt%)	Fluorescence intensity (A.U.) of sIPN stored at		Ratio of Flu. Int. at 4/25 °C
	25 °C	4 °C	
0 ^a	1000 ^b	416	0.42
2	484	293	0.61
3	400	246	0.62
4	553	293	0.53

^a0% PETA means QR dispersion (no sIPN).

^bAbove detection limit of fluorescence spectrophotometer.

Table 2. Determination of Optimal QR Content for sIPN Formation (F127 10%, PETA 2%)

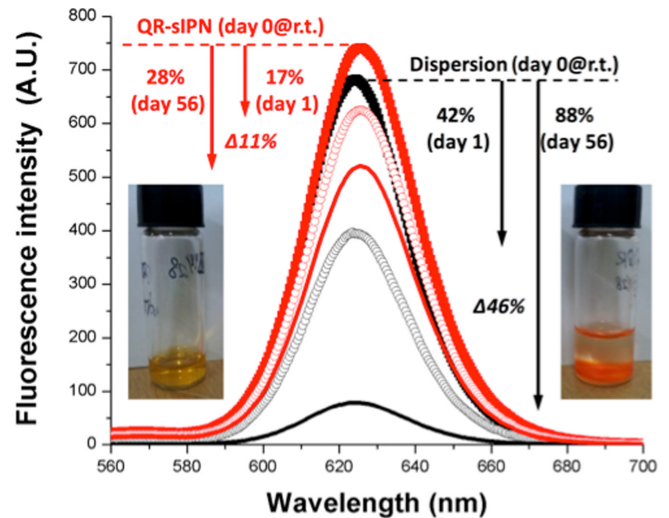
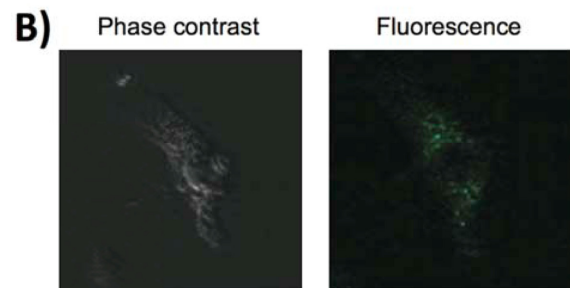
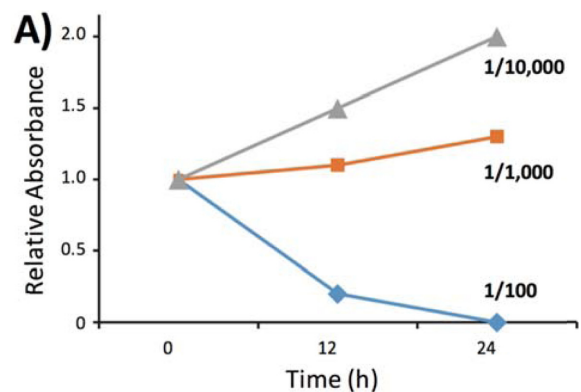
QR (wt%)	Fluorescence intensity (A.U.) of sIPN stored at		Ratio of Flu. Int. at 4/25 °C
	25 °C	4 °C	
0.1	53	22	0.42
0.2	229	140	0.61
0.3	388	185	0.48
0.4	740	521	0.70
0.4/no sIPN	682	79	0.12

**Figure 3.** TEM micrographs of QR-sIPN (length: 35.0 ± 1.7 nm). Arrows in the magnified image indicate spherical sIPN of F127 (right). Scale bars: 100 nm (left), 20 nm (right).

형광세기가 가장 높으면서 저온 보관시 잔여 형광세기가 가장 높은 것으로 측정되어 역시 향후 실험에 0.4 wt%의 QR을 사용하기로 결정하였다(Table 2). 이상과 같이 안정화도 시험을 통해 최적화한 2% PETA 그리고 0.4% QR의 함량을 이후 QR-sIPN 실험에 적용하였다.

TEM 이미징. 위의 방법으로 F127을 사용한 QR-sIPN을 제조하여 TEM으로 관찰하였다(Figure 3). QR 합성 직후 톨루엔에 콜로이드 형태로 존재하는 QR과 이미지상으로 특별히 다른 점은 없었으나, 수용액상의 QR-sIPN 시료에서는 직경 20 nm 미만의 구형 물질들이 간혹 관찰되었다. 약 10 nm의 직경과 모양을 고려하면 분산시 형성된 미셀 중심부에 있던 PETA가 UV에 의해 가교된, QR을 함유하지 않은 F127의 구형 sIPN으로 보인다.

장기간 저온 보관한 QR-sIPN의 안정성 시험. CMT 이하인 4 °C에 장기간(8주) 보관 시 sIPN 처리를 하지 않은 단순 분산액에서 다량의 주황색의 고체를 관찰하였다(Figure 4). 상온에서 분산후 QR 표면을 감싸고 있던 고분자들이 저온에서 unimer가 되어 QR 표면이 노출됨에 따라 고체로 석출된 것으로 설명할 수 있다. 같은 시료를 각각 하루, 8주의 기간동안 저온보관 후 QR의 형광 세기 변화를 측정하였는데, 놀랍게도 sIPN 제조 후 하루동안 보관한 용액(83%)과 비교하여 고작 11%(8주)의 형광 세기만 감소하였다(단순 분산액의 1일

**Figure 4.** Long term storage of identical QR-sIPN (red) and QR dispersion (black). Measured time point and temperature: day 0 at r.t. (filled symbols), day 1 stored at 4 °C (empty symbols), day 56 stored at 4 °C (solid line). Significant amount of precipitate was found in the dispersion of QR (picture on the right) while QR-sIPN remained clear for 8 weeks.**Figure 5.** Cell proliferation assay and fluorescence imaging of TC1 (lung cancer) cells: (A) TC1 cells were treated with three concentrations of QR-sIPN with F127 shell for indicated time periods. Results represent the mean ($\pm$ SD) of three samples (N=3) from two independent experiments for each condition; (B) Fluorescence micrograph of TC1 treated with 1/1000 QR-sIPN. Differential interference contrast (DIC) image (left) and confocal fluorescence image (right).

저온보관: 58%, 8주 저온보관: 12%). 이는 sIPN 내의 QR이 물리적, 화학적으로 굉장히 안정하다고 결론 내릴 수 있다.

QR-sIPN의 세포실험. F127으로 둘러싼 QR-sIPN을 PBS로 희석하여 TC1(폐암세포) 세포주를 대상으로 24시간의 세포증식시험과 형광이미징을 실시하였다. 100배 희석한 경우에는 12시간 안에 세포의 증식이 20% 가까이 줄어들었으며, 1000배 희석했을 때는 흡광도가 감소하지는 않았으나 증식이 현저히 느려지는 결과를 보였고, 10000배 희석한 경우에는 세포가 적절히 증식하는 결과를 얻었다(Figure 5(A)). 또한 형광현미경으로 1000배 희석한 QR-sIPN을 가한 TC1에서는 세포 내 유입이 일어난 세포들을 관찰하였다(Figure 5(B)). QR을 둘러싼 세포와 접촉하는 고분자 블록은 생체에 특이적 상호작용이 극히 적은 것으로 알려진 PEO이며 F127의 말단 작용기인 히드록시기(-OH)도 세포 표면과 상호작용을 기대할 수 없으므로, 우리가 관찰한 세포내 유입은 능동적인 리간드-수용체 상호작용보다는 QR의 크기 및 밀도와 막대 모양에 따른 비특이적 섭취일 것이라 추측한다.

결론

본 연구는 수화법을 이용하여 QR을 가교를 형성하는 아크릴레이트 유도체(PETA)와 함께 F127에 담지한 뒤, UV 조사를 통하여 자유라디칼 반응으로 다수의 아크릴레이트가 망상구조를 형성함으로써 소수성 PPO 중심부가 물리적으로 QR과 함께 얹혀 있는 sIPN을 제조하는 결과를 발표한다. 나이가 농도에 따른 세포실험 적합성과 세포섭취된 QR의 세포 이미징의 기초연구 결과를 추가함으로써 저온에서 8주 이상 저장이 가능한 안정화된 막대형 나노물질이 생체재료 분야에 응용 가능성을 보인다.

현재의 연구 결과를 바탕으로 세포의 특정 수용체와 특이적 작용을 하는 리간드¹¹ 등을 도입한다면 표적화된 이미징과 치료와 같은 생의학적 분야에^{12,13} 이바지 할 수 있는 스마트 나노소재가 되리라 기대한다.

감사의 글: 이 논문은 부경대학교 자율창의기술연구비(2013년)에 의하여 연구되었음.

참고문헌

1. IUPAC, *Compendium of Chemical Terminology*, 2nd ed. (the "Gold Book"), Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1997.
2. P. Petrov, M. Bozukov, and C. B. Tsevanov, *J. Mater. Chem.*, **15**, 1481 (2005).
3. G. H. Carey, A. L. Abdelhady, Z. Ning, S. M. Thon, O. M. Bakri, and E. H. Sargent, *Chem. Rev.*, **15**, 1101 (2015).
4. A. Banerjee, C. Gazon, B. Nadal, T. Pons, and T. Y. Krishnan, *Bioconjugate Chem.*, **26**, 1582 (2015).
5. S. Naahidi, M. Jafari, F. Edalat, K. Raymond, A. Khademhosseini, and P. Chen, *J. Controlled Release*, **166**, 182 (2013).
6. K. T. Yong, R. Hu, I. Roy, H. Ding, L. A. Vathy, E. J. Bergey, M. Mizuma, A. Maitra, and P. N. Prasad, *J. Am. Chem. Soc.*, **1**, 710 (2009).
7. G. Jia, S. Xu, and A. Wang, *J. Mater. Chem. C*, **3**, 8284 (2015).
8. D. V. Talapin, J. H. Nelson, E. V. Shevchenko, S. Aloni, B. Sadtler, and A. P. Alivisatos, *Nano Lett.*, **7**, 2951 (2007).
9. L. Liu, K. T. Yong, I. Roy, W. C. Law, L. Ye, J. Liu, J. Liu, R. Kumar, X. Zhang, and P. N. Prasad, *Theranostics*, **2**, 705 (2012).
10. Z. J. Zhu, Y. C. Yeh, R. Tang, B. Yan, J. Tamayo, R. W. Vachet, and V. M. Rotello, *Nat. Chem.*, **3**, 963 (2011).
11. S. H. Heo, M. J. Jang, D. G. Kim, Y. I. Jeong, M. K. Jang, and J. W. Nah, *Polym. Korea*, **31**, 454 (2007).
12. Z. Khatun, M. Nurunnabi, D. Y. Lee, Y. J. Kim, Y. Byun, K. J. Cho, and Y. K. Lee, *Macromol. Res.*, **23**, 686 (2015).
13. H. G. Kim, S. H. Jo, S. M. Yeon, K. H. Kim, J. W. Chung, T. W. Park, Y. Byun, E. H. Lee, Y. I. Park, and Y. W. Jung, *Macromol. Res.*, **21**, 1355 (2013).