

고분자화된 Vesicle의 투과 특성

조 의 환 · 신 재 섭*

한국과학기술원 화학과 · *충북대학교 자연과학대학 화학과
(1990년 11월 28일 접수)

Permeability Characteristics of Polymerized Vesicle

Iwhan Cho and Jae-Sup Shin*

*Department of Chemistry, Korea Advanced Institute of Science and Technology, P. O. Box 150
Chongyangni, Seoul 130-650, Korea*

**Department of Chemistry, College of Natural Sciences, Chungbuk National University, Cheongju,
Chungbuk 360-763, Korea*

(Received November 28, 1990)

요 약 : Vinyl기를 두개 갖고있는 lipid를 합성하여 이것으로부터 고분자화된 vesicle을 합성하였으며, 이것의 투과도를 고분자화 되기 전의 vesicle과 비교하였다. 고분자화된 vesicle이 고분자화되지 않은 vesicle보다 5 배이상 투과 속도가 느림이 밝혀졌다. 이것은 본 실험에서 합성한 lipid가 두개의 vinyl기를 모두 lipid의 꼬리 부근에 갖기 때문에 옆에 있는 lipid뿐만이 아니라, 윗층과 아래층 사이에서도 crosslinking이 충분히 일어났기 때문이라고 생각된다.

Abstract : Polymerized vesicle was synthesized from a lipid which had two vinyl groups, and permeability of this vesicle was compared with monomeric analog. Permeability of the polymerized vesicle was five times slower than that of monomeric analog. The reason is that the lipid which was used in this experiment had two vinyl groups at tail position in the lipid, and therefore crosslinking was possible between upper layer and lower layer in the vesicle as well as between side by side.

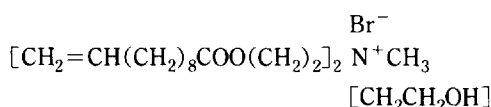
서 론

고분자화된 vesicle들에 관한 연구는 biological membrane의 model system으로서 뿐만이 아니라 의약의 운반체등 많은 분야에서 연구가 이루어지고 있다.^{1~11} Biological membrane의 가장 중요한 특성은 생물체에 필요한 화합물을 투과시키는 성질이므로 투과성을 조절할 수 있는 고분자화된 vesicle의

개발은 이러한 점에 있어서 매우 중요하다. 또한 controlled drug delivery system에 있어서 투과되는 속도를 조절하는 것은 매우 중요한 문제이다. 원하는 곳이나 원하는 시간에 의약의 방출을 조절할 수 있다면 한정된 곳에만 약을 투여해야하는 병, 예를 들어 암과 같은 병의 치료약의 개발에 이러한 연구가 좋은 model system이 될 수 있을 것이다.

본 연구에서는 vinyl기 두개를 갖는 lipid 1을 합

성하여 이것으로부터 고분자화된 vesicle을 형성시켜 crosslinked polymerized vesicle의 투과 특성을 살펴보았다. 그리고 이러한 vesicle의 투과 특성에 lipid의 중합 반응이 어떠한 영향을 주는지를 자세히 실험하였다.



실 험

본 실험에 사용된 10-undecenoyl chloride, *N*-methyldiethanolamine, 2-bromoethanol은 Aldrich 제품을 사용하였으며, [^3H]glucose (18 Ci/mmol)는 ICN Laboratories 제품을 사용하였다. Nuclear magnetic resonance spectrometer는 Varian EM 360 L을, 전자현미경은 Zeiss EM 109를, liquid scintillation counter는 Packard TRI-CARB 4000을, sonicator는 Braun Sonic probe-type sonicator를 사용하였다.

Bis[2-(10-undecenoyloxy)ethyl](2-hydroxyethyl)methylammonium bromide(1)의 합성¹²

11.9g(0.10mol)의 *N*-methyldiethanolamine을 80ml의 *N,N*-dimethylformamide에 녹인 용액에 44.6g(0.22mol)의 10-undecenoyl chloride를 더한다. 상온에서 1시간동안 반응시킨 후에 250ml의 diethyl ether를 더하고, 이 혼합물을 -10°C 로 낮춰 filter한 후, ethyl acetate에서 재결정하여 bis[2-(10-undecenoyloxy)ethyl]methylamine hydrochloride(2)를 합성하였다. (41.5g, 85% yield). mp $109\sim 110^\circ\text{C}$, NMR (CDCl_3) 0.95~1.85(s, 24H), 2.10(d, 4H), 2.26(t, 4H), 2.85(s, 3H), 3.38(t, 4H), 4.50(t, 4H), 4.67~6.02(m, 6H), 6.30(s, 1H).

4.88g(0.010mol)의 2를 0.5M NaOH 용액과 dichloromethane으로 extract하여 2를 free amine 형태로 dichloromethane에 녹인 후, 1.87g(0.015mol)의 2-bromoethanol과 80°C 에서 4시간 동안 반응시

켰다. 이 반응물을 진공하에서 용매를 반 정도 증발시킨 후 benzene을 가하여 결정화시켰다(3.92g, 68% yield). mp $64\sim 65^\circ\text{C}$, NMR(CDCl_3) 0.95~1.85(s, 24H), 2.10(d, 4H), 2.36(t, 4H), 3.45(s, 3H), 3.70~4.25(m, 9H), 4.58(t, 4H), 4.75~5.95(m, 6H).

Polymerized Vesicle의 합성

50ml의 비이커에 100mg의 1을 아주 소량의 chloroform에 녹이고 또한 2,2'-azobisisobutyronitrile (AIBN) (3.5mol%)을 chloroform의 용액 형태로 취해서 위의 비이커에 더해 함께 용액으로 만든 다음, 진공하에서 용매를 증발시켜 얇은 막이 비이커의 바닥에 형성되게 하였다(25°C , 4hr, 1mmHg). 그리고 10ml의 증류수를 이 비이커에 넣고 sonication하여 vesicle을 형성시켰다(10min, 50°C). 이 vesicle 용액을 시험관에 옮겨 stopper를 사용하여 공기를 차단한 후 두개의 주사 바늘을 이용해 질소 기체를 purge하였다. 이렇게 해서 형성된 vesicle 용액을 80°C 에서 6시간동안 놓아두어 중합반응을 시켰다.

투과도 측정

위에서 50ml의 비이커에 lipid와 AIBN을 첨가할 때 8 μl 의 [^3H]glucose stock solution (9:1 ethanol/water)을 함께 더하여 진공하에서 용매를 증발시켰다. 그러면 sonication 후 vesicle이 형성되었을 때 [^3H]glucose가 vesicle의 외부와 내부에 모두 존재하게 된다. 그리고 중합 반응을 시켰다. 이렇게 해서 얻어진 고분자화된 vesicle 용액을 sephadex G-50를 이용하여 gel filtration을 하면 vesicle 부분과 외부의 free [^3H]glucose를 분리할 수 있다. Gel filtration 과정은 다음과 같다. Sephadex G-50로 column (1 $\times$ 40cm)을 채운 뒤 0.5ml의 vesicle 용액을 더한 후 증류수를 elute하였다. 1.16ml씩 받았을 때, 11번째와 12번째에서 주로 vesicle 용액이 나왔다. 이렇게 분리한 vesicle부분, 즉 [^3H]glucose를 내부에 함유하고 있는 vesicle 용액을 가지고 투과도 측정을 실시하였다. Vesicle 용액 1ml를 dialysis bag에 넣고 200ml의 증류수에 대하여 20°C 에서 dialysis를 실시하였다. 그리고 일정한 시간마다 40 μl 씩

dialysis bag 내에서 sampling을 해서 liquid scintillation counter를 이용하여 남아있는 [^3H]glucose의 양을 측정하였다.

결과 및 고찰

고분자화된 Vesicle의 합성

합성된 고분자화된 vesicle의 전자현미경 사진으로부터 지름이 800~1200 Å인 구형 모양의 vesicle이 형성되었음을 확인할 수 있었다. Fig. 1에 고분자화된 vesicle의 전자현미경 사진이 나타나있다.

중합반응이 잘 일어났는가를 확인하기 위하여 중합반응 전후의 thin-layer chromatography(TLC)를 측정한 결과, chloroform, chloroform/methanol(1/1, v/v) 두 용매 조건에서 중합반응 전에는 모두 올라가는데 비해 중합반응 후에는 모두 원점에 남아있었다. 또한 중합반응 후 고분자화된 vesicle 용액을 freeze-dry한 다음에 CDCl_3 에 녹여 NMR을 찍어 본 결과 vinyl proton이 거의 완전히 사라지는 것이 확인되었다. 이 두가지의 실험 결과가 중합이 매우 잘 진행되었음을 나타내 준다.

중합반응을 하기 전과 중합반응을 하고난 후의 전자현미경 사진을 비교해 본 결과 vesicle의 모양이나 크기에 큰 차이를 발견할 수 없었으며 이것은 중합반응이 vesicle의 모양이나 크기에 영향을 별로 주지 않음을 말해준다.

본 실험에서 형성된 고분자화된 vesicle은 매우 안



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

정하여 30일 후에도 별 다른 변화를 보여주지 않았다. 또한 유기용매인 ethanol을 첨가하면서 400nm에서 turbidity를 측정해본 결과 10%의 ethanol을 첨가한 후 고분자화되지않은 vesicle은 즉각적인 변화를 보여주었지만 고분자화된 vesicle은 한시간 후 까지도 큰 변화를 보여주지 않았다.

투과도 실험

Vesicle의 투과도를 실험하는 방법은 여러가지가 있지만 그중에서 가장 좋은 방법은 [^3H]glucose와 같은 radio active한 substrate를 이용하는 것이다. 실험 방법은 [^3H]glucose가 함께 들어있는 vesicle 용액을 gel filtration하여, [^3H]glucose를 vesicle 내에만 갖고있는 vesicle 용액을 분리한다. 위에서 얻은 vesicle 용액을 dialysis bag에 넣고 200ml의 증류수에 대해 dialysis하여 투과도를 측정한다. 일단 vesicle을 투과해 나온 [^3H]glucose는 vesicle을 투과해 나온 속도보다 5배 이상의 빠른 속도로 dialysis bag의 membrane을 투과해 나간다. 그러므로 dialysis bag 내의 [^3H]glucose의 양을 측정하면 바로 그 값을 vesicle 내의 [^3H]glucose의 양을 측정한 값으로 볼 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 [^3H]glucose의 양과 용액에 남아있는 free [^3H]glucose의 양을 비교하여 vesicle이 차지하는 부피 분율을 구한 후 이것을 사용된 lipid의 mole수로 나누어 captured volume을 구한다. 본 실험에서 얻은 고분자화된 vesicle의 captured volume은 1.7 ± 0.1 l/mol이었다.

투과도 측정에서 얻은 data는 Johnson과 Bingham¹³의 방법을 이용하여 처리하였다.

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

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

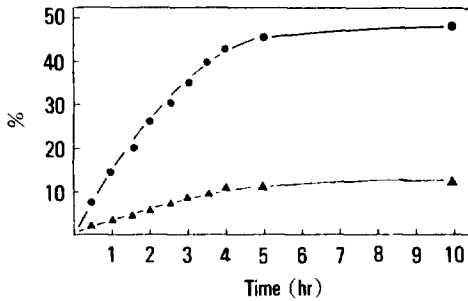


Fig. 2. Percent release of $[^3\text{H}]$ glucose vs. time at 20°C : (▲) polymerized, (●) unpolymerized.

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. 2에 시간에 따른 $[^3\text{H}]$ glucose의 % release가 나타나있다. 고분자화된 vesicle과 고분자화되지 않은 vesicle의 투과도를 비교해보면 고분자화된 vesicle의 투과도가 매우 작음을 알 수 있다. 이 data를 (3)식으로 처리하여 다시 도시한 그림이 Fig. 3에 나타나있다. 그리고 이 Fig. 3로부터 계산한 k 값과 P 값이 Table 1에 나타나있다.

Fig. 3에서 보듯이 4시간까지는 (3)식에 아주 잘 맞았으나 4시간이후에는 직선관계에서 벗어났다. 4시간이후의 data가 (3)식을 벗어나는 이유는 아직 명확하지 않으며 계속 연구 중이다. 그러나 초기 투과 속도는 (3)식에 아주 잘 맞았다.

Table 1에서 보듯이 고분자화된 경우가 고분자화되지 않은 경우보다 k 값이 5배 이상 작음을 알 수 있다. 이 값은 Dorn¹⁴등이 얻은 수치보다 큰 차이를 보여주는데 이것은 본 실험에서 선택한 lipid가 한 분자에 vinyl기 두개를 가지고 있어 crosslinking이 가능하며 또한 vesicle의 double layer가 서로 인접한

Table 1. Estimated Permeability of $[^3\text{H}]$ Glucose through Unpolymerized and Polymerized Vesicles at 20°C

	$k \text{ (hr}^{-1}\text{)}$	$P^* \text{ (} 10^{-7} \text{ cm hr}^{-1}\text{)}$
Unpolymerized	0.14 ± 0.015	2.3 ± 0.25
Polymerized	0.027 ± 0.003	0.45 ± 0.05

* Calculated by using a mean vesicle diameter of $1000 \text{ \AA}$

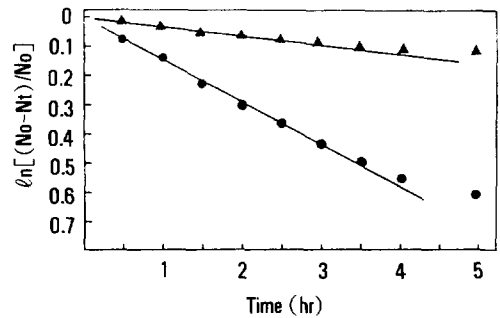


Fig. 3. Semilogarithmic plot of the fraction $\ln[(N_0 - N_t)/N_0]$ vs. time for $[^3\text{H}]$ glucose permeation: (▲) polymerized, (●) unpolymerized.

곳에 vinyl group이 있어 윗층과 아래층 간의 cross-linking도 가능하여 매우 단단한 crosslinking이된 고분자 구조가 형성되었기 때문으로 생각된다.

이 논문은 1990년도 문교부 학술연구조성비의 지원에 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. R. Elbert, A. Laschewsky, and H. Ringsdorf, *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 4134 (1985).
4. N. K. P. Samuel, M. Singh, K. Yamaguchi, and S. L. Regen, *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 42 (1985).
5. T. Kunitake, M. Nagai, H. Yanagi, K. Takarebe, and N. Nakashima, *J. Macromol. Sci. Chem.*, **A 21**,

- 1237 (1984).
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. P. Tundo, D. J. Kippenberger, P. L. Klahn, N. E. Prieto, T. C. Jao, and J. H. Fendler, *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 456 (1982).
13. S. Johnson and A. D. Bangham, *Biochim. Biophys. Acta*, **193**, 82 (1969).
14. K. Dorn, R. T. Klingbiel, D. P. Specht, P. N. Tyminski, H. Ringsdorf, and D. F. O'Brien, *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 1627 (1984).