

Octasubstituted Cyclotetraphosphazene으로부터 Vesicle의 형성

신영재 · 박철순* · 김주연* · 김세라* · 신재섭*†

한국과학기술원 전자전산학과 · *충북대학교 화학과 · 기초과학연구소
(2006년 10월 26일 접수, 2007년 1월 25일 채택)

Preparation of Vesicles Using Octasubstituted Cyclotetraphosphazene

Young Jae Shin, Chul Soon Park*, Ju Youn Kim*, Se Ra Kim*, and Jae Sup Shin*†

Department of Electrical Engineering and Computer Science, KAIST, Daejeon, 305-701, Korea

*Department of Chemistry and Basic Sciences Research Institute, Chungbuk National University, Cheongju, Chungbuk 361-763, Korea

(Received October 26, 2006; accepted January 25, 2007)

Octachlorocyclotetraphosphazene을 사용하여 cyclotetraphosphazene 구조를 내부에 갖고 외부로 8개의 사슬 구조를 갖는 cyclotetraphosphazene 유도체를 합성하였다. 그리고 이 유도체와 콜레스테롤을 사용하여 vesicle을 형성시켰으며, TEM을 이용해서 이 vesicle의 형태를 살펴보고, encapsulation 효율 등을 알아보았다. 이 vesicle의 안정도는 dihexadecylphosphate를 첨가함에 의해서 크게 향상되었다.

A cyclotetraphosphazene derivative having eight chains was synthesized from octachlorocyclotetraphosphazene, which was employed along with cholesterol for the preparation of vesicles. The resulting vesicles were characterized by TEM and encapsulation efficiency. The stability of the vesicles was enhanced in the presence of dihexadecylphosphate.

Keywords: cyclotetraphosphazene, vesicle, cholesterol, encapsulation

1. 서 론

Vesicle은 이분자 층으로 이루어진 구 모양을 갖는 막 내부에 물이 들어 있는 공간이 있는 구조를 하고 있다. 이러한 vesicle에 관한 연구는 처음에는 단순히 생체막의 model system으로 출발하였으나[1,2] vesicle이 가지고 있는 독특한 구조, 즉 내부에 막으로 격리된 물로 채워진 공간을 갖는 구조 때문에 광범위한 분야에 응용되기 시작했다. 예를 들어 drug carrier system[1], photochemical solar energy conversion system[3,4], reactivity control system[5,7], controlled release system[8-10] 등 매우 많은 분야에 응용이 시도되었다[11-19].

지금까지 여러 가지 천연 및 합성 계면활성제에 의해 많은 vesicle들이 만들어졌는데 이들 중 대부분은 이온성 계면활성제에 의해 만들어진 것들이며 일부는 비이온성 계면활성제에 의해 만들어졌다. 비이온성 계면활성제는 이온성 계면활성제에 비해 일반적으로 독성이 적어 생명체와 관계된 용도로 사용하기 좋은 면이 있으나, vesicle을 형성하였을 때 이온성 계면활성제로부터 만들어진 vesicle에 비해서 안정도가 떨어지는 단점이 있다.

Cyclophosphazene은 6각형 고리를 갖는 cyclotriphosphazene과 8각형 고리를 갖는 cyclotetraphosphazene이 있는데 많은 연구들이 cyclo-

triphosphazene을 이용해 개환 중합을 하는 것에 집중되어 있다 [20,21]. 이렇게 중합 반응을 하는 연구 이외에는 이러한 고리 화합물의 유도체들을 합성해 난연제[22-27], 윤활제[28], star polymer[29-31] 등으로 이용하려는 연구들이 활발히 진행되고 있다.

본 연구에서는 cyclotetraphosphazene derivative를 합성해서 이들을 이용해 vesicle을 만들고 이들이 어떠한 형태를 하고 있으며 다른 물질을 얼마나 잘 함유하는가를 살펴보았다.

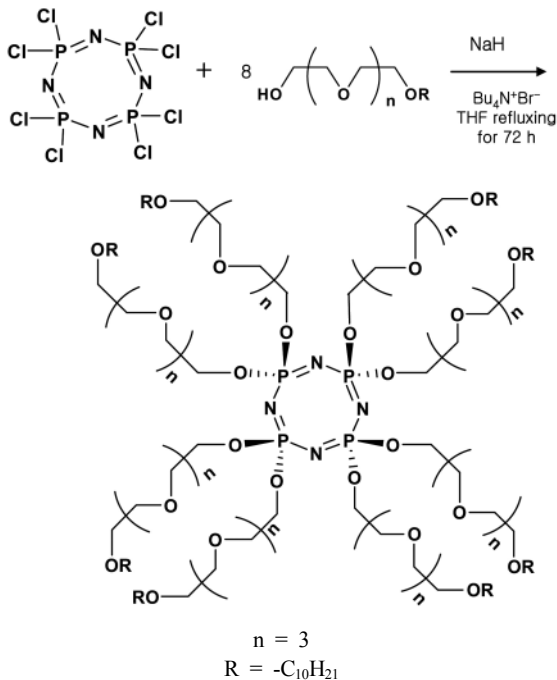
2. 실험

2.1. 시약 및 기기

Octachlorocyclotetraphosphazene (OCCP)은 Shanghai Qichen Chemical에서 구입한 phosphonitrilic chloride oligomer로부터 분별진공승화(fractional vacuum sublimation)를 실시한 후에 hexane에서 재결정하여 얻었다. 구입한 시약 안에는 trimer와 tetramer를 비롯하여 아주 소량의 oligomer가 혼합되어 있었다. Cholesterol, 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPHT), tetrabutylammonium bromide (TBAB), dihexadecyl phosphate (DHPP), Sephadex G-75, Tritron X-100는 Aldrich 시약을, 그리고 tetraethylene glycol monodecyl ether (TGME)는 Fluka 시약을 사용하였다.

NMR은 Bruker의 DPX 300을, IR는 Jasco의 FT-IR 680을, 원소분석

† 주 저자 (e-mail: jsshin@chungbuk.ac.kr)



Scheme 1. Synthetic route to octasubstituted cyclotetraphosphazene.

기는 CE Instruments의 EA 1110을, spectrofluorometer는 ISS의 ISSK2를, sonicator는 Cole-Parmer 4710 250 W를, 투과전자현미경(TEM)은 JEOL JEM-2010을 사용하였다.

2.2. 8개의 TGME를 갖는 Cyclotetraphosphazene 유도체(OTCP)의 합성

20 mL의 무수 THF에 NaH 0.784 g (32.8 mmol)을 녹여 suspension 상태를 만든 후 TGME 5.50 g (16.4 mmol)과 TBAB 0.0977 g (0.303 mmol)을 무수 THF 20 mL에 녹인 용액을 천천히 첨가하였다. 이 용액을 3 h 동안 환류시킨 후에, OCCP 0.635 g (1.37 mmol)을 무수 THF 20 mL에 녹인 용액을 이 용액에 천천히 첨가한 후에 72 h 동안 환류 하였다. 형성된 NaCl은 걸러서 제거 하였으며, 이 때 CH_2Cl_2 로 씻어주었다. 밑에 있는 혼합 용액을 진공 하에서 날려서 점성이 높은 액체 상태의 생성물을 얻었다. 얻어진 화합물은 두 번의 연속적인 column chromatography (silica gel, 용매 CH_2Cl_2 , CH_3OH)를 이용해서 정제하였다. 첫 번째 column chromatography에서는 CH_2Cl_2 : CH_3OH = 80:1 용매를 사용하였으며 두 번째 column chromatography에서는 CH_2Cl_2 : CH_3OH = 10:1 용매를 사용하였다. 수득율 48.2% (1.88 g, 0.660 mmol), $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 0.85 (t, 24 H, 8 CH_3), 1.06-1.51 (m, 128 H, CH_2), 3.27-4.15 (m, 144 H, O- CH_2), IR (cm^{-1}) 2930, 2870 (stretching C-H), 1150 (stretching C-O), 1120 (stretching -P=N-), 원소 분석 $\text{C}_{144}\text{H}_{296}\text{N}_4\text{O}_{40}\text{P}_4$, 계산된 값: C 60.73 H 10.48 N 1.97, 측정 값: C 60.51 H 10.58 N 1.92.

2.3. Vesicle의 형성

0.150 g (0.0502 mmol)의 OTCP와 0.0194 g (0.0502 mmol)의 cholesterol과 2.7 mg (4.94 μmol)의 DHPP를 10 mL의 methanol에 용해시켰다. 이 용액의 용매를 증발시켜 용기의 바닥에 아주 얇은 막이 형성되게 하였다. 여기에 2.5 mL의 증류수를 첨가한 후에 vortex mixer를 이용해서 10 min 동안 강력하게 흔들어서 주어 multilamellar vesicle

(MLV) 분산액을 형성하였다. 형성된 MLV 분산액을 sonicator를 이용하여 20 min 동안 sonication하여 unilamellar vesicle (ULV) 분산액을 형성하였다.

2.4. Encapsulation 효율 측정

DPHT를 이용하여 encapsulation 효율을 측정하였다. 위에서 vesicle 분산액을 형성할 때 DPHT를 첨가해서 DPHT의 농도가 20 mM이 되게 하였다. 이 용액을 gel filtration하여 vesicle 부분과 용액에 용해되어 있는 DPHT 부분을 분리하였다. 분리된 vesicle 부분을 Triton X-100을 이용하여 vesicle을 깨뜨린 후에 형광을 측정하였다. 측정할 때의 excitation 파장은 350 nm이었고 emission 파장은 425 nm이었다.

3. 결과 및 고찰

3.1. Cyclotetraphosphazene 유도체의 합성

본 연구에서 사용한 chlorocyclophosphazene은 trimer와 tetramer의 혼합물로 이루어져 있다. 순수한 tetramer를 얻기 위해서는 분별진공 승화(fractional vacuum sublimation)를 실시한 후에 hexane에서 재결정하였다. Hexachlorocyclotriphosphazene (trimer)의 IR spectrum 중에 -P = N-에 의한 absorption은 1218 cm^{-1} 에서 나타나며, OCCP (tetramer)의 -P = N-에 의한 absorption은 1310 cm^{-1} 에서 나타났다. 각각의 IR spectrum을 보면 trimer의 경우에 1310 cm^{-1} 에서는 absorption이 거의 없고 반대로 tetramer의 경우에는 1218 cm^{-1} 에서 absorption이 거의 없으므로, 이것들의 혼합물의 IR spectrum을 얻어 보면 각각의 상대적인 양이 어떠한지 대략적으로 추정하기 가능하였다.

OCCP와 TGME와의 반응은 TGME의 OCCP에 대한 몰 비를 12 배로 하여 반응시켰으며 phase-transfer 촉매로 자주 쓰이는 TBAB를 본 실험에 첨가하여 수득율을 크게 향상시킬 수 있었다. 전체적인 반응 과정을 Scheme 1에 나타내었다.

3.2. Vesicle의 형성

본 연구에서 합성된 OTCP는 단독으로 vesicle을 형성시키기는 매우 어려웠으나 같은 몰 비로 cholesterol을 첨가함에 의해서 vesicle을 형성할 수 있었다. 같은 몰 비의 OTCP와 cholesterol을 methanol에 용해시켜 만든 용액을 증발시켜 아주 얇은 박막이 용기의 바닥에 형성하게 한 다음, 증류수를 첨가하고 vortex mixer를 이용해 이 박막을 증류수에 용해시키면 여러 개의 층으로 구성된 multilamella 구조를 갖는 vesicle (MLV)이 형성된다[1,2]. 형성된 vesicle의 모양을 TEM으로 관찰한 사진을 Figure 1에 나타내었다.

Figure 1을 비롯한 TEM으로 관찰한 결과를 종합해 보면 지름이 400~500 nm인 vesicle들이 형성되었음을 알 수 있었다. 이렇게 얻어진 MLV 용액을 sonication해서 ULV 용액을 형성시킬 수 있었다. 형성된 모습을 역시 TEM으로 살펴보았는데 그 결과를 Figure 2에 나타내었다.

Figure 2의 결과를 보면 지름이 150~180 nm 정도인 비교적 크기가 균일한 vesicle들이 형성되었음을 알 수 있었다.

형성된 vesicle들의 안정도는 그렇게 길지 않았다. 즉 형성된 vesicle 용액을 상온에 놓아 두면 2~3일 후에는 조금씩 침전물이 형성됨을 관찰할 수 있었다. 본 연구에서는 이렇게 형성된 vesicle의 안정도를 획기적으로 크게 향상시킬 방법을 찾았는데 바로 DHPP를 소량 첨가하는 것이다. 본 연구의 실험 예에서 볼 수 있듯이 OTCP 0.15 g 당 DHPP 2.7 mg 정도의 아주 적은 양으로도 형성된 vesicle의 안정도를

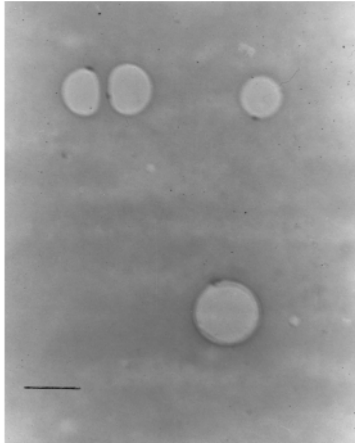


Figure 1. TEM images of the MLVs obtained from octasubstituted cyclophosphazene (bar represents 500 nm).

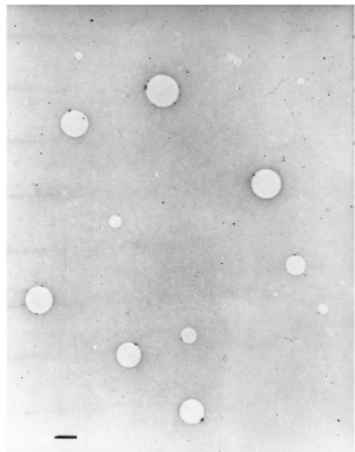


Figure 2. TEM images of ULVs obtained from octasubstituted cyclophosphazene (bar represents 200 nm).

매우 크게 향상시킬 수 있었다. DHPP를 첨가해서 형성한 vesicle 용액을 20~30일 동안 상온에 놓아두어도 침전물이 거의 형성되지 않았다. DHPP가 첨가된 vesicle의 경우에는 15일이 지난 후에도 TEM 사진에 큰 변화가 없었지만 DHPP가 첨가되지 않은 vesicle의 경우에는 15일이 지난 후에는 TEM 사진에서 서로 뭉쳐 있는 모습들이 여러 곳에서 관찰되었다. 이 때 얻은 TEM 사진을 Figure 3에 나타내었다.

Figure 3을 살펴보면 vesicle의 지름이 300~400 nm 정도로 커진 것들이 보이며 이들이 서로 뭉쳐 있음을 볼 수 있다. 이것은 vesicle들이 침전이 되는 과정에서 일반적으로 잘 나타나는 현상이다.

그리고 DHPP가 첨가되지 않은 경우와 DHPP가 첨가된 경우의 각각의 vesicle의 TEM 사진을 검토해 보면 모양이나 크기에 거의 차이가 없었다. 따라서 DHPP의 첨가는 형성된 vesicle의 모양이나 크기에 영향을 주지 않았으며 vesicle의 안정도만을 증가시켰다고 결론을 내릴 수 있다. 이러한 안정도의 증가는 DHPP가 이온성을 나타내므로 이것이 형성된 vesicle 들이 서로 뭉치는 경우를 많이 제어한 것으로 판단된다.

3.3. Encapsulation 효율 측정

Encapsulation 효율을 측정하기 위해서 DPHT를 이용하였다. 즉 vesicle의 형성과정 중에 DPHT를 같이 넣고 형성시켜 DPHT가 vesicle



Figure 3. TEM images of ULVs obtained from octasubstituted cyclophosphazene without DHPP (bar represents 200 nm).

Table 1. Entrapment Efficiency of Vesicles Obtained from Octasubstituted Cyclotetraphosphazene

Vesicles	Entrapment Efficiency
MLV	38 ± 2 %
ULV	30 ± 2 %

cle 내부에 들어있는 vesicle 용액을 형성하였다. 이 때 전체 용액에 대한 DPHT의 농도는 20 mM이었다. 형성된 vesicle 용액 중에는 vesicle의 이분자층 막의 내부로 들어가지 못하고 외부에 단독으로 용해되어 있는 DPHT들이 많이 있게 된다. 이들과 vesicle을 분리하기 위하여 Sephadex G-75를 이용해서 gel filtration을 하여 vesicle 부분만을 분리하였다. 분리된 vesicle 부분들을 Triton X-100을 이용해서 vesicle들을 깨뜨린 후에 형광을 측정하여 encapsulation된 DPHT의 양을 측정하였다. 그 결과를 Table 1에 나타내었다.

Table 1의 결과를 보면 MLV의 경우에는 38%가 encapsulation되었으며 ULV의 경우에는 30%가 encapsulation되었다. DPHT는 소수성이므로 vesicle 내부에 있는 DPHT들은 vesicle의 이중층 내에 주로 존재하게 된다. 이러한 이중층의 부피는 MLV와 UMV 모두의 경우에 같은 양의 물질을 사용한다고 하면, 거의 비슷할 것으로 판단되지만 본 실험 결과에서 보면 encapsulation된 양은 MLV가 ULV에 비해 8% 정도 더 많이 encapsulation되었음을 보여 주었다.

4. 결 론

본 연구에서는 OCCP를 이용하여 cyclotetraphosphazene 구조를 내부에 갖고 외부로 8개의 사슬 구조를 갖는 유도체를 합성하였다. 그리고 이 유도체를 이용하여 cholesterol과 1:1 몰 비로 혼합하여 vesicle을 형성시켰다. 이 vesicle은 둥근 모양을 하고 있음을 TEM으로 확인하였으며, DHPP를 소량 첨가하여 이 vesicle의 안정도를 높일 수 있었다. 그리고 DPHT를 이용하여 이 vesicle의 encapsulation 효율을 살펴봤는데 ULV의 경우에 30%, MLV의 경우에 38%가 encapsulation되었다.

감사의 말씀

본 연구는 2006년 중소기업청 산학연 공동기술개발사업에 의해 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

참고 문헌

1. J. H. Fendler, *Acc. Chem. Res.*, **13**, 7 (1980).
2. J. H. Fendler, *Membrane Mimetic Chemistry*, 160, John Wiley & Sons, New York (1982).
3. M. S. Tunuli and J. H. Fendler, *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 2507 (1981).
4. Y. M. Tricot and J. H. Fendler, *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 7359 (1984).
5. R. A. Moss and J. S. Shin, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1027 (1983).
6. R. A. Moss, S. Bhattacharya, P. Scrimin, and S. Swarup, *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 5740 (1987).
7. R. A. Moss and Y. Okumura, *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 1750 (1992).
8. I. Cho and J. S. Shin, *Polymer (Korea)*, **15**, 170 (1991).
9. J. S. Shin, *J. Kor. Ind. Eng. Chem.*, **2**, 64 (1991).
10. D. H. Bae, K. S. Kim, and J. S. Shin, *J. Kor. Ind. Eng. Chem.*, **3**, 335 (1992).
11. I. Cho and K. C. Chung, *Macromolecules*, **17**, 2935 (1984).
12. I. Cho and K. C. Chung, *Macromolecules*, **21**, 565 (1988).
13. I. Cho and J. G. Park, *Chem. Lett.*, 977 (1987).
14. I. Cho and Y. W. Kim, *Polymer Bulletin*, **24**, 545 (1990).
15. I. Cho, S. H. Kim, and J. S. Shin, *J. Kor. Ind. Eng. Chem.*, **3**, 273 (1992).
16. I. Cho, S. J. Jeong, and J. S. Shin, *Polymer (Korea)*, **18**, 23 (1994).
17. J. S. Shin, *Polymer (Korea)*, **19**, 379 (1995).
18. J. S. Shin, *J. Kor. Ind. Eng. Chem.*, **7**, 1142 (1996).
19. J. S. Shin, *J. Kor. Ind. Eng. Chem.*, **9**, 763 (1998).
20. H. R. Allcock, *Chem Mater.*, **6**, 1476 (1994).
21. H. R. Allcock, *Phosphorus-Nitrogen Compounds*, Academic Press, New York (1972).
22. D. Kumar, A. D. Gupta, and M. Khullar, *J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed.*, **31**, 707 (1993).
23. H. Horacek and S. Pieh, *Polym. Int.*, **49**, 1106 (2000).
24. Q. Wu, J. Lu, and B. Qu, *Polym. Int.*, **52**, 1326 (2003).
25. S. V. Levchik, G. F. Levchik, A. I. Balabanovich, E. D. Weil, and M. Klatt, *Angew. Macromol. Chem.*, **264**, 48 (1999).
26. W. Zhu, E. D. Weil, and S. Mukhopadhyay, *J. Appl. Polym. Sci.*, **62**, 2267 (1996).
27. H. Y. Kim, Y. J. Shin, Y. J. Ji, and J. S. Shin, *J. Korean Ind. Eng. Chem.*, **17**, 141 (2006).
28. M. Gleria and R. D. Jaeger, *Phosphazenes*, Nova Science Publishers, New York (2004).
29. J. Y. Chang, S. B. Rhee, S. Cheong, and M. Yoon, *Macromolecules*, **25**, 2666 (1992).
30. J. Y. Chang, H. J. Ji, M. J. Han, S. B. Rhee, S. Cheong, and M. Yoon, *Macromolecules*, **27**, 1376 (1994).
31. J. Y. Chang, P. J. Park, and M. J. Han, *Macromolecules*, **33**, 321 (1998).