

베시클 생성에 미치는 Phosphatidylcholine과 알루미늄 염 농도의 영향에 관한 TEM 관찰

鄭傑在 · 金飛賢 · 李炳校[†] · 李海旭[‡]

경북대학교 자연과학대학 화학과

[†]경북대학교 공과대학 무기재료공학과

[‡]가야대학교 공학부 전자세라믹공학과

(1995. 10. 26 접수)

Observation of Effects of Phosphatidylcholine and Al Salts Concentration on the Formation of Vesicles by TEM

Jong-Jae Chung, Chang-Hyun Kim, Byung-Kyo Lee[†], and Hae-Wook Lee[‡]
Department of Chemistry, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea

[†]Department of Inorganic Material Engineering, Kyungpook National University,
Taegu 702-701, Korea

[‡]Department of Electronic Ceramics, Kaya University, Kyungpook 717-800, Korea
(Received October 26, 1995)

요 약. 투과전자현미경(TEM)을 사용하여 실험 변수에 따른 베시클의 크기와 베시클간의 응집을 관찰하였다. 조절된 변수로는 (a) 반응온도의 변화, (b) phosphatidylcholine 농도의 변화, (c) phosphatidylcholine의 농도(0.39 mM)를 일정하게 유지했을 때 알루미늄 이온의 농도변화: 0.01, 0.05, 0.1, 0.2 M, (d) $Al(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$ 에 phosphatidylcholine을 1 wt%로 고정하여 이들의 농도 증가에 따른 전체농도의 변화 등을 실험한 결과 베시클 크기와 베시클간의 응집이 관찰되었다. 반응온도가 증가할수록, phosphatidylcholine 농도가 증가할수록 베시클의 크기가 감소되었다. 알루미늄 이온농도가 0.2 M일 때 입자간의 응집과 합체로 비정상 베시클 성장이 관찰되었다. $Al(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$ 에 대한 phosphatidylcholine비가 1 wt%일 때 최적의 베시클 크기와 균일한 분포를 얻을 수 있었다.

ABSTRACT. Transmission Electron Microscopy (TEM) was used to monitor the response of vesicle size and the intervesicle agglomeration with a variety of experimental parameters. Considered parameters are: (a) reaction temperature, (b) concentration of phosphatidylcholine, (c) concentration of aluminum ion with fixed concentration of phosphatidylcholine at 0.39 mM, and (d) mixed concentration of aluminum and phosphatidylcholine when fixing the weight ratio of phosphatidylcholine to aluminum at 0.01. Controlling these parameters, vesicle size changed and intervesicle agglomeration observed. As reaction temperature and the concentration of phosphatidylcholine increases, vesicle size decreases. With 0.2 M of aluminum ion, abnormal vesicle growth led by intervesicle agglomeration and coalescence was observed. When weight ratio of phosphatidylcholine to aluminum is 0.01, optimal vesicle size and size distribution can be obtained.

서 론

세라믹스 제조에 있어서 미세하고 균일한 크기의 분말은 우수한 소결성이나 전기, 기계적인 물성을

얻는데 매우 중요하다.¹ 미분체는 침전법,² 졸겔법³과 같은 액상법이나 기상법⁴ 등 여러가지 방법으로 제조되고 있다. 여러가지 분말제조 방법은 각각의 장

단점을 가지고 있으며, 최근 정밀세라믹스의 제조에 적합한 미분체 합성에 많은 연구가 진행되고 있다. 이러한 분말제조 방법 중 베시클을 이용한 침전법은 생체 조직내에 고화작용을 모방한 모델로서 미분체 제조에 적용할 수 있다.⁵⁻⁸ 베시클을 이용해 제조한 미분말은 기능성 세라믹스, 촉매, 자기기록매체 등과 같은 분야에서 중요하게 응용될 수 있다.⁹⁻¹¹

베시클은 초음파로 분산된 phosphatidylcholine 분자의 자체배열로 형성된다. 용액 속에 무기질 이온과 phosphatidylcholine 분자를 함께 넣고 분산시키면, 베시클이 무기질 이온을 포획하면서 생성된다. 무기질 이온들이 대부분 한정된 베시클내에 포획되고 나머지 일부 이온이 베시클 외부인 수용액상에 존재한다. 베시클 외부의 이온은 투석이나 이온교환수지로 제거된다. 베시클 외부에 존재하는 이온이 제거된 후 침전은 한정된 크기로 베시클 내부에서만 이루어진다. 베시클을 이용한 분말합성은 전통적인 액상반응법에서의 침전과는 달리 균일한 입도분포를 가지게 된다.

일반적으로 미셀은 계면활성제들간에 반데르 발스 힘과 엔트로피 효과에 의해 임계미셀농도에서 구상으로 배열된다. 미셀은 고정된 크기를 가지며 크기가 거의 계면활성제의 친유성부분의 성질에 의존한다. 따라서 구상의 미셀의 반지름은 구성 단위의 길이보다 약간 짧은 직경을 가진다.¹² 미셀은 계면활성제의 소수성 말단기가 쉽게 구상으로 배열하는 반면에, 베시클을 형성하는 양쪽성 물질은 상대적으로 작은 친수성 부분과 알킬부분이 C₁₆-C₂₄로 결합된 거대한 두개의 소수성 부분으로 이루어져 있으므로 간단히 밀집된 구형으로 배열할 수 없다.¹³

Fig. 1은 phosphatidylcholine 분자를 나타낸 그림이다. a) 그림은 친수성 머리부분인 choline과 phosphate 그리고 glycerol로 이루어져 있고, 두개의 소수성 꼬리부분은 fatty acid로 되어 있다. b) 그림은 phosphatidylcholine의 분자 구조식을 나타낸 그림이다. 소수성 부분은 포화 탄화수소로 결합되어 있는 꼬리와 하나의 cis-이중결합으로 된 불포화 탄화수소를 지닌 꼬리가 있다. 이 불포화 탄화수소는 선택적인 이온에 대한 투과성막의 특성을 나타낸다.¹⁴

베시클을 형성하는 양쪽성 물질은 소수성 부분이 수용액상에 노출되고, 노출된 탄화수소의 말단기 부

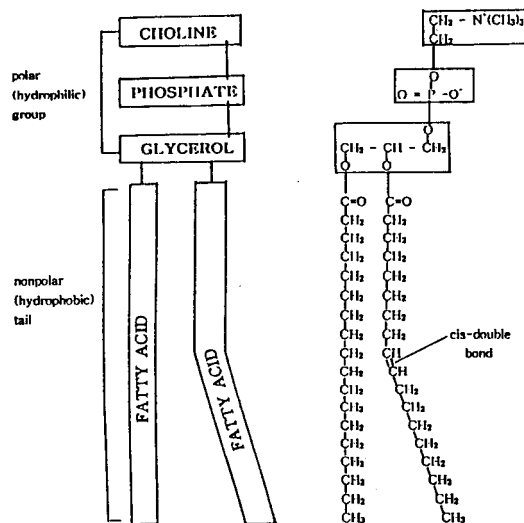


Fig. 1. The part of a phospholipid molecule, phosphatidylcholine, represented schematically (a), in formula (b), as a space-filling model.

분과 수용액상 사이에 계면에너지가 증가하여 에너지적으로 불안정해진다. 그리고 반복되는 이중막 구조의 성장은 무한히 확장되는 크기를 가지게 되므로 엔트로피가 감소한다. 그러므로 계면 에너지를 감소시키고, 엔트로피의 손실을 줄이는 방향으로, 즉 탄화수소의 말단기 부분의 계면에너지의 증가는 이중막을 형성하면 감소되고, 한정된 크기의 구조를 취함으로써 엔트로피의 손실을 줄일 수 있으므로 베시클의 생성이 가능하다.

베시클내의 침전반응에서 첨가된 무기질 이온은 베시클간의 응집과 합체에 영향을 준다. 이와 같은 베시클간의 응집과 합체는 DLVO¹⁵ 이론으로 설명할 수 있다. 베시클의 표면 에너지는 반 데르 발스 인력과 이중층 반발력의 합으로 계산될 수 있다. 표면 전하는 pH의 변화와 전해질 농도에 따라 변화된다. 그러므로 제타 포텐셜이 영인 등전점 근처에서 표면 전하에 의한 반발력이 없어지고, 반 데르 발스 인력만이 작용하기 때문에 등전점 근처에서 베시클간의 응집이 생기는 것으로 보고되어 있다.^{6,14}

일정한 크기의 미분체 합성은 베시클 크기를 조절함으로써 가능하다. 그러나 생성되는 베시클의 크기를 한정하는 메커니즘이 분명치 않으므로 그 크기를 한정하는 것은 메커니즘으로 간단하게 설명되지 못하고 있다.¹² 그러므로 본 실험에서는 실험을

통해서 얻은 결과를 Arrhenius 핵생성 이론식에 적용시켜 베시클의 크기가 한정되는 경향성과 그 결과를 해석해 보았다. 실험조건은 베시클의 크기를 조절하기 위하여 반응온도와 phosphatidylcholine의 농도를 변화시켰다. 그리고 베시클의 응집현상을 관찰하기 위하여 phosphatidylcholine의 농도를 일정하게 고정시킨 후 염의 농도를 변화시키고, 각 염에 대한 phosphatidylcholine의 비를 1 wt%로 조건을 고정하고 각 염의 농도를 변화시켰다.

실험방법

기기 및 시약. 본 실험에 사용한 Egg yolk phosphatidylcholine, $Al(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$ 와 이온교환수지인 Amberlite IR-120, Rohm & Hass Co.은 Sigma Chemical의 특급시약을 그대로 사용하였다. 초음파 분쇄기(1200 W)는 제일초음파에서 용기형태로 자체적으로 제작되었다. 베시클 크기의 관찰은 TEM(HITACHI H-7100)을 사용했으며, pH meter(pH/IOMETER DP-880)는 동우메디칼 시스템을 사용하였다.

실험방법. 계란 노른자위에서 추출한 Egg yolk phosphatidylcholine(100 mg/mL hexane)을 질소분위기에서 넣고 진공하에서 건조시켰다. 건조 후 phosphatidylcholine은 필름 형태로 반응용기 속에 남는다. 3차 증류수에 $Al(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$ 를 넣어 염용액을 만든다. 이 염용액을 반응용기에 넣어 약 5분간 분산시킨다. 분산 후 초음파 분쇄기에 넣어 30분 동안 반응시켜 베시클을 생성한다. 이때 반응온도는 30~70°C로 변화시켰다. Phosphatidylcholine의 농도는 0.04, 0.19, 0.39, 0.77 mM로 변화시켰다. 그리고 0.01, 0.05, 0.1, 0.2 M의 각 알루미늄 염용액에 일정한 phosphatidylcholine(0.39 mM)를 반응시켰다. 마지막으로, 각 염용액의 농도 0.01, 0.05, 0.1, 0.2 M에 대해 phosphatidylcholine의 비가 1 wt%인 0.04, 0.19, 0.39, 0.77 mM로 변화시켰다. 사용된 초음파 분쇄기는 일정한 출력으로 고정된 것을 사용하여 초음파 출력이 베시클 크기에 미치는 영향을 제거했다.

알루미늄 이온은 베시클 내부에 포획되고, 베시클 외부의 남은 이온은 이온교환 수지를 통과시켜 제

거되었다. 이온교환수지를 통과하는 동안 알루미늄 이온이 나트륨 이온으로 교환된다. 각 조건에서 얻어진 베시클의 크기와 형태는 TEM을 사용하여 관찰하였다. 이때 베시클이 생성된 분산계의 pH를 측정하였다. 베시클내에 침전이 생성되지 않은 상태에서는 베시클의 구분이 어렵기 때문에 Phosphotungstic acid를 착색제를 사용하였다. 베시클 크기는 Point Count법으로 계산했다.¹⁶

결과 및 토의

Fig. 2는 베시클 생성과정을 도시한 것이다. 수용액에 분산된 phosphatidylcholine 분자는 구획된 이중막이 계속 확장된 형태인 다중막 베시클을 형성한다. 다중막 베시클은 초음파 분쇄되어지면, 단일 이중막 베시클이 자체적으로 형성된다.^{17,18}

베시클 크기에 대한 영향과 베시클간의 응집을 조절하는 인자는 네 가지 변수로 실험했다. 각 결과는 핵생성 이론과 DLVO 이론으로 설명했다. Phosphatidylcholine 분자는 분산된 상태를 β상이라 하고 베시클을 형성한 상태를 상이라 볼 수 있다. 이때 α상은 β상으로 상변화를 하면서 핵생성이 이루어진다. 안정한 액적생성에 필요한 일은 구면 형성의 일(W_s)과 구적내형성의 일(W_b)의 합이다. 액적생성의 일을 식으로 표현하면 식 (1)과 같다.¹⁷

$$W = 4\pi r^2 \sigma - \frac{4}{3} \pi r^3 \frac{2\sigma}{r} = \frac{4}{3} \pi r^2 \sigma \quad (1)$$

여기서, σ 는 구적 표면의 단위면적당의 표면에너지

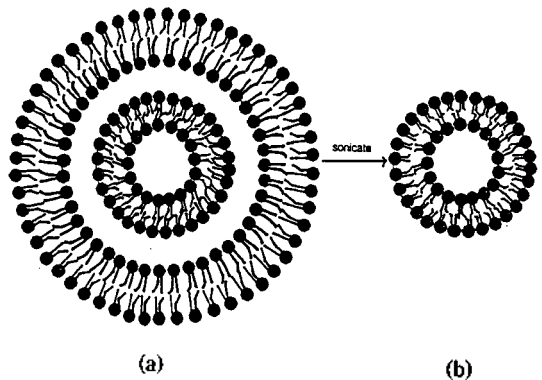


Fig. 2. Schematic illustration of (a) multilamellar and (b) single lamellar vesicle.

이다. 첫째항은 계면에너지이고 둘째항은 부피 자유 에너지를 나타낸다. 이는 액적생성의 일이 표면형성 일에 비해 1/3에 해당하므로 핵생성 이론을 베시클 생성에 적용할 수 있다. 이 식을 과포화도에 따른 핵생성에 필요한 일의 식으로 표현하면, 식 (2)와 같다.¹⁷

$$W = \frac{16\pi\sigma^3 M^2}{3(RT\rho \ln a)^2} \quad (2)$$

M 은 생성핵의 분자량을 나타낸다. 과포화도($\ln a$)항의 증가에 따라 핵생성의 일이 감소된다.

Arrhenius의 식을 이용하여 핵생성속도 V_N 을 나타내면 식(3)과 같다.¹⁷

$$V_N = k \exp\left[-\frac{16\pi\sigma^3 M^2}{3R^3 T^3 \rho^2 (\ln a)^2}\right] \quad (3)$$

여기서 k 는 빈도인자이다. 이 식에 의하면 핵생성속도는 온도항(T^3)이 증가하고, 과포화도항($\ln a$)²이 증가하면 빨라진다. 핵생성 속도가 빨라지면 생성핵은 작아지고, 생성핵의 갯수는 증가한다. 그러므로 과포화도의 증가는 핵의 크기를 감소시키고 핵의 크기 분포를 균일하게 한다.

Fig. 3은 phosphatidylcholine의 농도를 0.39 mM로 고정하고 반응온도를 30, 60, 70°C로 변화시키면서 초음파 분쇄기로 30분 동안 반응시켜 TEM으로 관찰한 사진이다. 반응온도가 증가함에 따라 베시클 크기는 (a) 40~70 nm, (b) 50 nm, (c) 5~20 nm로 관찰된다. 이는 식 (3)에서 보면 온도증가에 따라 핵생성속도는 빨라진다. 핵생성속도가 빨라짐에 따라 베시클의 크기가 작아지고 균일해진다.

Fig. 4는 상온에서 phosphatidylcholine의 농도를 0.04, 0.19, 0.39, 0.77 mM로 변화시켜 얻은 TEM 사진이다. 이 그림에서 베시클 크기가 (a) 180~200 nm, (b) 120~150 nm, (c) 40~70 nm, (d) 20~50 nm로 나타났다. 농도가 증가하면 과포화도는 증가하게 되고, 과포화도($\ln a$)²항이 증가하면 핵생성속도(V_N)가 증가한다. 핵생성속도가 증가하면 생성핵의 크기가 작아지고 크기 분포도 일정한 단분산 분포가 얻어진다.

Fig. 5는 phosphatidylcholine 농도를 0.39 mM로 일정하게 고정하고, $Al(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$ 를 0.01, 0.05, 0.1,

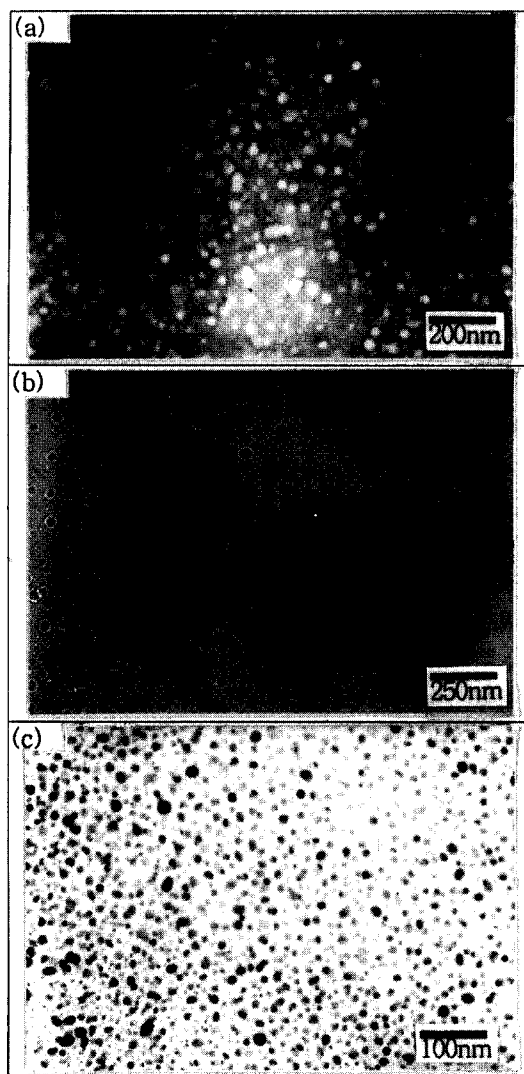


Fig. 3. TEM photographs of vesicles with variation of sonication temperature. Sonication temperatures are (a) 30 °C, (b) 60 °C and (c) 70 °C.

0.2 M로 변화시켜 염의 농도가 베시클 생성에 미치는 영향을 TEM으로 관찰하였다. 베시클 크기가 (a) 120~150 nm, (b) 100~120 nm, (c) 40~70 nm로 관찰되었으나, (d)의 경우는 베시클 크기분포가 상당히 넓게 관찰되었다. 염량이 증가됨에 따라 수용액의 pH가 3.4, 2.8, 2.6, 2.3으로 변화한다. DLVO 이론에 따르면 표면전하가 영인 등전점에서 정전기적인 반발력이 없어지고 반 데르 발스 인력만이 존재하므로 베시클간의 응집과 합체가 발생된다. (d)

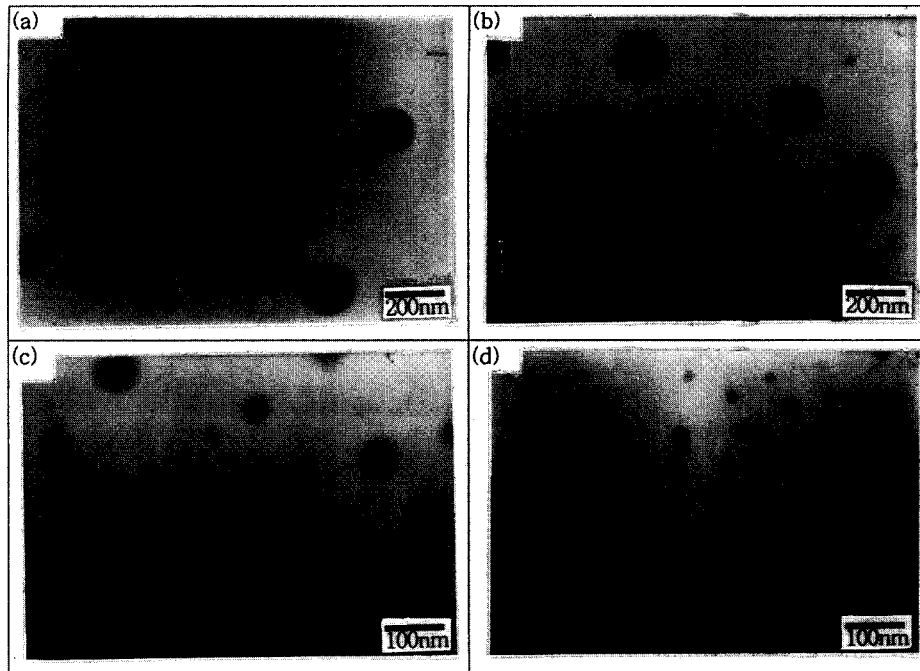


Fig. 4. TEM photographs of vesicles with variation of phosphatidylcholine concentrations are (a) 0.04 mM, (b) 0.19 mM, (c) 0.39 mM and (d) 0.77 mM.

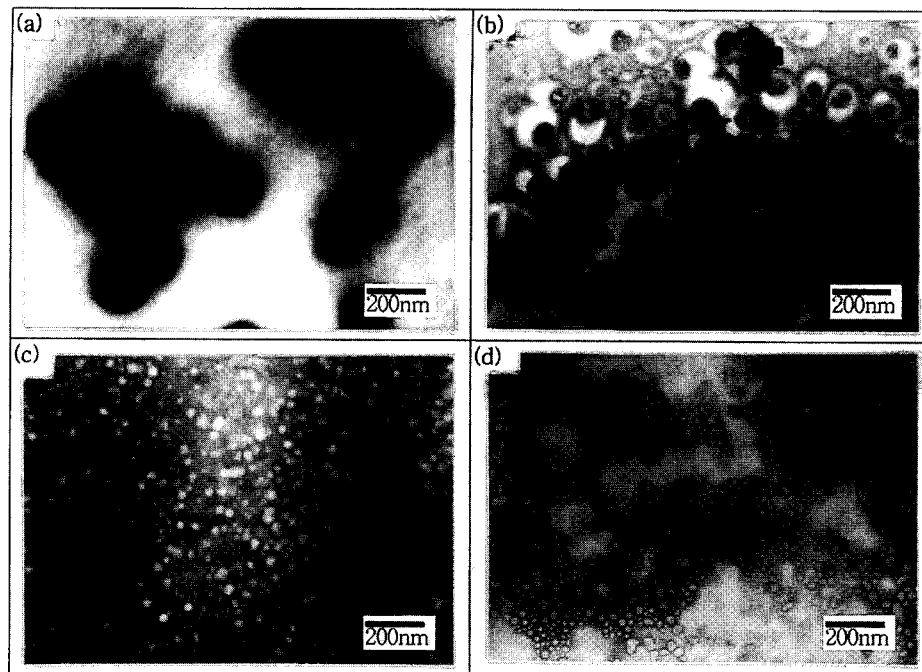


Fig. 5. TEM photographs of vesicles with variation of aluminium nitrate concentration in fixing phosphatidylcholine concentrations (0.39 mM). Aluminium nitrate concentration are (a) 0.01 M, (b) 0.05 M, (c) 0.1 M and (d) 0.2 M.

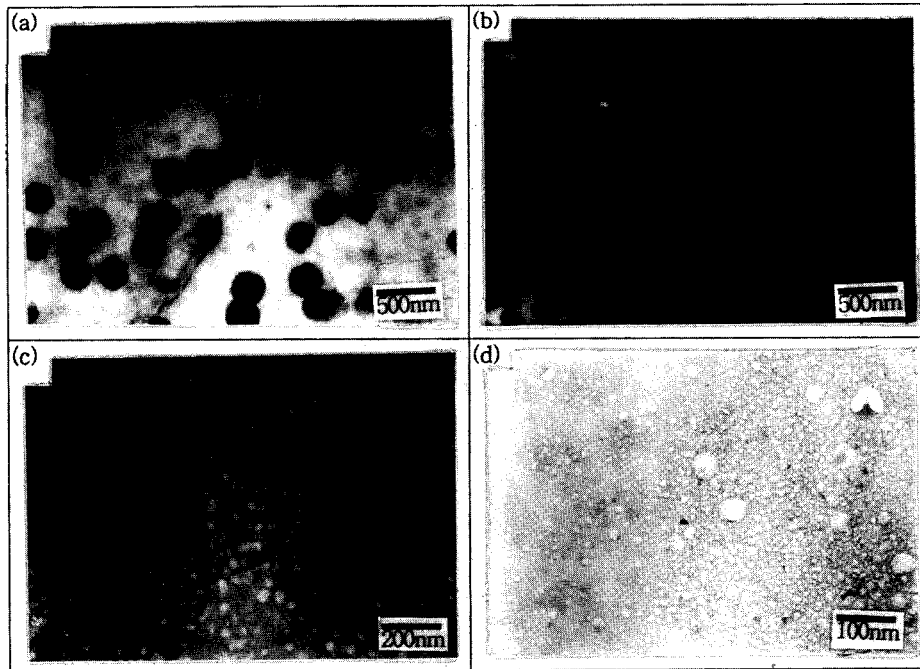


Fig. 6. TEM photographs of vesicles with variation of aluminium nitrate is 0.01. Aluminium nitrate concentration are (a) 0.01 M, (b) 0.05 M, (c) 0.1 M and (d) 0.2 M.

그림에서 등전점 영향으로 보이는 베시클간의 응집과 합체로 인한 비정상적으로 성장된 베시클이 관찰된다. 베시클간의 응집 영향을 보면, $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 에 대해 phosphatidylcholine 비가 1 wt%일 때 베시클간의 응집이 제거되고 베시클 크기분포가 단분산 분포가 확인되었다.

Fig. 6은 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 에 대해 phosphatidylcholine를 각각 1 wt%로 고정하고 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 의 농도를 (a) 0.01 M, (b) 0.05 M, (c) 0.1 M, (d) 0.2 M로 증가시켜, 전체농도의 변화가 베시클 크기와 베시클간의 응집과 합체에 미치는 영향을 관찰하였다. 베시클 크기는 (a) 200~220nm, (b) 100~130 nm, (c) 40~70 nm, (d) 5~50nm로 나타났다. 각 염량에 대해 phosphatidylcholine의 비를 1 wt%인 최적의 조건에서 반응했으므로 베시클 크기가 Fig. 4의 결과와 비슷한 단분산 분포를 관찰할 수 있다. 그러나 pH에 따른 등전점 영향으로 비정상적인 베시클의 크기가 Fig. 6의 d)에서도 관찰된다.

결 론

베시클의 크기나 형태에 영향을 주는 변수로 반응온도, phosphatidylcholine의 농도, 염의 농도변화 그리고 phosphatidylcholine와 염에 의한 전체농도를 변화시킨 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 반응온도의 증가는 핵생성속도(V_N)를 증가시키고 이는 베시클 크기를 감소시켰다.

2. Phosphatidylcholine의 농도가 증가함에 따라 과포화도가 비례하여 커지고 이는 핵생성속도를 증가시켜 베시클의 크기가 작아지고 균일한 크기의 베시클을 생성할 수 있다.

3. Phosphatidylcholine의 농도는 일정하게 유지하고 알루미늄 이온의 농도를 변화시켰다. 알루미늄 이온의 농도변화는 수용액상의 pH를 변화시켜 베시클의 표면전하를 바꾼다. 베시클의 표면전하가 영인 등전점 근처에서 베시클간의 응집이 발생한다. 응집은 합체과정을 거쳐 비정상적인 크기의 베시클로 관찰된다.

4. $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 에 대해 phosphatidylcholine를 1 wt%로 유지하면서 일정비율로 전체농도를 변화시킨 결과 phosphatidylcholine의 농도증가는 과포화

도를 증가시키고 이는 핵생성속도를 증가시키기 때문에 베시클 크기를 감소시킨다. 알루미늄 이온의 농도변화에 따라 베시클 표면전하가 변화하고 pH 2.3에서 베시클 표면전하가 등전점으로 접근함에 따라 응집과 합체과정을 확인할 수 있다.

인 용 문 헌

1. Segal, D. *Chemical Synthesis of Advanced Ceramic Materials*; West, A. R., Ed; Cambridge Univ. Pres.: New York, U.S.A., 1988; p 33.
2. Bratton, R. *J. Am. Ceram. Soc. Bull.* **1969**, *48*, 759.
3. Johnson, Jr, W. D. *Am. Ceram. Soc. Bull.* **1985**, *64*, 1597.
4. Mazdiyasn, K. S.; Lynch, C. T.; SmithII, J. S. *J. Am. Ceram. Soc.* **1965**, *48*, 372.
5. Fender, J. H. *Chem. Rev.* **1987**, *87*, 877.
6. Calvert, P. *Mat. Res. Soc. Symp. Proc.* **1990**, *180*, 619.
7. Yasrebi, M.; Kim, G. H.; Milius, D. L.; Sarikaya, M.; Aksay, I. A. *Mat. Res. Soc. Symp. Proc.* **1990**, *180*, 625.
8. Bhandarkar, S.; Yaacob, I.; Bose, A. *Mat. Res. Soc. Symp. Proc.* **1990**, *180*, 637.
9. Bhandarkar, S.; Bose, A. *J. Colloid Int. Sci.* **1990**, *139*, 541.
10. Bhandarkar, S.; Bose, A. *J. Colloid Int. Sci.* **1990**, *135*, 531.
11. Menger, F. M.; Lee, J. J.; Alkens, P. J.; Davis, S. *J. Colloid Int. Sci.* **1989**, *129*, 185.
12. Kuk, Y. H.; Lee, J. M. *콜로이드와 계면활성제*; 대광서림: Seoul, Korea, 1988; p 123.
13. Myers, B. *Surfaces, Interfaces and Colloids*; VCH Publishers: Germany, 1991; p 326.
14. Alberts, B.; Brag, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. *Molecular Biology of The Cell*; Carland Publishing Company, Inc.: New York, U. S. A., 1989; p 276.
15. Brinker C. T.; Scherer, G. W. *Sol-Gel Science*; Harcourt, B. J., Ed; Academic Pres. Inc.: New York, U. S. A., 1988; p 239.
16. Underwood. E. E. *Quantitative Stereology*; Addison ; Wesley Publishing Company: U. S. A., 1970; p 11.
17. Lee, H. J.; 일본화학회편. *세라믹고체반응총론*; 반도체출판사: Seoul, Korea, 1994; p 105.
18. Kingery, W. D.; Bowen, H. K.; Uhlmann, D. R. *Introduction to Ceramics*; John Wiley & Sons, Inc.: U. S. A., 1991; p 320.