Appl. Chem. Eng., Vol. 27, No. 3, June 2016, 291-298
http://dx.doi.org/10.14478/ace.2016.1035

Article

아민 옥사이드 양쪽성 계면활성제 첨가가 리포좀 특성에 미치는 영향에 관한 연구

모다희 · 이수민 · 이주연 · 한동성* · 임종주†

동국대학교-서울 공과대학 화공생물공학과, *애경산업(주) 중앙연구소
(2016년 4월 12일 접수, 2016년 5월 9일 심사, 2016년 5월 17일 채택)

Effect of Amine Oxide Zwitterionic Surfactant on Characteristics of Liposome

DaHee Mo, SuMin Lee, JuYeon Lee, DongSung Han*, and JongChoo Lim†

Dept. of Chemical and Biochemical Engineering, Dongguk University-Seoul, Seoul, Korea
**AK Central Research Center, DaeJeon, Korea*
(Received April 12, 2016; Revised May 9, 2016; Accepted May 17, 2016)

초 록

본 연구에서는 pH 변화에 따른 양쪽성 계면활성제 첨가가 리포좀 특성에 미치는 영향에 관하여 살펴보았다. 이를 위하여 아민 옥사이드(amine oxide) 양쪽성 계면활성제를 합성하고 ^{1}H NMR, ^{13}C NMR 및 FT-IR 분석을 통하여 구조를 규명하였으며, 계면활성제의 임계 마이셀 농도(critical micelle concentration, CMC) 및 표면장력 등의 계면 물성(interfacial property)을 측정하였다. 또한 제타 전위(zeta potential) 측정을 통하여 양쪽성 계면활성제가 양이온 계면활성제(cationic surfactant)에서 음이온 계면활성제(anionic surfactant)로 작용이 전환되는 등전점(isoelectric point)을 결정하였다. 이 결과를 바탕으로 등전점을 중심으로 한 pH 변화 및 아민 옥사이드 계면활성제의 탄화수소 사슬 길이가 리포좀의 평균 입자 크기 변화 및 제타 전위 등과 같은 안정성에 미치는 영향에 살펴보았다. 또한 pH 및 계면활성제의 탄화수소 사슬 길이 변화에 따른 및 리포좀과 계면활성제의 결합 정도(binding degree) 및 리포좀 막의 가변형성(deformability) 등의 측정을 통하여 리포좀 막의 유동성(fluidity) 변화에 미치는 영향을 이해하고자 하였다.

Abstract

In this study, zwitterionic surfactants were added to liposome systems at different pH conditions to understand the effect of surfactants on liposome characteristics. For this purpose, amine oxide surfactants having different hydrocarbon chain lengths were synthesized and the structure of the resulting product was elucidated by using ^{1}H NMR, ^{13}C NMR, and FT-IR. In addition, the physical properties of newly synthesized surfactants such as critical micelle concentration (CMC), surface tension and isoelectric point were measured. The stability characteristics of liposome systems including average particle sizes and zeta potentials were measured by varying pH and hydrocarbon chain lengths of an amine oxide surfactant. Effects of the pH and hydrocarbon chain length of an amine oxide surfactant on fluidity of a liposome membrane were also examined by measuring the deformability and the binding degree between the surfactant and liposome.

Keywords: *amine oxide zwitterionic surfactant, liposome, deformability, stability*

1. 서 론

인지질(phospholipid)은 생체 세포막의 약 60%를 차지하는 지질 성분으로, 양친매성 성질, 우수한 생체 적합성 및 수용액에서 생체막과 유사한 이중층(double layer) 구조의 회합체(aggregates)를 형성하는 성질을 지니고 있다. 이러한 장점 때문에 오래 전부터 리포좀 베시클(loposomal vesicle), 에멀젼(lipid emulsion), 라멜라(lamellar) 및 비라멜라(nonlamellar) 회합체와 같은 다양한 형태의 약물 전달체(drug delivery vehicle)에 많이 이용되어져 왔다. 특히 리포좀은 이중층의 소포체 형태로 약물의 빠른 흡수성, 표면 개질의 용이성, 유용성 및 수용성 약물을 함께 사용할 수 있는 장점을 갖고 있기 때문에 의약품이나 화장품 산업에서 다양하게 응용되어지고 있다[1-4]. 그러나 리포좀의 다양한 장점에도 불구하고 인지질의 낮은 용해도와 유화력 때문에 약물 전달체에 대한 실제 응용에는 많은 한계점을 지니고 있으며, 특히 pH, 염(salts) 등과 같은 외부 환경에 구조가 쉽게 파괴되는 불안정성 문제를 갖고 있다[1-4]. 따라서 최근 이를 개선하기 위한 다양한 연구들이 진행되고 있으며, 대표적인 방법으로 생체 고분자를 이용한 입체적 안정화와 이중막 구조 내에 다양한 중합기를 도입하여 중합에 의해 안정화시키는 방법 등이 많이 이용되었다. 그러나 친수성 고분자의 도입은 물질의 높은 친수성 때문에 희석 시 베시클의 형태 변화를 유발하며, 중합기의 도입은 리포좀 막의 주요 성질인 유동성(fluidity) 변화를 유발하는 단점을 지니고 있다.

† Corresponding Author: Dongguk University-Seoul,
Dept. of Chemical and Biochemical Engineering, Seoul, Korea
Tel: +82-2-2260-3707 e-mail: jongchoo@dongguk.edu

pISSN: 1225-0112 eISSN: 2288-4505 @ 2016 The Korean Society of Industrial and Engineering Chemistry. All rights reserved.

계면활성제(surface active agent, surfactant)는 한 분자 내에 친수기와 소수기를 동시에 가진 양친매성(amphiphilic) 화합물로서 용액의 표면장력 저하, 유화, 가용화, 분산, 기포성 등의 특성을 가진다. 이러한 성질을 이용하여 섬유 산업, 염색 산업, 피혁 산업, 제지, 화장품, 의약, 농약, 고분자, 플라스틱 관련 산업, 자동차, 페인트와 도료, 금속 공업용, 토목·건축 산업, 생활용품, 세정제 등 많은 분야에서 사용되고 있다[5-20]. 또한 나노기술(nanotechnology)의 중요성이 대두되면서 계면활성제의 초분자적 미세구조(molecular assembly)를 고기능성 나노 입자와 분자 자기조립 박막 제조에 응용하는 기술에 관하여 연구가 활발하게 진행되고 있다. 고부가가치를 부여한 고기능성 나노 입자와 분자 자기조립 박막을 응용한 기술들은 레이저 프린터용 토너, 고밀도 자기 기록 매체용 자성입자, 광자기 기록 매체, 모니터에 사용되는 미립자 형광입자 등 컴퓨터 및 정보기록 소재를 비롯하여 생명공학이나 분자전자학 분야에서의 제품 생산에 적극 검토되고 있다[21].

pH 조건에 따라 음전하 또는 양전하를 띄는 양쪽성 계면활성제(zwitterionic 혹은 amphoteric surfactant)는 피부, 눈 및 점막에 대하여 온화하며, 생분해가 높고 독성이 적으며, 강산 및 강염기 조건에서도 안정하므로 화장품, 샴푸, 목욕세제, 액체비누, 피부세정제, 화장 제거용 크림 등 다양한 분야에서 적용될 수 있다[21-28]. 또한 양쪽성 계면활성제는 수용액의 pH 조건에 따라 양이온과 비이온 혹은 음이온 계면활성제로 존재할 수 있으므로 한 분자를 가지고 세정, 유연, 대전방지, 저자극성 등의 기능을 동시에 구현하는 것이 가능하다. 이러한 복합 기능을 구현하기 위해서는 양쪽성 계면활성제의 물리적 특성을 이해하는 것이 필요하며, 특히 양쪽성 계면활성제는 피부, 눈 및 점막에 대하여 온화하며, 미생물에 의해 쉽게 분해되는 성질로 화장품, 샴푸, 목욕세제 등 다양한 분야에서 적용될 수 있어, 환경과 인체에 무해하고 자극이 적으며, 생분해성을 동시에 갖춘 제품의 개발에 관심이 집중되고 있다[21-28].

본 연구에서는 아민 옥사이드 양쪽성 계면활성제를 합성하고 ^{1}H NMR, ^{13}C NMR 및 FT-IR 분석을 통하여 구조를 규명하였으며, 계면활성제의 임계 마이셀 농도 및 표면장력 등의 계면 물성을 측정하였다. 또한 제타 전위 측정을 통하여 양쪽성 계면활성제가 양이온 계면활성제에서 음이온 계면활성제로 작용이 전환되는 등전점을 결정하였다. 이 결과를 바탕으로, 등전점을 중심으로 한 pH 변화 및 아민 옥사이드 계면활성제의 탄화수소 사슬 길이가 리포좀의 평균 입자 크기 변화 및 제타 전위 등과 같은 안정성에 미치는 영향에 살펴보았다. 또한 pH 및 계면활성제의 탄화수소 사슬 길이 변화에 따른 및 리포좀과 계면활성제의 결합 정도 및 리포좀 막의 가변형성 등의 측정을 통하여 리포좀 막의 유동성 변화에 미치는 영향을 이해하고자 하였다.

2. 실 험

2.1. 실험재료

TCI로부터 N,N-dimethyldodecylamine (> 95.0%), N,N-dimethyltetradecylamine (> 95.0%), N,N-dimethylhexadecylamine (> 98.0%) 등의 아민을 구입하여 dodecyl dimethyl amine oxide (C12AO), tetradecyl dimethyl amine oxide (C14AO), hexadecyl dimethyl amine oxide (C16AO) 등의 아민 옥사이드 계면활성제 합성에 각각 사용하였으며, 과산화수소(> 35.0%)와 에탄올(> 99.0%)은 Junsei와 Sigma-Aldrich로부터 각각 구입하여 사용하였다. 시료 제조를 위하여 사용한 물은 이온 교환 시스템과 증류를 거친 3차 증류수를 사용하였으며, 수용액의 pH 조절을 위하여 사용한 0.05 M 구연산(citric acid, $C_6H_8O_7$)과 0.1 M 제삼인산나트륨(trisodium phosphate, Na_3PO_4)은 Sigma-Aldrich로부터 구입하여 별다른 정제 과정 없이 그대로 사용하였다.

리포좀 제조에 사용된 레시틴은 Lipoid S75-3이며, 이는 hydride된 PC (phosphatidylcholine) 75%와 PI (phosphatidylinositol), PA (phosphatidic acid) 등이 25% 혼합된 레시틴을 말한다. 리포좀과 결합한 계면활성제 농도 측정을 위하여 사용한 Sephadex G-50 충진제와 cibacron brilliant red 3B-A 시약은 Sigma-Aldrich로부터 구입하여 별다른 정제과정 없이 그대로 사용하였다.

2.2. 실험 방법

2.2.1. 아민 옥사이드 계면활성제 합성

냉각기가 설치된 1 kg batch 형태의 3구 반응기에 3급 아민 30 wt%를 용매에 (C12AO와 C14AO는 증류수 사용, C16AO는 물/에탄올=3/1 혼합용매 사용) 첨가한 후 상온에서 1 h 동안 교반하였다. 교반한 용액에 35 wt% 함량 과산화수소수를 아민 기준으로 1.1 몰비 만큼 30 min 동안 적하(dropping) 투입한 후 70 ℃에서 6 h 동안 반응을 진행하였으며, 이때 용매 사용량은 용매와 과수를 합하여 질량 기준으로 전체 용액의 70%를 사용하였다.

40 ℃ 온도 조건에서 rotary evaporator를 사용하여 액상 합성물에 포함되어 있는 용매를 분리하는 과정을 거쳐서 건조된 상태의 합성물을 얻었다. 건조된 상태의 합성물을 아세톤이 담긴 2 L 플라스크에 넣고 상온에서 12 h 동안 교반한 후 5 ℃로 냉각한 상태에서 여과 과정을 진행하였다. 이와 같은 아세톤 재결정 방법을 3회 반복하여 얻은 재결정 합성물을 진공 오븐에서 24 h 동안 상온 건조하였다. 얻은 건조 합성물을 -70 ℃로 동결한 후, 동결 건조를 진행하여 최종 합성물을 얻었다. 최종 합성물은 FT-IR (Digilab, FTS-165), ^{1}H NMR 및 ^{13}C NMR 분광기(JEOLAL-400, $CDCl_3$ 용매 사용)로 구조를 분석하였다.

2.2.2. 계면 특성 측정

계면활성제 수용액의 표면장력은 DuNuoy ring tensiometer (Kruss K100, 독일)를 이용하여 평형 상태에서의 값을 측정하였다. 계면활성제의 CMC는 농도에 따른 표면장력을 측정한 결과로부터 구하였으며, 계면활성제 농도 증가에 따라 더 이상 표면장력 값이 변하지 않는 농도를 해당 계면활성제의 CMC로 결정하였다.

2.2.3. 등전점 측정

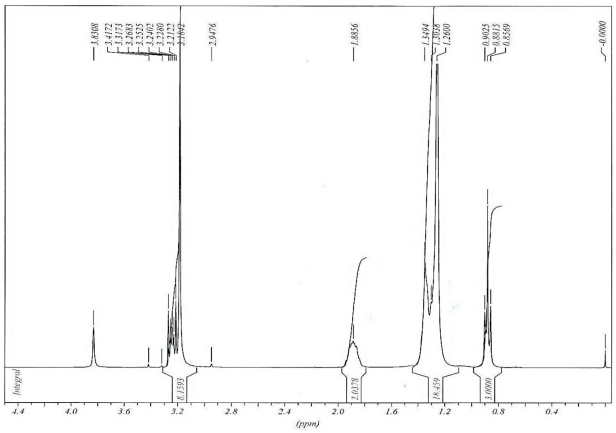
ELS-8000 (Otsuka, 일본)을 사용하여 25 ℃에서 계면활성제 수용액의 제타 전위를 측정하였으며, 계면활성제 수용액의 제타 전위가 0인 pH 값을 등전점으로 정의하였다. 이를 위하여 0.05 M 구연산과 0.1 M 제삼인산나트륨을 사용하여 다양한 pH 조건의 계면활성제 수용액을 제조하였으며, 수용액의 pH는 Mettler Toledo사의 MP230 pH meter를 사용하여 측정하였다. 동일한 조건에서 제타 전위를 2회 측정하여 그 평균값을 계면활성제 수용액의 제타 전위 값으로 결정하였다.

2.2.4. 리포좀 제조

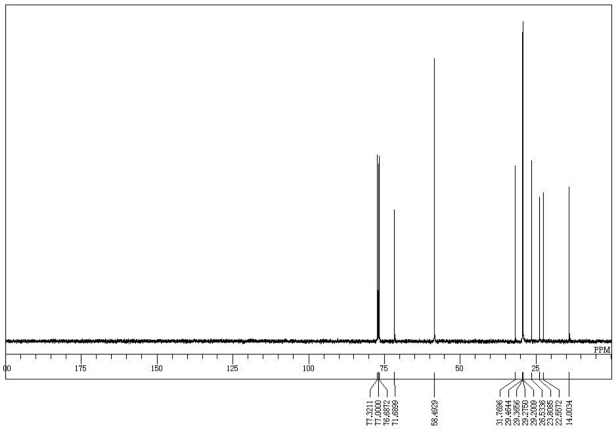
50 mg의 레시틴 Lipoid S75-3에 아민 옥사이드 계면활성제를 다양한 몰비율(1 : 0.00, 1 : 0.01, 1 : 0.02, 1 : 0.04, 1 : 0.06, 1 : 0.08)에 따라 첨가한 후 10 mL의 70 ℃의 증류수에 수화시켰다. 이후 초음파 분산기(VIBRACELL, SONICS Inc.)를 이용하여 15 min 동안 혼합물을 분산시켜 리포좀을 제조하였다. 제조한 리포좀은 25 ℃ 항온기(BOD Incubator DF-95B, 두리과학)에 보관하였다.

2.2.5. 리포좀 평균 입자 크기 및 제타 전위 측정

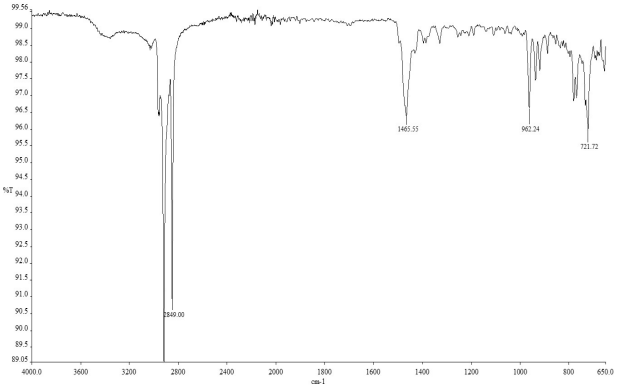
일본 OTSUKA사의 ELS-8000을 사용하여 제조된 리포좀의 입자 크기 및 표면 전하를 측정하였으며, 동일 시료에 대하여 각각 2회 측



(a)



(b)



(c)

Figure 1. Spectral data of C12AO; (a) ^{1}H NMR spectrum in $CDCl_3$, (b) ^{13}C NMR spectrum in $CDCl_3$, (c) FT-IR spectrum.

정하여 그 평균값을 구하여 결정하였다[29].

2.2.6. 리포좀과 결합한 계면활성제 농도 측정

첨가한 계면활성제가 리포좀과 결합(binding)한 양을 결정하기 위하여 겔여과 크로마토그래피(gel permeation chromatography)와 colorimetric determination 방법을 사용하였다. 겔여과 크로마토그래피 실험에서는 세파덱스 겔(Sephadex gel G-50)을 사용하여 리포좀을 포함한 용액과 리포좀이 포함되지 않은 용액으로 분리하였다. 리포좀과 결합하지 않은 아민 옥사이드 계면활성제의 농도는 colorimetric determination 방법을 이용하여 측정하였다[30]. 이를 위하여 시료 용액 0.3 mL와 cibacron brilliant red 3B-A 0.0075 wt% 용액 3 mL를 혼합한 후 30 ℃ 항온조에서 5 min간 방치한 후 UV Visible 분광광도계를 이용하여 파장 575 nm에서의 흡광도 값을 측정하여 농도를 결정하였다.

2.2.7. 리포좀 막의 Deformability 측정

pH 조건 및 첨가한 계면활성제의 소수성 차이에 따른 리포좀 막의 유동성을 평가하기 위하여 extrusion법을 이용하여 deformability D (mL/min)를 측정하였다. Extrusion 실험은 Amicon stirred cell (Millipore model 8050, USA)을 이용하였으며, 여기에 4.5 bar의 동일한 압력을 가하면서 실험을 진행하였다. 막 필터로는 제조된 리포좀 크기보다 기공 크기가 작은 50 nm의 폴리카보네이트(polycarbonate) 멤브레인 필터 페이퍼(Whatman Neclepore track-etched membranes, UK)를 사용하였고, 일정 시간 동안 막 필터를 통과한 리포좀 용액의 부피를 측정한 후 다음의 식 (1)을 이용하여 deformability D를 구하였다[31].

$$D = j \times \left(\frac{r_v}{r_p}\right)^2 \tag{1}$$

여기서, j는 일정 시간 동안 투과성 막을 통과한 리포좀의 양 (mL/min), r_v는 필터를 통과한 리포좀의 크기(nm), 그리고 r_p는 사용한 막의 기공 크기(nm)이다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 계면활성제 합성

합성한 C12AO, C14AO, C16AO 아민 옥사이드 계면활성제들의 ^{1}H NMR, ^{13}C NMR 및 FT-IR 분석 결과를 Figures 1-3에 각각 나타내었다. 아래에 나타낸 상세한 chemical shift (δ)에서 알 수 있듯이 합성한 C12AO, C14AO, C16AO 아민 옥사이드 계면활성제들의 구조를 확인할 수 있었다.

C12AO

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ : 0.85～0.90, t, 3H(-C**H**$_3$); 1.26～1.35, m, 18H(-C**H**$_2$-); 1.89, d, 2H(-C**H**2-CH$_2$-N$^+$(CH$_3$)$_2$O$^-$); 3.18～3.42, m, 8H(-C**H**$_2$-N$^+$(C**H**$_3$)$_2$O$^-$) (Figure 1(a))

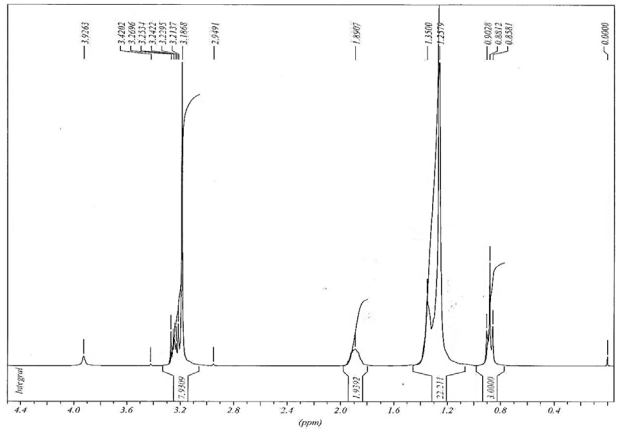
^{13}C-NMR (400 MHz, $CDCl_3$), δ : 77.32(-N$^+$(**C**H$_3$)$_2$O$^-$), 58.49(-**C**H$_2$-N$^+$(CH$_3$)$_2$O$^-$), 31.76(-**C**H$_2$-CH$_2$-CH$_3$), 29.46(-**C**H$_2$-), 29.36(**C**H2-(CH$_2$)$_3$-N$^+$(CH$_3$)$_2$O$^-$, -**C**H$_2$-(CH$_2$)$_2$-CH$_3$), 26.53(**C**H2-(CH$_2$)$_2$-N$^+$(CH$_3$)$_2$O$^-$), 23.80 (**C**H2-CH$_2$-N$^+$(CH$_3$)$_2$O$^-$), 22.56(-**C**H$_2$-CH$_3$), 14.00(-**C**H$_3$) (Figure 1(b))

IR, 2853～2957 cm^{-1} alkyl C-H stretching band, 1464～1465cm^{-1} C-H bending band, 965～962 cm^{-1} N-O stretching band (Figure 1(c))

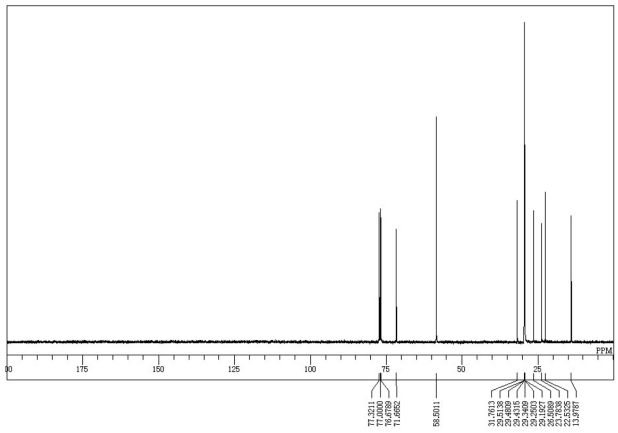
C14AO

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ : 0.85～0.90, t, 3H(-C**H**$_3$); 1.26～1.35, m, 22H(-C**H**$_2$-); 1.89, d, 2H(-C**H**2-CH$_2$-N$^+$(CH$_3$)$_2$O$^-$); 3.19～3.42, m, 8H(-C**H**$_2$-N$^+$(C**H**$_3$)$_2$O$^-$) (Figure 2(a))

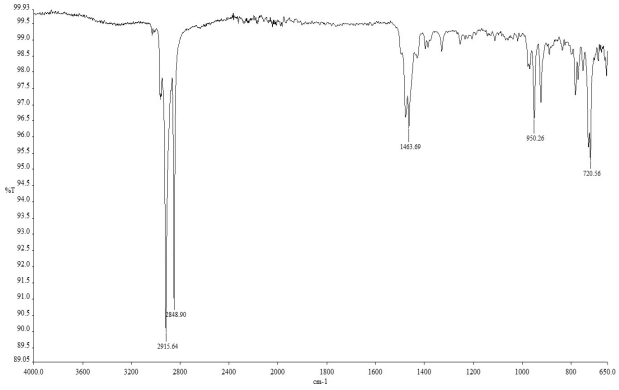
^{13}C-NMR (400 MHz, $CDCl_3$), δ : 77.32(-N$^+$(**C**H$_3$)$_2$O$^-$), 58.50(-**C**H$_2$-N$^+$(CH$_3$)$_2$O$^-$), 31.76(-**C**H$_2$-CH$_2$-CH$_3$), 29.51(-**C**H$_2$-), 29.48(**C**H2-(CH$_2$)$_3$-N$^+$(CH$_3$)$_2$O$^-$, -**C**H$_2$-(CH$_2$)$_2$-CH$_3$), 26.51(**C**H2-(CH$_2$)$_2$-N$^+$(CH$_3$)$_2$O$^-$), 23.78 (**C**H2-CH$_2$-N$^+$(CH$_3$)$_2$O$^-$), 22.53(-**C**H$_2$-CH$_3$), 13.98(-**C**H$_3$) (Figure 2(b))



(a)

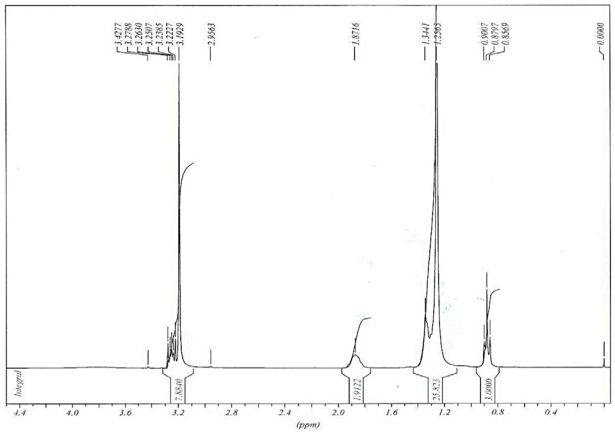


(b)

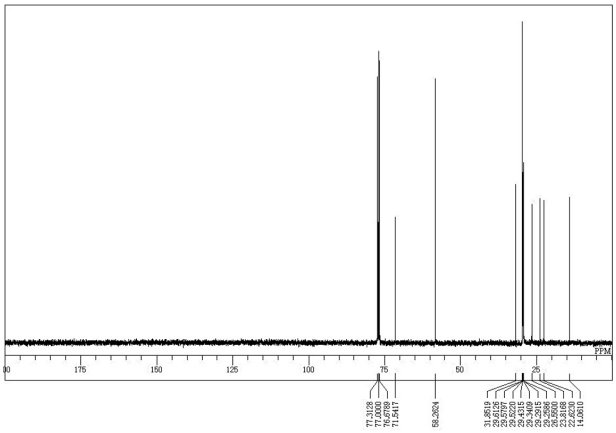


(c)

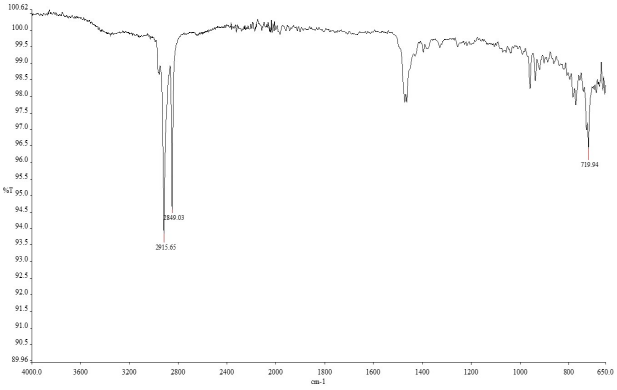
Figure 2. Spectral data of C14AO; (a) ^{1}H NMR spectrum in $CDCl_3$, (b) ^{13}C NMR spectrum in $CDCl_3$, (c) FT-IR spectrum.



(a)



(b)



(c)

Figure 3. Spectral data of C16AO; (a) ^{1}H NMR spectrum in $CDCl_3$, (b) ^{13}C NMR spectrum in $CDCl_3$, (c) FT-IR spectrum.

IR, 2848～2912 cm^{-1} alkyl C-H stretching band, 1462～1464 cm^{-1} C-H bending band, 950～951 cm^{-1} N-O stretching band (Figure 2(c))

C16AO

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ : 0.86～0.90, t, 3H(-C**H**$_3$); 1.26～1.34, m, 26H(-C**H**$_2$-); 1.87, d, 2H(-C**H**2-CH_2-$N^+(CH_3)_2O^-$); 3.19～3.43, m, 8H(-C**H**$_2$-N^+(C**H**$_3$)$_2O^-$) (Figure 3(a))

^{13}C-NMR (400 MHz, $CDCl_3$), δ : 77.31(-N^+(**C**H_3)$_2O^-$), 58.26(-**C**H_2-$N^+(CH_3)_2O^-$), 31.85(-**C**H_2-CH_2-CH_3), 29.61(-**C**H_2-), 29.58(**C**H2-$(CH_2)_3$-$N^+(CH_3)_2O^-$, -**C**H_2-$(CH_2)_2$-CH_3), 26.55(**C**H2-$(CH_2)_2$-$N^+(CH_3)_2O^-$), 23.82 (**C**H2-CH_2-$N^+(CH_3)_2O^-$), 22.62(-**C**H_2-CH_3), 14.06(-**C**H_3) (Figure 2(b)) (Figure 3(b))

IR, 2853～2957 cm^{-1} alkyl C-H stretching band, 1464～1465 cm^{-1} C-H bending band, 965～962 cm^{-1} N-O stretching band (Figure 3(c))

Table 1. Physical Properties of Amine Oxide Surfactants Measured at 25 ℃

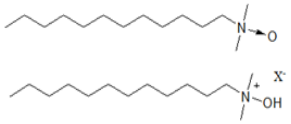
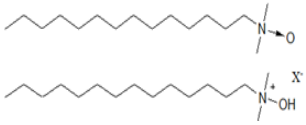
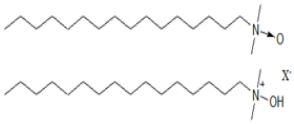
Surfactant	Structure	Amine Value (%)	Purity (%)	Molecular Formula	M.W. (g/mol)	CMC (mol/L)	Surface Tension at CMC (mN/m)	Isoelectic Point
C12AO		103	100	$C_{14}H_{31}NO$	229.41	2.50×10^{-3}	34.91	7.54
C14AO		104	98	$C_{16}H_{35}NO$	257.46	1.57×10^{-4}	33.38	7.57
C16AO		102	99	$C_{18}H_{39}NO$	285.51	9.50×10^{-5}	32.73	7.81

Table 2. Effect of Amine Oxide Surfactant on Particle Size of Liposome Prepared with Lecithin at 25 ℃

Surfactant	Molar Ratio of Lecithin to Surfactant	Particle Size (nm)		
		pH 4	pH 7.5	pH 10
C12AO	1 : 0.00	87.9 ± 0.35	87.5 ± 0.35	87.9 ± 0.35
	1 : 0.01	81.6 ± 0.78	86.9 ± 0.07	87.8 ± 0.00
	1 : 0.02	77.4 ± 0.07	85.6 ± 0.71	84.2 ± 0.28
	1 : 0.04	72.0 ± 0.57	79.4 ± 0.07	82.3 ± 0.64
	1 : 0.06	67.8 ± 0.07	78.7 ± 0.21	79.6 ± 0.49
	1 : 0.08	65.4 ± 0.21	78.7 ± 0.00	79.1 ± 0.35
	1 : 0.10	81.4 ± 0.07	77.7 ± 0.78	77.3 ± 0.28
C14AO	1 : 0.00	87.9 ± 0.35	87.5 ± 0.35	87.9 ± 0.35
	1 : 0.01	79.9 ± 0.00	82.6 ± 0.28	83.4 ± 1.13
	1 : 0.02	74.6 ± 0.07	81.2 ± 0.71	82.8 ± 0.35
	1 : 0.04	70.1 ± 0.35	79.4 ± 0.92	82.2 ± 0.99
	1 : 0.06	62.4 ± 1.56	78.1 ± 0.07	78.8 ± 0.78
	1 : 0.08	91.3 ± 0.28	77.8 ± 0.07	78.3 ± 0.07
	1 : 0.10	110.0 ± 1.13	73.6 ± 0.07	77.5 ± 0.35
C16AO	1 : 0.00	87.9 ± 0.35	87.5 ± 0.35	87.9 ± 0.35
	1 : 0.01	73.0 ± 0.21	80.8 ± 0.49	82.9 ± 1.27
	1 : 0.02	71.8 ± 0.21	79.9 ± 0.57	80.5 ± 0.14
	1 : 0.04	67.9 ± 0.35	77.0 ± 0.21	78.1 ± 0.57
	1 : 0.06	75.5 ± 0.07	75.0 ± 0.21	76.1 ± 0.14
	1 : 0.08	91.4 ± 0.35	72.2 ± 0.14	74.9 ± 0.07
	1 : 0.10	Phase Separation	Phase Separation	Phase Separation

3.2. 계면활성제 물성 측정

아민 옥사이드 계면활성제 수용액의 농도 변화에 따른 표면장력 측정 결과를 요약하여 Table 1에 나타내었다. Table 1에 나타낸 결과에서 볼 수 있듯이 탄화수소 사슬 길이가 증가함에 따라 CMC는 각각 2.50×10^{-3}, 1.57×10^{-4}, 9.50×10^{-5} mol/L로 점차 감소하였다. 또한 CMC 조건에서의 표면장력도 각각 34.91, 33.38, 32.73 mN/m로서 사슬길이 증가에 따라 감소하는 경향을 보였다. 이 결과는 동일한 친수기를 갖는 계면활성제의 탄화수소 길이가 증가할수록 계면활성제의 소수성이 증가하기 때문이다.

양쪽성 계면활성제는 등전점 이하의 pH 조건에서 양이온 계면활성제로 작용하며, 등전점 이상의 pH 조건에서는 음이온 혹은 비이온 계면활성제로 작용한다. 따라서 본 실험에서는 용액의 pH 조건에 따른 계면활성제 수용액의 제타 전위 측정을 통하여 등전점을 결정하였다. 이를 위하여 아민 옥사이드 양쪽성 계면활성제 수용액의 제타 전위를 pH 조건에 따라 측정하였으며, 그 결과를 Table 1에 나타내었다. Table 1의 결과에 나타나듯이 C12AO 계면활성제 수용액은 pH가 7.54인 조건에서 제타 전위 값이 0을 가진다. 또한 C14AO와 C16AO 계면활성제 시스템의 등전점은 각각 7.57, 7.81로 측정되었다. 이 결과는 아민 옥사이드의 등전점이 pH 8.0 이하라고 문헌에 보고된 바와 비슷한 결과이다[22-28].

Table 3. Effect of Amine Oxide Surfactant on Zeta Potential of Liposome Prepared with Lecithin at 25 ℃

Surfactant	Molar Ratio of Lecithin to Surfactant	Zeta Potential (mV)		
		pH 4	pH 7.5	pH 10
C12AO	1 : 0.00	-49.35	-51.72	-52.80
	1 : 0.02	-35.36	-51.70	-52.15
	1 : 0.04	-24.73	-47.13	-52.61
	1 : 0.06	-11.65	-41.23	-50.52
	1 : 0.08	6.08	-40.11	-48.57
C14AO	1 : 0.00	-49.35	-51.72	-52.80
	1 : 0.02	-32.21	-51.34	-51.72
	1 : 0.04	-12.66	-46.63	-52.69
	1 : 0.06	2.00	-40.07	-49.15
	1 : 0.08	14.82	-32.17	-47.17
C16AO	1 : 0.00	-49.35	-51.72	-52.80
	1 : 0.02	-28.96	-47.65	-51.85
	1 : 0.04	-9.95	-44.25	-51.43
	1 : 0.06	10.90	-33.42	-48.47
	1 : 0.08	24.94	-18.75	-43.95

3.3. 입자 크기 측정

레시틴 대비 다양한 몰비율로 아민 옥사이드 계면활성제를 첨가하여 리포좀을 제조한 후 리포좀의 평균 입자 크기를 측정하였다. 아민 옥사이드 계면활성제의 등전점 측정 결과에 따라, 등전점 이하(pH 4), 등전점 부근(pH 7.5) 그리고 등전점 이상(pH 10)의 조건에서 실험을 진행하였으며, 그 결과를 Table 2에 요약하여 나타내었다. Table 2의 결과에서 볼 수 있듯이 pH 4 조건에서는 첨가한 아민 옥사이드 계면활성제 종류에 관계없이 첨가량 증가에 따라 리포좀 입자 크기는 감소하다가 다시 증가하는 경향을 나타내었다. 예를 들어, C12AO 시스템의 경우에는 레시틴 몰대비 계면활성제를 0.08 만큼 첨가한 조건에서 리포좀이 가장 작은 크기를 나타내었으며, C14AO과 C16AO 시스템은 레시틴 몰대비 계면활성제 첨가량이 각각 0.06, 0.04 조건에서 리포좀 입자 크기가 가장 작게 나타났다. 또한 아민 옥사이드 계면활성제의 탄화수소 사슬 길이가 길어짐에 따라 리포좀 입자의 크기가 가장 작게 나타나는 몰비율 역시 작아지는 경향을 보였는데, 이는 계면활성제의 소수성이 증가할수록 리포좀 계면에 흡착하는 계면활성제 양이 증가하여 리포좀의 평균 입자 크기에 더 큰 영향을 미쳤기 때문이다. 반면에 pH 7.5와 pH 10 조건에서는 아민 옥사이드 계면활성제 첨가량 증가에 따라 리포좀 입자 크기는 감소하는 경향을 보였으며, 이는 첨가된 아민 옥사이드 계면활성제가 리포좀 막의 packing을 더 조밀하게 한 것으로 생각된다.

Table 2에 나타낸 결과에서 볼 수 있듯이 모든 pH 조건에서 소수성이 가장 큰 C16AO를 첨가한 시스템의 입자 크기가 가장 작게 측정되었다. 이는 소수성이 큰 계면활성제 첨가가 리포좀의 소수성을 증가시켜 곡률(curvature)이 큰 작은 크기의 베시클을 형성하기 때문이다. 또한 동일한 아민 옥사이드 계면활성제를 첨가한 시스템에서 pH 변화에 따른 리포좀 입자 크기를 비교하면, 일반적으로 pH 10 조건에서 가장 크며, 반면에 pH 4의 조건에서 가장 작은 것을 알 수 있다. 이는 pH 4의 조건 하에서는 음전하를 띠고 있는 리포좀 친수기 부분과 양전하를 띠는 아민 옥사이드 계면활성제 사이의 정전기적 인력(electrostatic attraction)에 의한 상호작용으로 입자 크기가 가장 작게 나타난 것으로 사료된다. 반면에 pH 10의 조건에서는 음이온을 띠는 계면활성제 첨가가 음전하를 띠고 있는 리포좀 친수기 사이의 정전기적 반발력(electrostatic repulsion)을 증가시켜 입자 크기가 가장 크게 나타난 것으로 생각된다.

3.4. 제타 전위 측정

레시틴 대비 다양한 몰비율로 아민 옥사이드 계면활성제를 첨가하여 리포좀을 제조한 후 리포좀 입자의 제타 전위를 측정하여 Table 3에 나타내었다. Table 3의 결과에서 볼 수 있듯이 계면활성제를 첨가하지 않은 순수 리포좀의 제타 전위 값은 -51.7 mV로 음전하를 띠고 있음을 알 수 있다. 아민 옥사이드 계면활성제가 양이온 계면활성제로 작용하는 pH 4의 조건에서 계면활성제 첨가에 따른 리포좀의 제타 전위 절대값은 감소하다가 등전점에서 0의 값을 갖고 이후 다시 감소하는 것을 알 수 있다. 이는 양전하를 띠고 있는 계면활성제 첨가에 따라 음전하를 띠고 있는 리포좀 입자의 표면 전하가 중화되어 음전하 값이 감소하다가 등전점을 거쳐서 표면 전하 역전(surface charge reversal)에 의해 리포좀 입자 표면의 양전하 값이 증가하기 때문이다.

반면에 pH 7.5와 pH 10 조건에서는 아민 옥사이드 계면활성제 첨가량 증가에 따라 리포좀 제타 전위는 그다지 크게 영향을 받지 않는 것을 알 수 있다. 즉, 아민 옥사이드 계면활성제의 등전점 부근인 pH 7.5 조건에서는 레시틴 대비 계면활성제를 몰비율로 0.08 만큼 첨가할 경우, C12AO는 -40.1 mV, C14AO는 -32.2 mV, 그리고 C16AO는 -18.8 mV로 각각 전이하는 결과를 보였으나 pH 4의 조건과 비교하여 계면활성제 첨가 영향이 작은 것을 알 수 있다. 또한 pH 10의 조건에서는 아민 옥사이드 계면활성제 첨가에 따른 리포좀의 제타 전위 값의 변화가 미미한 것으로 나타났다. 예를 들어 레시틴 대비 계면활성제를 몰비율로 0.08 만큼 첨가할 경우, C12AO -48.6 mV, C14AO -47.2 mV, C16AO -43.9 mV로서 계면활성제를 첨가하지 않은 리포좀 입자의 제타 전위 값과 큰 차이를 나타내지 않았다.

아민 옥사이드 계면활성제의 탄화수소 사슬 길이 변화에 따른 제타 전위 측정 결과를 비교할 경우, 계면활성제 소수기가 길어질수록 리포좀의 표면전하 변화에 미치는 영향이 크게 나타났다. 이는 아민 옥사이드 계면활성제의 소수성이 증가할수록 리포좀 계면에 흡착되는

Table 4. Effect of Amine Oxide Surfactant on Binding Efficiency Between Liposome and Surfactant at 25 ℃

Surfactant	Binding Efficiency (%)		
	pH 4	pH 7.5	pH 10
C12AO	48.2	45.1	40.4
C14AO	54.9	46.9	42.3
C16AO	67.0	54.0	47.8

Table 5. Effect of Amine Oxide Surfactant on Deformability of Liposomal Membrane at 25 ℃

Surfactant	Deformability (mL/min)		
	pH 4	pH 7.5	pH 10
C12AO	4.62	8.36	8.91
C14AO	4.32	7.72	8.55
C16AO	3.93	6.42	6.96

계면활성제가 양이 증가하기 때문이며, 이러한 결과는 입자 크기 측정과도 일치하는 것을 알 수 있다.

3.5. Binding Efficiency 측정

첨가한 아민 옥사이드 계면활성제 분자와 리포좀 사이가 결합된 정도를 측정하기 위하여 겔여과 크로마토그래피와 colorimetric determination 방법을 사용하였다. 우선 겔여과 크로마토그래피를 이용하여 리포좀과 결합하지 않은 아민 옥사이드 계면활성제를 리포좀 입자로부터 분리하였으며, 수용액 상에 존재하는 아민 옥사이드 계면활성제를 cibacron brilliant red 시료와 반응시킨 후 colorimetric method를 통하여 농도를 결정하였다. Binding efficiency는 리포좀 제조 시 첨가한 아민 옥사이드 계면활성제 대비 실제 리포좀 입자와 결합한(binding) 아민 옥사이드 계면활성제 분율로 정의하여 퍼센트로 산출하였다.

Table 4에 나타낸 결과로부터 C12AO 시스템의 리포좀에 대한 아민 옥사이드 계면활성제의 binding efficiency는 pH 4, 7.5, 10의 조건에서 각각 48.2, 45.1, 40.4%임을 알 수 있다. 이는 아민 옥사이드 양쪽성 계면활성제가 pH 4 조건에서 양이온을 띠기 때문에 비이온과 음이온 계면활성제로 각각 작용하는 pH 7.5와 10 조건과 비교하여 음전하를 띠고 있는 리포좀과 더 많이 결합한 것임을 알 수 있다. 이러한 경향은 Table 4에 나타낸 C14AO와 C16AO 시스템의 경우에도 동일함을 확인할 수 있다. 또한 동일한 pH 조건에서 첨가한 아민 옥사이드 계면활성제의 탄화수소 사슬 길이 증가에 따라 binding efficiency는 증가함을 알 수 있는데 이는 계면활성제 소수기가 증가함에 따라 리포좀 입자 계면에 흡착하는 계면활성제 양이 증가하기 때문이다. 예를 들어 pH 4 조건에서 C12AO, C14AO와 C16AO 계면활성제를 리포좀에 첨가한 경우, 계면활성제와 리포좀 입자 사이의 binding efficiency는 각각 48.2, 54.9, 67.0%를 나타내었다.

3.6. Deformability 측정

Extrusion method을 적용하여 리포좀 막의 deformability D를 측정하였으며, 그 결과를 Table 5에 나타내었다. Table 5에서 볼 수 있듯이 pH 증가에 따라 D 값은 증가함을 알 수 있다. 예를 들어 C12AO 시스템에서 pH 4, 7.5 및 10의 조건에서 D 값은 각각 4.62, 8.36, 8.91로서 pH 증가에 따라 증가하였다. 또한 Table 5에서 볼 수 있듯이 동일한 pH 조건에서 계면활성제 탄화수소 사슬 길이를 증가시킴에 따라 D 값은 감소함을 알 수 있다. 예를 들어 동일한 pH 4의 조건에서 C12AO, C14AO와 C16AO 시스템 시스템의 D 값은 각각 4.62, 4.32, 3.93으로 탄화수소 사슬 길이 증가에 따라 감소하였다.

계면활성제를 첨가하지 않은 리포좀 입자의 deformability D 값이 9.6 정도인 것과 비교하면, 아민 옥사이드 계면활성제 첨가에 따라 D 값이 감소한 것은 계면활성제 분자가 리포좀 막과 결합하여 리포좀 입자의 packing을 보다 조밀하게 한 것으로 생각할 수 있다. 특히 동일한 계면활성제 시스템에 대하여 pH 4인 조건에서 D 값이 가장 작은 것은 양이온을 띠는 계면활성제와 음전하를 띤 레시틴 사이에 정전기적 인력이 작용하여 보다 rigid한 상태의 조밀한 리포좀 막을 형성하기 때문이다. 또한 첨가한 계면활성제의 탄화수소 사슬 길이 증가에 따라 계면활성제의 소수성이 증가함에 따라 리포좀 입자 계면에 흡착하는 양이 증가하며, 이로 인하여 리포좀 막의 packing이 보다 조밀해지게 되어 D 값은 감소하게 된다. 이러한 결과들은 계면활성제 첨가에 따른 리포좀 입자 크기 및 제타 전위를 측정한 결과와도 일치하는 경향을 나타냄을 알 수 있다.

4. 결 론

본 연구에서 아민 옥사이드 양쪽성 계면활성제 첨가가 리포좀 특성에 미치는 영향에 관하여 살펴본 결과, 계면활성제 첨가량 증가에 따라 리포좀 입자 크기는 감소하였다. 이는 첨가한 아민 옥사이드 계면활성제가 레시틴 친수기 사이의 정전기적 반발력을 감소시켜 리포좀 막의 packing density를 증가시키기 때문이다. 특히 pH 4의 조건에서는 계면활성제 첨가량 증가에 따라 리포좀 입자 크기가 감소하다가 다시 증가하는데, 이는 양이온을 띤 계면활성제가 음이온을 띤 리포좀 상에 위치함에 따라 표면 전하 절대값이 감소하다가 등전점을 지난 이후에는 전하 역전에 의해 리포좀 표면이 양이온을 띠게 되면서 표면 전하 값이 계속 증가하기 때문이다. 또한 모든 pH 조건에서 첨가한 아민 옥사이드 계면활성제의 탄화수소 사슬 길이가 증가할수록 리포좀 입자 크기가 감소하며, 포면 전하 변화에 미치는 영향도 크게 나타났는데, 이는 소수성이 큰 계면활성제의 첨가가 리포좀의 소수성을 증가시켜 곡률(curvature)이 큰 베시클을 형성하기 때문이다. 이러한 pH 및 계면활성제의 탄화수소 사슬 길이 변화에 따른 리포좀 막의 packing density 변화에 미치는 결과는 및 리포좀과 계면활성제의 binding degree 및 리포좀 막의 deformability 측정 결과와도 일치함을 알 수 있다.

감 사

이 논문은 2010년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(No. 2010-0021117).

References

1. A. D. Bangham, M. M. Standish, and J. C. Watkis, Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids, *J. Mol. Biol.*, **13**, 238-252 (1965).
2. P. M. Elias and D. S. Friend, The permeability barrier in mammalian epidermis, *J. Cell Biol.*, **65**, 180-191 (1975).
3. C. D. Stubbs, T. Kouyama, K. Kinosita Jr., and A. Ikegami, Effect of double bonds on the dynamic properties of the hydrocarbon region of lecithin bilayers, *Biochemistry*, **20**, 4257-4262 (1981).
4. J. Marcelino, J. L. F. C. Lima, S. Reis, and C. Matos, Assessing the effects of surfactants on the physical properties of liposome membranes, *Chem. Phys. Lipids*, **14**, 94-103 (2007).
5. W. G. Cutler and E. Kissa, Detergency: Theory and Technology, Surfactant Science Series, 20, 1, Marcel Dekker, New York (1987).
6. A. M. Schwartz, The Physical Chemistry of Detergency ed. E. Matijevic, Surface Colloid Sci., 195, Wiley, New York (1972).
7. C. A. Miller and P. Neogi, Interfacial Phenomena: Equilibrium and Dynamic Effects, Surfactant Science Series, 17, 150, Marcel Dekker, New York (1985).
8. J. C. Lim, Phase equilibrium, dynamic behavior and detergency in systems containing hard surface soils and nonionic surfactant, *J. Kor. Ind. Eng. Chem.*, **6**, 610-617 (1995).
9. J. C. Lim, Dynamic behavior study using videomicroscopy in systems containing polar oils and nonionic surfactant, *J. Kor. Ind. Eng. Chem.*, **8**, 473-481 (1997).
10. S. K. Lee, J. W. Han, B. H. Kim, P. G. Shin, S. K. Park, and J. C. Lim, Solubilization of sulfur compounds in the diesel oil by nonionic surfactants, *J. Kor. Ind. Eng. Chem.*, **10**, 537-542 (1999).
11. H. K. Ko, B. D. Park, and J. C. Lim, Studies on phase behavior in systems containing NP-series nonionic surfactant, water, and D-limonene, *J. Kor. Ind. Eng. Chem.*, **11** 679-686 (2000).
12. J. G. Lee, S. S. Bae, I. S. Cho, S. J. Park, B. D. Park, S. K. Park, and J. C. Lim, Effect of cosurfactant on microemulsion formation and cleaning efficiency in systems containing alkyl ethoxylates nonionic surfactant, D-limonene and water, *J. Kor. Ind. Eng. Chem.*, **16**, 664-671 (2005).
13. J. G. Lee, S. S. Bae, I. S. Cho, S. J. Park, B. D. Park, S. K. Park, and J. C. Lim, Effect of solvents on phase behavior and flux removal efficiency in alkyl ethoxylates nonionic surfactant based cleaners, *J. Kor. Ind. Eng. Chem.*, **16**, 677-683 (2005).
14. J. C. Lim, Effect of cosurfactant on intermediate phase formation in systems containing alkyl ethoxylate nonionic surfactant, water and lubricant, *J. Kor. Ind. Eng. Chem.*, **16**, 778-784 (2005).
15. M. J. Bae and J. C. Lim, Solubilization mechanism of n-octane by polymeric nonionic surfactant solution, *J. Kor. Ind. Eng. Chem.*, **20**, 15-20 (2009).
16. M. J. Bae and J. C. Lim, Dynamic behavior study using videomicroscopy in systems cotaining nonpolar hydrocarbon oil and $C_{10}E_5$ nonioinc surfactant solution, *J. Kor. Ind. Eng. Chem.*, **20**, 473-478 (2009).
17. M. J. Bae and J. C. Lim, Solubilization mechanism of hydrocarbon oils by polymeric nonionic surfactant solution, *Korean Chem. Eng. Res.*, **47**, 24-30 (2009).
18. M. J. Bae and J. C. Lim, Dynamic behavior study in systems containing nonpolar hydrocarbon oil and $C_{12}E_5$ nonionic surfactant, *Korean Chem. Eng. Res.*, **47**, 46-53 (2009).
19. S. Lee, B. J. Kim, J. G. Lee, and J. C. Lim, Synthesis and characterization of interfacial properties of sorbitan laurate surfactant, *Appl. Chem. Eng.*, **22**, 37 (2011).
20. S. Lee, B. J. Kim, J. G. Lee, and J. C. Lim, A study on synthesis of glycidol based nonionic surfactant, *Appl. Chem. Eng.*, **50**, 282-291 (2012).
21. M. J. Rang, J. D. Kim, S. G. Oh, B. M. Lee, J. C. Lim, J. D. Hong, H. H. Kang, and J. G. Lee, The Recent Research Trends in Colloid and Interface Chemistry, The Korean Federation of Science and Technology Societies, 80, 45, Seoul (2007).
22. J. S. Kim, J. S. Park, and J. C. Lim, Measurement of isoelectric point of amine oxide zwitterionic surfactant by QCM(quartz crystal microbalance), *J. Kor. Ind. Eng. Chem.*, **20**, 9-14 (2009).
23. J. S. Kim, J. S. Park, and J. C. Lim, Measurement of isoelectric point of betaine zwitterionic surfactant by QCM(quartz crystal microbalance), *Korean Chem. Eng. Res.*, **47**, 31-37 (2009).
24. J. C. Lim and D. S. Han, Synthesis of dialkylamidoamine oxide surfactant and characterization of its dual function of detergency and softness, *Colloids Surf. A*, **389**, 166-174 (2011).
25. J. C. Lim, D. H Mo, J. S. Lee, J. S. Park, and D. S. Han, Measurement of an isoelectric point and softness of a EO-PO adducted zwitterionic surfactant, *Korean Chem. Eng. Res.*, **50**, 455-463 (2012).
26. J. C. Lim, J. S. Kim, D. H Mo, and J. S. Lee, Measurement of an isoelectric point and softness of a zwitterionic surfactant, *Appl. Chem. Eng.*, **23**, 112-118 (2012).
27. J. S. Kim, D. H. Mo, J. S. Lee, J. S. Park, D. S. Han, and J. C. Lim, Study on softness of an EO adducted amine oxide zwitterionic surfactant, *Korean Chem. Eng. Res.*, **50**, 960-968 (2012).
28. J. C. Lim, J. S. Park, D. S. Han, J. S. Kim, S. Lee, D. H. Mo, and J. S. Lee, A study on isoelectric point and softness of an ethylene oxide adducted amphoteric surfactant, *Appl. Chem. Eng.*, **23**, 521-528 (2012).
29. E. J. Bae, J. J. Lee, Y. H. Kim, K. H. Choi, and J. H. Yi, Sample preparation and analysis of physico-chemical properties for safety assessment of manufactured nanomaterials, *J. Korean Soc. Environ. Anal.*, **12**, 59-73 (2009).
30. R. A. A. Muzzarelli, Colorimetric determination of chitosan, *Anal. Biochem.*, **260**, 255-257 (1998).
31. B. A .I. van den Bergh, P. W. Wertz, H. E. Junginer, and J. A. Bouwstra, Elasticity of vesicles assessed by electron spin resonance, electron microscopy and extrusion measurements, *Int. J. Pharm.*, **217**, 13-24 (2001).