

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

• 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건 을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer 🖃







2018년 2월 석사학위 논문

BODIPY 유도체를 이용한 형광 자기-조립체의 합성 및 응용

조 선 대 학 교 대 학 원

화 학 과

김 보 람



BODIPY 유도체를 이용한 형광 자기-조립체의 합성 및 응용

Synthesis and application of fluorescent self-assemblies from BODIPY derivatives

2018년 2월 23일

조 선 대 학 교 대 학 원

화 학 과

김 보 람



BODIPY 유도체를 이용한 형광 자기-조립체의 합성 및 응용

지도교수 김호중

이 논문을 이학석사학위신청 논문으로 제출함.

2017년 10월

조 선 대 학 교 대 학 원

화 학 과

김 보 람





김보람의 석사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 이 범 규 (인)

위 원 조선대학교 교수 고 문 주 (인)

위 원 조선대학교 교수 김호중 (인)

2017년 10월

조 선 대 학 교 대 학 원





TABLE OF CONTENTS

TABLE OF CO	NTENTS	i
IST OF SYM	BOLS AND ABBREVIATIONS	iii
IST OF TAB	LE	iv
IST OF SCH		v
IST OF FIG		vi
	O ILO	
ABSTRACT		ix
Chapter I		1
•	duction	1 1
	iment	4
2.1.	Generals	4
2.1.	Synthesis	
	•	4
2.2.1	Synthesis of 1,3,5,7,8-pentamethyl-BODIPY (compound 1)	4
2.2.2	Synthesis of compound 2	5
2.2.3	Synthesis of compound 3	5
2.2.4	Synthesis of compound 4	6
2.2.5	Synthesis of compound 5	6
2.2.6	Synthesis of compound 6	6
2.2.7	Synthesis of compound 7	6
2.2.8	Synthesis of compound 8	7
2.2.9 2.2.10	Synthesis of compound 9	7
2.2.10	Synthesis of compound 10 Synthesis of compound 11	7 8
	ts and Discussion	9
3. Result	Measurements	9
3.1.		
	Preparation of luminogenic BODIPY derivatives	9
3.2.1	Synthesis and characterization of compounds 1~9	9
3.3	Characterization of BODIPY based-fluorescent molecules	14
3.3.1	BODIPY based-fluorescent molecules	14
	TEM images of self-assembled nano structures of AIE 1 & 3	15
	Photos of AIE 1&3 under 365 nm in different solvent	16
	AlE 1 & 3 Emission spectrum in different solution	16
	Aggregation property of AIE 3 molecule Cytotoxicity of synthesized molecules AIE 1 & 3	18 19
	PDT activity of synthesized molecules ALE 1 & 3	20
	Cell-imaging of synthesized molecules AIE 1 & 3	2
4.	Reference	22
4 . 5.	Spectrum	
J.	1LI NMD appetracease	23



Chapter II		33
1.	Introduction	33
2.	Experiment	34
2.1	Generals	34
2.2	Synthesis	34
	Synthesis of 1,3,5,7-tetramethyl-8-(4-bromophenyl)-4,	
2.2.1	4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene 1	34
2.2.2	Synthesis of compound 12 - final 11	35
2.2.2	Synthesis of compound 13	35
2.2.4	Synthesis of compound 14 - final 12	36
2.2.4	Synthesis of compound 15	36
2.2.5	Synthesis of compound 15 Synthesis of compound 16 - final 13	36
3.	Results and Discussion	37
3.1	Solid-state와 용매별 분광학적 분석	37
3.2	Preparation of luminogenic BODIPY derivatives	37
3.3	Preparation of 2 - TPA BODIPY	38
3.4	Preparation of 3 - TPA BODIPY	39
0.4	BODIPY-TPA 유도체의 광학적 성질 (UV-Vis absorption and fluorescence	33
3.5		
	spectrum)	40
4.	Conclusions	45
5.	References	46
6.	Spectrum	48
6.1	¹ H-NMR, ¹³ C-NMR spectroscopy	48
Chapter III		57
1.	Introduction	58
2.	Experiment	60
2.1	Generals	60
2.2	Synthesis	61
2.2.1	Synthesis of chitosan-IPN hydrogels functionalized with Gallic acid	61
۷.۷.۱	and Dopamine	01
2.3	DPPH radical-scavenging assay of the chitosan-IPN hydrogels	62
2.4	ABTS radical-scavenging assay of the chitosan-IPN hydrogels	62
3.	Results and discussion	63
4.	Conclusions	68
5.	References	69





LIST OF SYMBOLS AND ABBREVIATIONS

BODIPY 1,3,5,7,8-Pentamethyl-BODIPY

TBA tetrabutylammonium hydroxide

PDT photodynamic therapy

ICT Intra molecular charge transfer

DMF dimethylformamide
THF Tetrahydrofuran

EDC 1-ethyl-3-(3-dimethyl amino propyl)carbodiimide

HOBT 1-hydroxybenzotriazole hydrate

TFA trifluoroacetic acid
PEG Poly ethylene glycol

DAPI 4',6-diamidino-2-phenylindole
HEMA 2-Hydroxyl ethyl methacrylate
EGDMA ethylene glycol dimethacrylate

1-ethyl-3-(3-dimethyl amino propyl)-carbodiimide

EDC-HC1

hydrochloride

NHS N-hydroxy succinimide





LIST OF TABLES

Table 1 Characteristics of anti oxidant hydrogel





LIST OF SCHEMES

Scheme 1	Synthesis of compound 1 to 2
Scheme 2	Synthesis of compound 3
Scheme 3	Synthesis of compound 4 to 6
Scheme 4	Synthesis of compound 7 to 8
Scheme 5	Synthesis of compound 9
Scheme 6	Synthesis of compound 10 to 11
Schama 7	Synthesis of ALF 1 & 3





LIST OF FIGURES

그림 1	세포 imaging에 사용되는 BODIPY dye들
그림 2	Molecular structure of designed BODIPY; R = PEG coils
그림 3	TEM 사진. (a) AIE 1, (b) AIE 3. 수용액 (0.0001 wt%)으로 샘플을 TEM grid위에 casting 한 뒤, 최종적으로 uranyl acetate(2 wt%) 수용액으로 negative staining을 하였다.
그림 4	그림 (a)는 AIE 1, 그림 (b)는 AIE 3, 왼쪽부터 차례대로 H₂O, EtOH, THF, DCM 이다. 그림 모두 365 nm 파장 아래에서 관찰한 형광이다.
그림 5	그림 a)는 AIE 1, 그림 b)는 AIE 3이며, 용매에 따른 emission spectrum이다.
그림 6	그림 a) 왼쪽부터 1.0× 10 ⁻⁴ M, 5.0× 10 ⁻⁴ M, 2.5× 10 ⁻⁵ M, 1.25× 10 ⁻⁵ M 이다. 그림 b) 농도별 AIE 3 분자의 형광 intensity.
그림 7	AIE 1과 3의 섬유모세포에서의 세포 생존율
그림 8	AIE 1과 3의 췌장암세포에서의 PDT 실험
그림 9	AIE 3의 cell-imaging data (mouse pancreatic cancer cell); 2h incubation with 20 uM
그림 10	THF-water 비율 변화에 따른 (a) compound 11, (b) 12, (c) 13의 형광 사진. 물이 70-80 v/v‰이상 섞여 있을 때 AIEE 현상을 보여 준다.
그림 11	다양한 THF-water 비율의 용매에 녹은 compound 12의 형광 사진. fw = THF/H ₂ O, Excitation: 547 nm, 농도: 0.5uM.
그림 12	THF-water 비율에 따른 compound 12의 형광 세기 비교. fw =

	THF/H₂O, Excitation: 547 nm, 농도: 0.5uM
그림 13	실리카 나노입자에 탑재된 compound 12
그림 14	실리카 나노입자에 탑재된 compound 12로 imaging된 cell-L929.
그림 15	1,2-dihydroxy benzene의 항산화성
그림 16	Interpenetrating Polymer Network의 구성도
그림 17	(a) Schematic diagram for the fabrication of chitosan-IPN hydrogels functionalized with polyphenols. (b) Photograph of the fabricated antioxidant hydrogel
그림 18	Transmission spectra of the antioxidant hydrogels
그림 19	Absorbance spectra of the prepared chitosan-IPN hydrogels functionalized with gallic acid. Inset image displays the calibration curve obtained using five varying concentrations of gallic acid in aqueous solution
그림 20	Absorbance spectra of the prepared chitosan-IPN hydrogels functionalized with dopamine. Inset image displays the calibration curve obtained using five varying concentrations of dopamine in aqueous solution
그림 21	Radical scavenging capacity of the fabricated antioxidant chitosan-IPN hydrogels against DPPH free radicals. The amount of ascorbic acid is 0.85 umol. Legend: 1 = Low-SCS-H; 2 = High-SCS-H; 3 = Do-Low-SCS; 4 = Do-High-SCS; 5 = GA-Low-SCS; 6 = GA-High-SCS; 7 = ascorbic acid
그림 22	Radical scavenging capacity of the fabricated antioxidant chitosan-IPN hydrogels against ABTS free radicals. The amount of ascorbic acid is 0.85 umol. Legend: 1 = Low-SCS-H; 2 =





```
High-SCS-H; 3 = Do-Low-SCS; 4 = Do-High-SCS; 5 = GA-Low-SCS; 6
                  = GA-High-SCS; 7 = ascorbic acid
Figure 23
                  <sup>1</sup>H-NMR spectra of compound 1.
Figure 24
                   <sup>1</sup>H-NMR spectra of compound 2.
                   <sup>1</sup>H-NMR spectra of compound 3.
Figure 25
Figure 26
                   <sup>1</sup>H-NMR spectra of compound 4.
Figure 27
                   <sup>1</sup>H-NMR spectra of compound 6.
Figure 28
                   <sup>1</sup>H-NMR spectra of compound 8.
                   <sup>1</sup>H-NMR spectra of compound 9.
Figure 29
                   <sup>1</sup>H-NMR spectra of compound 10.
Figure 30
                   <sup>1</sup>H-NMR spectra of final 1.
Figure 31
Figure 32
                   <sup>1</sup>H-NMR spectra of final 3.
Figure 33
                   <sup>1</sup>H-NMR spectra of compound 11.
Figure 34
                   <sup>1</sup>H-NMR spectra of compound 13.
Figure 35
                   <sup>1</sup>H-NMR spectra of compound 15.
Figure 36
                   <sup>1</sup>H-NMR spectra of compound 16.
Figure 37
                   <sup>1</sup>H-NMR spectra of final 11.
Figure 38
                   <sup>13</sup>C-NMR spectra of final 11.
Figure 39
                   <sup>1</sup>H-NMR spectra of final 12.
                   <sup>13</sup>C-NMR spectra of final 12.
Figure 40
Figure 41
                   <sup>13</sup>C-NMR spectra of final 13.
```





ABSTRACT

Synthesis and application of fluorescent self-assemblies from BODIPY derivatives

Kim Bo Ram

Advisor: Prof. Kim, Ho-Joong, Ph.D,

Department of Chemistry,

Graduate School of Chosun University

Boron-dipyrromethene (BODIPY) derivatives have been widely used as bright fluorescent dyes for cellular imaging due to their remarkable photophysical properties, such as excellent photostability, large extinction coefficients and high fluorescent quantum vields. Recent improvements in functionalization methods for BODIPY has allowed fine-tuning of the photophysical properties of the chromophore and brought great research interest in BODIPYs for diverse fields, such as photosensitizers and fluorescent organic devices. We synthesized aqueous self-assemblies with nano-size from amphiphilic BODIPY derivatives. The amphiphilic BODIPY molecules consisting of a hydrophobic aromatic segment and hydrophilic coils, self-assembled into micellar nanostructures. The BODIPY derivatives could be used as photodynamic therapy and bio-imaging agents.





Chapter I

1. Introduction

Pyrene이나 perylene과 같은 방향족 분자들이 고농도의 용액 상에서 sandwich형 태의 excimer 형성으로 인한 emission-quenching 현상을 보인다는 연구가 50년 전 보고된 이래로, 발광성 방향족 분자들의 고체상이나 aggregation 및 crystallization으로 인한 발광 효율의 저하는 이들 발광성 방향 족 분자들의 분광학적 응용을 어렵게 만들었다.¹이러한 concentration- quenching 혹은 aggregation-guenching 효과를 극복하고 유기 발색단의 높은 발광 효율을 유 지하기 위한 여러 가지 방법들이 제안되었다. 2 발광성 organic dve 제조에 있어서 방향족 분자간의 응집을 방지하기 위한 bulky한 dendrimer나 긴 사슬들을 연결하 여 방향족 분자들의 응집 없이 독립적으로 isolation시켜 발광효율이 높은 필름이 나 광학재료의 제조에 적용되기도 하였다. 생물학 분야에서는 방향족으로 이루어 진 유기분자들은 cell-imaging에서 많이 사용되고 있으며, 응집을 방지하기 위하 여 저 농도의 수용액 상에서 isolation된 상태의 분자를 얻어 cell-imaging에 사 용하였지만. 농도 저하에 따른 emission 세기 감소와 낮은 감도 등의 이유로 정확 하고 민감한 분석에 어려움을 겪고 있다.3 이러한 유기발광 분자의 대안으로 사용 되는 중금속의 발광성 quantum dot의 경우에는 높은 독성으로 인해 생체 내 응용 은 한계가 있다.

이를 극복하기 위하여 고농도에서 응집된 상태임에도 불구하고 강한 발광 효율을 보이는 생체 친화적 유기발광소재의 개발에 대한 연구는 산업 및 학문 특히, 바이오-재료-화학 융합 분야에서 많은 주목을 받고 있다. 4 강한 형광을 내는 방향족 발색단을 프로펠러 혹은 굽은 형태 같은 입체 중심체에 단일결합으로 연결된다면, 발색단들의 분자 내 rotation으로 인한 운동에너지 방출로 인해 형광이 약화된다. 5 이들 분자들이 용매 제거 후 응집하게 될 경우 분자 내 rotation이 방지되어 형광세기가 증가하게 된다. 또한 방향족 발색단들은 평면으로 강하게 겹쳐지지 않아 응집된 후에도 강한 형광을 나타나게 된다. 4.6 이를 응집유도형광증가 (Aggregation





induced emission enhancement; AIEE)라고 한다.

본 연구에서는 boron dipyrromethene (BODIPY) species를 이용하였다. BODIPY 유도체는 높은 몰 흡광 계수, 높은 양자 효율, 장파장 영역에서의 emission 방출 그리고 외부 환경에 대한 높은 안정성을 갖고 있다 (그림 1). 하지만 BODIPY 발색단은 수용액에 대한 용해도가 매우 낮아서, 생체에 적용하기 쉽지 않다. 그래서 발색단에 친수성을 가진 poly ethylene glycol(PEG) 사슬을 도입하였다. ⁸ 즉, BODIPY 발색단 좌우에 AIEE를 유도하는 cyano stilbene unit을 도입하였고, 양쪽 끝에는 친수성의 PEG를 연결하여, ABA type의 양친매성 분자를 합성하였다⁹ (그림 2).

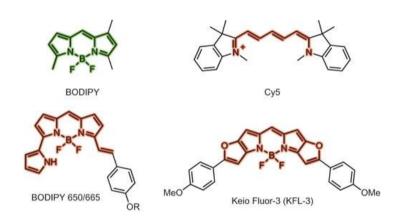


그림 1. 세포 imaging에 사용되는 상용화된 BODIPY dye들.





R: poly ethylene glycol

그림 2. Molecular structure of designed BODIPY derivative; R = PEG coils





2. Experiment

2.1. Generals

본 실험에서 일반적인 반응들은 아르고 기체 하에서 진행되었다. 2,4-dimethyl pyrrole 97 %, boron triflouroride diethyletherate, poly(ethylene glycol)meth yl ether MW 550, triethylene glycol monomethyl ether, iodine, iodic acid, trifluoroactic acid, tetrabutyl ammonium hydroxide solution 등을 Sigma aldrich 에서 구매하였고, tetrakis(triphenylphosphine)-palladium (0), acetyl chloride 는 TCI, 4-bromophenylacetonitrile 97 %, 4-bromobenz aldehyde 98+ %, 4-(amino methyl)benzene boronic acid hydrochloride 96 %, 4-bromo benzene boronic acid 97+ %, 4-formylbenzene boronic acid pinacol, 4-(diphenylamino)benzeneboronic acid pinacol은 Alfa Aesar에서 구입했으며, magnesium sulfate anhydrous는 DAEJ UNG에서 구입하여 실험을 진행하였다.

화합물의 구조 분석은 Bruker AC - 300 MHz spectrometer (¹H-NMR, 300.1 MHz 과 ¹³C-NMR 75 MHz) 을 이용하여 얻었으며, NMR 용매 chloroform-d는 Cambridge Is otope laboratories, Inc에서 구매하였고 정제 없이 사용하였다. NMR peak의 화학적 이동은 part per million (δ ppm)으로 얻었다.

2.2. Synthesis

2.2.1 Synthesis of 1,3,5,7,8-pentamethyl-BODIPY (compound 1)

2,4-Dimethyl pyrrole (5 g, 0.052 mol)을 아르곤 가스 하에서 dried dichloromethane (150 mL)가 담긴 둥근 바닥 플라스크에 첨가하고 교반하는 상태에서 acetylchloride (2.09 g, 0.026 mol)를 유리주사기를 사용하여 천천히 주입하였다. 그리고 50 ℃에서 2시간 환류 시켰다. 2시간 후 상온까지 식혀준 후용매를 제거하고 한 시간 가량 진공처리 후 anhydrous toluene 80 mL와 dried





dichloromethane 15 mL를 주입하였다. Ice bath에 옮겨 혼합물의 온도를 상온으로 떨어트린 후 천천히 triethylamine (13 mL) 첨가하였다. 15분 교반 후 연속적으로 boron trifluoride diethyl etherate (12 mL)를 천천히 첨가한 후 ice bath를 제거하고, 상온에서 5시간 교반을 유지하였다.

반응 종료 후, 용매를 제거하고 dichloromethane와 증류수를 사용하여 3번 추출하고 유기용매 층을 모아 용매를 제거 하였다. 깨끗한 compound를 얻기 위하여 dichloromethane: hexane = 1:2 용매 조건을 통해 컬럼 크로마토그래피를 사용해깨끗이 분리하였다.

합성된 compound의 결과는 ¹H-NMR spectroscopy를 이용하여 확인하였다.

2.2.2 Synthesis of compound 2

2,4-Dimethyl bodipy (1 g, 3.8 mmol)을 dried dichloromethane 60 mL에 아르고 가스 하에서 완전히 녹인 후, N-bromosuccinimide (1.43 g, 8.01 mmol)을 넣고, 상온에서 5시간 동안 교반하였다. 반응 종료 후, Na₂S₂O₃ 포화 수용액과 dichloromethane으로 3번 추출 하여 유기용매 층을 모으고, MgSO₄를 이용해 물을 먼저 제거하고, 그 후 유기용매를 제거하였다. 얻어진 고체 compound 2는 hexane 을 사용해 재결정을 수행하여 빨간색 고체 화합물을 얻었다.

2.2.3. Preparation of compound 3

compound 2(0.8 g, 1.90 mmol)과 4-formlyphenyl boronic acid (1.09 g, 4.38 mmol)을 250 mL 둥근 바닥 플라스크에 넣은 후, solvent tetrahydrofuran에 녹여, 물 15 mL를 첨가하였다. 그리고 교반을 유지하면서, 2 M K₂CO₃ 5 mL 넣고 30 분간 상온에서 교반한 후 촉매인 팔라듐 30 mg을 넣고, 75 ℃로 8시간 환류 시켰다. 반응 후 용매 tetrahydrofuran를 최대한 제거하고 유기 용매 dichloromethane와 증류수로 3번 추출하였다. 추출 후 컬럼 크로마토크래피를 통해 깨끗한 자주색 결정을 얻었다.





2.2.4. Preparation of compound 4

gallic acid (4 g, 23 mmol)을 100 mL 둥근 바닥 플라스크에 담은 후, distilled ethanol에 완전히 녹였다. 교반을 유지하며 촉매로 사용될 황산을 과량으로 천천히 첨가하였다. 그리고 80 ℃에서 5시간 환류 시켰다.

반응 종류 후 용매로 사용된 ethanol을 완전히 제거한 다음 dichloromethane와 증류수를 이용해 3번 추출하였다.

유기 용매 층을 따로 모아 $MgSO_4$ 로 물을 제거한 다음 유기용매 dichloromethane를 제거하여 하얀색 고체를 얻었다.

2.2.5. Preparation of compound 5

Ester gallic acid (1.00 g, 5.0 mmol)을 anhydrous dimethylformamide에 완전히 녹인 후 tosylated triethylene glycol을 첨가하였다. 그리고 연이어 K₂CO₃ (3.48 g, 25.0 mmol) 넣어주고, 75 ℃에서 12시간 환류 시켰다. 반응 종결 후 용매 dimethylformamide를 진공 증류로 완전히 제거하고 컬럼 크로마토그래피로 깨끗하게 얻었다.

2.2.6. Preparation of compound 6

Triethylene glycol (1.88 g, 3.0 mmol) 을 150 mL 둥근 바닥 플라스크에 담고 ethanol 40 mL 첨가하였다. triethyllene glycol이 ethanol과 잘 섞이게 교반하였다. 그리고 NaOH (0.47 g, 12 mmol)을 증류수 10 mL에 녹여서 천천히 첨가하고 70 ℃에서 5시간 환류 시켰다. 반응 후 용매 ethanol을 제거하고 dichloromethane와 묽은 염산 수용액을 사용하여 추출하였다. 유기용매 층을 모으고 용매를 제거 하였다.

2.2.7. Preparation of compound 7

Methyl 4-hydroxy benzoate (1.08g, 6.5mmol)을 150 mL 둥근 바닥 플라스크에





넣은 후, anhydrous dimethylformamide 40 mL를 첨가하였다. 그 후, tosylated polyethyleneglycol (0.22 g, 5.0 mmol)을 더하였다. 그리고 물에 K₂CO₃ (3.45 g, 25 mmol)을 첨가 후, 9시간 동안 75 ℃에서 환류 시켰다. 반응 종료 후 dimethylformamide 용매를 진공 증류 방법을 사용하여 제거 하였다. 그 다음 dichloromethane와 증류수로 추출을 3번 반복하였다. 화합물을 깨끗이 분리하기 위하여 dichloromethane: methanol = 1 : 30 비율인 전개액을 사용한 컬럼 크로 마토그래피를 진행하였다.

2.2.8. Preparation of compound 8

100 mL 둥근 바닥 플라스크에 compound 7 (1.4 g, 1.9 mmol)과 NaOH (0.30 g, 7.5 mmol)을 넣고, ethanol : water = 4 : 1 비율로 첨가하였다. 그리고 70 ℃에서 5시간 환류 시켰다. 반응 종류 후, 용매 ethanol을 제거한 후 증류수와 dichloromethane 추출을 진행하였다.

2.2.9. Preparation of compound 9

4-Boromophenyl acetonitrile (0.59 g, 3.0 mmol)과 4-(aminomethyl)benzeneb oronic aicd (0.51 g, 2.7 mmol)을 150 mL 둥근 바닥 플라스크에 담고 solvent tetrahydrofuran으로 녹였다. 혼합물이 다 녹으면 K₂CO₃ 2 M, 5 mL를 더 해주고 30 분간 교반을 유지하였다. 30분 후 촉매 Pd(pph₃)₄ 30 mg을 넣고, 75 ℃에서 12시간 환류 시켰다. 반응 후 tetrahydrofuran을 제거하고 dichloromethane과 증류수로 추출을 3번 반복하였다. 유기 용매 층을 따로 모으고 남아있는 물을 MgSO₄로 제거하였다. 얻어진 compound 9를 컬럼 크로마토그래피를 이용해 깨끗하게 분리하였다.

2.2.10. Preparation of compound 10

미리 만들어둔 dialdehydephenyl bodipy를 50 mL 둥근 바닥 플라스크에 넣고, 합성된 PEG (Mw 550)도 함께 넣어주었다. 그리고 둥근 바닥 플라스크를 진공 상태





로 만든 후, 아르곤으로 치환하였다. 그리고 anhydrous tetrahydrofuran, t-butanol을 5 mL 씩 각각 취하여 첨가 하였다. 50 ℃에서 10분간 교반 후 TBA 0.5 mL 을 주사기를 이용하여 첨가하였다. 그리고 2시간 동안 50 ℃에서 교반하였다. 반응 종료 후 용매를 제거한 다음, 컬럼 크로마토그래피 방법으로 깨끗이 분리하였다. TBA를 제거하기 위해 3일간 증류수로 투석 하였다.

2.2.11. Preparation of compound 11

150 mL 둥근 바닥 플라스크에 cyano aminebenzen (0.53 g, 2.4 mmol)을 넣고, 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (0.50 g, 2.6 mmol), 1-hydrox ybenzotriazole hydrate (0.35 g, 2.6 mmol)을 차례대로 첨가하였다.

작은 vial에 triethylene glycol (1.24 g, 2.0 mmol) 무게를 재고 dimethylformamide로 희석하면서 둥근 바닥 플라스크에 이동시켰다. 그리고 triethylamine (0.50 g, 5.0 mmol)을 첨가 하였다. dimethylformamide를 총 40 mL을 첨가하였고 상온에서 24시간 교반하였다. 교반 후 dimethylformamide를 진공 증류 방법으로 제거하였다. 그 다음 컬럼 크로마토그래피를 통해 깨끗이 분리하였다.





3. Results and Discussion

3.1. measurements

¹H-NMR과 ¹³C- NMR데이터는 Bruker AC-300 MHz spectrometer를 통해 얻었다.

3.2. Preparation of BODIPY derivatives of luminogenic molecules

BODIPY 유도체를 이용한 광발광성 분자의 합성 경로는 아래 Scheme 1에 나타냈다. 형광 분자를 합성하는데 필요한 전구체인 4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (BODIPY)는 출발물질인 2,4-dimethylpyrrole 과 acetyl chloride를 사용하여 합성 하였으며, 또한 아마이드 결합으로 합성된 polyethylene glycol을 공유결합으로 연결 했고, 얻어진 화합물은 ¹H-NWR Spectoscopy로 반응 여부를 확인하였다. 물에 녹는 형광 분자는 고체와 액정 형태의 크리스탈결정체를 구성하며, 용매 용해도에 따른 Intra molecular charge transfer (ICT)를 확인 했으며, 또한 췌장암 세포에 대한 PDT 실험을 진행 하였다. 또한 세포생존률과 세포에 대한 독성 그리고 세포 이미징 효율을 확인 하였다.

3.2.1 Synthesis and characterization of compound 1~9

BODIPY 를 합성하기 위하여 acetyl chloride와 2,4-dimethylpyrrole을 사용했으며, 화학반응식은 scheme 1에 나타냈다.





< compound 1& 2 >

Scheme 1. Synthesis of compound 1 to 2

합성된 compound 1의 수득률은 29 % 이었다. ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 6.06 (s, 2H), 2.59 (s, 3H), 2.55 (s, 6H), 2.42 (s, 6H). compound 1 은 1당량, N-bromosuccimide 2.3당량을 사용하여 브로민화 반응으로 합성하였다. 합성된 compound 2의 수득률은 78 %이었다. ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 2.63 (s, 3H), 2.56 (s, 6H), 2.43 (s, 6H).

< compound 3 >

Scheme 2. Synthesis of compound 3.



위의 방법으로 합성된 compound 3의 수득률은 85 % 이었다.

 1 H-NMR (300 MHz, CDCI $_{3}$): δ 10.09 (s, 2H), 8.01 (d, 4H), 7.45 (d, 4H), 2.77 (s, 3H), 2.54 (s, 6H), 2.40 (s, 6H).

< compound 4 to 6 >

Scheme 3. Synthesis of compound 4 to 6.

compound 3 에 공유결합으로 붙일 각각 다른 작용기 합성을 위해 먼저 gallic a cid의 에스테르화 하였다.

합성된 compound 4의 수득률은 98 %이었고, ¹H-NMR을 통해 확인하였다.

compound 4 : $^{1}\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCI $_{3}$): δ 6.94 (s, 2H), 4.23-4.15 (m, 2H





), 1.24 (m, 3H). compound 6 : 1 H-NMR (300 MHz, CDCI $_{3}$): δ 7.36 (s, 2H), 4.25-4.20 (m, 6H), 3.74 (m, 32H), 3.38 (s, 9H).

< compound 7 to 8 >

Scheme 4. Synthesis of compound 7 to 8.

Methyl 4-hydroxybenzoate 1 당량과 tosylated polyethylenglcol 1.2당량의 비율로 합성하였다. compound 7의 수득률은 89 %이었다. compound 8은 compound 6과같은 방법으로 실험 진행하였다. ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 4.18 (s, 2H), 3.78-3.58 (m, 5H), 3.39 (s, 3H).

< compound 9 >

$$\mathsf{NC} \xrightarrow{\mathsf{Br}} \overset{\mathsf{H}_2\mathsf{N}}{\overset{\mathsf{H}_2\mathsf{NOH}}{\mathsf{Pd}(\mathsf{pph}_3)_4}} \mathsf{NC} \xrightarrow{\mathsf{NH}_2} \mathsf{NH}_2$$

Scheme 5. Synthesis of compound 9.



4-bromophenyl acetonitrile 1.1 당량과 4-(aminomethyl)benzeneboronic acid 1 당량의 비율로, suzuki coupling reaction 반응을 수행하였다. 다음 합성을 Sche me 5에 나타내었다. compound 9의 수득률은 54 % 이었다. ¹H-NMR (300 MHz, CDC l₃): δ 7.62 (m, 4H), 7.42 (d, 4H), 3.93 (s, 2H), 3.49 (s, 2H).

< compound 10 to 11 >

Scheme 6. Synthesis of compound 10 to 11.

Reaction condition (a): triethylamine, EDC, HOBT, DMF, rt.





<compound AIE 1 and AIE 3 >

$$\bigcap_{R} \bigcap_{N \in \mathbb{N}} \bigcap_{N \in \mathbb{N$$

AIE 1 : R = R1, AIE 3 : R = R3

Scheme 7. Synthesis of AIE 1 & 3.

각각 합성된 화합물을 PEG 가지 개수에 따라서 AIE 1 그리고 AIE 3으로 명칭 하였다.

3.3. Characterization of BODIPY based-fluorescent molecules

3.3.1 BODIPY based-fluorescent molecules

Transmission electron microscopy (TEM)를 이용하여 수용액 상에서 각 AIE 1과 3은 지름 약 20-30 nm 크기의 micelle을 형성하는 것을 확인하였다. 지름은 compound가 수평으로 확장된 길이와 같으므로, 수용액상에서 ABA-type의 양친매성





분자가, 내부는 소수성의 BODIPY과 cyano stilbene unit이 차지하며, 물과 접하는 외부는 친수성의 PEG-coil로 둘러 쌓여있음을 예상할 수 있었다 (그림 3a에 삽입). 또한 샘플들이 dry한 상태에서 TEM grid 위에 나노구조체로 형성된 것인지확인하기 위해서 수용액 상에서의 dynamic light scattering (DLS) 실험을 진행하였다. DLS data를 통하여 응집체의 크기가 TEM 결과와 유사하게 20-30 nm인 것을 확인하였다.

3.3.1.1 TEM images of self-assembled nano structures from AIE 1 & 3

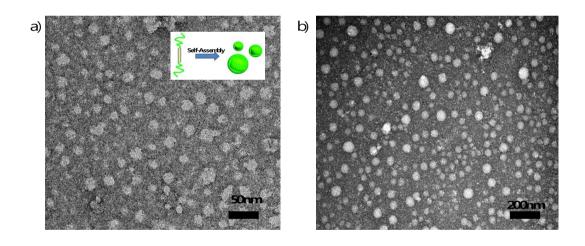


그림 3. TEM 사진. (a) AIE 1, (b) AIE 3. 수용액 (0.0001 wt%)으로 샘플을 TEM grid위에 casting 한 뒤, 최종적으로 uranyl acetate(2 wt%) 수용액으로 negative staining을 하였다.





3.3.1.2 Photos of AIE 1&3 under 365 nm in different solvent

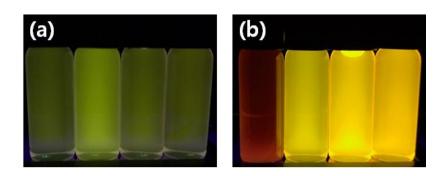
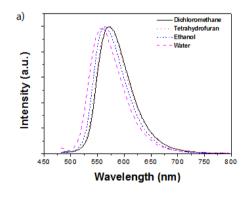


그림 4. 그림 (a)는 AIE 1, 그림 (b)는 AIE 3, 왼쪽부터 차례대로 H₂O, Ethanol, THF, DCM 이다. 그림 모두 365 nm 파장 아래에서 관찰한 형광이다.

3.3.1.3 Emission spectrum of AIE 1 & 3 in different solution



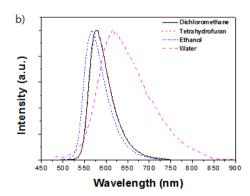






그림 5. 그림 a)는 AIE 1, 그림 b)는 AIE 3이며, 용매에 따른 emission spectrum이다.

그림 5를 통해 AIE 1과 AIE 3은 용매 물에서 각각 다른 파장이동이 있음을 확인할 수 있었다. AIE 1은 유기용매와 비교하여 물에서는 단파장 이동이 일어났으며, 단파장이동은 H-aggregation ($90^{\circ} > \theta > 54.7^{\circ}$)의 특징 중 하나이다. face to face로 $\pi-\pi$ stacking 상태에서 빛에너지를 받아 들뜬 상태가 되면, 평행상태인 dipole은 서로 밀어내어 높은 에너지 상태가 되어 그 결과 단파장 이동이 일어난다. 대조적으로 AIE 3은 end to end인 stacking 형태로 유기용매와 비교하여 물에서는 J-aggregation($54.7^{\circ} > \theta > 0^{\circ}$) 장파장 이동을 확인 할 수 있었다. 10





3.3.1.4 aggregation property of AIE 3 molecule

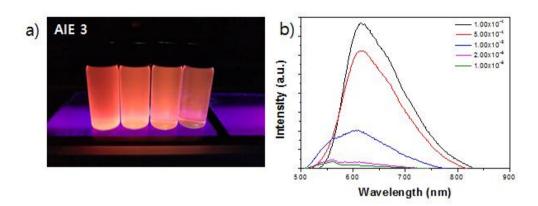


그림 6. 그림 a) 왼쪽부터 1.0× 10⁻⁴M, 5.0× 10⁻⁴M, 2.5× 10⁻⁵M, 1.25× 10⁻⁵M 이다. 그림 b) 농도별 AIE 3 분자의 형광 intensity.

일반 형광 유기 분자들은 응집이 일어남에 따라 형광이 소멸하는 ACQ 현상이 일어 난다. 하지만 그림 6의 b) emission spectrum에서 오히려 형광 intensity 세기가 강해졌으며, 이를 통해 AIE 3의 분자가 Aggregation induced emission 효과를 나 타냄을 알 수 있었다.





3.3.1.5 Cytotoxicity of synthesized molecules AIE 1 & 3

140 ■ AIE -1 ■ AIE -3 120 Cell viability (% of control) 100 80 60 40 20 0 0.625 1.25 5 10 Contrations (ug/ml)

Cytotoxicity of AIE-1 & -3 in L-929 (fibroblast) cells

그림 7. AIE 1과 3의 섬유모세포에서의 세포 생존율





3.3.1.6 PDT activity of synthesized molecules AIE 1 & 3

PDT condition: LED (500nm), 8mW for 5min cell concentrations: 1.5x105 cells/ml

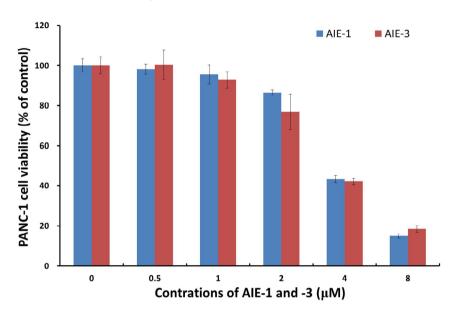


그림 8. AIE 1과 3의 췌장암세포에서의 PDT 실험

췌장암세포에서의 분자1과 3을 이용한 photodynamic therapy (PDT) 실험을 수행하였다. PDT 조건은 5분 동안 LED (500 nm)를 8 mW의 세기로 조사 했으며, AIE 1 과 3의 농도가 높아질수록 췌장암 세포의 생존률이 감소하였다. 췌장암세포에 빛을 조사 시 암세포의 생존률이 급감함을 확인하였고, 췌장암세포에 대한 PDT의효과가 있음을 확인하였다.





3.3.1.7 Cell-imaging of synthesized molecules AIE 1 & 3

양친매성의 AIE 3을 mouse pancreatic cancer cell에서 20 uM 농도로 2시간 incubation 시켰을 경우, 그림 9의 세포-이미징을 확인 할 수 있었다. 합성된 나노응집체의 외부는 중성이며 친수성인 PEG 로 둘러 쌓여있다. 친수성 PEG 는 cell-penetrating 기능이 있는 것으로 잘 알려져 있다. 그리고 나노응집체는 세포막 통과가 매우 잘되어 세포질을 균일하게 이미징 할 수 있으며, 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)로 파랗게 염색된 핵과 차별되어 세포질에 붉은 염색이 가능하다. 그 결과 세포-이미징에 적용 가능함을 예상 할 수 있었다.

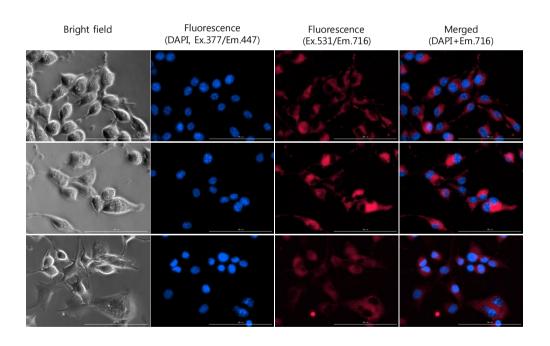


그림 9. AIE 3의 cell-imaging data (mouse pancreatic cancer cell); 2h incubation with 20 uM





4. References

- [1] X. Zhang, D. Gorl, V. Stepanenko, and F. Wurthner. Angew. Chem., 2014, 126, 1294-1298.
- [2] S. Zhu, J. Zhang, J. Janjanam, J. Bi, G. Vegesna, A. Tiwari, F. T. Luo, J. Wei and H. Liu. Analyica Chimica Acta., 758(2013) 138-144.
- [3] X. Liu, B. Chen, X. Li, L. Zhang, Y. Xu, Z.Liu, Z.Cheng and X.Zhu, Nanoscale., 16399, 7 (2015).
- [4] S. G. Awuah and Y. You. RSC., 2012, 2,11169-11183.
- [5] H. J. Kim, S. K. Kang, Y. K. Lee, C. Seok, J. K. Lee, W. C. Zin and M. Lee. Angew. Chem., 2010, 49, 8471-8475.
- [6] R. Hu, E. Lager, A. A. Aguilar, J. Liu, J. W. Y. Lam, H. H. Y. Sung, I.D. Williams, Y. Zhong, K. S. Wong, E. P. Cabrera and B. Z. Tang. J. Pys. Chem., 2009, 113, 15845-15853.
- [7] X. Zhang, M. Liu, B. Yang, X. Zhang, Z. Chi, S. Liu, J. Xu and Y. Wei. Polym. Chem., 2013, 4, 5060.
- [8] X. Zhang, Z. Chen and F. Wurthner. J. AM. Chem. SOC., 2007, 129, 4886-4887.
- [9] T. Hirose and K. Matsuda, Chem. Commun., 5832-5834, 0 (2009).
- [10] D. Zhai, W. Xu, L. Zhang and Y. T. Chang. Chem. Soc. Rev., 2014, 43, 2402-2411.





5. Spectrum

5.1. ¹H-NMR spectroscopy

Figure 23. ¹H-NMR spectra of compound 1.

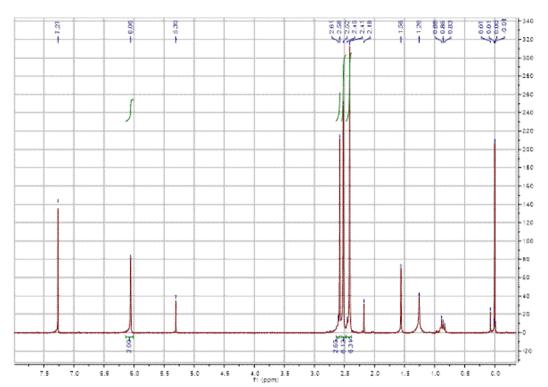




Figure 24. ¹H-NMR spectra of compound 2.

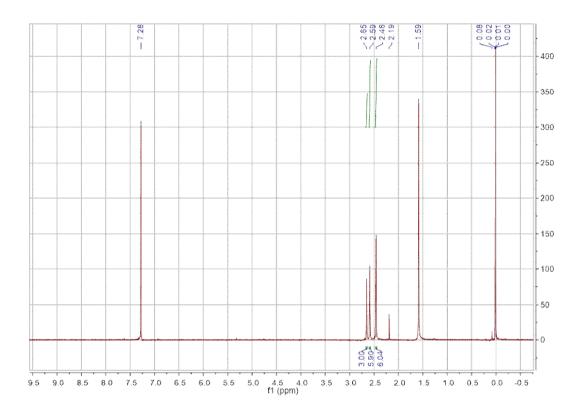






Figure 25. ¹H-NMR spectra of compound 3.

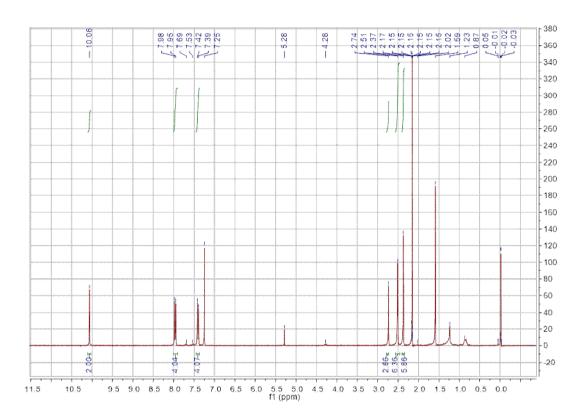
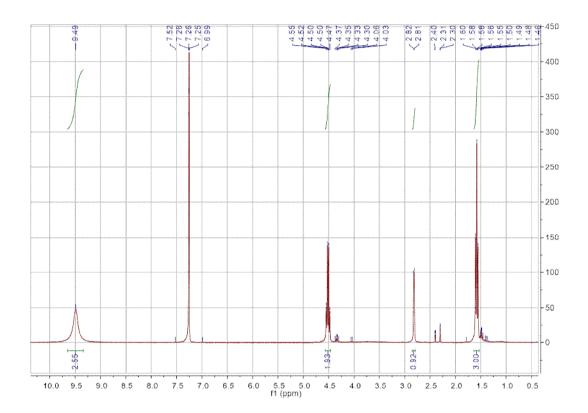






Figure 26. ¹H-NMR spectra of compound 4.







-341 -321 -30(-28 -261 -241 -221 -201 161 -141 -121 -101 -80 -60 -40 -20 -0 --20 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 f1 (ppm) 1.5 1.0 0.5 0.0 -0.5 -1.0 9.5 9.0 8.5 8.0 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0

Figure 27. ¹H-NMR spectra of compound 6.





Figure 28. ¹H-NMR spectra of compound 8.

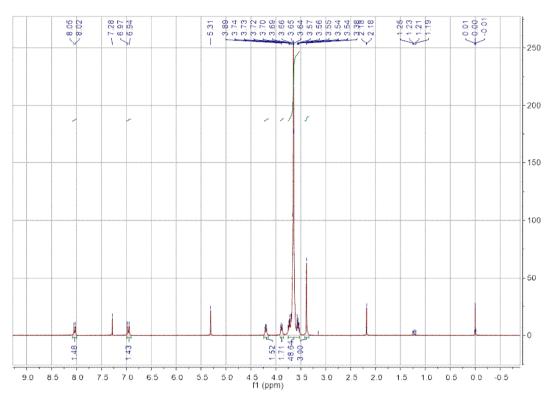






Figure 29. ¹H-NMR spectra of compound 9.

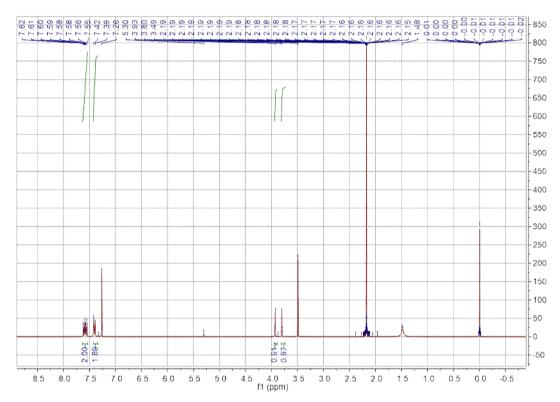






Figure 30. ¹H-NMR spectra of compound 10.

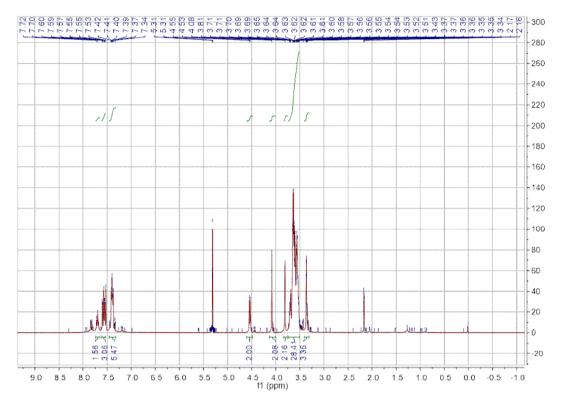






Figure 31. ¹H-NMR spectra of final 1.

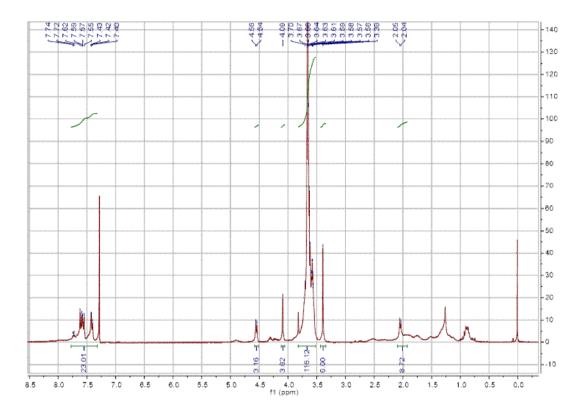
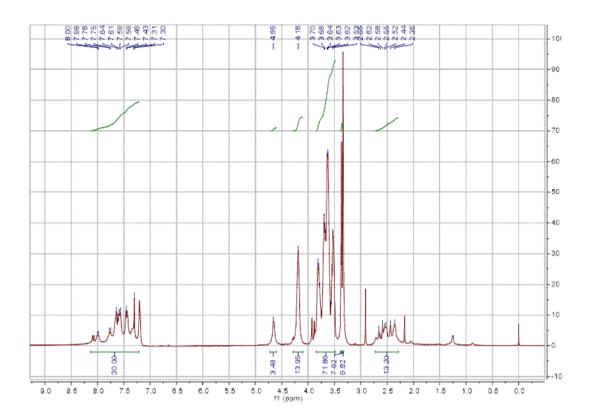






Figure 32. ¹H-NMR spectra of final 3.







Chapter II.

1. Introduction

일반적으로 solid-state의 형광분자의 emission은 분자간의 강한 interaction으로 인해 quenching effect가 발생하며, 이는 aggregation-caused quenching (ACQ) 현상으로 널리 알려져 있다.¹ ACQ effect로 인해 발광성 분자의 응용에 한계가 있다. 따라서, 형광분자에 bulky한 치환기의 도입 또는 quenching 을 어렵게 만들 수 있는 polymer의 도입 등 다양한 화학적, 물리적 그리고 기술적 인 접근을 통해 aggregate 형성을 방지하는 연구들이 진행되어왔다. 그럼에도 불 구하고, 이러한 화학적, 물리적 방법은 형광분자 본연의 분광학적 특성의 변화를 일으켰다. 본 연구에서는 aggregation-induced emission (AIE) effect를 적용한 BODIPY 형광분자를 합성하였다. AIE luminogens 유도체의 합성부분에는 BODIPY에 다양한 방향에 triphenvlamine (TPA)을 연결하였다.^{2,3,4} TPA는 분자 내 rotation의 운동에너지로 인해 BODIPY의 형광 emission을 약하게 만들 수 있으며, 이들 AIE 분자들은 aggregation이 되면 분자 내 rotation이 제한되어, planar conformation 을 형성하고 emission 세기가 증가하게 된다. 그러나 합성된 분자는 소수성으로 물에 대한 용해도가 좋지 않아 세포-이미징 연구에 적합하지 않는다. 그래서 수용 액에서 분산성이 우수한 실리카 나노입자에 이들 분자를 탑재하여 AIE 특성을 확 인하였다.⁵ 합성된 AIE 분자가 탑재된 실리카 나노입자를 이용한 세포-이미징 실험 을 수행하여 생물학분야에 응용가능성을 확인하였다.⁶





2. Experiment

2.1 Generals

본 실험은 대부분 suzuki reaction을 수행하였으며, 화합물의 합성은 특별한 조 건 없이 실행되었다. 4-boromobenzaldehyde, iodine, N-bromosuccimide, iodic acid, 2,4-dimethylpyrrole, trifluoroacitic acid는 Sigma Aldrich 에서 구매하 였고, 4-(dimethyl)benzeneboronic acid, Diphenylbenzeneboronic acid는 Alfa에서 구입하여 사용하였다.

화합물의 구조 분석은 Bruker AC - 300 MHz spectrometer (¹H-NMR, 300.1 MHz 과 ¹³C-NMR 75 MHz) 을 이용하여 얻었다. NMR 용매 chloroform-d는 Cambridge Isotope Laboratories, Inc에서 구매하였고 정제 없이 사용하였다. NMR peak의 화학적 이동은 part per million (δ ppm)으로 얻었다.

2.2 Synthesis

2.2.1 Synthesis of 1,3,5,7-tetramethyl-8-(4-bromophenyl)-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene 1.

150 mL 둥근 바닥 플라스크에 4-boromobenzene aldehyde (2.8 g, 15 mmol)과 2,4-dimethylpyrrole (3 g, 30 mmol)을 넣고 distilled dichloromethane로 녹였다. 그리고 상온에서 15분간 교반하였다. 촉매 trifluoroacetic acid(TFA) 0.2 mL를 주사기로 첨가하였고, 아르곤 가스로 둥근 바닥 플라스크 내부를 치환 한 후 상온에서 24시간 교반하였다.

그 후 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone (DDQ) (3.4 g, 15 mmol)을 anhydrous tetrahydrofuran에 녹여 천천히 첨가 한 후, 상온에서 4시간 교반하였





다. 교반이 끝나면 150 mL 둥근 바닥 플라스크를 Ice bath 하에서 triethyl amine (12 mL)와 boron trifuoride diethyl etherate (12 mL) 첨가 하였고, 2시간 교반하였다. 반응 종료 후, 용매를 제거하고 dichloromethane와 증류수로 3번 추출하였다. 유기용매를 따로 모아 MgSO4로 남아있는 물을 제거한 후, 컬럼 크로마토그래피를 통해 깨끗이 분리하였다.

2.2.2 Synthesis of compound 12 - final 11

4-bromophenyl-bodipy (0.24 g, 0.60 mmol), 4-(dimethyl)benzeneboronic acid (0.31 g, 0.83 mmol)과 Na₂CO₃ (0.38 g, 3.6 mmol)을 250 mL 둥근 바닥 플라스크에 넣은 후 solvent DME 와 물을 4:1 의 비율로 첨가하여 시약들을 녹였다. 5-10분 교반 후, 촉매 Pd(pph₃)₄ 20 mg을 더하고 80 ° C에서 8시간 이상 환류 시켰다. 반응 종료 후 용매를 제거하고, dichloromethane와 물로 추출을 3번 반복하였다. 추출을 통해 유기 용매를 모으고, 유기용매에 MgSO₄를 더하여 남아 있는 물을 제거한 후 용매를 제거하였다. 컬럼 크로마토그래피를 통해 깨끗하게 분리하였다.

2.2.3 Synthesis of compound 13.

150 mL 둥근 바닥 플라스크에 bodipy dye (0.14 g, 0.53 mmol)와 iodine (0.30 g, 1.2 mmol)을 넣고 용매 ethanol 40 mL 를 사용해 시약들을 녹였다. 다 녹인후, iodic acid (0.20 g, 1.1 mmol)을 물 3 mL 에 녹여서 천천히 더해주었다. 그 후 상온에서 5시간 교반하였다.

5시간 후, 용매를 완전히 제거하고, dichloromethane와 물을 사용 해 추출을 진행하였고, 그 다음, 용매를 깨끗하게 제거하였다. 그리고 methanol을 이용해 깨끗이 정제하여 빨간색 고체를 얻었다.





2.2.4 Synthesis of compound 14 - final 12

compound 3 (0.11 g, 0.21 mmol)과 4 (dimethyl)benzeneboronic acid (0.19 g, 0.51 mmol)을 100 mL 둥근 바닥 플라스크에 넣고, tetrahydrofuran 40 mL에 녹였다. 그리고 K_2CO_3 1.56 g을 물 5 mL 녹여서 둥근 바닥 플라스크에 더해주었다. 연이어 촉매 $Pd(pph_3)_4$ 20 mg 을 첨가하고 75 ° C에서 8시간 이상 환류 시켰다. dichloromethane와 물을 이용해 추출한 다음 컬럼 크로마토그래피로 화합물을 깨끗이 얻었다.

2.2.5 Synthesis of compound 15.

4-bromophenyl-bodipy (0.57 g, 1.4 mmol)을 distilled dichloromethane에 완전히 녹인 다음, N-bromosuccimide (0.53 g, 3.0 mmol)을 더하였다. 그리고 둥근 바닥 플라스크 내부를 아르곤 치환 하고 상온에서 24시간 교반하였다.

용매를 완전히 제거 한 후, dichloromethane와 $Na_2S_2O_3$ 수용액을 이용해 추출하였다. 용매를 제거하고 hexane으로 재결정 처리 하여 고체화합물을 얻었다.

2.2.6 Synthesis of compound 16 - final 13

compound 15 (0.70 g, 1.2 mmol)과 diphenyl benzeneboronic acid (1.57 g, 4.2 mmol)을 250 mL 둥근 바닥 플라스크에 넣은 후 $Na_2S_2O_3$ (0.76g, 7.2 mmol)을 첨가 하였다.

그 후 solvent 1,2-dimethoxyethane 50 mL를 사용해 시약들을 녹이고, 증류수 15 mL를 추가로 첨가 하였다.

Suzuki reaction을 수행하기 위해 85 °C에서 8시간 이상 환류 시켰다. evaporation 후 dichloromethane와 물을 사용해 3번 추출 하였고, 유기 용매를 따로 모아 다시 용매를 제거하였다. 용매를 제거하여 고체를 얻었고, 얻어진 고체를





methanol로 3시간 이상 교반하여 불순물을 제거하였다.

3. Results and Discussion

3.1. Solid-state와 용매별 분광학적 분석

3.2. Preparation of luminogenic BODIPY derivatives

< compound 11 >

OHC
$$\longrightarrow Br + HN \longrightarrow CF_3COOH, DDQ, NE_3$$

$$\longrightarrow BF_3-OEt_2$$

$$\longrightarrow N$$

4-Bromobenzaldhyde와 2.4-dimethylpyrrle을 이용하여 4-bromophenyl-bodipy를합성하였다. 수득률은 23 % 이었고, ¹H-NMR을 통해 결과를 확인하였다. ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.46 (m, 2H), 7.29 (m, 2H), 2.56 (s, 6H), 1.41 (s, 6H).





< compound 12 >

$$\begin{array}{c|c} & & & \\ & & & \\ & & & \\ & & & \\ & & & \\ & & & \\ & & & \\ & & & \\ & & & \\ & & & \\ & & & \\ & & & \\ & & & \\ & & & \\ & & \\ & & & \\ & &$$

Suzuki reaction을 수행하여 final 1을 합성하였다. 수득률은 20 %이었고, ¹H-NMR 과 ¹³C-NMR을 통해 확인하였다. ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.75-7.20 (m, 22H), 6.0 (s, 2H), 2.57(s, 6H), 1.46 (s, 6H).

3.3. Preparation of 2-TPA BODIPY

< compound 13 >

Halogen group으로 치환하였고, 수득률은 88 %이었다. ¹H-NMR을 통해 확인하였





CH. $^{1}\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCI $_{3}$): δ 2.63 (s, 3H), 2.56 (s, 6H), 2.43 (s, 6H).

< compound 14 >

Compound 2와 같은 방법으로 합성하였고, 수득률은 52 %이었다. $^1\text{H-NMR}$ 을 통해 확인하였다.

 $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCI $_3$): δ 7.22-7.01 (m, 30H), 2.70 (s, 3H), 2.52 (s, 6H), 2.37 (s, 6H).

3.4. preparation of 3 - TPA BODIPY

< compound 15 >

수득률은 88 %이었다. ¹H-NMR을 통해 확인하였다. ¹H-NMR (300 MHz, CDCI₃): δ 7.72 (d, 2H), 7.19 (d, 2H), 2.62 (s, 6H), 1.42 (s, 6H).

< compound 16 >

수득률은 65 %이었고, ¹H-NMR을 통해 확인하였다. ¹H-NMR (300 MHz, CDCI₃): δ 7.85-7.34 (m, 27H), 7.14 (m, 16H), 6.90 (s, 1H), 2.77(s, 6H), 1.59(m, 6H).

3.5. BODIPY-TPA 유도체들의 광학적 성질 (UV-Vis absorption and fluorescence spectrum)

Compounds 11-13의 응집유도 발광성을 확인하기 위하여 UV-vis adsorption spectrum과 fluorescence 등을 측정하였다. 그림 10과 11에서 볼 수 있듯이, compounds 11-13을 tetrahydrofuran에 먼저 녹이고, 99 v/v% (THF / H₂0의 비율)까지 물을 첨가하였다. 60-80 v/v% 비율로 물이 가해졌을 때 발광세기가 강해짐을 사진으로 확인할 수 있었고, 이를 통해 BODIPY-TPA 유도체들의 AIE 효과를 증명





할 수 있었다.

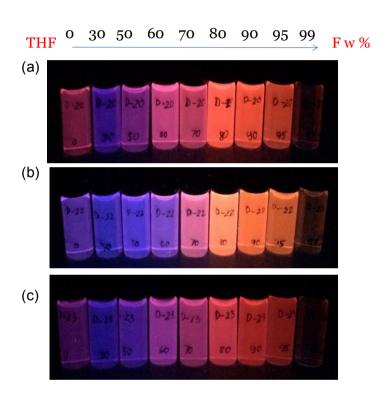


그림 10. THF-water 비율 변화에 따른 (a) compound 11, (b) 12, (c) 13의 형광 사진. 물이 70-80 v/v %이상 섞여 있을 때 AIE 현상을 나타낸다.

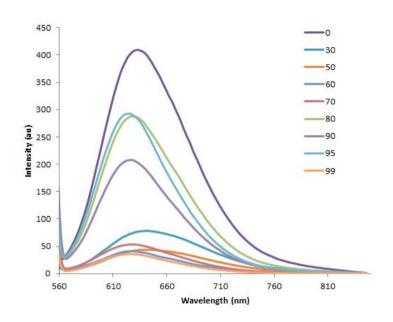


그림 11. 다양한 THF-water 비율의 용매에 녹은 compound 12의 형광 사진. fw = THF/H₂O, Excitation: 547 nm, 농도: 0.5 uM.

그림 11에서는, 형광 630 nm에서의 water fraction에 따른 compound 12의 발광세기 변화를 보여주고 있다. 이 경우 용매의 극성이 증가할수록, compound 12가 응집되어 triphenylamine의 분자내회전이 제한되어 형광세기가 증가함을 알 수 있었다.



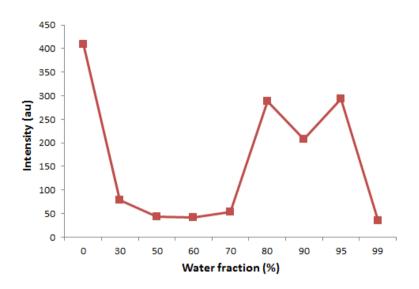


그림 12. THF-water 비율에 따른 compound 12의 형광 세기 비교. fw = THF/H₂O, Excitation: 547 nm, 농도: 0.5 uM.



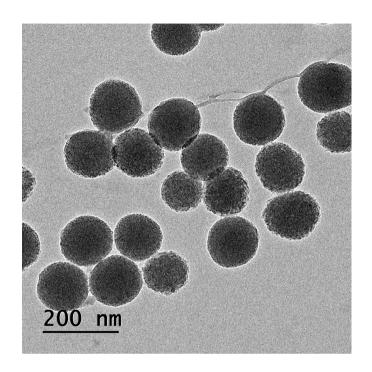


그림 13. compound 12가 탑재된 실리카 나노입자의 TEM 사진.



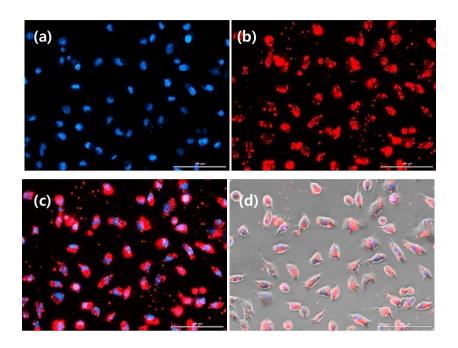


그림 14. 실리카 나노입자에 탑재된 compound 12로 imaging된 cell-L929.

4. Conclusions

이번 실험에서는 Aggregation-induced emission enhancement (AIEE) 효과가 나타나는 triphenylamine이 도입된 3가지 형태의 BODIPY 유도체를 합성하였다. 합성된 TPA-BODIPY 유도체는 THF / H₂O mixture에서 물의 비율이 증가 할수록 TPA-BODIPY 유도체는 응집이 일어나게 되고, 그에 따라 triphenylamine의 회전 자유도가 감소함으로 인해 형광이 강화되는 현상을 확인하였다. 하지만 소수성인 TPA-BODIPY 유도체는 물에 대한 용해도가 좋지 않아 생체 cell-imaging에 적합하지 않다. 그래서 물에 대한 높은 분산도, 높은 생체 적합성을 가진 silica nanoparticle에 TPA-BODIPY 유도체를 탑재하여 섬유 모 세포의 cell-imaging을 수





행하였다.⁷ TPA-BODIPY가 탑재된 silica nanoparticle은 120 nm 크기이며, 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)로 파랗게 염색된 핵과 차별되어 세포질이 붉게 염색됨을 확인하였고, cell-imaging에 적용 가능함을 보여주고 있다.⁸(그림 14)

5. References

- [1] L. Zong, Y. Xie, C. Wang, J. R. Li, Q. Li and Z. Li. Chem. commun., 2016, 52, 11496-11499.
- [2] R. Hu, E. Lager, A. Aguilar, J. Liu, J. W. Y. Lam, H. Sung, I.D. Williams, Y. Zhong, K. Wong, E. Cabrera and B. Z. Tang, J. Phys. Chem., 15845-15853, 113 (2009).
- [3] M. Gao, H. Su, S. Li, Y. Lin, X. Ling, A. Qin and B. Z. Tang, Chem. Commun., 921-924, 53 (2017)
- [4] M. Hengchang, Z. Zhongwei, J. Yuanyuan, Z. Lajia, Q. Chunxuan, C. Haiying, Y. Zengming, Y. Zhiwang and Z. Lei, RSC Adv., 87157-87167, 5 (2015).
- [5] K. S. Rao, K. E. Hami, T. Kodaki, K. Matsushige and K. Makino, J. Colloid Interface Sci., 2005, 289, 1, 125-131.
- [6] L. F. Oliveira, K. Bouchmella, A. S. Picco, L. B. Capeletti, K. A. Goncalves, J. H. Z. dos, J. Kobarg and M. B. cardoso, J. Braz. Chem., 28, 9 (2017).
- [7] B. Korzeniowska, R. Nooney, D. Wencel and C. Mcdonagh, Nanotechnology., 20, 24 (2013).
- [8] W. Lu, Y. Hung, J. K. Hsiao, M. Yao, T. H. Chung, Y. S. Lin, S. H. Wu,





S. C. Hsu, H. M. Liu, C. Y. Mou, C. S. Yang, D. M. Huang and Y. C. Chen, Nano Lett., 149-154, 7 (2007).





6. Spectrum

6.1. ¹H-NMR, ¹³C-NMR spectroscopy

Figure 33. ¹H-NMR spectra of compound 11

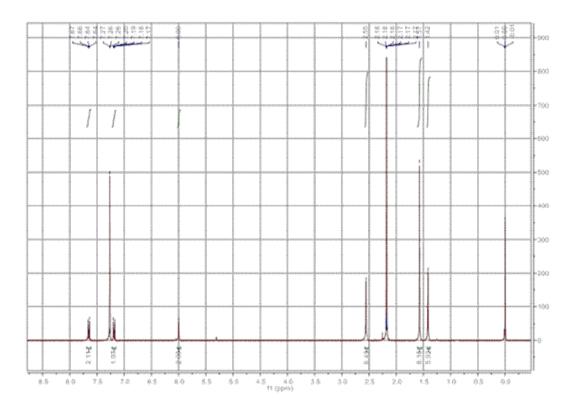






Figure 34. ¹H-NMR spectra of compound 13.

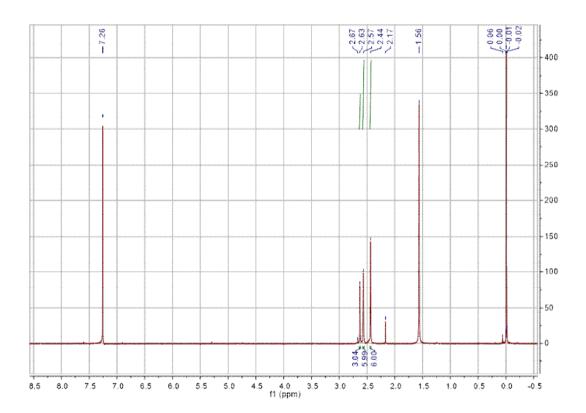






Figure 35. ¹H-NMR spectra of compound 15.

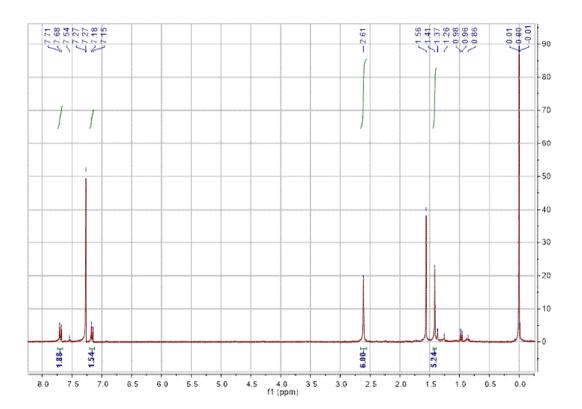






Figure 36. ¹H-NMR spectra of compound 16.

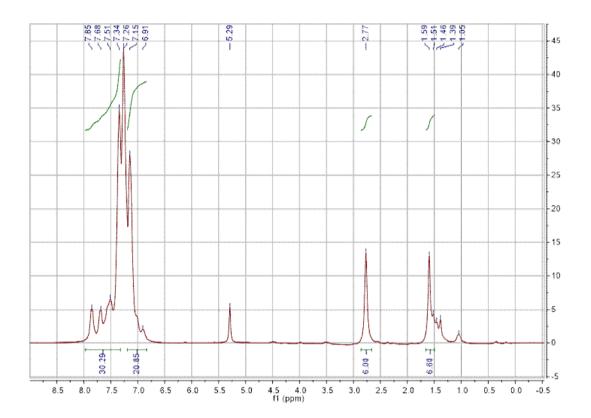




Figure 37. ¹H-NMR spectra of final 11.

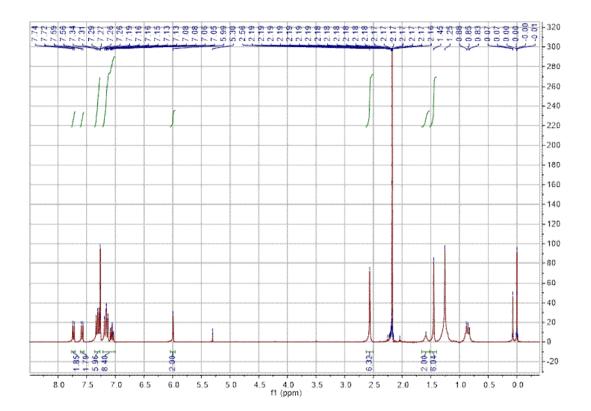






Figure 38. ¹³C-NMR spectra of final 11.

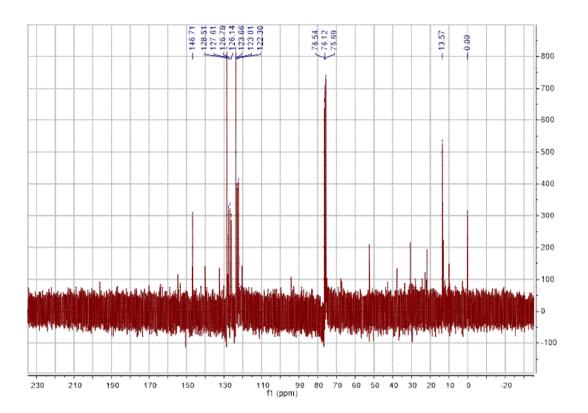






Figure 39. ¹H-NMR spectra of final 12.

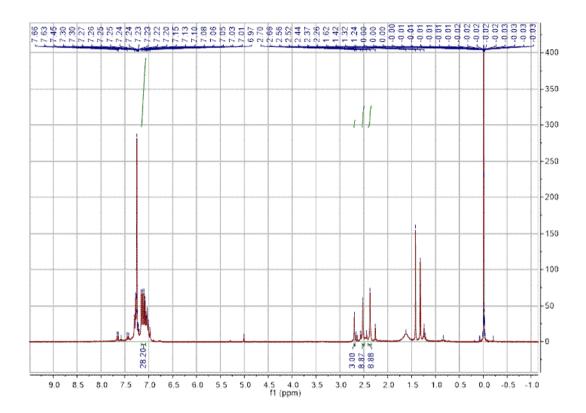






Figure 40. ¹³C-NMR spectra of final 12.

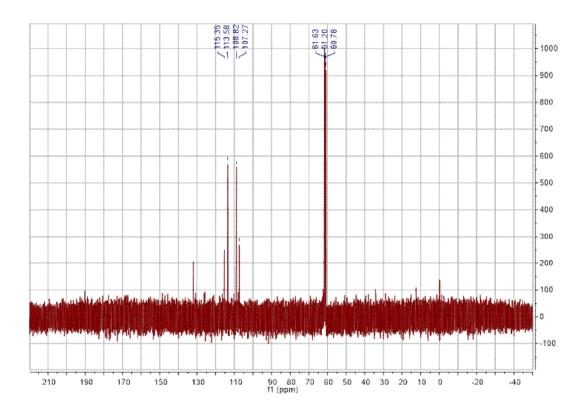
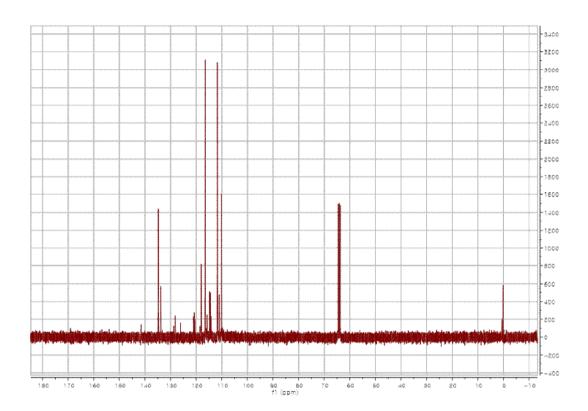






Figure 41. ¹³C-NMR spectra of final 13.







Chapter III.

Abstract

안구는 신체 장기들 중 외부에 가장 많이 노출되어 있는 만큼, 외부 세균 및 자외선, 전자기기에서 방출된 유해 광선 등에 의해 많은 악 영향을 받고 있다. 또한, 고령화 사회로 진입하며 증가된 당뇨, 안구 건조증, 녹내장 등의 다양한 요인들이 안구의 건강을 해치고 있다. 이렇게 다양한 환경적 영향으로 인해 체내 항산화와 산화촉진제의 불균형이 일어나 산화스트레스 (oxidative stress)가 발생하여 활성산소의 농도가 증가한다. 생성된 활성산소는 세포에 damage를 입히고 암,염증, 신경변성질환 등 각종 질병을 일으키는 원인으로 작용할 수 있다.

따라서 활성 산소로부터 시각세포를 보호하기 위하여 항산화 물질이 적용된 hydrogel contact lens를 개발하였다.

항산화 물질로는 polyphenol인 gallic acid 와 dopamine을 선정했으며, 이들은 각각 carboxyl group와 amine group을 갖고 있기 때문에 amide coupling 반응을 통해 원하는 물질에 고정할 수 있다. 또한 높은 antioxidant activity와 free radical scavenging activity를 가지고 있어, 식품, 제약, 화장품 등에 많이 사용 되고 있다.

본 실험에서는 키토산을 hydrogel 표면에 interpenetrating polymer network (IPN) 제조방법을 통해 고정하고, 추가적으로 gallic acid와 dopamine을 키토산과의 amide 결합을 수행해 고정시켰다. 제조된 polyphenol-functionalized hydrogel은 우수한 항산화 능력을 보여주었다.





1. Introduction

신체 내 발병하는 각종 질환 중 많은 경우가 활성산소가 관여된다는 것이 알려지면서, 항산화 물질 (산화를 방지하는 물질의 총칭)은 화학이나 생물 산업 분야에서 많이 연구되고 있다. 1-4 특히, polyphenol은 free radical scavengers, reactive oxygen scavengers, reducing agents 의 역활로 인체에 일어나는 산화과정을 방지할 수 있다. 1,2-dihydroxylbenzene을 갖는 polyphenol은 2개의 전자와수소양이온을 방출하면서, 2개의 활성산소, 즉, reactive oxygen species (ROS)를 제거하며, ortho-diguinone으로 산화된다. 1,2 (그림 15).

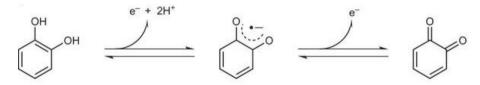


그림 15. 1,2-dihydroxybenzene의 항산화성

그러나 항산화 물질들의 훌륭한 생체적합성과 낮은 가격에도 불구하고, 주변에 있는 산소로 인한 산화, 휘발성, 불안정성 등 여러 가지의 문제점을 안고 있기 때문이다.^{5.6} 항산화 물질을 bio-polymer, inorganic materials, nanoparticle과 같은 재료에 도입시켜 단점을 보완하는 연구가 많이 진행되고 있다.⁷⁻¹⁰

최근, hydrogel은 functional bio-material platform으로 많이 연구되고 있는 재료이며 hydrogel은 cross-link된 hydrophilic polymer로, 높은 친수성으로 인해 많은 물과 biological fluids를 흡수할 수 있는 능력을 지니고 있다. 이러한 독특한 성질로 인해, hydrogel은 현재 drug delivery platform, soft contact lens, artificial cornea, artificial skin 등 다양한 분야에 응용되고 있다. 11-13 hydrogel의 표면에 radical polymerization, electrostatic interaction, interpenetrating polymer networks (IPNs) 형성 등을 이용하여 다양한 기능을 부여할 수 있다. 14-16



특히, IPNs구조는 두 가지 또는 그 이상의 polymer가 서로 공유결합으로 연결되지 않은 상호침투고분자 가교구조로 규정되며, hydrogel 본연의 구조와 3차원 형태를 파괴하지 않고 이상적인 기능을 가진 hydrogel을 구성할 수 있다. 16-18 (그림 16)

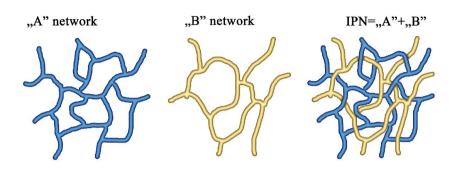


그림 16. Interpenetrating Polymer Network의 구성도.

IPNs는 polymerization initiator와 monomer의 solution속에서 polymer를 먼저형성하며, 그 뒤 다른 monomer를 첨가하여 다시 중합하여 얻을 수 있다. 그리고 각각의 polymer들의 장점이 IPN에 적용될 수 있는 장점이 있다.

이번 실험에서는, 항산화 물질을 poly(hydroxyehtyl methacrylate) (pHEMA)-기반 hydrogel 표면에 고정하여, hydrogel의 기본 물리적 특성과 항산화 특성을 분석하였다. 먼저 p(HEMA)-기반 hydrogel을 제조하고, hydrogel 표면에 chitosan과 p(HEMA)-network로 형성된 IPN을 도입하였다. 추가적으로, 항산화물질인 polyphenol은 chitosan과 amide 결합을 통해 hydrogel 표면에 도입하였다. ¹⁹





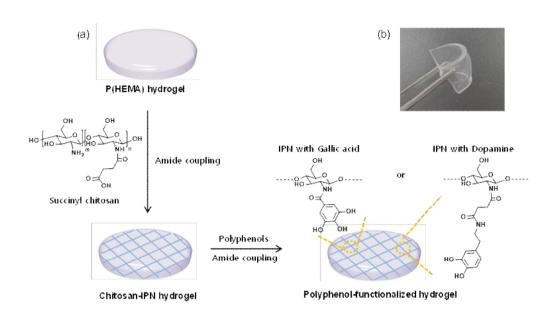


그림 17. (a) Schematic diagram for the fabrication of chitosan-IPN hydrogels functionalized with polyphenols. (b) Photograph of the fabricated antioxidant hydrogel.

2. Experiment

2.1 Generals

2-hydroxylethyl methacrylate (HEMA), ethylene glycol dimethacrylate (EGDM A), 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride (EDC-HCl), N-hydroxysuccinimide (NHS), gallic acid, dopamine hydrochloride, 2,2-di pheynyl-1-picrylhydrazyl(DPPH), and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS)들을 Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA)에서 구입하





였다.

Azobisisobutyromitrile (AIBN)은 Junsei (Tokyo, Japan)에서 구입하였고, tr iethylamine은 Alfa Aesar (Haverhill, MA, USA), chitosan (100-300 KDa 과 6 00-800 KDa)은 Acros Organics (Geel, Belgium)에서 구입하여 사용하였다. Suc cinyl chitosan(SCS)의 succinyl-substitution 정도는 약 35 %이었다. 20 hydrogel lenses 항산화 정량을 위해, UV는 285-750 nm 범위에서 측정했으며, UV-vis spectrometer (UV-1650 PC, Shimazu) 를 이용하였다.

2.2 Synthesis

2.2.1. Synthesis of chitosan-IPN hydrogels functionalized with gallic acid and dopamine

Polymerization 전에 HEMA monomer를 진공 증류 방법으로 정제하였다.

EGDMA (0.04 g)과 AIBN (0.004 g)을 HEMA (9.92 g)에 완전히 녹여 solution을 만든 후, polypropylene sheet와 0.8mm 구경의 teflon frame으로 구성된 hydrogel mold에 두 방울씩 첨가한 후, 90 °C 오븐 안에서 5시간 중합시켰다. polymerization 된 HEMA hydrogels 분리를 위해 이틀간 증류수에 담궈 수화를 시켰다. HEMA hydrogel을 mold에서 분리하고, 40 °C 오븐 에서 렌즈를 드라이 시켰다. 제조된 hydrogel과 N-succinyl chitosan으로 IPNs polymerization을 이틀간수행하였다.

이틀 후 잔여물을 제거하기 위해 증류수로 3-4번 씻어낸 후 gallic acid와 dopamine을 각각 공유결합을 수행하였다. 증류수 20 mL 에 IPNs-hydrogels을 넣어수화시킨 후, gallic acid / dopamine 그리고 EDC-HCI, NHS를 첨가하고, 상온에서 교반을 24시간 진행하였다.

그 후, chitosan-IPNs hydrogels를 증류수에 여러 번 헹군 후, 반응 후 남은 chemicals 들을 제거하기 위해 3일간 증류수로 씻어냈다.





2.3. DPPH radical-scavenging assay of the chitosan-IPNs hydrogels

Chitosan-IPNs hydrogels 각 샘플을 Brand-Williams 방법과 Miliauskas가 제안한 방법으로 DPPH radical scavenging capacity를 측정하였다.²¹ 비교군으로는, antioxidant로 알려진 ascorbic acid (1,000 ppm)을 사용하였다.

DPPH solution (0.2 mM, in ethanol)에 hydrogels 각 5개를 취하고 vial 안에함께 넣은 후 섞었다. 바로 암막 하에서 37 °C, 30분간 shaken machine으로 흔들어준다.

DPPH의 radical은 517nm 에서 측정 하였다.

DPPH scavenging inhibition capacity 아래의 방정식을 사용하였다.

% Inhibition = { 1-(Absorbance of sample / Absorbance of control) x 100 (1)

2.4. ABTS radical-scavenging assay of the chitosan - IPN hydrogels

ABTS 통해 항산화 효과를 측정하는 것은 Arnao에 의해 측정방법이 제안 되었다.²² ABTS 라디칼 양이온은 (ABTS+) 7 mM ABTS solution과 2.4 mM potassium persulfate solution을 첨가하여 준비하였다.

ABTS+ 묽은 solution으로 만들기 위해 이미 알고 있는 2개의 몰 농도의 용액을 암막 하에서 24시간 교반 후 준비하였다.

묽은 용액의 흡수 파장 범위는 734 nm 이며, 오차범위는 0.7-1 ± 0.02 이다. 여기서 hydrogels 샘플들을 묽은 ABTS + solution에 담궈 놓는다 그리고, 37 ° C, 30분간 어두운 incubator에 보관하였다.





위에 표기된 방정식을 이용하여 ABTS + solution의 항산화 정도를 계산 하였다.

3. Results and discussion

Antioxidant hydrogel의 합성 방법은 그림 17 를 통해 설명 하였다. 첫 번째 단계로써 p(HEMA)-based hydrogels은 HEMA monomer에 cross-linking agent인 EGDMA와 개시제 AIBN을 vial에 담아 완전히 녹인 후 가교시켰다. 이렇게 만들어진 hydrogel의 p(HEMA) networks에 chitosan을 교차 cross-linking시켜 IPNs 구조가적용된 chitosan-IPNs hydrogel을 합성했으며, 추가적으로 polyphenol인 gallicacid / dopamine 을 키토산과의 amide coupling 반응을 통해 항산화 기능을 갖는 chitosan-IPNs hydrogel을 합성하였다.

Amide 결합을 위해서는 분자 내 아민 혹은 카복실기를 갖고 있어야 한다. 이에, chitosan에 카복실기를 갖는 N-succinyl을 도입하여, chitosan backbone 내 아민 과 카복실기를 동시에 갖는 N-succuinyl-chitosan (SCS)을 합성 하였다.^{23,24} chitosan은 본래 중성의 물에 녹지 않지만, 분자 내 많은 아민과 카복실기를 가진 SCS는 물에 쉽게 녹아 반응이 용이 하다. 다양한 분자량 (MW 100-300 kDa, 600-800 kDa)을 갖는 chitosan을 이용하여 SCS를 합성 했으며. 각각을 Low-SCS와 High-SCS로 명칭 하였다. p(HEMA) hydrogels에 Low-SCS, High-SCS를 각각 loading 시켜 결합을 수행했으며, p(HEMA) network와 SCS으로 amide IPNs-structure hydrogles를 합성하였다. gallic acid 와 dopamine과의 추가적인 amide 결합을 통해 4가지의 항산화 hydrogel을 성공적으로 합성 하였다. 샘플들의 이름과 첨가된 polyphenol의 정량은 Table 1에 표기 하였다.





Table 1. Characteristics of antioxidant hydrogels

Hydrogels	MW of chitosan (kDa)	Amounts of attached polyphenols per hydrogel (μmol) ^a
High-SCS-H	600-800	(2)
Low-SCS-H	100-300	(2)
GA-High-SCS	600-800	0.22 ± 0.033 (gallic acid)
GA-Low-SCS	100-300	0.17 ± 0.046 (gallic acid)
Do-High-SCS	600-800	0.16 ± 0.015 (dopamine)
Do-Low-SCS	100-300	0.09 ± 0.054 (dopamine)

^aDada are means±SD (n=3)

Hydrogel은 soft contact lens나 colorimetric sensor, optical device 등으로 사용될 경우 optical transparency가 매우 중요하다. 합성된 hydrogel을 파장 285-750 nm에서 % transmittance를 측정했을 때, 대부분 90 % 이상의 높은 transmittance를 보여주었다. (> 90 %, 그림 18).

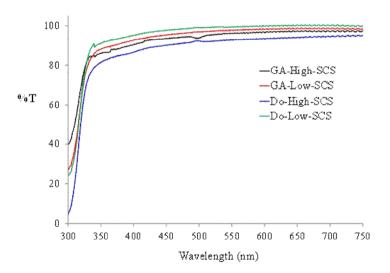


그림 18. Transmission spectra of the antioxidant hydrogels.



또한 UV/ Vis 흡광도로 chitosan-IPN-modified hydrogel에 gallic acid 와 dopamine이 얼마나 붙었는지 정량화하였다. Beer-Lambert의 법칙을 따랐으며, 제조된 hydrogel 1개당 GA-High-SCS에는 gallic acid가 293nm에서 0.21 μmol/cm³로 결합 되었다고 정량화 하였고, GA-Low-SCS에는 gallic acid가 0.16 μmol/cm³로 결합 되어있음을 확인하였다 (그림 19). 또한, DO-High-SCS에는 0.15 μmol/cm³, DO-Low-SCS에는 0.09 μmol/cm³의 dopamine이 결합 되어있음을 확인하였다.

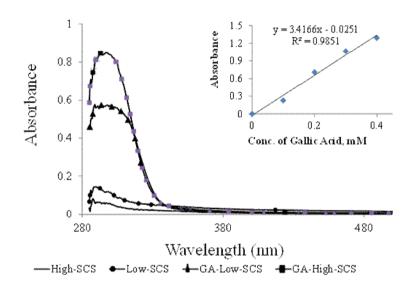


그림 19. Absorbance spectra of the prepared chitosan-IPN hydrogels functionalized with gallic acid. Inset image displays the calibration curve obtained using five varying concentrations of gallic acid in aqueous solution.

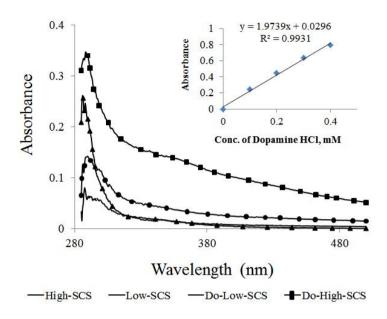


그림 20. Absorbance spectra of the prepared chitosan-IPN hydrogels functionalized with dopamine. Inset image displays the calibration curve obtained using five varying concentrations of dopamine in aqueous solution.

Table 1의 결과를 통해 더 길이가 긴 SCS-기반 hydrogel이 짧은 SCS-기반 보다 더 많은 항산화 물질이 도입되었다는 것을 확인할 수 있었으며, 그 이유는 분자량이 큰 SCS가 분자 내에 더 많은 아민과 카복실기를 갖고 있어 polyphenol이 더 많이 결합될 수 있기 때문이다.^{25,26}

Hydrogel의 항산화 특징은 DPPH와 ABTS radical제거 반응에 의해 분석하였다 (그림 19와 20). polyphenol이 없는 hydrogel은 radical scavenging ability을 보여주지 못하였지만, polyphenol-modified hydrogel은 강한 항산화성을 보여주었다. DPPH-assay 실험에서는 GA-High-SCS와 GA-Low-SCS가 각각 85.12 %와 82.45 %로 높은 항산화 능력을 보여주었다.(그림 21) 이때 ascorbic acid는 95.31 %로 결과



가 나타났다. ABTS-assay 실험에서는 GA-High-SCS와 GA-Low-SCS는 각각 96.77 %와 95.53 %의 항산화성을 보여주었다.(그림 22) dopamine을 작용기로 가진 hydrogel의 항산화 능력은 Do-High-SCS 56.33 % (ABTS), 35.91 % (DPPH)이고, Do-Low-SCS 48.80 % (ABTS), 34.34 % (DPPH)이다. 이러한 DPPH와 ABTS 방법으로 도출된 항산화 능력의 순서는 GA-High-SCS > GA-Low-SCS > Do-High-SCS > Do-Low-SCS로 이었다.

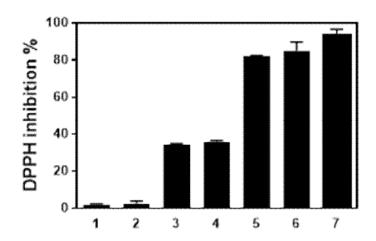


그림 21. Radical scavenging capacity of the fabricated antioxidant chitosan-IPN hydrogels against DPPH free radicals. The amount of ascorbic acid is 0.85 umol. Legend: 1 = Low-SCS-H; 2 = High-SCS-H; 3 = Do-Low-SCS; 4 = Do-High-SCS; 5 = GA-Low-SCS; 6 = GA-High-SCS; 7 = ascorbic acid.

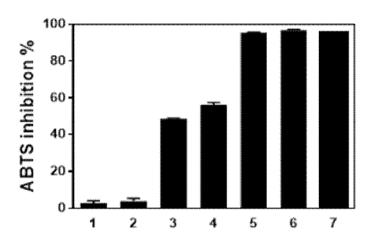


그림 22. Radical scavenging capacity of the fabricated antioxidant chitosan-IPN hydrogels against ABTS free radicals. The amount of ascorbic acid is 0.85 umol. Legend: 1 = Low-SCS-H; 2 = High-SCS-H; 3 = Do-Low-SCS; 4 = Do-High-SCS; 5 = GA-Low-SCS; 6 = GA-High-SCS; 7 = ascorbic acid.

4. Conclusions

Polyphenol-functionalized hydrogel을 합성하여 항산화 효과를 조사하였다. 첫 번째 단계에서, p(HEMA)-based hydrogel을 합성하였고, 여기에 cross-linked chitosan과 p(HEMA) network로 구성된 새로운 IPNs 구조를 도입했으며, 추가적으로 chitosan backbone에 gallic acid 와 dopamine 을 각각 공유결합으로 연결시켜 항산화기능의 chitosan-IPNs hydrogel를 제조 하였다. 합성된 hydrogel의 항산화 특성은 DPPH와 ABTS free radical scavenging을 이용해 측정하였다. 보통 chitosan polymer는 용해도가 매우 낮기 때문에 사용이 제한적이지만, 본 실험에서는 N-succynyl functional group을 chitosan에 도입하여, 중성의 수용액상에서도 잘 녹게 하였다. 또한 분자 내 많은 아민과 카복실기가 있어 손쉽게 분자 내혹은 분자 간 아마이드 결합이 가능하였다. 제조된 SCS는 p(HEMA)hydrogels에



chitosan IPNs 구조가 가능 하게 해주었다. 우리는 gallic acid와 dopamine 2종류의 polyphenol-함유 chitosan-IPN 구조가 도입된 hydrogel을 얻었고, 이들의 항산화 기능성을 분석하였다. 이를 통해서 gallic acid-functionalized hydrogel의 항산화 능력이 dopamine이 적용된 hydrogel 보다 더욱 뛰어남을 확인하였다. galic acid는 3개의 hydroxyl group을 갖고 있고, proton을 잃었을 때 phenoxy radical이 더욱 안정할 수 있기 때문이며, 그리고 더 높은 항산화 효과를 띄기 위해서는 SCS 길이가 길수록 좋은 효과가 나타났다. 이는 키토산 분자량의 길이가 길수록 분자에 더 많은 항산화 물질인 polyphenol이 결합 할 수 있기 때문이다.

이번 실험을 통해 chitosan의 우수한 생체적합성과 p(HEMA) network의 뛰어난 물리적 특징을 hydrogel안에 공존시켜 새로운 항산화 IPN-hydrogel 을 합성하였다.

5. References

- [1] E. Llorens, L. J. Valle, and J. Puiggali, Macromol. Res., 22, 388 (2014).
- [2] J. Kawabata, Y. Okamoto, A. Kodama, T. Makimoto, and T. Kasai, J. Agric. Food. Chem., 50, 5468 (2002).
- [3] D. Vilano, M. S. Fern?ndez-Pach?n, A. M. Troncoso, and M. C. Garc?a-Parrilla, Anal. Chim. Acta., 538, 391 (2005).
- [4] A. Kodama, H. Shibano, and J. Kawabata, Biosci. Biotech. Bioch., 71, 1731 (2007).
- [5] E. Giannakopoulos, K. C. Christoforidis, A. Tsipis, M. Jerzykiewicz, and Y. Deligiannakis, J. Phys. Chem. A., 109, 2223 (2005).
- [6] M. Scoponi, S. Cimmino, and M. Kaci, Polymer, 41, 7969 (2000).
- [7] G. Cirillo, K. Kraemer, S. Fuessel, F. Puoci, M. Curcio, U. G. Spizzirri, I. Altimari, and F. Iemma, Biomacromolecules, 11, 3309 (2010).



- [8] Y. S. Cho, S. K. Kim, C. B. Ahn, and J. Y. Je, Carbohydr. Polym., 83, 1617 (2011)
- [9] E. Giannakopoulos, P. Stathi, K. Dimos, D. Gournis, Y. Sanakis, and Y. Deligiannakis, Langmuir, 22, 6863 (2206).
- [10] Y. Deligiannakis, G. A. Sotiriou, and S. E. Pratsinis, ACS. Appl. Mater. In., 4, 6609 (2012).
- [11] S. Ashraf, H. K. Park, H. Park, and S. H. Lee, Macromol. Res., 24, 297 (2016).
- [12] J. Li, M. Darabi, J. Gu, J. Shi, J. Xue, L. Huang, Y. Liu, L. Zhang, N. Liu, W. Zhong, and L. Zhang, Biomaterials, 102, 72 (2016).
- [13] K. Kim, B. Bae, Y. J. Kang, J. M. Nam, S. Kang, and J. H. Ryu, Biomacromolecules, 14, 3515 (2013).
- [14] J. Wang, and J. Wei, Appl. Surf. Sci., 382, 202 (2016).
- [15] C. Zhou, V. X. Truong, Y. Qu, T. Lithgow, G. Fu, and J. S. Forsythe, J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem ., 54, 656 (2015).
- [16] M. V. Bee, L. Jones, and H. Sheardown, Biomaterials, 29, 780 (2008).
- [17] S. S. Es-haghi and R. A. Weiss, Macromolecules, 49, 8980 (2016).
- [18] C. W. Lee, S. H. Lee, Y. K. Yang, G. C. Rye, and H. J. Kim, J. Appl. Polym. Sci., 134, 45120 (2017).
- [19] H.-L. Lim, H.-J. Kim, and J. Jun, J. Nanosci. Nanotechnol., 16, 11952 (2016).
- [20] A. R. Viguera, M. J. Villa, and F. M.Go?i, J. Biol. Chem., 265, 2527 (1990).
- [21] W. B. Williams, M. E. Cuvelier, and C. Berset, Food Sci. Technol. Int., 28, 25 (1995).
- [22] M. B. Arnao, A. Cano, and M. Acosta, Food Chem., 73, 239 (2001).
- [23] H. Tan, C. R. Chu, K. Payne, and K. G. Marra, Biomaterials, 30, 2499 (2009).





[24] T. Wu, Y. Li, and D.S. Lee, Macromol. Res. (2017). doi:10.1007/s13233-017-5066-0

[25] M. Rossi, F. Caruso, C. Opazo, and J. Salciccioli, J. Agric, Food Chem., 56, 10557 (2008).

[26] R. Farhoosh, S. Johnny, M. Asnaashari, N. Molaahmadibahraseman, and A. Sharif, Food Chem., 194, 128 (2016).

