

Poly(Amino Acid) Matrix를 이용한 스테로이드의 방출기구에 관한 연구

金宜洛* · 姜仁圭[†] · 曹鍾守[‡] · 李明載[§] · 鄭鳳鎭 · 閔庚燮 · 元美子

계명대학교 자연과학대학 화학과

[†]경북대학교 공과대학 고분자공학과

[‡]전남대학교 공과대학 고분자공학과

[§]가톨릭 의과대학 화학과

(1992. 9. 24 접수)

The Studies for Release Mechanism of the Steroids in Synthetic Poly(Amino Acid) Matrix

Ui-Rak Kim*, Inn-Kyu Kang[†], Chong-Su Cho[‡], Myung Jae Lee[§], Bong-Jin Jeong,
Kyung-Sub Min, and Mi-Ja Won

Department of Chemistry, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

[†]Department of Polymer Science, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

[‡]Department of Polymer Engineering, Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea

[§]Department of Chemistry, Catholic Medical College, Seoul 137-701, Korea

(Received September 24, 1992)

요 약. 합성 polypeptide인 poly(γ -benzyl-L-glutamate)[PBLG]를 A-segment로 하고, polyoxypropylene (POP)를 B-segment로 하는 AB 형태 블록공중합체와 polypropyleneglycol을 B-segment로 하는 ABA 형태 블록공중합체를 합성한 후, 이들 공중합체와 생식 호르몬인 progesterone, estrone, estradiol, testosterone의 고분자 매트릭스를 제조하여 이들 스테로이드의 방출량의 변화를 연구하였다. PBLG-POP1과 PBLG-POP2의 매트릭스에서의 progesterone, estradiol 및 testosterone 방출속도와 ABA 형태의 GPG1 공중합체에서의 progesterone, estrone 및 testosterone 방출속도가 염기성용액보다 산성용액에서 더 빠름을 보였다. 한편 PBLG-POP1과 PBLG-POP2의 매트릭스에서의 estrone 그리고 ABA 형태의 GPG1의 매트릭스에서의 estradiol의 방출속도는 산성용액에서 보다 중성 및 염기성용액에서 더 빨랐다. 서로 다른 매트릭스에서의 방출차이는 GPG1 > PBLG-POP1 > PBLG-POP2이며, 방출속도는 스테로이드의 분자량에 반비례함을 보였다.

ABSTRACT. The release of steroids such as progesterone, testosterone, estrone and estradiol were investigated in two types of block copolymer matrices, which were AB type block copolymer composed of poly(γ -benzyl-L-glutamate)[PBLG] as the A segment and polyoxypropylene[POP] as the B segment and ABA type triblock copolymer composed of the A segment and poly(propylene glycol)[PPG] as the B segment. The release rates of progesterone, estradiol and testosterone through PBLG-POP1 and PBLG-POP2 matrices and those of progesterone, estrone and testosterone through GPG1 of ABA type triblock copolymer were higher in an acidic solution than in a basic one. However, the release rate of estrone through PBLG-POP1 and PBLG-POP2 matrices and that of estradiol through GPG1 of ABA type triblock copolymer were higher in a basic and neutral solutions than in an acidic one. The order of release rate in three different matrices was GPG1 > PBLG-POP1 > PBLG-POP2. The results also showed that the molecular weight of steroids is inversely proportional to the rate of release.

서 론

아미노산 무수물을 중합하여 폴리아미노산은 합성하는 방법이 1906년 Leuchs에¹ 의하여 처음 발표된 이래 생체고분자 물질인 효소나 단백질을 모델로하여 이와 유사한 폴리아미노산을 합성한 후^{2~5}, 그들의 구조, 물성, 기능에 대하여 많은 연구를 하고 있다^{6~12}.

폴리아미노산의 구성성분인 순수 α -아미노산은 단백질 연구가 시작되던 1950년대에는 많은 양을 얻기가 어려웠지만 최근에는 biotechnology의 발달로 효율적인 제법과 광학적으로도 순도가 높은 아미노산을 저가로 다량 구입할 수 있게 되었다.

단백질은 α -helix, β -coil, random coil 등 여러가지 구조를^{13,14} 가지고 있으며, 구성성분인 20가지 아미노산들은 측쇄의 성질에 의하여 소수성 아미노산기, 친수성 아미노산기, 해리성 아미노산기 등 세 가지로 분류된다. 소수성 아미노산 잔기를 가지는 아미노산은 Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Met, Phe, Trp, Tyr 이고, 친수성 아미노산 잔기에는 Ser, Thr, Asn, Gln가 여기에 속하고, 해리성 아미노산 잔기에는 Asp, Glu, His, Lys, Arg, Cys, Tyr 등이 있다. Gly 잔기는 소수성이 적지만 비극성 아미노산 잔기 때문에 소수성 아미노산 잔기에 속하며, Tyr의 잔기 속에 포함된 수산기의 pK_a 값은 보통 10 전후 이므로 중성 부근에서는 소수성 아미노산 잔기로써 작용하지만, 염기성이 큰 용액에서는 해리성 아미노산 잔기로 작용한다. Pro 잔기가 포함된 폴리아미노산은 Pro 잔기의 구조가 나머지 19가지 아미노산과는 다르기 때문에 peptide 주축에 있는 N-H 결합은 수소결합을 형성하지 않으며 β -coil 구조를 형성하기가 쉽다. 또 Glu, Ala, Lys은 α -helix를 그리고 Cys과 Ser는 Pro처럼 β -coil을 형성하기 쉬우며, Gly 잔기는 peptide 주축 이면체각 ϕ 와 ψ 의 자유도가 크기 때문에 불규칙한 구조를 형성하기 쉽다. Asn, Gly 잔기 이외의 친수성 혹은 해리성 아미노산 잔기는 측쇄 관능기가 helix 내측에 들어가는 경우가 많기 때문에 측쇄 극성잔기가 주축의 peptide 결합과 상호작용할 가능성이 크므로 불규칙한 구조 형성이 용이하다. 그러므로 소수성과 친수성 그리고 해리성 아미노산이 폴리아미노산을 합성할 때 어떤 조성을 갖는지에 따라 폴리아미노산의 성질이 크게 달라지

게 된다.

이와 같이 폴리아미노산이 구조변화의 다양성 광학 활성, 생분해성, 생체적 합성을 가지므로 기능성 고분자물질 개발을 위하여 많은 연구를 하고 있다. 예로써 폴리아미노산의 α -helix 구조가 가역적 구조변화를 하므로 분리, 투과막^{15,16}과 광학분할용 담체¹⁷로 이용되고 있으며, helix에 의한 측쇄의 배향을 이용하여 광전도성 폴리머^{18,19}로 사용되며, 친수성 폴리아미노산 겔막, L-alanine-L-methionine 공중합체²⁰, N-hydroxyalkyl-L-glutamine(A)-L-leucine(B)의 ABA 블록공중합체²¹, N-hydroxyalkyl-L-glutamine(A)-L-alanine(B)의 ABA 블록공중합체²², poly(L-leucine) 등은 적절한 흡수성, 수증기 투과성, 산소 투과성, 습윤시 역학적 강도 등이 양호하여 인공피부나 상처 피복제로, 그리고 poly(glutamic acid- α -methyl)은 합성피혁 소재, 인공피혁, 천연피혁 및 섬유류의 표면처리제로 응용되며, sponge 구조의 poly(L-leucine)과 L-alanine과의 ABA 블록공중합은 팽윤도가 큰(100%) 겔이므로 피부대용으로 쓰이고 있다²³.

Sidman 등이 합성한 L-glutamic acid- α -ethyl-L-glutamate 공중합체 겔막은 분자량이 12000~69000 정도의 단백질이 투과할 수 있고, 생분해성, 무독성, 비항원성을 가지고 있으므로 사람의 성장호르몬 방출조절제의 재료물질로 사용할 수 있다고 발표하였^{24~26}.

본 연구에서는 합성 polypeptide인 poly(γ -benzyl L-glutamate)[PBLG]를 A-segment로 하고, polyoxypropylene(POP)를 B-segment로 하는 AB 형태 블록공중합체와 poly(γ -benzyl-L-glutamate)[PBLG]를 A-segment로 하고, polypropyleneglycol을 B-segment로 하는 ABA 형태 블록공중합체를 합성한 후, 이들 공중합체와 생식 호르몬인 progesterone, estrone, estradiol, testosterone의 고분자 매트릭스를 제조하여 용질의 종류, pH와 온도를 변화시키면서 확산시켰을 때, 그 기구가 어떻게 변하는가를 규명하고자 하였다.

실 험

기 기. 합성된 고분자의 구조를 확인하기 위해서 IR spectrometer(Jasco IR 0080)와 ¹H-NMR spe-

ctrometer(80 MHz Bruker SY spectropin)을 사용하였다. 방출된 용질의 양을 측정하기 위해서 사용된 액체섬광 계측기(Liquid Scintillation Counter)는 Beckman LS7800이며, Circulator는 미국 GCA 회사의 제품을 사용하였다. 또 합성된 고분자의 점도를 측정하기 위해 Ubbelohde 점도계를 사용하였다. 합성된 고분자의 접촉각(water contact angle)을 측정하기 위해 사용된 Goniometer는 Erma Contact Anglement model G-1이다.

재료 및 시약. 고분자를 합성하기 위해 사용된 시약으로는 methoxypolyoxypropylenamine(분자량 2000)과 amine-terminated polyoxypropylene(분자량 2000)으로 Texas, Ballaire에 있는 Texaco chemical 회사로부터 제공받은 것을 사용하였다. 그리고 benzyl alcohol과 L-glutamic acid는 Wako Chemical사의 제품으로 정제하지 않고 그대로 사용하였으며, 합성된 고분자를 녹여 용질을 포함한 매트릭스를 제조하기 위한 용매로는 Aldrich사의 특급시약인 tetrahydrofuran을 아르곤 기류하에서 칼륨과 benzophenone을 넣고 장시간 환류시킨 후 증류하여 사용하였으며, 1,4-dioxane은 Sigma사의 제품으로 삼중증류하여 사용하였다. 그 외에 ethyl ether, ethyl acetate, dichloromethane, triethylamine, dimethylformamide 등은 Sigma사의 특급시약을 정제하지 않고 사용하였으며, 적정 시약으로 Aldrich사의 특급시약인 HClO₄와 지시약으로 thymol blue을 사용하였다.

용질은 Fig. 1의 구조를 갖는 스테로이드계통의 생식 호르몬인 progesterone, estrone, estradiol, testosterone으로 Sigma계 특급시약을 사용하였다. 그리고 방사선 동위원소로는 삼중수소로 표지된 ³H-progesterone, ³H-estrone, ³H-estradiol, ³H-testosterone으로 Dupont 회사의 제품을 사용하였다.

고분자의 합성. Benzyl alcohol과 L-glutamic acid를 100°C로 가열하면 ester가 생성되는데, 이를 40°C에서 COCl₂와 THF를 용매로 하여 반응시키면 γ-benzyl L-glutamate N-carboxyanhydride(BLG-NCA)가 얻어진다. 이 생성물을 실온에서 triethylamine을 개시제로 하여 CH₂Cl₂ 중에서 반응시키면 PBLG가 생성된다. 생성된 PBLG에 methoxypolyoxypropyleneamine을 넣어 실온에서 CH₂Cl₂ 중에서 반

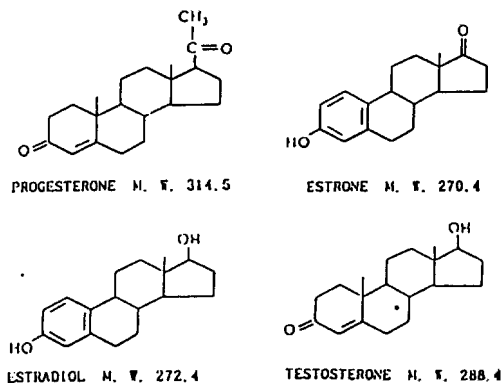


Fig. 1. Structure of solutes.

응시키면 PBLG-POP의 블록공중합체가 생성된다²⁷. 이때 이 생성물을 ¹H-NMR spectrum으로 AB 형태 블록공중합체라는 것을 확인하였다.

그리고 amine-terminated polyoxypropylene과 2배의 BLG-NCA를 실온에서 CH₂Cl₂ 중에서 반응시켜 PBLG-POP-PBLG의 ABA 형태 블록공중합체를 얻을 수 있다^{28,29}.

방출량 계산. 시간에 따른 방출된 용질의 양은 다음과 같은 Higuchi 식²⁶에 의하여 얻을 수 있다.

$$Q = [D(2C - C_s) C_s t]^{1/2}$$

여기서 Q 는 막의 단위면적당 시간 t 후에 방출된 용질의 양이고, D 는 막으로부터의 용질의 확산이고, C 는 초기농도, C_s 는 매트릭스내 용질의 용해도이다. 위 식을 다시쓰면 $Q = R t^{1/2}$ 이고, $R = [D(2C - C_s) C_s]^{1/2}$ 이며, 여기서 R 은 방출률이며, 방출량 Q 를 $t^{1/2}$ 에 대해서 plot할 때 얻어진 직선의 기울기 즉, 방출률(R)로부터 확산계수(D)를 구할 수 있다³⁰.

매트릭스 제조. THF로 녹인 고분자에 고분자량의 1%에 해당하는 용질 즉, progesterone, estrone, estradiol, testosterone을 각각 섞고, 삼중수소로 표지된 호르몬을 주입하여 일정시간 교반한 다음, 녹아있는 가스를 진공펌프로 뽑아낸 후(degassing)에 미량피펫(micropipet)을 이용하여 aluminum plate hole(1 cm×1 cm)에 360 μl을 떨어뜨려 실온에서 48시간 방치하여 THF를 증발시켜 굳힌 다음, 굳어진 매트릭스를 떼어 내어 실험에 사용하였다.

Release system 구성. 위에서 만든 매트릭스를

pH 4.0, pH 7.4, pH 10.0의 완충용액이 각각 23 ml씩 들어 있는 비이커에 넣고, 용액의 증발을 막기 위해 잘 밀봉한 후, boundary effects를 없애기 위하여 자석저개(magnetic bar)를 넣어 일정한 속도로 회전시키면서 용질이 용액속으로 확산되도록 한다.

Fick의 법칙에 따른 방출률 조사. 일정한 시간 간격으로 확산되어 나온 용질을 함유하는 용액을 250 μl씩 취하여 plastic vial 속에 넣은 다음 Dupont사의 aquasol 10 ml를 넣고, 액체삼광 계측기를 이용하여 방출된 용질의 양을 측정한다.

결과 및 고찰

공중합체의 합성

AB 형태 이종블록공중합체³¹⁻³³. PBLG-POP 이종블록공중합체의 합성과정을 Fig. 2에 나타내었다.

NCA의 적외선 흡수 피크가 1800 cm⁻¹ 부근에서 완전히 소멸되었을 때 반응이 완결된 것으로 보고 중합 용액을 농축하여 ethyl ether에 침전시킴으로써 미반응한 POP를 제거할 수 있다. 또한 벤젠/아세톤 (1:1 v/v) 혼합용액에 PBLG가 녹는점을 이용하여 클로로포름에 녹인 중합물을 벤젠/아세톤 혼합용액에 침전시켰다. 그러나 혼합용액에 녹은 PBLG의 양은 거의 무시할 정도였으므로 얻어진 최종 생성물을 클로로포름에 녹여 PBLG와 POP의 공중합물의 ¹H-NMR로 spectrum을 조사하여 구조를 확인한 결과는 Fig. 3과 같다. 그 결과를 보면 1.6 ppm에서 oxypropylene의 methyl기에 기인한 피크가 나타나고 7.2 ppm에서 benzyl ester의 phenyl기에 기인한 피크가 나타나는 것으로부터 AB 형태의 이종블록 공중합체의 구조를 확인할 수 있었다.

25°C의 CH₂Cl₂ 중에서 α-aminopoly(oxypropy-

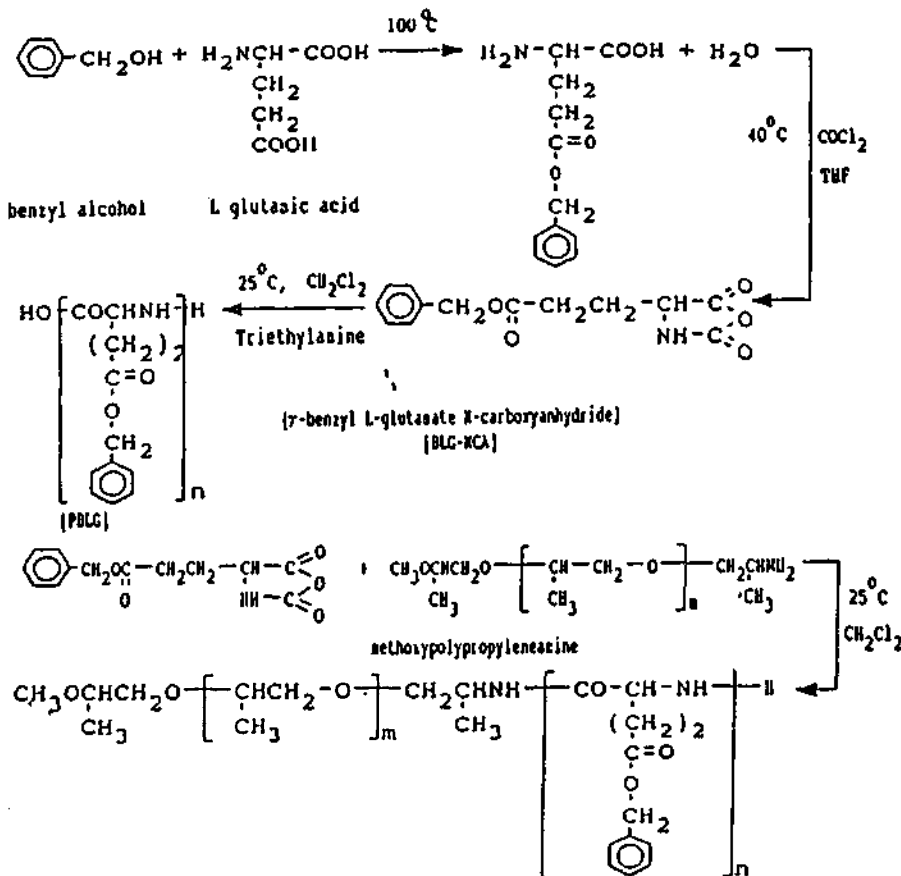


Fig. 2. The synthesis of AB type diblock copolymer for PBLG-POP.

lene)과 γ -benzyl L-glutamate NCA의 비를 변화시켜 공중합한 결과는 Table 1과 같다. Ethyl ether에 불용인 침전물을 기준으로 하였을 때 수율은 82~87%이었고, NMR 피크의 수소적분비에 의하여 계산된 블록 공중합체 중 γ -benzyl L-glutamate의 중합도는 이론값과 거의 일치하였다.

합성된 PBLG-POP1과 PBLG-POP2 필름을 인산 완충용액(phosphate buffer) 속에 담구어 두었다가 일정한 시간 간격으로 필름을 꺼내어 휴지(tissue)로 표면을 닦은 후의 무게(W_a)와 건조막의 무게(W_d)를 구하여 팽윤도(degree of swelling)를 측정된 결과는 Fig. 4와 같다. 이때 PBLG-POP1과 PBLG-POP2의 팽윤도의 차이는 크게 나타나지 않았다.

그리고 AB 형태 이종블록공중합체의 물리적 성질을 비교하여 보면 Table 2와 같다. Dimethylformamide를 용매로 하여 Ubbelohde 점도계로 점도를 측정된 결과 PBLG-POP1의 극한 점도값은 0.16이었고, PBLG-POP2는 0.17로써 큰 차이를 나타내지 않았다. 그리고 중합체 필름표면의 접촉각은 micro syringe를 이용하여 작은 물방울을 필름위에 부착시켜 Goniometer로 접촉각을 측정된 후 평균값을

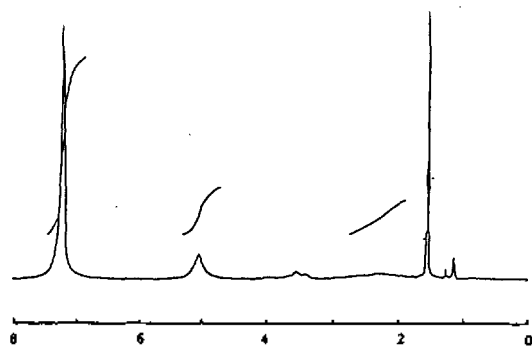


Fig. 3. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of PBLG-POP2 block copolymer in CDCl_3 .

Table 1. Block copolymerization of γ -benzyl-L-glutamate NCA with α -aminopoly(oxypropylene) at 25°C in CH_2Cl_2

Samples	Glu(OBzl)NCA mol/l $\times 10^3$	POP		Yield(%) ^c	Block copolymer(n) ^d	
		mol/l $\times 10^4$ ^a	m ^b		calcd.	by NMR
PBLG-POP1	5.685	2.841	33	87	20	18
PBLG-POP2	6.162	1.198	33	82	51	40

^aConcentration of amino group. ^bDegree of polymerization of oxypropylene. ^cEther-insoluble product. ^dDegree of polymerization of γ -benzyl-L-glutamate.

접촉각(water contact angle)으로 하였고, 그 값은 $66\sim 67^\circ$ 로 나타났다. 이는 친수성 고분자표면 위의 물의 접촉각은 $20\sim 30^\circ$ 이고, 소수성 고분자 위의 접촉각은 $90\sim 130^\circ$ 이므로³⁴, PBLG-POP1과 PBLG-POP2는 친수성과 소수성 고분자의 중간 정도의 성질을 나타낸다고 할 수 있다. Polyoxypropylene은 측쇄의 메틸그룹으로 인하여 poly(γ -benzyl L-glutamate)와 거의 비슷한 표면에너지를 나타낸다³⁵.

ABA 형태 삼중블록공중합체^{28,29}. ABA 형태 삼중블록공중합체의 합성과정은 Fig. 5와 같고, 그들 고분자의 점성도와 무게평균 분자량, 그리고 propylene glycol의 함량을 Table 3에 나타내었다. PBLG-POP 블록공중합체의 분자량은 dichloroacetic acid

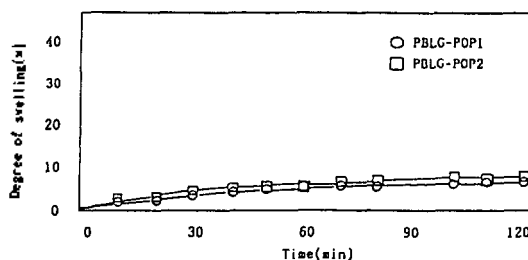


Fig. 4. Dynamic swelling degree of PBLG-POP1 and PBLG-POP2 as a function of incubation time. Degree of swelling(%) = $\frac{W_a - W_d}{W_a} \times 100$

Table 2. Physical properties of AB type block copolymers

Samples	$[\eta]^a$	Water contact angles (degree) ^b
PBLG-POP1	0.16	67 ± 4
PBLG-POP2	0.17	66 ± 3

^aMeasured in dimethylformamide. ^bMeasured by sessile droplet method.

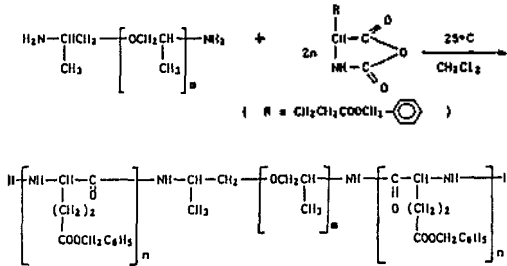


Fig. 5. The synthesis of ABA type triblock copolymer for GPG.

Table 3. Limiting viscosity number, $[\eta]$, weight-average mol. wt, \bar{M}_w , and composition of samples prepared

Samples	$[\eta]$ dl·g ⁻¹	$\bar{M}_w \cdot 10^{-4}$ g·mol ⁻¹	Content of propylene glycol units	
			in mol%	in wt%
PBLG	1.49	27.3	0.0	0.0
GPG-1	0.60	9.6	17.0	5.1
GPG-2	0.40	6.0	26.0	8.5
GPG-3	0.10	1.2	60.0	28.4

를 용매로 사용하고 Ubbelohde형 점도계로 극한 점도 $[\eta]$ 값을 측정하여 Doty³⁶와 그의 공동연구자들이 제안한 $[\eta]$ 값과 분자량간의 상관관계식으로부터 구하였다. 점성도(η)는 PBLG가 1.49 dl/g으로서 가장 크고 GPG1, GPG2, GPG3 순으로 점성도가 작아지며, 무게평균 분자량(\bar{M}_w)도 마찬가지로 PBLG가 가장 크고, GPG1, GPG2, GPG3 순으로 작아짐을 볼 수 있다. Propylene glycol의 함량은 PBLG가 propylene glycol을 포함하고 있지 않으므로 함량이 0이며 GPG1은 17 mol%, GPG2는 26 mol%, GPG3는 60 mol%로 GPG3가 propylene glycol의 함량이 가장 많다. 이들 각각을 무게%로 나타내면 5.1, 8.5, 28.4 wt% 이다.

IR spectrum을 이용하여 PBLG, GPG1, GPG2, GPG3와 같은 polypeptide의 특성 피크를 조사하면 Fig. 6과 같이 나타난다. 이것은 클로로포름으로 casting한 각 블록공중합체의 고체 필름을 1800~500 cm⁻¹ 영역에서 IR 피크를 보면, 각 GPG와 PBLG는 폴리펩티드속에 있는 아미드기의 특성피크가 1650, 1550과 615 cm⁻¹에서 나타나므로 각 블록공중합체

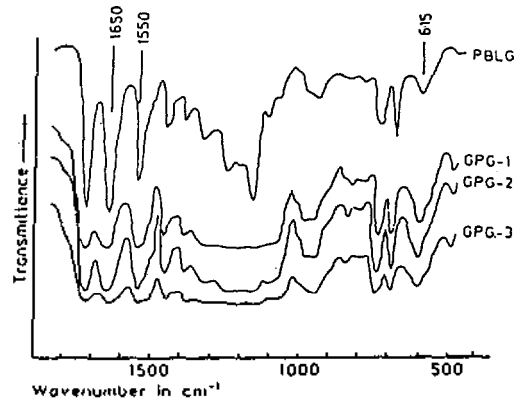


Fig. 6. IR spectra of PBLG and GPG triblock copolymers.

의 사슬형태(chain conformation)을 확인하였다. 즉 GPG 중의 펩티드 블록은 α -helix 구조를 하고 있음을 알 수 있었다.

고분자 매트릭스의 방출률 조사

PBLG, GPG1, GPG2 그리고 GPG3를 매트릭스로 만들었을 때 PBLG는 알루미늄판에서 떼어 내기가 힘들어 막을 만들지 못하였고, GPG2와 GPG3는 막의 균열이 생겨 막을 형성할 수 없었으나 GPG1은 쉽게 막을 형성하였으므로 용질의 방출 실험에는 GPG1만 사용하였다.

GPG1, PBLG-POP1과 PBLG-POP2를 4개의 시험관에 넣고, 고분자 무게의 약 1%에 해당하는 스테로이드를 넣어 고분자와 약물을 잘 혼합한 후 매트릭스를 만들었다. 만든 고분자-약물 매트릭스를 실험에 사용하기 위하여 각각의 무게와 두께를 측정된 결과는 Table 4와 같다.

pH의 영향. pH 7.4(phosphate buffer), pH 10.0의 완충용액 속에 고분자 매트릭스를 넣어 용질의 방출된 양을 측정된 후, 각 매트릭스를 통한 용질의 확산계수(D), 방출률(R)과 분배계수(K)를 구하였다. 분배계수(K)는 초기 수용액내의 용질의 농도를 일정하게 한 후 여기에 용질을 포함하지 않은 매트릭스를 담구어 평형에 달한 후 매트릭스내로 스며 들어간 후와 전의 농도비로 구하였다. 매트릭스내의 용질의 용해도(C)는 분배계수(K)와 용질의 용해도(C₀)로부터 구할 수 있다.

GPG1 고분자를 이용하여 만든 매트릭스에서 용

Table 4. Components of matrices containing solutes

		Progesterone	Estrone	Estradiol	Testosterone
GPG1	Thickness and weight of matrices	0.280 mm	0.312 mm	0.312 mm	0.228 mm
		7.130×10^{-3} g	7.525×10^{-3} g	7.575×10^{-3} g	7.478×10^{-3} g
		0.280 mm	0.301 mm	0.316 mm	0.283 mm
		7.135×10^{-3} g	7.503×10^{-3} g	7.633×10^{-3} g	7.458×10^{-3} g
		0.286 mm	0.305 mm	0.309 mm	0.291 mm
		7.170×10^{-3} g	7.523×10^{-3} g	7.578×10^{-3} g	7.488×10^{-3} g
		0.288 mm	0.306 mm	0.315 mm	0.282 mm
		7.153×10^{-3} g	7.530×10^{-3} g	7.625×10^{-3} g	7.453×10^{-3} g
PBLG-POP1	Thickness and weight of matrices	0.184 mm	0.177 mm	0.179 mm	0.178 mm
		4.550×10^{-3} g	4.495×10^{-3} g	4.478×10^{-3} g	4.468×10^{-3} g
		0.179 mm	0.183 mm	0.170 mm	0.183 mm
		4.505×10^{-3} g	4.535×10^{-3} g	4.348×10^{-3} g	4.545×10^{-3} g
		0.181 mm	0.179 mm	0.183 mm	0.181 mm
		4.525×10^{-3} g	4.508×10^{-3} g	4.558×10^{-3} g	4.525×10^{-3} g
		0.180 mm	0.181 mm	0.180 mm	0.178 mm
		4.501×10^{-3} g	4.513×10^{-3} g	4.345×10^{-3} g	4.430×10^{-3} g
PBLG-POP2	Thickness and weight of matrices	0.171 mm	0.169 mm	0.173 mm	0.177 mm
		4.325×10^{-3} g	4.328×10^{-3} g	4.345×10^{-3} g	4.430×10^{-3} g
		0.178 mm	0.172 mm	0.175 mm	0.179 mm
		4.303×10^{-3} g	4.338×10^{-3} g	4.420×10^{-3} g	4.473×10^{-3} g
		0.168 mm	0.171 mm	0.172 mm	0.173 mm
		4.310×10^{-3} g	4.323×10^{-3} g	4.340×10^{-3} g	4.525×10^{-3} g
		0.167 mm	0.180 mm	0.180 mm	0.183 mm
		4.323×10^{-3} g	4.303×10^{-3} g	4.525×10^{-3} g	4.528×10^{-3} g

질의 확산계수와 방출물들 Table 5에 나타내었다. 이때 progesterone을 용질로 하였을 때의 방출물은 pH 4.0일 때 24.60로 가장 크고, pH 7.4일 때는 21.01 이었으며, pH 10.0일 때 20.80로 가장 적은 값을 얻었다. Estrone과 testosterone도 마찬가지로 pH가 낮은 산성용액에서 방출물이 큼을 볼 수 있다. 이는 양성자의 농도 증가로 폴리아미노산내의 수소결합이 깨어져 용질의 투과가 커지기 때문이다. 그러나 estradiol을 용질로 하였을 경우 pH 4.0에서보다 pH 7.4와 pH 10에서 방출물이 크게 나타남을 볼 수 있다. 이는 염기성용액에서 estradiol내의 2개의 수산기의 양성자가 해리하여 이온으로 되어 물체적(molar volume)이 감소하기 때문이다. 그리고 용질과 매트릭스와의 상호작용을 나타내는 분배계수를 보면, progesterone은 분자속에 포함된 카보닐기가 양성자가 많은 산성용액에서는 양성자첨가가 되어 양이온이 되므로 매트릭스내의 폴리펩티드 결합중에 있는 NH

결합과 수소결합의 형성이 어렵고, 또한 폴리펩티드속에 포함된 카보닐기의 반발력에 의하여 분배계수가 작지만 염기성용액에서는 progesterone이 용액에 의하여 분자자체의 변화가 없고, 분자속에 포함된 카보닐기와 폴리펩티드속의 NH와 수소결합을 형성하고, 또한 methyl기와 매트릭스내의 소수성 부분과 결합할 수 있으므로 분배계수가 크게 나타난다. Estrone은 산성과 중성에서 분자내의 페닐기에 있는 양성자가 해리하기 어려우므로 매트릭스내에 있는 카보닐기와 수소결합을 형성하고 또한 분자내의 카보닐기와 매트릭스내의 N-H와 수소결합을 형성하므로 분배계수가 크게 나타난다. 그러나 염기성용액에서는 페닐기가 해리하여 양성자가 생성되고 수산기가 음이온으로 되므로 매트릭스내의 N-H 결합보다 분자구조상으로 볼 때 카보닐기와 산소원자의 수가 많으므로 수소결합을 형성하여 안정한 것보다 카보닐에 의하여 반발력이 크게 작용할

Table 5. The properties of matrices (GPG1) on solutes

		K	C_o ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	C_i ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	C ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	$D \times 10^2$ (cm^2/sec)	R ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^2/\text{ml} \cdot \text{hr}^{1/2}$)
Progesterone	pH 4.0	3.62	15.57	56.31	71.88	14.96	24.60
	pH 7.4	3.47	16.07	55.81	71.88	11.01	21.01
	pH 10.0	13.46	4.97	66.91	71.88	8.99	20.80
Estrone	pH 4.0	14.34	4.93	70.69	75.62	77.59	64.40
	pH 7.4	15.69	4.53	71.09	75.62	41.17	47.05
	pH 10.0	5.33	11.94	63.68	75.62	29.86	37.92
Estradiol	pH 4.0	9.63	7.19	69.27	76.46	58.59	55.71
	pH 7.4	15.06	4.76	71.70	76.46	111.97	78.35
	pH 10.0	2.96	19.33	57.13	76.46	134.43	76.63
Testosterone	pH 4.0	6.74	9.70	65.42	75.12	17.46	29.29
	pH 7.4	9.82	6.94	68.18	75.12	14.08	26.85
	pH 10.0	2.37	22.27	52.85	75.12	22.72	30.03

C: Total concentration, K: Partition coefficient, C_o : Solubility in water, D: Diffusion coefficient, C_i : Solubility in matrix phase, R: Release rate.

것이므로 분배계수가 작다. Estradiol은 중성>산성>염기성의 순으로 분배계수가 크다. 이는 중성에서 페닐기의 수산기와 cyclopentanyl기의 수산기의 해리가 적게 일어날 것이므로 매트릭스내의 카보닐기와 수소결합을 형성하여 분배계수가 커지지만, 염기성용액에서는 페닐기가 해리하여 양성자와 수산기가 음이온으로 되므로 매트릭스내의 카보닐기의 반발로 분배계수가 작아진다. 이때 cyclopentanyl기의 수산기는 페닐기보다 해리하기 어려우므로 크게 영향을 미치지 않으며 매트릭스내의 카보닐기와 수소결합 형성이 가능하다. 실험결과를 보면 수소결합 형성이 크지 않음을 알 수 있다. 또한 산성용액에서는 두 수산기가 해리되지 않고 매트릭스내의 카보닐기와 수소결합을 할 수 있다. 그러나 중성용액에서 보다 분배계수가 작은 이유는 산성용액에서의 양성자 매트릭스내의 카보닐기에 결합하여 양이온을 형성할 수 있으므로 수소결합의 영향이 줄어들기 때문이다. testosterone의 경우는 estradiol과 같은 경향으로 중성>염기성>산성의 순으로 분배계수가 커진다. 이것은 testosterone의 구조가 공액이중결합을 가지는 카보닐기를 가지므로 이것이 매트릭스내의 N-H 결합과 작용하여 수소결합을 형성하며, cyclopentanyl기의 수산기가 매트릭스내의 카보닐기와 작용하여 수소결합을 형성하므로 분배계수가 커

지만 산성과 염기성용액에서는 estradiol과 같은 이유로 분배계수가 작아진다.

PBLG-POP1 고분자를 이용하여 만든 매트릭스의 용질의 확산계수와 방출률을 Table 6에 나타내었다. PBLG-POP1 매트릭스내의 progesterone은 산성일 때 분배계수가 가장 크고, 중성과 염기성에서는 거의 같다. 이는 산성하에서 progesterone 속에 포함된 두 개의 카보닐기가 양성자첨가가 되어 oxypropylene내의 산소원자와 γ -benzyl-L-glutamate 속의 카보닐기나 산소원자와의 수소결합을 하기 때문에 산성에서 분배계수가 크게 나타나며, estrone은 염기성에서 분배계수가 가장 크고 산성, 중성 순으로 작아짐을 볼 수 있다. 이는 염기성용액에서는 페닐기의 수산기가 해리하여 음이온이 되고, cyclopentanyl의 카보닐기가 매트릭스내에서 상호작용을 하기 때문에 분배계수가 커지며, 중성용액에서는 estrone 분자에 큰 변화가 없으므로 매트릭스에 영향을 미치는 효과가 줄어들었기 때문에 분배계수가 가장 작다. 한편 estradiol도 염기성, 산성, 중성 순으로 분배계수가 작아지는 것은 액성에 따라 분자내의 두 수산기의 변화가 매트릭스와의 상호작용으로 염기성에서 가장 크고, 중성에서는 변화가 적으므로 분배계수가 가장 작다. testosterone은 산성에서 분배계수가 가장 크고, 염기성, 중성 순으로 작아지는

Table 6. The properties of matrices (PBLG-POP1) on solutes

		K	C_s ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	C_i ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	C ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	$D \times 10^2$ (cm^2/sec)	R ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^2/\text{ml} \cdot \text{hr}^{1/2}$)
Progesterone	pH 4.0	9.84	4.06	39.94	44.00	17.31	17.44
	pH 7.4	6.43	5.92	38.08	44.00	14.96	15.83
	pH 10.0	6.83	5.62	38.38	44.00	11.33	13.83
Estrone	pH 4.0	8.07	4.84	39.07	43.91	32.90	23.77
	pH 7.4	5.32	6.95	36.96	43.91	39.53	25.33
	pH 10.0	14.74	2.79	41.12	43.91	65.17	34.30
Estradiol	pH 4.0	5.84	6.35	37.07	43.42	15.00	15.50
	pH 7.4	4.52	7.86	35.56	43.42	29.57	21.37
	pH 10.0	6.60	5.71	37.71	43.42	16.13	16.25
Testosterone	pH 4.0	6.88	5.56	38.25	43.81	32.06	23.18
	pH 7.4	4.98	7.32	36.49	43.81	15.30	15.64
	pH 10.0	6.71	5.68	38.13	43.81	15.48	16.08

C : Total concentration, K : Partition coefficient, C_s : Solubility in water, D : Diffusion coefficient, C_i : Solubility in matrix phase, R : Release rate.

Table 7. The properties of matrices (PBLG-POP2) on solutes

		K	C_s ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	C_i ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	C ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	$D \times 10^2$ (cm^2/sec)	R ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^2/\text{ml} \cdot \text{hr}^{1/2}$)
Progesterone	pH 4.0	7.67	4.91	37.65	42.56	8.57	11.72
	pH 7.4	3.49	9.48	33.08	42.56	5.00	8.38
	pH 10.0	5.14	6.93	35.63	42.56	3.70	10.52
Estrone	pH 4.0	10.84	3.56	38.60	42.16	21.95	18.90
	pH 7.4	4.93	7.11	35.05	42.16	23.86	18.78
	pH 10.0	7.35	5.05	37.11	42.26	13.49	14.53
Estradiol	pH 4.0	5.57	6.63	36.92	43.55	11.63	13.67
	pH 7.4	4.24	8.30	35.20	43.55	5.81	9.02
	pH 10.0	3.68	9.31	34.24	43.55	7.27	10.41
Testosterone	pH 4.0	5.04	7.30	36.79	44.09	9.29	12.27
	pH 7.4	7.02	5.50	38.59	44.09	13.74	15.29
	pH 10.0	3.20	10.51	33.58	44.09	3.77	7.47

C : Total concentration, K : Partition coefficient, C_s : Solubility in water, D : Diffusion coefficient, C_i : Solubility in matrix phase, R : Release rate.

것은 progesterone이 산성에서 가장 큰 분배계수를 가지는 이유와 같으며, cyclopentanyl내의 수산기는 페닐기내의 수산기보다 해리상수가 아주 작기 때문에 영향이 크지 않다.

PBLG-POP2는 PBLG-POP1보다 γ -benzyl-L-glutamate의 함량이 2배 이상 많기 때문에 Table 7에서 progesterone은 PBLG-POP1 매트릭스와 마찬가지로

산성에서 분배계수가 가장 크고, 중성에서 가장 작다. 그러나 esteron은 PBLG-POP1 매트릭스에서는 염기성에서 분배계수가 가장 컸으나, PBLG-POP 2에서는 산성에서 가장 크다. 이는 cyclopentanyl기 내의 카보닐기가 양성자첨가가 되어 γ -benzyl-L-glutamate내의 카보닐기와 산소원자와의 수소결합을 형성하기 때문이다. estradiol은 산성에서 가장 크고,

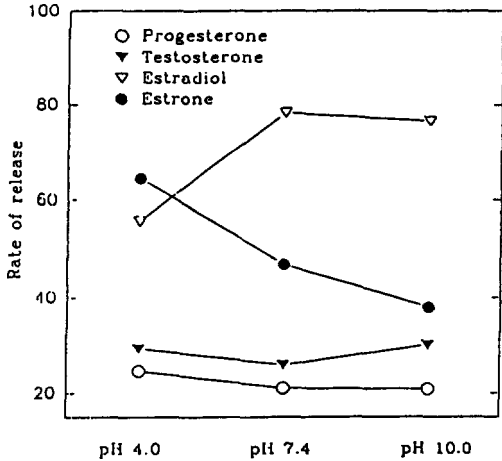


Fig. 7. Release profiles of the steroids in the GPG1 film.

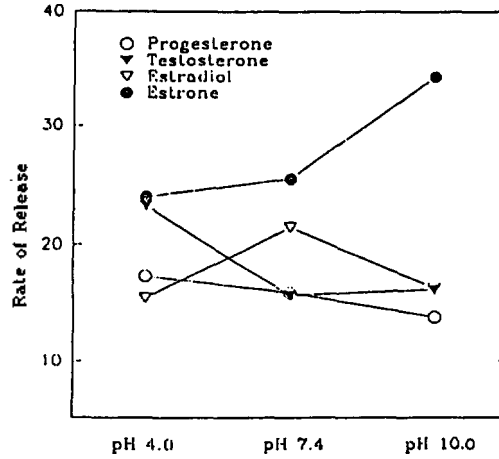


Fig. 8. Release profiles of the steroids in the PBLG-POP1 film

중성, 염기성의 순으로 감소한다. 이와 같은 현상은 두 개의 수산기가 매트릭스내의 카보닐기나 산소원자와의 수소결합으로 분배계수가 커지기 때문이다. 산성과 염기성용액에서는 estradiol이 해리하고, 또 매트릭스내의 카보닐기와 산소원자와의 반발력에 의하여 분배계수가 작아진다. testosterone은 중성, 산성, 염기성의 순으로 분배계수가 감소한다. 염기성용액에서 분배계수가 가장 작은 것은 카보닐기 주위의 공액이중결합으로 전자의 이동이 쉽고, cyclopentanyl기 속의 수산기가 해리하여 음이온으로 되므로 매트릭스내의 산소원자와 카보닐기와의 반발력에 의하여 분배계수가 작고, 산성용액에서 분자내의 카보닐기에 양성자첨가가 되고, 또 매트릭스내의 산소원자가 카보닐기들이 양성자첨가가 될 가능성이 있으므로 그들 간의 상호작용으로 염기성보다는 커진다. 그러나 중성용액 하에서는 testosterone 분자나 매트릭스가 액성에 의하여 변화되지 않았으므로 그들 간의 상호작용으로 분배계수가 커진 것이다. 이러한 이유로 Table 6, 7에서 각 매트릭스와 스테로이드들 간에 pH, 용질의 종류, 온도에 따라 방출률의 차이가 생기게 된다.

용질의 영향. GPG1 고분자 매트릭스를 통한 용질의 방출률을 나타낸 Table 5을 그래프로 도시하면 Fig. 7과 같이 나타낼 수 있다.

용질의 분자량은 Fig. 1에서 볼 수 있는 바와 같이 progesterone이 가장 크고 testosterone, estradiol,

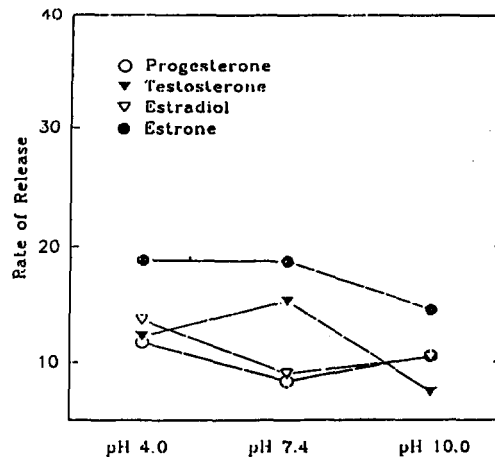


Fig. 9. Release profiles of the steroids in the PBLG-POP2 film

estrone의 순으로 적어진다. Fig. 7에 도시한 용질과 방출률과의 관계를 살펴보면, 분자량이 큰 progesterone의 방출률이 가장 적고, testosterone, estradiol, estrone의 순으로 방출률이 커짐을 볼 수 있으므로 분자량의 크기가 방출량에 직접적인 관계가 있음을 알 수 있다^{26,30}.

PBLG-POP1과 PBLG-POP2 고분자 매트릭스를 통한 용질의 종류에 따른 방출률을 앞의 Table 6과 7의 결과를 이용하여 Fig. 8, 9와 같이 그래프로 도시하였다. PBLG-POP1과 PBLG-POP2도 GPG1 고분자 매트릭스와 마찬가지로 분자량이 큰 progeste-

Table 8. The effect of temperature to the release of progesterone at pH 7.4

		C_a ($\mu\text{g/ml}$)	C_s ($\mu\text{g/ml}$)	C ($\mu\text{g/ml}$)	$D \times 10^2$ (cm^2/sec)	R ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^2/\text{ml} \cdot \text{hr}^{1/2}$)
GPG1	20°C	15.57	56.31	71.88	11.01	21.01
	40°C	8.11	63.77	71.88	41.28	43.50
PBLG-POP1	20°C	5.92	38.08	44.00	14.96	15.83
	40°C	3.57	40.43	44.00	147.01	51.14
PBLG-POP2	20°C	9.48	33.08	42.56	5.00	8.38
	40°C	6.60	35.96	42.56	62.50	30.92

rone의 방출률이 가장 적고, 분자량이 가장 적은 estradiol이 가장 잘 방출되어 방출률이 크게 나타남을 알 수 있다. 즉, 용질의 분자량과 방출률은 서로 반비례함을 알 수 있다.

고분자 매트릭스의 종류에 따른 영향. 앞의 Table 5와 6, 7에서 같은 pH에서 각각의 고분자 매트릭스에 따른 방출률과의 관계를 나타내었다.

pH 4.0에서 각 고분자 매트릭스의 방출률은 ABA 형태의 삼중 공중합체인 GPG1 고분자 매트릭스의 방출률이 가장 크고, AB 형태의 이중공중합체인 PBLG-POP1과 PBLG-POP2를 보면, POP의 함량이 크고, BLG의 중합도가 적은 PBLG-POP1이 PBLG-POP2 고분자 매트릭스보다 더 방출률이 크다는 것을 알 수 있다.

또한 pH 7.4와 pH 0.0일 때 고분자 매트릭스의 종류에 따른 방출률을 살펴보면, pH 4.0일 때와 마찬가지로 GPG1이 가장 방출률이 크고 PBLG-POP1, PBLG-POP2 순으로 방출률이 적어짐을 알 수 있다.

온도의 영향. 앞 실험에서 만든 progesterone을 용질로 한 각각의 고분자 매트릭스를 온도 20°C와 40°C에서 pH 7.4의 완충용액 속에서 방출률과 확산 계수를 구하여 Table 8에 나타내었다.

GPG1 고분자 매트릭스의 경우 20°C에서 방출률은 21.01이고 40°C에서는 43.50로 20°C에서 보다 40°C에서 방출률이 더 크게 나타났다.

PBLG-POP과 PBLG-POP2도 마찬가지로 20°C에서 보다 40°C에서 더 방출률이 크게 나타났다. 이와 같이 온도가 높을수록 매트릭스의 chain mobility가 증가하여 용질이 더 잘 방출됨을 알 수 있다.

결 론

ABA형 삼블록공중합체인 GPG1, GPG2와 GPG3 중에서 GPG2와 GPG3는 스테로이드와 혼합하였을 때 막의 균열이 생겨서 매트릭스틀 만들기에 적합하지 못하였으며, PBLG는 유리판과 알루미늄판과의 접착력이 강하여 막이 잘 떨어지지 않았다. PBLG-POP1과 PBLG-POP2를 고분자 물질로 사용한 매트릭스에서는 progesterone, estradiol과 testosterone은 pH가 낮은 산성용액에서 방출률이 컸으나 estrone은 염기성용액에서 방출률이 컸으며, GPG1의 ABA 삼블록공중합체에서는 progesterone, estrone과 testosterone은 산성용액에서 더 방출률이 컸으나 estradiol은 중성이나 염기성에서 더 방출률이 크게 나타났다.

용질의 분자량과 방출률은 서로 반비례하였으며, 온도가 증가할수록 방출률은 증가하였다.

고분자 매트릭스의 종류에 따른 영향은 ABA형 삼블록공중합체인 GPG1 고분자 매트릭스의 방출률이 가장 크고, AB형 이블록공중합체인 PBLG-POP1과 PBLG-POP2 중 POP의 함량이 많고 중합도가 적은 PBLG-POP1이 PBLG-POP2 고분자 매트릭스보다 더 방출률이 크므로 GPG1이 가장 방출률이 크고 PBLG-POP1과 PBLG-POP2 순으로 방출률이 줄어든다는 것을 알 수 있었다.

인 용 문 헌

1. H. Leuchs, *Ber.*, **39**, 857 (1906).
2. J. P. Greenstein, "Chemistry of Amino Acids", Vol. 1~3, John Wiley and Sons, New York, 1961.
3. E. Schroder, "The Peptides", Vol. 1, 2, Academic Press, New York, 1965.
4. Eugen Muller *et al.*, "Synthese Peptiden, Metho-

- den Organischen chemie (Houben-WegI)", Band 15, Teil 1.2, George Thieme Verlag Stuttgart 1974.
5. 泉屋信夫 他, "ペプチド合成", 丸善 (1985).
 6. 脇竝典, 泉屋信夫, 蛋白質 核酸 酵素 27, 808 (1982).
 7. S. Egusa, M. Sisido, and Y. Imanishi, *Macromol.*, **18**, 882, 890 (1985).
 8. M. Goodman and M. L. Falxa, *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 3863 (1967).
 9. A. Ueno, K. Takahashi, J. Anzai, and T. Osa, *J. Am. Chem. Soc.*, **13**, 459 (1980).
 10. S. Chandrasekhar and K. N. S. Rao, *Acta Crystallogr.*, **A24**, 445 (1968).
 11. R. B. Meyer, L. Liebert, and L. Strzelecki, *J. De. Phys.*, **36**, 269 (1975).
 12. C. H. Lochmiller and R. W. Souter, *J. of Phys. Chem.* **77**(25), 3016 (1973).
 13. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature 1969, *Biochemistry*, **9**, 3471 (1970).
 14. G. N. Ramachandran and V. Sasisekharan, *Adv. Prot. Chem.*, **23**, 283 (1968).
 15. M. Maeda *et al.*, *Macromol. Chem.*, **181**, 2251 (1980).
 16. V. Sandek *et al.*, *Biopolymer*, **21**, 1011 (1982).
 17. G. Blashe, *Angew. Chem. Int. Ed Engel*, **19**, 13 (1980).
 18. M. Sisido in "Photophysics of polymers", ACS Symposium Series No. 358, Chap. 26.
 19. M. Sisido, A. Okamoto, S. Egusa, and Y. Imanishi, *Polym. J.*, **17**, 1253, 1263 (1983).
 20. S. Aiba, N. Minoura, and Y. Fujiwara, *J. Biomed. Mat. Res.*, **16**, 181 (1982).
 21. T. Hayashi, Y. Tabata, K. Takeshima, and A. Nakajima, *Polym. J.*, **17**, 1149 (1985).
 22. T. Hayashi, K. Takeshima, and A. Nakajima, *Polym. J.*, **17**, 1273 (1985).
 23. 妹尾學 他, "ポリアミノ酸", 94 (1986).
 24. K. R. Sidman, A. D. Schwope, W. O. Steber, S. E. Rudolph, and S. B. Poulin, *J. Membr. Sci.*, **7**, 277 (1980).
 25. K. R. Sidman, W. D. Steber, A. D. Schwope, and G. R. Schnaper, *Biopolymers*, **22**, 547 (1983).
 26. T. J. Roseman and W. I. Higuchi, *J. Pharm. Sci.*, **59**, 353 (1970).
 27. T. Kumaki, M. Sisido, and Y. Imanishi, *J. Biomed. Mater. Res.*, **19**, 785 (1985).
 28. C.-S. Cho, S.-W. Kim, Y.-K. Sung, and K.-Y. Kim, *Macromol. Chem.*, **189**, 1505 (1988).
 29. I.-K. Kang, Y. Ito, M. Sisido, and Y. Imanishi, *J. Biomed. Mater. Res.*, **23**, 223 (1989).
 30. T. Higuchi, *J. Pharm. Sci.*, **50**, 874 (1961).
 31. Y. Ito, K. Iwata, I.-K. Kang, Y. Imanish, and M. Sisido, *Int. J. Biol. Macromol.*, **10**, 201 (1988).
 32. I.-K. Kang, Y. Ito, Y. Imanish, and M. Sisido, *Int. J. Biol. Macromol.*, **10**, 169 (1988).
 33. I.-K. Kang, Y. Ito, M. Sisido, and Y. Imanishi, *J. Biomed. Mater. Res.*, **22**, 595 (1988).
 34. a) N. K. Adam, *The Physics and Chemistry of Surface*, Dover, New York, 1980; b) A. M. Adamson, *Physical Chemistry of Surface*, John Wiley and Sons, New York, 1967.
 35. I.-K. Kang, Y. Ito, M. Sisido, and Y. Imanishi, *Polym. J.*, **19**, 1329 (1987).
 36. P. Doty, J. H. Bradbury, and A. M. Sheraga, *Macromol.*, **5**, 739 (1972).