

Tri-Block Copolypeptide膜의 透過 및 抗血栓性

印敎鎮 · 李永茂 · 金啓用 · 李龍均*

漢陽大學校 工業化學科

*漢陽大學校 化學科

(1982년 12월 1일 접수, 1983년 1월 19일 심사완료)

要約: 親水性和疎水性 構造를 갖는 ABA型 tri-block copolypeptide를 *L*-glutamic acid와 *L*-leucine을 重合시켜서 얻었다. *p*-phenylenediamine을 開始劑로 하여 *L*-leucine *N*-carboxy anhydride (NCA)를 8일간 重合시킨 후 *r*-benzyl-*L*-glutamate NCA를 重合시켰다. 제조한 膜의 透過性, 含水率 및 臨界表面張力은 random copolypeptide나 homopolypeptide膜보다 매우 향상되었다. 또한 debenzylation으로 인한 機械의 特性의 커다란 감소는 없었다. 0.1% albumin용액으로 처리한 후 혈액응고시간은 10분이상 길어졌다. 親水疎水性을 갖는 block copolypeptide膜의 透水性 및 血液適合性이 우수함을 알 수 있었다.

1. 序 論

本研究에서는 親水性부분으로 *L*-glutamic acid, 疎水性부분으로 *L*-leucine을 교대로 갖고 있는 ABA型, tri-block copolypeptide를 重合시켰다. *r*-benzyl-*L*-glutamate segment의 벤질기를 가수분해하여 친수성인 카르복시기로 만든 重合體중의 *L*-glutamic acid의 친수성부분과, *L*-leucine의 소수성부분의 물비에 따른 물의 투과량, 인장강도, 신장률, 함수율, 접촉각 및 혈액응고시간을 조사하였다. 또한 이 重合體의 구조가 혈액응고에 미치는 영향과 albumin 처리한 후의 효과를 검토하였다.

2. 實驗方法

2.1 試藥

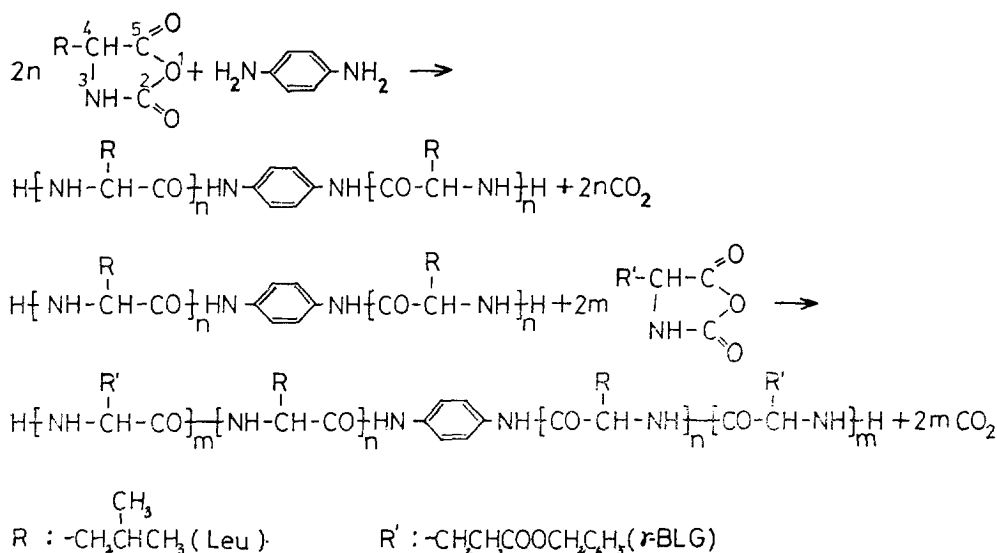
L-Leucine 및 *L*-glutamic acid는 日本 理化學藥品株式會社 製品 특급시약을 미분쇄하여, 적외선을 조사하며 12시간 감압건조를 하였다.

테트라히드로푸란, 에테르, 벤젠, 디옥산 등은 1급시약을 상법에 의해 완전 탈수한 후 증류하여 사용하였다. 초산에틸은 공업용시약을 CaH_2 로 수일간 환류한 다음 증류하였고, *n*-헥산은 공업용시약에 금속나트륨을 넣고 환류한 것을 증류하여 사용하였다.

2.2 *L*-Leucine NCA와 *r*-BLG NCA의 블록공중합

r-Benzyl-*L*-glutamate (*r*-BLG)는 *L*-glutamic acid와 벤질알코올을 황산촉매로 에스테르化하여 製造하였다. *L*-glutamic acid 88.2g, 벤질알코올 72g, 물 39g 및 98% 황산 58.3g을 70°C의 항온증탕에서 교반하며 반응시킨다. 30분 후에 투명액이 되면 감압하여 탈수시킨다. 반응물을 탄산수소나트륨 101g의 수용액으로 중화시켜 침전된 結晶을 찬 물로 씻고, 뜨거운 물로 세 3회 재결정한 후 적외선 照射下에 2일간 감압건조하였다.

r-BLG NCA와 *L*-leucine NCA는 각각 phosgene法으로 合成하였다^{1,8}.



L-Leucine NCA의 3%벤젠용액에 $D_p = [A]/[I]$ 에 따라 開始劑인 *p*-페닐렌디아민을 설계한 D_p 가 되도록 일정량을 주입하여 30°C로 8일간 1차중합을 하였다. 여기에 다음조성의 *r*-BLG NCA를 디옥산에 3%용액으로 만든 후 설계한 중합 물비에 따라 일정량을 주입하여 다시 30°C로 8일간 2차중합을 하였다.

중합이 진행되는 동안 양쪽말단은 아민기를 갖고있는 활성종으로 되어있어 계속 중합이 가능하다. 이 아민기가 NCA의 5원환의 5번탄소에 친핵공격으로 부가하면 CO₂가 유리된다. 중합도는 중합시 발생하는 CO₂를定量함으로써 중합전에 설계한 중합도와 비교하여 검토하였다. 불록共重

Table I. Composition and Characteristics of ABA Type Tri-block Copolypeptides

Sample	mol ratio of NCA (G)-(L)-(G)	(a) polymerization Solvents	(b) Conformation	(c) $[\eta]$ (dl/g)
PLG 9-1	10 : 180 : 10	benzene & dioxane	α -helix	0.51
PLG 7-3	30 : 140 : 30	"	"	0.67
PLG 5-5	50 : 100 : 50	"	"	0.44
PLG 4-6	60 : 80 : 60	"	"	0.61

(a) (G): L-glutamic acid, (L): L-leucine

(b) confirmed by infrared spectra.

(c) measured by Ubbelohde viscometer in trifluoroacetic acid at 25°C.

合體의 Characterization data는 Table I과 같다.

2.3 CO₂定量

重合할때 발생하는 CO₂의 정량은 Patchornik 등의 방법으로 하였다². 반응기내 질소가스를 1초에 1,2방울의 속도로 불어 넣으면서 중합시 발생하는 CO₂가스를 벤질아민, 에탄올 및 디옥산의 1:3:3비율의 혼합용액중에 흡수시켰다. 흡수액을 bromthymol blue지시약 존재하에 0.1N sodium methoxide(메탄올:벤젠=1:3)로 10분 간격으로 적정하였다.

2.4 HBr에 의한 Debenzylation

Debenzylation은 브롬과 테트라린을 반응시켜 발생하는 HBr가스를³ 빙초산에 흡수시킨 용액을 사용하였다^{4,5}. CaCl₂관을 붙인 반응기내의 중합 원액에 30% HBr빙초산 용액을 이론양의 2배를 넣고 1시간동안 교반하면서 0°C에서 반응시킨다. 5배량의 무수에테르를 주입하고 냉장고에 3~4시간 방치하여 debenzylation시킨 copolypeptide를 석출시켰다. 이 용액을 여과하고 무수 에테르로 세척한 후, 메탄올에 넣고 암모니아수를 소량넣어 펩티드를 유리시킨 다음 에테르로 다시 세척하고 건조한다.

2.5 製膜 및 透過實驗

중합체를 70°C에서 벤젠에 3%로 녹인 다음 유리판위에 일정한 두께로 流延하여 膜을 만들었

다. 물에 넣어 막을 분리한 후 감압건조하여 사용하였다. 막의 두께는 약 $15\mu\text{m}$ 이었다.

투과실험은 Batch式 투과장치¹¹로 하였다. 투과 장치의 실제용적은 350cc 이고 유효막면적은 12.6cm^2 이다. 온도는 항온중탕기로 20°C 에서 60°C 까지 변화시켰으며 압력은 질소가스를 사용하여 1기압에서 5기압까지 가하였다. Water flux, J_w 는 정상상태부터의 透水量을測定하여 다음 식으로부터 구하였다.

$$J_w = \frac{\text{투과량}}{\text{유효막면적} \times \text{투과시간}} \left[\frac{\text{mol}}{\text{cm}^2 \cdot \text{sec}} \right] \quad (1)$$

2.6 機械的 特性 및 接觸角 測定

인장강도는 日本 精密株式會社の Rheo-meter로서 引張用슬라이사를 사용하였다. crosshead speed는 2cm/min 로 하였다. ASTM D882-79규격에 따라서 시편을 제조하여 實驗하였다.

접촉각의 測定⁶은 日本 Erma光學株式會社製 Model G-1을 사용하였다. 시편은 제조한 膜으로, 유리판과 닿았던 부분을 위로하여 측정하였다. 한 시료에 대해 각 7~9회 측정하여 평균값을 接觸角으로 하였다.

2.7 인산염 완충용액의 製造와 血液凝固時間의 測定

$0.008665\text{ M KH}_2\text{PO}_4$ 와 $0.03032\text{ M Na}_2\text{HPO}_4$ 를 증류수에 녹여 pH7.4의 인산염완충용액 1l를 제조하였다. 이 용액에 albumin을 0.1%로 녹여 사용하였다.

혈액응고시간측정용 시편은 길이 70mm , 지름 10mm 의 시험관 내벽에 중합체용액을 도포한 후 40°C 에서 1일간 감압건조하여 사용하였다. 이중 일부는 0.1% albumin 인산염완충용액에 5시간동안 침지시킨 후 증류수로 닦은다음 건조하였다.

血液凝固時間 測定은 Lee-White法으로 하였다^{7,13}. 한 시료에 대해 각각 4개의 시편을 제조하여 측정한 평균값을 혈액응고시간으로 하였다.

3. 結果 및 考察

3.1 IR에 의한 Conformation의 확인

Poly(*r*-BLG)의 側鎖인 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ 에 있는 카르보닐基의 신축진동은 1740cm^{-1} 에서 나

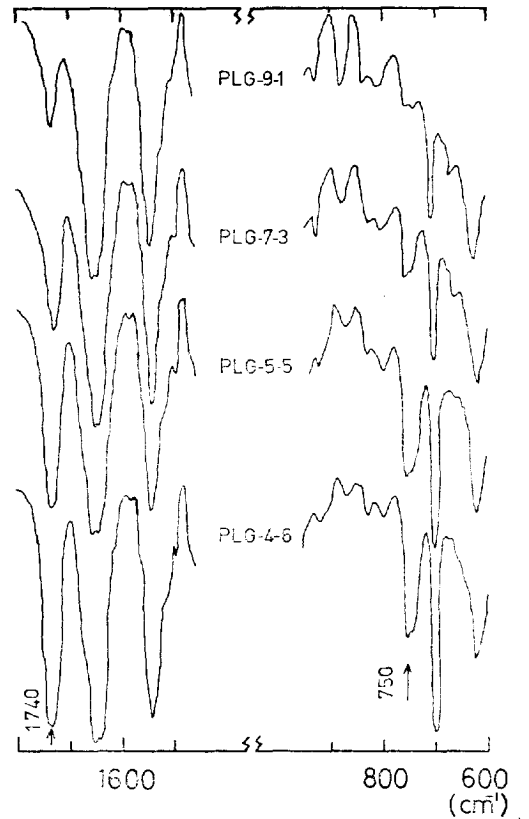


Fig. 1. IR spectra showing the gradual increase in absorption at 1740cm^{-1} and 750cm^{-1} . characteristic peak of side chain in *r*-BLG, with the increase in *r*-BLG ratio.

타나고, 벤질基의 mono-substituted phenyl基의 흡수띠는 750cm^{-1} 에서 나타난다. 반면 側鎖가 $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 인 poly(*L*-leucine)은 이 파장영역에서 흡수띠가 나타나지 않는다. debenzyla-tion前의 重合體에서 *r*-BLG의 함량은 PLG 9-1, 7-3, 5-5, 4-6 순으로 증가하고 있다. Fig.1에서 알 수 있듯이 *r*-BLG함량이 증대됨에 따라 이 두 영역에서 흡수띠의 크기가 증가하고 있어 설계한 조성으로 중합이 진행되었음을 알 수 있다.

또한 PLG중합체는 모두 1650cm^{-1} 에서 amide I, 1550cm^{-1} 에서 amide II 그리고 620cm^{-1} 에서 amide V의 흡수띠를 나타내는 것으로 보아 α -helix를 형성하고 있음을 알 수 있다.

3.2 IR에 의한 Debenzylation의 확인

HBr/CH₃COOH 용액으로 copolypeptide를 처리

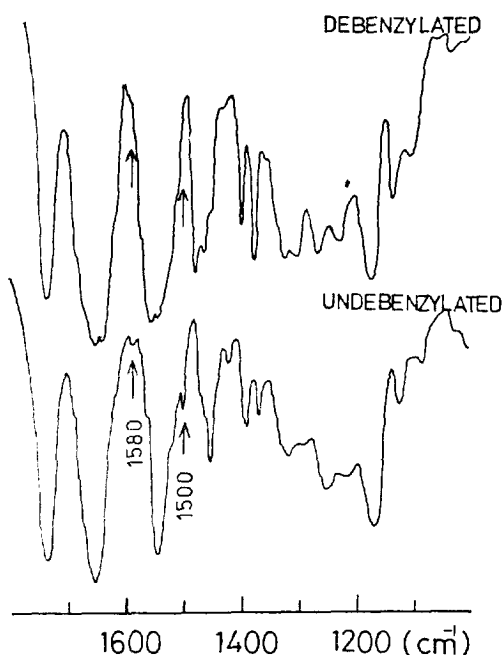


Fig. 2. IR spectra of PLG-4-6 showing the removal of benzyl group.

하면 *r*-benzyl-*L*-glutamate의 벤질기가 가수분해되어 glutamic acid로 변한다. 따라서 copolypeptide중의 벤질기의 有無로서 debenzylation이 일어난 것을 알 수 있다. benzyl기의 mono-substituted phenyl기는 1500, 1580 (1600)cm⁻¹에서 흡수띠가 나타나는데 Fig.2에서 알 수 있듯이 debenzylation된 것은 이 영역의 흡수띠가 나타나지 않은 것으로 보아 벤질기가 除去되었음을 알 수 있다.

3.3 親水性부분의 增大에 의한 透水量의 변화

친수성을 증대시키기 위하여 *r*-BLG와 *L*-leucine의 tri-block copolypeptide를 debenzylation하여 *r*-BLG를 glutamic acid로 하였을 때 물의 透過量을 測定하였다. 壓力과 溫度 變化에 따른 flux의 變化를 Fig.3과 Fig.4에 나타내었다. 그리고 35°C로 일정한 온도에서 leucine과 glutamic acid의 함량비에 따른 flux의 變化를 Fig.5에 나타내었다. glutamic acid 즉 親水性 부분이 증가하는 PLG 9-1로부터 PLG 4-6으로 갈수록 flux가 증대하고 있어, 물의 투과는 카복실기와 같은 親水性을 側鎖로 갖고 있는 것이 더 양호함을 알 수 있다.

膜을 투과하는 溶液이 순수한 물일 경우 hy-

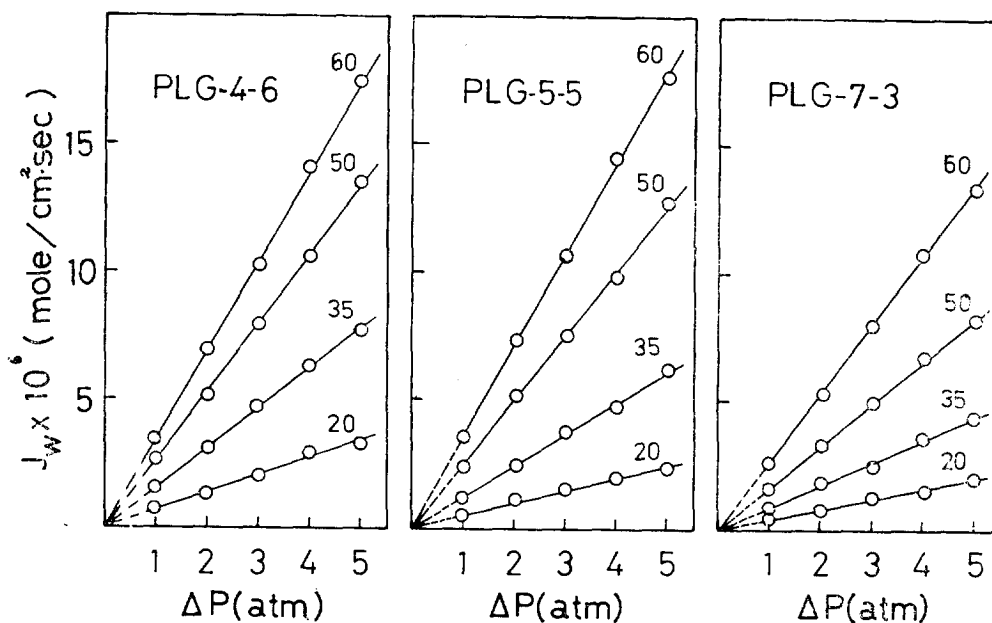


Fig. 3. Water flux vs. applied pressure at different temperatures.

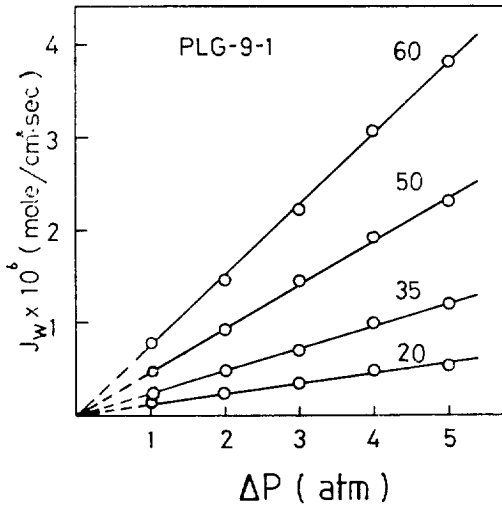


Fig. 4. Water flux vs. applied pressure at different temperatures.

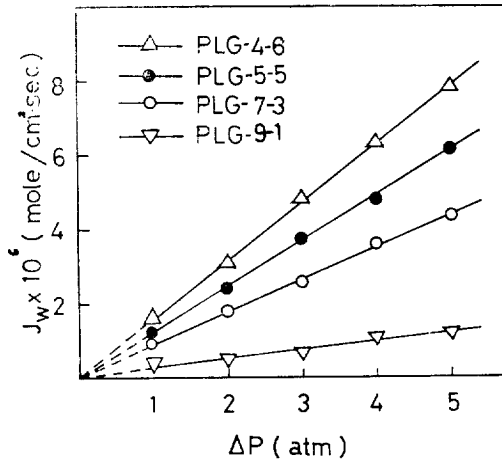


Fig. 5. Water flux vs. applied pressure at 35°C of different block copolypeptide membranes.

draulic water flux, J_w 는 다음 식으로 표시된다.

$$J_w = K_w \cdot \frac{\Delta p}{\Delta x} \quad (2)$$

이 식에서 $\Delta p/\Delta x$ 는 압력구배, Δp 는 操作壓力, Δx 는 膜두께이고, K_w 는 hydraulic permeability 이다. (2)式으로부터 K_w 를 구한 다음 Arrhenius plot하여 Fig.6에 나타내었다. 이 直線의 기울기로부터 활성화에너지(ΔE)를 구하였다. 여기서 직선의 기울기 즉 활성화에너지가 크다는 것은

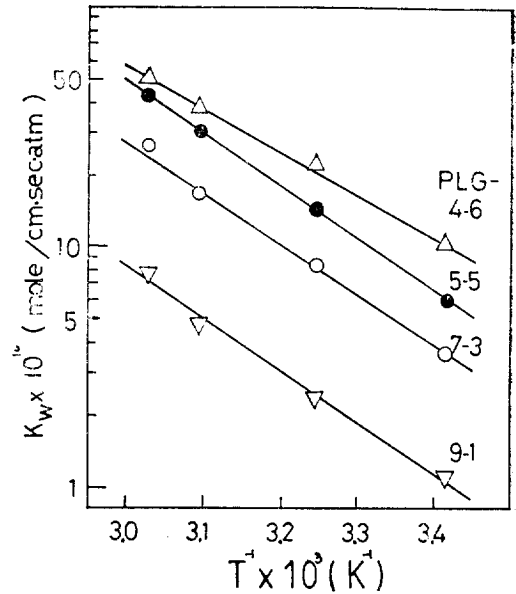


Fig. 6. Temperature dependence of block copolypeptide membranes on hydraulic permeability K_w .

Table II. Permeability Data of PLG Block Copolypeptide Membrane⁸⁻¹¹.

Sample	permeability const. $K_w \times 10^{12}$ at 35°C (mol/cm. sec.atm)	Degree of hydration H	Activation energy ΔE (Kcal/mol)
PLG 9-1	2.4	0.0938	9.326
PLG 7-3	8.8	0.1167	9.026
PLG 5-5	14.8	0.1264	9.966
PLG 4-6	22.2	0.1594	8.398
PMLG-LI-1 ^(a)	1.0	0.034	13.6
PLG 1-1 ^(b)	0.25	—	6.0
PBLG ⁹	6.3	0.023	6.2
PMLG ¹⁰	5.2	0.062	9.16
P-Leucine ¹¹	4.9	0.072	6.64

(a) random copolypeptide of γ -methyl-L-glutamate, L-leucine (5:5 mole ratio)

(b) random copolypeptide of γ -BLG, L-leucine(5:5 mole ratio)

물의 투과량이 溫度에 의한 영향이 크다는 것을 나타낸다. (Table II)

수화도 H 는 膜의 건조중량에 대한 함수무게분

물로 5회 測定한 평균값이다. 水和度 K_w 와 같은 경향으로 glutamic acid의 함량이 증대할수록 커지고 있어서 측쇄영역인 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ 와 물과의 수소결합에 의해 막내부의 含水率이 증가됨을 시사하고 있다.

3.4 膜의 機械的 特性

제조한 膜의 인장강도와 신장률을 측정하여 Table III에 나타내었다. Leucine의 함량이 증가할수록 引張強度가 커지는 것을 알 수 있다. 이 데이터를 poly(*r*-methyl-*L*-glutamate-*L*-leucine) random copolypeptide와¹² 비교하여 보았다. 대응되는 PMLG-*L* 1-1과 PLG 5-5, 또는 PMLG-*L* 1-9와 PLG 9-1을 비교하여 보면 引張強度는 크게 감소하지 않은 것으로 보아 debenzylation에 의한 큰 물성의 약화는 나타나지 않고 있다. 伸張率은 PMLG-*L*의 copolypeptide에 비해 개선되었으나 대부분 작은 값을 나타내고 있다.

3.5 臨界表面張力(γ_c)과 젖음(wetting)

高分子의 表面張力은 $r_c \approx r_s$ (r_s ; 固體의 表面

Table III. Mechanical Properties of Copolypeptide Membranes

Sample	Tensile Strength (kg/cm ²)	Elongation(%)
PLG 9-1	157	5.2
PLG 7-3	143	4.8
PLG 5-5	146.7	4.0
PLG 4-6	186.8	3.8
PMLG- <i>L</i> 1-1	148	3.8
PMLG- <i>L</i> 1-9	165	4.6

Table IV. Critical Surface Tension and Clotting Time

Sample	γ_c (dyne/cm)	CT(min)	CT-5(min) ^(a)
PLG 9-1	23.5	24	39
PLG 7-3	24	26	42
PLG 5-5	27.5	30.1	50.5
PLG 4-6	28.2	30	41

a) dipping the copolypeptide samples in 0.1% albumin solution for 5 hours before drying in vacuum for more than two days.

張力)이라는 가정하에¹⁴ Zisman plot로 구할 수 있다¹⁵. 전보¹³와 같은 방법으로 각 액체시료의 접촉각을 측정하여, 임계표면장력을 구하였다.

각 시료의 임계표면장력은 PLG 9-1=23.5, PLG 7-3=24.0, PLG 5-5=27.5 그리고 PLG 4-6=28.2(dyne/cm)의 값을 나타내었다. 側鎖로 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ 를 갖고있는 glutamic acid의 함량비율이 증대될수록 임계표면장력도 증가되고 있다. 이것은 친수성 영역이 큰 임계표면장력의 값을 갖는 것과 일치하는 결과이다.

3.6 血液凝固時間과 親水·疎水性 構造의 關係

血液中에 있는 albumin, fibrinogen, 그리고 γ -globulin등은 수많은 혈장단백질중에서도 대표적이다²⁰. 이중에서 albumin은 혈액응고를 일으키는 혈소판과의 접촉이 없거나 거의 약하기 때문에 albumin을 선택적으로 흡착하는 고분자표면은 항혈전성이 우수하지만, fibrinogen과 γ -globulin을 선택 흡착하는 高分子表面은 혈액응고가 촉진된다¹⁶⁻²³.

本 實驗에서는 중합제막을 도포한 시료를 albumin용액에 5시간 침적시킨 후 건조시킨 것을 시료로서 혈액응고시간을 측정하여 Table IV에 나타내었다. 血液凝固時間은 PLG 5-5 및 4-6의 30.1分 및 30分으로 다른 것에 비해 혈액응고시간이 길어지고 있다. albumin처리한 시료는 처리하지 않은 시료보다 각각 10분이상 혈액응고시간이 증가하고 있다. 다시 말하면 albumin처리한 것이 항혈전성이 우수하다.

4. 結 論

1. Debenzylaton에 의한 親水영역의 증대로 물의 透過가 매우 향상되었다. *L*-glutamic acid 含量이 많아질수록 透水性 및 含水率이 증가하였다.

2. 機械的 強度는 *L*-leucine 含量이 증대될수록 증가하며, debenzylation에 의한 커다란 物性的 弱화는 나타나지 않았다.

3. 親水·疎水性 構造를 갖는 膜이 抗血栓性에 우수함을 나타내었고, 또한 albumin처리한 것이 血液凝固를 지연시키는 역할을 하고 있음을 알 수 있다.

參考文獻

1. R.B. Woodward and C.H. Schram, *J. Am. Chem. Soc.*, **69**, 1551(1947).
2. A. Patchornik and Y. Shalitin, *Analytical Chem.*, **33**, 1887(1961).
3. 中森一誠, “實驗化學講座 9. 無機化合物の合成と精製”, 日本化學會編, **7** (1973).
4. D.B. Ishai and A. Berger, *J. Org. Chem.*, **19**, 1564(1954).
5. “タンパク質化學 1”, アミノ酸・ペプチド, 3th Ed., 413 (1954).
6. 角田 光雄, 小石眞純, *工業材料*, **28**, 100(1980).
7. R.I. Lee and D.D. white, *J. Am. Med. Sci.*, **145**, 495(1913).
8. K.Y. Kim and J.H. Ko, *Polymer(Korea)*, **5**, 44(1981).
9. K.Y. Kim, Y.M. Lee and J.H. Ko, *ibid*, **4**, 499(1980).
10. K.Y. Kim, and H.J. Kim, *ibid*, **5**, 372(1981).
11. K.Y. Kim and Y.M. Lee, *ibid*, **3**, 205(1979).
12. K.Y. Kim, Y.M. Lee, H.J. Kim and K.J. In, *ibid*, in press.
13. K.Y. Kim and K.J. In, *ibid*, **5**, 459(1981).
14. D.W. Van Krevelen, “Properties of Polymers,” Elsevier/North Holland Inc., New York, 162(1976).
15. M.K. Bernett and W.A. Zisman, *J. Phys. Chem.*, **71**, 2075(1967).
16. J.L. Brash, *Annals New York Academy of Sci.*, **283**, 356(1977).
17. R.E. Baier, *Federation Proceedings*, **30**, 1526(1971).
18. V.L. Gott, *ibid*, **30**, 1679(1971).
19. Leo Vroman, A.L. Adams and M. Klings, *ibid*, **30**, 1494(1971).
20. S.W. Kim and E.S. Lee, *J. Polym. Sci. Polym. Symp.*, **66**, 429(1979).
21. M.B. Zucker and L. Vroglman, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **131**, 318(1969).
22. D.J. Lyman, et al, *Trans. Am. Soc. Arti. Int. Org. (TASAIO)*, **20**, 474(1974).
23. S.W. Kim, et al, *ibid*, **20**, 449(1974).

Permeability and Thromboresistance of Tri-Block Copolypeptides

Kyo Jin In, Young Moo Lee, Kea Yong Kim and *Yong Kyun Lee

Department of Industrial Chemistry, *Department of Chemistry, Hanyang University,

(Received December 1, 1982 : Accepted January 19, 1983)

ABSTRACT: Tri-block copolypeptides of ABA type were synthesized with *L*-glutamic acid as A-component and *L*-leucine as B-component. Using *p*-phenylenediamine as an initiator, *L*-leucine-*N*-carboxy anhydride (NCA) was polymerized in benzene for 8 days, followed by the addition of *r*-benzyl-*L*-glutamate NCA in dioxane. The polymer thus obtained debenzylated by the addition of acetic acid containing 30% HBr. Permeability, hydration and critical surface tension were significantly improved compared with those of benzylated copolypeptides, and mechanical properties did not show any significant change. Clotting times of the debenzylated copolypeptides treated with 0.1% albumin solution were found to be increased by more than 10 minutes. It is concluded that membrane performance and properties of block copolypeptides possessing both hydrophilicity and hydrophobicity alternately were markedly improved compared with random copolypeptides.