

콜레스테롤의 추출을 위한 고분자화된 Vesicles의 합성

조 의 환 · 김 상 희* · 신 재 섭*

한국과학기술원 화학과

*충북대학교 자연과학대학 화학과

(1992년 1월 10일 접수, 1992년 3월 26일 채택)

Synthesis of Polymerized Vesicles for Cholesterol Extraction

Iwhan Cho, Sang-Hee Kim*, and Jae-Sup Shin*

Department of Chemistry, Korea Advanced Institute of Science and Technology, P. O. Box
150 Chongyangni, Seoul 130-650, Korea

*Department of Chemistry, College of Natural Sciences, Chungbuk National University,
Cheongju, Chungbuk 360-763, Korea

(Received January 10, 1992, Accepted March 26, 1992)

요 약 : 콜레스테롤을 갖는 계면활성제를 합성하고 중합하여 고분자화된 vesicle들을 얻었으며, 이러한 vesicle들을 이용하여 콜레스테롤을 추출해 내는데 사용하였다. 콜레스테롤을 갖는 계면활성제와 두 개의 알킬 사슬을 갖는 계면활성제를 50 : 50으로 혼합하여 vesicle을 형성시킨 후 중합하여 형성된 고분자화된 Vesicle이 각각의 계면활성제들을 사용한 경우와 비교하여 볼 때 콜레스테롤을 효과적으로 추출해 내었다. vesicle의 투과도도 50 : 50으로 혼합하여 형성시킨 경우가 가장 컸다. 그러므로 많은 양의 콜레스테롤을 함유하려면 어느 정도의 여유 공간이 필요하다고 결론지을 수 있다.

Abstract : Polymerized vesicles were prepared from monomeric cholesterol-containing surfactant. These vesicles were used to extract the free cholesterol. A polymerized vesicle was formed from both monomeric cholesterol-containing surfactant and monomeric surfactant containing two alkyl chain(50 : 50 weight ratio). This vesicle got the better extracting capacity compared with the vesicle which got the other weight ratio of the surfactants. This vesicle also exhibited the fastest substrate permeability. These all results showed that considerable vacant room is necessary in polymerized vesicles in order to extract more cholesterols.

1. 서 론

Vesicle은 molecular bilayer로 이루어진 구형의 막 내부에 물이 들어 있는 구형의 공간을 가진 구조를 하고 있다. 이러한 vesicle에 관한 연구는 처음에는 복잡한 구조를 가지고 있는 biological membrane에 대한 model system으로서 연구가 시작되었다[1]. 그 이후로 1977년에 di-

octadecyldimethylammonium chloride를 sonication을 이용하여 물에 분산시킴으로써 처음으로 synthetic vesicle을 얻을 수 있음이 발표되었다[2]. 아주 간단한 암모늄 화합물로 부터 vesicle을 형성할 수 있게 되었기 때문에 그 뒤로 많은 dialkyl계면활성제들이 개발되었다[3].

이러한 연구는 처음에는 단순히 biological membrane의 model system으로 출발하였으나

[1, 3] vesicle이 가지고 있는 독특한 구조, 즉 내부에 막으로 격리된 물로 채워진 공간을 갖는 구조 때문에 광범위한 분야에 응용되기 시작했다. 예를 들어 drug carrier system[1, 4], photochemical solar energy conversion system[5-7], reactivity control system[8-10] 등 매우 많은 분야에 응용이 시도되었다. 그러나 vesicle이 가지고 있는 불안전성 때문에, 즉 오랜기간 놓아두면 서로가 융합되어 침전이 형성되는 현상때문에 이러한 많은 응용에는 어려움이 있었다[11-14]. 그리하여 등장한 것이 바로 고분화된 vesicle이다.

첫 고분자화된 vesicle은 1980년에 소개되었는데[15] vesicle을 형성할 수 있는 계면활성제에 중합반응을 할 수 있는 관능기를 붙여 계면활성제를 합성하여 vesicle을 형성시킨 후 중합반응을 하여 합성한다. 이렇게 해서 얻어진 고분자화된 vesicle은 단분자로 된 vesicle에 비하여 상당히 안정하며, 유기용매에서도 어느 정도 안정함이 밝혀졌다. 그 뒤로 많은 고분자화된 vesicle들이 소개되었다[16-27].

본 연구팀은 콜레스테롤을 함유하는 계면활성제를 합성하여 고분자화된 vesicle을 형성시켰다[27]. 이러한 콜레스테롤을 함유하는 vesicle을 형성하게 된 동기는 자연의 생체막들이 콜레스테롤을 많이 함유하고 있다는 사실로부터이다. 이렇게 형성된 고분자화된 vesicle들은 매우 안정함이 밝혀졌다[28]. 그리고 이 콜레스테롤을 갖는 계면활성제들 중에는 물에 분산되었을 때 giant helical superstructure를 갖는 것이 있음이 보여졌다[29]. 이러한 구조는 전자현미경이 아닌 일반 현미경으로도 관찰이 가능하다.

본 연구의 목적은 콜레스테롤을 추출할 수 있는 고분자화된 vesicle들을 합성하는 것이다. 본 연구에서는 콜레스테롤을 갖는 계면활성제들을 합성하여 고분자화된 vesicle을 형성시키고, 이러한 vesicle들을 이용하여 콜레스테롤을 추출해 내는데 이용하려고 한다. 콜레스테롤은 인간의 핏줄속에 축적되어 고혈압과 같은 성인병의 주요 원인이 되고 있다. 본 연구팀은 이미 비이온성이며 콜레스테롤을 함유하는 고분자화된 vesicle들을 합성하여 콜레스테롤을 추출하는데

이용하려는 시도를 하였다[30]. 본 연구에서는 보다 안정한 콜레스테롤을 함유하는 고분자화된 vesicle들을 이용하여 콜레스테롤을 추출하는데 이용해 보려고한다. 본 연구의 결과가 이러한 인간의 핏줄 속에 축적되어 있는 콜레스테롤을 추출할 수 있는 의학의 개발에 좋은 model system이 될 수 있을 것으로 생각한다.

2. 실험

2.1. 시약 및 기기

본 실험에 사용된 cholesteryl chloroacetate, 2-(dimethylamino)ethyl methacrylate, 1-dodecanol, epichlorohydrin은 Aldrich제품을 사용하였으며, [³H]glucose는 ICN Laboratories제품을, [¹⁴C]cholesterol은 Amersham제품을 사용하였다. Infrared spectrophotometer는 Perkin-Elmer X 98을, nuclear magnetic resonance spectrometer는 Varian EM 360L을, 전자현미경은 Zeiss EM 109를, liquid scintillation counter는 Beckman LS 5000 TA를, sonicator는 Cole-Parmer 4710 250 W sonicator를 사용하였다.

2.2. Cholesteryl Methacryloyl Ammonium Lipid (CHODAMA)의 합성[28]

Cholesteryl chloroacetate 25g(54.0mmole)과 증류물 한 2-(dimethylamino)ethyl methacrylate 25g(159 mmole)을 250 ml의 tetrahydrofuran (THF)에 첨가하였다. 이 혼합물을 3일 동안 상온에서 stirring을 하였다. 반응이 끝난 혼탁한 용액을 거르고, THF로 씻어 준 다음 건조시켰다. CHODAMA가 12.7g 얻어졌다 (yield, 38%).

NMR(CDCl₃) δ 0.8-2.4(m, 43H), 2.0(s, 3H, C-CH₃), 3.8(s, 6H, N-CH₃), 4.4(m, 2H, N-CH₂), 4.5-4.8(m, 3H, CH-O-CO), 5.0(s, 2H, N-CH₂-CO), 5.4(m, 1H, CH=C), 5.7(s, 1H, CH=C), 6.1(s, 1H, CH=C).

2.3. Didodecyl Methacryloyl Ammonium Lipid(DOLDAMA)의 합성[28]

α , α' -(Didodecyloxy)glyceryl chloroacetate 5.0g(9.90mmole)과 2-(dimethylamino)ethyl

methacrylate 3.1g(19.7mmole)과 중합 금지제로 p-methoxyphenol 5mg을 50ml의 dry acetone에 첨가하였다. 이 반응 혼합물을 12시간 동안 reflux하였다. 그런 다음 상온으로 온도를 낮추어서 형성된 침전 생성물을 걸렀다. 얻어진 생성물을 acetone에서 3번 recrystallization하여 4.46g의 DOLDAMA를 얻었다(yield, 68%).

NMR(CDCl₃) δ0.9(t, 6H, CH₃), 1.3(s, 40H, CH₂), 2.0(s, 3H, C-CH₃), 3.4(t, 4H, O-CH₂), 3.5(d, 4H, OCHCH₂O), 3.8(s, 6H, N-CH₃), 4.5(m, 2H, N-CH₂), 4.6(m, 2H, COOCH₂), 5.0(s, 2H, N-CH₂-CO), 5.2(t, 1H, COOCH), 5.7(s, 1H, CH=C), 6.1(s, 1H, CH=C).

2. 4. 고분자화된 Vesicle의 합성

50ml의 비이커에 100mg의 lipid를 아주 소량의 클로로포름에 녹여 용액으로 만든 다음, 25℃와 1mmHg의 진공하에서 4시간 동안 용매를 증발시켜 얇은 막이 비이커의 바닥에 형성되게 하였다. 여기에 10ml의 증류수와 2mg의 potassium persulfate를 첨가하고 55℃에서 10분 동안 sonication을 하여 vesicle을 형성시켰다. 그리고 70℃에서 12시간 동안 반응시켜 고분자화된 vesicle을 합성하였다.

2. 5. Transmission Electron Microscopy

2% uranyl acetate용액을 vesicle용액과 1 : 1로 혼합한 후, copper grid위에 이 용액 한 방울을 살짝 올려 놓았다. 이것을 2시간 정도 hood에서 조심스럽게 건조시킨 후, transmission electron microscopy(Zeiss EM 109)를 사용하여 vesicle의 크기와 모양을 관찰하였다.

2. 6. Gel Permeation Chromatography 실험

Sephadex G-50로 column(1x 40cm)을 채운 뒤 증류수 속에 6시간 정도 놓아 둔 후 사용하였다. 여기에 vesicle용액 0.5ml를 더한 후 증류수를 elute하였다. 1.16ml씩 받았을 때, 11번째와 12번째에서 주로 vesicle용액이 나왔다.

2. 7. 투과도 측정

위에서와 같이 vesicle을 형성시키려할 때, 즉 sonication을 하기 전에 우선 [³H]glucose를 substrate로 첨가하였다. 즉 surfactant 5mg당, 20 μCi의 [³H]glucose가 녹아있는 용액을 첨가하

였다. 그러면 sonication후 vesicle이 형성되었을 때 [³H]glucose가 vesicle의 외부와 내부에 모두 존재하게 된다. 그리고 나서 중합 반응을 시켜서 얻어진 고분자화된 vesicle용액을 가지고, sephadex G-50를 이용하여 gel filtration을 하면 vesicle부분과 외부의 free [³H]glucose를 분리할 수 있다. 이렇게 분리한 vesicle부분 즉 [³H]glucose를 내부에 함유하고 있는 vesicle용액을 가지고 투과도 측정을 실시하였다. Vesicle용액 1ml를 dialysis bag에 넣고 200ml의 증류수에 대하여 20℃에서 dialysis를 실시하였다. 그리고 일정한 시간마다 40 μl 씩 dialysis bag 내에서 sampling을 해서 liquid scintillation counter를 이용하여 남아있는 [³H]glucose의 양을 측정하였다.

2. 8. Cholesterol추출 실험

Probe로는 [¹⁴C]cholesterol을 사용하였다. 1 μCi(10 μl의 toluene용액)의 [¹⁴C]cholesterol을 2ml의 vesicle용액 (20mg의 surfactant를 포함하고 있음)에 혼합하였다. 이 혼합물을 20℃에서 24시간 동안 stirring하여 cholesterol이 vesicle속으로 들어갈 수 있는 충분한 시간을 제공하였다.

Vesicle에 의해 추출되어진 cholesterol과 용액중에 남아있는 cholesterol의 분리는 Sephadex G-50를 사용해서 gel filtration하여 실시하였다. Vesicle에 의해 추출되어진 cholesterol의 양은 liquid scintillation counter를 사용하여 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

3. 1. 고분자화된 vesicle의 형성

중합반응이 잘 일어났는가를 확인하기 위하여, 중합반응 후 고분자화된 vesicle용액을 freeze-dry한 다음에 CDCl₃에 녹여 NMR을 찍어본 결과 Fig. 1에 나타나있듯이 vinyl proton이 거의 완전히 사라지는 것이 확인되었고, 또한 IR spectrum에서 1645cm⁻¹에서의 vinyl기에 의한 absorption이 중합 반응 후에 사라지는 것이 Fig. 2에 나타나 있다. 이 두가지의 실험 결과가 중합이 매우 잘 진행되었음을 나타내준다.

전자현미경 사진으로 CHODAMA로 부터 합

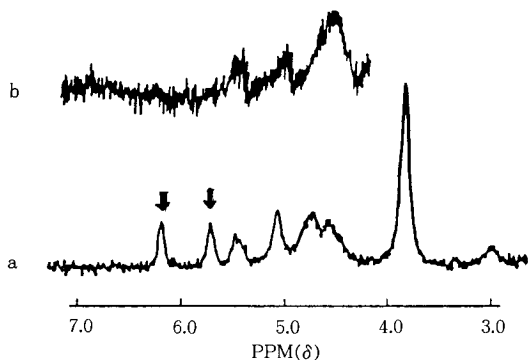


Fig. 1. NMR spectrum of CHODAMA (a) and its polymer (b).

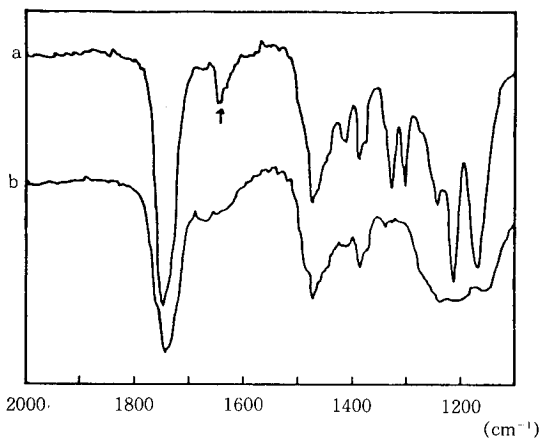


Fig. 2. IR spectrum of CHODAMA (a) and its polymer (b).

성된 고분자화된 vesicle은 지름이 300-500 A°인 구형 모양의 vesicle이 형성되었음을 Fig. 3에서와 같이 확인 할 수 있었고, 또한 DOLDAMA로부터 합성된 고분자화된 vesicle은 지름이 800-1200 A°인 구형 모양의 vesicle이 형성되었음을 Fig. 4에서와 같이 확인할 수 있었다. 또한 CHODAMA와 DOLDAMA를 혼합하여 합성한 고분자화된 vesicle은 CHODAMA와 DOLDAMA의 비가 75 : 25인 경우는 지름이 500 A°-900 A°인 것이 얻어졌으며, 50 : 50인 경우와 25 : 75인 경우는 모두 800A°-1200A°인 구형 모양의 vesicle이 형성됨을 전자현미경 사진으로부터 확인할 수 있었다.

중합반응을 하기 전과 중합반응을 하고난

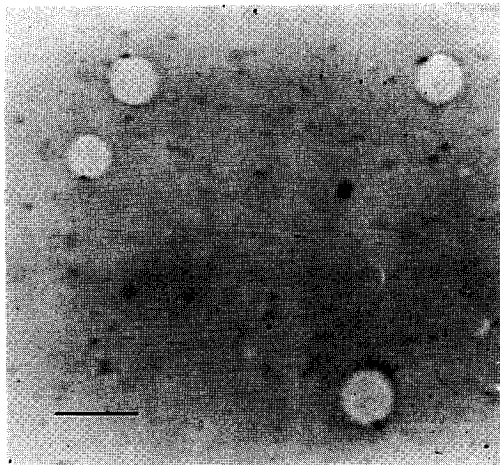


Fig. 3. Electron micrograph of the polymerized vesicle from CHODAMA (2% uranyl acetate stain, bar represents 1000 A°).

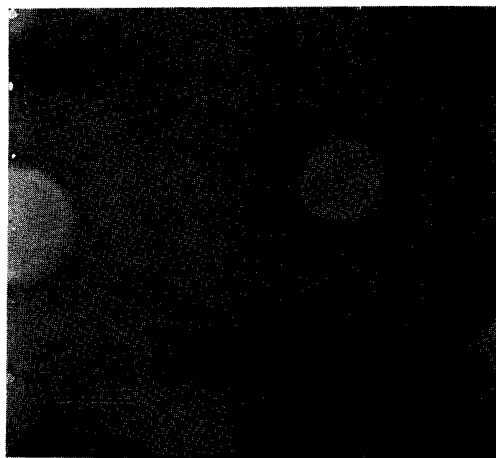


Fig. 4. Electron micrograph of the polymerized vesicle from DOLDAMA (2% uranyl acetate, bar represents 1000 A°).

후의 전자현미경 사진을 비교해 본 결과 vesicle의 모양이나 크기에 큰 차이를 발견 할 수 없었으며 이것은 중합반응이 vesicle의 모양이나 크기에 영향을 별로 주지않음을 말해 준다.

CHODAMA로 부터 합성된 고분자화된 vesicle은 매우 안정하여, 단분자로 된 vesicle의

경우에는 vesicle을 형성시킨 후 30일이 지나면 침전물이 형성되었지만 고분자화된 vesicle은 150일 후에도 침전물이 형성되지 않았다.

3. 2. 투과도 실험

Vesicle의 투과도를 실험하는 방법은 여러가지가 있지만 그 중에서 가장 좋은 방법은 [³H]glucose와 같은 radio active한 substrate를 이용하는 것이다. 실험 방법은 [³H]glucose가 함께 들어있는 vesicle용액을 gel filtration하여, [³H]glucose를 vesicle내에만 갖고있는 vesicle용액을 분리한다. 위에서 얻은 vesicle용액을 dialysis bag에 넣고 200ml의 증류수에 대해 dialysis하여 투과도를 측정한다. 일단 vesicle을 투과해 나온 [³H]glucose는 vesicle을 투과해 나온 속도보다 5배 이상의 빠른 속도로 dialysis bag의 membrane을 투과해 나간다. 그러므로 dialysis bag내의 [³H]glucose의 양을 측정하면 바로 그 값을 vesicle내의 [³H]glucose의 양을 측정할 값으로 볼 수 있다.

투과도 측정에서 얻은 data는 이미 보고되어진 방법[31, 32]을 이용하여 처리하였다.

$$\ln \left[\frac{N_0 V_0}{V_1 + V_0} - N_t \right] = \ln \frac{N_0 V_0}{V_1 + V_0} - k \frac{V_1 + V_0}{V_0} t \quad (1)$$

$$k = (A/V_1) P \quad (2)$$

N_0 = 초기의 vesicle 내부의 counts

N_t = t시간 후의 vesicle 내부의 counts

V_0 = dialysate의 부피

V_1 = vesicle내부의 부피

A = vesicle내부의 표면적

P = vesicle의 permeability

$$\ln \left[\frac{N_0 - N_t}{N_0} \right] = -kt \quad (3)$$

(1)식에서 V_1 은 V_0 에 비해 매우 작으므로 (1)식을 정리하여 (3)식과 같이 쓸 수 있다. 매 30분 마다 dialysis bag내에 남아있는 substrate의 양을 측정하여 (3)식에 의해 y축을 $\ln [(N_0 - N_t)/N_0]$ 로 하고 x축을 t (hr)으로 하여 그래프를 그리면 투과 시작 후 3시간 정도까지는 (3)식에 아주 잘 맞았으며 그 이후로는 (3)식을 벗어났다[32]. 이와 같은 초기 투과속도로

Table 1. Estimated Permeability of Polymerized Vesicles to [³H]glucose at 20°C^a

	k(hr ⁻¹)	P(10 ⁻⁷ cm hr ⁻¹) ^b
CHODAMA	0.063	0.42
A	0.072	0.84
B	0.072	1.2
C	0.055	0.82
DOLDAMA	0.035	0.58

^a Weight ratio of mixture (CHODAMA : DOLDAMA), A(75 : 25), B(50 : 50), C(25 : 75).

^b Calculated by using a mean vesicle diameter of 400 Å (CHODAMA), 700 Å (A), 1000 Å (B, C, DOLDAMA).

부터 각각의 경우의 k값을 구한 후, (2)식에 의해 P값을 구하였다. 구한 k값과 P값이 Table 1에 나타나 있다.

순수한 CHODAMA만으로 이루어진 고분자화된 vesicle이 P값이 가장 작았으며 CHODAMA와 DOLDAMA가 50 : 50으로 혼합되어 있는 고분자화된 vesicle이 P값이 가장 컸다. 이 결과로부터 순수한 CHODAMA로만 이루어진 vesicle이 매우 조밀한 구조를 갖고 있으며, 50 : 50으로 혼합된 경우에는 어느 쪽 한가지만으로만 이루어진 vesicle의 경우보다도 훨씬 조밀하지 않은 구조를 갖고있다고 생각할 수 있다.

3. 3. 콜레스테롤 추출 실험

Gel filtration을 이용하여 vesicle에 의해 추출되어진 콜레스테롤을 분리한 후 liquid scintillation counter로 그 양을 측정하였다[30]. 측정된 결과로부터 각각의 경우에 있어서 처음에 넣어준 총 콜레스테롤중에 추출되어진 분율을 Table 2에 나타내었다.

Table 2. Percent of Extrated [¹⁴C]cholesterol by Polymerized Vesicles^a

CHODAMA	A	B	C	DOLDAMA
9.0	11.5	14	12	5.5

^a Weight ratio of mixture (CHODAMA : DOLDAMA), A(75 : 25), B(50 : 50), C(25 : 75).

Table 2의 결과로부터 CHODAMA의 경우가 DOLDAMA의 경우 보다도 많은 양의 콜레스테롤을 추출할 수 있었으며, CHODAMA와 DOLDAMA가 50 : 50으로 혼합된 고분자화된 vesicle의 경우가 CHODAMA나 DOLDAMA만으로 이루어진 경우보다 훨씬 많은 양의 콜레스테롤을 추출할 수 있음을 알 수 있었다.

이 결과와 투과도 측정에서 얻어진 결과를 종합해 볼 때 CHODAMA가 갖고 있는 콜레스테롤 부분이 free콜레스테롤을 끌어 당기는 능력은 있지만 좀 더 많은 양의 콜레스테롤을 추출해 내려면 어느 정도의 여유 공간이 필요하다고 결론지을 수 있다.

4. 결 론

콜레스테롤을 갖는 계면활성제를 합성하여 고분자화된 vesicle들을 형성 시키고, 이러한 vesicle들을 이용하여 콜레스테롤을 추출해 내는데 사용하였다.

1. CHODAMA와 DOLDAMA가 50 : 50으로 혼합된 고분자화된 vesicle이 CHODAMA나 DOLDAMA각각으로만 이루어진 고분자화된 vesicle보다 투과도가 컸다.
2. 콜레스테롤의 추출 능력도 CHODAMA와 DOLDAMA가 50 : 50으로 혼합된 고분자화된 vesicle의 경우가 CHODAMA나 DOLDAMA만으로 이루어진 경우보다 훨씬 많은 양의 콜레스테롤을 추출할 수 있었다.
3. 이 결과들을 종합해 볼 때 좀 더 많은 양의 콜레스테롤을 추출해 내려면 어느 정도의 여유 공간이 필요하다고 결론지을 수 있다.

본 연구는 1991년 교육부 신소재 분야 연구 지원에 의하여 연구되었음을 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. J. H. Fendler, *Acc. Chem. Res.*, **13**, 7 (1980).
2. T. Kunitake and Y. Okahata, *J. Am. Chem. Soc.*, **99**, 3860 (1977).
3. J. H. Fendler, "Membrane Mimetic Chemistry", John Wiley & Sons, New York, 1982, p 160-168.
4. C. D. Tran, P. L. Klahn, A. Romero, and J. H. Fendler, *J. Am. Chem. Soc.*, **100**, 1622 (1978).
5. T. Nomura, J. R. Escabi-Perez, J. Sunamoto, and J. H. Fendler, *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 1484 (1980).
6. M. S. Tunuli and J. H. Fendler, *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 2507 (1981).
7. Y. M. Tricot and J. H. Fendler, *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 2475 (1984).
8. R. A. Moss and J. S. Shin, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1027 (1983).
9. R. A. Moss, S. Bhattacharya, P. Scrimin, and S. Swarup, *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 5740 (1987).
10. R. A. Moss, P. Scrimin, S. Bhattacharya, and S. Swarup, *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 6209 (1987).
11. S. E. Schullery, C. F. Schmidt, P. Felgner, T. W. Tillack, and T. E. Thompson, *Biochemistry*, **19**, 3919 (1980).
12. C. F. Schmidt, D. Lichtenberg, and T. E. Thompson, *Biochemistry*, **20**, 4792 (1981).
13. M. Wong and T. E. Thompson, *Biochemistry*, **21**, 4133 (1981).
14. N. O. Petersen and S. I. Chan, *Biochim. Biophys. Acta*, **509**, 111 (1978).
15. S. L. Regen, B. Czech, and A. Singh, *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 6638 (1980).
16. J. H. Fendler, *Acc. Chem. Res.*, **17**, 3 (1984).
17. Y. Yuan, P. Tundo, and J. H. Fendler, *Macromolecules*, **22**, 29 (1989).
18. R. Elbert, A. Laschewsky, and H. Ringsdorf, *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 4134 (1985).
19. B. Hupfer, H. Ringsdorf, and H. Schupp, *Chem. Phys. Lipids*, **33**, 355 (1983).
20. M. F. M. Roks, R. S. Dezentje, V. E. M. Kaats-Richters, W. Drenth, A. J. Verkleij, and R. J. M. Nolte, *Macromolecules*, **20**,

- 920 (1987).
21. S. L. Regen, A. Singh, G. Oehme, and M. Singh, *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 791 (1982).
 22. N. K. P. Samuel, M. Singh, K. Yamaguchi, and S. L. Regen, *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 42 (1985).
 23. S. L. Regen, N. K. P. Samuel, and J. M. Kurana, *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 5804 (1985).
 24. M. Wakita, K. A. Edwards, and S. L. Regen, *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 5221 (1988).
 25. T. Kunitake, N. Nakashima, K. Takarabe, M. Nagai, A. Tsuge, and H. Yanagi, *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 5945 (1981).
 26. T. Kunitake, M. Nagai, H. Yanagi, K. Takarebe, and N. Nakashima, *J. Macromol. Sci. Chem.*, **A 21**, 1237 (1984).
 27. I. Cho and K. C. Chung, *Macromolecules*, **17**, 2935 (1984).
 28. I. Cho and K. C. Chung, *Macromolecules*, **21**, 565 (1988).
 29. I. Cho and J. G. Park, *Chem. Lett.*, 977 (1987).
 30. I. Cho and Y. W. Kim, *Polymer Bulletin*, **24**, 545 (1990).
 31. S. Johnson and A. D. Bangham, *Biochim. Biophys. Acta*, **193**, 82 (1969).
 32. I. Cho and J. S. Shin, *Polymer (Korea)*, **15**, 170 (1991).