

키토산 유도체의 단분자막과 Langmuir-Blodgett Film

신 재 섭

충북대학교 자연과학대학 화학과
(1995년 11월 21일 접수, 1996년 2월 27일 채택)

Monolayer and Langmuir-Blodgett Film of Chitosan Derivatives

Jae-Sup Shin

Dept. of Chem., Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea
(Received November 21, 1996, Accepted February 27, 1996)

요 약 : 키토산에 acylation을 하여 acylated된 키토산을 합성하였으며 이 acylated된 키토산을 trough 위에 spreading하여 π -A curve를 얻었다. 이 π -A curve로부터 glucose unit 당의 제한 면적을 계산할 수 있었으며 온도에 따른 π -A curve의 변화도 측정하였다. 또한 유리판을 수평적으로 접하는 방법으로 이 단분자막을 유리판 위에 transfer할 수 있었다.

Abstract: Acylated chitosan derivatives with several kind of acyl chain length were synthesized. Using trough, monolayers of the acylated chitosan derivatives were formed. Limiting area per glucose unit and temperature dependence of π -A curves were determined. Multilayers were prepared by horizontal dipping method.

1. 서 론

키토산은 glucosamine으로 이루어진 polysaccharide이며 결사슬이 없는 매우 긴 사슬 구조를 갖고 있고, 자연에서 갑각류, 곤충류, 버섯, 진균류 등의 외부 골격의 재료나 박테리아의 세포벽 등에 널리 존재한다. 키토산은 poly(N-acetyl-2-amino-2-deoxy-D-glucopyranose)로서 glucosamine이 (1→4) β 결합을 하고 있다. 키토산은 셀룰로오스와 매우 유사한 구조를 가지고 있으나 두번째 탄소에 hydroxyl기 대신에 acetyl-amino기가 붙어 있는 점이 다르다.

새우나 게의 껍질의 30%를 이루고 있는 키토산을 이용하기 위하여 현재 많은 연구가 진행 중이며 혈액 응고 방지제, 생물학적으로 분해될 수 있는 의약품의 carrier, 상처 치료 보조제, 키토산 섬유, 직물 처리제, 식품 첨가제, 크로마토그래피 재료, 효소의 정제, 효

소의 immobilization 재료 등으로 이용하려는 연구가 매우 활발하다[1-8].

키토산은 셀룰로오스와 비슷한 구조를 갖고 있지만 화학적 성질은 매우 다르다. 특히 키토산은 여러 가지 시약에 대한 저항성이 매우 강한데 이것은 키토산 분자 내의 N-acetyl기가 형성한 강한 micelle 구조에 기인한다. 이러한 이유로 키토산의 용매는 hexafluoroisopropanol이나 formic acid 정도로 제한적이며 이러한 점이 키토산의 연구에 큰 제약적인 요소이다.

키토산은 poly(2-amino-2-deoxy-D-glucopyranose)이며 키토산을 염기로 N-deacetylation시켜 합성할 수 있다. 키토산은 키토산에서의 N-acetyl기가 형성하는 강한 micelle 구조가 없으므로 여러 가지 용매에 용해된다. 키토산의 용매인 formic acid를 비롯하여 acetic acid, propanoic acid, butanoic acid 등에 잘 용해된다. 이 키토산은 carboxylic anhydride를 이용하여

N-acylation을 시킬 수 있으며 여러 가지 조건에서 반응시킨 결과들이 보고되어 있다[9-12].

단분자막에 대한 연구[13-16]는 최근에 매우 활발히 연구되는 분야로서 과거에는 저분자량의 유기 분자들이 주요 대상이 되어 왔으나 최근에는 고분자 물질들에 관한 연구도 활발히 진행되고 있다[17-20].

본 연구에서는 키토산으로부터 acylated된 키토산을 합성하여 이러한 긴 사슬을 갖는 고분자에 대해 trough를 사용하여 단분자 막을 만든 후 surface pressure-area isotherm(π -A curve)을 얻어 키토산 유도체들의 단분자 막의 성질을 규명하여 보려고 한다.

2. 실험

2.1. 시약 및 기기

본 실험에 사용된 decanoic anhydride, dodecanoic anhydride(lauric anhydride), hexadecanoic anhydride(palmitic anhydride)는 Aldrich 제품을 사용하였다. Infrared spectrophotometer는 Perkin-Elmer X-98을 사용하였으며 Elemental analysis는 Perkin Elmer model 240C를 사용하였다.

2.2. 키토신의 분리

2.2.1. 산 처리

뼈 오징어(Loligo)의 뼈의 안쪽 연한 부분을 긁어내고 키토신이 많은 부분만 골라내어 잘게 부수어 가루 형태로 만들었다. 이것을 10°C 이하에서 2N의 염산 용액과 잘 교반시켜 주면서 반응시켰다. 탄산칼슘(CaCO₃) 부분이 염산 용액과 반응하여 이산화탄소를 발생하며 녹는다. 12시간 정도 반응시킨 후 증류수로 씻어내고 같은 조건에서 이산화탄소의 거품이나 기포가 생기지 않을 때까지 충분히 반응시켜 탄산칼슘을 완전히 제거하였다. 반응이 끝난 후 증류수로 여러번 씻어서 남아 있는 산이나 부산물을 깨끗이 제거하였다.

2.2.2. 알칼리 처리

산 처리를 하여 탄산칼슘을 완전히 제거한 후 알칼리 가수분해하여 단백질을 제거하였다. 1N 수산화나트륨 용액 속에 넣고 12시간 정도 reflux하였다. 반응시킨 후 진한 질산과 Xanto protein 반응이 일어나지 않을 때까지 위의 과정을 반복하여 반응시켰다.

처음에 단백질을 가수분해시킨 용액의 색깔은 진한 갈색이었으며 마지막 알칼리 처리에서의 용액의 색깔은 무색이었다. 반응이 끝난 후 증류수로 여러번 씻어서 남아 있는 염기나 부산물을 깨끗이 제거하였다.

2.3. 키토산의 합성

30g의 40wt% NaOH 수용액에 0.01g의 NaBH₄를 첨가하였다. 이 용액에 키토신 1g을 넣고 4시간 동안 reflux하였다. 이 과정을 두번 더 반복하여 실시하였다. 생성물을 2% 아세트산 수용액에 녹인 후, 녹지 않고 남은 소량의 물질을 원심분리를 이용하여 제거하였다. 얻어진 용액에 10% NaOH 용액을 첨가하여 용액의 pH를 8-9로 하여 침전을 형성시켰다. 침전물을 거르고 증류수로 여러번 씻은 후에 진공 건조하였다.

2.4. 키토산의 N-acylation

0.5g의 chitosan을 10ml의 10% acetic acid 수용액에 녹인 후, 40ml의 methanol을 첨가하였다. 촉매로 5ml의 pyridine을 가한 다음, glucosamine residue의 4배의 mole수에 해당하는 carboxylic anhydride를 첨가하였다. 5분 정도 50°C로 가열한 후에 12시간 동안 상온에서 반응시켰다. 침전물을 거르고 아세톤과 ethyl ether로 차례로 세척한 다음 진공 건조하였다.

2.5. N-acylation된 키토산의 O-acylation

0.3g의 N-acylation된 키토산에 1.2ml의 methanesulfonic acid와 glucosamine residue의 10배의 mole수에 해당하는 carboxylic anhydride를 첨가하였다. 이때 모든 반응물의 온도를 0°C로 하고 반응 중에도 0°C를 유지하면서 2시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후, 이 혼합물을 0°C의 냉장고에서 24시간 동안 저장하였다. 이 혼합물에 0°C의 증류수를 첨가한 후, 침전물을 거르고 증류수로 여러번 씻었다. 이 침전물을 증류수에 분산시킨 후 ammonium hydroxide를 이용하여 pH 7.0으로 중화시켰다. 이 혼합물의 온도를 50°C로 올린 후, acylated 키토산을 거르고 증류수로 여러번 씻은 다음에 진공 건조하였다.

2.6. 단분자막의 물성 측정

컴퓨터에 의해 조절되는 film balance(Sanesu Keisoku model FSD-50)을 사용하여 π -A curve를

얻었다. Trough의 크기는 $600 \times 150 \text{mm}^2$ 이고 $20.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ 를 유지하였다.

10ml의 CHCl_3 에 정확하게 무게를 측정한 10mg 정도의 키틴산 유도체를 녹인 후, 이 용액 $30\mu\text{l}$ 를 trough 위에 조심스럽게 spreading하였다. Compress 속도는 $0.2\text{mm}/\text{sec}$ 이었다.

3. 결과 및 고찰

본 연구에서 사용할 키틴은 뼈 오징어(Loligo)의 뼈로부터 분리하여 얻었다. 키틴은 poly(N-acetyl-2-amino-2-deoxy-D-glucopyranose)이지만 그러나 모든 amine기가 acetylation되어 있는 것은 아니며 보통 5~6개의 glucosamine unit 당 1개가 free amine 기로 되어 있다고 알려져 있다. 본 연구에 사용될 키틴은 뼈 오징어(Loligo)의 뼈로부터 분리한 후 원소 분석하여 free amine으로 되어 있는 glucosamine unit의 비율을 구하였다. Table 1에 본 연구에서 분리한 키틴의 원소분석 결과와 모든 glucosamine unit가 아세틸화되었을 때의 C, H, N 각각의 질량퍼센트와 모든 glucosamine unit가 free amine 상태로 있을 때의 C, H, N 각각의 질량퍼센트를 나타내었다. 원소 분석 결과로부터 N/C 값을 계산하여 이 값을 100% acetylated 경우와 100% deacetylated 경우 각각의 N/C 값과 비교하여 acetylated된 glucosamine unit의 비율을 구하였다.

Table 1의 결과로부터 본 연구에 사용될 키틴은 84.6%가 acetylated되어 있음을 알 수 있었다.

또한 얻어진 키틴을 NaOH로 acetylamino기를 가수분해하여 키틴산을 합성하였다. 본 연구에서는 될 수 있는 한 많은 양의 아세틸기를 가수분해시키기 위하여 3차례 반복해서 가수분해 반응을 실시하였다. 합성된 키틴산의 원소분석 결과도 Table 1에 나타내었다. 이 원소분석 결과로부터 남아있는 아세틸화된 glucosamine unit의 함량을 계산해보니 3.3%이었다. IR 스펙트럼을 보면 키틴의 경우는 1650cm^{-1} 에서 amide band가 나타나지만 키틴산의 경우는 이 band가 거의 없어졌다.

본 연구에서는 단분자막 실험에 적당한 키틴산 유도체를 합성하기 위하여, 키틴산을 최대한 acylate할 수 있는 여러 가지 방법을 검토하였다. 여러 가지 시약을 사용해 보고 또한 반응 조건도 바꾸어 보면서 실험해 본 결과, N-acylation과 O-acylation을 분리

Table 1. Elemental Analysis of Chitin and Chitosan

Sample	C	H	N	N/C	% of acetylation
Chitin	45.1	6.54	6.91	0.1532	84.6
Chitosan	44.8	6.86	8.64	0.1928	3.3
poly(N-acetyl-glucosamine)	47.3	6.45	6.89	0.1457	100.0
Polyglucosamine	44.7	6.88	8.69	0.1944	0.0

해서 실시하고, O-acylation 단계에서는 methanesulfonic acid를 사용할 때 acylation이 가장 많이 된 키틴산 유도체가 합성되었다. N-acylation 후에 IR 스펙트럼을 살펴 보면 키틴산의 경우에 거의 없어졌던 1650cm^{-1} 에서의 amide band가 N-acylation 후에는 키틴의 IR 스펙트럼과 비슷하게 나타났다. 또한 1725cm^{-1} 에서도 band가 나타나는데 이것은 N-acylation 과정 중에도 O-acylation이 조금은 진행되고 있음을 말해준다. 이 band는 O-acylation 후에는 매우 강해졌다.

키틴산에 decanoyl이 붙은 경우를 3C10 키틴산이라 명하였으며 dodecanoyl의 경우를 3C12 키틴산으로, hexadecanoyl의 경우를 3C16 키틴산으로 각각 명하였다.

본 연구에서 합성한 acylated 키틴산의 원소분석 결과와 이 원소분석 결과로부터 얻은 acylated 함량을 Table 2에 나타내었다.

Table 2에서 보면 3C10 키틴산의 경우 acylated된 정도는 매 glucoseamine residue 당 2.83이였으며, 3C12 키틴산의 경우는 2.80이었고, 3C16 키틴산의 경우는 2.77이었다. 탄소수가 증가할수록 acylated된 정도는 낮아졌다. 그러나 탄소 수가 16으로 비교적 많음에도 불구하고 본 실험에서 사용한 키틴산이 갖고 있는 $-\text{NH}_2$ 나 $-\text{OH}$ 기의 92% 이상이 acylated되어졌다. 합성한 acylated 키틴산 유도체를 chloroform에 녹여 Trough 위에 spreading한 후에 compress하여 π -A curve를 얻었다. 얻어진 π -A curve들이 Fig. 1에 나타나 있다.

Fig. 1에서 3C10 키틴산과 3C12 키틴산의 경우를 보면, π -A curve의 오른쪽 부분인 표면 장력이 증가하기 시작하는 부분은 액체와 같은 형태를 나타내는 부분이다. 이 부분에서는 긴 alkyl 사슬들이 random한 액체와 같은 conformation을 하고 있고 키틴산의 주사슬에 plasticizer와 같은 효과를 나타내고 있다.

Table 2. Elemental Analysis of Acylated Chitosan

Acylated Chitosan	Found %				Calcd %				Degree of Acylation
	C	H	N	N/C	C	H	N	N/C	
3C10 chitosan	68.92	10.32	2.29	0.03616	69.30	10.50	2.25	0.03247	2.83
3C12 chitosan	70.10	10.59	2.09	0.03307	71.24	10.96	1.98	0.02779	2.80
3C16 chitosan	71.56	10.99	1.78	0.02918	74.00	11.62	1.60	0.02162	2.77

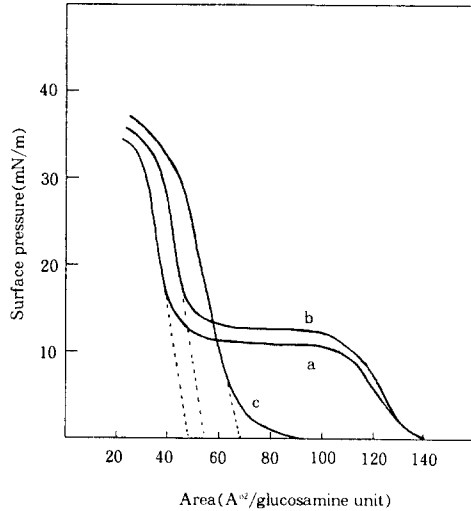


Fig. 1. Surface pressure-area isotherms for acylated chitosans. a : 3C10 chitosan, b : 3C12 chitosan, c : 3C16 chitosan.

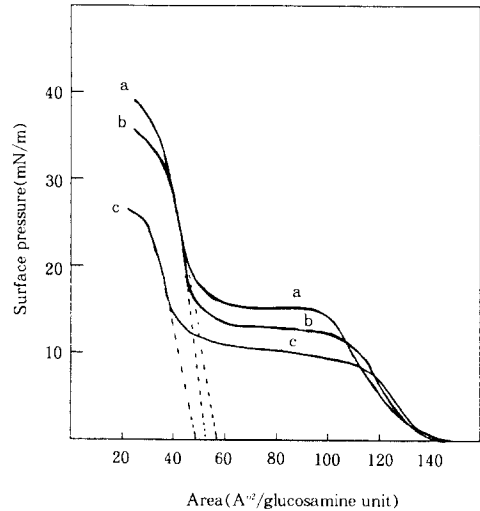


Fig. 2. Temperature dependence of the surface pressure-area isotherms of 3C12 chitosan. a : 10 °C, b : 20 °C, c : 30 °C.

계속되는 수평한 부분은 구부러져 있던 alkyl 사슬들이 물 표면에 수직되는 방향으로 쭉 뻗는 conformation을 점차적으로 갖는 영역이다. 이 수평한 부분이 끝나면 alkyl 사슬들이 서로 촘촘히 쌓여 지면서 이 monolayer는 단단한 성질을 나타내는 고체와 같은 구조를 갖게 된다. C16 키토산의 경우는 수평한 부분이 보이지 않는데 그 이유는 alkyl 사슬의 길이가 길어 사슬간의 인력이 충분하여 사슬들이 접근하면서 곧바로 alkyl 사슬들이 촘촘히 쌓여지기 때문으로 생각된다. Fig. 1에서 보면 glucose unit 당의 제한 면적이 C16 키토산의 경우에 70 \AA^2 이며 C12 키토산의 경우에 53 \AA^2 이며 C10 키토산의 경우에 48 \AA^2 이었다.

C12 키토산의 경우 π -A curve에 대한 온도의 영향을 Fig. 2에 나타내었다.

측정은 각각 10°C, 20°C, 30°C에서 실시되었다. 최대로 건디는 압력은 온도가 증가할수록 현저히 감소

하였으며 제한 면적도 온도 증가와 더불어 감소하였다. 제한 면적은 10°C일 때 58 \AA^2 이었으며, 20°C일 때 53 \AA^2 이었고, 30°C일 때 46 \AA^2 이었다.

다층 구조를 형성하기 위한 방법은 다음과 같다. C16 키토산을 trough 위에 spreading하여 monolayer를 형성시킨 후 20mN/m의 압력 조건에서 멈추어 이 압력을 유지하도록 조절하였다. 이 조건하에서 유리($1.3\text{cm} \times 2\text{cm}$)의 표면으로 앞에서 형성된 monolayer를 transfer하였다. 우리는 NaOH/ethanol 용액에 담겨놓은 후, 사용 전에 증류수로 여러번 세척한 다음에 사용하였다. 처음에는 수직 방향으로 시도하였는데 multilayer의 형성에 실패하였다. 그래서 수평 방향으로의 transfer를 시도하였다. 유리가 움직이는 속도는 20mm/min이었으며 위에서 100초동안 멈추고 수면에 접한 후에는 멈춤이 없이 진행하였다. 매번 접할 때마다 trough 위의 monolayer가 감소하는 면적의 크기는 유리의 표면적의 크기와 일치하였으며,

이러한 사실은 형성된 multilayer가 X-type의 구조를 하고 있다는 것을 말해준다. 한번의 실험에서 transfer할 수 있는 회수는 trough의 면적에 따라 정해지며, 본 실험에서는 20~30회 정도 transfer를 실시하고 멈추었다. 이때 평균 이전율은 $95 \pm 6\%$ 이었다.

4. 결 론

키토산에 acylation을 하여 키토산의 glucosamine unit에 있는 $-NH_2$ 기와 $-OH$ 기 모두에 decanoyl, dodecanoyl, hexadecanoyl 각각이 치환된 acylated 키토산들을 합성하였다. 이 키토산 유도체들을 trough 위에 spreading한 후에 compress하여 π -A curve를 얻었다. 얻어진 π -A curve로부터 제한면적을 계산하였으며 온도에 따른 π -A curve의 변화도 살펴 보았다. 형성된 monolayer를 수평 방향으로 접하는 방법으로 유리판 위에 transfer하여 multilayer를 형성시켰다. 형성된 multilayer는 X-type의 구조를 하고 있었다.

감 사

이 연구는 1995년도 한국과학재단 핵심전문연구과제 연구비 지원에 의한 결과임을 감사드립니다(과제번호 : 951-0305-037-1).

참고문헌

- I. Cho and J. S. Shin, *Polymer(Korea)*, **6**, 181 (1982).
- K. H. Kim, K. S. Kim, and J. S. Shin, *Polymer(Korea)*, **11**, 133(1987).
- K. H. Kim, K. S. Kim, J. S. Lim, J. S. Shin, and K. H. Chung, *Polymer(Korea)*, **12**, 56(1988).
- Y. C. Lee, K. S. Kim, and J. S. Shin, *Polymer(Korea)*, **13**, 442(1989).
- S. H. Cho, K. S. Kim, K. H. Kim, and J. S. Shin, *Polymer(Korea)*, **14**, 9(1990).
- Y. C. Lee, Y. M. Yoo, K. S. Kim, and J. S. Shin, *Polymer(Korea)*, **14**, 342(1990).
- K. S. Kim, S. H. Cho, Y. C. Chun, J. S. Shin, K. H. Kim, and J. S. Lim, *Polymer(Korea)*, **14**, 385 (1990).
- S. Hirano and Y. Nishiguchi, *Carbohydr. Polym.*, **5**, 13(1985).
- S. Hirano and Y. Nishiguchi, *J. Biomed. Mater. Res.*, **19**, 413(1985).
- S. Hirano, Y. Ohe, and H. Ono, *Carbohydr. Res.*, **47**, 315(1976).
- K. Laifu, N. Nishi, T. Komai, S. Tokura, and O. Somorin, *Polymer J.*, **13**, 241(1981).
- J. S. Shin, *Polymer(Korea)*, **19**, 379(1995).
- H. Lee, *Chemworld*, **33**, 814(1993).
- J. W. Park, *Chemworld*, **34**, 111(1994).
- H. Lee, *Polymer Sci. Tech.*, **5**, 471(1994).
- I. F. Chi, R. R. Johnston, H. Ringsdorf, N. Kimizuka, and T. Kunitake, *Thin Solid Film*, **210/211**, 111(1992).
- J. B. Peng, G. T. Barnes, A. Schuster, and H. Ringsdorf, *Thin Solid Film*, **210/211**, 16(1992).
- M. N. Teerenstra, E. J. Vorenkamp, A. J. Schouten, R. J. M. Nolte, C. A. Walree, J. F. Pol, and J. W. Zwikker, *Thin Solid Film*, **210/211**, 496(1992).
- I. Cho, S. W. Jeong, and J. S. Shin, *Polymer(Korea)*, **18**, 23(1994).