

Acylated Chitins : 그 製法과 膜의 性質

趙義煥 · 孔明宣 · 朴聖培

한국과학기술원 화학과

(1982년 3월 29일 접수)

Acylated Chitins: Their Preparation and Membrane Properties

I whan Cho, M.S. Gong and S.B. Park

*Department of Chemistry, Korea Advanced Institute of
Science and Technology*

(Received March 29, 1982)

요약 : N-Stearoyl chitosan을 한의여과 막으로서 성질을 조사하기 위해 키토산을 N-stearoylation하여 합성하였다. 키토산의 아민기중 평균 6개중 하나에 stearoylation 반응이 일어났으며 합성한 막을 포름 산에 녹여 필름을 제조한 결과 막의 두께는 18-22 μ , 흡수율은 15.8%이었다. 얻어진 필름으로 rejection efficiency (RE)를 측정한 결과를 키토산, 아세틸 키토산과 비교하였다. Exclusion limit가 분자량 4,000으로 키토산보다 매우 적은 값이며 분자량이 증가함에 따라 증가하였다. 또한 키토산 unit의 알킬기가 모두 존재하고 long chain alkyl기에 의한 소수성을 동시에 가지고 있어 아세틸 키토산보다 친수적 용질에 대해 RE가 작게 나타나고 있다. 그리고 아미노산의 경우 L과 D form 이 막에 대한 투과성이 같았으며 saccharide류가 polyethylene glycol류보다 RE가 작은 이유를 분배계수로서 설명하였다. 또한 농도와 압력에 따른 RE의 변화추세를 검토하고 막에 대한 flow를 convective와 diffusive flow로 나누어 고찰하였다.

ABSTRACT: N-Stearoyl chitosan was prepared to investigate the film properties as semipermeable membrane. N-Stearoyl chitosan was synthesized by the stearoylation of chitosan which was from chitin by deacetylation with alkali. Thus prepared chitosan sample had 87% of total possible acetyl amino group deacetylated. Extent of N-stearoylation was 17%. This sample of N-stearoyl chitosan was soluble in formic acid and water-swelling films could be cast from formic acid solution. Thus prepared films had wet thickness, 18-22 μ , and dry thickness, 12-13 μ , indicating 15.8% water absorption. Presently prepared N-stearoyl chitosan film had exclusion limit around 4,000 molecular weight, this value is in contrast with chitin (10,000) and acetyl chitin (7,500). Polyethylene glycols had larger rejection efficiency than amino acids and saccharide toward solutes of similar molecular weight. This correlates well with the distribution coefficient for the various solutes. The flux through the membranes was characterized in terms of convective and diffusive flow, and found to be the combination of both types of flow.

1. 서 론

키틴은 poly- β -(1 $\rightarrow$ 4)-N-acetyl-D-glucosamine 으로서 자연에 널리 존재하는 셀룰로오스와 비슷한 생체 고분자이다. 최근 키틴은 항생제의 원료로서의 글루코사민의 원천이 되고 있고, 폐수 처리제로서 키토산(deacetylated chitin)이 이용되고 있으며¹ 생분해성, 생활성 등 여러가지 특성을 가지고 있다. 키틴은 보통 유기 용매에 잘 녹지 않는 높은 결정성의 중합체로 매우 강한 산이나 fluoroalcohol, hydrotropic salt 용액에는 잘 녹으나 키틴을 빠르게 분해 시키거나 사용상 불편한 점이 많다. 그러나 비분해성용매의 발견으로 키틴의 방사, 연신도 가능하여 생체수용성과 생분해성을 겸비한 재료로서의 연구가 진행중이다. 본 실험실에서는 셀룰로오스와 같이 한외여과막으로서 키틴²과 아세틸 키틴³에 대해서 분자량 10,000, 7,500이 각각 exclusion limit (EL)임을 보고한 바 있다. 아세틸 키틴의 경우 막의 물리적 성질이 키틴과 많은 차이가 있었으며 더 작은 EL을 가지고 있다. 키틴의 관능기에 acylation 에⁴ 의한 alkyl chain의 도입은 EL을 현저하게 변화시키거나 어떤 화합물에 대한 선택적인 투과성도 나타낼 것으로 예상된다. Acylation은 키틴에 C₂~C₁₈ 산의 anhydride를 반응하여 진행시키고, 아실화도는 여러가지 반응조건에 의하여 결정된다. Long chain alkyl의 경우 키틴의 각 단위의 관능기에 붙어 소수성 상호작용을 이룰 수 있는 가능성도 있고 micelle을 이루어 이에 대한 특이한 현상도 기대된다. 본 연구에서는 long chain 지방산인 stearic anhydride를 키토산에 N-stearoylation하여 막의 성질과 한외여과막으로서 키틴, 아세틸 키틴과 비교 검토하였다.

2. 실험방법

2-1. 시 약

포름산 : 99%포름산을 무수황산 구리로 일차수분을 제거하고 다음 무수프탈 산을 넣고 환류시킨후 증류하여 사용하였다.

무수초산 : 시약용 무수초산을 오산화인(P₂O₅)

으로 처리하고 증류하여 사용하였다.

피리딘 : 수산화나트륨을 넣어 환류시킨후 115°C에서 분별증류하여 사용하였다.

2-2. 키틴의 분리

뼈오징어(Sepia essculenta, Sepia subaculeate or Sepia hercules)의 뼈(pen) 부분을 미세하게 부수어 5°C 이하에서 1N의 HCl 용액과 교반하여 반응시켜 탄산칼슘을 완전히 제거하였다. 산처리가 끝난 키틴을 세척, 건조한 후 1N의 NaOH 용액에 넣고 10시간 정도 끓이면서 Xanto-Protein 반응이 나타나지 않을 때까지 반응시켜 증류수로 세척하고 건조하여 분리하였다.

2-3. 키토산의 제조

170g의 NaOH를 250g의 증류수에 서서히 넣고 녹인후 키틴을 약 15g 넣은 후 4시간 동안 환류시켰다. 얻어진 키토산을 증류수로 여러번 씻고 건조하여 얻었다.

2-4. Stearoylation

키토산 0.5g을 10ml의 10%초산 수용액에 녹이고 40-50ml의 메칠 알콜을 넣어 희석시킨다. 촉매로서 5ml의 피리딘을 가한 다음 11.1g의 stearic anhydride를 가한다. 반응의 가속화를 위해 약 1분 가량 환류시킨후 상온에서 12시간 반응시켰다. 반응물을 여과지로 걸러내고 아세톤, 에틸에테르로 세척하고 건조하여 스테아로일 키토산을 얻었다.

2-5. 스테아로일 키토산 막의 제조

Stearoylchitosan을 무수포름 산에 중량 20%를 넣고 충분히 녹인 다음 여과지로 거른다. 이 용액을 주사기로 일정량을 뽑아 유리판 위에 펴 포름산을 증발시켜 제조하였다. 잔존하는 포름산은 0.11% NaOH 용액에 담가 제거하였다. 막의 두께는 마른 막이 12-13 μ , 물에 팽윤된 막이 18-22 μ , 함수율 15.8%, 젖은 막의 밀도 0.623g/cm³, 젖은막 내부의 물 농도 0.111g/cm³이었다.

2-6. 키토산의 확인 및 적정

키토산은 키틴보다 물에 팽윤이 더 잘되었으며 포름 산이나 초산, 10% 초산, hexafluoroisopropanol 이외에도 propionic acid, butyric acid 등에 잘 녹았다. IR 스펙트럼에서 키틴은 $3,447\text{ cm}^{-1}$, $3,264\text{ cm}^{-1}$ 에서 각각 O-H와 N-H 밴드가 나타나며 $1,650\text{ cm}^{-1}$, $1,550\text{ cm}^{-1}$, $1,350\text{ cm}^{-1}$ 에서 아마이드 밴드가 각각 나타난다. 그런데 키토산의 IR 스펙트럼은 이 아마이드 밴드가 거의 없어지고 대신 $1,590\text{ cm}^{-1}$ 에서 강한 $-\text{NH}_2$ 밴드가 나타난다. 또 키토산에 아세틸 아미노기와 아민의

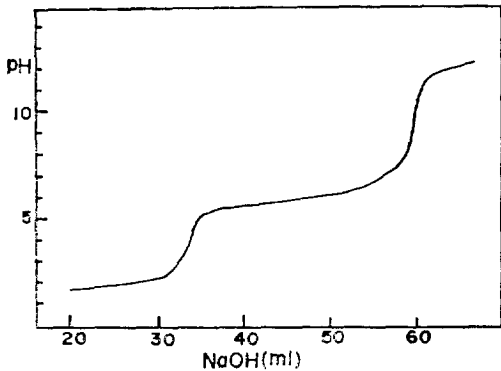


Figure 1. Titration curve for the chitosan

비를 구하기 위해 중화적정을 하였다. 250ml 바이커에 0.12 N HCl 용액 50ml와 0.5g의 키토산을 넣고 교반시키면서 0.1 N NaOH 용액을 떨어뜨려 NaOH의 ml와 pH를 그린 그래프가 다음 Fig. 1과 같다.

두 변곡점을 각각 33.8ml, 60.0ml로 잡으면 적정에 쓰인 NaOH량은 26.2ml이며 87.2%가 아민기로 되어있음을 알 수 있었다.

2-7. 스테아로일 키토산의 확인

스테아로일 키토산의 수율은 58.3%로 얻어졌으며 키토산의 아민기중 6개 중에 하나가 acylation이 일어났음을 알 수 있었다. 스테아로일 키토산은 물, 아세톤, 메타놀, DMF 등에 녹지 않았고 포름산에 매우 잘 녹았다. 필름을 사용하여 IR 스펙트럼을 얻었다. $2,900\text{ cm}^{-1}$ 부근의 강한 C-H stretching band와 $1,650\text{ cm}^{-1}$ 의 카보닐, $1,540\text{ cm}^{-1}$ 에서 N-H stretching band를 볼 수 있

었다. O-acyl group은 $1,750\text{ cm}^{-1}$ ($\text{C}=\text{O}$), $1,240\text{ cm}^{-1}$ ($\text{C}-\text{O}$)에서 밴드가 없는 것으로 보아 히드록실기에는 acylation이 일어나지 않은 것으로 보인다

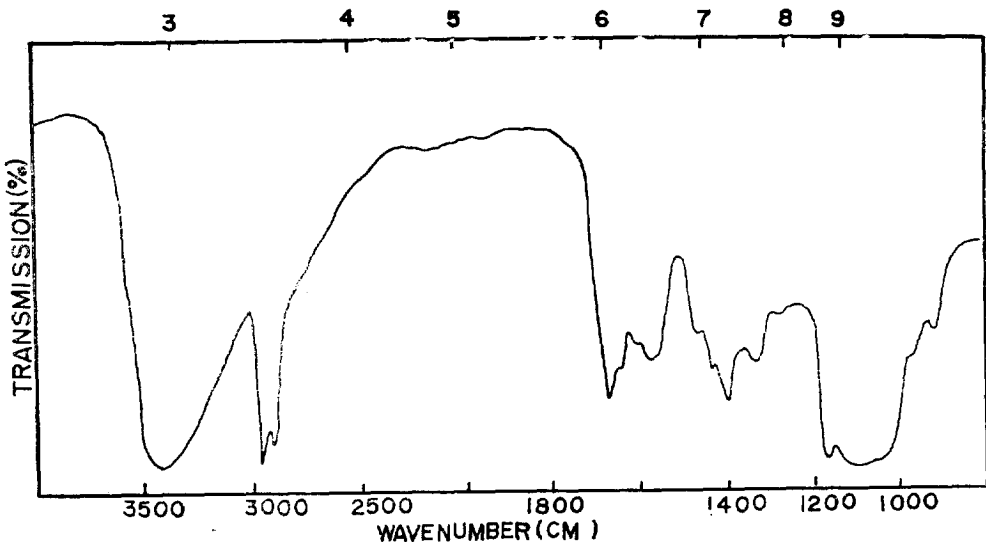


Figure 2. IR spectrum of N-stearoylchitosan

2-8. 한의여과 실험

Rejection efficiency, R 은 $R = 1 - \frac{C_p}{C_f} = \frac{\ln C_p/C_{p0}}{\ln V_0/V}$ 로 표시되며 여기서 C_p : 한의여과된 용액의 미소농도 증가분, C_f : Cell 안의 용액농도, C_{p0} : 용액의 농도, V : Cell 안의 용액의 부피를 나타내고 한의여과되고 남은 용액의 농도와 부피를 reflective index 차이의 비로 계산하였다. 실험에 사용한 cell은 Amicon-stirred U.F. Model 12를 사용하였고 그 대략의 구조는 다음 Fig. 3와 같다.

실험에 사용된 용액은 1g/dl로 일정하게 하고 압력은 2기압, induction period는 3시간으로 하고 농도 측정은 differential refractometer (Bricphenix model 2,000-Vj)를 사용했고 standard curve가 직선관계를 유지하는 범위안에서 실험하였다.

2-9. 분배계수

각 용질의 키틴 유도체 막안의 용해도와 친화성을 알기 위해 분배 계수를 측정하였다. 막의 면적과 두께로부터 부피를 구한 다음 5cc의 농도를 아는 용액에 0.2cm³정도의 막을 담고 용액과 막이 충분한 접촉을 가지도록 흔들어 주며 3일 후에 막이 용액과 평형을 이룰 때 용액의 농도 변화를 측정하여 구하였다.

3. 결과 및 고찰

3-1. Rejection Efficiency(RE)

키틴 유도체들의 각각의 용질에 대한 RE는

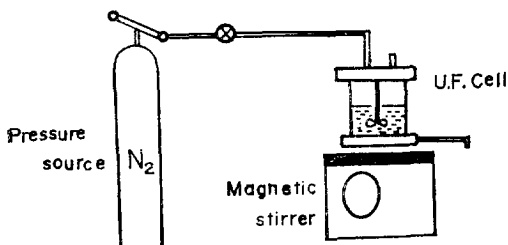


Figure 3. Schematic diagram of ultrafiltration apparatus

Table I과 같다.

키틴, 아세틸 키틴, 스테아로일 키틴산의 EL은 각각 10,000, 7,500, 4,000으로 추정되었다. 각각의 분자량에 대한 RE는 다음 Fig. 4와 같다.

키틴과 비교하여 아세틸 키틴이나 스테아로일 키틴산은 같은 화합물에 대해서 RE가 크게 증가하고 있다. 그 중 스테아로일 키틴산은 특히 EL이 4,000으로 현저하게 줄어들었다. 각각의 막에서 PEG류는 분자량이 커짐에 따라 RE가 증

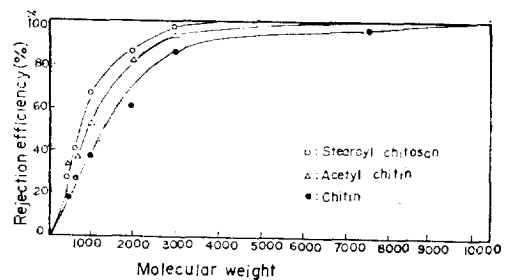


Figure 4. Solute rejection profiles of chitin derivatives towards compounds of different molecular weight

Table I. Rejection efficiency of acyl chitosan films toward various solutes (pressure, 2 kg/cm², 25°C)

Compound	Molecular Weight	Rejection Efficiency (%)		
		Chitin	Acetyl-chitin	Stearoyl Chitosan
PEG 200	200	—	14	—
" 400	400	16.1	32.1	27.4
" 600	600	26.0	36.7	41.1
" 1,000	1,000	36.7	51.4	68.3
" 2,000	2,000	60.3	80.6	86.4
" 4,000	3,000	85.3	91.2	97.5
" 6,000	7,500	93.4	99.3	100
PVP 10,000	10,000	—	100	100
PEG 20,000	20,000	100	100	—
L-Alanine	89	—	4.7	1.3
L-Histidine	155	—	6.3	2.2
L-Phenylalanine	165	—	6.5	2.5
Raffinose	504	14.7	30.2	26.6
Maltose	342	8.3	25.4	16.8
NaCl	58	0.0	4.7	3.0
MgSO ₄	120	—	12.1	—

가하며 아미노산이나 saccharide 경우도 역시 분자량에 따라 증가하고 있다. 그러나 비슷한 분자량에 대해 saccharide나 아미노산류는 PEG류보다 훨씬 작은 RE를 나타낸다. 이것은 막에 대한 용질의 친화성의 척도인 분배계수를 비교하여 보면 알 수 있다. 즉 스테아로일 키토산에서 raffinose와 PEG 400은 각각 분배계수가 36.3과 35.5이다. PEG 400은 분자량이 raffinose보다 작음에도 불구하고 분배계수가 작은 값으로 나온다. 이것으로 raffinose가 PEG보다 막에 대한 친화성이 큰 것을 알 수 있다.

아세틸 키틴은 특히 아미노산, saccharide에 보다 큰 RE를 가지는데 이것은 키틴 단위의 2개의 알콜기에 acetylation에 의한 소수성이 증가

되어 막에 대한 친화성이 작아졌기 때문이다. 또한 스테아로일 키토산은 키틴 단위 6개 중 1개가 stearylation된 것으로 키틴의 알콜기는 모두 존재하면서 long chain alkyl기에 의한 소수성질을 동시에 가지고 있다. 그래서 아세틸 키틴보다 친수적 용질에 대해서 RE가 훨씬 작게 나타난다. 또한 무기염에 대해서는 실제의 분자량과 비교하여 매우 큰 RE가 나타나는데 이것은 수화된 이온 반경⁵⁾이 실제보다 증가하기 때문이다. 또한 아미노산의 경우 D와 L form의 RE 차이는 찾아볼 수 없었다.

3-2. Rejection efficiency의 농도 및 압력의 의존성

PEG 600과 PEG 2,000에 대해 압력이 2 기압으로 일정할 때 농도를 변화시키면서 RE를 측정하였다. 각각의 경우 농도가 점차로 증가할수록 커지며 그 증가비는 농도가 증가함에 따라 커졌다. 그 실험 결과는 Fig. 5와 같다.

PEG 2,000에서는 PEG 600보다 RE의 증가비가 더 커짐을 알 수 있었다. 이것으로 분자량이 커질수록 농도에 대한 RE의 증가비는 분자량이 작을 때보다 더 커지는 것을 알 수 있었다. 일반적으로 RE는 linear filtration rate (filtration

Table II. Distribution coefficients of various solutes in chitin derivatives membrane

Compound	Molecular weight	Distribution Coefficient(%)		
		Chitin	Acetylchitin	Stearyl Chitosan
L-Alanine	89	—	62.3	50.7
Glucose	180	81.0	—	49.5
Maltose	342	72.4	42.8	43.2
Raffinose	504	62.8	36.4	36.3
PEG 400	400	49.7	38.7	35.5
PEG 600	600	43.3	25.1	22.6
PEG 1,000	1,000	34.1	15.6	19.7

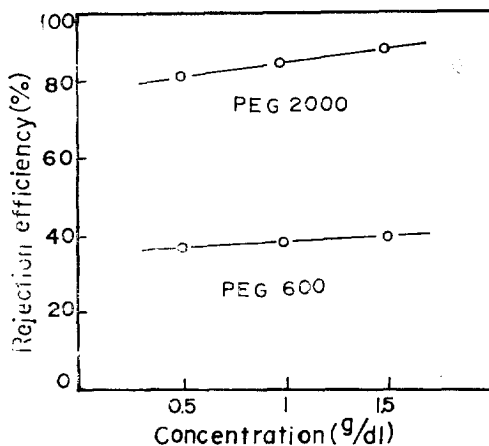


Figure 5. Dependence of rejection efficiency upon the solution concentration

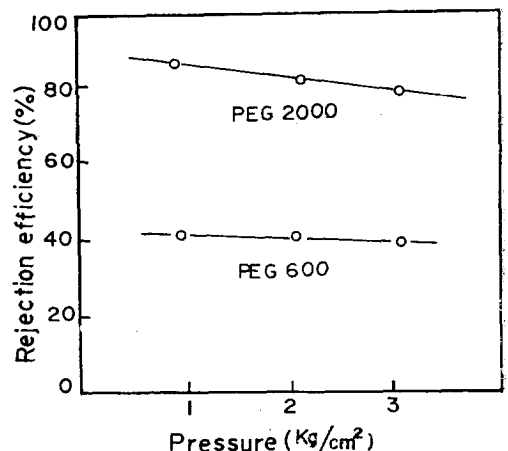


Figure 6. Dependence of rejection efficiency upon the applied pressure

rate/area of ultrafiltration membrane)와 filtrate 의 용질농도의 곱에 비례하며 용질분자 자신들끼리의 상호작용은 제외된다⁶. 앞의 현상은 한 외여과 cell안의 용액이 교반이 잘되지 않은 상태에서는 retention이 매우 증가하는데 이것은 rejection되는 분자가 막의 표면에 축적이 되어 용질층을 형성하거나 막의 pore를 막아 용질이 통과 못하도록 blocking하는 것으로 보인다.

압력에 대한 의존성은 농도를 일정하게 유지하고 압력을 1기압에서 3기압까지 변화시켜 가면서 RE를 측정하였다. 압력이 증가함에 따라 한 외여과 속도의 증가는 laminar flow theory에 의해 예측된 linear effect보다 훨씬 적는데 McBain에 의한 막의 compression 때문이거나 nylon cloth supporting the membrane과 같은 것에 존재하는 pore blocking 때문이다. 완전히 pore membrane이 아닌 경우에서 압력이 증가하면 한 외여과 속도가 증가하고 큰 압력에 의해 pore가 일그러져 pore를 빠져나가는 용질의 양이 증가되어 RE는 작아진다.

PEG 600과 PEG 2,000에 대한 압력의존성은 Fig. 6과 같다. 각각은 모두 압력이 증가함에 따라 RE는 약간씩 감소하였다. PEG 600의 경우 그 감소비는 PEG 2,000에 비하여 작아졌는데 이것은 pore를 빠져나가는데 분자량이 작을수록 유리하기 때문에 영향을 덜 받는 것으로 생각되어진다.

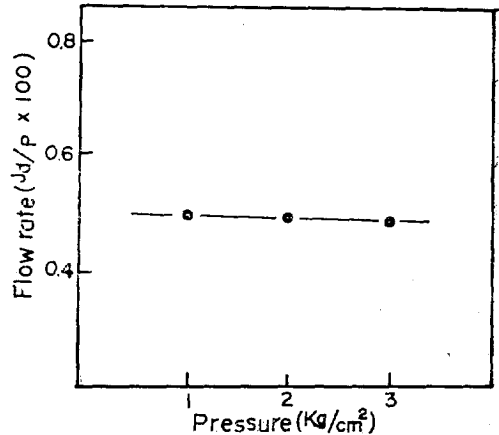


Figure 7. Effects of the applied pressure on diffusive flow

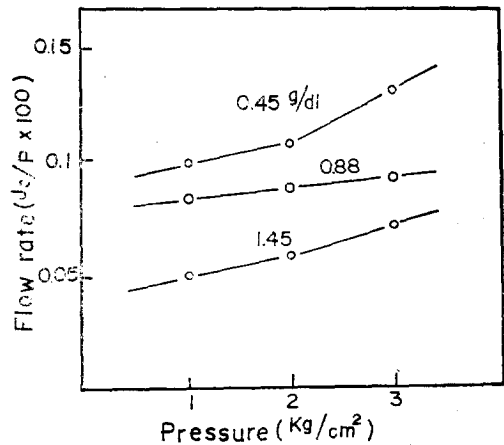


Figure 8. Effects of the applied pressure and concentration on convective flow

Table II. Results of ultrafiltration measurement for stearylated chitosan membrane

Concentration (g/dl)	Press (kg/cm²)	Rejection Efficiency (%)	Flow rate (g/min × 10³)	$J_d \times 100$	$J_d/p \times 100$	$J_c \times 100$	$J_c/p \times 100$
0.45	1	84.9	0.66	0.560	0.560	0.099	0.099
	2	83.7	1.34	1.122	0.561	0.218	0.109
	3	81.0	2.08	1.685	0.562	0.395	0.131
0.88	1	87.3	0.65	0.567	0.567	0.083	0.083
	2	86.4	1.32	1.140	0.570	0.180	0.090
	3	85.5	2.01	1.719	0.573	0.291	0.097
1.45	1	91.2	0.62	0.565	0.565	0.055	0.055
	2	89.4	1.26	1.126	0.563	0.134	0.067
	3	86.0	1.96	1.686	0.562	0.274	0.091

3-3. Diffusive Flow와 Convective Flow

막을 통과하는 용매의 속도를 diffusive flow와 convective flow로 나누어 고찰하였다. 용질이 bound water network에 참여하지 않는다면 다음 관계식에 성립한다.

$$J_u = R - J$$

$$J_c = (1 - R) \cdot J$$

J_u : diffusive flow rate

J_c : convective flow rate

J : 한의여과 속도

R : rejection efficiency

PEG 2,000 용액에서 구한 자료를 위의 두 가지 메카니즘에 의한 속도로 분리해 보았다. J_d/P 는 압력과 농도에 관계없이 거의 일정하였으며 J_c/P 는 압력에 따라 약간씩 증가하였다. 이 결과는 PVA,⁷ 키틴,² 아세틸 키틴⁸ 막에 대해서 실험한 결과와 비슷하다. 그 실험 결과는 Table III과 같으며, 그것을 그래프로 표시하면 Figure 7 및 8과 같다.

4. 결 론

백오징어로부터 추출한 키틴을 N-deacetylation하여 키토산을 합성하였다. 이 키토산에 포함된 아민기와 아세트 아미드기의 갯수비는 6.8:1이었다. 수율 93%로 stearic anhydride와 키토산을 반응시켜 스테아로일 키토산을 합성하였고, 전 아민기의 $\frac{1}{6}$ 이 acylation 되었다. 여기서 얻어진

스테아로일 키토산은 exclusion limit이 분자량 4,000이었고 키틴이나 아세틸 키틴과는 비교하여 매우 작은 값이다. 아미노산의 경우 D와 L form의 rejection efficiency차이는 없었고 비슷한 분자량에 대해 PEG류와 saccharide, amino acid와의 차이는 분배 계수차이 즉, 막의 친화성으로 알 수 있었다.

REFERENCES

1. P.R. Austin, C.J. Barrine, J.P. Zikakis, *Science*, 212, 749 (1981).
2. I. Cho, Y.C. Lee, *Int. J. Biol. Macromol.*, 2, 52 (1980).
3. I. Cho, M.S. Gong, *Polymer (Korea)*, 4, 331 (1980).
4. S. Hirano, Y. Ohe, H. Ono, *Carbohydr. Res.*, 47, 315 (1976).
5. A.S. Michaels, H.J. Bixler, R.M. Hodges, Jr., *J. Colloid. Science*, 20, 1034 (1965).
6. W.E. Henderson, C.M. Slieperich, *Chem. Eng. Progress Symp. Ser.*, 55, 145 (1968).
7. C.E. Reid, H.G. Spenser, *J. Phys. Chem.*, 64, 1587 (1960).
8. I. Cho, M.S. Gong, "Chitin Derivatives and Their Properties", M.S. Thesis, Korea Advanced Institute of Science and Technology, Seoul, Korea (1980).