

## 키틴·키토산 유도체의 합성기술과 그 분석법

김 세 권 / 부산수산대학교 교수

### 머 리 말

키틴은 새우, 게 등의 갑각류 및 연체류의 껍질, 그리고 곤충류, 버섯류 및 사상균의 세포벽 등에 함유되어 있으며, 연간  $1 \times 10^{11}$ 톤 정도로 지구상에서 셀룰로오스 다음으로 많이 생산되고 있다. 따라서 키틴은 지구상에서 미이용자원으로서 현존하는 최후의 biomass라 할 수 있으며, 특히 최근에는 천연에 존재하는 다당류의 신기능 소재로서 키틴 키토산이 주목을 받고 있다.

키틴은 *N*-아세틸글루코사민이  $\beta$ -1,4-글리코시드 결합한 뮤코다당류의 일종으로서 셀룰로오스의 글루코오스잔기의 C-2의 수산기가 아세틸아미노기로 치환된 화학구조를 가지고 있으며, 키토산은 키틴이 디아세틸화 한 구조로 되어 있다.

최근에는 이러한 여러 가지 흥미있는 생물활성이 밝혀지고 있어 크게 주목을 받고 있으며, 그 자체가 아미노다당이기 때문에 각종의 기능을 부여하는데 적합한 분자구조를 하고 있다고 생각되어 기능성 소재로서 상당히 높은 가능성을 갖는 것으로 기대되지만 일반 용매에 녹지 않기 때문에 그 잠재적 기능성을 충분히 개발시키지 못하고 있는 실정이다.

키틴의 구조특이성에 착안하여 화학수식

에 의한 기능화의 접근방법에 대한 관심은 이미 오래되었으나 불용성과 다작용성(multifunctionalities) 때문에 키틴의 화학수식에는 어려운 점이 수반되는 경우가 많았다. 특히 특정 위치에 활성이 있는 치환기를 도입하는 것은 지금까지 거의 불가능하여 기능성 소재로서 고도 유효이용이 늦어져 온 큰 원인이 되었다. 그러나 화학수식법의 개발이 최근 활성화됨으로써 키틴의 화학적 수식에 의한 기능화에 새로운 전기를 맞이하고 있다. 본고에서는 키틴 키토산의 화학수식에 의한 유도체의 합성기술과 이들의 분석법에 대하여 살펴보고자 한다.

### 1. 탈아세틸화(Deacetylation)

키틴을 화학수식하기 위한 가장 대표적인 화학반응은 C-2의 아세토아미드기의 가수분해반응, 이른바 탈아세틸화반응이다. 탈아세틸화도의 비율이 높은 것은 키토산이라 부르며, 묽은 초산 등의 산성용액에서 용해된다. 탈아세틸화 반응은 보통 키틴조각 또는 분말을 진한 수산화나트륨 수용액(30~60%) 중에서 가열(80~120°C, 0.5~5시간) 교반함으로써 이루어진다.

탈아세틸화도는 사용한 수산화나트륨 농도, 반응온도 및 시간에 따라 어느 정도 체

어할 수 있지만 온화한 조건(30%이하 농도의 NaOH, 112°C이하)에서는 결정부분의 가수분해는 진행되기 어려워 탈아세틸화가 잘 이루어지지 않는다. 완전히 탈아세틸화한 키토산을 얻기 위해서는 알칼리처리를 수회 반복할 필요가 있다. 그러나 이같은 강알칼리를 사용한 조건하에서 탈아세틸화는 동시에 글리코시드결합의 일부가 가수분해되어 분자량이 저하된다. 이같은 분자량 저하는 탈아세틸화 반응이 질소환경 내에서 하든가, 반응계에 티오페놀이나 수소화 붕소나트륨을 첨가함으로써 어느 정도 억제할 수 있으나 여전히 분자량 저하는 상당량 일어난다. 이외의 방법으로써 수산화나트륨 대신에 수산화칼륨 수용액<sup>1)</sup>, 용융수산화칼륨<sup>2)</sup>, 수산화칼륨/에탄올/에틸렌글리콜 혼합용액<sup>3)</sup> 및 수열법<sup>4)</sup> 등이 보고되어 있다.

이상의 탈아세틸화반응은 일반적으로 불균일 용액계에서 일어나지만 키틴은 진한 알칼리 수용액에 녹기 때문에 균일 용액계에서도 탈아세틸화반응이 가능하다. 이 경우 탈아세틸화도가 약 0.5인 키틴은 중성의 물에도 녹는 수용성 키틴으로 된다. 그러나 종래의 불균일 용액계 반응에서 같은 정도로 탈아세틸화 하여도 물에는 녹지 않았다. 불균일 용액계의 반응에서는 표면 및 비정(非晶)부분에서 우선적으로 탈아세틸화시키기 위해 불록화 된 *N*-아세틸기의 분포를 가지게 된다. 이것에 대하여 균일 용액계에서 탈아세틸화반응은 일관성 없이 진행되어 키틴 분자간의 수소결합이 약하기 때문에 수용성이 발현된다고 볼 수 있다. 수용성 키틴에서 *N*-아세틸기의 분포가 일관성이 없는 것은 리조짐(lysozyme)에 의한 분해성<sup>5)</sup>, NMR<sup>6)</sup> 등에 의해 검토되고 있다.

지금까지 연구대상이 된 키틴은 주로 새우, 게로부터 얻어진  $\alpha$ -키틴으로 결정구조 중에서 분자사슬이 서로 역평행으로 줄지어 있고, 강한 분자간 수소결합에 의해 견고한 결정구조를 취하고 있다. 이와는 다른 오징어 유래의  $\beta$ -키틴에서는 분자사슬이 서로 같은 방향으로 줄지어 분자간 수소결합이 비교적 약한 결정구조를 취하고 있다. 이 때문에  $\beta$ -키틴은  $\alpha$ -키틴보다 높은 반응성을 나타내어 훨씬 탈아세틸화되기 쉽다(그림 1)<sup>7)</sup>.

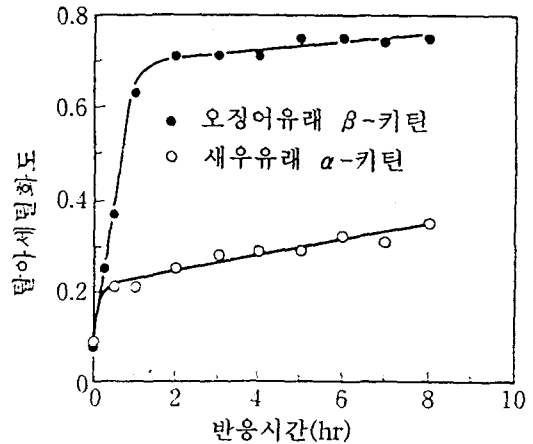


그림 1.  $\alpha$ - 및  $\beta$ -키틴의 탈아세틸화  
NaOH 농도 : 30%, 반응온도 : 100°C

효소를 이용하여 탈아세틸화 하는 방법으로 식물병원균 등의 세균류, 또는 그것으로부터 분리시킨 키틴 탈아세틸화효소(EC.3.5.1.41)<sup>8)</sup>를 사용할 수 있다. 단, 키틴을 함유한 배지 중에서 이들 균을 배양하면 탈아세틸화되지만 어느 한계 이상은 진행되지 않는다. 그러나 글리콜키틴, 키틴올리고당 등의 수용성 키틴유도체는 고도로 탈아세틸화 시킴으로써 물에 불용인 키틴에서는 효소가 결정내부까지 침투할 수 없다는 것을 나타내고 있다.

키틴의 성상을 결정하는 가장 중요한 요인으로서 탈아세틸화도를 들 수 있다. 여러 가지 측정법이 검토되고 있지만 각각 장단점이 있다. 이들 측정방법은 10항에서 기술할 것이다.

## 2. 아실화(Acylation)

### 1) O-아실화, O, N-아실화

키틴의 수산기는 산염화물이나 산무수물로 아실화시킨다. 피리딘 등 일반적인 용매 중에서 키틴은 용해되지 않기 때문에 불균일 용액계에서 반응시켜 치환도를 높게 하는 것은 어렵다. 그러나 무수초산 내로 염화수소를 불어 넣어야 하는 가혹한 조건하에서는 완전히 아세틸화 된다. 또 메탄술폰산이나 삼염화초산/1,2-디클로로에탄올 용

때로 하여 키틴을 아실화시키면 치환도가 높은 유도체가 얻어지지만 주사술의 절단이나 염소화 등의 부반응도 일어난다. 생성물의 치환도는 사용한 아실화 시약과 반응조건에 의존하지만 무수초산, 무수프로피온산, 무수호박산, 무수안식향산 등의 산무수물을 사용한 경우, 치환도는 0.2~2.0이다. 염화아세틸, 염화헥사노일, 염화도데카노일, 치환염화벤조일 등의 산염화물을 사용하여도 최고 2.0의 치환도를 달성시킬 수 있다. 그 외에 포름산/메탄술폰산계에서의 O-포르밀화 반응(치환도 ~1.4)도 보고되어 있다<sup>9)</sup>.

오징어 유래의  $\beta$ -키틴은 보통의  $\alpha$ -키틴과는 달리 온화한 조건하에서도 쉽게 아실화된다. 예를 들면 피리딘중, 디메틸아미노피리딘 존재하에서 무수초산을 사용하면 치환도 2.0의 완전한 아세틸화 키틴이 얻어진다. 키틴산의 수산기만을 아실화할 때는 유리의 아미노기를 보호하여 놓을 필요가 있다. 즉, 먼저 알데히드와 반응시켜 시프염기(Schiff base)로 아미노기를 보호한 *N*-아리

리덴 키틴산, 또는 *N*-알킬리덴 키틴산으로 한후, 아실화하면 *O*-아실유도체가 생성되며, 이것을 약산으로 처리하여 보호기를 떼어내면 *di-O*-아실키틴산이 얻어진다.

## 2) *N*-아실화

키틴산의 *N*-아실화는 카르복실산, 산염화물, 산무수물에 의해 이루어지고 있지만 동시에 수산기의 아실화가 수반되는 경우가 많다. 그 때문에 선택적으로 *N*-아세틸화를 하여 탈아세틸화도 0.0의 균일한 분자구조를 갖는 키틴을 얻기는 곤란하다. 그러나 수용성 키틴의 수용액, 또는 그 수용액을 유기용매 중에 넣어 고도로 팽윤시킨 침전을 사용하여 초산/DCC(dicyclohexylcarbodiimide) 또는 무수초산으로 아세틸화함으로써 달성시킬 수 있다. 또 오징어 유래  $\beta$ -키틴을 사용하면 메탄올 중 무수초산으로 선택적으로 *N*-아세틸화 할 수 있기 때문에 탈아세틸화도 0.0의 구조적으로 균일한 키틴을 쉽게 얻을 수 있다.

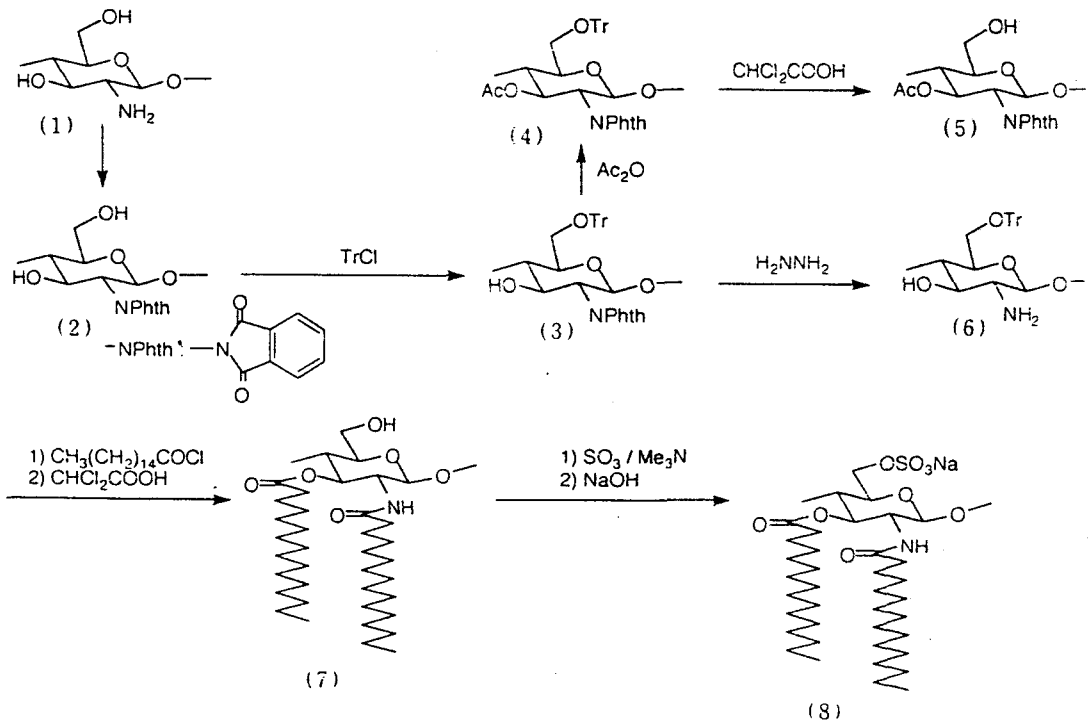


그림 2. 프타로일화키틴산의 화학수식

키토산의 아미노기는 환상(環狀)의 산무수물(프탈산, 트리멜리트산, 피로멜리트산의 무수물)로 아실화 한 후 가열 폐환(閉環)하면 이미드화가 된다. 이때 도입된 카르복실기나 산무수물기는 다시 화학수식에 이용할 수 있다. 또 *N*-프탈로일화한 유도체는 디메틸설폭시드(DMSO)에 용해되는 것이 발견되었다. 완전히 탈아세틸화한 키토산의 *N*-프탈로일화도 디메틸포름아미드(DMF) 중에서 정량적으로 진행되며, 생성된 *N*-프탈로일화 키토산(그림 2의 (2))(치환도 1.0)<sup>10</sup>은 DMF, DMSO 이외에 피리딘 등의 일반적인 용매에도 녹기 때문에 유기용매 중 균일계에서 반응하기 위한 전구체로서 유용하다. 이것으로 부터 여러 가지 화학수식을 위치선택적 또한 정량적으로 행하는 것이 가능하게 되었다. 예를 들면 (2)를 피리딘 중에서 염화트리메틸과 반응시키면 6위치 수산기만이 트리메틸화된 (3)이 만들어진다. 더구나 3위치의 수산기를 아세틸화하여 (4)로 하고, 디클로로초산으로 탈트리메틸화하여 (5)로 하면 6위치만이 유리의 관능기를 갖는 유도체를 얻을 수 있다. 이 방법으로 키토산의 3위치와 6위치의 수산기를 완전히 식별하는 것이 가능하게 되었다. 또 이들의 유도체는 어느 것이나 높은 용해성을 나타낸다. 이 *N*-프탈로일화 키토산 (2)를 전구체로 하여 이용한 반응 예로서는 양친매성 키토산유도체의 조제이다(그림 2). (2)에서 유도된 (6)을 팔미토일화하고 6위치의 트리메틸기는 탈보호, 황산화 및 중화하면 양친매성 키토산 유도체 (8)를 조제할 수 있다.

수용성 키토산의 조제는 키토산의 가수분해에 의한 방법 이외에 키토산의 부분 *N*-아세틸화에 의해 조제할 수 있다. 키토산의 묽은 초산수용액을 무수초산/피리딘 혼합액에 넣어 고도로 평윤한 키토산을 약 50% 아세틸화함으로써 수용성 키토산을 얻을 수 있다.

지금까지 알려진 일반적인 수용성 키토산의 조제법은 중화할 때 생성되는 염화나트륨을 제거하기가 번잡하였지만 이 조제법은 간편할 뿐만 아니라 다량으로 조제하는 경우에도 적합하다. 이 키토산의 평윤활성 겔을 사용하면 노나노일, 데카노일, 미리스토

일 등 산염화물에 의한 긴사슬의 아실기의 도입이나 니코틴산 무수물에 의한 니코틴노일화도 가능하다. 또 수용성 키토산을 사용한 반응의 한 예로서 아래와 같은 *N*-카르복시 아미노산 무수물(NCA)의 그라프트 공중합이 있다.

이 반응에서는 키토산의 아미노기를 중합 개시점으로 작용, NCA가 개환(開環) 중합한다. 키토산 측쇄의 중합도는 가한 NCA의 양에 의존한다. 그라프트 공중합에 유용하게 사용된 NCA의 비율은 70~80%로 상당히 높다. 또 알라닌 NCA를 마찬가지로 그라프트 공중합시켜 그 측쇄 말단의 아미노기를 니코틴노일화 한 후, 피리딘핵을 4급화하여 환원하면 보조소 NADH의 활성부위를 갖는 고분자 부제(不齊)환원시약을 조제할 수 있다. 이것을 사용하면 에틸벤조일포르메이트(ethylbenzoylformate)도 부제 환원시킬 수 있다.

### 3. 토실화(Tosylation)

키토산에 토실기를 도입한 유도체는 높은 반응성과 용해성을 기대할 수 있다. 그 때문에 토실화 키토산[그림 3의(9)]은 여러 가지 화학수식을 하기 위한 전구체로서의 이용 가능성을 가지고 있다. 키토산과 염화토실과의 피리딘 중에서 반응은 불균일계이며 거의 반응하지 않고, 반응 온도를 높이면 부반응 때문에 착색이 형성된다. 따라서 알칼리 키토산 수용액과 염화토실의 클로로포름 용액과의 계면반응을 시도함으로써 효율적으로 토실화 할 수 있는 것이 관명되었다<sup>11</sup>. 이 계면반응에 의한 토실화를 재현성 좋게 하기 위해서는 충분한 교반과 냉각이 필요하지만 첨가한 염화토실의 양에 따라 비교적 용이하게 생성물의 토실화도를 제어할 수 있다. 이때 치환도는 1정도까지 쉽게 올릴 수 있다. 이런 조건하에서 토실화는 6위치 수산기가 우선적으로 반응하고 있다고 생각된다. 또 이 반응에는 강알칼리를 사용하기 때문에 일부는 탈아세틸화된다. 따라서 토실화 후 생성물을 메탄올 중에 현탁하여 무수초산으로 *N*-아세틸화

하고, 수산화칼륨의 메탄올용액으로 처리하여 O-아실기를 제거시킴으로써 탈아세틸

화도 0의 구조적으로 명확한 토실화키틴을 만들 수 있다.

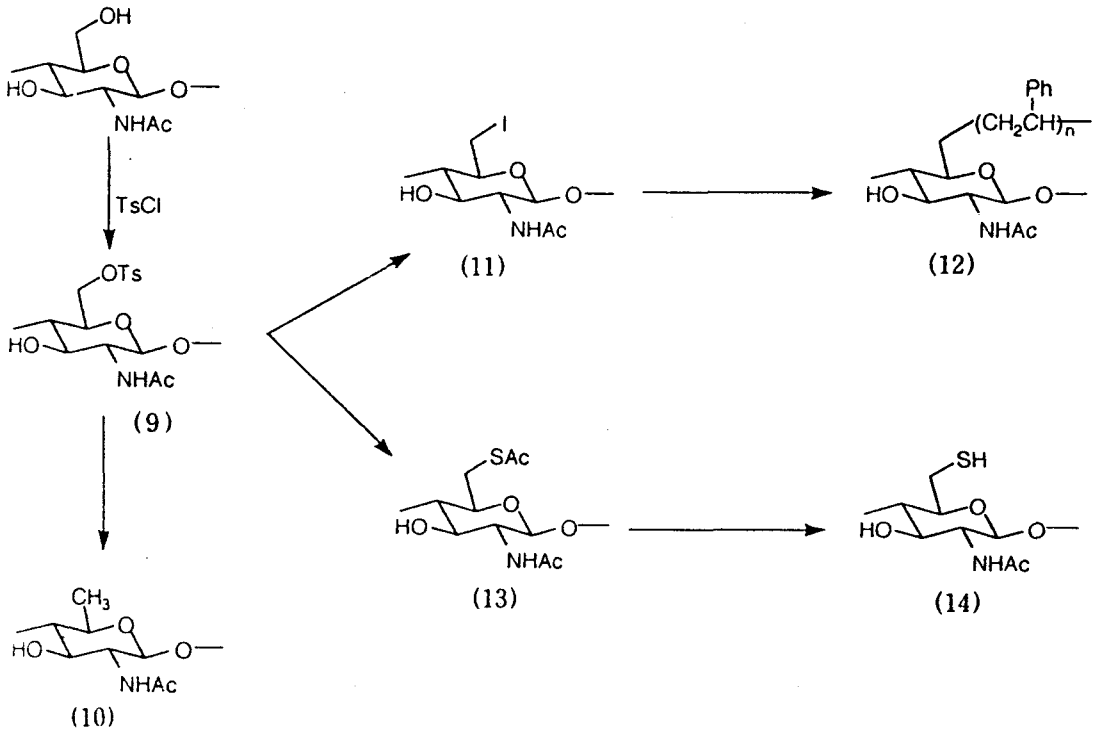


그림 3. 토실화키틴 및 그 유도체의 조제법

생성되는 토실화키틴의 주목해야 할 물성은 그 용해성이다. 토실화도가 낮은 경우 ( $\leq 0.15$ )는 물에 잘 용해하지만 토실화도가 0.5를 넘으면 물에 녹지 않으며, DMSO 등의 극성 유기 용매에 가용화되기 때문에 각종 화학수식을 균일 용매계에서 수행해야 한다. 예를 들면 토실화키틴을 수소화 붕소 나트륨으로 처리함으로써 6위치를 환원하여 데옥시형 키틴으로 할 수 있다. 또 요오드화나트륨에 의해 요오드화키틴(11)을 조제할 수도 있는데, 이 요오드화키틴도 용해성과 반응성이 우수한 유도체이며, 스티렌(styrene)을 양전하를 띤 화학중으로 또는 라디칼로 그라프트 공중합함으로써 키틴/폴리스티렌 복합체(12)를 조제할 수 있다. 또 토실화키틴에서 티오아세틸화 키틴(13)을 지나 반응성이 높은 머캡토(mercapto)기를 갖는 머캡토 키틴(14)으로 쉽게 변환시킬 수도 있다(그림 3).

#### 4. 알킬화(Alkylation)

##### 1) O-알킬화

알칼리 키틴은 에틸렌옥사이드, 프로필렌 옥사이드, 글리시딜트리메틸, 염화암모늄과 반응하여 O-히드록시 알킬키틴을 생성한다. 에틸렌옥사이드의 경우는 히드록시에틸 키틴(글리콜키틴)이 생성되지만, 에틸렌옥사이드와 수산기가 1대1로 반응하고 있다고 할 수 없고, 일부는 올리고에틸렌옥사이드의 가지가 붙어 있다고 생각된다. 글리콜 키틴은 수용성이기 때문에 키틴분해효소의 기질로서도 사용되고 있다.

에폭시화물(Epoxyde) 대신에 할로겐화 알킬(요오드화메틸, 염화에틸, 브롬화에틸, 브롬화부틸과 브롬화펜틸의 각종 이성체, 염화벤질, 디에틸아미노염화에틸)이나 2-클로로에탄올과 반응시키면 대응하는 O-알

킬화 키틴(그림 4의 (15),(16))이 얻어진다. 그 외에 프로판술포에 의한 슬퍼프로필

화(17), 아크릴로니트릴화에 의한 시아노에틸화(18) 등도 보고 되어 있다<sup>12), 13)</sup>

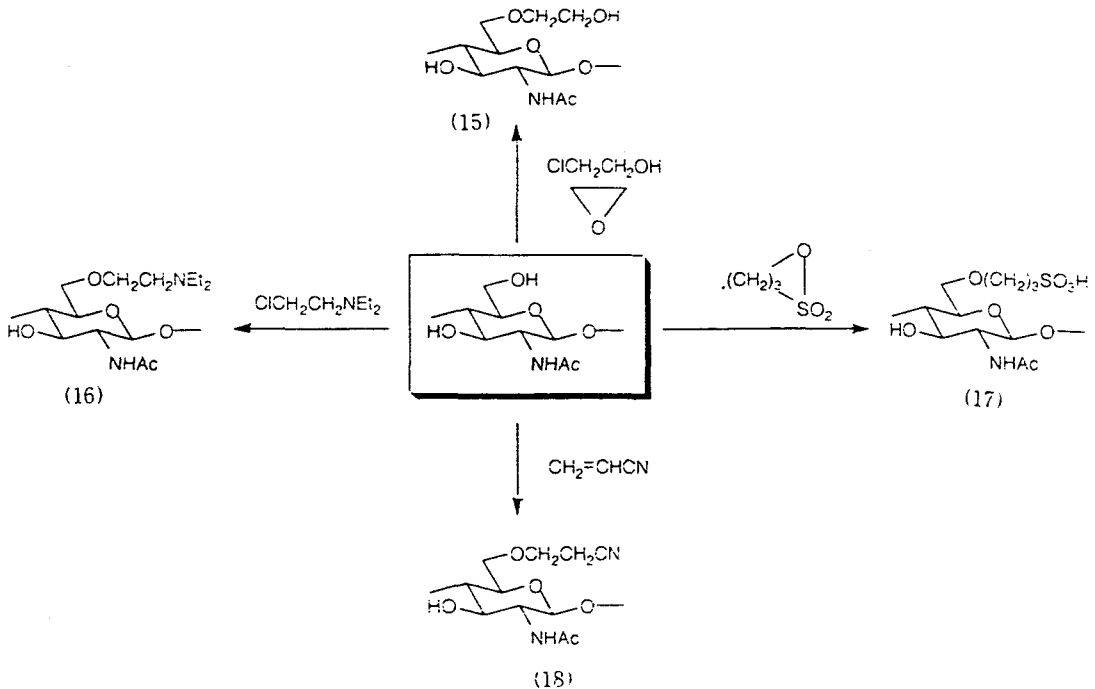


그림 4. 키틴의 O-알킬화

## 2) N-알킬화

키토산의 N-알킬화에는 포름알데히드-포름산의 Eschweiler-Clarke반응에 의한 디메틸 키토산, 에폭시화물의 부가에 의한 히드록시알킬키토산(그림 5의 (19),(20)), 프로판술포의 개환반응에 의한 황프로필 키토산(21),(22)의 생성, 할로젠화 알킬(요오드화 메틸, 요오드화 에틸)에 의한 암모늄염(23)의 생성, 시프염기를 경유하는 환원 알킬화 등의 방법이 있다.

이 환원 알킬화의 방법은 환원성 올리고당으로 확장하면 키토산에 글루코오스, 갈락토오스 등의 당축쇄를 도입하는 것이 가능하다. 또 알데히드기를 갖는 글리코시드를 사용하여 마찬가지로 환원 알킬화를 행하면 당 단위를 개환(開環)시키지 않고 도입할 수 있다<sup>14)</sup>.

## 5. 카르복시화(Carboxylation)

알칼리 키틴과 모노클로로 초산과의 반응에 의해 수산기가 카르복시메틸화 된다. 그러나 강알칼리를 사용하는 반응이기 때문에 탈아세틸화도 상당히 진행된다. 카르복시메틸화의 치환도를 0.73에 도달하게 되면 탈아세틸화도는 0.22로 된다고 하는 반응 예가 있다. 따라서 반응을 효율적으로 진행하기 위해서 전처리로서 키틴을 DMSO로 팽윤시켜 진한 알칼리/2-프로판올 중에서 실온으로 1시간 반응시키면 치환도 0.99의 카르복시메틸화 키틴이 얻어진다<sup>15)</sup>. 또 동결법에 의해 알칼리 키틴을 조제하면 치환도 0.6~0.8의 카르복시메틸화 키틴을 얻을 수 있다<sup>16)</sup>. 이 동결법에 의한 알칼리키틴의 조제법은 단시간에 키틴의 견고한 결정구조를 붕괴할 수 있다는 점에서 종래의 방법보다 우수하다.

카르복시메틸화 키틴의 치환도는 알칼리 키틴을 조제할 때의 수산화나트륨의 농도에 의존하는 것으로 알려져 있다. 또 치환도의

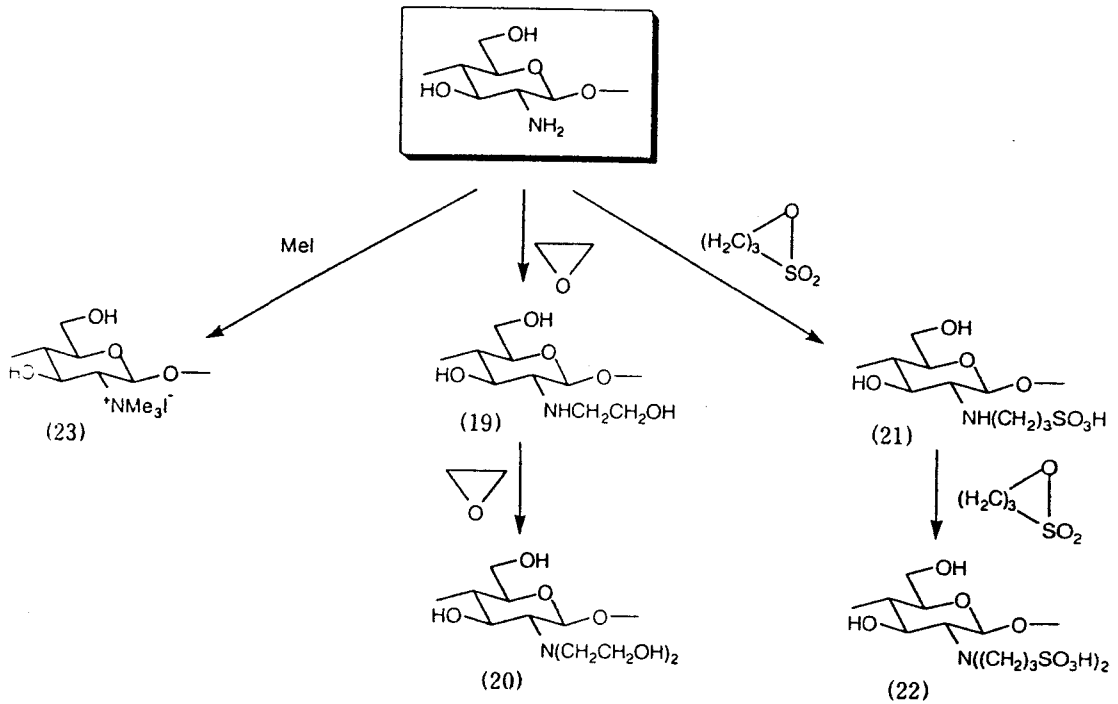


그림 5. 키토산의 N-알킬화

측정은 IR법, 콜로이드적정법으로 정량할 수 있다. 카르복시메틸화는 6위치의 수산기에 우선적으로 일어나지만 치환도를 높이면 3위치도 일부 카르복시메틸화되는 것이  $^{13}\text{C}$ -NMR의 측정결과로부터 알 수 있다<sup>16)</sup>. 카르복시메틸화 키토산의 나트륨염은 물에 잘 녹지만 일반 유기용매에는 용해되지 않는다. 그러나 카르복시메틸화 키토산의 나머지 수산기를 브롬화아릴로 아릴(arylation)화하면 메탄올로 용해한 뒤 빛(光)으로 가교할 수 있다.

키토산의 N-카르복시메틸화는 키토산의 아미노기와 글리옥실산의 알데히드기와의 반응에 의해 생성한 시프염기를 수소화 시아노 붕소나트륨으로 환원하여 조제된다<sup>17)</sup>.

O-카르복시메틸화 키토산, N-카르복시메틸화 키토산의 분자량은 각각 점도법, 광산란법에 의해 구한  $1.63 \times 10^5$ ,  $5.43 \times 10^5$ 의 값이 보고되어 있다<sup>16)</sup>.

## 6. 황산화

키토산·키토산은 진한 황산, 클로로술폰산 및 삼염화황/DMF 등에 의해 황산에스테르화시킨다. 그러나 강산을 사용하기 때문에 분자량의 저하가 일어난다. 실제 클로로술폰산-디클로로에탄계에서 조제한 치환도 1.45~1.80의 황산화 키토산의 분자량은  $1.2 \times 10^4 \sim 1.7 \times 10^4$ 으로 주사슬이 상당히 절단되어 있다고 생각된다. 그러나 삼염화황/DMF착체에 의한 황산화에서는 비교적 주사슬의 절단은 적다.

황산화 반응의 위치선택성은 일반적으로 낮다. 그러나 황산-클로로술폰산(2:1) 혼합계에서의 키토산의 황산화에서는 6위치 수산기만이 거의 선택적으로 황산화(치환도 0.95~1.00)된다. 또 2가의 구리이온과 키토산으로 된 착체를 사용하여 삼염화황/피리딘으로 25°C, 16시간 황산화하면 치환도 1.0이고, 6위치 수산기가 선택적으로 황산화된 황산화 키토산-구리착체(銅錯體)가 얻어진다. 또한 반응온도를 높게 하면 치환도는 높게 되며, 75°C, 16시간의 반응에서는 치환도는 1.8로 되어 3위치 수산기 또는 아

미노기도 황산화된다.

위에 기술한 것 외에 키틴유도체인 *N*, *O*-카르복시메틸화 키틴의 황산화도 보고되어 있다<sup>19</sup>. 황산화의 결과는 표 1에 정리하였다.

표 1. 키틴 및 키토산의 황산에스테르 유도체

황산화 유도체(나트륨)	치환도
<i>N</i> , <i>O</i> -황산화키틴	2.7
<i>O</i> -황산화키틴	2.0
황산화 <i>O</i> -카르복시메틸키토산	0.6
<i>O</i> -황산화 키토산	0.8
황산화 <i>N</i> -헥사노일키토산	1.8
황산화 <i>N</i> -벤조일키틴	1.8

## 7. 시프염기 생성

키토산의 아미노기는 보통의 아미노기와 마찬가지로 알데히드와 반응하여 시프염기를 생성한다. 반응에 사용된 알데히드화합물로서는 포름알데히드, 아세트알데히드, 프로판올, 헥사날, 옥타날, 데카날, 도데카날 등의 지방족 알데히드 화합물(표 2)이나 벤조알데히드,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $m$ -치환벤조알데히드(히드록시, 니트로, 메틸, 클로로), 2-포르밀피리딘, 나프트알데히드 등의 방향족 알데히드 및 아크릴 알데히드, 글리옥살 등이 있다.

표 2. 키토산과 알데히드와의 반응

	알데히드	치환도
키토산 (dd.=0.1)	헥사날	0.98
	옥타날	0.86
	데카날	1.00
	도데카날	0.89
수용성키틴 (dd.=0.5)	헥사날	0.90
	데카날	0.74
	도데카날	0.60

또 키토산의 시프염기는 케톤으로도 조제할 수 있고, 디히드로아스콜르브산의 카르보닐에 의한 시프염기도 합성되고 있다.

합성된 키토산의 시프염기 구조는 IR에

의해 동정되고 있으며, 당쇄의 지방족 알데히드로부터 유도된 알킬리덴 키토산의 물성과 알킬기의 영향도 조사되어 있다<sup>20</sup>. DSC의 측정결과에서 데카날로부터의 유도체는 유리 전이(glass transition)온도를 나타내어, 키토산과 같은 강직고분자에서도 적당한 축쇄의 도입에 의해 유리 전이현상이 발현하는 것이 발견되고 있다.

키토산과 글루타르알데히드로부터 나온 시프염기는 글루타르알데히드가 2가지의 관능성을 가지기 때문에 가교구조로 되어 산성수용성에도 불용성인 겔을 생성한다. 이 겔의 가교밀도는 글루타르알데히드의 첨가량에 의해 쉽게 제어할 수 있어 금속이온의 흡착제로서의 이용이 보고되어 있다<sup>21</sup>. 이 경우 가교함으로써 금속이온의 흡착량은 증가하지만 가교가 어느 정도 이상으로 되면 금속이온의 흡착량은 감소하기 때문에 금속이온의 흡착에는 작은 가교구조가 유효하다는 것이 시사되고 있다. 또 글루타르알데히드를 사용한 효소고정화도 수행되고 있다. 글루코오스 이소아밀라아제, 파파인, 갈락토시드 가수분해효소 등을 고정화한 예도 보고되어 있다<sup>22</sup>.

## 8. 4급 암모늄염의 생성

키토산을 염기 존재하에서 할로겐화 알킬(브롬화메틸, 요오드화메틸, 요오드화에틸)을 작용시키면 키토산의 아미노기가 4급화된 암모늄염이 생성된다.

염기로서는 수산화나트륨이 자주 사용되지만 요오드화나트륨의 첨가에 의해 치환도가 0.64의 것까지 얻을 수 있다. 또 트리에틸아민, 피리딘, 루티딘, 콜리딘(collidine) 등의 유기염기도 사용되어 치환도 0.26~0.78의 트리메틸키틴 유도체가 얻어진다. 트리메틸키틴 유도체는 치환도가 0.25 이상일 때는 pH에 관계없이 물에 녹는다.

또 키토산과 포름알데히드로부터 *N*, *N*-디메틸키토산으로 하여 여기에 요오드화 메틸을 반응시켜 트리메틸 키토산 유도체를 합성할 수 있다.

생성물의 구조는 NMR에 의해 상세하게



검토되었으며, 그 결과 반드시 모든 아미노기에 메틸기가 3개 도입되어 있는 것은 아니고 1치환, 2치환의 단위와의 혼합물로서 얻어지는 것이 알려져 있다<sup>23)</sup>. 또한 아미노기 이외에 3위치와 6위치의 수산기도 알킬화되어 있는 것이 확인되었다<sup>24)</sup>. 마찬가지로 글리콜 키토산도 요오드화메틸로 4급화될 수 있고, 그 생성물은 물에 대해 높은 용해성을 나타낸다.

## 9. 기타

키틴, 키토산의 화학수식은 지금까지 기술한 것 이외에 그림 6과 같은 예가 있다. 키토산의 아미노기는 산과 반응하여 염(그림 6의 (24))을 형성한다. 이 때문에 키토산은 포름산, 초산 수용액에 녹아서 다량이온(polycation)수용액으로서 이용된다. 또 유기산 이외에 염산, 황산 등의 무기산과도 반응하여 염을 형성한다.

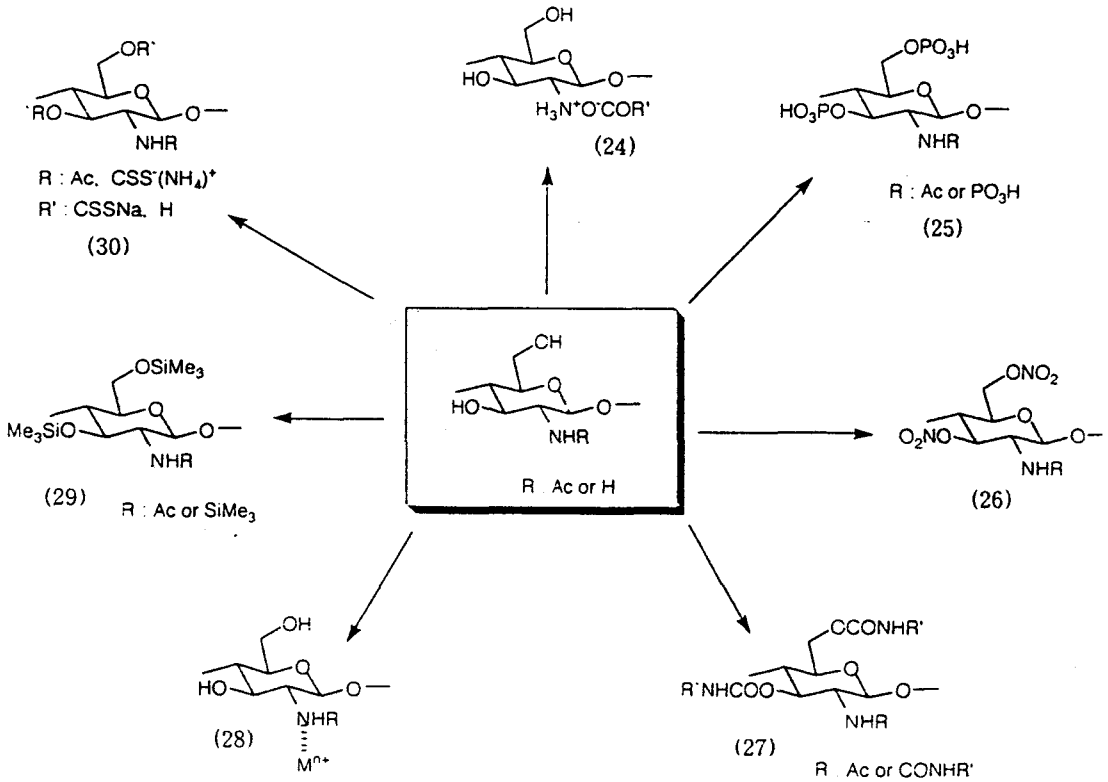


그림 6. 키틴, 키토산의 각종 화학수식

키틴, 키토산을 오산화인, 오르토인산과 반응시키면 인산화유도체(25)가 얻어진다. 반응용매로서 메탄술폰산을 사용하면 치환도를 1.8정도까지 올릴 수 있지만, 메탄술폰산은 강산이기 때문에 주사슬의 절단이 일어나 분자량이 저하한다. DMF나 톨루엔을 사용하면 메탄술폰산을 사용할 때 보다는 분자량의 저하를 막을 수 있다.

초산-황산 혼합용액 또는 발연(發燃)초산

으로 키틴, 키토산을 처리하면 니트로화 키틴, 키토산(26)(치환도 ~2.0)을 얻을 수 있다<sup>25)</sup>. 니트로화 키틴은 메탄술폰산, DMSO, DMF에 용해하지만 니트로화 키토산은 메탄술폰산에만 용해된다. 이소시아나이드(Isocyanide), 염화카르바모일(carbamoylchloride)로 키틴, 키토산을 처리하면 수산기, 아미노기가 카르바모일화된다. 그 응용 예로서 서방성(徐放性) 농약이나 광학분활용 충전제의 조제가 있다.

키티, 키토산의 질소원자상의 비공유 전자쌍은 착체형성능을 갖고 있어, 여러 가지의 금속(Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, U 등) 이온과 착체를 형성한다. 또 키티, 키토산의 착체형성능은 화학수식에 의해 크게 변화하

여 화학수식을 실시함으로써 훨씬 성능이 향상되고 있는 예도 있다<sup>26)</sup>.

대표적인 키티유도체의 chemical abstract 등록번호(CAS Registry Number)를 표 3에 나타내었다.

표 3. 키티유도체 CA 등록번호

키티유도체	등록번호	키토산유도체	등록번호
chitin	1398-61-4	chitosan	9012-76-4
acetyl chitin	70645-06-6	N-(o-acetoxybenzoyl) chitosan	88731-27-5
alkali chitin	83046-29-1	N-benzoyl chitosan	57407-10-0
amyl chitin	81774-30-3	benzylidene chitosan	71212-04-9
benzoyl chitin	71060-86-1	N-butyryl chitosan	57404-11-1
benzyl chitin	71060-85-0	N-(o-carboxybenzoyl) chitosan	83930-84-1
butyl chitin	81774-29-0	N-carboxymethyl chitosan	62711-98-2
t-butyl chitin	83046-30-4	chitosan acetate	42617-20-9
butyryl chitin	78642-60-1	chitosan acetate salt	87582-10-3
capryl chitin	84069-40-9	chitosan dithiocarbamate	82496-85-3
O-carboxymethyl chitin	52519-63-8	chitosan salicylate	84563-97-7
chitin benzoate	71060-86-1	chitosan sulfate	25191-25-7
deacetylated-chitin	9012-76-4	cyanoethyl chitosan	71138-98-2
diacetyl chitin	70645-07-7	N-decanoyl chitosan	67621-34-5
dihydroxypropyl chitin	84617-10-7	dichloroacetyl chitosan	73560-55-1
formyl chitin	81690-08-6	dimethyl chitosan	82496-84-2
lauroyl chitin	84069-39-6	glycol chitosan	39280-86-9
propionyl chitin	78642-62-3	N-hexanoyl chitosan	66580-73-2
sulfated chitin	1398-62-5	hydroxyethyl chitosan	39280-86-9
		hydroxypropyl chitosan	84069-43-3
		hydroxypropyl chitosan acetate	84069-43-2
		methoxyethyl chitosan	88650-88-8
		N-methylene chitosan	70893-19-5
		N-octanoyl chitosan	66580-74-3
		N-pentanoyl chitosan	74812-04-7
		N-propionyl chitosan	57407-14-4
		N-succinyl chitosan	78809-92-4
		N-salicylidene chitosan	71211-96-6
		sodium chitosan acetate	62744-83-6
		N-stearoyl chitosan	67621-37-8
		N-m-toluylidene chitosan	71211-99-9
		N-o-toluylidene chitosan	71212-00-5
		trimethylammonium chitosan iodide	98225-52-6
		trimethylammonium chitosan 6-(2-hydroxyethyl) iodide	65145-31-5

## 10. 키틴 키토산의 분석법

### 1) 화학적 분석법

키틴, 키토산의 화학적인 분석법으로서 우선 필요한 것을 탈아세틸화도와 관계없이 시료 중에서 존재하는 전체 키틴·키토산 양을 측정하는 일이다. 이 목적으로는 산가수분해물 중의 *D*-글루코사민(GlcN)의 양을 아미노산 자동분석기를 사용하여 정량하는 것이 최적이다. 또 경우에 따라서 시료 중에 존재하는 키틴, 키토산 이외의 물질의 정량이 필요하다. 시료중에 함유된 단백질이나 중금속 등의 정량법이 확립되어 있다. 키틴, 키토산의 총량이 결정되면 이어서 탈아세틸화도의 정량이 필요하다. 원래의 개념으로 키틴은 *N*-아세틸글루코사민(GlcNAc)잔기를 100% 함유되어 있고, 키토산은 GlcN잔기를 100% 함유된 것을 말하지만 실제로는 아미노기가 단백질과 키틴과의 결합에 관여하기 때문에 키틴 분자중에도 아미노기가 존재한다. 또 키틴을 탈아세틸화하여도 반응의 진행이 100%까지 이루어지지 않기 때문에 *N*-아세틸기가 키토산 분자내에도 존재한다. 특히 키틴과 키토산의 중간적으로 존재해 있는 부분 탈아세틸화키틴(deacetylated chitin; DAC)도 여러 가지 형태로 존재되어 근년 이들의 중요성도 높아지고 있다. 따라서 키틴, 키토산, DAC의 어느 것에 대해서도 GlcNAc잔기와 GlcN잔기의 정량이 필요하게 된다. 탈아세틸화된 GlcN기를 직접 측정하는 방법으로는 콜로이드 적정법이나 반 슬라이크(Van Slyke)법이 있다. 콜로이드 적정법이 일반적이지만 오차가 크고 대량의 수은을 포함하고 있기 때문에 전용 장치를 필요로 하는 반 슬라이크법과 마찬가지로 장단점을 가지고 있다. 아초산분해로 GlcN잔기 부분을 화학변환시킨 후 이 부분을 NBTH법이나 HCl-인돌법으로 정량하면 아세틸기를 갖지 않는 GlcN잔기의 양을 측정할 수 있다. 반대로 아초산분해물을 염산가수분해하여 아초산으로 변환되지 않은 GlcNAc잔기를 GlcN로 변환하기 때문에 아미노산 분석으로 GlcN기를 정량하면 원래의 시료중의 GlcNAc양을 측정할 수 있다.

### ① 키틴·키토산 총량의 측정

#### 가. 아미노산분석기에 의한 키틴 키토산 총량의 측정

키틴이나 키토산 또는 DAC시료를 염산 가수분해하면 GlcN잔기는 물론 GlcNAc잔기도 GlcN염산염으로 된다. 이 GlcN는 아미노산 발색제로 염색되기 때문에 이들의 양을 아미노산 자동분석기를 사용하여 정량하면 GlcN, GlcNAc 양잔기의 총량을 측정할 수 있다.

#### 나. 알칼리 가용분 및 단백질 함량

시료 중에 함유되어 있는 키틴이나 키토산 이외의 물질 중 단백질량이나 단백질이 함유된 알칼리 가용분의 양은 다음 조작으로 측정할 수 있다.

건조한 시료 1.0g을 500ml 비이커에 취하여 5% 수산화나트륨(w/v) 200ml를 가하여 95°C에서 2.5시간 교반하면서 추출한다. 유리거르개(glass filter)로 여과하여 물로 충분히 세정한 후 105°C에서 3시간 건조한 다음, 실리카겔이 들어있는 건조기(desiccator) 중에서 방냉한다. 냉각후 중량을 달아서 감량한 분을 알칼리 가용분으로 한다.

단백질 함량은 Lowry법으로 측정한다. 앞에서 서술한 알칼리 가용분 측정과 같은 방법으로 열수 추출하여 냉각 후 상등액 1ml을 취하여 여기에 시약 A 5ml을 가하여 잘 흔들어 혼합한다. 실온에서 10분 정치한 후 시약 B 0.5ml을 가하여 다시 잘 흔들어 혼합한다. 30분 후 240nm에서의 흡광도를 측정한다.

#### <시약>

- 시약 A : a액 45ml와 b액 5ml을 사용 직전에 혼합하여 시약 A로 한다.  
a액 - 주석산나트륨 50mg과 무수탄산나트륨 2g을 0.1N수산화나트륨 수용액에 용해하여 100ml로 한다.  
b액 - 황산구리 0.15g을 탈이온수로 용해하여 100ml로 한다.
- 시약 B : 1N 포린시약(페놀시약) - 텅크스텐산나트륨 ( $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 100g, 폴리브덴산나트륨 ( $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 25g

및 탈이온수 700ml을 0.5ℓ의 플라스크에 넣고, 여기에 85% 인산 50ml와 진한염산 100ml을 가하여 공통으로 합하여 환류냉각기를 붙여서 10시간 서서히 자비환류시킨다. 냉각 후 황산리튬 (LiSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O) 150g, 탈이온수 50ml와 브롬화수 2~3방울을 가하여 냉각기 없이 15분간 끓여 과잉의 브롬을 날려 보낸다. 냉각 후 1ℓ로 희석하여 여과한 다음 마개가 붙은 갈색병에 보관한다. 시약의 색이 황색이면 좋고 갈색이면 새로 만들 필요가 있다. 또 시판의 폴린시약을 사용해도 좋다.

다. 회분량, 중금속량 및 과망간산칼리 환원성 물질

시료 0.5g을 백금도가니 또는 자성도가니 중에 600℃, 3시간에 걸쳐서 회화시킨다. 실리카겔이 들어있는 데시케이터속에서 실온까지 냉각하여 평량하여 회분량을 산출한다. 이 회분을 50ml의 0.1N 염산에 녹여 「日本藥局方」중의 일반시험법 19, 「중금속 시험법」의 제 2법에 따라 납환산으로 정량한다. 비교액으로서 납표준액 2ml를 가하여 정량하여 표준으로 한다.

과망간산칼리 환원성 물질 정량은 시료 1g을 50ml의 탈이온수에 현탁하여 60℃에서 30분간 추출한 액 10ml를 마개가 있는 삼각플라스크에 취하여 0.01N 과망간산칼륨 용액 20ml 및 묽은 황산 1.0ml를 가하여 30분간 가열한다. 실온까지 냉각한 후 요오드화칼륨 용액 0.1g과 전분시약 5방울을 가하여 밀봉하고 잘 혼합하여 10분간 방치한다. 0.01N 티오황산나트륨 용액으로 적정한다. 별도로 대조구로서 탈이온수 10ml를 사용하여 같은 조작을 행한다.

② 탈아세틸화도의 측정

가. 콜로이드 적정법<sup>27)</sup>

키토산분말 0.50g을 5%(v/v) 초산에 녹여 정확히 100g으로 한다. 이 키토산 초산 용액 100g을 200ml의 삼각플라스크에 정확히 달고, 탈이온수 30ml를 가하여 잘 교반한다. 지시약으로서 0.1% 톨루이딘 청색

(toluidine blue)용액 2~3방울을 가하여 N/100 폴리비닐황산칼륨용액 [(C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>OSK)<sub>n</sub>, n = 1500이상]으로 적정한다.

탈아세틸화도는 다음식을 사용하여 계산한다.

$$\text{탈아세틸화도} = \frac{X/161}{X/161 + Y/203} \times 100(\%)$$

$$X = \frac{1}{400} \times \frac{1}{1,000} \times f \times 161 \times \nu$$

$$Y = 0.5 \times \frac{1}{100} - X$$

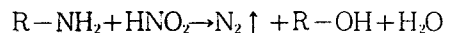
여기서  $\nu$ : N/400 폴리비닐황산칼륨용액 적정값(ml)

f: N/400 폴리비닐황산칼륨용액의 농도계수(factor)

이 콜로이드 적정법은 일반적인 방법이지만 90%이상의 탈아세틸화도의 시료에 대해서는 원소분석이나 다른 방법을 첨가하여 결정해야만 한다. 지시약으로서 8-아닐리노-1-나프탈렌 황산(1-anilinonaphthalene-8-sulfuric acid)을 사용한 키토산-지시약 복합체(complex)에 의한 형광을 폴리비닐황산칼륨 적정으로 소거하여 구하는 방법도 있다<sup>28)</sup>.

나. 반 슬라이크법

반 슬라이크법은 아초산이 지방족 제 1급 아민과 상온에서 반응하여 정량적으로 질소와 알코올을 생성하기 때문에 이 질소의 양을 측정하여 아미노기를 정량하는 방법이다.



다만 실제의 정량에는 대량의 수온을 함유한 반 슬라이크 검압장치를 사용할 필요가 있기 때문에 간편한 방법이라고 말할 수 없지만 균일계 뿐만 아니라 미분말인 불균일계에서도 상당히 정밀도가 높은 장점을 가지고 있다.

다. 아초산분해물의 분석

시료의 GlcN잔기 부분을 아초산으로 분해하여 분해물의 GlcN잔기나 GlcNAc잔기의 양을 측정하는 방법이다. 시료 중의 GlcN잔기 부분은 아초산에 의해 다음과 같은 반응을 이용한다.

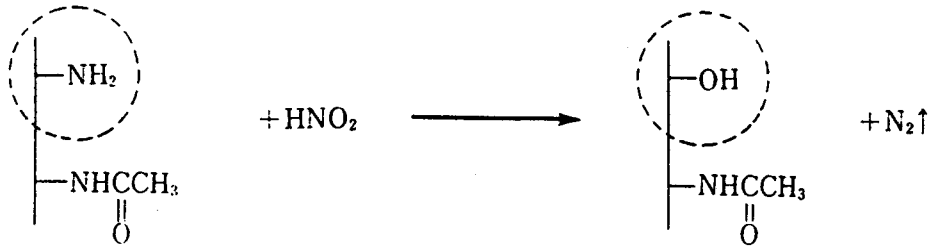


그림 A

점선 부분의 화학반응은 다음과 같다.

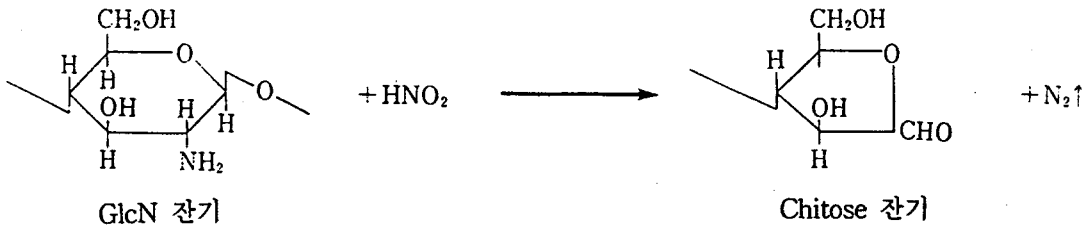


그림 B

위에서 서술한 반 슬라이크법도 이 반응을 이용하여 생성되는 질소량을 정량하는 방법이지만 그외에도 아초산 분해 후의 시료를 원소분석한다. 질소 함량의 저하와 탄소 함량의 증가로부터 탈아세틸화도를 측정하는 데에도 실제적으로 유력한 방법이다. 아초산 분해는 일반적으로 다음 조건에서 행한다. 키토산 등의 용액(0.04g/l의 1% 초산수용액 또는 1N 염산수용액) 1ml을 시험관에 넣고 여기에 10% 아초산나트륨 수용액 1ml와 5% 황산수소나트륨 수용액 1ml(초산수용액 중에서 반응시킨 경우만 황산수소칼륨을 첨가한다)을 가하여 실온에서 12시간 반응시킨 후 12.5% 술폴산 암모늄 수용액 2ml을 가하여 10분간 진탕한다. 이 경우 아초산나트륨 수용액은 미리 조제해 놓는 쪽이 분해반응을 진행하기에 쉽다. 이 아초산분해 후의 시료를 염산가수분해하여 GlcN 양을 아미노산 분석기로 정량하면 아초산에 분해되지 않았던 GlcNAc 양을 측정할 수 있다. 한편, 아초산으로 분해시킨 GlcNAc 잔기량은 다음의 2가지 방법으로 정량할 수 있다.

\* MBTH(3-Methyl-2-benzothiazolone-hydrazone)법<sup>29)</sup>

아초산 분해로 GlcN 잔기를 chitose로 변환시켜 MBTH-염화 제 2철로 발색시킨 후 653nm에서 흡광도를 측정하여 정량하는 방법이다.

아초산 분해물에 0.5% 3-methyl-2-benzothiazolone-hydrazone 수용액을 1ml 가하여 실온에서 1시간 방치한 후 여기에 0.5% 염화 제 2철 수용액을 1ml 가하여 30분 후 653nm에서 흡광도를 측정한다. 표준물질로 글루코자민염산염을 사용하고 아초산분해물도 포함하여 같은 조작을 하여 검량선을 작성한다. 흡광도를 검량선과 비교함으로써 직접 아미노기를 정량할 수 있다. 단, GlcNAc 잔기수가 대단히 많은 시료에서는 아초산분해물이 각종 발색 조작 중에서 포함하여 초산용성으로 되지 않기 때문에 적용할 수 없다.

\* HCl-인돌법<sup>30)</sup>

아초산분해물(조제 30분 후)에 1% 인돌-에탄올 용액 0.1ml을 가하여 끓는 수조 중에서 5분간 반응시킨다. 빙수 중에서 충분히 냉각한 후 에탄올 1ml을 가하여 즉시

492nm에서의 흡광도를 측정한다. 검량선은 글루코자민 염산염을 사용하여 아초산 분해로부터 시작하는 조작을 통해 작성하지만 적용농도 범위가 좁고 감도가 높기 때문에 조작, 측정에는 조심할 필요가 있다.

전향과 마찬가지로 키틴이나 GlcNAc 잔기가 많은 시료의 경우는 분해생성물이 물에 불용성이기 때문에 적용할 수 없다. 수용성이며 저분자량 키틴산에 적합한 방법이다.

## 2) 적외흡수 스펙트럼법

키틴의 적외흡수 스펙트럼(IR스펙트럼)에는 그 화학구조식에서 예상된 바와 같이 OH신축진동( $3840\sim 3440\text{cm}^{-1}$ ), CH신축진동( $2960\sim 2878\text{cm}^{-1}$ ), NH신축진동( $3260\sim 3270\text{cm}^{-1}$ )에 있어서 아미드기에 의한 흡수대가 특징적이다. 아미드기에 의한 흡수대 중 아미드 I ( $1650\sim 1660\text{cm}^{-1}$ ) 및 아미드 II ( $1550\sim 1560\text{cm}^{-1}$ )가 특히 중요하다.

키틴이 탈아세틸화되어 부분 탈아세틸화 키틴이나 키틴산으로 되면 아미드기에 의한 흡수대가 감소하기 때문에 IR 스펙트럼에 의해 어느 정도 탈아세틸화도의 측정이 가능하다. 아미드 I 과 OH신축진동의 흡광도비를 사용한 Roberts 등의 방법<sup>33)</sup>, 아미드 II와 CH신축진동의 흡광도비를 이용한 Sannan 등의 방법<sup>31)</sup> 외에 Miya 등<sup>32)</sup>에 의해서는 탈아세틸화도가 상당히 높은 시료 및 역으로 낮은 시료에 대한 탈아세틸화도 측정법도 소개되었다. 또 화학적으로 합성시킨 많은 키틴유도체에 대해서는 같은 방법으로 새로이 도입된 치환기의 양을 측정할 수 있다. 카르복시메틸키틴에 대해서는 Nishimura 등<sup>43)</sup>의 방법이 있다.

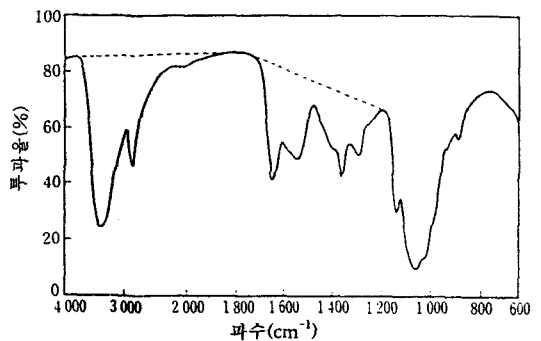
### ① 탈아세틸화도의 정량법

자주 사용되고 있는 일반적인 방법은 Robert 등<sup>43)</sup>의 보고에 기초한 것으로 브롬화칼륨 분말과 함께 키틴산 분말을 더욱이 잘게 부수어 펠리트(pellet)로 성형하여 IR 스펙트럼의  $1655\text{cm}^{-1}$ 의 아미드 I 밴드(band)와  $3450\text{cm}^{-1}$ 의 수산기 신축진동에 의한 밴드와의 흡수비로부터 탈아세틸화

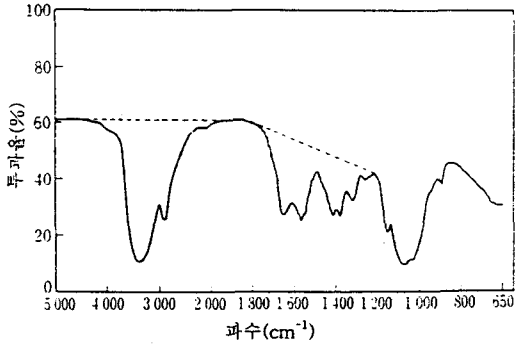
도를 계산하는 방법이다. 잘 건조한 브롬화칼륨 및 키틴산을 충분히 혼합마쇄하는 것이 측정 정밀도를 높이기 위한 필요조건이다.

한편, 필름의 IR 스펙트럼보다 탈아세틸화도를 구하는 것도 좋은 방법이다. 즉, 키틴산을 4% 초산수용액(v/v)에 용해한 후, 0.5~1.0ml을 슬라이드 유리상에서 적하하여 유리봉으로 될 수 있는대로 얇게 넓혀서 유리접시(petridish)를 털어서 10~30분간 정치하여 탈포시킨다. 키틴산 농도는 점도에 따라 적당히 조절할 수 있으므로 얇은 필름으로 되는 농도로 한다. 탈포가 끝난 키틴산도포 슬라이드글라스를 메탄올과 약 4N 수산화나트륨 수용액(10:1 v/v)을 넣은 유리접시 중에 침투시켜 약 1시간 건조시킨다. 건조된 키틴산을 가볍게 수세한 후 메탄올로 알칼리를 충분히 씻어낸다. 이 조작 중 절단칼이나 면도날을 사용하여 키틴산 필름을 슬라이드 유리에서 떼어내고 다시 메탄올로 충분히 세정한다. 이 필름을 여지에 끼워 가벼운 압력하에서 충분히 건조한다. 급격한 가열진조를 초기에 하면 필름이 수축한다든지 파괴되기 때문에 충분히 주의할 필요가 있다.

이 필름을 펠리트 홀더(holder)에 셀로판 테이프 등으로 고정하여 IR스펙트럼을 측정한다. 이때 적외광로에 있는 필름면적을 적당히 가감하여 흡수가 최대가 되도록 하고 또 각 피크를 적당하게 나오도록 조절한다.



(a) 키틴산의 IR스펙트럼  
접선은  $A_{1655}$ 와  $A_{3450}$ 을 결정하기 위한 기준선



(b) 키토산소중합체의 IR스펙트럼

그림 7. Roberts 등<sup>43)</sup>의 방법에 의한 탈아세틸화도의 측정(표 4의 탈아세틸화도(IR)는 이 그림으로부터 측정)

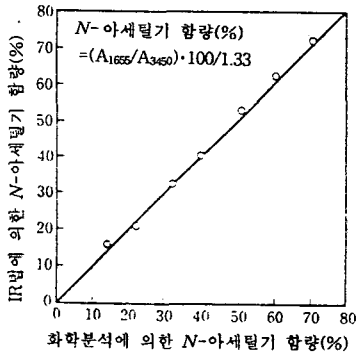


그림 8. IR 스펙트럼법으로 측정된 N-아세틸기 함량과 화학분석으로 얻어진 N-아세틸기 함량과의 관계

기준선(Base-line)은 그림 7과 같이 된다. 흡수비  $A_{1655}/A_{3450}$ 과 탈아세틸화도의 관계에 대하여는 Roberts의 데이터를 그림 8에 나타내었다. 비교를 위해 80% 아세틸화 키틴(DAC-80%)을 아초산법으로 분해한 키토산소중합체(chitosan oligomer)(분자량 17000~2100)에 대하여 IR 스펙트럼법(KBr 사용), MBTH법 및 HCl-인돌법을 사용하여 얻어진 탈아세틸화도를 표 4에 나타내었다. 표 4 중에서 DA의 기호가 들어간 시료는 아초산분해로 얻어진 각 올리고당을 진한 알칼리 중에서 열처리하여 탈아세틸화를 행한 것이다. 3가지 방법에서 거의 같은 값을 나타내고 있는 경우와 상당히 다른 경우가 있다. 각 방법에는 장단점이 있어 절대적인 방법은 아직까지 결정되지 못했다.

Sannan 등<sup>31)</sup>은 KBr로 펠리트르 성형한 시료를 사용하여 아마이드 II 밴드( $1550\text{cm}^{-1}$ )와 CH 신축진동( $2878\text{cm}^{-1}$ )의 비를 탈아세틸화도 정량에 사용하였다. 각각의 흡수대에 대한 기준선·긋는 방법을 그림 9에 나타내었다. 양 밴드의 흡광도의 비( $A_{1550}/A_{2878}$ )를 탈아세틸화도에 대하여 플로트하면 그림 10과 같이 직선관계가 얻어진다. 그림 중 ●는 균일계에서, 한편 ○는 불균일계에서 탈아세틸화한 시료이다. 이들이 동일 직선상에 위치하기 때문에 탈아세틸화 반응이 균일하게 진행된 시료에서도, 또 어느 정도 부서지는 시료에서도 이 방법을 적용할 수 있다.

표 4. 키토산 소중합체의 탈아세틸화도 정량법

시	료	IR(Roberts)	HCl-인돌법	MBTH법
DAC-OL-0.3~5	#1	0.50	0.48	0.58
	#2	0.58	0.61	0.67
	#3	0.57	0.62	0.69
	#1-DA	0.64	0.46	0.82
	#2-DA	0.57	0.71	0.81
	#3-DA	0.62	0.39	0.61
	DAC-OL-0.3~12	#1	0.41	0.51
#2		0.50	0.60	0.68
#3		0.52	0.51	0.57
#4		0.47	0.28	0.41
#1-DA		0.62	0.58	0.68
#2-DA		0.63	0.63	0.79
#3-DA		0.53	0.56	0.57
#4-DA		0.64	0.61	0.62

(주) DA : 표기 번호의 소중합체를 수산화나트륨 중에서 재탈아세틸화시킨 시료

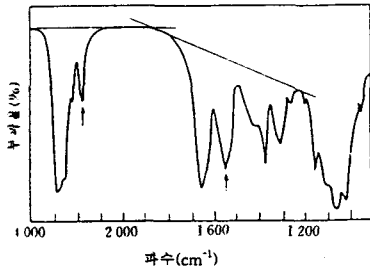


그림 9. 15% 탈아세틸화키틴의 IR스펙트럼  
과 흡광도측정을 위한 기준선

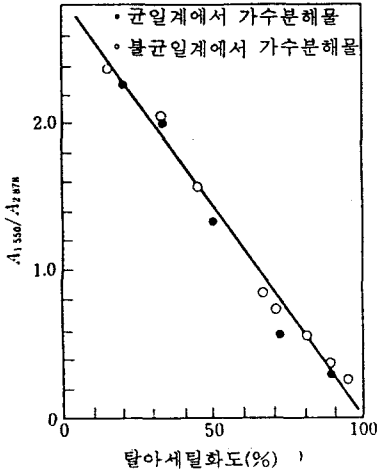


그림 10. 탈아세틸화도와 흡광도비( $A_{1350}/A_{2878}$ )의 관계

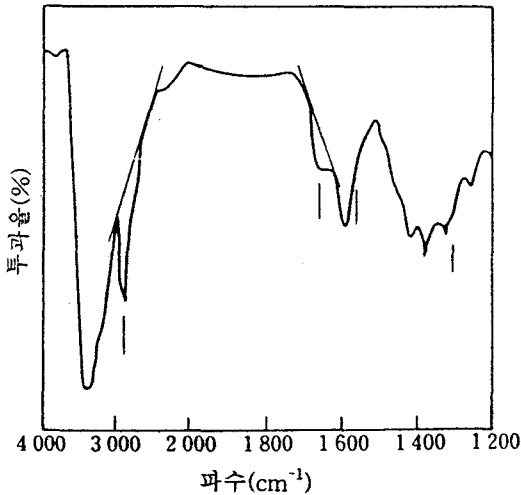


그림 11. 94.5% 탈아세틸화된 키토산의 IR  
스펙트럼 및 흡광도측정용 기준선

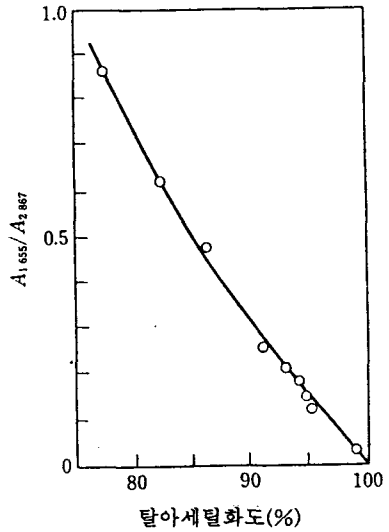


그림 12. 탈아세틸화도와  $A_{1655}/A_{2867}$ 의 관계

한편 Miya 등<sup>32)</sup>은 상기의 2가지 방법에서는 정밀도가 좋은 탈아세틸화도를 구하는 것이 곤란한 탈아세틸화율 90% 이상 및 10% 이하의 시료에 관해서 가장 적합한 정량용 밴드를 나타내 보였다. 그림 11은 탈아세틸화도 94.5% 시료의 IR 스펙트럼이다. 상당히 탈아세틸화도가 높아도 아마이드 I 밴드( $1655\text{cm}^{-1}$ )는 확실히 관찰되지만 아마이드 II는 불명료하다. 또 CH 신축진동에 의한  $2867\text{cm}^{-1}$ 의 밴드는 탈아세틸화도가 높아도 변화가 적은 것을 고려하여 그림 11과 같은 기준선을 그어 아마이드 I과 CH 신축진동의 흡광도비( $A_{1550}/A_{2878}$ )를 아세틸기 정량의 눈금(기준)으로 사용하였다. 그림 12에 나타난 바와 같이 흡광도비 및  $A_{1550}/A_{2878}$ 과 탈아세틸화도의 관계는 탈아세틸화도가 90% 이상에서도 좋은 직선 관계를 나타낸다. 아세틸기가 그다지 남아 있지 않은 키토산 시료의 탈아세틸화도 정량에도 적합한 방법이라 할 수 있다. 또 Miya 등<sup>33)</sup>은 반대로 높은 아세틸화율(낮은 탈아세틸화율)의 시료에 대하여 가장 적당한 흡광도비를 취하는 방법을 여러 가지로 연구하여 아마이드 II의 흡수대( $1554\text{cm}^{-1}$ )와 당구조에 특유한  $897\text{cm}^{-1}$ 의 흡광도의 비( $A_{1544}/A_{897}$ )가 이 목적에 가장 적합하다는 것을 밝혔다.



이와 같이 IR 스펙트럼을 사용한 탈아세틸화도 정량법에도 몇가지 방법이 있기 때문에 측정하고 싶은 시료에 가장 적합하다고 생각되는 방법을 선택해야 한다.

② 카르복시메틸키틴(CM-키틴)의 치환기 정량법

카르복시메틸키틴(CM-키틴)은 키틴을 알칼리 중에서 모노클로로초산(monochloroacetic acid)과 반응시켜 얻으며 생리활성을 갖는 많은 키틴 유도체 합성의 중간체로서 상당히 중요하다. 따라서 CM-키틴의 치환도를 조사하는 것이 우선 필요하지만 IR 스펙트럼을 사용하는 방법도 적용되어 KBr 펠리트법과 필름법을 사용할 수 있다.

가. KBr 펠리트법

시료 1g을 탈이온수 50ml에 침지 또는 용해시키고 여기에 2N 염산을 가하여 pH 1.0으로 한다. 0.5~1시간 교반 후 아세톤을 가하여 침전시킨다. 침전을 물-아세톤 혼합액(약 1:20, v/v)으로 잘 씻어 탈염을 한 다음, 끝으로 아세톤으로 씻어 풍건하고, 다시 70°C에서 3시간 정도 건조시킨 후 분말 KBr을 혼합하여 펠리트를 만든다. 염산 처리는 -COONa기를 -COOH기로 변환하기 위해서 한다.

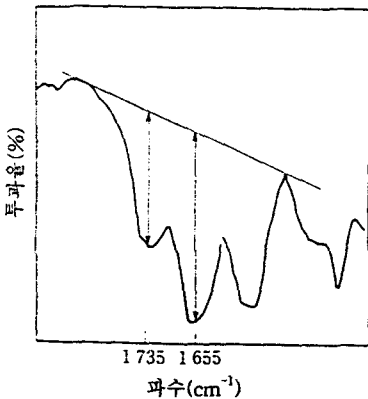


그림 13. 카르복시메틸키틴의 IR스펙트럼 및 흡광도 측정용 기준선

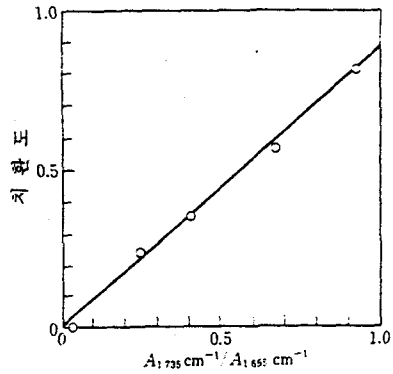


그림 14. IR스펙트럼법에 의한 CM화도 측정용 위한 검량선

IR 스펙트럼으로 부터 그림 13에 나타난 바와 같이 기준선을 그어 1655cm<sup>-1</sup>(아미드 I 밴드) 및 1735cm<sup>-1</sup>(카르복실기 유래의 C=O 밴드)의 투과율 A의 차를 각각 구하여 그 비 A<sub>1735</sub>/A<sub>1655</sub>를 계산한다. 그림 14의 검량선에서 CM화도를 구한다.

나. 필름법

물에 녹는 CM-키틴에 적용할 수 있기 때문에 시료를 적당량의 물에 용해하여 가제(4매 중첩)로 여과하면서 슬라이드 유리상에 펼 수 있는 대로 얇게 펼친다. 유리접시를 덮어서 30분간 정도 정치 탈포한 후 아세톤 중에 옮겨 고화시킨다. 10~20분간 정치한 후 메탄올 2N 염산혼합액(20:1, v/v)으로 옮겨 다시 30분 정도 정치한다. 절단 칼이나 면도칼로 필름을 슬라이드 유리로부터 유리시켜 다시 염산 함유 메탄올 중에 침지하여 발포가 일어나지 않는 것을 확인 후 메탄올 중에 옮겨 잘 씻는다. 끝으로 아세톤으로 세정 후 여지에 끼워 1kg 정도의 무게를 올려서 풍건한다. 70°C에서 10분간 정도 건조한 다음 IR 스펙트럼을 측정하여 앞서와 같이 A<sub>1735</sub>/A<sub>1655</sub>의 비로부터 CM화도 산출한다. KBr 펠리트법도 필름법도 원소분석과 병용하면 보다 정밀도가 높은 치환도를 측정할 수 있다.

### 3) NMR법

핵자기 공명(Nuclear magnetic resonance ; NMR)법은 화학을 중심으로 한 모든 분야에서 위력을 발휘하고 있는 분석 수단이며, 키틴, 키토산의 화학구조에 관해서도 이 방법에 의해 많은 유력한 정보를 모을 수 있다.

$^1\text{H}$ 이나  $^{13}\text{C}$ 을 함유한 물질을 자장속에 놓으면 이들 원자의 원자핵 중의 스핀이 각각 다른 에너지 준위로 배향한다. 이것에 전자파를 조사하면 어떤 주파수에서 에너지의 흡수를 일으켜 에너지 준위가 변화한다. 이 주파수나 에너지의 형태로 부터 분자구조에 관한 정보를 얻는 것이 NMR 스펙트럼법의 일반적인 원리이다.

키틴, 키토산 및 그 유도체에 관해서 용액상태에서 측정된  $^1\text{H}$ -NMR 및  $^{13}\text{C}$ -NMR법 또 고체시료에서의  $^{13}\text{C}$ 교차분극-매직각도 회전법인  $^{13}\text{C}$ -CP-MAS( $^{13}\text{C}$ -cross polarization-magic angle spinning)-NMR법에 대하여 소개한다.

#### ① 용액 NMR

NMR 스펙트럼은 용액상태에서 측정하는 것이 일반적이다. 용매로는  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -NMR과 동시에 NMR 측정의 기술적인 이유에서 중수소화물을 사용한다. 중수소화용매를 사용하는 것은  $^1\text{H}$ -NMR의 경우에는 시료와 용매의 신호의 중첩을 피한다고 하는 의미도 있다. 시료 농도는 5~10%가 일반적이지만  $^{13}\text{C}$ -NMR의 경우에는  $^{13}\text{C}$ 의 천연존재비가 낮고 감도가 낮기 때문에 보다 고농도 쪽이 바람직하다. 그러나 키틴과 같이 용해성이 낮은 시료에서는 저농도에서 측정할 수밖에 없는 경우도 많다. 이 같은 경우는 측정온도를 높게 하여 분자운동을 향상시킨다든지 초음파를 쪼이면 감도나 스펙트럼의 분리능을 좋게 할 수 있다.

키틴이나 물불용성의 키틴 유도체의  $^1\text{H}$  및  $^{13}\text{C}$ -NMR 측정의 경우, 시료분말을 감압하에서  $40^\circ\text{C}$ 로 충분히 건조 후 중수소화포름산(DCOOD)에 현탁(1.5~2.0%, w/v)하여 실온에서 1시간 정치하여 포름산을

충분히 침지시킨 다음,  $-20^\circ\text{C}$ 에서 동결시키고, 충분히 동결한 후, 실온에서 해동한다. 이 조작을 반복하면 점조한 키틴-포름산 용액이 조제된다.  $^1\text{H}$ -NMR에서의 화학적 이동 액중에 생성하는 HDO를 표준으로 하여 측정할 수 있기 때문에 4메틸실란(tetramethylsilane, TMS)와 같은 표준시약을 가하지 않아도 측정할 수 있다. 다만, HDO의 화학적 이동은 pH에 의존하기 때문에 그 점은 주의할 필요가 있다.

한편, 키토산의 경우는 아미노기가 산과 염으로 되어 있으면 수용성으로 되기 때문에  $\text{D}_2\text{O}$ 를 용매로 하여 측정할 수 있다. 카르복실메틸키틴, 디히드록시프로필키틴, 인산화키틴, 황산화 키틴과 같은 수용성 유도체의 경우도  $\text{D}_2\text{O}$  중에서 측정할 수 있다. 단지 이들 용액은 고점도 때문에 농도를 높이지 않게 해야 한다. 이 같은 경우도 온도를  $45^\circ\text{C}$  정도까지 높이면 감도가 좋게 되고 또 측정과정에서  $\text{D}_2\text{O}$  용해와 동결조건을 반복하면 스펙트럼의 분리를 개선시킬 수 있다.

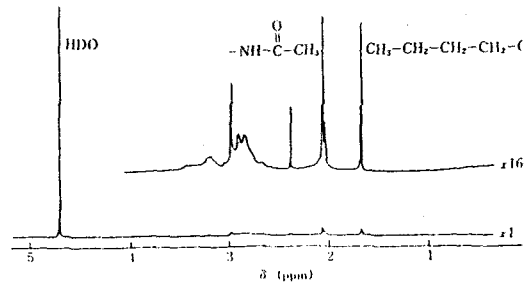


그림 15. *n*-부틸키틴-DCOOD 용액의  $^1\text{H}$ -NMR스펙트럼 폴리머농도 : 1.8% (w/v), 측정온도 :  $45^\circ\text{C}$ , 스펙트럼폭 : 6002Hz, 펄스각 :  $90^\circ$  ( $10\mu\text{s}$ ) 16회 조작을 반복하여 측정

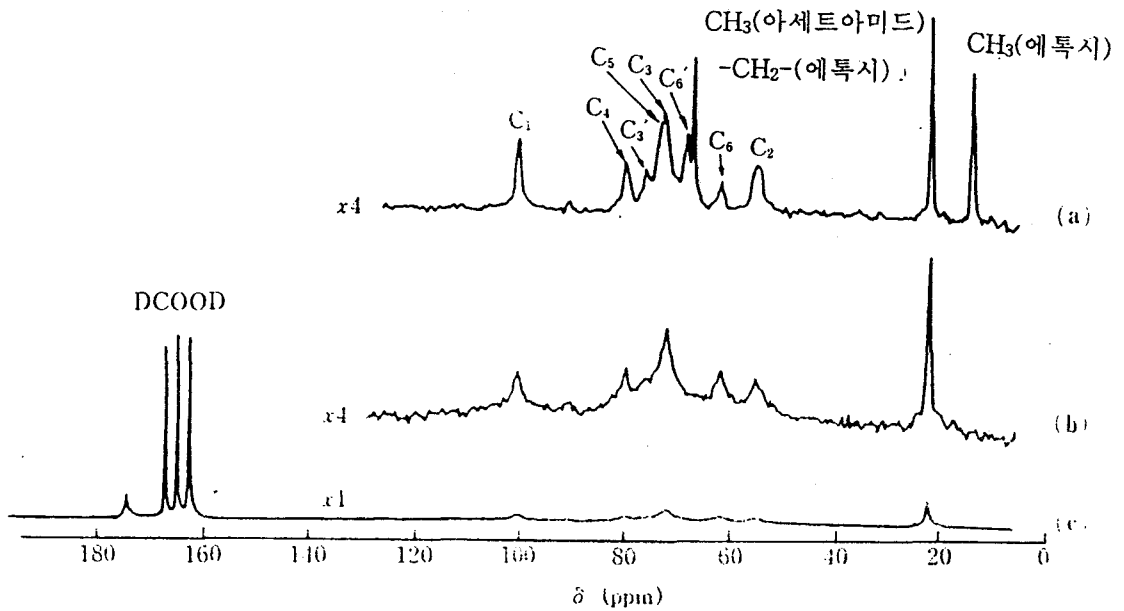


그림 16. 키틴(b), (c)와 에틸키틴(a)의  $^{13}\text{C}$ -NMR스펙트럼(DCOOH 중)  
 폴리머의 농도 : 1.8%(w/v), 측정온도 : 45°C,  
 펄스각 : 90° (10 $\mu\text{s}$ ), 21,600회 조작을 반복하여 측정

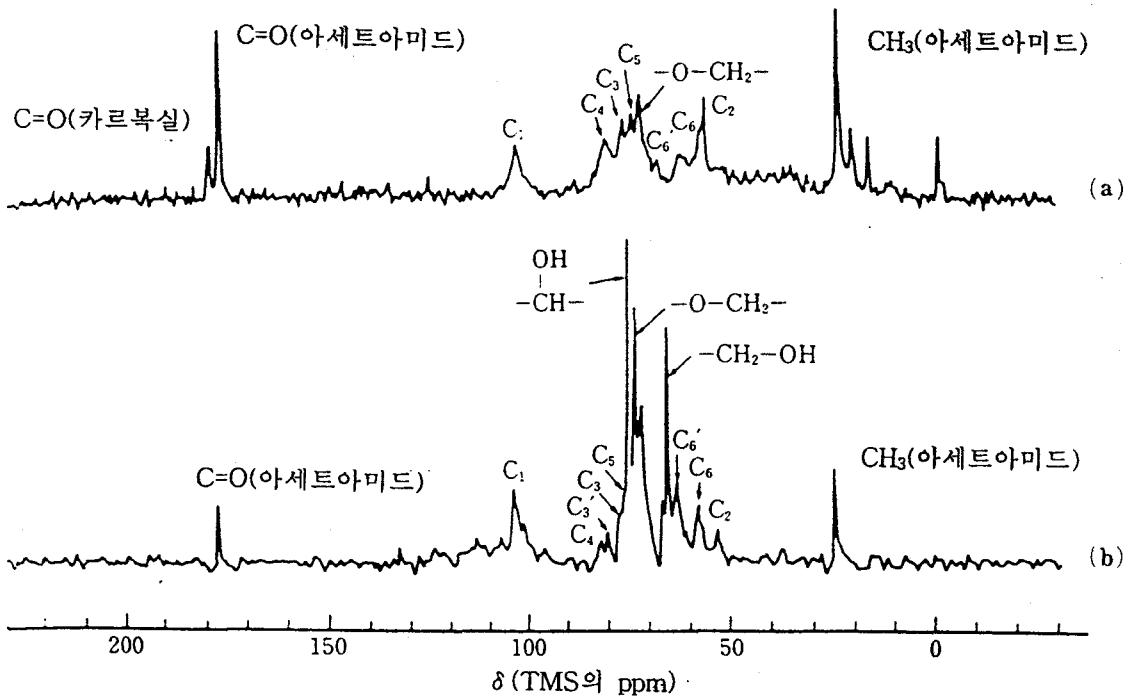


그림 17. 카르복시메틸키틴(a)과 디하이드록시프로필키틴(b)의  $^{13}\text{C}$ -NMR스펙트럼  
 ( $\text{D}_2\text{O}$  중, 45°C에서 측정)

그림 15에 *n*-부틸키틴-DCOOD 용액의 <sup>1</sup>H-NMR 스펙트럼(400 MHz)을, 또 그림 16에 키틴과 에틸키틴-DCOOD 용액의 <sup>13</sup>C-NMR 스펙트럼(15 MHz)을 나타내었다<sup>30)</sup>

한편, 그림 17에 D<sub>2</sub>O 중에서 측정된 카르복시메틸키틴과 디히드록시프로필키틴의 <sup>1</sup>H 및 <sup>13</sup>C-NMR 스펙트럼을 나타내었다<sup>30)</sup>. 그림 18은 메탄술폰산법으로 합성한 치환도 0.4 (치환율 20%) 및 1.5(75%)의 인산화키틴에 대하여 D<sub>2</sub>O 중에서 측정된 <sup>13</sup>C-NMR 스펙트럼이다<sup>30)</sup>. C-3 위치 및 C-6 위치의 수

산기를 인산화시킴으로서 이들의 탄소 피크가 영향을 받아 새로운 피크가 출현하고 있는 것을 알 수 있다. 또 C-4 위치의 탄소도 인접한 C-3 위치의 치환효과로 약간의 효과를 받고 있다. 표 5는 그림 18의 스펙트럼으로부터 각 피크의 화학적 이동과 치환에 의해 영향을 받은 피크의 상대강도를 정리한 것이다. 이 데이터에서 3 위치 및 6 위치가 마찬가지로 어느 정도 인산화된 점 또 각각의 위치의 치환도가 피크의 상대강도로부터 측정됨을 알 수 있다.

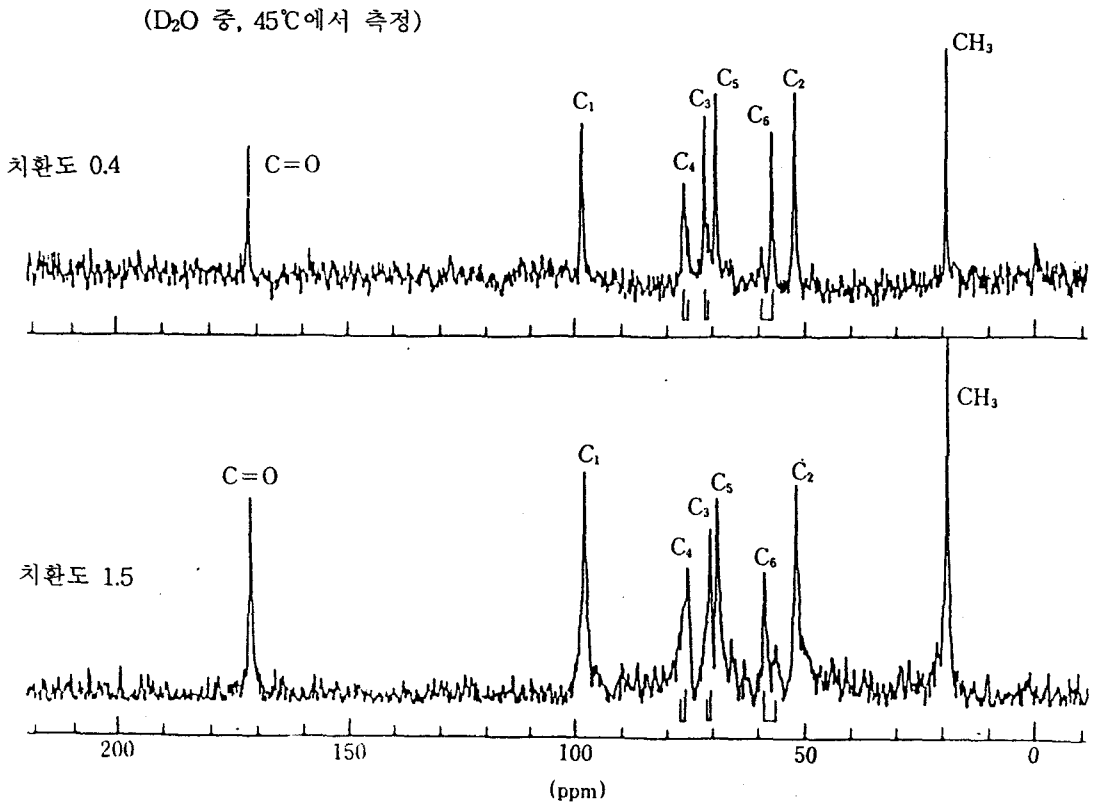


그림 18. 인산화키틴(치환도 0.4 및 1.5)의 D<sub>2</sub>O(pD7.0) 중의 <sup>13</sup>C-NMR스펙트럼 TMS에 의한 화학적 이동을 ppm으로 표시

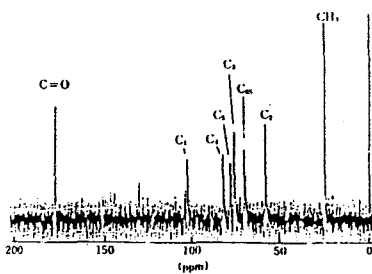
그림 19는 선택적으로 6위치만 또는 3위치만을 황산화시킨 키틴의 <sup>13</sup>C-NMR 스펙트럼이다. 그림 18의 인산화 키틴의 경우와

마찬가지로 치환된 위치와 그 치환의 정도를 직접 측정할 수 있는 것이 NMR법의 장점이다.

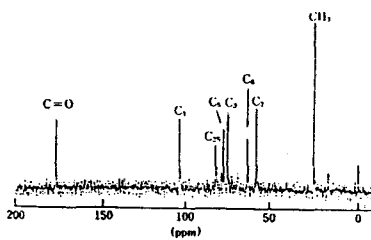
표 5. 그림 18에 나타난 인산화키틴의  $^{13}\text{C}$ -NMR 스펙트럼에 있어서 치환에 의한 영향을 받은 피크의 화학적 이동과 상대강도

	화학적 이동 (TMS*1로 부터의 ppm)	상 대 강 도 (%)	
		치환도=0.4	치환도=1.5
CH <sup>3</sup>	19.34		
C <sub>2</sub>	52.10		
C <sub>6</sub>	{ 57.13*2	80	35
	{ 58.91*3	20	65
C <sub>5</sub>	69.20		
C <sub>3</sub>	{ 70.53*3	30	80
	{ 71.67*2	70	20
C <sub>4</sub>	{ 75.63*3	37	70
	{ 75.89*2	63	30
C <sub>1</sub>	98.26		
C=O	171.75		

(주) ※1 사메틸실란 ※2 원래의 피크 ※3 치환에 의해 이동한 피크



(a) 6-O-황산화키틴



(b) 3-O-황산화키틴

그림 19. 6-O-황산화키틴 및 3-O-황산화키틴의 D<sub>2</sub>O 중에서의  $^{13}\text{C}$ -NMR스펙트럼

## ② 고체 NMR

특히 키틴 같은 난용성 물질의 경우 용액 상태로 함으로써 본래 키틴이 갖고 있는 고

차구조가 파괴될 가능성이 높다. 따라서 용액의 NMR 뿐만 아니라 고체상태 그대로 NMR을 측정하는 것이 중요하다.

고체(분말 또는 필름상)시료의 경우는  $^{13}\text{C}$ -CP-MAS(cross-polarization-magic angle spinning) NMR법을 응용하여 측정할 수 있다. 이  $^{13}\text{C}$ -CP-MAS 이외에도 최근 고체상태에서의  $^1\text{H}$ 의 고분해능 측정(CRAMPS)이 행해지기 시작하고 있지만,  $^{13}\text{C}$ -CP-MAS에 비해 기술적으로 어렵고 키틴, 키토산계 시료에서의 측정에는 아직 찾아볼 수 없다.

그림 20은 齊藤 등<sup>37)</sup>이 보고한 키틴 및 단리원이 다른 3종류의 키토산에 대한  $^{13}\text{C}$ -CP-MAS-NMR 스펙트럼이다. 단리원에 의한 입체배치(conformation)의 약간의 차이를 반영한 스펙트럼이 관찰되고 있음을 알 수 있다.

$^{13}\text{C}$ -CP-MAS-NMR에서는 시료관을 2~4 KHz의 고속에서 원활히 회전시키기 위해 시료의 균일충진, 또 시료의 유전율이 높은 경우에는 고전력 데카폴에 의한 발열을 완화하기 위해 알루미늄이나 NaCl에 의한 시료의 희석이 필요하다. CP-MAS법은 고체시료의 구조해석이나 구조-활성 상관관계의 연구에 도움이 되지만 반면에 시료조제법에 의해 스펙트럼이 크게 변화되기 때문에 신중한 시료 조제가 요망된다.

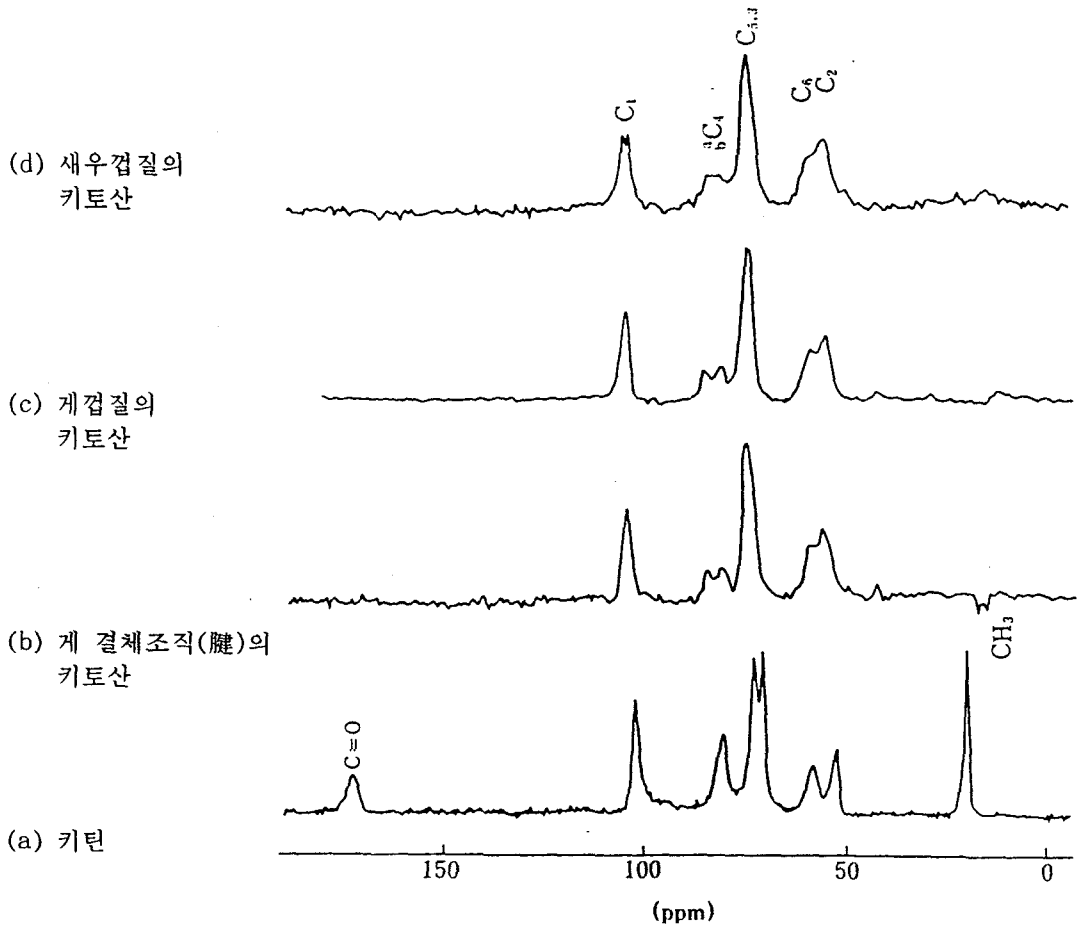


그림 20. 키틴 및 키토산의  $^{13}\text{C}$ -CP-MAS-NMR스펙트럼  
 Bruker CXP-300, 펄스각  $90^\circ$  ( $10\mu\text{s}$ ),  
 500~2,000회 조작을 반복하여 측정,  
 벤젠을 기준으로 하여 측정

#### 4) X선 해석법

키틴, 키토산의 결정구조에 관한 정보는 주로 X선 해석법에 의해 얻어질 수 있다. X선 해석법은 분자의 구조를 정확히 알 수 있는 우수한 방법이지만, 결정성의 시료가 필요한 점이나 전문적인 지식이나 기술이 필요한 점으로 보아 결코 손쉬운 해석법이라 할 수 없다. 특히 다당류의 경우 양호한 단결정을 얻는 것이 곤란하기 때문에 X선을 사용하는 해석법에도 한계가 있다. 따라서 앞에서 기술한 CP-MAS-NMR법에 의한

고차 구조해석법이나 IR 스펙트럼에 의한 해석과 조합시키는 것이 바람직하다. 다만 천연의 섬유상 시료를 입수한다든지 섬유화가 가능하면 분자배향에 의한 X선 산란의 규칙성을 도출시킨다. 즉 규칙적인 X선 간섭상으로부터 분자사슬 중의 원자위치를 어느 정도 추측할 수 있다. 키틴의 경우 생체 중에 함유되어 있는 섬유상 키틴을 이용할 수 있기 때문에 이같은 X선 회절법을 유용하게 이용할 수 있어 그 결정구조가 상당히 밝혀졌다.

키틴은 생체중이나 그 존재부위에 따라  $\alpha, \beta, \gamma$ 의 3종류의 결정구조가 알려져 있다. 이들 중에서  $\alpha$ 구조는 자연계에 많이 분포하며, 분자사슬은 서로 역방향으로 줄지어 있어 조밀한 결정구조이며 Minke와 Blackwell에 의하면 단위격자는  $a=4.75 \text{ \AA}$ ,  $b=18.86 \text{ \AA}$ ,  $c=10.32 \text{ \AA}$ (섬유축)의 사방정형이며, 분자사슬은 헬릭스 구조를 취하고 있다.  $\beta$ 구조는 오징어의 갑각이나 규조류 등에 존재하며,  $\alpha$ 구조와는 반대로 분자사슬은 서로 평행으로 되어 있다. 분자사슬은  $\alpha$ 구조와 동일한 헬릭스 구조를 취하고 있지만 단위격자는  $a=4.85 \text{ \AA}$ ,  $b=9.26 \text{ \AA}$ ,  $c=10.38 \text{ \AA}$ (섬유축),  $\gamma=97.5$ 의 단사정형이다.  $\gamma$ 구조는  $\alpha$ 구조와  $\beta$ 구조가 혼재한 구조이며 예를 들면 오징어의 위벽에서 발견되고 있다. 이 같은 키틴의 경우는 천연에 섬유상 키틴이 존재하기 때문에 X선 회절법에 의한 해석이 이루어지지만, 키토산의 경우는 천연상태에서의 섬유상 키토산이 존재하지 않기 때문에 배향성이 높은 시료를 얻기가 어렵고 해석도 좀처럼 진척되지 않고 있다. 게나 바다가재의 껍질에서 얻어진 섬유상 키틴을 주의 깊게 탈아세틸화하여  $a=8.97 \text{ \AA}$ ,  $b=17.05 \text{ \AA}$ ,  $c=10.17 \text{ \AA}$ (섬유축)의 사방정형의 단위격자를 밝혔다<sup>30)</sup>.

한편 필름이나 섬유로 재생한 키틴이나 키토산에 대해서도 마찬가지로 하여 결정구조를 조사하였다. 예를 들면 小川 등<sup>31)</sup>은 탈아세틸화도 100%의 키토산의 초산수용액에서 cast법으로 필름을 만들어 이것을 200°C의 열수처리로 습도의존성이 없는 고결정성의 시료를 얻어 단위격자 정수  $a=8.24 \text{ \AA}$ ,  $b=16.48 \text{ \AA}$ ,  $c$ (섬유축) $=10.39 \text{ \AA}$ 의 사방정제라고 보고하였다. 齊藤 등<sup>32)</sup>에 의하면 게껍질에서 얻은 키토산은  $a=8.9 \text{ \AA}$ ,  $b=17.0 \text{ \AA}$ ,  $c$ (섬유축) $=10.25 \text{ \AA}$ 이며 열처리로 고결정성 키토산으로 이행되지만 새우 키토산은 열처리하여도 고결정형으로 이행하는 양은 많지 않다는 것이 X선회절과 CP-MAS-NMR의 두가지 분석법으로부터 측정되었다. 이것은 조제법에 따라 여러 가지의 결정형을 취할 수 있다는 것을 나타내고 있다. 따라서 측정시료 조제에 있어서는 측정 전반에 걸쳐서 사용되는 것만은 동일조건에

서 조제한 시료를 준비할 필요가 있다. 한편 키틴섬유의 경우 수소결합의 재생 등에 따라 결정화도가 시간과 더불어 변화하기 때문에 키틴유도체의 구조해석도 포함하여 충분히 주의할 필요가 있다.

이어서 X선 해석에 사용되는 키틴섬유 및 키토산 섬유의 조제법에 대하여 기술한다.

#### 가. 키틴섬유조제법<sup>40)</sup>

키틴미세분말(120 mesh) 5g을 50ml의 99% 포름산으로 현탁하여 실온에서 1시간 정도 정치 후  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 하룻밤 동결시켜 다음날 실온에서 해동한다. 이 조작을 균일하고 점조한 겔이 얻어질 때까지 계속한다. 포름산과 디클로로초산(dichloroacetic acid, DCA)를 가하여 균일한 용액을 만든다(키틴 농도 3~5%, w/v, DCA농도 5%, v/v). 방사직전에 여기에 아세톤을 10% 전후 가하여 잘 혼합하면 예사성(曳絲性)의 액이 된다. 여포로 가압여과한 후  $0.07\sim 0.1\text{mm}\phi \times 50\text{holes}$ 의 백금노즐로 아세톤 중에 가압에 의해 압출하여 응고시킨다(아세톤 응고속장 약 80cm, 50% 에탄올수의 제 2응고속장 약 80cm, 0.0~7.0m/mm의 속도로 방사). 냉각중에 연신(延伸, 1.2~1.4배)조작을 하여 casset으로 감는다. 입상(粒狀)수산화나트륨을 가한 메탄올 중에서 하루밤 침지하여 포름산이나 DCA를 제거한다. 메탄올 중에서 충분히 세정하여 건조한다.

#### 나. 키토산섬유 조제법<sup>41)</sup>

분자량 약 4만의 키토산(탈아세틸화도 70~80%) 13g을 100ml의 4% 초산수로 실온에서 서서히 용해시킨다. 여포를 사용하여 가압여과한 후  $0.07\sim 0.1\text{mm}\phi \times 50\text{holes}$ 의 백금 또는 스텐레스 노즐로부터 암모니아 용액(2M  $\text{CuSO}_4$  수용액에 진한 암모니아수를 가하여 완전히 용해된 액) 중으로 압출하여 응고시킨다(속장 약 80cm, 6.0~7.0m/mm의 방사속도). 약 70cm의 제 2응고속장(50%에탄올수)을 통한 후 온수(약  $60\sim 70^{\circ}\text{C}$ ) 중에서 연신조작(1.2~1.5배)을 하여 카세트로 감는다. 충분히 수세한 후 2~5% EDTA-4Na 수용액 중에 침지하여 구리를 제거한다. 이때  $80\sim 90^{\circ}\text{C}$ 로

처리하면 효과적이다. 중성으로 될 때까지 충분히 수세 후 메탄올 중에 침지하여 탈수 후 풍건하면 키토산 섬유(약 3~10denoer)가 얻어진다.

### 5) 분자량 측정법

고분자화합물의 분자량 측정법으로는 점도법, 초원심분석법, 광산란법, 삼투압법, 고속액체크로마토그래피(HPLC), 겔여과법, 겔전기영동법 및 말단기 정량법 등이 있다. 키토산의 분자량 측정에 가장 일반적으로 이용되는 것은 초산수용액 중에서의 점도법이다. GPC(Gel permeation chromatography) 칼럼을 이용한 HPLC에서는 평균분자량 뿐만 아니라 분자량 분포도 확실히 알 수 있기 때문에 앞으로 보다 일반적으로 이용될 것으로 생각된다. 한편 키틴은 키토산과 달리 물이나 일반 유기용매에 용해되지 않기 때문에 분자량의 측정이 곤란하다. 진한 황산, 포름산, 삼염화초산 등의 산에는 용해되지만 이들 용매 중에서는 분자량이 저하하기 때문에 얻어진 결과는 전혀 맞지 않는다. 그러나 최근 키틴이 염화칼슘이수염을 포화한 메탄올로 용해되는 것이 발견되어 이 용매계에서의 점도측정으로 분자량을 구할 수 있다.

#### ① 키토산의 분자량 측정법

##### 가. 점도법

키토산을 초산 수용액에 녹여 모세관형 점도계에서 모세관 속을 시료액이 통과하는 시간을 측정하는 방법이다. 모세관형 점도계에는 몇가지의 종류가 있지만 Ostwald형과 Ubbelohde형이 일반적이다. 그 중에서 시료의 액량에 관계없이 측정할 수 있는 Ubbelohde형이 사용하기 쉽다.

그림 21의 관 1, 2, 3을 각각 고무관으로 연결하고 측정할 때에는 관 3의 입구를 막고 2에서 빨아 올려 모든 관을 개방하여 모세관 통과시간(a선보다 b선까지의 시간)을 측정한다. 희석한 경우 관 1에서 희석액을 가하여 관 2을 닫고 관 3에서 공기를 넣어

잘 교반한다.

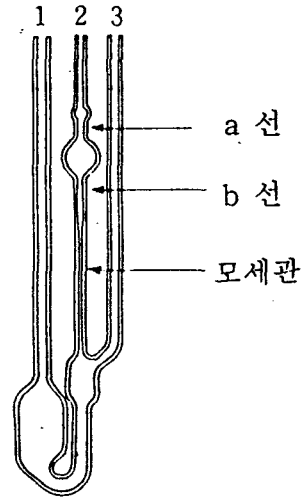


그림 21. Ubbelohde형 점도계

Ubbelohde형 점도계를 사용하여 키토산의 분자량을 측정하는 조작에 대하여 설명하면 잘 건조한 키토산 0.4g을 0.2M 초산-0.1M 염화나트륨-4M 요소수용액에 용해하여 100 ml로 한다(0.4% 키토산 용액, w/v), 다음에 이 0.4% 키토산 용액을 위에서 서술한 초산-염화나트륨-요소용액으로 1/2배 희석한다. 희석을 키토산 농도가 최초의 1/64로 될 때까지 반복하여 7종류의 용액을 만들어 냉암소에 10일간 방치하여 평형화시킨다. 항온조의 온도를 25℃로 설정하여 각 용액의 점도를 측정한다. 점도식은 다음의 Mark-Houwink식을 기본으로 한다.

$$[\eta] = K \cdot M^a$$

여기서  $[\eta]$ : 극한점도 또는 고유점도, K: 정수, M: 분자량 a: 중합체의 종류, 용매의 종류에 의해 결정되는 정수  
이 식에서 양 변의 상용대수를 취하면

$$\log M = 1/a(\log [\eta] - \log K)$$

로 된다. Lee<sup>(5)</sup>에 의하면 탈아세틸화도가 약 91%인 키토산은 0.2M 초산-0.1M NaCl-4M 요소 용액 중에서 정수 K와 a는 각각  $8.93 \times 10^{-4}$ 와 0.71이다. 이들 값을 사용하여 분자량을 산출한 예를 표 6에 나타내었다.



표 6. 키토산의 점도, 상대점도 및 비점도 측정 예

농도(C) (g/100ml) 희석	점도	상대점도 $\eta_{rel}$	비점도 $\eta_{sp}$	$\eta_{sp}/C$	$1/C \ln(\eta_{rel})$
0.4% (1/1)	26.90	25.10	24.100	60.2	8.06
0.2% (1/2)	7.62	7.12	6.120	30.6	9.81
0.1% (1/4)	3.34	3.12	2.120	21.2	11.40
0.05% (1/8)	1.86	1.74	0.738	14.8	11.00
0.025% (1/16)	1.43	1.34	0.336	13.5	11.00
0.0125% (1/32)	1.23	1.15	0.150	12.0	11.20
0.00625% (1/64)	1.15	1.07	0.748	12.0	11.50
0.00000% (용매)	1.07	-	-	-	-

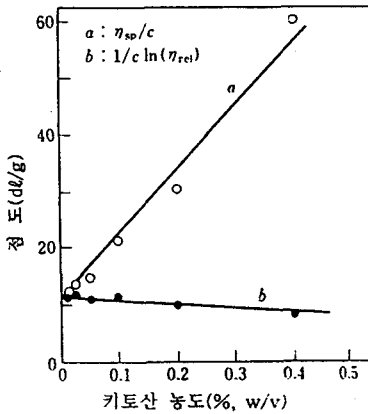


그림 22. Ubbelohde형 모세관식 점도계에 의한 고유점도 계산법

먼저 여러 농도의 키토산용액에 대하여 모세관 통과시간을 측정하여 점도를 산출한다. 표 6에 있어서 상대점도는 키토산 용액과 용매의 점도비( $\eta/\eta_0$ )이며, 비점도는  $(\eta - \eta_0)/\eta_0$ 이다. 표 6 중의  $\eta_{sp}/C$  또는  $1/C \ln(\eta_{rel})$ 와 키토산 농도의 관계를 도식하면 그림 22와 같게 되어 키토산 농도 0에 외삽하면 고유점도 $[\eta]$ 가 11(dl/g)로 된다.

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \eta_{sp}/C = \lim_{c \rightarrow 0} 1/C \ln(\eta_{rel})$$

여기서 c : 키토산 농도  
따라서 키토산의 분자량은 다음식에서 구한다.

$$\log M = 1/a(\log [\eta] - \log K)$$

$a=0.71$ ,  $[\eta]=11$ ,  $K=8.93 \times 10^{-4}$ 이므로  $\log M=5.76$ 로 되어 분자량  $M$ 은 575000~580000로 산출된다.

한편 회전점도계는 공장 등에서는 취급이 간단하기 때문에 비교적 자주 사용되고 있다. 이것은 원통 또는 원판 등을 유체중에서 회전시키든가 그들을 정지시켜서 그 주위의 유체에 동심원상의 회전 흐름을 생기게 함으로써 그 물체가 점성저항에 의한 토오크(torque)를 받고, 이때 회전속도 등이 동일조건이 되면 그 토오크는 유체의 점도에 의해 변하고 점도가 높을수록 크게 되기 때문에 이것으로부터 유체의 점도를 구할 수 있다.

현재 널리 사용되고 있는 것은 원통을 사용하는 방법이지만 외통(外筒)의 크기에 영향을 받지 않는 Brookfield형 회전점도계(B형 회전점도계)가 일반적이다. 다음에 측정예에 대하여 기술한다.

시료인 키토산은 보통 10% 정도의 수분을 함유하고 있기 때문에 미리 건조 감량을 측정해 놓을 필요가 있다. 건조 감량을 10%로 하면 0.5%(w/v)용액을 조제하는 데는 1.6667g(무수물로서 1.50g)을 달아서 300ml의 용매(5% 묽은 초산 또는 5% 묽은 포름산)에 가해 일정한 교반속도(예를 들면 60rpm)에서 3시간 교반하여 용해시킨 것에 대해 점도를 측정한다. 그 결과의 예를 표 7에 나타내었다. 또 점도와 분자량의 관계값을 표 8에 정리해 놓았다<sup>2)</sup>.

표 7. 회전점도계에 의한 키토산의 점도의 농도와 관계

키토산농도 (g/100m <sup>l</sup> )	점도(cP)* (5% 초산수)	점도(cP)* (5% 포름산수)
1.0	7200(No.3)	6900(No.3)
0.5	1500(No.2)	840(No.2)
0.1	55(No.1)	28(No.1)
0.05	28(8L)	10(8L)
0.03	11(8L)	5.2(8L)
0.01	2.4(8L)	1.8(8L)

(주) 가로안은 사용 adapter이름  
 ※ 점도 단위는 centipoise(cP)이다.  
 최근 milipascal초 (mPa·S)로 바뀌었다.

표 8. 회전점도계에 의한 키토산의 점도와 분자량 관계

점도(mPa·s) (농도, g/100m <sup>l</sup> )	분자량 (×10 <sup>4</sup> )	아미노기 함량 (%)*
7(0.70)	2.0	8.10
5(0.70)	1.2	7.95~7.16
9(0.40)	3.1	8.14
10(0.35)	3.7	8.17
12(0.07)	4.2	8.18
390(0.018)	17.6	8.20
150(0.018)	13.0	8.15
970(0.007)	23.9	8.19
430(0.007)	18.2	8.18
1300(0.005)	25.5	8.16
890(0.005)	23.5	8.14

(주) ※ 콜로이드 적정으로부터 산출

#### 나. HPLC법

최근 급속히 보급 발전된 고속액체크로마토그래피(HPLC)를 사용 GPC로 키토산의 분자량을 간단히 측정할 수 있게 되었다.

예를 들면 키토산을 0.1M 초산완충액(pH 4.0)에 녹여 60℃에서 0.5ml/mm의 속도로 흘려 RI(굴절율)를 검출한다. 컬럼은 수계 고속 겔여과용의 것을 사용한다. 예를 들면

분자량 4만 정도까지의 시료에는 Asahipak GFA-30F(旭化成工業), 고분자량 시료의 경우, TSK gel G 4000PW를 사용 폴란의 분자량 표준(Shodex standard P-82, 昭和電工)과 비교하여 분자량을 측정한다.

이같은 GPC로 분자량을 구하는 방법은 신속하게 분자량 분포도 측정할 수 있기 때문에 HPLC장치만 갖고 있으면 점도법에 비해서 상당히 우수하다고 본다. 단지 하나의 문제는 분자량 표준과 같은 다당류라도 다른 결합양식이나 입체배치를 갖는 폴란만이 있어 이것과 직접적으로 비교하는 것이 어느 정도 타당한지가 불명확하다.

#### ② 키틴의 분자량 측정법

키틴은 산 이외의 용매에 용해하지 않기 때문에 분자량을 점도법으로 직접 측정하기는 곤란하다. 따라서 어떤 정해진 조건에서 탈아세틸화하여 키토산으로 하여 이들의 분자량을 앞에서 기술한 점도법으로 결정하여 키틴으로 환산하는 소위 Unichica법이 일반적으로 사용된다. 이것에 의하면 1000 $\mu$ m 키틴 미세분말 시료 3g을 미리 95±2℃로 조절한 50% 수산화나트륨 용액(w/w) 100ml에 현탁하여 온도를 유지하면서 정확히 2.5시간 탈아세틸화 반응시킨다. 반응 종료후 실온까지 온도를 내린 다음 여과 후 증류수로 충분히 세정하여 알칼리를 씻어 흘려 내려 건조 하고 점도 측정용 시료로 한다. 점도 측정은 키토산의 분자량 측정에 준한다.

그러나 최근 키틴이 염화칼슘이수염을 포화한 메탄올 중에서 교반하면 용해하는 것이 발견되어 이 용액중에서의 점도와 분자량의 관계식이 제출되었다. 먼저 7종류의 분자량을 가지는 미지의 키토산을 아세틸화하여 분자량을 모르는 7종류의 재생 키틴으로 하여 이들을 염화칼슘이수염을 포화한 메탄올 중에서 실온으로 교반시킴으로써 완전히 용해할 수 있다. 이어서 이들의 점도를 회전점도계로 측정하여  $\eta_{sp}/C$  나  $\ln \eta_{rel}/C$ 와 농도와의 관계로부터 고유점도  $[\eta]$ 를 구한다. 3가지의 측정 예를 그림 23에 나타내었다.

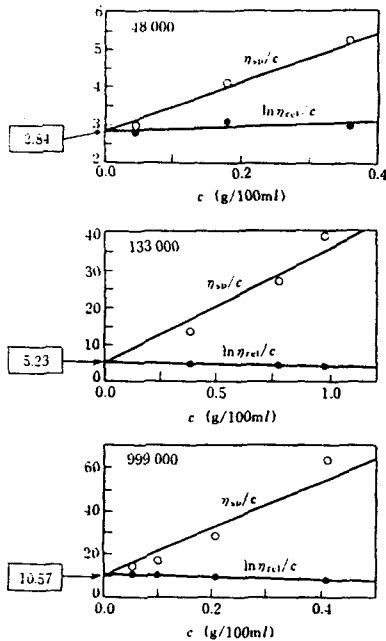


그림 23. 키틴의 염화칼슘이수염 포화메탄올 중에서의 점도

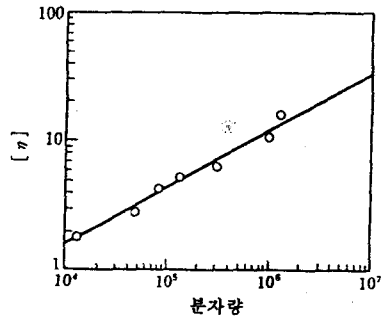


그림 24. 키틴의 분자량과 염화칼슘이수염 포화메탄올 중 25°C에서 고유점도의 관계

또 이와 같이하여 구해진 7종류 모두의 키틴 고유점도를 키토산의 데이터와 함께 표 9에 나타내었다. 표 9에 나타난 키틴에 대하여 분자량과  $[\eta]$ 의 관계를 그림 24에 나타내었고, 이것으로부터

$$[\eta] = 2.54 \times 10^{-2} M^{0.45}$$

의 점도식이 유도되었다. 따라서 염화칼슘이수염 포화 메탄올 중에서 분자량을 모르는 키틴을 녹여 회전점도계를 사용하여  $[\eta]$ 를 구하면 분자량을 직접 구할 수 있다.

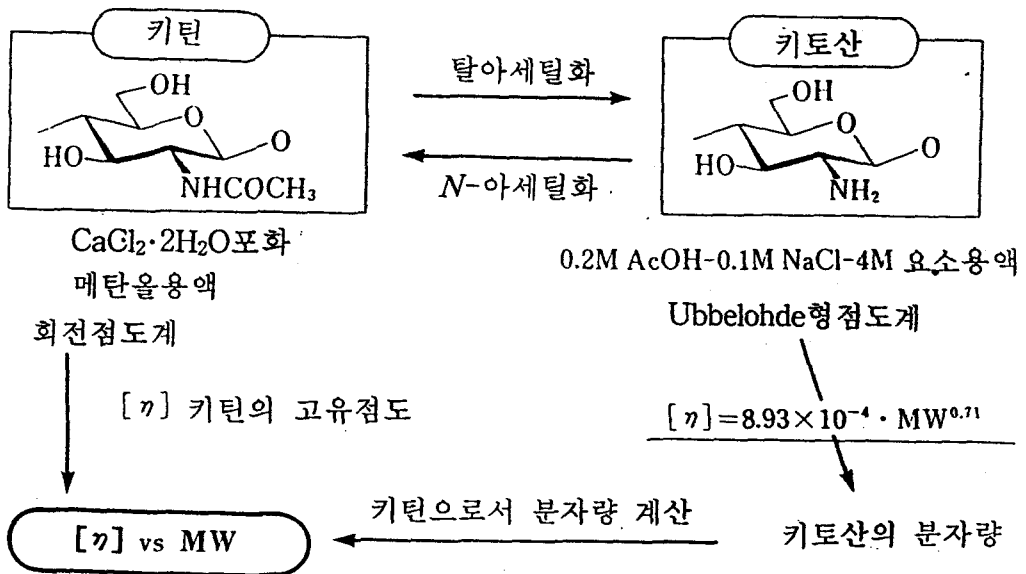


그림 25. 키틴의 분자량과 고유점도(염화칼슘이수염 포화메탄올 용액 중)의 관계식을 구하기까지의 과정

상술한 염화칼슘이수염 포화 메탄올 중에서의 키틴의  $[\eta]$ 와 분자량 관계식을 구하기

까지의 순서를 정리하여 그림 25에 나타내었다.

표 9. 각종 키토산 및 키틴의 고유 점도

키토산	키토산의 단리원	키토산		키틴	
		$[\eta]^1$	MW $\times 10^3$	$[\eta]^2$	MW $\times 10^3$
A	뚝은 게, 껍질	0.66	11	1.79	13
B	" "	1.65	40	2.84	48
C	게 껍질	2.40	68	4.27	84
D	뚝은 게, 껍질	3.32	107	5.23	133
E	" "	6.10	251	6.28	309
F	새우껍질	14.10	819	10.57	999

(주) MW : N-아세틸 키토산으로서 계산한 분자량

$[\eta]^1$  : Ubbelohde형 점도계로 계산한 고유점도

$[\eta]^2$  : 회전점도계로 측정된 고유점도

### ③ 카르복시메틸키틴의 분자량 측정

고치환 카르복시메틸키틴의 분자량 산출의 점도식이 井上 등에 의해 산출되어 있다. 점도식은 기본적으로는 Mark-Houwink의 식이지만 삼투압의 측정값에서  $K=7.92\times 10^{-5}$ ,  $a=1.00$ 로 계산되어 수평균분자량(Mn)을 고유점도로부터 산출할 수 있다. 즉

$$[\eta]=7.98\times 10^{-5}Mn^{1.00}$$

또는  $\log[\eta]=-4.10+1.00\times \log Mn$

이다(여기서  $[\eta]$ 는 100 ml/g의 단위)

그림 26에  $\log Mn$ 과  $\log[\eta]$ 의 관계를 나타내었다. 점도의 측정법은 ①에서 기술한 키토산 용액의 점도 측정법에 준하지만 0.1M 식염수 100ml에 1g의 카르복시메틸키틴을 용해하여 감압 여과 등에서 충분히 불순물 등을 제거한 다음 점도를 30°C의 항온조 중에서 Ubbelohde형 점도계를 사용하여 측정한다.

## 맺음말

키토·키토산연구는 일본을 비롯하여 미국, 유럽 등지에서 대학, 산업체, 연구소를 중심으로 국가적 차원의 지원하에 활발한 연구 개발이 진행되어 그 연구 결과의 일부는 산업화가 이루어지고 있는 실정이다. 국내에서도 이에 관한 연구가 일부 진행되고 있으나 아직까지는 초보적인 단계라 할 수 있으며, 산업적으로 키틴·키토산만이 생산되고 있을 뿐 고부가가치의 기능성소재 개발에 관한 연구는 미흡한 실정이다.

최근들어 기업체로부터 키틴·키토산 유도체의 합성기술과 그 측정방법에 관한 문의를 받는 경우가 있었기에 그 필요성이 인식

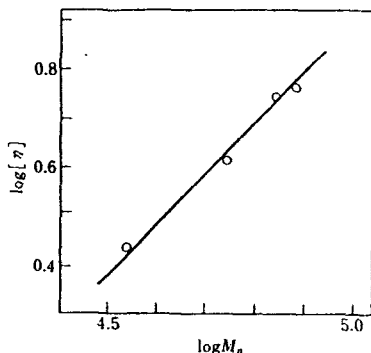


그림 26. 카르복시메틸키틴의 고유점도와 평균분자량의 관계 (30°C Ubbelohde형 점도계)

되어 이에 관한 내용들을 정리해 보았다.

이미 기술한 바와 같이 키틴은 양적으로는 풍부하지만, 실제 이용범위가 매우 한정되어 있어 대부분 폐기되고 있는 실정이다. 그러나 키틴은 다작용성 분자이므로 화학적 수식법에 의해 여러 가지 유도체를 만들 수 있는 합성기술이 확립됨으로써 유용한 기능성을 갖는 소재들이 계속 개발되어 그 일부는 실용화되고 있는 실정이다.

앞으로 위치선택적 또는 정량적인 화학수식법이 한층 더 발전되면 다양한 기능발현으로 키틴·키토산 유도체의 고도 유효이용의 길은 더욱 확대될 것으로 기대된다.

## 참고문헌

- 1) Moorjani, M. N., V. Achutha, D. I. Khasim : J. Food Sci. Technol., 12, 187 (1975)
- 2) Horton, D., D. R. Lineback : Method in Carbohydrate Chemistry, Vol. 5, ed. R.L. Whistler, p. 403, AP. New York(1965)
- 3) Focher, B., P. L. Belttrame, A. Naggi G. Torri : Carbohydr. Polym., 12, 405 (1990)
- 4) 山崎伸道, 由本圭一, 西岡守 : 日本化學會, 793(1992)
- 5) Aiba, S. : Int. J. Biol. Macromol., 14, 225 (1992)
- 6) V rum, K. M., M. W. Anthonsen, H. Grasdaren : Carbohydr. Res., 211, 17 (1991)
- 7) Kurita, K., K. Tomita, T. Tada, S. Ishii : J. mol. Biol, 28, 282(1967)
- 8) Araki, Y., E. Ito : Methods Enzymol., 161, 510(1988)
- 9) Kaifu, K., N. Nishi, T. Komai, S. Tokura : Polym. J. B., 241(1981)
- 10) Nishimura, S., O. Kohgo, K. Kurita, H. Kuzuhara : Macromolecules, 24, 4745 (1991)
- 11) Kurita, K., H. Yoshino, K. Yokota, M. Ando, S. Inoue : Macromolecules, 25, 3786(1992)
- 12) Kurita, K., S. Inoue, Y. Koyama : Polym. Bull., 21, 131(1989)
- 13) Yamada, H., T. Imoto : Carbohydr. Res., 92, 160(1981)
- 14) Holme, K. R., L. D. Hall : Macromolecules, 24, 3828(1991)
- 15) Trujillo, R. : Carbohydr. Res., 7, 483 (1968)
- 16) Maresch, G., T. Clausen, G. Lang : Chitin and Chitosan, eds. G. Skjalc-Braek, T. Anthosen, P. Sandford, p. 389, Elsevier, London(1989)
- 17) Muzzarelli, R. A. A., F. Tanfani, M. Emanuelli : Carbohydr. Res., 107, 199 (1982)
- 18) 戸倉清一 : キチン, キトサン 研究會 マニユフル, キチン キトサン 研究會編, p. 68, 技報堂出版(1991)
- 19) Muzzarelli, R. A. A., F. Tanfani, M. Emanuelli, D. P. Pace : Carbohydr. Res., 126, 225(1984)
- 20) Kurita, K., M. Ishiguro, T. Kitagima : Int. J. Biol. Macromol., 10, 124(1988)
- 21) Kurita, K., Y. Koyama : J. Appl. Polym. Sci., 31, 1951(1986)
- 22) Stanley, W. L., G. G. Watters, S. H. Kelly, A. C. Olsen : Biotechnol. Bioeng., 20, 135(1978)
- 23) Donal, A., C. Gey, M. Rinaudo, C. Terrassin : Int. J. Biol. Macromol., 9, 223 (1987)
- 24) Muzzarelli, R. A. A., F. Tanfani : Carbohydr. Polym., 5, 297(1985)
- 25) Hirano, S., H. Yano : Int. J. Biol. Macromol., 5, 183(1982)
- 26) Kurita, K., Y. Koyama, A. Taniguchi : J. Appl. Polym. Sci., 3,1651(1986)
- 27) Kina, K., K. Tamura, N. Ishibashi : Japan Analist, 23, 1082(1974)
- 28) Toei, K., T. Kohata : Anal. Chem. Acta, 83, 59(1976)
- 29) Tsuji, A., T. Kinoshita, M. Hoshino : Chem. Pharm. Bull., 17, 1505(1979)
- 30) Ohno, N., T. Yatamae : Carbohydr. Res., 137, 239(1985)

- 31) Sannan, T., K. Kurita, K. Ogura, Y. Iwakura : *Polymer*, 19, 458(1978)
- 32) Miya, M., R. Iwamoto, S. Yoshikawa, S. Mima : *Int. J. Biol. Macromol.*, 2, 323 (1980)
- 33) 見失勝, 岩木令吉, 太田浩二 : *高分子論文集*, 42, 181(1985)
- 34) Tokura, S., J. Yoshida, N. Nishi, T. Hiraoaki : *Polym. J.*, 14, 527(1982)
- 35) Tokura, S., N. Nishi, A. Tsutsumi : *Polym. J.*, 15, 485(1983)
- 36) Nishi, N., A. Ebina, S. Nishimura : *Int. J. Biol. Macromol.*, 8, 311(1986)
- 37) Saito, H., R. Tabeta, K. Ogawa : *Macromolecules*, 20, 2424(1987)
- 38) Ogawa, K., S. Imuleai : *Carbohydr. Res.*, 160, 425(1987)
- 39) Ogawa, K., S. Hirano, T. Miyanishi, T. Yui : *Macromolecules*, 17, 973(1984)
- 40) Tokura, A., N. Nishi, J. Noguchi : *Polym. J.*, 11, 781(1979)
- 41) Tokura, A., S. Nishimura, N. Nishi, K. Nakamura : *Sem-i Gakkaishi*, 43, 56 (1987)
- 42) 井治, 川 和男, 藤田孝夫 : *日本特許*, 昭和 56-33401
- 43) Roberts, A. F., J. G. Domszy : *Macromol. Chem.*, 186, 1671(1985)
- 44) Nishimura, S., N. Nishi, S. Tokura : *Carbohydr. Res.*, 146, 251(1986)
- 45) Lee, V., *University microfilms Ann Arbor* 74/29, 446(1974)