J.Korean Asso. Radiat. Prot.
Vol.23 No.2: 83-88(1998)

▣論 文▣

The Distribution of ^{14}C-chitosan by Different Molecular Weight in Mice

*K*wang-Yoon Kim, Young-Ho Kim, Hee-Kyung Kim*, Hee-Seung Bom, Ji-Yeul Kim, Young-Bok Roh† and Yoshikazu Nishimura‡

Department of Nuclear Medicine, Chonnam University Hospital, Kwangju
**Department of Food science and Technology, Pukyong University, Pusan*
†Department of Biology, College of Natural Sciences, Chosun University, Kwangju
‡Department of Environmental Health, National Institute of Radiological Sciences, JAPAN

마우스에서 ^{14}C-chitosan 분자량별 체내 분포에 관한 연구

김광윤 · 김영호 · 김희경* · 범희승 · 김지열 · 노영복† · 요시카즈 니시무라‡
전남대학교병원 핵의학과, *부경대학교 식품공학과,
†조선대학교 생물학과, ‡일본방사선의학총합연구소
(1998년 2월 10일 접수, 1998년 8월 10일 채택)

Abstract - Chitosan is a nontoxic natural chealtor which was made by chitin, and reduced a contamination of radiostrontium in animals. In this experiment, A different molecular weight of C-14 chitosan was intravenously administered to mice, and then the distribution of C-14 chitosan in the body was observed. Male mice (8 to 10 weeks, body weight of 30 to 35g) of ICR strain were used. C-14 chitosan was diluted with saline and then given intravenously in mice. After the administration of C-14 chitosan, mice was sacrificed at the 6th hour, 1st, 3rd, 5th, and 7th day. Beta radioactivities in the blood, liver, kidney, liver, muscle, testis, and urine was measured using a liquid scintillation analyzer. Most of the C-14 chitosan was excreted through urine within 6 hours. Biodistribution of C-14 chitosan was similar despite the difference of moleclar weight. Higher distributions of radioactivities were found in the liver, kidney, spleen. The relative concentration in tissue increased for the 6 hours and then decreased. In conclusion, most of C-14 chitosan was excreted through urine despite the difference of molecular weight. and, low melecular weight of C-14 chitosan showed higher distribution than high molecular weight of C-14 chitosan in tissues.
Key word : C-14 chitosan, mice, distribution, molecular weight

요약 - 키토산은 키틴의 탈아세틸화반응을 통해서 얻어진 유전적 독성이 없는 천연착화제로써 방사성동위원소 혹은 중금속 이온의 제거제 및 체내 흡수 억제제로 알려져 왔다. 본 연구에서는 분자량이 다른 C-14 chitosan을 정맥투여 한 후 C-14 chitosan 분자량별 마우스 체내 대사과정을 알아보고자 하였다. ICR계 웅성 마우스(8-10주령, 체중 30-35g)를 사용하였다. C-14 chitosan은 증류수로 희석한 다음, 꼬리정맥을 통해 정맥 투여하였다. C-14 chitosan 투여후 6시간, 1일, 3일, 5일, 7일째 마우스를 희생시켜 혈액, 간, 신장, 비장, 폐, 근육, 고환, 오줌을 채취하였으며, 각각의 β-방사능을 측정하여 상대농도를 구하였다. 대부분의 C-14 chitosan이 6시간째에 오줌을 통해 체외 배출되었고, 체내대사과정은 분자량이 서로 다름에도 불구하고 비슷하였다. 간, 신장, 비장등에서 높은 방사능을 나타내었다. 조직간의 상대농도는 6시간째에 증가하다가 서서히 감소함을 알 수 있었다. 결론적으로 정맥 투여한 키토산은 분자량에 상관없이 대부분 오줌을 통해 체외배출 되고, 체내 장기중의 대사과정은 비슷하게 나타났다.
중심어 : C-14 키토산, 마우스, 분자량

본 연구는 1996년도 보건의료기술연구개발사업(HMP-96-D-0031) 연구비를 지원받아 수행하였음.

서 론

최근 버섯 등의 균류와 새우, 게와 같은 갑각류의 외골격에 분포하며 방사성동위원소 및 중금속이온 등에 흡착력이 있는 것으로 알려진 키토산을 이용한 다양한 연구들이 이루어지고 있다. 키토산은 키틴의 탈아세틸화반응을 통해서 얻어진 물질로 유전적 독성이 없는 것으로 알려져 왔고[1,2], 방사성스트론튬에 오염된 마우스 및 마우스태아의 오염 치료 및 예방에 효과가 있다고 보고되었다[3~5]. Maruca 등[6]은 pH가 중성으로 갈수록 중금속이온의 흡착능이 높아짐을 관찰하였고, Iwakura 등[7]은 키틴, 키토산의 방사성동위원소, 중금속이온등에 대한 흡착능이 아미노기 함량, 탈아세틸화도의 차이에 따라 달라진다고 보고하였다. Tong 등[8]은 키토산 유도체를 이용한 이온교환수지 연구를 통해 일부 중금속이온의 흡착력에 pH가 영향을 준다고 보고하였으며, Muzzarelli[9]는 2가 중금속 이온에 대한 키틴 및 키토산의 실험 결과 일부 중금속 이온이 pH에 영향을 받아 착화율에 차이가 있는 것과 비교했을 때, 방사성스트론튬에 대한 흡착능은 pH에 영향을 받지 않고 훨씬 더 높은 착화율을 관찰하였다. 또한, 김 등[10]은 키틴, 키토산의 분자량별, 탈아세틸화도, pH의 차이에 따른 시간별 방사성스트론튬, 방사성수은, 방사성철 등의 *in vitro* 흡착 실험에서 분자량이 적을수록, 탈아세틸화도가 증가할수록, pH가 중성일 때 다른 조건에 비해 흡착능이 뛰어남을 관찰하였다. 위와 같이 여러 가지 요인에 따라 키토산의 방사성동위원소나 중금속이온 등의 흡착능에 차이가 있음이 관찰되어 실제 키토산을 임상에 적용할 때 고려해야 할 문제점 중의 하나이다.

본 실험에서는 고분자와 저분자 C-14 chitosan을 이용한 키토산의 분자량에 따른 체내대사 과정에 관한 연구를 통해 키토산의 임상적 적용시 기초 자료로 삼고자 하였다.

재료 및 방법

C-14 chitosan[$(C_8H_{13}NO_5)_N$]은 Shimahara[11], Molano 등[12]의 방법에 기초를 두고 제조하였는데, 제조공정을 간단히 요약하면 다음과 같다. C-14 acetic acid(4.625MBq/㎖) 75㎕과 acetic acid 1㎖, 알코올 10㎖이 혼합된 용액에 키토산 0.5g을 혼합시킨다. 실온에서 20시간 교반시킨후, 반응용액을 4.5% triethyl amine이 포함된 100㎖ 에탄올에 넣고 10분간 원심분리한다. 그후, 0.9% triethyl amine이 포함된 에탄올에 3회간 더 원심분리하면 순수한 C-14 chitosan이 합성된다. 합성된 *N*-acetyl-1-C-14 labeled chitosan을 증류수로 희석하였다.

저분자 C-14 chitosan(0.691MBq/㎖. M.W:3,000~20,000), 고분자 C-14 chitosan (370M Bq/㎖, MW:1,000,000~2,000,000)의 경우 실험동물은 일본 SLC사에서 생산·공급하고 있는 ICR계 웅성 마우스(8-10주령,체중 30-35g)를 구입하여 사용하였으며, 꼬리정맥을 이용하여 0.3㎖를 마우스에 정맥투여하였다. C-14 chitosan 투여후, 6시간, 24시간, 72시간, 120시간, 168시간 간격으로 각 실험군당 마우스 20마리씩을 희생시켜 혈액, 간, 신장, 비장, 심장, 폐, 근육, 고환, 오줌을 채취하여 각 조직당 100~200㎎의 무게를 단 후, 조직연소기(B-306, Packard Instrument Co., USA)로 조직을 연소시키고, 액체섬광분석기(2500 TR, Packard Instru-ment Co., USA)를 이용하여 β-방사능을 측정하였다.

조직별 상대농도는 Nishimura 등[13]의 방법에 기초를 하여 구하였다. 상대농도를 구하는 공식은 다음과 같다.

$$\text{상대농도} = \frac{\dfrac{\text{조직에 침착된 } {}^{14}\text{C-chitosan 방사능}}{\text{조직의 무게}}}{\dfrac{{}^{14}\text{C-chitosan 전체 투여량}}{\text{실험동물의 몸무게}}}$$

결 과

고분자와 저분자 C-14 chitosan을 마우스에 정맥 투여한 후 각 조직별 상대농도를 Table 1과 2에 나타내었다. 고분자와 저분자 모두 오줌을 통해 6시간째에 다른 장기에 비해 높은 선량인 33.0±12.0, 119.78±77.49을 보이다가 시간의 경과에 따라 그 양이 급속히 감소함을 보이면서 5일째에 0.40±0.01, 1.11±0.65 등이 체외로 배출되었다(Fig. 1). 간에서는 6시간째에 2.09±1.34, 20.1±2.40을 나타내었고, 이러한 경향은 7일째까지 큰 변화 없이 3.55±1.45, 15.01±2.06을 나타내었다(Fig. 2). 신장에서는 6시간째에 11.7±4.11, 11.21±2.66 등이 분포하다가 7일째에 4.82±1.74, 1.91±0.26을 나타내었다(Fig. 3). 비장에서는 6시간째에 13.2±8.45, 37.3±13.46, 7일째에 7.26±3.75, 21.01±5.82 등 높은 선량의 분포 경향을 나타내었

Table 1. Relative concentration of high molecular weight ^{14}C-chitosan in organs of mouse after a single intravenous administration (mean±SD).

	6th hour	1st day	3rd day	5th day	7th day
Blood	0.22±0.01	0.22±0.01	0.02±0.00	0.02±0.00	0.00±0.00
Liver	2.09±1.34	2.17±1.43	2.09±1.23	3.34±1.52	3.55±1.45
Kidney	11.7±4.11	8.63±1.10	5.30±1.62	5.83±2.11	4.82±1.74
Spleen	13.20±8.45	3.63±2.10	9.57±3.24	7.92±4.23	7.26±3.75
Lung	0.36±0.63	0.36±0.16	0.18±0.51	0.18±0.03	0.18±0.12
Muscle	0.04±0.01	0.04±0.01	0.04±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00
Testis	0.01±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
Urine	33.0±12.00	0.20±0.01	0.30±0.01	0.40±0.01	0.20±0.01

다(Fig. 4). 혈액에서는 6시간째에 0.22±0.01, 6.53±1.73, 7일째에 0.00±0.00, 2.75±1.72을 나타내었다(Fig. 5). 폐에서는 6시간째에 0.36±0.63, 4.25±1.63, 7일째에 0.18±0.12, 2.02±1.29을 나타내었다. 근육에서는 6시간째에 0.04±0.63, 0.28±0.17, 7일째에 0.02±0.00, 068±0.41을 나타내었다. 고환은 6시간째에 0.01±0.00, 0.41±0.31, 7일째에 0.00±0.00, 0.29±0.25 등 거의 존재하지 않음을 관찰하였다.

위와 같은 결과를 볼 때, 정맥 투여한 키토산은 분자량에 상관없이 대부분이 투여 6시간째에 오줌을 통해 체외배출 되며, 시간의 경과에 따라 각 조직간의 상대농도가 감소하고, 저분자 키토산이 고분자에 비해 체내 조직별 대사가 빨리 진행되었고 그에 따라 체외배출도 고분자에 비해서 빠르게 진행 되었다.

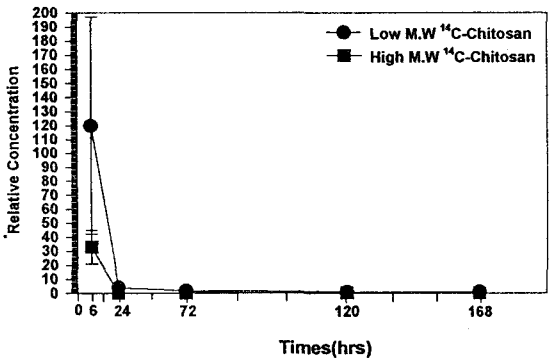

Fig. 1. Urinary excretion of ^{14}C-chitosan in mice after a single intravenous administration. *Relative concentration=(Radioactivity in tissues/Weight of tissues at sacrifice)/(Radioactivity of mice administered/Weight of mice at administration).

고찰 및 결론

본 연구에서는 분자량이 다른 고분자와 저분자 C-14 chitosan을 마우스에 정맥 투여하여 분자량에 따른 체내대사 과정을 비교·관찰하여 분자량에 상관없이 체내분포는 비슷한 경향을 나타내었지만, 저분자 C-14 chitosan이 고분자에 비해 체

Table 2. Relative concentration of low molecular weight ^{14}C-chitosan in organs of mouse after a single intravenous administration (mean±SD).

	6th hour	1st day	3rd day	5th day	7th day
Blood	6.53±1.73	4.82±1.77	3.51±1.40	4.92±2.71	2.75±1.72
Liver	20.10±2.40	18.58±3.69	13.18±3.51	12.96±2.43	15.01±2.06
Kidney	11.21±2.66	9.50±1.49	4.89±0.91	2.82±0.69	1.91±0.26
Spleen	37.30±13.46	20.56±5.46	8.38±0.59	16.94±4.37	21.01±5.82
Lung	4.25±1.63	4.71±1.16	1.82±1.51	2.20±0.34	2.02±1.29
Muscle	0.28±0.17	1.09±0.39	0.83±0.26	0.54±0.32	0.68±0.41
Testis	0.41±0.31	0.56±0.51	0.51±0.27	0.69±0.48	0.29±0.25
Urine	119.78±77.49	4.10±1.94	1.94±1.15	1.11±0.65	

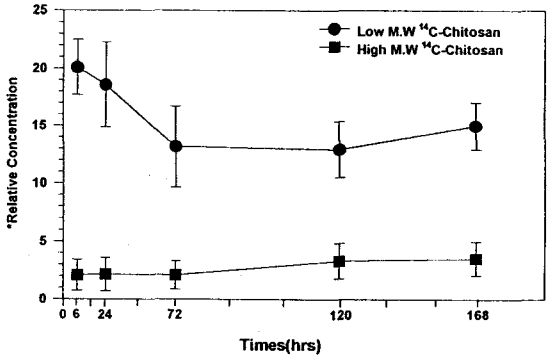

Fig. 2. Distribution of low and high molecular weight of ^{14}C-chitosan in the liver of mice after a single intravenous administration.
*Relative concentration=(Radioactivity in tissues/Weight of tissues at sacrifice)/(Radioactivity of mice administered/Weight of mice at administration).

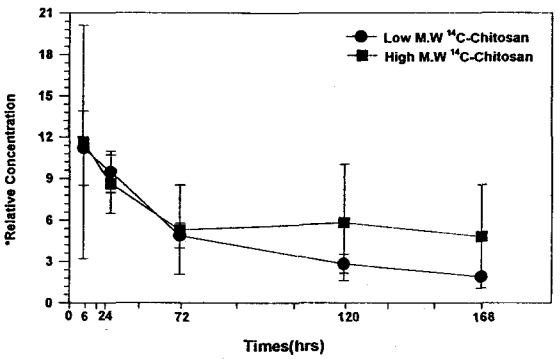

Fig. 3. Distribution of low and high molecular weight of ^{14}C-chitosan in the kidney of mice after a single intravenous administration.
*Relative concentration=(Radioactivity in tissues/Weight of tissues at sacrifice)/(Radioactivity of mice administered/ Weight of mice at administration).

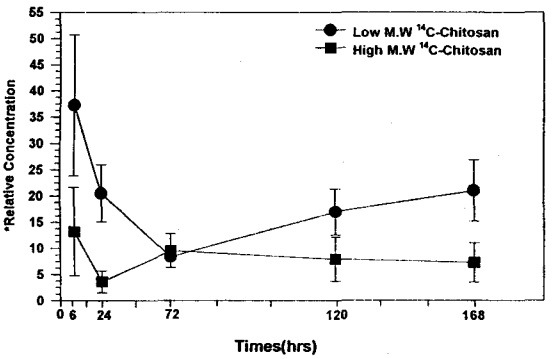

Fig. 4. Distribution of low and high molecular weight of ^{14}C-chitosan in the spleen of mice after a single intravenous administration.
*Relative concentration=(Radioactivity in tissues/Weight of tissues at sacrifice)/(Radioactivity of mice administered/Weight of mice at administration).

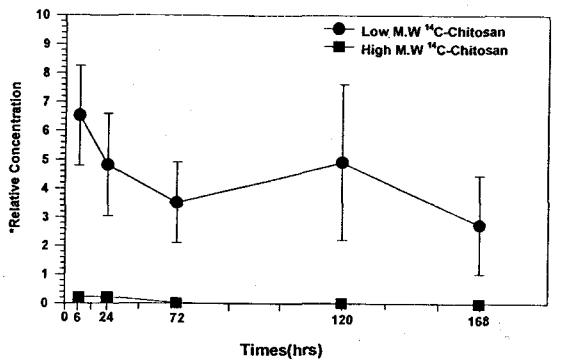

Fig. 5. Retention level of chitosans in the blood of mice after a single intravenously administration of ^{14}C-chitosans with different molecular weights.
*Relative concentration=(Radioactivity in tissues/Weight of tissues at sacrifice)/(Radioactivity of mice administered/Weight of mice at administration).

내 조직별 대사과정이 훨씬 빠르게 진행되었고 오줌을 통한 체외배설도 고분자에 비해서 빠르게 이루어짐을 관찰하였다.

키토산은 게나 새우 등의 외골격 구성물질인 키틴의 탈아세틸화 반응을 통해서 얻어진 물질로 유전적 독성이 없는 것으로 알려져 왔다. 최근 키토산을 이용한 국내.외 학자들에 의해서 분자생물학, 식품영양학, 생화학, 생리학, 생명공학적인 면에서 연구가 진행중이며, 일본등지에서는 인공피부, 항암작용, 상처치료제, 키틴분해효소 및 식물세포의 활성화제, 화장품, 혈중 콜레스테롤 강화제, 의약품 전달계, 면역보조제 등 여러 분야에 걸쳐 활발하게 이용 혹은 연구되고 있다[14~19]. 또한, 방사성동위원소 및 2가 중금속 양이온에 대한 착화능이 우수한데[20, 21], 특히, 방사성스트론튬에 오염된 마우스에 키토산을 장기간 분말상태로 먹이

거나 수용성키토산을 투여하면 방사성스트론튬의 체외배출 및 골조직 침착을 억제시키고, 임신중 방사성스트론튬에 오염된 어미에서 태어난 마우스 어린 새끼로의 전이를 억제시킬 수 있다고 보고되었다[3~5]. 하지만, 방사표지된 C-14 chitosan을 이용한 분자량 차이에 따른 키토산의 체내흡수 및 체외배출에 관한 연구는 이루어지지 않고 있다.

본 연구에서는 C-14 chitosan의 분자량 차이에 따른 체내 대사를 관찰하기 위하여 ICR계 웅성마우스(8-10주령,체중 30-35g)를 사용하여 꼬리정맥을 통한 정맥투여로 0.3㎖를 각각 투여하였고 투여후 6시간, 24시간, 72시간, 120시간, 168시간 간격으로 마우스를 희생시켜 혈액, 간, 신장, 비장, 심장, 폐, 근육, 고환, 오줌 등을 각각 채취하여 조직별 상대농도를 구하였다. 저분자 C-14 chitosan이나 고분자 C-14 chitosan 모두 다 간, 신장, 비장 등에서 다른 조직에 비해 상대적으로 높은 C-14 chitosan 분포를 나타내었고, 시간의 경과에 따라 각 조직간의 상대농도는 감소함을 알 수 있었다. 김 등[22]은 마우스에 구강과 정맥주사를 통해 저분자 C-14 chitosan을 투여하였을 경우 투여경로에 상관없이 간, 신장, 비장 등에서 다른 장기에 비해 상대농도가 높게 나왔고, C-14 chitosan을 경구 투여한 경우는 거의 대부분이 흡수되어 빠른 시간내에 오줌으로 체외 배출되며, 정맥 투여한 경우는 대부분이 오줌을 통해 체외 배설되었다. 또한, 경구 및 정맥 투여한 경우 모두 비슷한 체내분포를 나타내었으며 주요 대사 장기는 간과 신장이었다고 보고하였다. 그리고, Nishimura 등[13, 23]은 서로 다른 임신일 수를 가진 쥐에 구강을 통해 C-14 chitosan을 투여하면 투여 선량의 일부가 모체의 태반을 통해 태아로 전이되며 모체의 경우 간, 신장등에 상대적으로 높은 선량이 분포하고, 쥐를 가지고 C-14 chitosan을 단독 구강투여한 후 6시간째에 위장관 조직 및 간, 신장, 비장, 췌장, 폐등에서 각 조직간 상대농도가 높은 분포를 나타낸 것과 비교할 때 본 실험에 사용한 마우스에서도 거의 일치한 결과를 관찰하여 실험동물간의 체내분포에서도 별다른 차이점을 발견하지 못하였다. 위의 실험 결과는 분자량이 다른 키토산을 정맥 투여한 본 실험에서도 간, 신장등에서 높은 선량 분포를 나타내어 일치하는 경향을 관찰하였다. 하지만, 저분자 C-14 chitosan의 경우 6시간째에 다량의 투여 선량이 오줌을 통해 체외로 배출된 반면 고분자 C-14 chitosan은 저분자 C-14 chitosan에 비해 상대적으로 적은 선량이 오줌을 통해 체외로 배설되었다. 이는 신장의 사구체을 통해 저분자의 경우 분자량이 적어 쉽게 통과할 수 있지만, 고분자는 분자량이 신장의 사구체를 통과할 수 있는 분자량보다 훨씬 커서 통과를 하지 못하고 다시 순환계를 통해 체내에서 순환이 이루어지기 때문이라고 생각한다. 위의 결과를 통해서 볼 때 키토산이 체내에 들어온 방사성 동위원소 혹은 중금속이온등과 착화물을 형성하여 체외로 배출시 고분자의 경우 쉽게 체외배출이 이루어지지 않으므로 저분자 키토산을 사용하는 것이 효과적일 것으로 사료된다. Tokura 등[17]은 I-125 방사표지된 CM-chitin을 마우스에 피하 주사하면 위장관 조직에서 다량의 투여 선량이 관찰되었고, 그 다음으로 간, 신장등에서 높은 농도를 보였으나, 특별한 축적 장기는 관찰되지 않았다고 보고하였다. 본 실험의 결과와 비교해 볼 때 키틴과 키토산의 체내대사 과정은 거의 일치하는 경향을 알 수 있다. 또한, Hirano 등[24]은 토끼, 닭에게 키틴, 키토산을 먹인 결과 토끼는 약 35~85%, 닭은 89~98% 소화가 이루어짐을 보고하였는데, 본 실험의 결과 일부 장기가 상대적으로 처음에 높은 수치를 나타내었다가 시간의 경과에 따라 감소하였고, 특정한 축적 장기 없이 극히 적은 선량만이 체내에 잔존하는 것으로 사료된다.

본 실험을 통해 키토산은 분자량에 상관없이 체내에 분포 하는 장기는 거의 비슷한 경향을 나타내고 체외배출 효과에서는 저분자 키토산이 빨리 빠져나옴을 알 수 있었다. 하지만, 고분자 키토산이 체내에서 어떤 효소작용에 의해 분자 구조가 바뀌는 가와 그에 따른 분해산물 및 키토산의 체내 흡수율을 증가시키는 방안에 대한 더 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

결론적으로, 정맥투여한 키토산은 대부분이 오줌을 통해 체외배출 되고, 체내 장기중의 분포 경향은 비슷하였으며, 체내 조직별 대사는 저분자가 고분자에 비해 훨씬 더 빠르게 진행됨을 알 수 있었다.

참고문헌

1. K.Arai, T.Kinumaki and T.Fujita, "Toxicity of chitosan." *Bull Tokai Reg Fish. Tes. Lab,* **337**, 89-94(1968).
2. K.Y.Kim, H.S.Bom, C.S.Oh, H.C.Lee, R.D.Park, H.K.Kim, Y.H.Kim, K.H.Choi, K.M.Chae and J.Y.Kim, "Genetic toxicity of chitosan and EDTA in mice" , Paper presented at the 10th Symp. on Chitin and chitosan, 8-9 June, Univ. of Hokkaido, Japan(1996).

3. 범희승, 김지열, 김광윤, 양광희, 채기문, 최근희, 송호천, "카이토산을 이용한 방사 성스트론튬 오염의 치료." 대한방사선방어학회지, **19**(3), 222-228(1994).
4. Y.H..Kim, Y.B.Roh, K.Y.Kim, H.S.Bom, and J.Y.Kim, "Reducing Fetal Contamination of Radiostrontium by Water Soluble Chitosan." *Kor J Biol Sci*, 1(2),337-340(1997).
5. 김영호, 범희승, 김지열, 노영복, "마우스에서 칼슘 및 Chitosan metabolism이 방사성스트론튬의 체외배출에 미치는 영향," 대한방사선방어학회지, **22**(1),9-14(1997).
6. R.Maruca, B.Josuder and J.P.Wightman, "Interaction of Heavy Metals with Chitin and Chitosan." *J Applied Polymer Scie*, **27**, 4827-4837(1982).
7. Y.Iwakura, T.Sannan, "Binding of Metal Cations." *J Applied Polymer Scie*, **23**, 511-515(1979).
8. P.Tong, Y.Baba, Y.Adachi and K.Kawazu, "Adorption of metal ions on a new chelating ion-exchange resin chemically derived from chitosan." *Chem letters*, 1529-1532(1991).
9. R.A.A.Muzzarelli, O.Tubertini, "Chitin and chitosan as chromatographic supports and adsorbents for collection of metal ions from organic and aqueous sollution and sea water." *Talanta*, **16**,1571-1577(1969).
10. H.K.Kim, D.SJoo, J.S.Lee, J.J.Park, H.E.Lee, B.M.Lee, K.Y.Kim, H.S.Bom, Y.H. Kim, J.Y.Kim and J.M.Kim, "The absorption effects of the radioactive isotopes (Sr-85, Hg-203, Fe-59) by the difference of molecular weight of phosphated chitosans", Paper presented at the 10th Symp. on Chitin and chitosan, 8-9 June, Univ. of Hokkaido, Japan(1996).
11. K.Shimahara, "Some novel methods for production of chitin and chitosan." *Chitin Chitosan Res*, 191-196(1991).
12. J.Molano, A.Duran and E.Cabib, "A rapid and sensitive assay for chitinase using tritiated chitin." *Anal Biochem*, **83**(2),648-656 (1977).
13. Y.Nishimura, Y.Watanabe, J.M.Hong, H.Takeda, M.Wada and M.Yukawa, "Intestinal Absorption of ^{14}C-chitosan in Rats." *Chitin Chitosan Res*, **3**(2),55-61(1997).
14. D.Koga, "Induction of chitinase for plant self-defense", Paper presented at the 7th Symp. on Chitin and chitosan, 15-16 May, Sandai, Japan(1993).
15. M.Sugano, S.Watanabe, A.Kishi, M. Izume and A. Ohtakara, "Hypocholestero lemic action of chitosan with different viscosity in rats," *Lipid*, **23**, 187-191(1988).
16. S.M.Hirano, K.Iwata, H.Nakayama and H. Toda, "Enhancement of serum lysozy me activity by injecting a mixture of chitosan oligosaccharides intravenously in rabbit," *Agric Biol Chem*, **55**, 2623-2625(1991).
17. S.Tokura, Y.Miura, Y.Kaneda and Y.Uraki, "Drug delivery system using biodegradable carrier," *Chitin Chitosan Res*, 314-324(1992).
18. G.Skjak, T.Anthonsen and P.Sandford, "Chitin and chitosan : sources, chemistry, biochemistry, physical properties and application" Elsevier applied science. 1988.
19. 長洋隆, キチン、キトサンの *應用*, 技報堂出版, 日本(1990).
20. A.Ortega, M.Gomez, "The removal of strontium from the mouse by chelating agents." *Arch. Environ. Contam. Toxicol*, **18**, 612-616(1989).
21. R.A.A.Muzzarelli, "Chitosan the collection from seawater of naturally occurring zinc, cadmium, lead and copper." *Talanta*, **18**,853-858(1971).
22. 김영호, 범희승, 김광윤, 김지열, 요시카즈 니시무라, "마우스에서 경구 및 비경구투여 ^{14}C-chitosan의 체내 분포에 관한 연구", Paper presented at the proceeding of the Korean Association for Radiation Protection, 7-8 November, Kyungju, Korea(1997)
23. Y.Nishimura, Y.Watanabe, M.Yukawa, M. Wada and Y.H.Kim "Placental transfer of ^{14}C-chitosan in Rats", Paper presented at the 11th Symp. on Chitin and chitosan, 5-6 June, Shigioka, Japan(1997).
24. S.C.Hirano, H.Itakura, H.Seino and Y. Akiyama, "Chitosan as an ingredient for domestric animal feeds." *Agric Food Chem*, **38**, 1214-1217(1990).