

키토산 올리고당 유도체의 베지클 형성에 관한 연구

하병조*, 박성규

*서울보건대학 미용예술과, 태평양기술연구원

A Study on the Formation of Vesicle by Chitosan Oligosaccharide Derivative

Byung-Jo Ha*, Seong-Kyu Park

*Dept. of Beauty Art, Seoul Health College, Sungnam, Kyounggi 461-250, Korea

Pacific R&D Center, Yongin, Kyounggi 449-900, Korea

요 약

계 껍질에서 얻어진 키토산에 아질산나트륨을 가한 후 수산화붕소산 나트륨으로 환원시켜 중합도 2~3인 2,5-anhydro-D-mannitol의 말단기를 갖는 키토산 올리고당을 합성하였다. 염화팔미틴산을 DMAP 촉매하에서 키토산 올리고당과 반응시켜 키토산 올리고당에 세 개의 아실기가 결합된 키토산 올리고당 유도체를 얻었으며, 이를 다시 수산화칼륨으로 가수분해하여 N-팔미토일 키토산 올리고당을 합성하였다. 최종적으로 수용액에 분산시킨 후 초음파를 가한 후 형성된 베지클을 TEM 을 이용하여 확인할 수 있었다.

서 론

키토산은 생체 적합성이 우수하고 독성이 적을 뿐 아니라 비교적 값싸게 얻을 수 있어 미국, 일본 등에서는 의료용 및 화장품용 신소재, 약물 전달체의 용도로 연구가 활발히 진행되고 있다[1-2]. 키토산의 생체 친화성을 이용한 연구는 점점 그 범위를 확대해 나가고 있으며 효소의 고정화 또는 미생물 배양을 위한 지지체, 약물의 목표 지향성을 위한 지능성 전달체에 대한 연구 또한 활발히 진행되고 있다[3-5]. 한편, 키토산은 질병에 대

한 면역성 및 저항성을 향상시켜줄 뿐만 아니라 암에 대한 저항력 및 콜레스테롤 저하능까지 알려져 건강 보조식품으로도 개발되고 있다. 그러나 키토산의 분자량이 높을 경우 체내 흡수와 용해성이 나쁘기 때문에 키토산 올리고당이 대부분 이용되고 있다.

한편, 하나의 친수성 머리부분에 두 개의 소수성 꼬리가 결합된 물질을 수용액에 분산시켰을 때 이중막(bilayer)이 있는 작은 폐쇄형 소포체를 형성하게 되는데 이를 베지클(vesicle)이라 부른다. 특히 베지클 중에서 인지질로 형성된 것을 리포솜(liposome)이라 한다. 즉, 리포솜은 인지질의 이중막으로 구성된 작은 소포체를 의미한다. 리포솜의 리포(lipo)란 지질을 의미하는 말로 이는 화학적으로 보면 하나의 친수성기에 두 개의 친유성기를 가지고 있는 것으로 자발적으로 이중층의 특수한 형태를 갖는 것을 의미한다[6-7]. 베지클을 형성할 수 있는 분자구조는 대부분 두 개의 알킬 사슬로 된 소수성 부분과 하나의 친수성 부분으로 된 것이 대부분이다[8-9]. Critical packing parameter(CPP)는 베지클을 형성하는 물질의 구조의 크기와 모양을 예측하기 위해 고안된 것으로 주어진 물질에 대하여 필요한 파라미터(parameter)를 이용하면 베지클 형성을 추측할 수 있다[10-11]. 또한 베지클의 형성을 열역학적으로 고찰해 볼 때, 지질 부분이 이중층을 형성하게 되면 둘러싸고 있는 물분자의 엔트로피(entropy)가 증가하게 되고 전체 계의 자유에너지가 감소하여 형성된 베지클을 안정하게 유지시키는 결과가 된다.

이와 같은 베지클은 세포막의 모델 연구에 기초가 될 뿐만 아니라 화장품이나 의약품 분야에서 특정 유효성분의 전달체로도 응용이 가능하여 베지클에 여러 가지 생리활성 물질을 봉입하여 지속적으로 방출하게 하거나 특정부위에 효율적으로 도달하게 하는 목적으로 이용되고 있다[12-13].

이에 본 연구에서는 생체 친화성이 우수한 키토산 올리고당을 친수성기로 하고, 여기에 두 개의 소수성기를 결합한 새로운 N-팔미토일 키토산 올리고당을 합성하고 이에 대한 베지클 형성의 가능성을 살펴보고자 하였다.

실 험

1. 기기 및 시약

IR 분석은 Bomem사의 FT-IR (model MB-100) 및 Jasco사의 FT-IR (model FT/IR-200)을 사용하여 수행하였다. NMR분석에는 Jeol사 300-MHz FT-NMR (model JNM-LA300)을 사용하였다. UV 스펙트럼은 Beckmann사의 DU-65 Spectrophotometer와 Hewlett Pakard사의 UV/Vis Spectrophotometer를 이용하였다. TEM분석은 Jeol사의

JEM-200CX 전자현미경을 사용하였고, 초음파기는 Heat System사의 W-35 Microtip Sonicator을 사용하였다.

키토산(평균 분자량 82만)은 일본 동경화학에서 구입한 것을 사용하였고, 염화팔미틴산, DMAP, MBTH등은 Aldrich사의 것을 사용하였다. Fluka사의 수산화붕소산나트륨, Hayashi사의 아질산나트륨, Merck사의 TLC plate (Silica gel 60 F₂₅₄)를 사용하여 크로마토그래피 분석을 실시하였다.

2. 분석 방법

2.1. 얇은막 크로마토그래피 분석

TLC 흡착제는 Merck사의 Silica gel 60 F₂₅₄를 사용하였으며, 전개 용매를 사용하여 전개를 마친 후 UV lamp를 이용하여 물질의 위치를 확인하거나, 요오드 혹은 아니스알데히드(anisaldehyde)로 발색시켜 물질의 위치를 확인하였다.

2.2. MBTH법[14-15]

아질산나트륨과 키토산과의 반응 용액 0.1ml를 취한 다음 여기에 12.5% 황산암모늄 1ml를 첨가하고 교반시켰다. 5분 후 0.5% MBTH 용액 1 ml를 첨가하고 1 시간 동안 반응시켰다. 여기에 다시 0.5% MBTH 1ml에 0.5% 염화철 용액 1ml가 첨가된 혼합용액을 넣고 30분간 방치 후 10배로 희석하고 653nm에서의 흡광도 변화를 관찰하였다.

2.3. 중합도 분석

키토산 올리고당의 평균 분자량을 측정하기 위하여 겔 투과 크로마토그래피를 수행하였다. 표준물질로 99% 이상의 순도를 가진 폴리에틸렌글리콜(분자량 6000, 4450, 1500, 970, 600; 420)을 사용하였다. 이때 사용한 컬럼은 OHPak KB-802, 803 (8 mm ID x 300 mm, GPC column)이었고, 컬럼의 온도는 40℃를 유지하였다. 용출액은 0.1M NaNO₃를 사용하였고, 유속은 분당 1 ml를 유지하였다. ELSD (model Sedex 55, Sedere) 검출기를 사용하였고 25℃, 2.1 bar를 유지하였다.

2.4 TEM 분석

N-팔미토일 키토산 올리고당을 Tris-HCl 완충용액 (pH 7.5)에서 초음파로 처리하여 리포솜을 형성케 하고 0.45 μm millipore 여과지를 이용하여 맑은 용액을 얻었다. 여과된 용액을 스포이드로 소량 취하여 여과지 위에 grid를 올려놓고 한 방울 적가하였다. 30분 정

도 공기 중에서 건조한 후 2% 암모늄몰리브덴 용액을 한 방울 적가하여 stanning하였다. 공기 중에서 12 시간 건조시킨 후 TEM으로 확인하였다.

3. N-팔미토일 키토산 올리고당의 합성[16]

3.1 키토산 올리고당의 제조

키토산 (탈아세틸화도 87%) 30g을 10% 아세트산 용액 300ml에 녹인 후 여과하였다. 여과된 용액의 기포를 제거하기 위해 하루 동안 냉장고에 보관 한 후 ice bath를 장치하고 10% 아질산나트륨 수용액 26ml를 서서히 적가 하였다. 2~5℃를 유지하면서 5 시간 동안 교반 시킨 후 28% 암모니아수로 pH를 7이 되도록 하여 중화시켰다. 여기에 다시 수소화붕소산 나트륨 5.35g을 가하여 환원반응을 진행하였다. 수소화붕소산 나트륨의 첨가는 기포가 발생하지 않도록 30분에 걸쳐 조심스럽게 수행하였다. 계속적으로 교반을 진행하면서 반응의 종결여부는 MBTH법에 의해 추적하였다. 약 12시간 동안 교반 후 반응을 종결하였다. 반응이 끝난 후 용액의 3배에 해당하는 메탄올에 침적시켜 침전물을 제거하고, 다시 2배에 해당하는 메탄올에 침적시켜 약 2.5 g의 키토산 올리고당을 얻었다. 키토산 올리고당 1g을 3구 둥근 플라스크에 넣고 48% 수산화나트륨 수용액 50ml에 넣고 질소 분위기에서 5 시간 동안 환류 교반시켰다. 감압 회전증발을 통해 반응 용액을 초기 부피의 절반 정도로 농축시킨 후 과량의 아세톤에 침적하였다. 침전물을 수득하고 이를 메탄올, 에탄올 순으로 세척하고 진공 건조하여 약 0.3g의 탈아세틸화 키토산 올리고당을 얻었다.

3.2. N-팔미토일 키토산 올리고당의 합성

3구 둥근 플라스크에 키토산 올리고당 0.2g과 DMAP 2.3g을 넣고 정제된 클로로포름 10ml를 가한 후 환류 교반하였다. 염화팔미틴산 4.3 ml를 정제한 클로로포름 10ml에 녹인 후 환류하에 30분 동안 적가 하였다. 염화팔미틴산이 들어가면서 용액의 색깔은 약한 오렌지색을 나타내었고 시간이 경과할수록 점점 검붉게 변했다. 24 시간 후에 DMAP 2.3g, 염화팔미틴산 4.3ml를 추가로 더 넣어 반응을 계속 진행하였다. 70 시간 교반 후 반응을 종결하고 과량의 초순수 에탄올에 침적하여 흰색 고체를 얻었다. 흰색 고체 0.65g을 다시 클로로포름 20ml에 녹였다. 수산화칼륨 0.046g을 에탄올 1 ml에 녹인 후 1시간에 걸쳐 적가한 후 4 시간 동안 환류하에서 교반하였다. 반응이 종결된 후 2.5M HCl 1 ml를 가해 산성화하였다. 감압 회전증발기를 사용하여 클로로포름, 에탄올을 제거하여 흰색의 고체가 생성되었다. 클로로포름을 가하고 온도를 높여 녹지 않는 염을 제거하고 다시 감압

회전 증발한 후 정제한 디에틸에테르를 가하여 침전을 형성한 후 여과하여 팔미틴산을 제거하여 생성물과 미반응 물질의 혼합물을 얻었다. 상온에서 생성물이 클로로포름에 녹지 않는 성질을 이용하여 분별 용해시킨 후 여과하여 최종적으로 N-팔미토일 키토산 올리고당 0.17g을 얻었다.

TLC (R_f 0.48, n-hexane/ethyl acetate=4:1), 녹는점 70~75°C, IR(KBr) 3440(w), 2960(m), 2920(s), 2850(s), 1665(s), 1470(s), 1220(m), NMR ($CDCl_3$) δ 0.88(t), 1.26(s), 1.63~1.78(m), 2.13~2.55(m), 3.5~6.5(m)

4. 리포좀 형성

N-팔미토일 키토산 올리고당 20mg을 Tris-buffer (pH 7.5, 50mM) 5ml에 넣고, 30분간 bath sonicator를 이용하여 현탁시켰다. 현탁시킨 용액을 Microtip sonicator (Ultrasonicator, power level 3)을 이용하여 1시간 정도 초음파 처리하였다.

결과 및 고찰

탈아세틸화도 87%인 키토산을 산성 용액상에서 아질산나트륨에 의해 산화적 탈아민화 반응을 일으켜 알데히드 말단을 갖는 키토산 올리고당을 얻었고, 이를 수소화붕소산 나트륨으로 환원시켜 최종적으로 히드록시기 말단의 키토산 올리고당을 제조하였다. 이때 알데히드의 환원여부는 MBTH법으로 추적하였다. 자외선 분광스펙트럼을 통한 분석결과 658nm 최대 흡수피크의 소멸로부터 환원의 여부를 확인 할 수 있었다. 얻어진 올리고당을 겔 투과 크로마토그래피를 통해 평균 분자량을 측정한 결과 분자량이 500 부근으로 이는 평균 중합도 2~3에 해당하는 것임을 알 수 있었다. 키토산 올리고당으로부터 N-팔미토일, O-팔미토일 키토산 올리고당의 합성 경로를 Scheme 1에 나타내었다.

합성 반응의 촉매로 DMAP를 사용하였으며 아실화 반응을 실시한 후 IR을 분석한 결과 2920 cm^{-1} 과 2850 cm^{-1} 에서 아실기의 C-H stretching 피이크, 720 cm^{-1} 에서 C-H bending 피이크, 1650 cm^{-1} 에서 amide 결합에 의한 피이크, 1760 cm^{-1} 에서 ester 결합에 의한 피이크를 확인할 수 있었다(Fig. 1)

리포좀을 형성할 수 있는 구조로 전환하기 위한 목적으로 N-팔미토일, O-팔미토일 키토산 올리고당에서 선택적으로 O-팔미토일기를 제거해야 했다. 이를 위해 친핵체로 쉽게 이용할 수 있는 수산화칼륨을 사용했다. N-팔미토일, O-팔미토일 키토산 올리고당은 할로젠을 포함한 용매에서 녹는 성질을 보여 용매는 클로로포름을 사용하였고 수산화칼륨

을 정제한 에탄올에 녹여 균일상으로 만들었다. 이러한 반응조건하에서 4 시간 만에 에스테르는 가수분해되어 제거되는 것을 IR 스펙트럼을 통하여 확인할 수 있었다 (Fig. 2, Fig 3). 얻어진 N-팔미토일 키토산 올리고당은 클로로포름에 대한 용해성이 좋지 않았으며 클로로포름에서 가열해야 녹았다. NMR 스펙트럼에서는 아실기의 수소에 기인하는 $-CH_2-$ 의 피이크를 확인할 수 있었지만 피라노오즈의 수소에 기인하는 피이크는 매우 낮게 나타났는데, 이는 아실기의 수소에 비해 상대적으로 피이크의 세기가 약해졌기 때문으로 생각할 수 있다 (Fig. 3).

한편 키토산 올리고당의 중합도가 1인 경우 리포솜을 형성할 수 있는 두 개의 소수성 사슬의 구조가 성립되기 어렵지만 키토산 올리고당의 중합도가 2 이상인 경우는 아마이드 결합에 의해 두 개 또는 세 개의 소수성 사슬이 결합할 수 있게 되므로 리포솜의 형성을 가능케하는 구조를 이룰 수 있다.

리포솜을 만들기 위한 방법으로 초음파를 이용하였다. 이때 bath 형태의 sonicator와 probe 형태의 sonicator를 이용하는 방법이 있는데, bath sonicator는 작은 크기의 vesicle을 형성하게 하지만 다양한 크기의 리포솜을 얻을 수 있다. 반면 probe형태의 sonicator는 균일한 크기의 리포솜을 형성시키지만 금속 팁에 의해 오염이 일어날 수 있는 단점이 있다.

리포솜의 형성을 위해 N-팔미토일 키토산 올리고당을 Tris-HCl 완충용액에 4~5mM 농도로 bath sonicator를 사용하여 분산하였다. 분산된 용액을 마이크로 팁 sonicator를 이용하여 다시 1 시간 동안 초음파를 가하여 리포솜을 형성하였다. 형성된 리포솜을 TEM을 이용하여 확인하였다. 확인결과 리포솜은 직경 20~150nm에 이르는 다양한 크기를 나타내었으며 이중층의 두께는 5~20nm로 추정되었다 (Fig. 4). 본 연구에서 중합도 2~3인 키토산 올리고당을 위주로 하여 합성한 N,N-디팔미토일 키토산 올리고당은 CPP 값이 0.5~1 이며 이중층의 베지클을 형성할 수 있음이 확인되었다(10).

결 론

평균 분자량 82만인 키토산을 아질산나트륨을 이용한 분절반응으로 평균 중합도 2~3인 키토산 올리고당을 제조하였고, 말단에 생긴 알데히드는 수소화붕소산나트륨으로 수산기로 전환하였다. 이를 DMAP촉매하에 염화팔미틴산과 반응시켜 N-팔미토일,O-팔미토일 키토산 올리고당을 얻었으며, 이를 알칼리 가수분해하여 두 개의 소수성기와 한 개의 친수성기를 갖는 N-팔미토일 키토산 올리고당을 얻을 수 있었다. 얻어진 N-팔미토일 키

토산 올리고당을 수용액상에서 초음파를 처리하였으며, TEM을 통하여 리포솜이 형성되었음을 확인할 수 있었다.

ABSTRACT

Chitosan oligosaccharide with an average degree of polymerization 2-3 was prepared by degradation reaction using sodium nitrite, and the resulting aldehyde group was reduced to hydroxy group. N-palmitoyl, O-palmitoyl chitosan oligosaccharide was obtained from the reaction between palmitoyl chloride and oligosaccharide under DMAP catalyst. Alkaline hydrolysis was carried out to remove the O-palmitoyl group. After dispersion and ultrasonication in aqueous solution, N-palmitoyl chitosan oligosaccharide gives vesicle structure. Its structure and size was analyzed by TEM.

참고 문헌

1. C. J. Brine, P. A. Sandford, and J. P. Zikakis, "Advances in Chitin and Chitosan", Elsevier Applied Science, New York, 1992.
2. S. Tokura, K. Itoyama, N.Nishi, S.I. Nishimura, I. Saiki, and I. Azuma, *Pure Appl. Chem.*, A31, 1701(1994).
3. A. R. Alcantara, M. H. Gil, A. J. Guiomar, M. T. L. Belmonte, M. C. M. Sobral, C. Torres, and J. V. Sinisterra, *J. Mol. Catalysis A: Chemical*, 101, 255(1995).
4. Z. Aydin and J. Akbuga, *Int. J. Pharm.*, 131, 101(1996).
5. M. I. G. Siso, E. Lang, B. Carreno-Gomez, M. Becerra, F. O. Espinar, and J. B. Mendez, *Process Biochemistry*, 32(3), 211(1997).
6. G. Ceve, "Liposome Technology", G. Gregoriadis Ed.: 2nd Ed., CRC press, Vol 1, New York, 1992
7. M. J. Ostro, "Liposome", CRC press, New York, 1983
8. A. L. Lehninger, D. L. Nelson, and M. M. Cox, "Principles of Biochemistry", 2nd Ed., Worth Publishers, 1993
9. A. T. Florence, "Liposome Technology", G. Gregoriadis Ed., 2nd Ed., CRC press, Vol 1, 1992

10. J. N. Israelachvili, S. Marcelja, and R. G. Horn, *Quarterly Reviews of Biophysics*, 13(2), 121(1980).
11. C. Tanford, *J. Phy. Chem.*, 76(21), 3020(1972).
12. S. Nojima, J. Sunamoto, and K. Inoue, "The Liposomes", Namkangdang, 1988
13. G. Gregoriadis, "Liposome Technology", 2nd Ed., Vol 21, CRC press, 1992
14. A. Tsuji, T. Kinoshita, and M. Hoshino, *Chem. Pharm. Bull.*, 17, 1505(1969).
15. E. Sawicki, H. R. Hauser, T. W. Stanley, and W. Elbert, *Anal. Chem.*, 33, 93(1961).
16. O. S. Lee, B. J. Ha, J. O. Kim, S. K. Park, and Y. S. Lee, *J. Kor. Ind & Eng. Chem.*, 8(3), 365(1997).

Legends

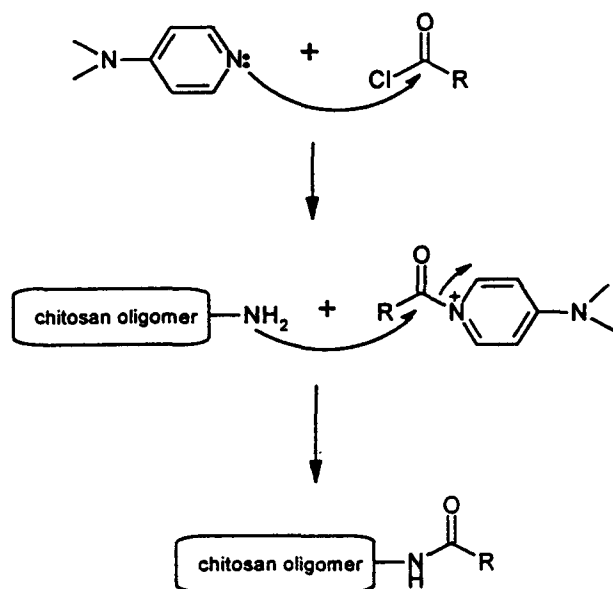
Scheme 1. The reaction mechanism of chitosan oligosaccharide under DMAP catalyst

Fig. 1. The change of IR spectrum of N-palmitoyl, O-palmitoyl chitosan oligosaccharide during hydrolysis. (above: before hydrolysis, under: after 3 hr)

Fig. 2. IR spectrum of N-palmitoyl chitosan oligosaccharide.

Fig. 3. NMR spectrum of N-palmitoyl chitosan oligosaccharide.

Fig. 4. TEM picture of vesicle formed by N-palmitoyl chitosan oligosaccharide.
(x100,000)



Scheme 1. The reaction mechanism of chitosan oligosaccharide under DMAP catalyst

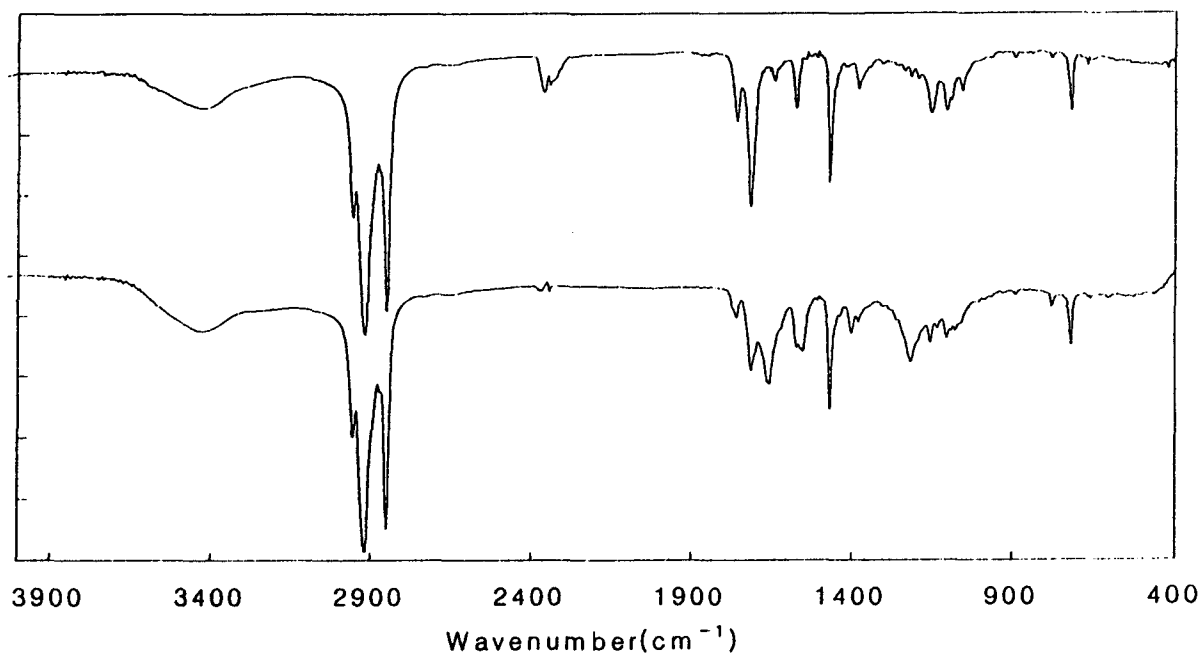


Fig. 1. The change of IR spectrum of N-palmitoyl, O-palmitoyl chitosan oligosaccharide during hydrolysis. (above: before hydrolysis, under: after 3 hr)

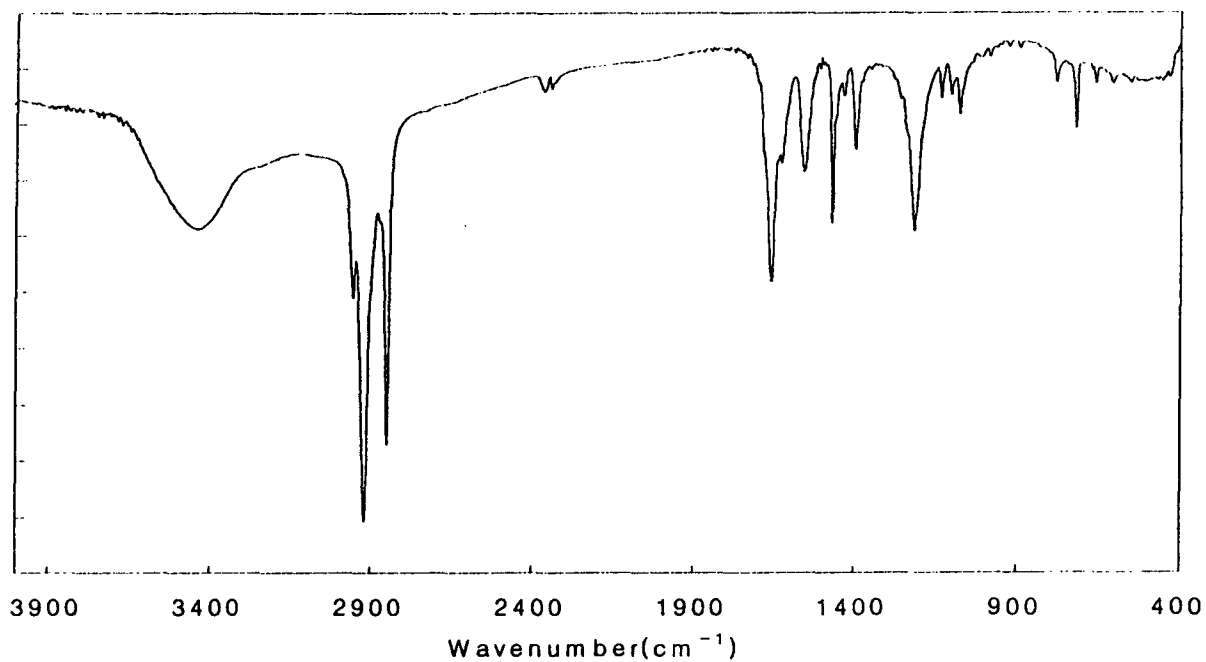


Fig. 2. IR spectrum of N-palmitoyl chitosan oligosaccharide

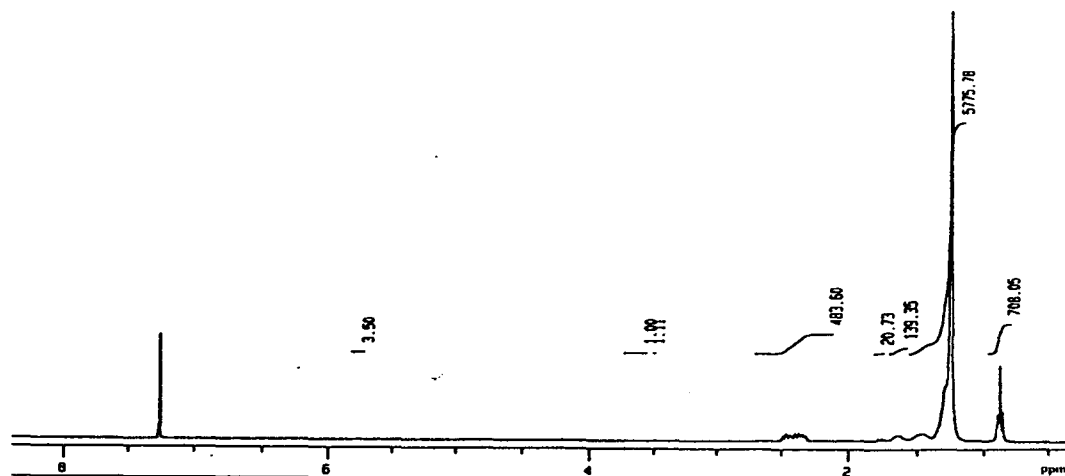


Fig. 3. NMR spectrum of N-palmitoyl chitosan oligosaccharide

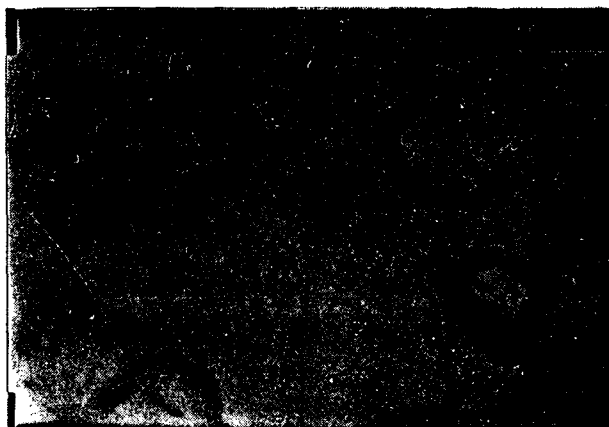


Fig. 4. TEM picture of vesicle formed by N-palmitoyl chitosan oligosaccharide
(x100,000)