

Carboxymethyl-chitin 제조공정의 단순화

韓相文* · 安柄齊[†] · 金容愚[‡] · 金容範[‡] · 柳國鉉[†] · 李承晉

이화여자대학교 약학대학 약학과

[†]동국대학교 이과대학 화학과

[‡]C&C Science 주식회사

[§]키틴키토산연구소

(2001. 3. 6 접수)

The Novel Synthesis of Carboxymethyl-chitin by a New Process

Sang-Mun Han^{*}, Byung-Je Ahn[†], Yong-Woo Kim[‡], Yong-Beom Kim[‡],
Kook-Hyun Yu[§], and Seung-Jin Lee

Department of Industrial Pharmacy, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea

[†]Department of Chemistry, Dongguk University, Seoul 100-715, Korea

[‡]C&C Science Co., Ltd., Seoul 131-205, Korea

[§]Dr. Y. B. Kim's Chitin and Chitosan Research Center, Seoul 135-090, Korea

(Received March 6, 2001)

요 약. CM-chitin은 화장품 분야에서 보습제, 유연제, 피부관리를 위한 세포활성제 및 미백제 등으로 다양하게 이용되고 있는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 CM-chitin 제조공정을 기존의 방법에서 몇가지 절차를 배제하여 단순화 하였다. Chitin분말을 NaOH와 혼합하고 16 hrs 동안 동결 및 교반을 통해 $\text{ClCH}_2\text{COONa}$ 와 isopropyl alcohol 혼합액을 첨가하였다. 그 결과 높은 치환도의 CM-chitin을 얻을 수 있었다.

ABSTRACT. The water soluble carboxymethyl-chitin (CM-chitin) has been well known to be very useful to the cosmetic field as a moisturizer, a smoothener, a cell activator and a cleaner for face skin conditioning. In this study, the preparation process of CM-chitin was simplified with elimination of some procedures in the conventional method. The chitin powder was mixed with sodium hydroxide solution. And then a mixture of sodium monochloroacetate (or monochloroacetic acid) and isopropyl alcohol (or a mixed solution with water and isopropyl alcohol) was added to thorough the agitation and the freezing during 16 hours. The CM-chitin with a high degree of substitution by the improved process was obtained.

서 론

현대사회가 점차 고령화 되고 정보화, 개인화, 세분화 됨에 따라 화장품의 기능도 과거의 피부 보습 및 보호의 차원에 덧붙여서 피부 노화의 지연과 미백은 물론 아로마테라피에 이르기까지 다양한 효능과 효과를 함께 요구하고 있다.¹ 이와같은 기능을 극대화하기 위하여 다당류의 화학적 수식 또는 천연물로부터 분리 추출하는 방법들이 행하여지고 있다. 미생물로부터 생산되는 hyaluronic acid와 carboxymethyl-chitin(CM-chitin)²

이 개발되어 화장품업계에서 대량으로 사용되고 있다. Hyaluronic acid는 glucuronic acid와 N-acetylglucosamine이 결합된 다당류로 화장품의 기초 원료로써 응용되고 있다. CM-chitin은 게껍질로부터 추출되는 chitin에 hydrophilic의 관능기인 carboxymethyl기를 도입하여 제조한다. 이렇게 제조된 CM-chitin은 화장품의 기초원료로서의 여러가지 기능을 지니게 되는데, 물을 보유하는 강력한 보수성과 점탄성을 가지고 있어 피부의 보습 및 보호막을 형성시키며 다른 보습제(glycerin, propylene glycol 등)와 달리 친수성기가 물과 수소결합

을 하고 있으므로 습도의 영향을 거의 받지 않아 화장품의 보습성 기초원료 소재로서 많이 응용되고 있다. 또한 chitin은 천연의 다당류로 생리활성이 탁월하여 창상치료,³ 화상치료용 인공피복체,^{4,5} chitin의 sulfation한 유도체는 암전이억제제,⁶ 항혈액응고제,⁷ 항AIDS활성⁸ 등 생체적합성이 현재까지 알려진 물질중에서 가장 뛰어난 것으로 알려져 있다. 또한 chitin은 마이크로파지 환성능⁹이 있고 생체내 lysozyme에 의하여 잘 분해되어 항원항체반응이 거의 없는 것으로 알려져 있다.¹⁰ 그러나, 지금까지 이 CM-chitin의 제조방법¹¹은 반응중에 열이 발생하므로 반응조에 냉각장치를 설치할지라도 중화반응에서 순간적으로 열이 발생하기 때문에 chitin의 가수분해로 인해 분자량의 감소가 급격히 일어나 최종 product의 점탄성을 잃게되어 요구되는 제품으로써의 가치를 상실하게 되므로 반응시 상당히 주위가 요구된다. 또한, 반응에 긴시간이 소요되는 등 비경제적인 방법으로 제조되고 있다.

본 연구에서는 chitin의 입체배위가 온도에 따라 달라진다는 것에 착안하여 저온 유지하에서 열이 발생하지 않는 시약인 sodium monochloroacetate를 사용하여 반응을 진행시킴으로써 간단하고 짧은 공정하에서 CM-chitin을 제조할 수 있는 방법을 연구하였다. 또한, 기존 공정¹¹에서는 chitin과 NaOH 용액을 혼합한 후 동결하는 process를 사용하였으나 본 연구에서는 동결과정을 생략하고 CM-chitin을 제조하였다.

실 험

시약 및 기구. Sodium monochloroacetate와 monochloroacetic acid는 Wako Pure Chemical Industries Co. Ltd.(Japan)의 1급시약을 구입하여 더 이상 정제 없이 사용하였다. Sodium hydroxide와 isopropyl alcohol, acetone, 염산 등은 Duksan Pure Chemical Industries Co. Ltd.(Korea)의 1급시약을 구입하여 사용하였다. Chitin은 홍계의 껍질을 사용하여 Hackman법¹²에 의하여 직접 제조하여 사용하였다.

Carboxymethylchitin제조와 확인과 치환도 계산. Fig. 1은 제조한 chitin의 IR spectrum과 ¹³C-NMR을 나타내고 있는데 파장 1550 cm⁻¹의 N-H에 의한 신축진동 파장과 1650 cm⁻¹에서의 C=O에 의한 신축진동의 파장으로 잘 정제된 chitin인 것을 확인할 수 있었다. 그리고, 제조된 CM-chitin의 분말을 증류수에 용해하여

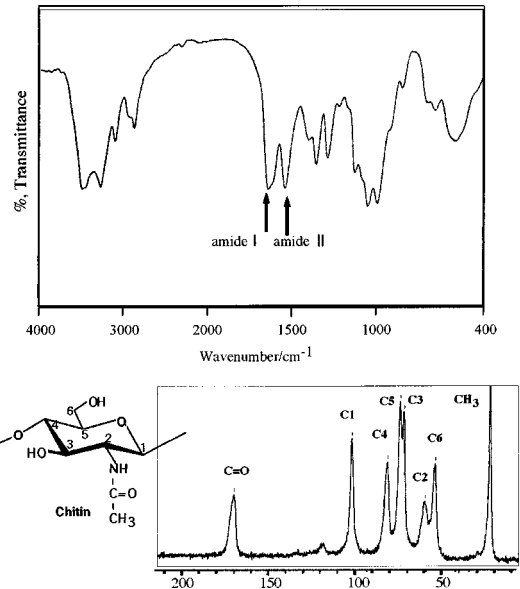


Fig. 1. ¹³C-NMR spectrum by CP-MAS and IR spectrum of purified chitin.

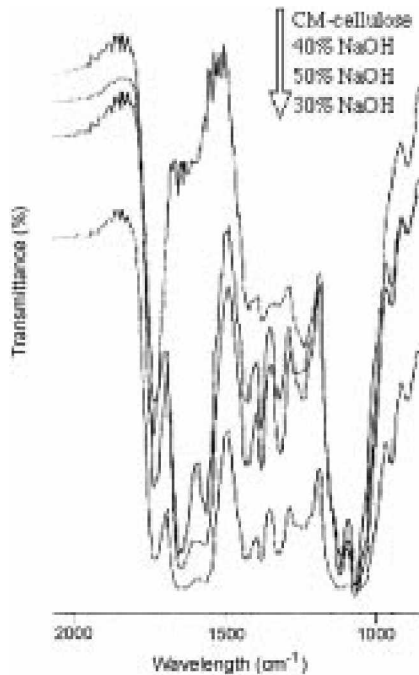


Fig. 2. The effect of sodium hydroxide concentration of the swelling solutions on carboxymethylation of chitin by the conventional method.

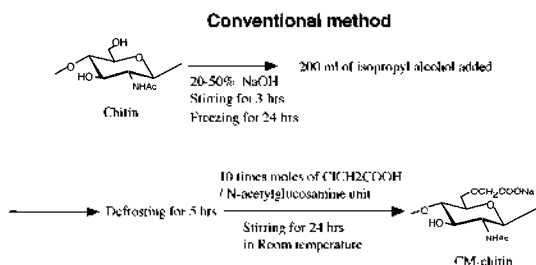
1N HCl로 pH 2로 낮추어 깨끗한 유리판에서 얇게 펴 film을 제조하였다. 이 film을 infrared spectrophotometry

(Bio-red, FTS-7)로 IR spectrum을 측정하였다. CM-chitin의 특징 peak인 carboxyl기가 1735 cm^{-1} 에서 나타났다(Fig. 2). 치환도구는 Tokura 등에 의하여 보고된 방법¹³에 따라 1735 cm^{-1} 와 1650 cm^{-1} peak 높이의 비로 계산하였다.

제조한 CM-chitin의 점도(viscosity) 측정방법¹⁴. 건조된 CM-chitin 3 g을 증류수 300 ml에 2 hrs 동안 교반하여 완전히 용해시킨 다음, $20 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 에서 1일간 방치 후 점도 측정전 30분간 교반하고 $20 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 유지하여 Brookfield viscometer LVDV-(U.S.A)로 수회 측정하여 그 평균값으로 점도를 구하였다.

결과 및 고찰

기존방법에 의한 CM-chitin의 제조. CM-chitin은 Tokura¹ 등에 의하여 처음 개발되었으며 분말상의 chitin을 50% NaOH용액중에서 수시간 교반한 후 장시간(24 hrs) 동안 동결시키는 방법에 의하여 chitin의 분자내와 분자간 수소결합을 절단함으로써 carboxymethyl기를 도입하였다(Scheme 1). 이 방법에 의한 CM-chitin 제조에서 NaOH용액의 농도가 분자량의 변화에 영향을 미칠 것으로 사료되어 알칼리 농도를 감소시켜 CM-chitin을 제조하였다. Scheme 1에서 나타낸 것과 같이 각각 chitin 10 g을 NaOH용액의 농도를 20% or 50%로 변화시켜 3 hrs 교반한 후 -20°C 의 냉동실에 24 hrs 동결하는 방법에 의하여 알칼리 chitin을 제조하였다. 약간의 isopropyl alcohol을 첨가한 후 해동하고 monochloroacetic acid를 chitin의 10배분의 비율로 isopropyl alcohol 200 ml에 용해하여 실온에서 2 hrs 동안 알칼리 chitin에 주입한 후 24 hrs 동안 교반하였다. 이 반응물을 acetone 중에서 침전시키고 분리하여 적당량의 증류수중에 용해시켰다. 이 용액을 0.1N HCl로 중화한 후 5일 동안



Scheme 1. Synthetic route of CM-chitin by the conventional method.

Table 1. Effects of sodium hydroxide concentration on degrees of substitutions (D.S.) yields, viscosity of CM-chitin prepared with fixed carboxymethylation time (24 hrs) by the conventional method

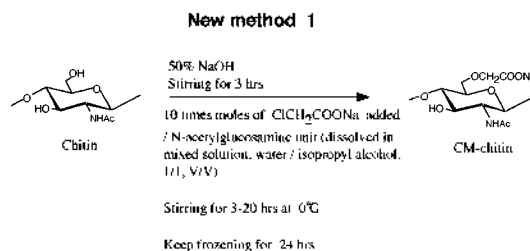
NaOH concentration(%)	D.S.	Yields(%)	Viscosity(cps)*
50	0.82	82	250
40	0.86	80	150
30	0.85	75	110
20	0	0	0

*Measurement error: less than 10%

순수속에서 투석하고 이과하여 어분의 염과 불순물을 제거하였다. 정제된 CM-chitin용액을 rotary evaporator로 농축하여 동결 건조하였다. 제조한 CM-chitin과 carboxymethyl cellulose(CM-cellulose)로 각각 film을 제조하여 IR spectra를 측정하고 NaOH농도에 따른 치환도 및 수율, 점도의 분석한 그 결과를 Fig. 2와 Table 1에 나타내었다.

새로운 방법에 의한 CM-chitin의 제조

Sodium monochloroacetate에 의한 carboxymethyl 화 시간에 따른 치환도, 점도, 수 율의 변화(New method 1). 알칼리 chitin과 sodium monochloroacetate ($\text{ClCH}_2\text{COONa}$)의 반응시간이 CM-chitin의 치환도, 점도 및 수율에 영향을 미칠 것으로 사료되어 각각 3, 5, 10, 15, 20 hrs 동안 Scheme 2에서 나타낸 공정으로 제조하였다. 기존공정에서는 제조시간이 길고 monochloroacetic acid(ClCH_2COOH)가 NaOH와 중화반응에 의한 열이 발생되므로 항온을 유지하기가 어려우며 탈아세틸화 반응이 일어나기 때문에 $\text{ClCH}_2\text{COONa}$ 를 사용하였다. 그러나, $\text{ClCH}_2\text{COONa}$ 는 isopropyl alcohol에 대해 용해성이 없기 때문에 isopropyl alcohol과 증류수의 비율 1:1(V/V)로 하는 혼합용매 중에서 용해하였다. 기



Scheme 2. New synthetic route of CM-chitin by carboxymethylation time with sodium monochloroacetate at 0°C .

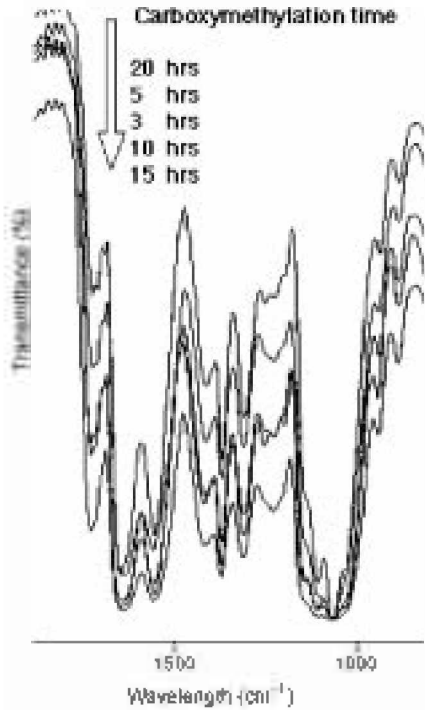


Fig. 3. IR spectra of CM-chitin prepared by new method with various carboxymethylation times.

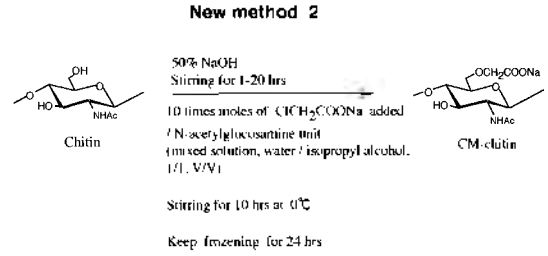
존 공정과 달리 chitin과 NaOH 혼합물의 동결공정을 생략하고 알칼리 chitin에 직접 10배몰의 $\text{ClCH}_2\text{COONa}$ 를 0°C 에서 투입하여 3-20 hrs 동안 교반하였다. 이것을 -20°C 냉동실에서 24 hrs 보관하는 방법으로 CM-chitin을 제조함으로써 기존 공정보다 5-20 hrs를 단축하였다. 제조된 CM-chitin 혼합물을 증화하고 부서 제거하여 동결건조하였다. 제조한 CM-chitin의 IR spectra를 측정하여 Fig. 3에 치환도 및 점도, 수율에 관한 결과를 Table 2에 나타내었다.

50% NaOH 용액중에서 chitin의 팽윤시간에 따른

Table 2. Effects of carboxymethylation time on D.S. yields and viscosity of CM-chitin prepared by new method

Carboxymethylation time(hrs)	D.S.	Yields(%)	Viscosity(cps)*
3	0.70	65	958
5	0.48	73	160
10	0.73	67	76
15	0.87	-	70
20	0.67	60	60

*Measurement error: less than 10%



Scheme 3. New synthetic route of CM-chitin by swelling time with sodium monochloroacetate at 0°C .

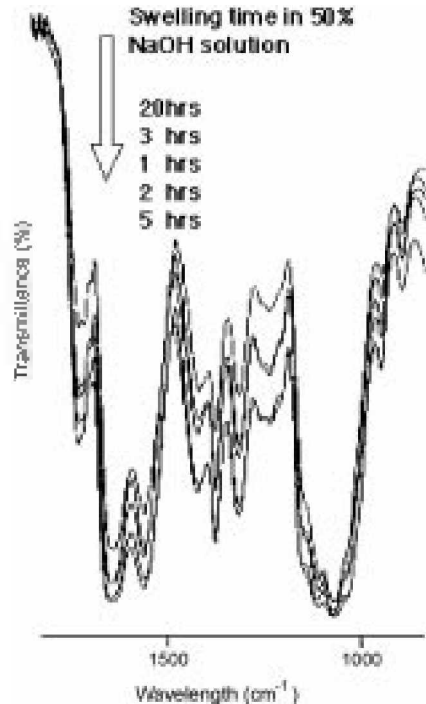


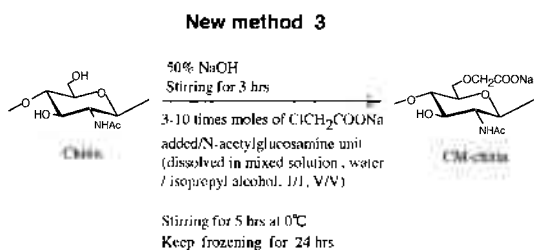
Fig. 4. IR spectra of CM-chitin prepared by new method with various swelling times in 50% sodium hydroxide solution.

치환도, 점도 및 수율의 변화(New method 2). 일정한량의 chitin과 50% NaOH 용액을 잘 혼합하여 chitin을 팽윤시킬 때 그 팽윤시간이 치환도, 수율 및 점도에 크게 관여할 것으로 사료되어 Scheme 3에서 나타낸 것처럼 팽윤시간을 1, 2, 3, 5, 10, 15, 20 hrs으로 변화시켜 chitin에 대한 10배몰의 sodium monochloroacetate를 첨가하여 0°C 에서 10 hrs 교반하였다. 이것을 냉동실에서 24 hrs동안 보관하여 CM-chitin 얻었다. 이것을 film으로 제조하고 IR spectra를 측정하여 Fig. 4에 치환도 및 점도, 수율의 분석결과를 Table 3에 나타내었다.

Table 3. Effects of swelling times in 50% sodium hydroxide solution on D.S. yields and viscosity of CM-chitin prepared by new method

Swelling time in 50% NaOH solution (hrs)	D.S.	Yields (%)	Viscosity (cps)*
1	0.66	70	161
2	0.68	69	337
3	0.72	79	972
5	0.66	65	60
20	0.46	61	15

*Measurement error: less than 10%



Scheme 4. New synthetic route of CM-chitin by molar ratio of sodium monochloroacetate to N-acetylglucosamine unit at 0 °C.

Sodium monochloroacetate의 첨가량에 따른 치환도, 점도 및 수율의 변화(New method 3). CM-chitin의 제조에서 첨가하는 sodium monochloroacetate 양을 변화시키면 CM-chitin을 제조하였다. Scheme 4에 나타낸 것처럼 알칼리용액중에서 3 hrs 교반하여 알칼리 chitin을 제조하고 각각 3, 5, 7, 10배몰의 $\text{ClCH}_2\text{COONa}$ 를 첨가하고 0 °C에서 5 hrs 동안 carboxymethyl화시켜 중화와 부석을 거쳐 1의 process와 같은 방법으로 CM-chitin 분말을 제조하였다. 이렇게 제조된 CM-chitin의 IR spectra를 Fig. 5에 치환도 및 점도, 수율을 Table 4에 나타내었다.

냉동보관을 생략한 공정에서 monochloroacetic acid에 의한 CM-chitin의 제조(New method 4). 이 제조 방법은 냉동보관 단계를 생략한다면 보다 짧은 시간으로 CM-chitin을 제조할 수 있을 것이다. 또한, $\text{ClCH}_2\text{COONa}$ 의 가격이 비싸기 때문에 제조비용 절감을 위하여 ClCH_2COOH 를 사용하여 Scheme 5에 나타낸 것과 같이 CM-chitin을 제조하였다. Chitin 10 g에 50% NaOH로 3 hrs 팽윤시킨 후 6 hrs 동안 0 °C 이하에서 carboxymethylation 하였다. 이때 산과 알칼리가 반응할 때 생성되는 열은 ice-bath를 이용하여 흡수하였다. Chitin에 대하여 10배몰의 ClCH_2COOH 를 isopropyl

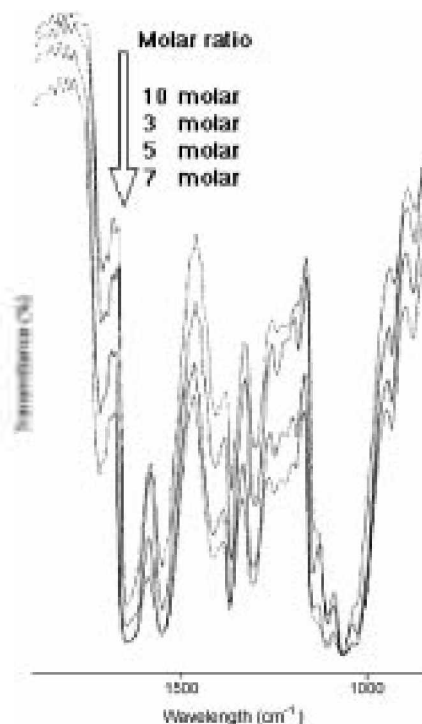


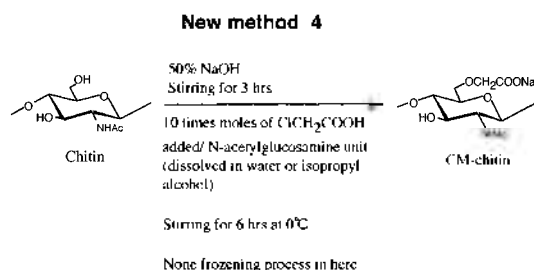
Fig. 5. IR spectra of CM-chitin prepared by new method with various molar ratios of sodium monochloroacetate to N-acetylglucosamine unit.

Table 4. Effects of molar ratios of sodium monochloroacetate to N-acetylglucosamine unit on D.S. yields and viscosity of CM-chitin prepared by new method

Molar ratio*	D.S.	Yields (%)	Viscosity (cps)**
3	0.36	51	18
5	0.64	62	26
7	0.77	66	650
10	0.47	73	160

* $\text{ClCH}_2\text{COONa}$ / N-acetylglucosamine of chitin

**Measurement error: less than 10%



Scheme 5. New synthetic route of CM-chitin by without freezing process with monochloroacetic acid at 0 °C.

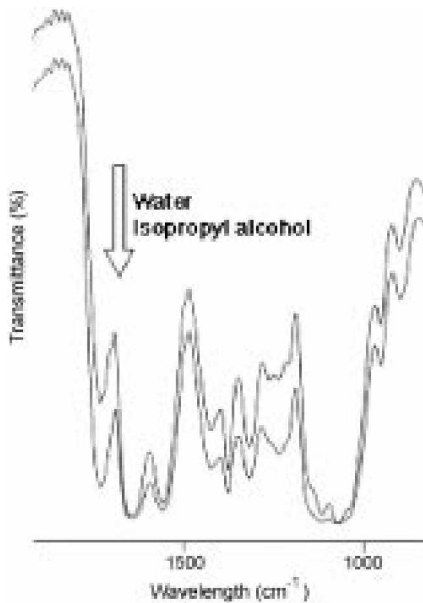


Fig. 6. IR spectra of CM-chitin prepared by new method with mono-chloroacetic acid solvents.

alcohol 또는 증류수에 각각 용해하고 증화와 부석을 기친 후 동결건조하고 이렇게 제조된 CM-chitin의 IR spectra를 Fig. 6에 치환도 및 점도, 수율의 분석결과를 Table 5에 나타내었다.

결 론

기존공정에 의한 CM-chitin의 제조 결과. 본 연구실험 결과 치환도가 NaOH 농도 변화와 무관하게 일괄적이었으며 20% NaOH농도에서는 CM-chitin이 제조가 불가능하였다. 본 연구에서는 30%, 40%, 50% NaOH 농도에서 CM-chitin을 제조할 수 있었다. 점도는 50%, 40%, 30%의 NaOH 수율로 나타났으며, 이와 같은 결과는 NaOH농도의 이온활동도와 관계가 있는 것으로 사료된다. 50% NaOH의 OH가 30% NaOH농도의

OH에 비해 이온활동도가 적기 때문에 분자량의 감소가 적게 된 것으로 사료된다. 50% NaOH의 OH와 mono-chloroacetic acid의 H와의 결합이 적어 열의 발생이 적고 분자량 감소가 없는 반면 30% NaOH농도는 이온활동도가 50% NaOH농도에 비해 크므로 반응중 높은 열이 발생하여 NaOH용액중에 존재하는 chitin의 glycoside결합이 일단되어 분자량 감소가 있는 것으로 사료된다. 기존방법은 상온에서 carboxymethylation이 일어나는 공정이므로 생성열에 대한 제어가 불가능하여 CM-chitin제조시 분자량이 많이 감소하여 점도가 감소하는 것으로 사료된다.

새로운 방법에 의한 CM-chitin의 제조. Carboxymethyl화 시간에 따른 치환도, 점도 및 수율의 변화에서는 치환도는 시간과 무관한 결과를 나타내었다. 이것은 carboxymethyl화가 시간 보다는 반응시 조건에 따라 결정되는 것으로 사료된다. 또한 점도는 시간이 짧을수록 높게 나타나 carboxymethyl화 시간이 짧을수록 분자량의 감소가 적게 일어남을 알 수 있었다.

팽윤시간에 따른 치환도, 점도 및 수율의 변화에서는 chitin과 50% NaOH의 혼합시간은 3hrs이 적절하였다. 팽윤 시간이 길어지면 높은 NaOH농도에 의하여 분자량 및 점도의 감소가 관찰되었다.

Sodium mono-chloroacetate의 첨가량에 따른 치환도, 점도 및 수율의 변화에서는 sodium mono-chloroacetate의 양이 증가함에 따라 치환도가 증가함을 알 수 있었으며 점도 역시 증가하는 것으로 나타났다. Chitin에 대한 sodium mono-chloroacetate가 7배불일 때 적정한 CM-chitin이 제조되는 것으로 나타났다.

냉동보관을 생략한 공정에서 mono-chloroacetic acid에 의한 CM-chitin의 제조에서 치환도가 다른 것과 비교해 높게 나타났으며 점도도 기존공정보다 높게 나타났다. 또한 CICH₂COOH를 용해하는 용매가 물과 isopropyl alcohol일때의 치환도와 점도가 기존공정보다 높은 것을 관찰할 수 있었다. 또한 0°C이하 상태가 유지되면 CICH₂COOH를 사용하는 것에 의하여 9hrs이

Table 5. Effects of mono-chloroacetic acid solvents on D.S. yields and viscosity of CM-chitin prepared by new method

Mono-chloroacetic acid solvent	Carboxymethylation time (hrs)	D.S.	Yields (%)	Viscosity (cps)*
Isopropyl alcohol	6	0.99	50	350
Water	6	0.81	68	200
Conventional method	24	0.77	82	250

*Measurement error: less than 10%

라는 단시간에 CM-chitin를 제조할 수 있다는 것을 알 수 있었다.

인용문헌

1. 하병조: 화장품학, 수문사, 서울, 1999, pp 15-37.
2. 戸倉清一: 西 則雄 高分子 **1986**, 25, 5, 452.
3. Sugano, M.; Yoshida, K.; Hashimoto, H.; Enomoto, K.; Hirano, S. *Proceedings from the 5th International Conference on Chitin and Chitosan* 1991; pp 472-478.
4. 大浦武彦: 杉原平樹 手術 **1992**, 44, 5.
5. 大浦武彦: 占部治邦: 大島良夫 西日本皮膚科 別冊. 日本, **1988**, 50, 712-720
6. Saiki, I.; Murata, J.; Nakajima, M.; Tokura, S.; Azuma, I. *Cancer Res.* **1990**, 50, 3631.
7. Wolforn, M. I.; Han, T. M. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, 81, 1764.
8. Gama, S. M.; Fazely, F.; Koch, J.; Vercellotti, S.; Ruprecht, R. *Biochem. & Biophys. Research Communications*, **1991**, 174(2), 489.
9. Nishimura, K.; Nishimura, S.; Nishi, N.; Saiki, I.; Tokura, S.; Azuma I. *Vaccine*, **1984**, 2, 93.
10. Sashiwa, H.; Uraki, Y.; Saimoto, H.; Shigemasa, Y.; Tokura, S. *CHITIN AND CHITOSAN. Proceedings from the 4th International Conference on Chitin and Chitosan*: Skja-brek G., Anthonsen T., and Sandford P., Ed.; Elsevier Applied Science: NY, 1989; pp 265-268
11. Tokura, S.; Nishi, N.; Tsutsumi, A.; Somorin, O. *Polymer J.* **1983**, 15(6), 485-489.
12. Hackman, R. H.; Goldberg, M. *J. Biol. Sci.* **1965**, 18, 935.
13. Nishimura, S.; Nishi, N.; Tokura, S.; Nishimura, K. *Carbohydr. Res.* **1986**, 146, 251.
14. キチン・キトサン實驗マニュアル, キチンキトサン研究會編. 日本, 技報堂出版: 1991; pp 49-77.