

## 키토산 분자네트 워크속에서 비타민 C의 지속적 방출 특성

한 상 문

\*서울보건대학 환경보건과

### Sustained Release Properties of Vitamin C in Chitosan Molecular network

Sang-Mun Han

*\*Dept. of Environmental Health, Seoul Health College, Sungnam 461-250, Korea*

#### Abstract

Chitosan is a dietary fiber because of a linear polysaccharide composed of  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-linked 2-amino-2-deoxy-D-glucopyranose. In this study, control release system of vitamin C has been estimated in chitosan molecular network as a vitamin C carrier of controlled release. The amount of released vitamin C were decreased in higher amount of chitosan concentration. Especially, vitamin C were slowly released from chitosan solution in dialysis membrane when compared with vitamin C solution alone in dialysis membrane. These result assumed that chitosan driving force is dependent on chitosan molecular weight and cationic property of amino group with anionic property of vitamin C.

Keyword : chitosan, vitamin C, drug control release device, chitosan molecular network

#### I. 서 론

Vitamin C는 수용성 환원제로서 여러 가지 필수적인 영양적 기능을 가지며 질병 예방과 치료에도 관련성이 많은 것으로 알려져 있다. 관상 심장질환, 뇌혈관질환, 당뇨병 및 고혈압 환자들이나 노인, 흡연자의 경우 혈중 Vitamin C 농도가 현저히 저하되어 있고, Vitamin C가 체내 지질 및 포도당 대사 등에 관여하고 발암물질인 nitrosamine 형성을 방지하는 등 각종 생활습관병(성인병)의 예방 및 신체의 자연치유에서 매우 중요하다는 연구보고들이 많다<sup>(1-4)</sup>.

Vitamin C와 동맥경화성 심장 및 뇌질환의 관계는 1930년대부터 보고되어 왔다. 체내 Vitamin C가 결핍되면 동맥벽의 muco-polysaccharides와 collagen 형성이 불완전해지고 동맥혈관 내피 조직이 손상될 뿐만 아니라, 혈중 total- 및 LDL-cholesterol과 triglyceride 농도를 증가시키고 HDL-cholesterol은 감소시킴으로써 동맥경화 발생을 촉진하는 것으로 보고되어 있다<sup>(5-7)</sup>. 또한 Vitamin C를 과량 보충 공급하면 고콜레스테롤, 고지방 식이에 의한 혈중 지질의 상승을 억제하여 토끼나 흰쥐 동맥내벽에 atherome 형성을 방지하였다고 보고 되었으며<sup>(8)</sup>, 고지혈증이나 관상심장병, 당뇨병을

않는 사람에서도 Vitamin C 다량보충에 의한 혈중 total cholesterol, triglyceride 농도 감소 또는 lipoprotein lipase 수준의 증가효과가 보고 되었다<sup>(9-10)</sup>. 이러한 Vitamin C는 몸에서 쉽게 배설되므로 건강을 위해서 매일 섭취해 주어야하는 필수 영양소이다<sup>(11)</sup>.

게 껍질에는 키틴질과 탄산칼슘, 색소, 약간의 단백질이 함유되어 단백질이 부패하면서 고약한 냄새를 유발한다. 이 유기성 폐기물은 묽은 염산용액 중에서 칼슘을 제거하고 알칼리용액 중에서 끓여 단백질을 제거하면 키틴질이 남는다. 이 키틴질을 deacetylation하면 Chitosan이 얻어지는데, Chitosan은 Glucosamine 이 Beta-1,4 결합하여 있는 고분자 다당체로써 섬유질이기에 때문에 사람의 몸속에서 소화되지 않는다. 그래서 최근에는 건강기능성 식품분야에서 식이섬유질 식품으로 그 가치를 인정받고 있다. 또한, 생명공학분야, 식품분야 외에도 의학적 응용 등 다양한 분야에서 연구와 응용 되고 있다. 이것은 Chitosan을 생물체 내에 응용하였을 경우에 생물학적인 피해가 매우 적기 때문이다<sup>(12)</sup>. 방출 지속성 제제에 관한 연구는 약물의 방출속도를 조절함으로써 약물 치료의 효능이 기존의 제형보다 개선될 수 있기 때문에 많은 연구가 진행되고 있다<sup>(13)</sup>. 본 연구에서는 장내 일정한 농도를 유지함으로써 혈중에서도 일정한 농도를 장시간 유지시키고자 Chitosan에 Vitamin C를 흡착시켜 Vitamin C가 Chitosan으로부터 서서히 방출하게 하였다.

## II 재료 및 방법

### 1. 시약 및 기기

Chitosan은 (주) C & C Science에서 생산되는 DAC 85%, 20cps, Size 60-80 Mesh의 분말을, Vitamin C는 DUKSAN PURE CHEMICAL CO., LTD.의 순도 99% L-Ascorbic acid를 정제 없이 사용하였다. 분석기기로는 UV/Visible Spectrophotometer((주) SCINCO) S-1100, FTS135, FT-IR((주) BIO-RED), pH Meter는 ISTEK Model

720P를 사용하였다. 투석시에는 삼광 순약 주식회사 UC 1-7-8-50 50FT 투석막을 사용하였다.

### 2. Vitamin C 용액 중에서 Chitosan의 용해도

Vitamin C에 키토산이 용해되는 양은 키토산에 Vitamin C를 흡착 시킬 수 있는 양을 결정할 수 있기 때문에 Vitamin C에 키토산이 많이 용해되는 것이 좋을 것이다. Chitosan은 무기산보다 유기산에 잘 용해된다. Vitamin C는 유기산으로 Carboxyl기가 존재한다. Chitosan에 대한 Vitamin C의 몰 비를 각각 0.5, 1, 2, 4, 10으로 혼합하여 200ml Beaker에 넣고 100ml의 증류수를 넣어 교반 하면서 UV/Visible Spectrophotometer로 Turbidity를 측정하여 용해성을 평가하였다.

### 3. 투석 시간에 따라 방출되는 Vitamin C의 양 변화

증류수 200ml에 Vitamin C 3.52g을 넣고, 다른 하나는 증류수 200ml에 Chitosan 1.61g과 Vitamin C 3.52g을 넣어 용해하였다. 각 sample을 투석막에 넣어 1,800ml의 증류수에 담그고 매 30분마다 물을 교환하면서 투석막외로 방출되는 Vitamin C의 농도를 시간의 변화에 따라 측정하였다. 농도는 UV/Visible Spectrophotometer로 최대흡수 파장을 측정하여 결정하였다. 처음 용액의 흡수파장을 측정하고 1시간마다 용액을 채취한 다음 회석하여 흡수파장을 측정하여 농도변화를 관찰하였다.

### 4. Chitosan 양에 대한 Vitamin C의 흡착량

Vitamin C 500mg에 Chitosan을 각각 100, 300, 500mg 넣고 세 sample 모두 pH 1.2 HCl 용액 10ml와 증류수 20ml씩을 첨가한 다음 1N NaOH로 pH 7.5 이상으로 맞추었다. 각 sample을 Water bath shaker(100rpm, 37°C)에 넣어 잘 혼합 하였

다. 1시간 후에 sample들의 용액과 응집물을 filter 하여 분리해서 용액의 흡수파장을 측정하고 그 Chitosan 응집물에 증류수 30ml를 가한다음 Water bath shaker(100rpm, 37°C)에 넣어 잘 혼합하였다. 흡수파장은 매 1시간 마다 위와 같은 방법으로 측정하고 이 실험을 12시간 동안 반복하여 흡착량 변화를 관찰하였다.

### III. 결과 및 고찰

#### 1. Vitamin C 용액 중에서 Chitosan의 용해도

Vitamin C는 acid solution일 때 245nm 부근에서  $\lambda_{max}$ 를 나타내고, neutral solution일 때는 265nm 부근에서  $\lambda_{max}$ 가 나타난다. Fig. 1는 Vitamin C의 최대 흡수파장을 UV Spectrum을 이용하여 확인해 본 결과이다. Vitamin C는 증류수에 녹으면 그 자체가 산성이기 때문에 245nm 부근(248.97nm)에서  $\lambda_{max}$ 를 나타내고 많은 양의 증류수에 녹여 거의 중성 용액상태에서 측정하면 265nm 부근(267.47nm)에서 최대 흡수 파장을 얻을 수 있다. 그리고 산성 용액 상태의 Vitamin C에 NaOH를 첨가하여 강제로 중성용액을 만들어 UV Spectrophotometer를 측정하면 역시 265nm 부근(270.12nm)에서 최대 흡수 파장이 나타난다. Chitosan의 농도에 따른 Turbidity 검량선은 100ml

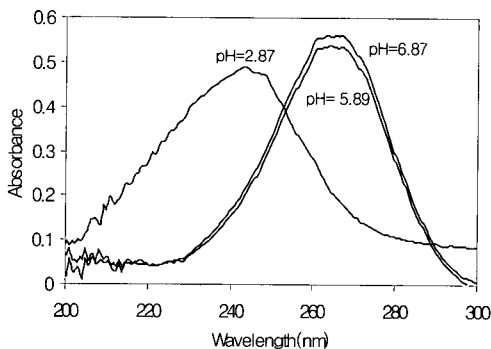


Fig. 1. UV Spectra of Ascorbic acid in acid and neutral solution

의 증류수에 0.5, 1, 1.5, 2g을 각각 넣고 610 nm에서 측정하였다. 농도에 따른 흡광도 식은  $y = 0.4277x - 0.1856$  이었고 신뢰도  $R^2 = 0.9976$ 이다. 그 결과는 Fig. 2에 나타내었다. 이 결과로부터 Chitosan의 용해도를 평가할 수 있었다. 610nm에서 전혀 흡수하지 않으면 Chitosan이 완전히 용해되었다고 할 수 있는 것이다. Vitamin C에 대한 Chitosan의 용해도는 Fig. 3에서 보는 것처럼 1ml 이상이면 모두 30분 안에 용해된다. Vitamin C를 넣지 않았을 때 Chitosan만의 Turbidity는 시간이 경과함에 따라 증가하게 되는데 이는 Chitosan의

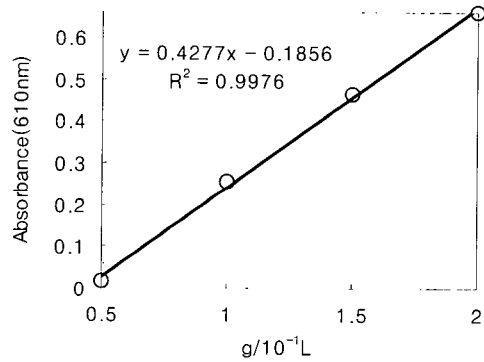


Fig. 2. Working curve of Chitosan powder in water

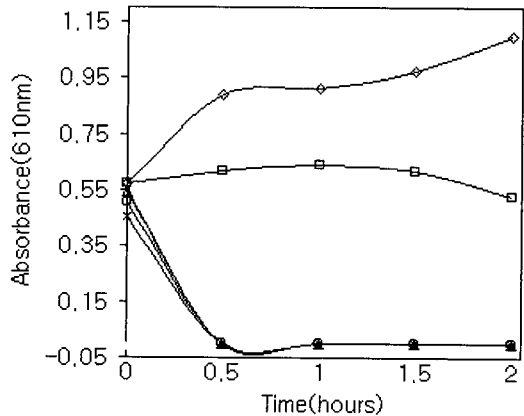


Fig. 3. Turbidity of Chitosan and Vitamin C mixture in water (Molar ratio of Vitamin C to Chitosan ;  $\diamond$  0,  $\square$  0.5,  $\triangle$  1,  $\times$  2,  $\ast$  4,  $\ominus$  10)

팽윤 현상 때문이다. 그리고 Vitamin C의 양이 많을수록 Chitosan은 더 빨리 용해되는 것을 알 수 있다. 그래프에서 Vitamin C가 0.5mol 들어간 것은 시간이 경과함에 따라 Chitosan이 약간 팽윤 되지만 좀 더 지나면 더 이상 흡수 과장이 높아지지 않고 조금 녹는 것을 알 수 있다. 또 1, 2, 4, 10mol은 30분이 지나기도 전에 모두 녹은 것을 UV Spectrum을 통해서 확인 할 수 있었다. 처음 0시간의 최대 흡수과장이 조금씩 차이가 나는 것은 Vitamin C가 많이 들어가면 빨리 녹기 때문에 조작과정에서 시간이 조금씩 차이가 나기 때문이다. Chitosan이 증류수에 전혀 용해되지 않았을 경우 ABS는 0.55-0.57에서 나타난다. 그리고 Sample을 채취하는 과정에서 Chitosan 입자 수가 정확하게 채취되지 않은 점도 균일하지 않은 이유가 될 것이다.

## 2. 투석에 시간에 따른 Vitamin C의 방출량 변화

Chitosan과 Vitamin C가 함께 녹아 있는 용액 안의 투석 시간 별 Vitamin C 함량을 계산하기 위하여 Fig. 4와 같이 검량선을 작성하였다. 흡광도 식은  $y = 0.145x - 0.0144$ 이고 신뢰도  $R^2$ 은 0.9942였다. 이 결과를 바탕으로 6시간 투석하는 동안 매 30분마다 증류수를 바꾸어 주면서 1시간마다 채취한 sample 중 Vitamin C의 함량을 분석한 결과가 Fig. 5에 나타나 있다. Chitosan과 Vitamin C 혼합 용액의 흡광도에 따른 감량식은  $y = -0.3721x + 5.6321$ 이고 신뢰도  $R^2$ 은 0.9853이다. 그리고 Vitamin C 단독으로 투석한 것의 흡광도에 따른 감량식은  $y = -0.6564x + 5.7207$ 이고 신뢰도  $R^2$ 은 0.9350이다. Fig. 5에서 보는 것처럼 Vitamin C 용액 단독으로 투석 한 것의 기울기가 크고 감량되는 정도가 심하다. 이는 Chitosan이 없을 경우 투석막으로부터 빠져 나오는 양이 더 많음을 의미한다. 이 결과는 Chitosan이 Vitamin C를 잡아 두고 있어 투석막 밖으로 빠져나가는 것을 지연시키는 효과를 얻을 수 있음을 의미한다. 이는 Helix 구조를 가지고 있는 Chitosan 분자가 Vitamin C를 포

집 또는 정전기적으로 결합하여 천천히 방출한다고 추정할 수 있다. 이 결과로부터 분해 되지 않는 식이섬유인 Chitosan의 포집 또는 결합력으로 Vitamin C가 장내에 더 장시간 머무르면서 혈관으로 지속적으로 서서히 흡수될 가능성이 높다고 시사된다.

## 3. Chitosan 양에 대한 Vitamin C의 흡착량

방출 실험을 통해 Chitosan의 양이 많을수록 Vitamin C가 많이 포집되어 있다는 것을 알 수가

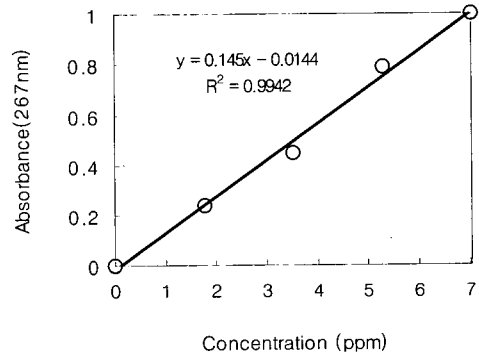


Fig. 4. Working curve of Vitamin C solution

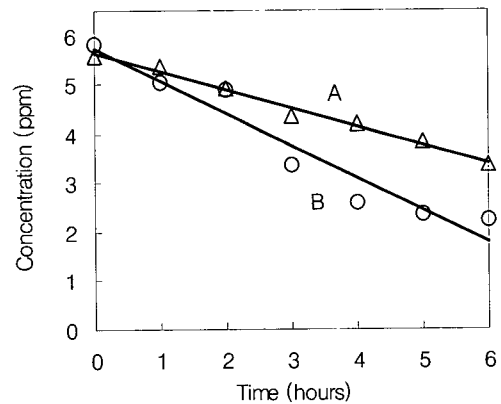


Fig. 5. Release profiles of Vitamin C in dialysis membrane (A ; Vitamin C in Chitosan  $y = -0.3721x + 5.6321$ , B ; Vitamin C  $y = -0.6564x + 5.7207$ )

있었다. Fig. 6과 같이 Chitosan 100mg을 넣은 시료에서는 4시간 경과 후 412 mg이 방출 되었고, 300mg을 넣은 시료에서는 6시간 후 396.5mg이 방출 되었다. 또, Chitosan을 500mg을 넣은 시료는 6시간 후에 376.1mg을 방출 하였다. 그 후에는 시간이 경과하여도 더 이상 Vitamin C는 방출되지 않았다. 처음 예상대로 Chitosan의 양이 많을수록 방출속도는 지연되고 방출량 역시 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이 결과로부터 Chitosan은 Vitamin C를 흡착 또는 포접하는 능력이 있으며, Chitosan 양이 많으면 흡착 또는 포접되는 양이 증가한다는 것을 알 수 있다.

#### 4. IR Spectra of Chitosan-Vitamin C Complex

앞의 실험들을 통해 Chitosan이 Vitamin C의 방출 속도 및 포접하는 양에 대한 관계를 확인 하였고, 이 data들의 검증을 위해 IR Spectrum을 측정 하여 실제 Chitosan에 Vitamin C가 포접되어 있는지를 관찰하였다. Fig. 7의 IR Spectrum에서 보는 것처럼 Chitosan은  $1550\text{cm}^{-1}$  부근에서 N-H peak

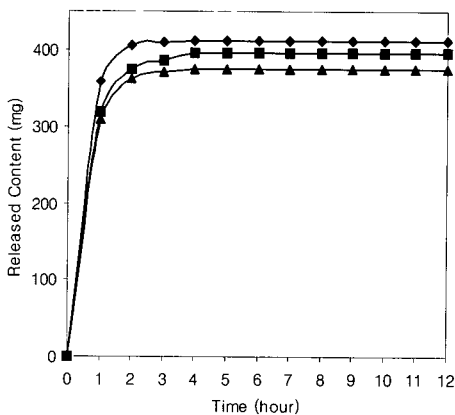


Fig. 6. Control release of Vitamin C in Chitosan molecular network (◆-Chitosan 100mg : Vitamin C 500mg, ■-Chitosan 300mg : Vitamin C 500mg, ▲-Chitosan 500mg : Vitamin C 500mg)

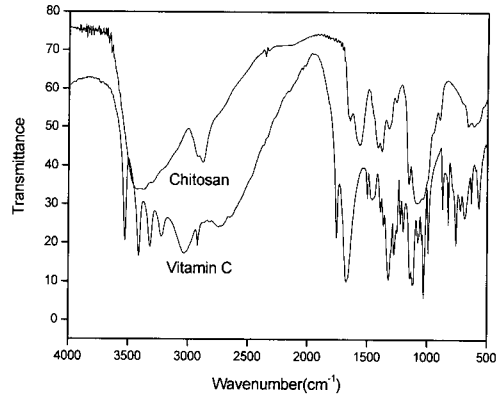


Fig. 7. IR Spectra of Chitosan and Vitamin C

가 관찰되고 Vitamin C는  $1750\text{cm}^{-1}$ 와  $1675\text{cm}^{-1}$  부근에서 COOH peak와 C=O peak가 sharp하게 나타난다. 또, Fig. 8의 Chitosan용액에 Vitamin C를 녹인 sample의 IR Spectrum에서는  $1675\text{cm}^{-1}$  부근에서 Vitamin C의 C=O peak와  $1570\text{cm}^{-1}$  부근에서 Chitosan의 N-H peak와 가 overlap 되어 처음 각각의 peak에 비해 broad 해진 것을 확인 할 수 있다. 그리고 방출실험이 완전히 끝난 후의 IR Spectra는 Chitosan 고유의 peak를 나타내고 있다. 이 증거로 보아 Chitosan에 Vitamin C가 흡착 또는 포접되어 있다가 방출되었음을 확인 할 수 있다.

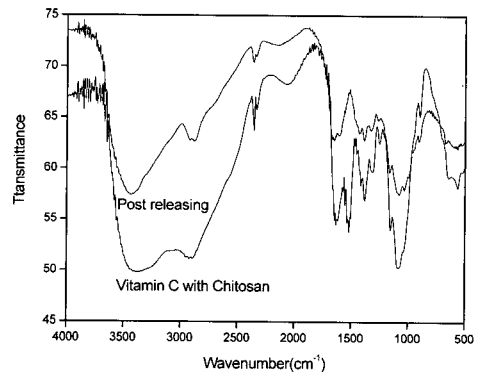


Fig. 8. IR Spectra of mixture Chitosan and Vitamin C, and post Vitamin C releasing in Chitosan

#### IV. 결 론

키토산은 Glucosamine 이  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) 결합된 고분자 다당으로 식이 섬유질이다. 본 연구에서는 Chitosan을 Vitamin C의 방출 조절형 제제로서 이용하였다. Chitosan의 양이 증가할수록 방출속도는 느려지고 Chitosan 분자 네트워크 안에 포접되어 있는 Vitamin C의 양이 더 많았다. 이 결과로부터 Chitosan의 Vitamin C 서방성은 Chitosan의 량에 의존하여 방출되는 것으로 사료되며 Chitosan의 아미노기에 Vitamin C가 이온교환적인 특성으로 방출 조절되는 것으로 추정된다. 또한, Chitosan이 Vitamin C를 분자네트워크 속에 포접하고 있어 서서히 방출한다고 추정할 수 있고, 이로써 혈관내로 흡수되는 Vitamin C의 양을 조절할 수 있을 것으로 기대된다.

#### 참 고 문 헌

1. Pelletier O. Vitamin C and cigarette smoker. *Ann NY Acad Sci.*, 258, 156-167, 1975
2. Simon JA. Vitamin C and cardiovascular disease. *J Am Coll Nutr.*, 11(2), 07-125, 1992
3. Som S, Basu D, Mikherjee S. Ascorbic acid metabolism in diabetes mellitus. *Metabolism.*, 30, 572-577, 1981
4. Mirvish SS. Blocking the formation of N-nitroso-compounds with ascorbic acid. In vitro and in vivo. *Ann NY Acad Sci.*, 258, 175-180, 1975
5. Clemetson CAB. Vitamin C, Voll II, CRC Press, Boca Raton, 147-163, 1989
6. Erden F, Gulenc S, Torun M, Kocer Z, Simsek B, Nebioglu S. Ascorbic acid effect on some lipid fractions in human beings. *Acta Vitaminol Enzymol.*, 7, 31-88, 1985
7. Uchida K, Nomura Y, Takase H, Tasaki T, Seo S, Hayashi Y, Takeuchi N. Effect of Vitamin C depletion on serum cholesterol and lipoprotein levels in ODS(od/od) rats unable to synthesize ascorbic acid. *J Nutr.*, 120, 1140-1147, 1990
8. Manson JE, Gawiano JM, Jones MA, Hennekens CH. Antioxidants and cardiovascular disease : A review. *J Am Coll Nutr.*, 12, 426-432, 1993
9. Ginter E, Zdichynec B, Holzerova D, et al. Hypocholesterolemic effect of ascorbic acid in maturity onset diabetes mellitus. *Int J Vitam Nutr Res.*, 48, 368-373, 1978
10. Heine H, Norden C. Vitamin C therapy in hyperlipoproteinemia. *Int J Vitam Nutr Res Suppl.*, 49, 45-54, 1979
11. J. Grant, Handbook of Parenteral Nutrition, WB Saunders, London., 1980.
12. R. A. A. Muzzarelli, "Chitin", Pergamon Press, Oxford., 1977.
13. 정서영, 화학과 공업의 진보., 27, 680, 1987