전기분사법을 이용한 키틴/키토산 미세입자의 제조

유 용 · 박원호* · 민병무[1] · 이승진[2]

충남대학교 공과대학 섬유공학과,
[1]서울대학교 치과대학 구강생화학교실, [2]이화여자대학교 약학대학

Preparation of Chitin/Chitosan Nanoparticles by Electrospray

Young You, Won-Ho Park*, Byung-Moo Min[1] and Seung Jin Lee[2]

Department of Textile Engineering, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea
[1]Department of Oral Biochemistry, College of Dentistry, Seoul National University, Seoul 110-749, Korea
[2]College of Pharmacy, Ewha Wowen's University, Seoul 120-750, Korea

ABSTRACT

Electrospray method is a new technique to fabricate the polymer nanoparticles. Nanoparticles of chitin and chitosan were prepared by electrospray and characterized by scanning electron microscope (SEM). In general, the increase in the concentration of chitosan solution induced the increase in its solution viscosity. In addition, the solution viscosity increased rapidly at above the critical concentration, due to formation of entanglement between chitosan chains. From the plot of polymer concentration vs. solution viscosity, it was found that chitosan or chitin nanoparticles, with particle size in the range of 200-600 nm, could be easily formed at below the critical concentration associated with the formation of chain entanglement. Therefore, we concluded that the plot of polymer concentration vs. solution viscosity was important to investigate the concentration range in which polymer nanoparticles could be prepared.

Keywords: electrospray, chitin, chitosan, nanoparticle

서 론

지구상에 존재하는 천연 다당류 중에서 셀룰로오스 다음으로 많은 양이 존재하는 키틴은 N-acetyl-D-glucosamine이 β-(1→4) 결합한 형태의 천연 다당류이며, 게나 새우 등의 갑각류, 갑오징어 등의 연체류, 그리고 곤충류 및 세균의 세포벽 등에 광범위하게 분포되어 있다. 그러나, 키틴은 유기용매에 잘 용해되지 않기 때문에 성형에 문제가 있어 그 용도가 한정되어 있다(1,2). 한편, 키틴을 진한 알칼리 용액 중에서 탈아세틸화하여 얻어지는 키토산은 초산, 포름산 등의 유기산과 염산 등의 무기산 수용액에 쉽게 용해되므로 폐수처리용 응집제, 중금속 흡착제, 식품 및 화장품 등 다양한 분야에 활용되어 왔다(3,4). 특히, 최근엔 키토산 및 그 유도체가 항균활성, 면역증강과 면역회복에 의한 항종양성(5), 콜레스테롤 저하작용(6), 혈액응고 활성 및 상처치유 효과(7), 혈압강하 등 여러 가지 생리활성을 가진다는 사실이 밝혀지면서 의약학 분야에서 널리 연구되고 있는데, 이런 특성들은 키토산의 분자량과 탈아세틸화도에 크게 영향을 받는 것으로 알려져 있다.

*To whom all correspondence should be addressed
Tel.: 042-821-6613; E-mail: parkwh@cnu.ac.kr

한편, 전기방사법이란 충분한 점도를 가지는 고분자 용액이나 용융물에 정전기력을 부여하여 방사하는 방법을 말한다. 수직으로 위치한 모세관 끝에 고분자 용액은 중력과 표면장력 사이에 평형을 이루며 반구형 방울을 형성하며 매달려 있게 되는데, 전기장이 가해질 때 이 반구형 방울 표면에 전하 또는 쌍극자 배향이 공기층과 용액의 계면에 유도되고, 전하 또는 쌍극자 반발로 표면장력과 반대되는 힘을 발생시킨다. 따라서 모세관 끝에 매달려 있는 용액의 반구형 표면은 Taylor cone(8)으로 알려진 원추형 모양으로 늘어나게 되고, 어떤 임계 전기장세기에서 이 반발 정전기력이 표면장력을 극복하게 되면서 하전된 고분자 용액의 jet가 Taylor cone 끝에서 방출된다. 이 jet는 점도가 낮은 용액의 경우 표면장력 때문에 미세 방울로 분사된다. 그러나 점도가 높은 용액의 경우 jet는 붕괴되지 않고 집적판을 향하여 공기 중을 날아가면서 용매가 증발하게 되고 집적판에는 하전된 고분자의 연속상 섬유가 쌓이게 된다. jet가 집적판을 향해 날아가는 과정에서 jet의 탄도는 굽어지거나 방향이 바뀌기도 한다. 또한, jet는 비행 중에 가늘어지게 되고 표면에 전하가 밀집되면서 전하 반발력에 의해 초기 하나의 jet는 더욱 작은 여러 필라멘트로 분열된다. 이러한 과정을 splaying이라 부른다. 이러한 전기방사법은 최근 개발된 것이 아니라 이미 1930년대에 제안되어 특허화 되었는데, Formhals는 1934년 정전기적 힘을 이용

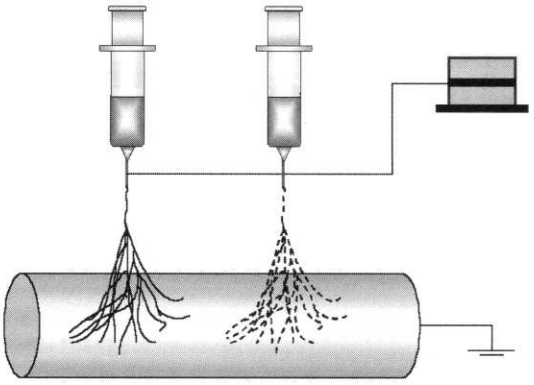

Fig. 1. Schematic diagram on jet formation of polymer solution with different concentration or molecular weight.

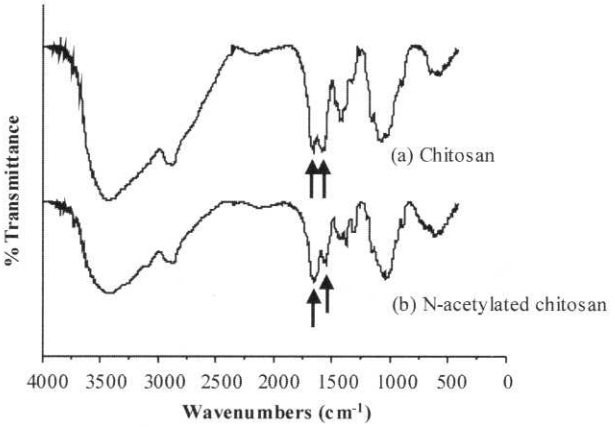

Fig. 2. IR spectra of chitosan and N-acetylated chitosan (chitin).

한 셀룰로오스 아세테이트 섬유의 제조에 대한 장치를 개발하고 특허를 출원하였다. 그러나, 용융방사나 용액방사에 밀려 상업화되지 못하였다. 그 이후, 1971년에 Baumgarten은 아크릴계 고분자를 전기방사법을 통하여 제조하였는데 이 때 얻어진 섬유의 직경은 500~1100 nm 정도이었다. 또한 1977년 영국 ICI에서 창상피복재 용도로 매트 제조방법을 개발하여 전기방사법의 상업화 가능성을 처음으로 제시하였다. 1989년 이후, Reneker에 의해서 간단한 실험 장치가 개발되면서 최근 에크론대학 및 MIT 등을 중심으로 전기방사에 대한 연구가 다시 활발하게 이루어지고 있다.

이론적인 측면으로만 살펴본다면 거의 모든 고분자는 전기방사를 통하여 아주 가는 섬유로 만들어 질 수 있다. 그리고 또한 고분자의 농도를 조절함으로써 Fig. 1에서 보는 바와 같이 입자와 섬유를 선택적으로 제조할 수 있다(9). 따라서, 전기분사(입자의 제조에는 전기분사로 표현하는 것이 더 일반적임)를 사용하면 보통 마이크로 크기의 입자를 생산하는 방법에서 진보하여 더 미세한 나노 수준의 입자를 제조할 수 있을 것이다. 또한 고분자를 용해시키는 과정을 제외한 다른 특수한 공정이 필요 없어 매우 간편하게 미세입자를 제조할 수도 있다. 즉, 분사와 동시에 수많은 입자의 형태로 제조가 가능하며 또한 분사에 걸리는 시간이 매우 짧다. 분사에 사용되는 장비도 일반적인 분사장비에 비해 매우 간단하다는 장점이 있다. 적은 양의 고분자를 사용하여 분사가 가능하므로 신규 고분자의 성능 평가에도 간편하게 이용될 수 있다.

최근에 전기방사법은 대부분 고분자 나노섬유의 부직포를 제조하는데 주력하고 있지만, 본 연구에서는 전기적인 힘을 이용하는 전기방사 장치를 이용하여 우수한 흡습성, 생체 조직과의 친화성, 항균성 및 응집성을 지니는 키틴·키토산 미세입자를 제조하고자 하였다.

재료 및 방법

시약 및 시료

본 연구에 사용된 키토산은 크게 두 가지 종류로 나눌 수 있다. 첫 번째 시료는 (주)금호화성에서 구입한 고분자량 키토산(M_v=220,000)을 묽은 초산에 녹인 후 NaOH 수용액으로 석출하고 중화시켜 정제한 것이고, 두 번째 시료는 수용성의 글리콜 키토산(M_v=23,000)을 사용하여 실험을 행하였다. 또한 키틴은 (주)금호화성에서 구입한 키토산을 N-아세틸화 반응시켜 제조된 키틴을 포름산에 녹여 사용하였다.

N-아세틸화 반응

(주)금호화성에서 구입한 키토산은 탈아세틸화도가 약 86% 정도였다. N-아세틸화 키틴은 정제한 키토산 1 g을 10% 초산 수용액(18 m*l* 증류수, 2 m*l* 초산)에 녹인 후 100 m*l*의 메탄올에 희석시키고 무수 아세트산을 1.5 m*l* 첨가하여 12시간 이상 교반시킨 다음, 다시 600 m*l*의 메탄올로 12시간 이상 희석시켰다. 이것을 아세톤 600 m*l*로 수세한 뒤 40°C로 진공오븐에서 건조하였다. 이렇게 제조된 키토산을 Fig. 2에 제시된 바와 같이 IR 스펙트럼으로 확인한 결과, 탈아세틸화도가 약 36% 임을 알 수 있었다(10).

전기방사

전기방사장치(모델명, CPS-40K03)는 (주)청파EMT에서 제작한 것을 실험에 사용하였으며, 키틴 또는 키토산 용액을 시린지 펌프를 사용하여 1-4 m*l*/h로 변화시켜 일정량을 연속적으로 방사하였다. 그리고 전기분사의 공정변수인 용액의 농도는 키토산의 경우 4-9 wt%, 수용성 글리콜키토산의 경우 10-65 wt%, 키틴의 경우 6-8 wt%의 범위에서, 방사거리와 방사전압은 3종류의 시료에 대하여 모두 동일하게 5-9 cm, 10-25 kV 까지 변화시켜가면서 실험하였다.

특성분석

전기분사된 키틴·키토산의 미세입자의 형태는 주사전자현미경(SEM, HITACHI S-2350)으로 관찰하였는데, 시료를 금속판 위에 단단히 고정시킨 후 플라스마 스퍼터를 이용하여 아르곤 분위기하에서 금으로 코팅한 다음 가속전압을 25 kV, 배율 2,000으로 하여 측정하였고, 용액점도는 점도계(model

LVDVE 230, Brookfield digital viscometer)를 사용하여 고분자의 농도를 달리하면서 측정하였다. 제조된 키틴, 키토산 미세입자의 크기는 화상분석기(Scope Eye II)를 사용하여 측정하였다.

결과 및 고찰

키토산 미세입자

고분자량의 키토산은 불순물을 제거하기 위하여 묽은 초산 수용액에 용해시켜 여과하고 과량의 NaOH 수용액으로 중화시키는 방법으로 정제하여 사용하였다. Fig. 3은 5% 초산 수용액에 용해시킨 정제된 키토산의 농도에 따른 점도의 변화 곡선을 보여주고 있다. 키토산의 농도에 따라 점도가 증가하다가 키토산의 농도가 약 8% 정도에서 급격하게 점도가 증가하는 것을 알 수 있다. 점도의 급격한 증가는 용액내에 용

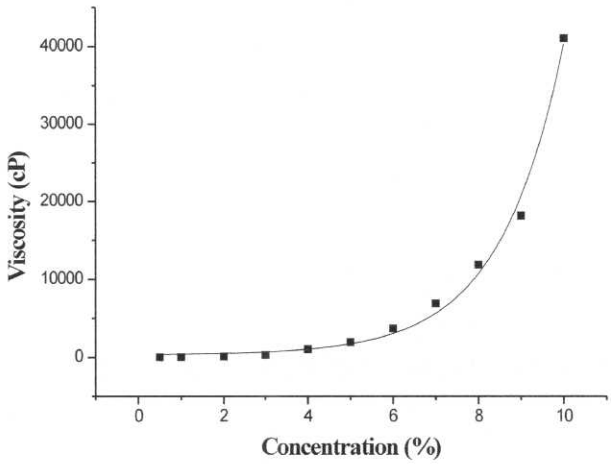

Fig. 3. Relationship between concentration and viscosity of chitosan solution in 5% acetic acid.

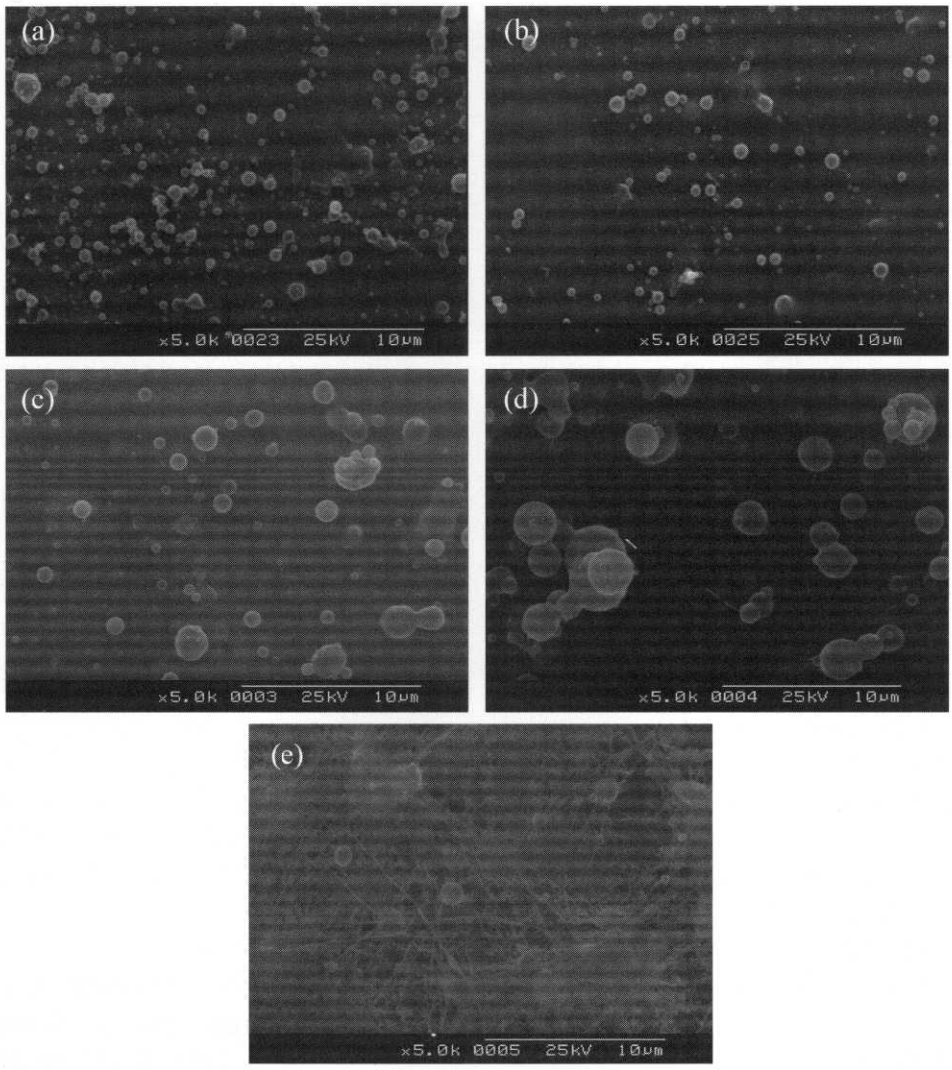

Fig. 4. SEM micrographs of nanoparticles electrospun from chitosan solution in 5% acetic acid: (a) 4 wt%, (b) 5 wt%, (c) 6 wt%, (d) 8 wt%, (e) 9 wt%.

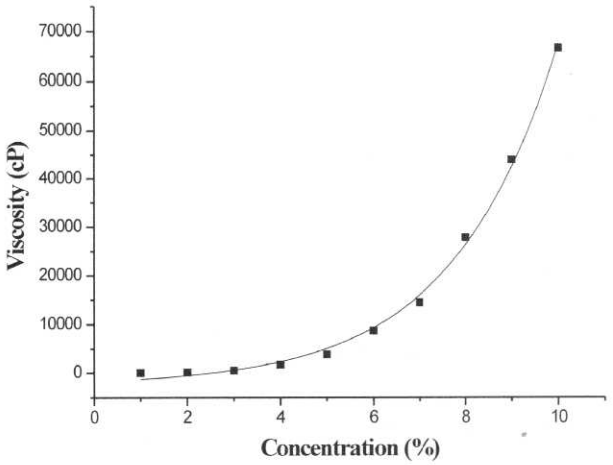

Fig. 5. Relationship between concentration and viscosity of the chitosan solution in formic acid.

해되어 있는 고분자 사슬간의 엉킴에 기인하는 것으로 잘 알려져 있다. 이러한 엉킴현상은 전기방사를 통하여 연속적인 초극세 섬유를 제조하는 데에 기여하는 중요한 용액성질이다. 그러나 본 연구에서는 미세입자를 제조하기 위하여 엉킴이 적은 농도에서 전기분사를 실시하였다. Fig. 4는 5% 초산 수용액에 키토산을 4~9 wt%의 농도로 용해시킨 후 전기분사하여 얻어진 키토산 미세입자의 SEM 사진이다. 사진에서 볼 수 있듯이 키토산의 농도가 증가할수록 입자의 크기가 증가하는 경향을 보이며 9 wt%에서는 키토산 사슬간의 엉킴이 증가하여 미세입자가 아닌 연속섬유의 형태가 주로 나타나는 것을 알 수 있다. 특히, 키토산의 농도를 4~5 wt%로 하여 제조한 미세입자의 경우에는 입자의 크기가 200~400 nm의 범위를 나타내었다.

본 연구에서는 키토산의 또 다른 용제인 포름산을 사용하여 입세입자를 제조하였다. Fig. 5는 키토산을 포름산에 용해하였을 때, 키토산의 농도에 따른 점도의 변화를 나타낸 곡선이다. 이 곡선 또한 앞에서 살펴 본 바와 같은 경향을 나타낸다. 용제의 종류에 관계없이 점도가 급격히 증가하는 농도범위가 유사하게 나타나고 있다. 이는 용제 자체의 점도가 유사하기 때문으로 생각된다. Fig. 6은 키토산을 포름산에 3, 5, 7 wt%로 용해시켜 전기분사하여 제조한 미세입자들의 SEM 사진이다. 키토산을 5 wt%의 초산 수용액에 녹여 방사하였을 때보다 좀 더 균일한 입자가 형성되는 것을 알 수 있었다. 초산 수용액을 사용하는 경우와 마찬가지로 7 wt%의 조건에서는 일부 연속적인 섬유형태가 관찰되는 것을 볼 수 있다. 따라서, 전기분사 방식으로 미세입자를 제조하기 위해서는 고분자의 농도와 점도의 관계 곡선으로부터 제조조건을 설정하는 것이 중요하다고 할 수 있다.

글리콜키토산 미세입자

또다른 키토산 시료인 글리콜 키토산을 물에 용해하여 여러 가지 농도에서 전기분사를 실시하였다. Fig. 7은 수용성

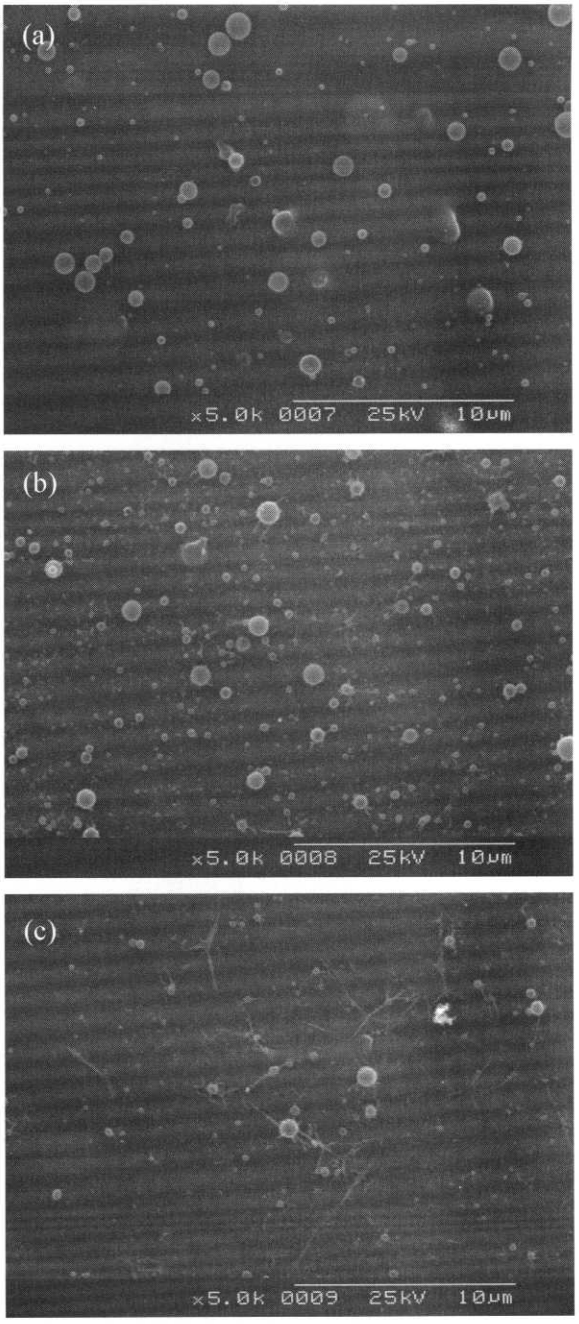

Fig. 6. SEM micrographs of nanoparticles electropsun from chitosan solution in formic acid: (a) 3 wt%, (b) 5 wt%, (c) 7 wt%.

글리콜 키토산의 농도에 따른 점도의 변화를 나타낸 곡선이다. 글리콜 키토산의 경우에는 분자량이 키토산 시료의 약 10분의 일에 불과하여 비교적 높은 농도까지 점도의 변화를 관찰하였다. 수용성 글리콜 키토산의 농도가 약 40 wt% 정도에서 점도가 증가하기 시작하다가 약 55% 정도에서 점도의 변화가 급격하게 일어나는 것을 볼 수 있다. Fig. 8은 수용성 글리콜 키토산을 여러 농도에서 전기분사 하였을 때의 미세입자의 형태변화를 보여주는 SEM 사진이다. 글리콜 키토산의 농도가 증가할수록 입자의 크기는 증가하는 경향을 보이

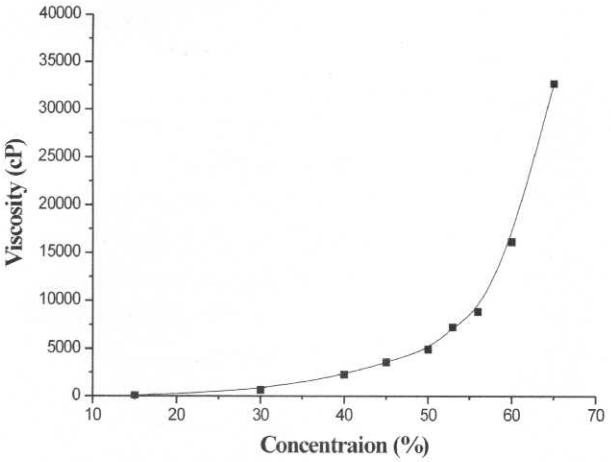

Fig. 7. Relationship between concentration and viscosity of glycolchitosan solution in distilled water.

다가, 섬유상으로 변화하면서 미세입자의 크기는 다소 감소하는 동시에 섬유의 양은 증가하는 경향을 보이고 있다. 또한 점도의 변화 곡선에서 알 수 있듯이 약 55% 이상의 농도에서는 주로 섬유가 형성되었음을 알 수 있다.

키틴 미세입자

시판되고 있는 키틴의 경우에는 용제로 디메틸아세트아미드(dimethylacetamide, DMAc)와 염화리튬(5% 함유)의 혼합용매가 주로 사용되고 있는데, 본 전기분사 방식에는 DMAc의 끓는점이 너무 높고, 염화리튬의 완벽한 제거에 어려움이 있어서 미세입자의 제조에 적용하기가 곤란하였다. 또한, 키틴을 인산에 녹여 전기분사를 하였을 경우엔 입자가 형성되지 못하고 큰 방울로 떨어졌다. 이것은 용매의 종류에 따라서 혹은 용액의 성질에 따라서 분사형태가 달라지며 분사 또한 가능하지 않을 수도 있다는 것을 시사한다. 따라서, 본 연구

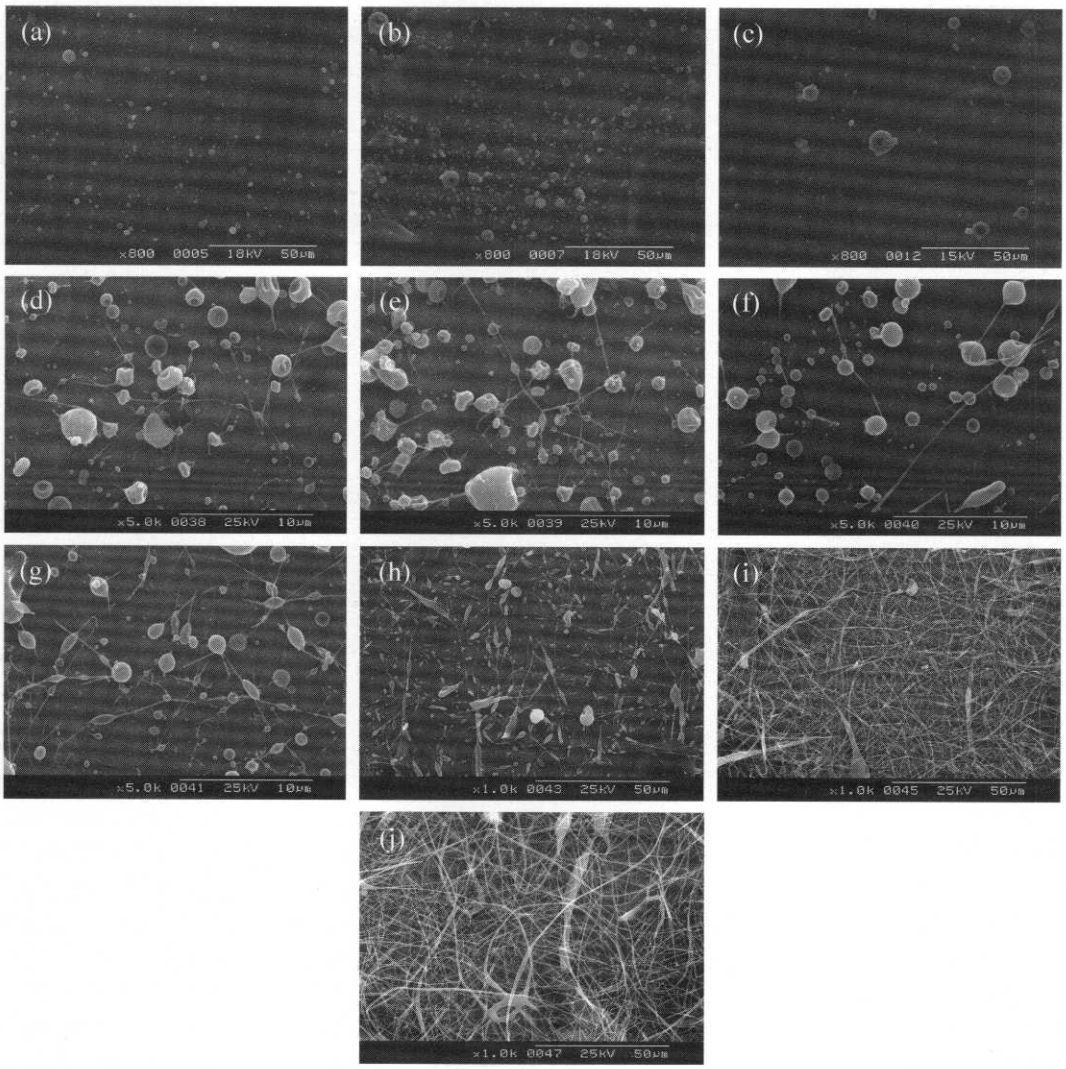

Fig. 8. SEM micrographs of nanoparticles electrospun from glycolchitosan solution in distilled water: (a) 30 wt%, (b) 35 wt%, (c) 40 wt%, (d) 45 wt%, (e) 49 wt%, (f) 53 wt%, (g) 56 wt%, (h) 59 wt%, (i) 60 wt%, (j) 65 wt%.

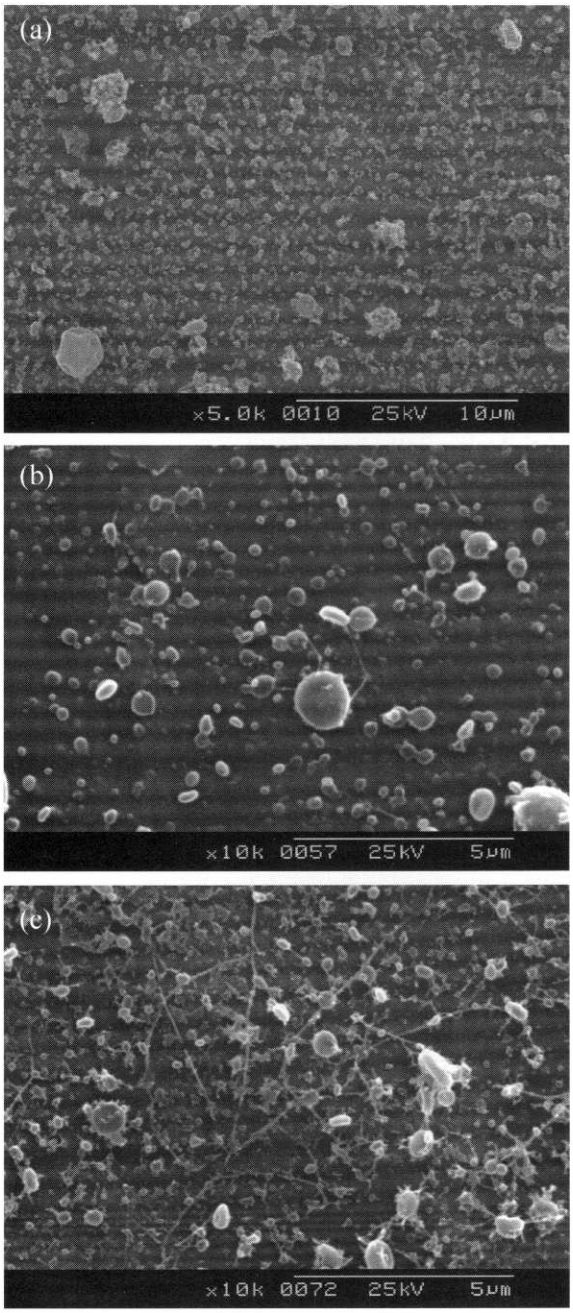

Fig. 9. SEM micrographs of nanoparticles from chitin solution in formic acid: (a) 6 wt%, (b) 7 wt%, (c) 8 wt%.

에서는 키토산 시료를 사용하여 균일계 N-아세틸화 반응을 통해서 키틴시료를 준비하였다. 본 실험에서 사용한 N-아세틸화 조건하에서 얻어진 키틴시료의 탈아세틸화도는 36% 정도이었다. 제조된 키틴시료는 포름산에 용해가 가능하여 용제로 포름산을 사용하였다. Fig. 9는 키토산의 아미노기에 선택적으로 아세틸화 시켜 제조한 키틴을 포름산에 용해하여 여러 농도에서 전기분사하여 얻어진 미세입자의 SEM 사진이다. 6 wt%에서 얻어진 키틴의 경우, 미세한 입자만 얻어진 것을 볼 수 있고, 7 wt%의 경우 다소 입자의 크기가 증가하

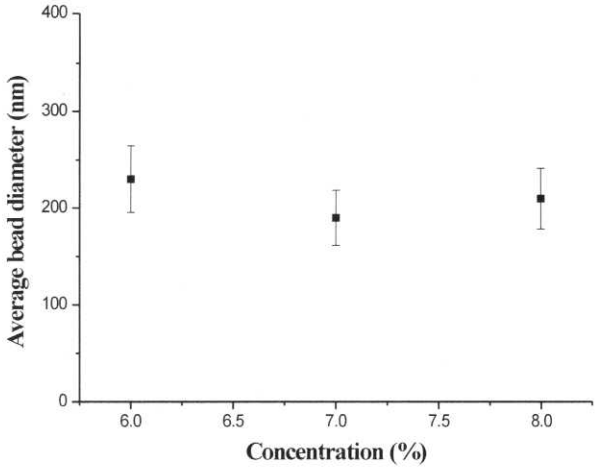

Fig. 10. The average diameters of chitin nanoparticles electrospun at different concentrations.

였고 일부 섬유상이 관찰되었다. 농도를 8 wt%로 증가시켰을 경우에는 대부분 섬유상으로 형태가 바뀌는 것을 알 수 있다. 본 연구에서 사용한 키틴의 경우, 앞서 언급한 키토산으로부터 제조하였기 때문에 농도에 따른 점도의 변화 및 섬유상으로 변하는 농도범위가 유사함을 알 수 있다. Fig. 10은 전기분사한 N-아세틸화된 키틴 미세입자의 크기변화를 농도별로 나타낸 그래프이다. 입자의 크기는 약 150-300 nm 정도로 매우 작았으며, 농도의 증가에 따라 입자의 크기가 다소 감소하는 경향을 보이는 것은 검토한 농도범위가 입자의 형태에서 섬유상 형태로 변화하는 영역이기 때문이다.

따라서, 키틴과 키토산을 용매와 분사조건을 달리하여 전기분사를 하였을 경우, 용액 내에서 고분자 사슬간의 엉킴이 적은 일정 농도 이하에서 균일하고 미세한 입자를 제조할 수 있다는 사실을 알 수 있었다.

요 약

최근 의약학용 바이오 소재로 각광을 받고 있는 키틴과 키토산을 전기적인 힘을 이용하는 전기방사장치를 사용하여 미세입자 형태로 제조하였다. 키틴 또는 키토산 시료에 대하여 고분자 농도가 일정한 수준(사슬 간의 엉킴이 본격적 일어나는 농도) 이상에서는 초극세 섬유의 형태를 보였으며, 그 농도 이하에서는 비교적 균일하고 미세한 입자를 형성하였다.

키토산의 경우, 5% 초산 수용액에 녹여 4~5 wt%로 분사하였을 경우 200~400 nm 크기의 미세입자를 제조할 수 있었다. 또한 농도가 증가할수록 입자의 크기가 커지면서 다소 불균일해지는 경향을 보였다.

수용성 글리콜 키토산은 분자량이 작기 때문에 높은 농도인 약 55 wt% 까지 미세입자가 생성되었다. 이 입자의 평균 크기는 약 300-500 nm 정도를 나타내었다.

키토산을 초산 수용액에 녹여서 무수 아세트산으로 처리하여 얻어진 N-아세틸화 키틴의 경우에는 포름산에 농도별로

녹여 전기분사를 하였는데 7 wt% 이하에서 균일한 미세입자가 생성되었다.

따라서, 키틴이나 키토산의 미세입자를 제조하기 위해서는 용매에 따라 일정한 농도와 점도와의 관계곡선으로부터 사슬간의 엉킴현상에 의해 섬유상이 형성되지 않은 낮은 농도에서 전기분사를 실시하는 것이 무엇보다도 중요하다는 것을 알 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부 나노핵심기반기술사업의 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Brine, C. J. and Austin, P. R.: Chitin variability with species and method of preparation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B : Biochemistry and Molecular Biology*, **1981**, *69*, 283-286
2. Baba, Y., Yamashita, T., Kawano, Y., and Uchida, Y.: Antifungal activity of aqueous soluble chitosan derivatives on fusarium and verticillium. *J. Chem. Soc. Japan*, **1996**, *1*, 48-53.
3. Castellanos-Perez, N., Maldanando-Vega, G., and Fernansez-Villagomez, G.: *Chitin and Chitosan*, Elsevier Applied Science, London, (1988)
4. Evans, E. E. and Kent, S. P.: The use of basic polysaccharides in histochemistry and cytochemistry IV. Precipitation and agglutination of biological materials by Aspergillus polysaccharide and deacetylated chitin. *J. Histochem. Cyto Chem.*, **1962**, *10*, 24-28
5. Shigemasa, Y., Sashiwa, H., Saimoto, H., Tokura, S., and Azuma, I. (Eds.): *Chitin Derivatives in Life Science*, pp. 86-92. Japanese Society for Chitin/Chitosan (1992)
6. Ikeda, I., Sugano, M., Yoshida, K., Sasaki, E., Iwamoto, Y., and Hatano, K.: Effects of chitosan hydrolyzates on lipid absorption and on serum and liver lipid concentration in rats. *J. Agric. Food Chem.*, **1993**, *41*, 431-437
7. Ueno, H., Mori, T., and Fujinaga, T.: Topical formulations and wound healing applications of chitosan. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2001**, *52*, 105-115
8. Reneker, D. H. and Chun, I. S.: Nanometre diameter fibres of polymer produced by electrospinning. *Nanotechnology*, **1996**, *7*, 216-223
9. Deitzel, J. M., Kleinmeyer, J., Harris, D., and Beck Tan, N. C.: The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles. *Polymer*, **2001**, *42*, 261-272
10. Hirano, S. and Yamaguchi, R.: N-Acetylchitosan Gel: A Polyhydrate of Chitin. *Biopolymers*, **1976**, *15*, 1685-1691

(2003년 8월 12일 접수, 2003년 9월 12일 채택)