

Chitosan계 인공피부의 개발 : I. Chitosan과 Sulfon화 Chitosan으로 된 고분자전해질 복합체의 합성과 성질

김 계 용 · 민 동 선 · 정 호 삼*

한양대학교 공과대학 공업화학과 · *한양대학교 의과대학 해부학교실
(1987년 12월 28일 접수)

Chitosan-based Skin Substitute ; I. Synthesis and Properties of Polyelectrolyte Complex Consisting of Sulfonated Chitosan and Chitosan

Kea-Yong Kim, Dong-Sun Min, and Ho-Sam Chung*

Dept. of Industrial Chemistry, College of Engineering, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea

**Dept. of Anatomy, College of Medicine, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea.*

(Received December 28, 1987)

요 약 : Chitosan과 술폰화 chitosan으로 된 고분자전해질복합체를 합성하여 인공피부로서의 이용가능성을 알아보기 위한 기초적인 물성을 검토하였다. chitosan과 술폰화 chitosan의 혼합비율, 수증기투과성, 산소투과성, 흡수율 및 습윤시 인장강도와 신장율 그리고 생체분해성에 대해 조사하였다. 그 결과 수증기투과성은 $400 \sim 500 \text{ g/m}^2 \cdot \text{day}$, 산소투과성은 $1.3 \sim 6.2 \times 10^{-8} \text{ cm}^3(\text{STP})/\text{cm}^2 \cdot \text{sec} \cdot \text{cmHg}$ 이었으며 흡수율은 94~150%이었다. 습윤시의 인장강도와 신장율은 각각 $0.6 \sim 0.4 \text{ kg/mm}^2$, 59~77%이었다. lysozyme에 의한 분해실험으로 부터 10~12일 이후에는 거의 분해하지 않음을 알 수 있었다. 또한 접촉각 측정결과 임계표면장력값이 $25.7 \sim 27.5 \text{ dyne/cm}$ 이었다. 이상의 실험결과로 부터 인공피부로서 요구되는 기본적인 물성값을 대부분 만족하고 있었다.

Abstract : The possibility of polyelectrolyte complex, which was prepared from chitosan and sulfonated chitosan, as a skin substitute was evaluated by measuring the tensile strength and elongation under wet state, water content, water vapor transmittance rate, permeability of oxygen and biodegradability. The polyelectrolyte complex was dissolved in a quaternary solvent mixture($\text{NaBr} / \text{water} / \text{DMF} / \text{DMSO} = 10 : 33 : 20 : 37$). Water vapor transmittance rate was $400 \sim 450 \text{ g/m}^2 \cdot \text{day}$ like that of the normal skin, the coefficient of oxygen permeability was $1.3 \sim 6.2 \times 10^{-8} \text{ cm}^3(\text{STP})/\text{cm}^2 \cdot \text{sec} \cdot \text{cmHg}$. The water absorption was 94~150%, and the tensile strength of $0.4 \sim 0.6 \text{ kg/mm}^2$ was lower than that of the normal skin. From the result of the biodegradability by lysozyme, the biodegradation rate was fast at the initial state but it was slow after 10-12 days. The critical surface tension was $25.7 \sim 27.5 \text{ dyne/cm}$. From the results obtained in this study, polyelectrolyte complex which was prepared from chitosan and sulfonated chitosan was found to satisfy most of the basic properties of a skin substitute.

서 론

생체재료로서 고분자전해질복합체(polyelectrolyte complex)가 응용된 것은 1960년대 Michaels 등¹의 연구가 최초이다. 고분자전해질복합체의 특징으로는 물과 전해질에 의하여 가소화되어 습윤시 유연성을 가지며 이온흡착선택성, 이온교환성, 높은 물투과성, 전해질 및 수용성저분자물질에 대해 높은 투과성을 나타내며 고분자물질은 투과되지 않는다.² 이러한 성질들을 이용하여 고분자전해질복합체막은 인공신장의 혈액투석막, 인공폐의 막으로서 높이 평가되고 있으며,³ 각막 이식재료 또는 콘택트렌즈재료,⁴ 조직적합성 및 혈액적합성재료^{5,6}로서 연구되고 있다.

이와같이 고분자전해질복합체가 생체재료로 널리 응용되고 있으나 아직 인공피부재료로 연구되고 있는 것은 없다. 고분자전해질복합체가 인공피부로서 요구되는 투과성, 기계적성질, 생체적합성 등의 조건을 만족하므로 본 연구에서는 양이온고분자로는 아미노기를 갖는 chitosan을, 음이온고분자로는 chitosan을 술폰화시킨 물질을 이용하여 고분자전해질복합체를 합성하여 chitosan을 기본물질로 하는 인공피부개발에 관하여 연구하였다.

Chitosan은 chitin을 강알칼리로 탈아세틸화하여 얻어지는 물질로 희박한 산성용액에 용해한다. chitin은 게, 새우등의 갑각류 및 균류, 조류등의 고등식물의 세포벽에 존재하는 천연고분자로 cellulose 다음으로 자원이 풍부하지만 거의 이용되지 못하고 있다. 수산자원이 풍부한 우리나라에서는 천연자원의 이용이라는 점에서 가치가 있으며 chitin과 chitosan이 무독성, 무공해성, 생분해성등의 특성이 있고 특히 Prudden 등⁷은 상처치료를 촉진시키는 효과를 갖고 있다고 보고하였다.

본 연구에서는 chitosan을 기본물질로 이를 술폰화하여 고분자전해질복합체를 합성하고 최적혼합비율과 인공피부로서 요구되는 기본적인 물성 즉 수증기투과성, 습윤시 기계적성질, 흡수율, 산

소투과성, 효소에 의한 분해성 및 생체적합성에 대해 조사하였다.

실 험

시 약

Chitosan은 일본동경화성제품으로 4% 수산화나트륨수용액으로 48시간 동안 처리한 후 물로 알칼리성분을 완전히 제거하고 건조하여 사용하였다. 피리딘은 수산화칼륨으로 탈수하고 증류하여 사용하였으며 chlorosulfonic acid는 감압증류하여 사용하였다. 그 외의 시약들은 일급시약을 그대로 사용하였다.

Chitosan의 Sulfonation⁸

5g의 chitosan을 2% 초산수용액 500 ml에 용해시킨 후 불용물을 제거하고 수산화나트륨수용액으로 중화하였다. 백색의 침전물을 물로 수 회 세척하고 에탄올, 무수에탄올, 무수에테르와 탈수정제된 피리딘으로 씻었다. 마지막으로 40 ml 탈수정제된 피리딘에 분산시켰다.

삼구플라스크에 탈수정제된 피리딘 60 ml를 넣고 얼음중탕으로 0℃로 유지하고 chlorosulfonic acid를 서서히 적하시켰다. 이 혼합물에 chitosan-피리딘 분산액을 넣고 80~100℃로 2시간동안 가열하였다.

실온으로 냉각시킨 후 반응혼합물에 물 200 ml를 가하고 2.5 N 수산화나트륨수용액으로 염상대로 만들었다. 여기에 에탄올 500 ml를 가하여 침전물을 생성시키고 다시 물 200 ml에 용해시켜 셀로 판막을 통하여 3일동안 물로 투석하였다. 용액을 100 ml로 농축시킨 후 포화염화나트륨수용액 10 ml를 가하고 에탄올 150 ml에 침전시켜 술폰화 chitosan을 얻었다.

고분자전해질복합체의 합성

Chitosan과 술폰화 chitosan을 각각 pH 2의 초산수용액에 0.5% 농도로 용해시킨 후 실온에서 교반시키면서 chitosan 용액에 술폰화 chitosan 용액을 서서히 적하하였다. 이때 탁도를 575 nm

에서 비색계로 측정하여 혼합비율에 대해 변화를 조사하였다. 탁도가 최대값을 나타낼 때의 복합체를 취하여 하루동안 정치한 후 원심분리하여 초산수용액과 물로 씻고 에탄올에 분산시켰다. 생성물을 여과분리한 후 에탄올과 에테르로 씻고 건조시켜 chitosan-술폰화 chitosan 고분자전해질 복합체를 얻었다.

고분자전해질 복합체막의 제조

합성한 고분자전해질복합체를 4성분계용매인 NaBr / water / DMF / DMSO(=10 : 33 : 20 : 37)의 혼합용매에 5 wt%로 용해시키고 유리판위에 제막하여 40 °C에서 3일간 감압건조하였다. 건조된 막은 물에 담구어 유리판으로 부터 분리하였다.

기계적성질의 측정

막을 폭 0.5 cm, 길이 3 cm로 절단한 후 인장시험기(Toyo Baldwin UTM-400)를 이용하여 건조상태와 습윤상태의 인장강도 및 신장율을 측정하였다. 습윤상태의 기계적성질은 막을 37 °C 물에 담구어 물의 흡수가 평형에 도달한 막을 사용하여 측정하였다.

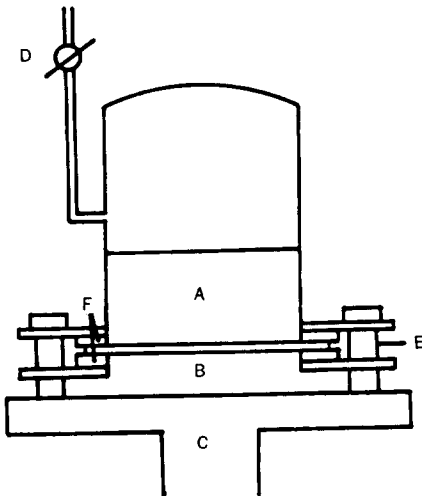


Fig. 1. Apparatus for water vapor permeability measurement.

A : Water D : Cock
B : Membrane E : Fixing Screw
C : Balance F : Silicone O-ring

흡수율의 측정

완전히 건조시킨 일정무게(w_d)의 막을 37 °C 물에 담구어 습윤상태의 무게(w_s)를 측정하여 다 음식에서 흡수율을 구하였다.

$$\text{흡수율}(\%) = (w_s - w_d) / w_d \times 100$$

수증기 및 산소투과성의 측정

수증기투과성은 Fig. 1과 같은 투과장치를 이용하여 F의 실리콘링사이에 막을 고정시키고 용기내에 물을 채운다. 투과장치전체의 무게를 측정한 다음 37 °C 항온실에 방치하고 처음에는 1 시간 간격으로 무게변화를 측정하고 24시간 이후에는 하루씩 무게변화를 측정하여 감소된 무게로부터 수증기투과량을 구하였다. 산소투과성은 Fig. 2와 같은 Batch식 기체투과장치를 이용하여 37 °C에서의 투과계수를 구하였다.

효소에 의한 분해실험

Table 1과 같은 조성을 갖는 유사체액⁹을 제조하고 Sigma사 제품의 lysozyme을 이 유사체액에 1 mg / ml로 용해시켜 효소용액을 만들었다. 막을 효소용액에 담근 후 37 °C에서 일정주기로 꺼내어 분해율과 기계적 성질을 측정하였다.

접촉각의 측정

Table 2의 액체들을 사용하여 20 °C에서 접촉각을 측정하고 Zisman plot에 의해 각 시료의 임계표면장력을 구하였다.

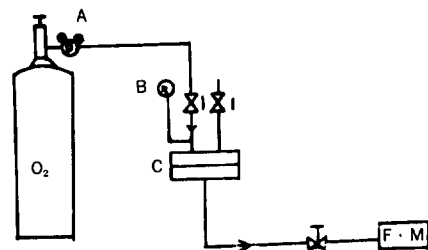


Fig. 2. Schematic diagram of gas permeation apparatus.

A : Pressure Regulator C : Permeation Cell
B : Pressure Gauge F.M : Flow Meter

Table 1. Composition of Pseudo-Extracellular Fluid (PECF).

Ion	Extracellular fluid* (meq / l)	PECF (meq / l)
Na ⁺	142	145
K ⁺	4	5
Ca ⁺⁺	5	
Mg ⁺⁺	3	
NH ₄ ⁺	0.3	
Cl ⁻	103	118
HCO ₃ ⁻	27	30
HPO ₄ ⁻	3	2

*D. C. Sabiston, Textbook of Surgery, 11th Ed. p110, 1977

NaHCO₃ : 30 meq / l

K₂HPO₄ : 2 meq / l

NaCl : 115 meq / l

KCl : 3 meq / l

Table 2. Surface Tension of Various Liquids.

Liquids	Surface tension(dyne / cm.)
Water	72.5
Glycerol	63.4
Formamide	58.2
Ethylene glycol	47.7
Diethylene glycol	45.2
Aniline	42.9
Benzyl alcohol	39.0
Bromobenzene	36.5
Oleic acid	32.5
1,2-dichloroethane	31.16
Tetrachloromethane	26.4
n-butyl alcohol	24.6

결과 및 고찰

Chitosan의 탈아세틸화도

본 실험에 사용된 chitosan의 탈아세틸화도를 알아보기 위하여 일정량의 chitosan을 염산수용액에 용해시킨 다음 수산화나트륨수용액으로 중화조정하였다. 그 결과 Fig. 3과 같이 두개의 변곡점을 얻었다. 이 두 변곡점사이에 소비된 수산

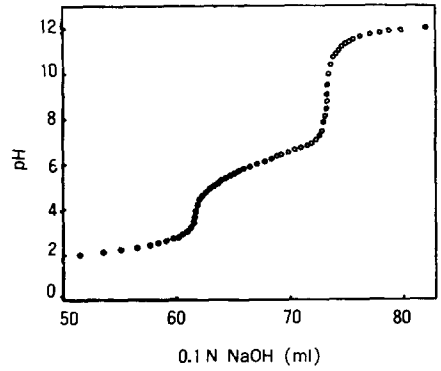


Fig. 3. Titration curve of chitosan sample dissolved in HCl with NaOH solution.

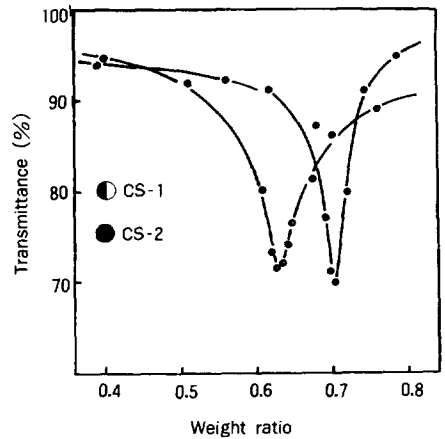


Fig. 4. Turbidity curves plotted against the mixing ratio(R) for chitosan-sulfonated chitosan system at 575 nm.

화나트륨의 양이 chitosan의 아미노기의 양과 같다.¹⁰ 따라서 76%가 탈아세틸화되어 있는 것을 알 수 있었다.

고분자전해질 복합체의 형성

고분자전해질복합체형성에 사용된 술폰화 chitosan은 원소분석 결과로 부터 술폰화율이 0.882와 0.644이었으며, 전자의 술폰화 chitosan을 사용하여 합성한 고분자전해질복합체를 CS-1, 후자의 경우 CS-2라 한다.

Fig. 4에 chitosan과 술폰화 chitosan의 혼합비율에 대한 탁도의 변화를 나타내었다. 혼합비율

은 $R = m_a / (m_c + m_a)$ 로 m_a 는 술폰화 chitosan의 무게, m_c 는 chitosan의 무게이다. 최소의 투과율 즉 최대의 탁도를 나타낼 때 혼합비율을 R_{max} 라 하면 R_{max} 는 각 조성의 복합체분산용액을 24시간 정치한 후 측정된 최대의 투과율(최소 탁도)과 일치하였다. 이것은 복합체 입자들이 정량적으로 결합하여 침전물을 형성한 것이라고 생각된다.¹¹ 이때 구한 최적조성비(chitosan : 술폰화 chitosan)는 CS-1이 1 : 1.7, CS-2가 1 : 2.3이었다. 또한 고분자전해질복합체를 IR로 확인한 결과(Fig. 5), 1630 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$)와 1540^{-1} ($\text{C}=\text{NH}$)에서 chitosan 부분을, 1240 cm^{-1} ($\text{S}=\text{O}$)와 810 cm^{-1} ($\text{C}-\text{O}-\text{S}$)에서 술폰화 chitosan을 확인할 수 있었다.

고분자전해질 복합체의 용해성

일반적으로 고분자전해질복합체는 일반유기용매에는 용해하지 않는 난용성물질이다. Table 3에 합성한 복합체의 용해성을 나타내었다. 대부분의 단일 유기용매에는 용해하지 않았으며 dichloroacetic acid에는 부분적이지만 약간 용해되었다. 그리고 formic acid에는 실온에서는 일부 용해하고 가열하였을 때는 분해하였다. 또한 강전해질, 물 및 극성용매로 된 3성분계용매에서도 대부분이 용해하지 않았으며 dimethylsulfoxide를 사용한 경우에는 부분적으로 용해하였다. 그러나 4성분계용매(NaBr / Water / DMF / DMSO=10

: 33 : 20 : 37)에서는 5 %농도이하에서 48시간이 후에 완전히 용해하였다.

막의 기계적성질

Table 4에 건조상태와 습윤상태에서의 막의 인장강도와 신장율을 나타내었다. 고분자전해질복합체막은 chitosan막보다 전반적으로 낮은 값을 보였으며 술폰화율이 낮은 시료가 인장강도는 작은 값을, 신장율은 큰 값을 나타냈다. 이것은 술폰화율이 큰 경우 분자간 이온결합이 증가되고 결합이 조밀해지면서 나타나는 현상이라 생각된다. 상처피복재는 신체의 움직임에 대해 신축성을 가져야 하는데 본 실험에서 측정한 시료들은 collagen 부직포¹²에 비해서 인장강도는 다소 낮았지만 신장율은 우수하였다. 그러나 nylon편물을 사용한 Biobrane¹³ 보다는 신장율이 다소 낮았다. 이것은 다른 재료와의 복합화 또는 가소화 물질을 첨가함으로써 향상시킬 수 있을 것으로 기대된다.

Table 3. Solubility of Chitosan -Sulfonated Chitosan Complexes.

Sample Solvent	CS-1		CS-2	
	R	H	R	H
DMSO	I	I	I	P
DMF	I	I	I	I
DCA	P	P	P	P
Formic acid	P	D	P	D
Ternary system				
a)	I	I	I	I
b)	I	I	I	I
c)	I	P	P	P
Quaternary system				
*	S	-	S	-

R : Room temperature, H : Heating

I : Insoluble, P : Partially soluble, D : Degradation

S : Soluble

a) NaBr / Water / Acetone (20 : 60 : 20)

b) NaBr / Water / DMF (20 : 60 : 20)

c) NaBr / Water / DMSO (20 : 60 : 20)

* NaBr / Water / DMSO (10 : 33 : 20 : 37)

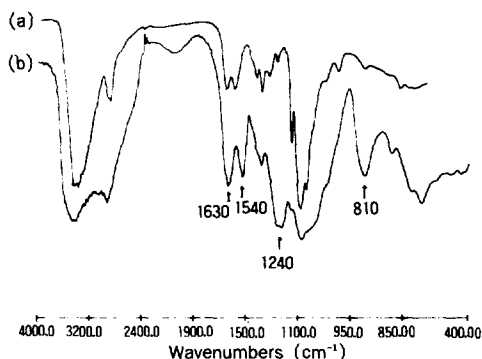


Fig. 5. IR spectra : a) chitosan, b) chitosan-sulfonated chitosan complex.

막의 흡수성과 투과성

상처피복재가 갖추어야 할 가장 중요한 것이 수증기 투과성이다. 상처피복재는 정상피부와 비슷한 투과성을 가지고 있어서 상처부위로 부터 과량의 체액손실을 방지하여야 하며, 100%내외의 흡수율을 가지고 있어서 배출된 체액을 흡수하여 상처부위에 체액이 고여 발생하는 세균감염 및 피복재의 탈리를 방지하여야 한다. 정상피부의 수증기투과성은 $200 \sim 500 \text{ g/m}^2 \cdot \text{day}$ 로 본 실험에 사용된 막들은 이 값을 만족하였으며 흡수율도 100%정도로 상처부위에 체액이 고이는 것을 방지할 수 있다고 본다 (Table 5). 또한 산소투과성도 $10^{-8} \text{ cm}^3(\text{STP})\text{cm/cm}^2 \cdot \text{sec} \cdot \text{cmHg}$ 정도로 비교적 우수하였다. chitosan막보다 고분자전해질 복합체막이 우수하였으며 슬론화율이 작은 시료가 전반적으로 큰 값을 보였다. 이것은 슬론화율이 작은 경우 분자사이의 결합이 적게 되고 분자간의 결합간격이 크게 되어 물분자의 침투가 용이하여 흡수율이 증가된 것에 영향을 받아 투과성이 향상된 것이라고 생각된다.

생체적합성 및 분해성

Fig. 6에 Zisman plot에 의하여 구한 각 시료

Table 4. Mechanical Properties of Chitosan and Chitosan-Sulfonated Chitosan Complexes.

Sample	Tensile strength(kg/mm ²)		Elongation(%)	
	Dry	Wet	Dry	Wet
Chitosan	2.22	0.69	17.7	88.2
CS-1	1.94	0.61	5.5	59.3
CS-2	1.59	0.42	11.0	76.7

Table 5. Water Vapor and Oxygen Permeability of Chitosan and Chitosan-Sulfonated Chitosan Complex Membranes.

Sample	Water vapor (g/m ² day)	Oxygen($\frac{\text{m}^3(\text{STP})\text{cm}}{\text{cm}^2\text{sec cmHg}}$)	Degree of swelling(%)
Chitosan	362.2	8.02×10^{-9}	45.2
CS-1	399.9	1.36×10^{-8}	93.8
CS-2	443.5	6.23×10^{-8}	150.3

의 임계표면장력을 나타내었다. chitosan이 27.7 dyne/cm, CS-1이 25.7 dyne/cm, CS-2가 27.5 dyne/cm로 거의 비슷한 값을 보였다. 일반적으로 임계표면장력이 생체적합성 평가에 절대적 인자는 아니지만 20~30 dyne/cm일 때 생체적합

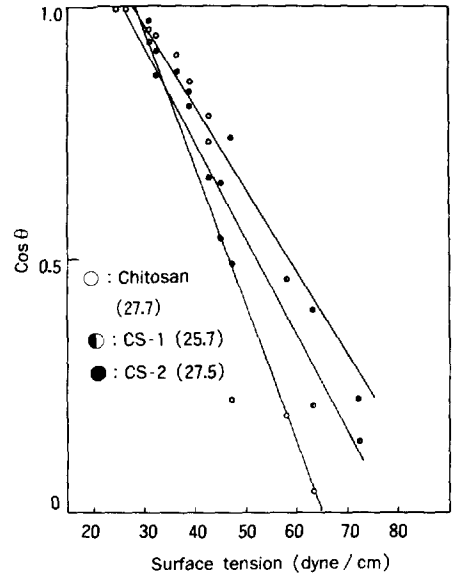


Fig. 6. Critical surface tensions of chitosan and chitosan-sulfonated chitosan membranes by Zisman plot.

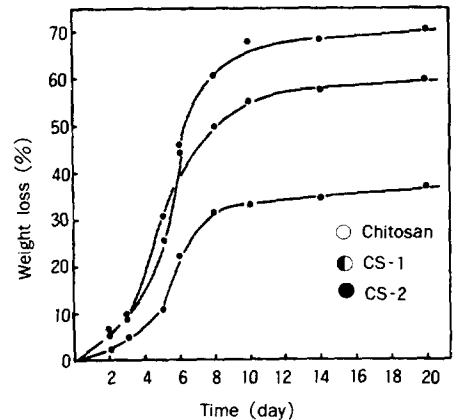


Fig. 7. Biodegradation of chitosan and chitosan-sulfonated chitosan complexes by lysozyme at 36 °C.

성이 우수한 것으로 보고되어 있다.¹⁵ 따라서 각 시료들의 임계표면장력을 측정함으로써 생체적합성의 우열을 예측할 수 있다.

상처피복재는 상처부위를 피복보호하는 것 외에도 상처부위에서 일정기간동안 서서히 분해하면서 이 분해산물에 의해 상처치료를 촉진할 수 있어야 한다.

따라서 본 연구에서는 in vitro로 체액에 존재하는 muco 다당류의 분해효소인 lysozyme을 이용하여 분해실험을 하였다. Fig. 7에 분해시간에 따른 시료의 무게감소변화를 나타내었다. 초기에는 빠른 분해속도를 보였으나 10~12일 이후에는 서서히 분해하여 분해속도가 둔화되었으며 20일 이후에도 막의 형태는 계속 유지하고 있었다. chitin이나 chitosan은 체내에서 단량체, 이량체 및 oligomer 등으로 분해하여 이들이 상처치료를 촉진한다.⁷ 따라서 본 연구에서 측정 한 시료들은 체내에서 적절히 분해되어 상처치료를 촉진시킬 수 있을 것으로 기대된다.

결 론

Chitosan과 chitosan을 술폰화한 물질로 고분자전해질복합체를 합성하여 상처피복재로서의 기본적인 물리화학적성질을 검토하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 고분자전해질복합체의 chitosan과 술폰화 chitosan의 최적형성조성비는 CS-1의 경우 1:1.7, CS-2는 1:2.3이었으며 이들의 용매는 4성분계 계용매로 NaBr / water / DMF / DMSO=10:33:20:37이었다.

2) 기계적성질은 다소 낮은 값으로 탄성을 부여할 필요가 있다고 생각된다.

3) 흡수율 및 투과성은 적당하였으며 특히 상처피복재로서 가장 중요한 수증기투과성은 400 g / m²·day로 정상피부와 같은 값을 가지고 있었다.

4) 임계표면장력과 효소분해성으로 부터 생체

적합성이 우수하며 상처치료를 촉진시킬 수 있다고 생각된다.

이상의 실험결과로 부터 앞으로 진행할 동물실험 및 임상실험에서 좋은 결과를 얻을 수 있으리라 기대된다.

감사의 글: 본 연구는 학술진흥재단과 한양대학교의 교내연구비 보조에 의해 이루어졌으므로 이에 사의를 표합니다.

참 고 문 헌

1. A. S. Michaels and R. G. Miekka, *J. Phys. Chem.*, **65**, 1765(1961).
2. A. S. Michaels, *Ind. Eng. Chem.*, **57**, 32(1965).
3. L. L. Markley, H. J. Bixler, and R. A. Cross, *J. Biomed. Mater. Res.*, **2**, 145(1968).
4. M. F. Refojo, *J. Appl. Polym. Sci.*, **11**, 1991(1967).
5. K. Kataoka, M. Maeda, T. Nishimura, Y. Nitadori, and T. Tsuruta, *J. Biomed. Mater. Res.*, **14**, 817(1980).
6. H. Fukuda and Y. Kikuchi, *J. Biomed. Mater. Res.*, **12**, 531(1978).
7. L. L. Balassa and J. F. Prudden, Proc. 1st International Conference Chitin / Chitosan, MIT(1977) p296.
8. M. L. Wolfrom and T. M. Shen Han, *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 1764(1959).
9. C. A. Homsy, *J. Biomed. Mater. Res.*, **4**, 341(1970).
10. R. A. A. Muzzarelli, "Chitin", Pergamon Press, Oxford(1977) p103.
11. S. Hirano, C. Mizutani, R. Yamaguchi, and O. Miura, *Biopolymers*, **17**, 805(1978).
12. 宇津尾明, 松友勝己, 化學工業, **25**, 1245(1974).
13. E. Aubrey Woodroof, *Burn Wound Coverings*, **2**, 1(1984).
14. 富士原行彦, 工業材料, **33**, 50(1985).
15. R. E. Baier, *Bull. N. Y. Acad. Med.*, **48**, 257(1972).