

## Chitosan 人工膜을 통한 Sodium ion과 Copper ion의 침투성

환경위생과 이 치 영  
부 교 수

### I. 서 론

chitosan( $\alpha(1-4)2$ -amino-2-deoxy- $\beta$ -D-glucan)은 chitin으로부터 alkali로 deacetylation하여 얻을수 있는 物質로서 자연계에 광범위하게 분포되어 있고 天然的인 cellulose의 유도체로서 有機溶媒나 물에 전혀 溶解되지 않는 生體高分子(biopolymer)이다.

自然界에서는 녹조류(green algae), 곰팡이의 세포벽 및 갑각류의 껍질에 존재하고<sup>1)</sup>人間에게는 結核조직의 多糖類로서 hyaluronic acid, kelatin sulfate, heparin, 등과 비슷한 구조를 하고 있으며, 最近에는 manosyl-D-N-acetyl chibose의 內部(core) 構造로 알려져 있다.<sup>2)</sup>

포유 동물에서는 mucose membrane의 chitinase에 의해서만 가수분해 되며,<sup>3)</sup>人間에서는 소화관내 chitinase가 존재하지 않으나 少量의 chitin을 食品으로 利用하고 있다. M. Sugano 등<sup>4)</sup>은 토끼에 chitosan을 투여하면 현저하게 中性 steroidal의 배설을 증가 시키고 低 cholesterol의 作用을 한다고 보고 하였으며 Smiley와 Strandberg<sup>5)</sup>는 가교제인 glutaraldehyde를 이용하여 aldolase, glyceraldehyde- $\textcircled{3}$ -p-dehydrogenase, fructose-1-6-diphosphate 등의 효소들을 chitosan matrix에 固定化 하였고 Y. nozawa 등<sup>6)</sup>은 chitosan matrix에 직접 결합시켜 typsin을 고정시켜 효소 活性을 持續시켰다고 보고 하였다.

近來에 chitosan은 좋은 生體適合性(biocompatability) 때문에 生體醫藥用分野(biomedical field)에 널리 利用되어 지고 있으므로서 저자는 人工膜(artificial membrane) 開發의 一環으로써 chitosan膜을 통한 copper 이온 및 sodium 이온의 permeation과 이의 물리화학적 성질을 비교 분석하여 여과 재료로서의 타당성을 살펴 보았다.

### II. 실험재료 및 방법

재료: NaOH (Junsei chemical co.)

acetic acid (sigma co.) CuSO<sub>4</sub> (Sigma co.) 등을 구입하여 재결정 하지 않고 본 실험에 이용 하였으며 chitosan은 本研究室에서 製造하여 사용하였다.

방법: a) 새우 껍질에서 Chitin제조

Hackman方法<sup>7)</sup>에 따라 새우껍질(Penaeus Orientalis, Penaeidae)을 물로 세척하여 껍질에

부착된 단백질을 완전히 제거 한 다음, 100°C에서 건조한 후에 220g의 새우껍질에 2N-HCl 12ℓ를 가하여 실온에서 5시간 동안 처리하여 석회질을 제거 한후 고형물을 다시 물로 세척하고 100°C에서 건조 한 다음 미세한 粉末로 하여 2N-HCl 500ml을 가한 다음 48시간 처리 한 후에 원심분리 하여 얻은 잔사를 100°C에서 N-HCl 1500ml의 용액으로 中和시키고 잔사는 다시 원심분리 하고 수회 무수 ethanol과 ether로 세척 하여 37g의 chitin을 얻었다.

b) chitin에서 chitosan 제조—Horton 등<sup>8)</sup> 방법에 따라 chitin을 질소하에서 40% NaOH 용액을 가하여 115°C에서 6시간 동안 deacetylation한 다음 여과하고 中性이 될때까지 물로 세척 한후에 건조 시키고 4% acetic acid에 용해 시킨후 24시간 후에 원심 분리 하고 46% NaOH 용액으로 처리하여 백색 침전물을 얻었다. 이 침전물을 여과하여 증류수, ethanol, ether로 세척하고 건조한 후에 제정제하기 위하여 90°C에서 40% NaOH 용액으로 1시간 동안 처리한 후에 원심 분리 하고 세척 한 후 건조한 다음 4% acetic acid로 재 용해시키고 여과한 여액에 2.5N-NaOH 용액으로 처리한 후에 증류수, ethanol, ether로 세척하여 이 과정을 3회 반복하여 건조 시키고 분말 하여 100mesh을 통과한 Chitosan을 실험 재료로 사용 하였다.

c) chitosan 膜의 제법—Yaku<sup>9)</sup>등의 수정 방법으로 chitosan 10g을 2% acetic acid 300ml에 교반하여 人工膜을 제조하였으며 이 과정을 Fig.1에 도시 하였다.

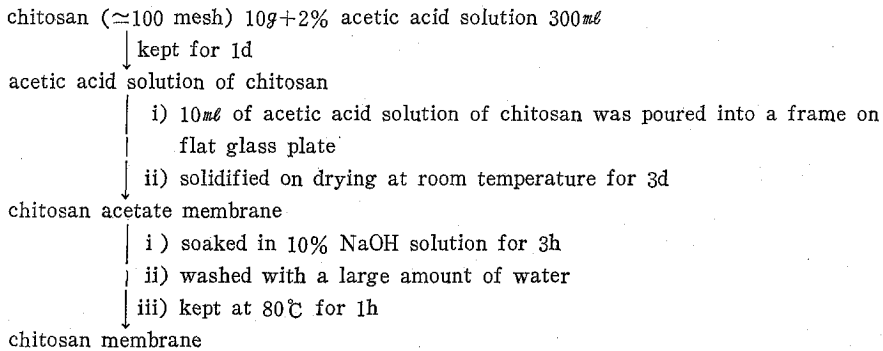


Fig. 1. Preparation of Chitosan Membrane

d) 人工膜의 침투율 실험에 대한 장치—polymer 膜의 Na<sup>+</sup> 및 Cu<sup>++</sup>의 확산 계수 (diffusion coefficient) 및 침투율(permeability)을 측정 하기 위해 Fig.2에서 체럼 176ml의 용량을 갖는 2개의 구획실(compartments)의 사이에 유리로 된 diffusion cell에서 측정하였다. 각 구획실(compartments)은 1600r.p.m의 속도를 갖는 motor로 계속

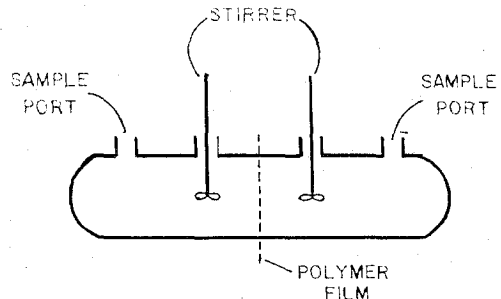


Fig. 2. Schematic diagram of the diffusion cell.

하여 stirring 하였다.

처음 한 chamber에 deionized water를 가득 채우고 두번째의 chamber에는  $\text{Cu}^{++}$  및  $\text{Na}^+$  농도가  $1\text{mg}/\text{ml}$  함유 하도록 하였다.

e)  $\text{Na}^+$  및  $\text{Cu}^{++}$ 의 정량— $\text{Na}^+$ 의 濃度는 Corning ion meter model 130으로 측정 하였으며  $\text{Cu}^{++}$ 의 양은 Borchart등<sup>10)</sup>의 방법으로 Spectrophotometer (Shimadzu UV-140) 484mm에서 측정 하였다.

f) 人工部의 두께 측정—人工膜의 두께는 Mitsutoyo 101—103 micrometer로 측정하였다. 이때 膜의 두께는 수회 측정 하여 그 평균치가 0.01cm이었고 그 표면적은 14.2cm<sup>2</sup>이었다.

### III. 결과 및 고찰

#### 1. Chitosan 膜의 분배계수(Partition coefficient)

polymer membrane의 분배계수(partition coefficient)  $Kd$  값은 膜内の 濃度  $C_1$ 과  $C_1'$  (Fig. 3)을 일반적으로는 알 수 없지만 partition coefficient로 나타낼 수 있다. Fig. 3에서  $Kd = \frac{C_1'}{C_1} = \frac{C_1'}{C_1}$ 이므로 chitosan內에  $\text{Na}^+$ 의  $Kd$ 는 0.0443이었다.

chitosan 膜의  $Kd$  값은 Nakagaki등<sup>11)</sup>이 보고한 cellulose 膜의  $Kd$  값과 비슷한 수치를 나타내주고 있다.

#### 2. 擴散계수(diffusion coefficient)

重合體 膜(polymer membrane)을 이동한 溶質의 運搬(transport)에 대한 것은 細孔의 흐름(pore flow)이나 溶質의 擴散기전(diffusion mechanism)에 의한 것으로써 細孔(pore)을 통한 용질의 흐름은 重合體 膜內에 있는 細孔(microchannel)에 가득찬 溶媒를 통해서 이루어진 것이며 溶媒—擴散의 기전은 重合體 사슬 사이에서 擴散(diffusion)이 계속해서 일어나는 것과 重合體網(polymer network)에서 溶出(dissolution)에 의한 것이라 하였다.<sup>12, 13)</sup>

Craig등<sup>14~17)</sup>은 膜의 細孔을 통과한 溶質의 침투율(permeability)은 溶質의 分子量의 크기와 상관성이 있다고 하였고, Cowsar등<sup>18~20)</sup>은 Fick's 擴散法則에 지배 된다고 하였다.

Fick's First 法則은  $J = -D \left( \frac{dC_m}{dl} \right)$ .....①

$J = \text{Flux} (\text{g}/\text{cm}^2/\text{sec})$

$D = \text{diffusion coefficient} (\text{cm}^2/\text{sec})$

$C_m = \text{concentration of solute in polymer} (\text{g}/\text{cm}^3)$

$l = \text{thickness of the polymer barrier.}$

$dC_m/dl = \text{Gradient in concentration across polymer barrier.}$

膜의 障壁(membrane barrier)內的 농도경사는 다음과 같이 표시할 수 있다(Fig. 3).

$$\frac{-dm}{dt} = \frac{C_I - C_{II}}{l} \dots\dots\dots ②$$

이때  $C_I$ 과  $C_{II}$ 는 膜의 바깥쪽의 donor (I)와 receptor (II)에서의 表面의 농도이고  $l$ 은 膜의 두께이다.

만약 분배계수(partition coefficient)가 溶質의 농도와 관계가 없다면 아래와 같이 바꿀수 있을 것이다.

$$\frac{-dm}{dt} = \frac{kd(C_I - C_{II})}{l} \dots\dots\dots ③$$

주어진 式  $J = D \times \frac{-dm}{dt}$ 이므로 式 ③을 式 ①에 代入 하면

$$J = \frac{D \cdot kd(C_I - C_{II})}{l} = \frac{P \times (C_I - C_{II})}{l}$$

∴침투율(permeability),  $P = D \times kd$ . 구획실(compartment) flux (I)과 compartment flux (II)가 평행상태에 도달하면 Flux,  $J$ 는 다음과 같다.

$$-J = \frac{V}{A} \frac{dC_I}{dt} \dots\dots\dots ⑤, \quad J = \frac{V}{A} \frac{dC_{II}}{dt} \dots\dots\dots ⑥$$

$A$ 는 膜의 表面積이고  $V$ 는 compartment의 溶量이다. 式 ⑤—⑥에서

$$\begin{aligned} \frac{V}{A} \cdot \frac{dC_I}{dt} - \frac{V}{A} \times \frac{dC_{II}}{dt} &= 0 \\ \frac{V}{A} \left( \frac{d(C_I - C_{II})}{dt} \right) &= \frac{-P(C_I - C_{II})}{l} \\ \therefore \frac{d(C_I - C_{II})}{dt} &= \frac{-2P \times A(C_I - C_{II})}{V \times l} \dots\dots\dots ⑦ \end{aligned}$$

구획실(compartment) I, II의 농도가 시간  $t_{oss}$  일때  $C_1 - C_2$ 이고, 시간  $t_{ss}$  일때의 농도가  $C_3 - C_4$ 라고 하면 式 ⑦을 적분하여

$$\int_{C_1 - C_2}^{C_3 - C_4} \frac{d(C_I - C_{II})}{C_I - C_{II}} = -2P \times A \int_{t_{oss}}^{t_{ss}} dt.$$

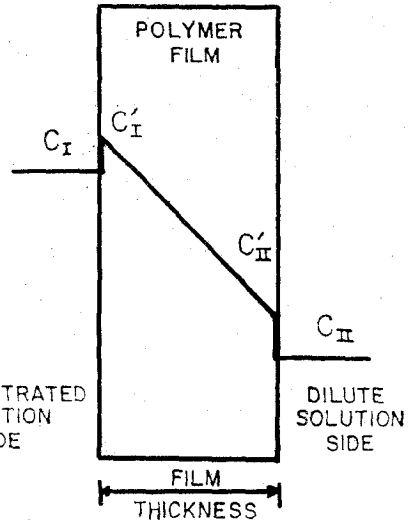


Fig. 3. Diagrammatic representation of solute permeation through a polymer film.

$$\ln\left(\frac{C_3-C_4}{C_1-C_2}\right) = \frac{-2P \times A}{V \times l} (tss - toss) \dots \dots \dots (8)$$

compartment의 모든 용액의 평형은 정지상태(steady state)에서

$$C_0 \times V = C_1 V + C_2 V + C_m V_m$$

$$C_0 \times V = C_3 V + C_4 V + C_m V_m$$

$C_0$ 은 donor phase의 처음농도이고  $C_m$ 은 膜內的 농도이며  $V_m$ 은 膜의 용량이다. 膜內的 농도는

$$C_m = \frac{kd(C_1 - C_2)}{2} = \frac{kd(C_3 - C_4)}{2} \dots \dots \dots (11)$$

로 정의할 수 있다.

式 11을 式 9와 式 10에 代入하여

$$C_1 = \frac{2}{2 \times V + kd \cdot V_m} \left( C_0 \cdot V - C_2 V - \frac{kd C_2 \cdot V_m}{2} \right) \dots \dots \dots (12)$$

$$C_3 = \frac{2}{2V + kd \cdot V_m} \left( C_0 \cdot V - C_4 \cdot V - \frac{kd C_4 V_m}{2} \right) \dots \dots \dots (13)$$

式 12-13을 式 8에 代入하면

$$\ln \frac{C_0 \cdot V - (C_2 V + kd V_m) C_4}{C_0 \cdot V - (2V + kd V_m) C_2} = \frac{-2PA}{Vl} (tss - toss) \dots \dots \dots (15)$$

이때  $kd$ 가 무한적으로 적어지고  $toss$ 가 Zero에 가까워지면  $C_2$ 도 역시 Zero에 가까워질 것이다.

$$\ln\left(1 - \frac{2C_4}{C_0}\right) = \frac{-2PA}{Vl}, t \dots \dots \dots (15)$$

이때 permeability는 시간  $t$ 에 대하여 圖示하면 直線을 나타내게 되는바  $Na^+$ 의 chitosan膜의 permeation coefficient를 단위시간 마다 측정 하여 그 값을 Table 1에 나타냈으며 처음  $NaCl$ 의 농도는  $1000 \mu g/l$ 이었고  $Na^+$ 의 용출율(released fraction)이 0.5일때 시간은 70hrs.

**Table 1. Fraction of Sodium Chloride Released Versus Time for Sodium chloride Permeation through Chitosan membrane.**

Time (Hours)	10	20	30	40	50	60	70
Released amount (mg)	28.035	47.303	63.245	72.660	81.743	85.768	87.514
Fraction (Q/Q <sub>∞</sub> <sup>a</sup> )	0.16	0.27	0.36	0.42	0.47	0.49	0.50

a) Fraction of Sodium Chloride.  
(amount  $Na^+$  released per initial  $Na^+$  concentration)

Table 2. Diffusion Coefficient, Partition Coefficient and Permeability for Sodium Chloride and Copper sulfate in Chitosan membrane at Room Temperature.

	NaCl	CuSO <sub>4</sub>
$C_0 \times 10^{-3} \text{mg/l}$	1.00	1.00
$L(\text{cm})$	0.01	0.01
$P \times 10^7 (\text{cm}^2/\text{S})$	3.52	—
$D \times 10^5 (\text{cm}^2/\text{S})$	7.95	—
Kd	0.0443	—

이었다.

이때 Na<sup>+</sup>에 대한 chitosan 膜의 침투율(permeation coefficient)는  $3.52 \times 10^{-7} \text{cm}^2/\text{sec}$ 이었고 식  $P = D \times kd$ 에서 확산계수(diffusion coefficient)는  $7.95 \times 10^{-6} \text{cm}^2/\text{s}$ 이었다(Table 2).

이것은 chitosan 膜의 細孔(pore)으로 Na<sup>+</sup>이 permeation 한것으로 생각된다. 반면에 copper ion은 70시간 이후에도 permeation 되지 않으므로(Fig. 4) 이것은 chitosan 膜과 copper ion과의 착화합물(chelation) 형성으로 생각되며, chitosan의 amino 基와 protonation의 결과로 사료된다.

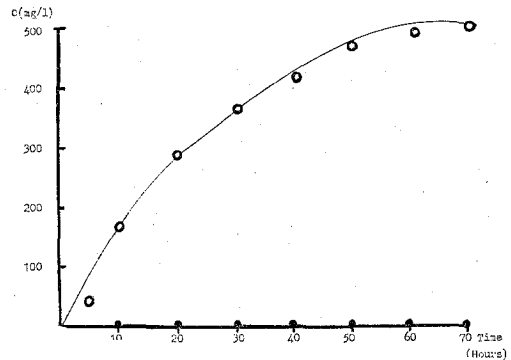


Fig. 4. Permeation of chitosan membrane by copper and sodium ions.  
Key: O, Na<sup>+</sup> and Cu<sup>++</sup>, ●

#### IV. 결 론

Chitosan 膜에 Copper ion과 Sodium ion을 permeation하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Sodium ion에 대한 Chitosan 人工膜의 Partition coefficient는 0.0443이었고 Diffusion coefficient는  $7.95 \times 10^{-6} \text{cm}^2/\text{sec}$  이었으며 Permeability는  $3.52 \times 10^{-7} \text{cm}^2/\text{sec}$ 이었다.
2. Copper ion은 Chitosan 人工膜을 통과하지 못하였다. 이것은 Cu<sup>++</sup>와 Biopolymer인 Chitosan 膜內的 Amino基와 Chelation 形成으로 생각된다.

이상의 결과로 Chitosan 人工膜으로 Drug Delivery System의 Control Drug Release Matrix와 그리고 상수 및 폐수의 중금속의 여과 재료로서 이용할 가치가 있다고 사료된다.

## 참 고 문 헌

1. R.D. Preston, *The physical Biology of Plant cell wall*, Chapman and Hall, London, England (1974)
2. R. Kornfeld and S. Cornelius, *Ann. Rev. Biochem.* **45**: 217 (1976)
3. C. Jeuniaux and C. Cornelius, Distribution and activity of chitonolytic enzymes in the digestive tract of birds and mammals, in Proc. First intl. Conference on chitin and chitosan, R.A.A. Muzzarelli and E.R. (Eds.) M.I.T. Sea Grant, Cambridge, U.S.A. (1978)
4. M. Sugano, T. Fujidawa, Y. Hiratsuji, and Y. Gasegawa, *Nutr. Rept. Int.*, **18**: 531 (1978)
5. K.L. Smiley and G.W. Strandberg, Immobilized Enzymes, in *Advances in Applied Microbiology*, D. Perlman. Ed Vol. **15**: 13-37 (1972)
6. Y. Nozawa, T. Matsushita, K. Yamashina and F. Higashide, *Biotechnology and Bioengineering*, **24**: 753 (1982)
7. R.H. Hackman, Australian, *J. Biol. Sci.*, **7**: 168 (1954)
8. D. Horton and D.R. Lineback, N-Deacetylation Chitosan from Chitin, in *Method in Carbohydrate, Chem.*, **5**: 403 (1965)
9. T. Yaku and I. Yamashita, Japan. Patent 19,213 (1973), *Chem. Abstr.*, **80**: 72, 291 (1973)
10. Borchardt, L.G and J.P. Butler, Determination of trace amounts of Copper Anal, *Chem.* **29**: 414 (1957)
11. M. Nakagaki, N. Koga, and S. Iwata. *Yakugaku Zasshi*, **82**: 1138 (1962)
12. Craig, L.C.: Kinogserh, W.J. *Phys. Chem.* **65**: 166-72. (1961)
13. Lyman, D.J.: Kim, S.W. *Biomat. Med. Dev. Art. Org.* **1**: 431-51, (1973)
14. Caig, L.C.; King, T.P. *J. Amer. Chem. Soc.* **77**: 6620-4. (1955)
15. Crag, L.C.; King. T.P.; Stracher, A. *J. Amer. Chem. Soc.* **79**: 3729-37, (1957)
16. Muir. W.M; Gray, R.A.; Courtney, J.M.; Ritchie, P.d.J. *Biomed. Mater. Res.* **7**: 3-15. (1973)
17. Craig, L.C. *Science* **144**: 1093, (1964)
18. Cowsar, D.R. In "Controlled Release of Biologically Active Agents"; Tanquary, A. C.; Lacey, R. E., Eds.; Plenum Press: New York and London, pp.10-11, (1974)
19. Baker, R.; Lonsdale, H.K. In "Controlled Release of Biologically Active Agents"; Tanquary, A. C.; Lacey, R.E., Eds.; Plenum Press: New York and London, pp.15-72, (1974)
20. Flynn, G.I.; Yalkowsky, S.H.; Roseman, T.J.J. *Pharm. Sci.* **63**: 479-510, (1974)

## Permeation of Copper Ion and Sodium Ion Through a Artificial Chitosan Membrane

Chi-young Lee

*Dept. of Environmental Hygiene*

*Kwangju Health Junior College*

### >Abstract<

The permeation of cations such as sodium ion and copper ion through a chitosan membrane was investigated as part of a series of studies on pharmaceutical application and filtration of water by chitosan.

Over a 70 hour period, with 0.01cm thick membrane, concentration equilibrium was reached by sodium, while the copper concentration in the distilled water remained below detection limits.

The membrane constant of the chitosan membrane was calculated from the permeability constant  $3.52 \times 10^{-7} \text{cm}^2/\text{s}$  and from the diffusion coefficient  $7.95 \times 10^{-6} \text{cm}^2/\text{s}$ , and it was obtained for sodium chloride.

The partition coefficient of chitosan membrane was found to be 0.0443, which is close to the reported value for cellulose membrane.

Assuming that the permeation sodium ion through a chitosan membrane process on the basis of diffusion through pores, and also that sodium chloride has no special interaction with chitosan membrane, while cupric ion did not pass through.