

흰쥐의 납독에 대한 키토산의 효과에 관한 연구

김일두 · 유문희*

조선대학교 화학과, *이리 농공전문대학 식품공업과

A Study on the Preventive Effect of Chitosan on the Lead Toxicity in Rats

IL DOO Kim and *Moon Hee Ryu

Department of Chemistry, Cho Sun University, Kwang Ju, 506-759

* Department of Food Engineering, Iri National College of Agriculture and Technology, Iksan, 570-110

(Received October 10, 1996)

(Accepted October 25, 1996)

ABSTRACT : This study was performed to investigate the effects of chitosan on the lead poisoning in rats. For this experiment, 15 male Sprague-Dawley rats were used. The experimental groups were divided into five: Control (250 mg/kg lead), Group I (250 mg/kg lead+1% chitosan), Group II (250 mg/kg lead+2% chitosan), Group III (250 mg/kg lead+4% chitosan), Group IV (250 mg/kg lead+8% chitosan).

The results were as follows;

1. The lead concentration in the liver showed 3.924~10.217 mg/kg in control group, but treated group was inclined to decrease during the experiment period ($P<0.05$).

2. The lead concentration in the kidney showed 23.268~31.315 mg/kg in control group, but Experimental group showed 3.765~9.725 mg/kg (Group I), 34.60~9.115 mg/kg (Group II), 3.549~8.816 mg/kg (Group III), 3.502~8.532 mg/kg (Group IV) respectively, also, Experimental group was inclined to decrease compared to control group ($P<0.05$).

In conclusion, this study revealed the preventive effect of chitosan against lead toxicity.

Key Words : Lead, Preventive effect, Toxicity, Chitosan

I. 서 론

납은 인간이 가장 오래전부터 사용해왔던 금속으로써 용도는 합성수지 제품, 농약, 유리 접착제, 납 축전지 제조, 케이블 제조, 납땜 작업 등 다양하게 이용되고 있으며, 우리 나라에서도 그 사용량은 매년 증가하는 실정이다(이광수등, 1982; Hammound등, 1989). 이와 같이 납은 여러 산업 공정중 또는 소비되는 과정에서 대기 및 수질을 오염시키며, 이곳에 농축된 납은 농작물, 어패류등에 이동되어 결국 최종적으로는 인간에게 농축되며, 그에 따른 인간에게 병변은 일으키게 하는 독성물질이다(김성조, 1984). 그 독성은 heme 합성 장애 혈액소의 감소와 이에 따른 적혈구의 생존기간 단축등이다. 즉 heme 합성 초기 단계인 α -ALA에서 Protoporphyrinogen으로 전환하는데 필요한 ALA-dehy-

drase 효소작용을 억제하므로, 혈중의 α -ALA 농도를 증가시키어 heme 합성의 중간 단계인 CPG3에서 PPG 9으로서의 전환에 필요한 coproporphyrinogen decarboxylase 효소의 작용을 억제 시킴으로 Heme 합성이 감소되고, 전구 물질이 증가하게 된다(김정만등, 1985; Kage등 1961).

또한 혈액중에 납의 농도가 증가되면, 칼슘과 수분의 손실을 가져와 삼투압이 증가되며 적혈구는 위축되고 그에 따라 적혈구내 전해질의 감소로 적혈구 생존기간이 짧아지고, 골수에 조혈기능이 항진되어 망상 적혈구와 호염기성 적혈구가 증가된다(김옥경, 1986).

납은 건강장애 정도, 예방관리 대책, 납에 대한 중독 기전등이 비교적 잘 연구되었음에도 불구하고, 빈번한 납중독 사고가 발생하여 납을 취급하는 산업장 근로자 건강문제가 대두되고 있으며, 납이 분진 또는 증기로 발산하는 장소에서 일하는 근로자에게 중독을 일으킬 수 있다고 한다(Cherian MG등, 1983).

* 본 논문은 1994년도 조선대학교 학술연구비에 의하여 진행된 논문임.

또한 박등¹⁴⁾은 최근 전자산업의 발달로 열 취급 근로자의 수가 증가하여 납중독에 대한 철저한 작업자 관리가 요구된다고 한다(박정임등, 1990). 납의 폭로시에 나타나는 초기 자각증상으로는 두통, 피로, 침착성 결여, 수면장애, 체중감소, 변비등을 초래한다고 하며(Pulido등, 1966; Kostonis등, 1977), 만성 중독 증상으로는 두통, 근육통, 관절통, 안면창백, 신근마비등을 유발하는 독성이다(Zmudzki등, 1984). 그리고 고농도의 납에 장기간 폭로될경우 말초신경조직에 segmental demyelination이 생기고 Schwann's cell과 mitochondria 손상을 입힌다는 보고가 있다(Luigi, 1983).

새우, 게 등의 갑각류 외골격이나 균류, 조류와 같은 고등식물 벽에는 천연고분자인 키틴이 함유되어 있는데(Landes등, 1976), 본 실험에서는 게를 산, 알칼리처리하여 키틴을 얻었으며, 이것을 탈아세틸화하여 키토산을 얻었다. 키토산은 무독성, 무공해성으로 의약, 식품 및 섬유공업등에 이용하고 있으며, 특히 폐수중의 중금속 제거제로 널리 이용되고 있다(Watkins등, 1983).

키틴을 저지질혈증, 저콜레스테롤혈증의 활성이 있는 것으로 보고 되고 있으며(Muzzarelli등, 1981), 항종양제, 제산제 등에 효과가 있는 것으로 알려져 있다(Hirano등, 1979). 또한 키틴 유도체인 키토산은 폐수내 납 및 카드뮴을 제거하는 작용이 있는 것으로 발표하였고, 키틴의 탈아세틸화 정도에 따라서 폐수내 Hg(II) 및 Cu(II)의 흡착 특성 등을 연구하였다(최규석등, 1990).

본 실험에서는 키틴을 탈아세틸화하여 얻은 키토산을 흰쥐에게 먹이시키어 흰쥐 간장 및 신장내 납의 해독 효과를 측정하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험동물

원광대학교 의과대학 실험동물 사육실에서 사육된 Sprague Dawley 흰쥐 3~4주경 숫컷을 공급받아 2주 동안 실험실 환경에 적응시킨후 실험에 사용하였다. 사육실 환경은 온도 18~24°C, 습도 40~70% 범위를 유지하면서 실험을 했다.

2. 키토산 제조

계껍질을 실온에서 2N-HCl 수용액중에서 6시간 동안 침출시키어 탄산칼슘을 제거하고 믹서로 분쇄한 후 2N-HCl으로 실온에서 24시간 처리하여 15°C이하 온도

에서 4% NaOH 수용액으로 24시간 동안 처리하여 단백질을 분해 제거하고 증류수로 세척한다. 이와같은 알칼리와 산처리를 5회 반복한 다음 3% H₂O₂-1NHCl 수용액에 6시간 동안 실온에서 방치하여 색소를 산분해시키고 알칼리 처리하여 증류수, 에탄올, 에테르순으로 세척하여 Chitin Chip을 얻는다. 이것을 bull mill로 분쇄하여 100~130 mesh의 Chitin 분말을 얻었다.

이 분말 40 g에 47% NaOH 수용액 400 ml를 넣고 110°C에서 1시간 동안 탈아세틸화 반응을 시키어 증류수로 세척하는 방법을 5회 반복하여 탈아세틸화도를 높인후 증류수로 알칼리를 제거하고 에탄올, 에테르순으로 처리하여 80°C에서 진공건조하여 키토산을 얻었다.

3. 흰쥐 키토산 투여

제거된 키토산과 동물사료(무지개 사료)를 Table 1과 같이 혼합하여 흰쥐에게 무제한 먹이도록 하였다.

4. 흰쥐 납 투여

Pb(C₂H₃O₂)₂을 쥐 사료에 혼합하여 사료내의 Pb농도가 250 mg/kg 되도록하여 실험이 진행되는 동안 먹이도록 하였다.

5. 흰쥐 장기내 납의 농도 측정

흰쥐의 간장 및 신장을 적출하여 0.5 g을 취하여 킬달 플라스크에 넣고 여기에 Conc. HNO₃, 5 ml와 Conc. H₂SO₄, 10 ml를 가한 다음 100°C Hot plate 상에서 유기물을 분해 시켰으며, 이때 분해액의 색이 황색-무색이 될 때까지 Conc. HNO₃를 가하였다. 이와같이 유기물의 분해가 완료된 시료를 DDTC-MIBK 추출방법에 의하여 중금속을 추출후 원자흡광분광광도계(Varian spectra. AA-30)로 Wave length 217 nm, Lamp current 10 mA, Slit 0.7 nm에서 중금속 함량을

Table 1. Experimental dosage with rats treated chitosan and lead

Group	No of rats	Dosage	
		Chitosan: animal food	Lead
Control	15	0:100	250 mg/kg
Experimental group I	15	1:99	250 mg/kg
Experimental group II	15	2:98	250 mg/kg
Experimental group III	15	4:96	250 mg/kg
Experimental group IV	15	8:92	250 mg/kg

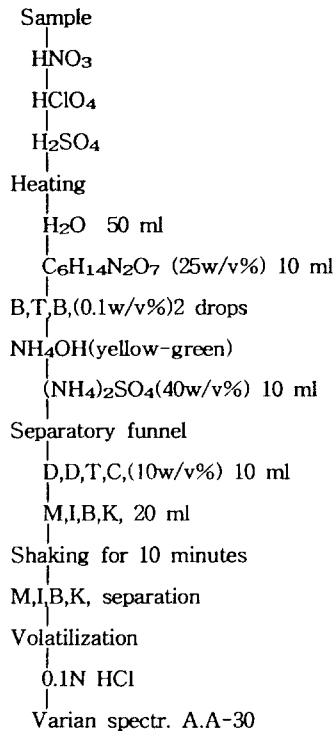


Fig. 1. Determination method of heavy metals in sample.

측정하였다(Fig. 1)

6. 흰쥐 장기내 metallothionein 측정

조직중의 metallothionein은 liver와 kidney를 0.5 g 취하여 생리적 식염수로 세척한 다음, 0.25 M 설탕용액(sucrose, Sigma)를 가하면서 Teflon glass homogenizer를 이용하여 조직을 균질화되도록 하였으며 4°C에서 20분간 원심분리(Beckman)하여 세포액(cytosol)을 얻었다. 세포액 0.2 ml를 0.03 M tris-HCl (pH=8.0) 완충용액에 첨가한 후 10 ppm의 CdCl₂(standard solution) 1 ml로 포화시키고 실온에서 5분간 배양하였다. 여기에 rat RBC hemolysate 0.2 ml를 가하여 과량의 Cd과 MT이외의 모든 bioligand를 제거하고, 100°C 수욕탕에 1분간 정치시켜 Cd-bound hemoglobin을 변성시킨 후, 1,000 g(Beckman, room temperature)을 원심분리하여 상층액을 취하였다.

이상의 rat RBC hemolysate 첨가와 열처리 및 원심분리 과정을 3회 반복하여 얻은 시료를 카드뮴농도 측정에 이용하고 최종적인 MT 농도 계산은 카드뮴 6 g 원자가 1M의 MT(분자량 6,050)과 결합하는 것으로 환산하여 조직 g당 mgMT 농도를 구하였다(Fig. 2).

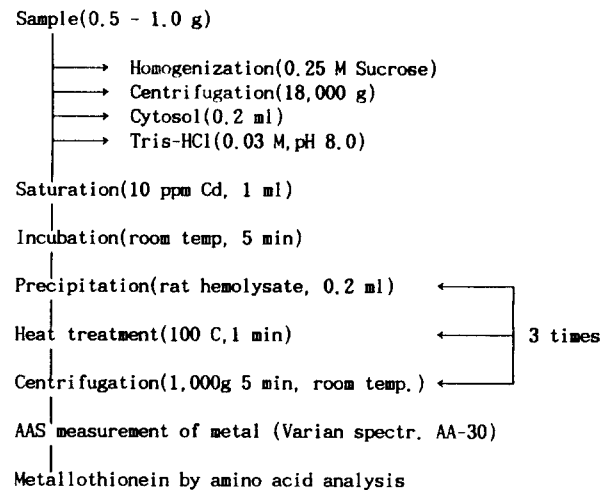


Fig. 2 The procedure of metallothionein determination in liver and kidney of rats.

III. 결과 및 고찰

납 해독방법으로는 단백질, 칼슘, 아연, 철, 아미노산, 우유, 비타민 등의 투여에 의한 조직내의 납중독 치료방법이 연구되고 있으며 최근에는 생약제에 의한 해독 방법이 모색되고 있다. 그러나 납해독 방법은 미미한 것으로 보고되고 있으며, 보다 금속과 강한 착물을 이룰수 있는 배위기가 연구되어야 한다고 한다. 금속착물을 이룰수 있는 킬레이트제의 중요한 부분은 배위기에 있는 donor atom으로 일반적으로 O, N, S 원자를 들수 있다.

산소를 포함한 배위기는 C=O, —N=O, —COOH, —COOR, —OH, 질소를 포함한 배위기는 —NH₂가 있고, 황을 포함한 배위기는 —SH, —S—, C=S 등을 들수 있다.

키틴의 탈아세틸화 유도체인 키토산은 유리 1차 아미노기를 가지고 있기 때문에 금속이온들이 잘 흡착되는 것으로 보고 되고 있다(Landes등, 1976)

본 실험에서는 게, 새우, 균류, 조류등 자연계에 풍부한 천연 킬레이트 고분자인 키틴을 게에서 추출하여 이것을 탈아세틸화하여 키토산을 제조하여 흰쥐 사료에 혼합하여 식이시키어 다음과 같은 결과를 얻게 되었다.

1. 키토산제조 확인

게의 껍질을 Hackman방법에 의하여 산·알칼리 처리하여 순백색의 키틴을 단리 시킨후 47% NaOH로 탈아세틸화하여 IR-Spectrum으로 합성여부를 확인한 결과 1655 cm⁻¹에서 C=O 결합 Stretching 흡수 피크를 볼

수 있었다(Fig 3).

2. 간장중의 납의 농도 변화

대조군은 사료중에 lead acetate를 이용하여 납의 농도가 250 mg/kg되게하여 2주간 식이 시킨 결과 흰쥐 간장중의 납의 농도는 3.924±1.162 mg/kg, 4주, 6주, 8주에서 6.516±2.319 mg/kg, 7.986±1.163 mg/kg, 10.217±3.713 mg/kg으로 나타나(Table 2) 식이 기간이 길수록 납의 농도가 높은 것을 볼 수 있었다(P<0.05).

실험군 I은 식이 사료중에 납의 농도가 250 mg/kg 투여량과 동시에 납의 착물을 이룰것으로 사료되는 키토산을 사료와 혼합비 [99(사료):1(키토산)]가 되게하여 흰쥐에게 식이 시킨 결과 간장중의 납의 농도가 대조군에 비하여 2주간 투여시 0.159 mg/kg 감소 하였으며, 8주간 식이시에는 0.492 mg/kg 감소하는 것을 볼 수 있었다.

실험군 II는 식이 사료중의 납농도 250 mg/kg, 사료

와 키토산의 혼합비 [98(사료):2(키토산)]가 되게하여 흰쥐에게 4주간 식이 시킨 결과 간장내의 납의 농도가 0.967 mg/kg으로 감소하였다.

실험군 III, IV에서 사료중의 키토산 혼합비를 4%, 8%로 증가시킬 경우 흰쥐 간장내 납의 농도는 더욱 감소하는 것으로 나타나 키토산이 납해독 효과가 있는 것으로 나타났다(P<0.05).

3. 신장중의 납의 농도 변화

신장의 납의 농도는(Table 3)과 같이 대조군은 1주 23.268 mg/kg, (2주) 31.315 mg/kg (8주) 으로 나타나 실험기간이 길수록 신장중의 납농도가 증가하는 것으로 나타났다(P<0.05).

실험군 I의 2주(21.153±4.562 mg/kg), 6주(28.352±2.276 mg/kg), 실험군 II의 4주(25.547±3.153 mg/kg), 8주(27.774±5.542 mg/kg), 실험군 III의 2주(18.586±

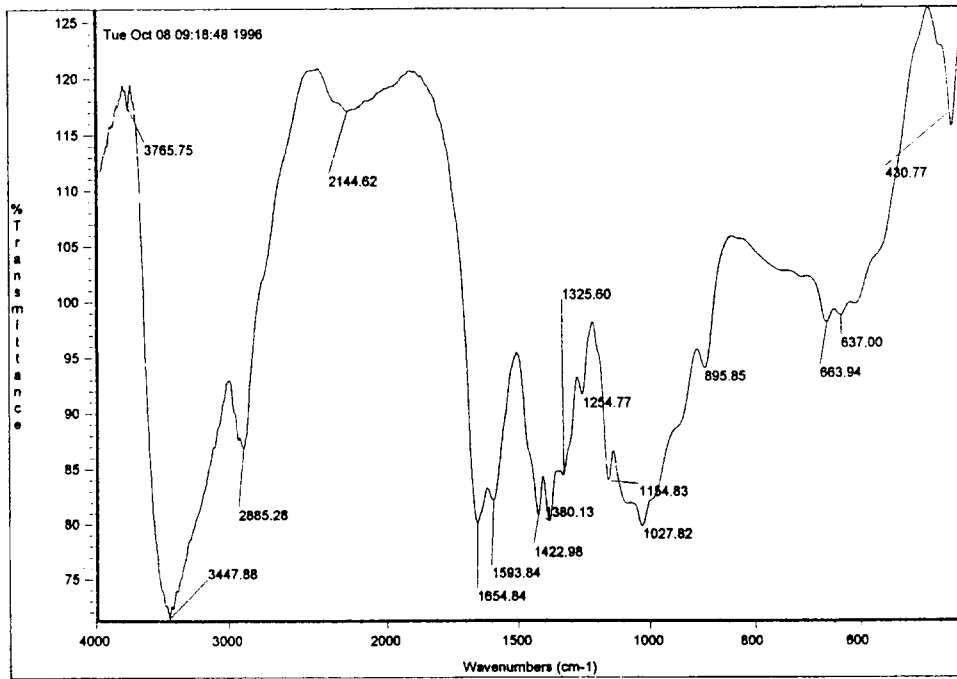


Fig. 3 IR Spectra of chitosan

Table 2. The lead concentration in Liver of rats treated with lead acetate and chitosan (Unit:mg/wet kg, mean±S.D)

Group	Lead concentration by week after treatment			
	2	4	6	8
Control	3.924±1.162	6.516±2.319	7.986±1.163	10.217±3.713
Group I	3.765±0.932	5.942±1.753	6.516±0.912	9.725±1.542
Group II	3.460±1.236	5.549±2.761	6.932±1.356	9.115±3.127
Group III	3.549±0.972	5.725±1.112	6.335±1.216	8.816±1.150
Group IV	3.502±1.763	5.431±0.943	6.112±0.967	8.532±0.990

Table 3. The lead concentration in Kidney of rats treated with lead acetate and chitosan (Unit:mg/wet kg, mean±S.D)

Group	Lead concentration by week after treatment			
	2	4	6	8
Control	23.268±6.241	28.916±3.161	30.118±5.498	31.315±6.219
Group I	21.153±4.562	29.325±4.112	28.352±2.276	30.431±1.165
Group II	20.567±2.763	25.547±3.153	28.002±3.625	27.774±5.542
Group III	18.586±5.556	24.581±1.162	26.481±2.113	26.627±3.157
Group IV	19.024±3.271	24.593±3.019	25.624±1.353	26.543±1.998

Table 4. Metallothionein concentration in Liver of rats treated with lead acetate and chitosan (Unit:mg/wet g, mean±S.D)

Group	MT concentration by week after treatment			
	2	4	6	8
Control	0.08±0.03	0.09±0.02	0.09±0.02	0.11±0.03
Group I	0.09±0.02	0.12±0.05	0.11±0.03	0.13±0.04
Group II	0.11±0.05	0.12±0.03	0.12±0.04	0.14±0.05
Group III	0.10±0.03	0.13±0.07	0.11±0.05	0.15±0.10
Group IV	0.12±0.03	0.14±0.05	0.13±0.05	0.15±0.06

Table 5. Metallothionein concentration in Kidney of rats treated with lead acetate and chitosan (Unit:mg/wet g, mean±S.D)

Group	MT concentration by week after treatment			
	2	4	6	8
Control	0.05±0.02	0.06±0.02	0.06±0.02	0.07±0.03
Group I	0.06±0.02	0.07±0.04	0.05±0.03	0.09±0.04
Group II	0.06±0.03	0.08±0.03	0.08±0.04	0.09±0.05
Group III	0.08±0.02	0.07±0.02	0.08±0.03	0.08±0.02
Group IV	0.07±0.03	0.08±0.02	0.09±0.03	0.13±0.06

5.556 mg/kg), 8주(26.627±3.157 mg/kg), 실험군 IV 4주(24.593±3.019 mg/kg) 6주(25.624±1.353 mg/kg)으로 나타나 키토산 투여량이 높을수록 신장내 납의 농도는 감소하는 것을 볼 수 있었다(P<0.05). 따라서 키토산은 흰쥐 신장내에서 납과 착물을 형성하여 배설되는 것으로 사료된다.

4. 간장중의 Metallothionein(MT)농도 변화

간장중의 MT의 농도는 납만 투여군(대조군)에서는 0.08±0.03 mg/g(2주) ~ 0.11±0.03 mg/g(8주)로 나타나 납 투여 기간이 길수록 증가하는 것을 볼 수 있었다(P<0.05). 또한 키토산과 납 혼합 투여군(실험군)에서는 키토산 투여량이 증가할수록 흰쥐 간장내 MT량은 증가하는 것으로 나타났으나(Table 4) 통계적으로 유의한 차이는 없었다(P>0.05).

5. 신장중의 Metallothionein(MT)농도 변화

흰쥐 신장중의 MT량은 납만 투여군(대조군) 2주(0.

05±0.02 mg/g) 6주(0.06±0.02 mg/g)으로 나타났으며, 실험군 I(먹이량의 1% 키토산+납)의 흰쥐 신장중의 MT량은 2주(0.06±0.02 mg/g), 8주(0.09±0.04 mg/g)으로 나타나 실험기간이 길수록 MT량이 증가하는 것으로 나타났으나 통계적으로 유의한 차이는 없었다(P>0.05).

실험군 IV(먹이량의 8%키토산+납)의 흰쥐 신장중의 MT량은(Table 5) 2주(0.07±0.03 mg/g) 8주(0.13±0.06 mg/g)으로 나타나 키토산의 투여량이 높은 실험군에서는 키토산 및 납의 투여기간이 길수록 MT량이 증가하는 것을 볼 수 있었다(P<0.05).

IV. 결 론

계의 껍질을 산과 알칼리 처리하여 키틴을 얻은 후 이것을 탈아세틸화하여 키토산을 제조하였다. 키토산을 사료와 혼합하여 흰쥐에게 식이 시키어 납에 폭로된 간장 및 신장내 납의 해독량을 원자흡광도계를 이용하여 측정하였으며, 장기내 metallothionein을 정량(Onosalca, 1978)한 결과 다음과 같은 결론을 얻게 되었다.

1. 흰쥐 간장내 납의 농도는 납만 투여군의 8주때 10.217 mg/kg이 있으나, 키토산 식이시에 납의 농도가 8주때 8.532 mg/kg으로 감소하는 것을 볼 수 있었다.
2. 흰쥐 신장내 납의 농도는 저농도 키토산 투여군(Group I)의 6주때 납의 농도는 28.352 mg/kg이었으나, 고농도 키토산 투여군(Group IV) 6주때 납의 농도가 25.624 mg/kg으로 키토산 투여량이 높을수록 납의 해독 효과가 클 것을 볼 수 있었다.
3. 흰쥐 간장내 metallothionein량은 납만 투여군에 비하여 키토산 투여군에서 높게 나타나는 것을 알수 있었다.
4. 흰쥐 신장내 metallothionein량은 8주때 납만 투여군에서는 0.07 mg/g이었으나, 키토산 투여량이 증가할수록 metallothionein량이 [0.09 mg/g(저농도 키토산: Group I)~0.13 mg/g(고농도 키토산(Group IV))] 증가하는 것으로 나타났다.

참고문헌

- 김옥경, 서정숙, 이명환(1986): 단백질 급원과 수준을 달리한 식이가 흰쥐 납축적에 미치는 영향. *한국영양학회지*, **19(4)**:211-221.
- 김성조: 대기 및 수질오염 지역에 토양 및 수도체중의 중금속 함량. 전북대학교 박사학위논문, 1984
- 김정만, 이세훈, 이은영, 조영선(1985): 연세련 근로자들의 만성적 연폭로에 관한 연구. *한국산업의학*, **24(1)**:10-19.
- 류철인, 조병만, 이지호, 황인경, 이수일, 김돈균(1991): 연 취급 근로자들의 면역능에 관한 조사. *대한 산업의학회지*, **3(2)**:135-143.
- 박정임, 구정완, 노영만, 이승환(1990): 고속도로 톨게이트 근로자들의 연 폭로 및 자각증상에 관한 연구. *대한산업의학회지*, **2(2)**:142-151.
- 서봉수, 문화회, 김인기, 김학엽, 전성환(1982): 하천부지 토양중의 중금속 함량 조사와 동광산지역 농경지의 중금속 실태조사. *국립환경연구소보*, **4**:199-201.
- 이광우, 이수형, 양승범, 오재룡, 김은주(1982): 생태내에 있어서 오염물질의 이동체계에 관한 연구. *한국과학기술원 해양연구소*, 1-63.
- 이병철: 흰쥐에서 만성 납중독이 뇌의 Biogenic Amine 함량에 미치는 영향. 연세대의 학위논문집, 214-225, 1990
- 원중훈(1973): 한국산 어패류 중의 수은, 카드뮴, 납, 구리의 함량. *한수지*, **6(1)**.
- 최규석, 류영완(1990): 활성화된 chitosan계 분리용 소재의 제조와 금속이온 분리능에 관한 연구. *고분자학회지*, **14(4)**, 404-416.
- Cherian MG, Nordberg M (1983): Cellular adaptation in metal toxicology and metallothionein. *Toxicology*, **25**:1-15.
- D.R. Landes and W.A. Bough (1976): Effects of chitosan acoagulating agent for food processing wastes in the diet of rats on growth and liver and blood consumption. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **15**, 55-57.
- Eaton, D.L. and Toal, B.F. (1982): Evaluation of the Cd/hemoglobin affinity assay for the rapid determination of metallothionein in biological tissues. *Toxicol Appl Pharmacol.*, **66**, 134.
- Hammound, P.B., Chernausek, S.D., Succop, P.A., Shukla, R. and Bornschein, R.L. (1989): Mechanism by which Lead Depresses Linear and Ponderal Growth in Weanling Rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **99**, 474-486.
- Hirano, S and Miura, O. (1979): Alkaline Phosphatase and Pepsin immobilized in gels, *Biotechnol. Bioeng.*, **21**, 711-714.
- Kage JHR, Vallee BL (1961): Metallothionein: A cadmium and zinc-containing protein from equine renal cortex. *J Biol Chem* **236**:2435-2442.
- Kostonis, F.N. and Klaassen, C.D. (1977): Toxicity and distribution of cadmium administered to rats at sublethal doses. *Toxicol Appl Pharmacol.*, **41**, 667.
- Luigi, P. (1983): Encyclopaedia of Occupational Health and Safety, Third Edition, International Labour Office. *Geneva*, **12**, 174-176, 1197-1209.
- Muzzarelli, R.A.A., Tanfani, F. (1981): The production of chitosans of superior quality, *J. Appl. Biochem.*, **3**, 316-321.
- Onosaka S, Tanak K, Doi M, Okahara K (1978): A simplified procedure for determination of metallothionein in animal tissues. *Eisei Kagaku* **24**: 128-133.
- Pulido P, Kagi, Vallee BL (1966): Isolation and some properties of human metallothionein. *Biochemistry* **5**:1768-1777.
- T.R. Watkins and D. Knorr (1983): In vivo dye-binding of chitin and its effect on gerbil growth and gut function. *Nutrition Reports Int.*, **27**, 1161.
- Zmudzki, J., Bratton, G.R., Womac, C. and Rowe, L. D. (1984): The Influence of Milk Kiet, Grain Diet, and Method of Dosing on Lead Toxicity in Young Calves. *Toxicology and Applied Pharmacology* **76**, 490-497.