

키토산 유도체의 담즙산 흡착 활성

이아린 · 이강만*

이화여자대학교 약학대학

(Received July 28, 1998)

The Bile Acid Absorption Activity of Chitosan Derivatives

Aileen Lee and Kang Man Lee*

College of Pharmacy, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea

Abstract—Chitosan has been known to have hypocholesterolemic and hypolipidemic effects in animal studies. Chitosan also absorbs bile acids *in vitro* and *in vivo*, which might result in the hypocholesterolemic action. Trialkyl chitosan derivatives were prepared and tested for bile acid absorption activity *in vitro*. The derivatives showed enhanced absorption capacities which were comparable to cholestyramine.

Keywords □ Chitosan, N-trialkyl chitosans, bile acid absorption.

키토산(chitosan)은 poly-D-glucosamine의 구조를 가지고 있는 물질로서 새우, 게, 갑각류 등의 외골격 및 진균류의 세포벽에서 쉽게 얻어지는 키틴(chitin: poly-N-acetyl-D-glucosamine)을 탈아세틸화하여 얻을 수 있는 물질이다. 이 물질은 *in vivo*와 *in vitro*에서 담즙산을 흡착한다고 알려진 물질로 LDL(low density lipoprotein)의 농도를 저하하며, 혈중 cholesterol이 담즙산(bile acid)으로 계속 전환되도록 함으로써 혈중 cholesterol 농도를 낮추는 효과가 있다고 알려져 있고 그 효과는 cholestyramine과 비교되기도 하였다.¹⁻³⁾

Cholestyramine 수지는 장관에서 흡수되지 않으며 담즙산과 결합함으로써 담즙산의 재흡수를 억제하여 대변으로 배설을 증가시키고, 담즙산은 cholesterol을 담즙산으로 전환하는 효소인 microsomal hydroxylase를 억제하므로 담즙산의 제거는 cholesterol로부터 담즙산의 생성을 증가시킨다.⁴⁾ 그러나 cholestyramine의 경우 장에서 지용성 비타민의 흡수를 방해하고 다량 투

여시 오심, 구토, 변비, 지방변증과 지용성 비타민의 결핍 증상을 일으키는 결점을 갖고 있기도 하다.⁵⁾ 한편 쥐를 이용한 동물실험에서 Sugano등¹⁾은 5% 농도로 cholestyramine을 투여했을 때 변비증상을 야기하는데 비하여 키토산은 10% 농도 투여시에도 변비 또는 설사 등 변의 양과 질에 어떠한 변화도 관찰할 수 없었다고 보고하여 cholestyramine이 보이는 부작용이 키토산 투여에서는 없음을 제시하였다.

Cholestyramine의 구조는 4급 암모니움을 포함하여 음이온 교환 수지의 성질을 띠고 있어 그 잔기 중에 있는 Cl⁻가 담즙산으로 치환되어서 흡착의 효과를 보인다고 알려져 있기 때문에 본 연구에서는 혈청 cholesterol 치를 낮추는 효과가 있는 키토산을 사용하여 키토산의 -NH₂기에 trimethyl, triethyl, tripropyl등의 chitosan-N-trialkyl 4급 암모니움 유도체를 만들어서 담즙산 흡착 활성을 실험하였다.

실험방법

키틴의 제조 - 키틴은 No등⁶⁾의 방법을 변형하여 제조하였는데 노량진 수산시장에서 수집한 꽃게의 등껍질

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-360-3041 (팩스) 02-360-3051

을 수세하여 건조한 후 일정 크기로 분쇄한 것을 40 g 취하여 4°C의 1 N 염산 1 L에 24시간 반응시켜 탄산칼슘을 제거하고 물로 세척하여 중화시킨 후 95% 에탄올에서 30분간 반응시킨 후 여과하여 40°C 오븐에서 건조하였다. 이 조키토산을 60°C, 10% 수산화나트륨 용액에서 20시간 반응시켜 단백질 성분을 제거하고 물로 세척, 중화한 후 아세톤으로 세척하고 건조하여 정제 키토산으로 사용하였다.

키토산의 제조 - 키토산은 No등⁷⁾의 방법을 변형하여 꽃게에서 얻은 키토산을 50%(w/w) 수산화나트륨 액에 고체와 용매의 비를 1:10(w/v)으로 하여 100°C에서 31시간 처리하여 탈아세틸화시키고 반응액을 재빨리 얼음물에 분산시켜 세척한 후 다시 아세톤으로 세척하여 50°C 오븐에서 건조하였다. 키토산의 탈아세틸화 정도는 Moore⁸⁾의 방법에 따라 chitosan film을 만들어 IR spectrophotometer로 4,000~600 cm⁻¹ 범위의 IR spectrum을 얻어 측정하였다. 조제한 키토산의 탈아세틸화 정도는 95%이상이었다. 탈아세틸화 정도는 $100 - (A_{1655}/A_{3450}) \times 100 \div 1.33$ 의 식으로부터 계산하였다.

N-trimethyl Chitosan(NTM-C)의 제조 - Domard 등⁹⁾의 방법에 따라 키토산 10 g을 N-methyl-2-pyrrolidone 250 ml에 12시간 분산시킨 후 2.2 M 수산화나트륨 1 ml, 메틸요오드 33 g, 요오드화 나트륨 10 g을 현탁액에 첨가하고 질소가스 하에서 36°C, 16시간 동안 교반하면서 반응시킨 후 에탄올 800 ml에 침전시켰다. 침전물은 원심분리로 세척하였고, 진공오븐에서 건조시켰다.

N-triethyl Chitosan(NTE-C)의 제조 - NTM-C의 제조과정에 준하여 실시하였으며 메틸요오드 대신 에틸요오드 36.26 g을 사용하여 60°C, 24시간 동안 반응시킨 후 isopropanol 800 ml로 침전시켜 원하는 물질을 얻었다.

N-tripropyl Chitosan(NTP-C)의 제조 - NTM-C의 제조과정에 준하여 실시하였으며 메틸요오드 대신 프로필요오드 39.53 g을 사용하여 90°C, 20시간 동안 반응시킨 후 isopropanol 800 ml로 침전시켜 원하는 물질을 얻었다.

담즙산의 정량 - 담즙산용액(0.1% sodium azide를 포함하는 0.1 M 인산 완충액 pH 7.0에 taurocholate 1~15 mM 함유) 0.5 ml에 45% 황산 3 ml과 0.3% furfural 수용액 0.5 ml을 넣고 65°C에서 30분간 반응시킨 후 나온 청색을 spectrophotometer

로 680 nm에서의 흡광도를 측정하여 분석하였다.¹⁰⁾

시간에 따른 담즙산의 흡착량 변화 - 키토산, NTM-C, cholestyramine각 0.5 g을 10 mM taurocholate용액(pH 7.0) 30 ml에 첨가하고 37°C에서 200 rpm으로 교반하면서 반응시킨 후 1시간과 3시간에 각각 1.5 ml을 취한 후 Centricon-10(Amincon[®])을 사용하여 5,000 g로 1시간 동안 원심분리하여 나온 여액 0.5 ml을 사용하여 분석하였다.

pH에 따른 담즙산의 흡착량의 변화 - 키토산 용액의 pH를 5, 6, 7, 8, 9로 변화시켜 담즙산의 흡착정도를 실험하였다. 한편 키토산, cholestyramine, NTM-C, NTE-C, NTP-C 각 0.5 g을 pH가 5, 7, 9인 15 mM taurocholate buffer 30 ml에 넣고 37°C, 200 rpm에서 2시간 흡착시킨 후 1.5 ml을 취하여 앞에서와 동일하게 조작하여 흡착률을 구하였다.

담즙산 흡착강도 실험 - pH 6, 7, 8의 10 mM taurocholic acid buffer 30 ml에서 cholestyramine, 키토산, NTM-C 각각 0.5 g을 4시간 반응시킨 후 1.5 ml을 취하여 Centricon-10에 넣고 5,000 g에서 1시간 동안 원심 분리하여 여액중 담즙산 농도를 분석하고, retentate에 인산 완충액 1 ml를 가하여 잘 혼합한 다음 다시 원심 분리하는 과정을 2회 반복, 세척하여 담즙산의 흡착정도를 실험하였다.

결과 및 고찰

시간에 따른 흡착량의 변화 - Table I의 결과에서 알 수 있는 것과 같이 세가지 물질은 시간에 따라 흡착량의 변화가 거의 없었다. 이들 고분자 물질은 담즙산 용액에 혼합한 후 초기 1시간 이내에 흡착이 완료되어 시간이 더 경과되어도 흡착량에는 변화가 없었다. 키토산의 흡착정도는 40%(pH 7.0) 내외였으나 NTM-C는 73%이상의 흡착률을 보여, 키토산에 비해 흡착력이 뚜렷하게 향상되었음을 알 수 있었다.

Table I—The effect of incubation time on bile acid absorption at pH 7.0

Polymer	% Absorption	
	1 Hour	3 Hours
Cholestyramine	92.7	93.2
Chitosan	39.7	38.3
N-trimethyl chitosan	73.0	77.0

% SE were less than 3.

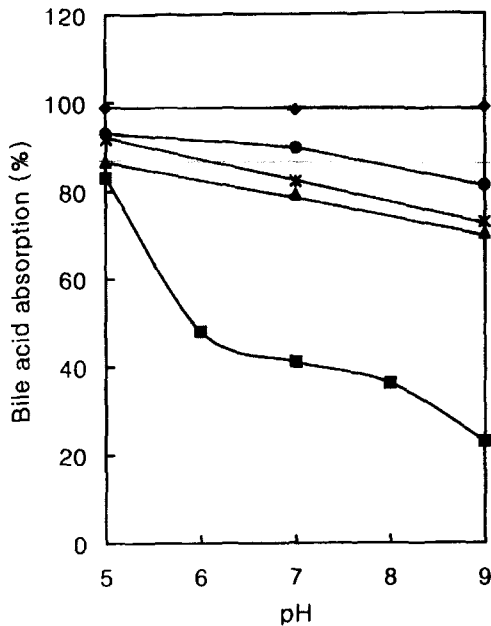


Fig. 1 - The effect of pH on bile acid absorption of various chitosan derivatives. % SE range was less than 8 (◆: cholestyramine, ●: N-triethyl-chitosan, *: N-tripropyl-chitosan, ▲: N-trimethyl-chitosan, ■: chitosan).

pH에 따른 흡착량의 변화 - Fig. 1에서 볼 수 있듯이 키토산에 담즙산이 흡착되는 정도는 용액의 pH에 매우 민감하였다. 산성조건에서는 흡착정도가 우수하였으나 알칼리성에서는 20%까지 떨어졌다. 키토산 유도체들의 담즙산 흡착성이 pH에 따라 어떤 영향을 보이는지를 알아보기 위하여 용액의 pH를 5, 7, 9로 조절하여 실험한 결과는 Fig. 1에서 보는 바와 같았다. pH 9에서도 NTM-C는 70%이상, NTE-C는 80%이상,

NTP-C는 70%이상의 흡착을 보였다. 산성에서 보다 알칼리성에서 흡착률이 감소하는 것은 키토산의 amino group의 trialkylation이 완전하지 않았기 때문이라 생각된다.

흡착강도 - Table II에 나타난 것과 같이 cholestyramine은 처음 담즙산 용액농도의 ~20%를 유출하였으나 키토산은 흡착강도가 작아서 3번 세척에 의하여 100% 유출되었다. 반면, NTM-C는 ~25% 내외의 매우 적은 양의 유출만을 보여 cholestyramine과 유사한 강한 흡착강도를 보였다.

키토산은 *in vitro*에서 담즙산의 흡착효과가 있다고 알려져 있지만 pH 6이상에서는 물에 녹지 않는 고분자 물질이다. 키토산의 $-NH_2$ 기에 alkyl group를 붙여서 4급 암모늄염을 만들었을 때 물에 녹는 형태가 되었고, 중성과 알칼리성 영역에서도 키토산에 비하여 담즙산 흡착률의 향상을 관찰할 수 있어 키토산의 trialkylation이 담즙산 흡수에 도움이 됨을 알 수 있었다. Triethyl-, tripropyl- chitosan의 경우는 양에 따라 cholestyramine과 비견되는 흡착률을 보여 앞으로 혈중 cholesterol의 저하제로서의 이용이 기대된다. 키토산의 담즙산의 흡착이 pH에 민감하게 반응함과 4급 암모늄화가 담즙산 흡착에 긍정적으로 작용한다는 결과로부터 deacetylation 정도가 높은 키토산을 사용하여 높은 정도로 trialkylation 시킨 키토산 유도체를 제조한다면 pH에 무관하게 cholestyramine에 상응하는 담즙산 흡착능을 가지는 물질을 얻을 수 있을 것으로 생각된다.

결 론

키토산과 그의 trialkyl 유도체인 N-trimethyl-, N-

Table II - Analysis of bile acid absorption strength of chitosan and its derivatives during repetitive washing

Polymer	pH	Bile acid (mM)* in Filtrates			Total % Release
		1st Filtrate	2nd Filtrate	3rd Filtrate	
Cholestyramine	6	0.82	0.73	0.51	20.5
	7	0.16	0.61	0.50	12.8
	8	1.21	0.57	0.32	21.0
N-trimethyl-chitosan	6	0.67	0.27	1.38	23.2
	7	1.15	0.25	0.25	16.4
	8	1.83	0.27	0.37	24.7
Chitosan	6	6.77	1.87	1.36	100
	7	6.35	2.74	0.91	100
	8	8.20	1.80	-	100

* Initial concentration of bile acid solution was 10 mM.

triethyl-, N-tripropyl- chitosan의 담즙산 흡착력을 cholestyramine과 비교한 실험에서 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 키토산의 담즙산 흡착력은 pH 변화에 민감하여 산성에서는 흡착효과가 우수하나 알칼리성에서는 저조하였다.

2. N-trialkyl chitosan 유도체들의 단위질량당 담즙산 흡착량은 산성조건에서는 키토산과 cholestyramine이 비슷하였고, 알칼리성 조건에서는 cholestyramine 보다 약간 낮았으나 키토산 보다는 월등히 높았다.

3. N-trialkyl chitosan 유도체들의 담즙산 흡착강도는 키토산보다 월등히 우수하여 cholestyramine의 흡착강도와 대등하였다.

따라서 N-trialkyl chitosan 유도체들은 사람의 장관조건에서 키토산 보다 담즙산을 효과적으로 흡착하여 담즙산의 재흡수를 억제할 것으로 생각된다.

문 헌

- 1) Sugano, M., Fujikawa, T., Hiratsuji, Y., Nakashima, K., Fukuda, N. and Hasegawa, Y. : A novel use of chitosan as a hypocholesterolemic agents in rats, *Am. J. Clin. Nutr.*, **33**, 787 (1980).
- 2) Sugamno, M., Watanabe, S., Kishi, A., Izume, M. and Ohtakara, A. : Hypocholesterolemic action of chitosans with different viscosity in rats, *Lipids*, **23**, 187 (1988).
- 3) Vahouny, G. V., Satchithanandam, S., Cassidy, M. M., Lightfoot, F. B. and Furda, I. : Comparative effects of chitosan and cholestyramine on lymphatic absorption of lipids in the rat, *Am. J. Clin. Nutr.*, **38**, 278 (1983).
- 4) Grundy, S. M., Ahrens, E. H., Jr. and Salen, G. : Interruption of the enterohepatic circulation of bile acids in man: comparative effects of cholestyramine and ideal exclusion on cholesterol metabolism, *J. Lab. Clin. Med.*, **78**, 94 (1971).
- 5) Brown, M. S. and Goldstein, J. L. : Drugs used in the treatment of hyperlipo-proteinemias, in *The Pharmacological Basis of Therapeutics* (Gilman A. G. et al. ed.) Pergamon Press, New York, pp. 888 (1991).
- 6) No, H. K., Meyers, S. P. and Lee, K. S. : Isolation and characterization of chitin from crawfish shell waste, *J. Agric. Food Chem.*, **37**, 575 (1989).
- 7) No, H. K. and Meyers, S. P. : Crawfish chitosan as a coagulant in recovery of organic compounds from seafood processing streams, *J. Agric. Food Chem.*, **37**, 580 (1989).
- 8) Moore, G. K. and Roberts, G. A. F. : Determination of the degree of N-acetylation of chitosan, *Int. J. Biol. Macromol.*, **2**, 115 (1980).
- 9) Domard, A., Rinaudo, M. and Terrassin, C. : New method for the quaternization of chitosan, *Int. J. Biol. Macromol.*, **8**, 105 (1986).
- 10) Chang, H. J., Jeon, D. W. and Lee S. R. : *In vitro* study on the functionality in digestive tract of chitin and chitosan from crab shell, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **26**, 348 (1994).