키토산 올리고당의 보습성과 생리활성에 관한 연구

하 병 조 · *이 옥 섭

서울보건대학 피부관리과 · *태평양 기술연구원

Moisturizing Property and Physiological Activity of Chitosan Oligosaccharide

Byung-Jo Ha · *Ok-Sub Lee

Dept. of Skin Care, Seoul Health College, Sungnam, Kyunggi-do, Korea

*Pacific R&D Center, Yongin, Kyunggi-do, Korea

요 약

천연고분자인 키틴으로부터 저분자 키토산을 얻은 후 이를 아질산을 이용한 분해반응에 의해 세포증식효과 및 상처치유효과 등의 생리적인 효과가 있는 키토산 올리고당을 합성하였다. 이를 위해 아질산을 이용하여 deamination한 후, sodium borohydride로 환원시켜 reducing-end residue들을 alditol unit로 치환하였으며 MBTH시약을 사용하여 반응이 진행하였음을 확인하였다. 얻어진 키토산 올리고당의 분자량 분포를 HPLC로 확인한 결과 중합도가 2~6 인 올리고당이 얻어졌음을 알 수 있었다. 상대습도 43%와 81%에서 측정한 흡습력 실험결과, 글리세린에 대해 각각 63%, 57%의 흡습력을 보였으며, 상대습도 43%와 실리카겔 분위기하의 보습력 측정결과, 각각 98%, 91%의 수분잔존률을 나타내었다. 키토산 올리

고당은 0.000032~0.01% 농도 범위에서 세포증식효과를 보였으며, 2%와 20%로 처리한 경우 상처치유효과를 나타내었다.

Ⅰ. 서 론

인체의 약 70%는 수분으로 이루어져 있다[1]. 수분은 인체에 필요한 각종 생리활성 물질을 운반해주는 작용을 하며, 피부가 부드럽고 촉촉한 상태를 유지할 수 있도록 하는 역할을 한다[2]. 피부의 가장 바깥층인 표피의 각질층은 10~20% 정도의 수분을 함유하고 있으며, 수분이 과도하게 증발되는 것을 억제해 줄 뿐만 아니라 외부에서 필요 이상의 수분이 체내로 유입되는 것을 막아주는 역할을 한다[3-4]. 그러나 각질층의 수분이 10% 이하로 되는 경우에는 피부의 생리작용이 저하되어 피부가 본래의 기능을 잃게되어 거칠어지게 되고 각종 피부 트러블의 원인이 된다. 따라서 피부의 건조를 막기 위한 보습제의 사용은 화장품에서 거의 필수적이다. 화장품에서 요구하는 보습제의 조건으로는 첫째, 적절한 흡습력을 가져야 한다. 둘째, 흡습력이 주위 환경조건의 변화에 의해 영향을 적게 받아야 한다. 셋째, 피부에 대한 친화성이 좋아야 한다. 넷째, 피부와 생체에 대한 안전성이 좋아야 한다. 다섯째, 화장품에서 사용되는 다른 성분들과의 상용성이 우수해야 한다.

보습제로 오래전부터 알려진 것은 글리세린이다. 글리세린은 한 분자중에 세 개의 수산기를 가지고 있어 수소결합을 통해 물 분자와 친화성이 높다. 그러나 글리세린의 경우 대기중의 상대습도가 높은 경우 피부에 수분공급을 더욱 높이게 되지만 대기중의 상대습도가 낮고 사용량이 높은 경우 오히려 피부의 진피층에 함유된 수분을 빼앗아 가기 때문에 오히려 피부를 더욱 건조하게 할 수 있다. 따라서 화장품에 사용되는 보습제들은 대기중의 상대습도, 사용자의 연령, 주변 환경 등에 따라 광범위 하게 사용될 수 있도록 다양하게 연구되고 있다[5].

현재 널리 사용되고 있는 보습제로는 글리세린, 프로필렌글리콜, 부틸렌글리콜과 같은 폴리올류, 아미노산, 피롤리돈 카르본산염, 젖산염과 같은 천연보습인자, 히아루론산염, 콘드로이친 설페이트, 키토산 등의 생체 고분자 물질 등이 있다[6].

이중 키토산은 게, 새우 등의 갑각류의 외각, 곤충의 표피, 균류의 세포벽 등에 함유되어 있는 키틴을 탈아세탈화하여 얻어지는 D-글루코사민의 호모 폴리머(homopolymer) 형태로 생체에 대한 친화성이 우수하고 안전성이 좋은 것으로 알려져 최근 기초 화장품, 모발 화장품, 바디 화장품 등에 대한 응용 연구가 활발히 진행되고 있다[7-12].

그러나 키토산은 저분자 물질에 비해 고분자 형태이므로 물에 대한 용해성이 부족하며 생리활성이 적은 단점이 있다[13]. 따라서 최근에는 생리활성의 측면에서 키토산 올리고당에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 키토산 올리고당은 D-글루코사민이 2~10개 결합한 올리고당으로 키토산을 부분 가수분해하여 얻을 수 있으며 이들은 식물에 해로운 사상균을 억제하는 한편 식물성장에 유리한 방선균의 번식을 조장하는 등 식물의 성장, 분화, 또는 생체방어에 관여하는 정보전달물질로서의 생리활성 등을 지니는 것으로 알려져 있다[14-15].

키토산 올리고당을 화장품에 사용했을 때 예상되는 효과로는 첫째, 고분자인 키토산과 달리 물과 알코올에 대한 용해성이 증가되어 스킨로션, 아스트린젠트, 애프터 쉐이브로션, 팩 등의 제품에 첨가했을 때 침전등의 문제가 적다는 점이다. 둘째, 키토산 올리고당 자체에는 다수의 친수성기가 함유되어 있으므로 화장품에서 요구하는 적절한 보습효과를 부여할 수 있다. 셋째, 고분자 키토산과 달리 저분자 물질이므로 고농도로 사용했을 때 피부에 끈적이는 감촉을 적게 남길 수 있다. 넷째, 항균작용을 예상할 수 있고 향의 보류제로 이용할 수 있다. 다섯째, 키토산 올리고당은 고분자 키토산에 비해 분자량이 적어 피부 각질층의 침투가 보다 용이하므로 부가적인 생리활성 효과들을 예상할 수 있어 기능성 화장품 성분으로의 이용이 가능할 것이다.

일반적으로 헤어스프레이, 헤어젤, 헤어무스, 헤어트리트먼트 등의 모발화장품 분야에서는 고분자 키토산이 유리한 반면, 생리활성이 중시되는 기능성 화장품(functional cosmetics)분야에서는 분자량이 낮은 키토산 올리고당이 더욱 바람직하다.

키토산 올리고당의 제조법으로는 알칼리 가수분해법, 산 가수분해법, sonic irradiation법, 효소분해법, 그리고 아질산법 등이 알려져 있다. 이중 최근까지 이

용되고 있는 방법을 중심으로 살펴보면, Horowitz 등은 키토산을 염산으로 부분 가수분해하여 과잉의 염산을 농축조작으로 제거한 후 양이온 교환 크로마토그래피로 각각의 올리고당을 분리하였다[16]. 또한 Rupley는 키틴을 산으로 부분 가수분해한 다음 활성탄-셀라이트 흡착분리법과 겔여과법을 사용하여 올리고당을 분리하는 방법을 보고하였다[17]. 그러나 활성탄-셀라이트 분리방법은 활성탄에 의한 올리고당의 흡착량이 작고 올리고당의 용출에 다량의 알코올이 요구되며 단당류의 N-아세틸 글루코사민을 회수할 수 없다는 단점이 있으므로 많은 양을 얻는데는 적합하지 않다.

Izume 등은 chitosanase를 이용하여 chitopentamer, chitohexamer 중심의 키토산 올리고당 제조에 관하여 보고하였고[15], Muraki 등은 cellulase를 이용하여 키토산을 가수분해하였으며 이때 침전용매의 종류 및 비율을 달리하면 중합도 분포가 다른 키토산 올리고당을 제조할 수 있다고 보고하였다[13].

아질산을 사용하는 방법은 산성 수용액상에서 키토산을 해중합하여 올리고당 형태로 만드는 반능을 이용한 것으로 반응이 매우 온화한 조건에서 수행될 뿐만 아니라 정량적인 것으로 알려져 있다[18]. 그러나 이 방법의 경우 말단에 알데히드기가 생겨나기 때문에 안전성 측면에서 가능한 알데히드기를 수산기로 바꾸어 주는 것이 유리하다. 따라서 본 연구에서는 반응조건이 온화한 아질산법을 이용하여 말단의 알데히드기가 환원된 키토산 올리고당의 합성을 시도하였다.

또한, 현재까지 키토산 올리고당은 주로 미용 증진을 위한 다이어트 음료 또는 건강 보조식품의 소재로 연구되어 왔으며 화장품 성분으로의 특성에 대한 연구는 미미한 실정이였다. 따라서 본 연구에서는 화장품 분야에서 요구되는 보습성과 기타 생리활성을 측정하여 화장품에 적용해 보고자 한다.

Ⅱ. 실험

1. 시약

키토산 올리고당의 제조에 사용한 Hydrogen Chloride(35%, w/v), NH_4OH (28%, w/v), Sodium nitrite 및 Sodium borohydride는 각각 Junsei Chemical Co.,

Samchun Pure Chemicals Co., Sigma Chemical Co. 및 Aldrich Chemical Co.의 시약을 사용하였다. 수산화나트륨은 Shinyo Pure Chemicals Co.의 특급시약을 사용하였으며 용매인 아세톤과 알코올은 Samchun Pure Chemicals Co.의 공업용 시약을 사용하였다. 세포증식효과와 자유라디칼 소거능 측정은 각각 Sigma사의 MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] 시약과 DPPH(1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl) 시약을 사용하였다. 또한 제조한 키토산 올리고당의 분자량 분포를 알기 위한 표준물질로는 99% 이상의 순도를 가진 폴리에틸렌글리콜(분자량 : 6000, 4450, 1500, 970, 420)을 사용하였다.

2. 키토산 및 키토산올리고당의 제조

분자량이 낮은 키토산을 얻기 위해서 키틴을 NaOH(48%, w/v) 수용액에 넣고 반응시간과 반응온도를 변화시키며 탈아세틸화 반응을 행한 후 여과하고 여액이 중성이 될 때까지 탈이온수로 세척하였다. 반응 후에 키토산을 에탄올, 에테르 순으로 세척한 후 60℃에서 감압 건조하였다. 이렇게 제조한 키토산 25g을 3%(w/v) 염산 수용액 500㎖에 넣어 충분히 용해시켰다. 이 용액을 5℃이하의 낮은 온도로 교반시키면서 10%(w/v) 아질산나트륨(5.36g) 수용액을 6시간 동안 서서히 적가시킨 후 암모니아수를 이용하여 pH(Fisher Scientific, Model 25)를 7.0으로 중화시켰다. 이를 여과한 후 고체상태의 수소화 붕소나트륨 1.47g을 첨가하여 1시간 동안 반응시키고 이를 초기부피의 10배로 농축한 후 아세톤, 메탄올, 그리고 에탄올에 침적시켰다. 이후 하루동안 방치시킨 후 여과하여 감압 건조하였다.

3. 키토산의 평균분자량 및 탈아세틸화도

0.2*M* 초산-0.1*M* NaCl-4*M* Urea (1 : 1 : 1, v/v)용액에 진공 건조된 키토산 분말을 각각 0.03%(w/v), 0.06%(w/v), 0.09%(w/v), 0.12%(w/v) 되도록 용해하고 냉암소에 1일간 방치하였다. 각각을 막여과(Whatman membrane filters cellulose nitrate, pore size 0.2μm)한 후 Ubbelohde(App. Nr. 44854) 점도계를 사용하여 25±0.2℃의 항온조에서 모세관 통과시간을 측정, 고유점도를 계산하고 다

음 식 (1)로부터 분자량을 구하였다.

$$[\eta] = 8.93 \times 10^{-4} M 0.71 \quad \cdots\cdots (1)$$

키토산의 탈아세틸화도는 30℃에서 24시간 동안 진공건조한 분말상의 키토산 3㎎을 KBr 400㎎에 잘 혼합하여 disk로 만든 후 적외선 분광스펙트럼에서 2878 cm^{-1}(C-H stretching band)에 대한 1550cm^{-1}(amide II band)의 상대적인 흡수비로부터 탈아세틸화도를 다음 식 (2)로부터 구하였다.

$$D(\%) = 98.03 - 34.68 (A_{1550} / A_{2878}) \quad \cdots\cdots (2)$$

4. 분석 기기

키토산 올리고당 말단의 알데히드기와 alditol unit 구조는 자외선 흡광광도계(Cecil Instrument CE5501R Spectrophotometer, issue 5041)를 이용하여 분석하였다. 키토산 올리고당의 분자량 분포는 ELSD(Evaporative Light Scattering Detector, SEDERE, France)가 장착된 HPLC(High Performance Liquid Chromatography : Waters, Liquid Chromatograph Model 510)를 이용하여 분석하였다. pH 측정기는 Fisher Scientific Co의 pH/ion meter Model 25를 사용하였다.

5. 흡·보습력 측정

키토산 올리고당의 흡·보습력을 글리세린과 비교, 측정하였다. 흡습력은 황산암모늄 포화수용액과 탄산칼륨 포화수용액을 이용하여 상대습도를 각각 81%와 43%로 조절한 데시케이터 각각에 건조된 시료 0.5g이 든 30㎖의 칭량병을 넣은 후 측정하였다. 보습력은 탄산칼륨 포화수용액을 이용한 상대습도 43%와 실리카겔 데시케이터 분위기(상대습도 30%)에서 수분잔존률을 통하여 측정하였다. 흡·보습률은 다음 식 (3, 4)로부터 구하였다.

$$흡습률(\%) = 100 \times (W_a - W_b)/W_b \quad \cdots\cdots (3)$$

$$수분잔존률(\%) = 100 \times H_2/H_1 \quad \cdots\cdots (4)$$

여기서 W_b, W_a는 방치 전·후의 질량이며, H_1, H_2는 각각 첨가수분량과 방치 후의 수분량이다.

6. 용해성 및 상용성 측정

키토산 올리고당 0.1g을 각 용매 10㎖ 가 들어있는 시험관에 조금씩 잘 혼합하면서 넣고 밀봉한 후 1일 동안 25℃ 인큐베이터에 둔 후 용해 여부를 관찰하여 용해성을 판정하였다. 화장품에서 사용되는 성분들과의 상용성을 알아보기 위해 키토산 올리고당과 시험대상 물질을 각각 시험관에 넣고 2-3분간 흔들었을 때 용액의 현탁여부를 관찰하였다. 또한 키토산 올리고당의 화장품에의 적용 가능성을 알아보기 위해 스킨로션, 모이스쳐크림, 헤어젤 등의 처방에 일정한 비율로 배합하여 실험하였다.

7. 세포증식효과 및 상처치유효과 측정

96 microwell plate에 5% fetal bovine serum(FBS) 용액 100㎕ 씩 넣은 다음, 2% FBS가 함유된 DMEM 배지에 시료를 일정 농도 분산시켜 묽혀 100㎕ 씩 다시 첨가했다. Hemocytometer를 이용하여 신생아의 포피(foreskin) 조직에서 얻은 섬유아 세포를 well 당 4000개씩 100㎕ 배지에 분산시켜 가한 후 7일간 배양하였다. 배양이 끝난 후 상등액을 제거하였다. 다시 5% PBS (phosphate buffered saline) 200㎕씩을 가하여 세척하고 DMSO를 well당 150㎕씩 가한 후 10분간 흔들어 녹인 후 570㎚에서의 흡광도를 측정하였다. 이때 시료를 첨가하지 않고 같은 방법으로 실험을 진행한 것을 대조군으로 하여 상대적인 흡광도의 차이로부터 세포증식 효과를 비교하였다.

상처치유효과는 Hairless mouse의 등에 해부용 칼을 사용하여 2㎝ 정도 길이 방향으로 진피 깊이의 상처를 낸 다음, 이를 외과 수술용 봉합사로 봉합하였다. 이 수술 부위에 20%, 2%의 시험 물질, 생리 식염수 및 시판되고 있는 상처치유

용 연고를 10일간 매일 처치하였다. 이렇게 처치하는 동안 상처의 치유 정도를 육안으로 관찰하였다.

8. 자유라디칼 소거능과 미백효과

키토산 올리고당에 대한 자유라디칼 소거능은 Fujita 등에 의해 행해진 DPPH 법을 이용하여 측정하였다. DPPH(diphenyl picryl hydrazyl)를 에탄올 용액에 200μM로 용해시켜 자주빛을 띤 안정한 자유라디칼을 만들고 이렇게 만들어진 DPPH용액 1㎖와 적당한 농도의 키토산올리고당을 혼합하여 37℃에서 30분간 정치시켰다. 이후 혼합물 속에 존재하는 자유라디칼의 O.D.값은 516㎚에서 측정하였다. 자유라디칼 제거활성능력(free radical scavenging activity, SC_{50})은 자유라디칼의 50%가 제거되는 혼합물의 농도에서 결정되었다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 평균분자량 및 탈아세틸화도

각각의 반응조건으로부터 제조된 키토산의 고유점도 및 평균분자량은 표 1과 같다. 낮은 분자량의 키토산 올리고당을 제조하기 위해 반응온도와 반응시간을 각각 140℃와 6시간으로 고정한 후 이후의 실험을 진행시켰다. 이때의 탈아세틸화도는 적외선스펙트럼을 사용한 base line method에 의해 약 80%임을 확인하였다. 제조한 키토산 올리고당의 수율은 약 70~85% 정도이었으며 분자량분포는 HPLC 컬럼을 이용하여 분석하였다. 표준물질과의 비교를 통해서 중합도가 2~6인 키토산 올리고당의 혼합물임을 확인할 수 있었다. 이때의 HPLC 조건은 표 1과 같다.

2. 반응의 확인

키토산 올리고당의 합성과정에서 생성된 알데히드기와 그의 환원 형태인 히드록시기는 MBTH(3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone, Sigma)를 이용하여 반응의 완결여부를 확인할 수 있었다. Fig. 1 에서 보는 바와같이 알데히드기를

표 1. HPLC 분석 조건

고정상 : OHpak KB-802, 803 (8㎜ x 300㎜)
이동상 : 0.1M $NaNO_3$
유 속 : 1㎖/min
검출기 : ELSD
컬럼 온도 : 40℃

갖는 형태는 예상한 것과 마찬가지로 코발트 블루색을 띠었고 658㎚에서 흡광도를 나타냈으나 alditol unit는 처음과 별 차이가 없었다. 이 결과로부터 pinacol rearrangement 반응이 진행되어 키토산의 말단에 알데히드기가 생성되었음을 MBTH 시약으로 확인하였으며, $NaBH_4$ 처리 전·후의 흡광도 변화를 통하여 알데히드기가 환원되었음을 확인할 수 있었다. Fig. 2에는 키토산 올리고당의 ^{1}H-NMR 스펙트럼을 나타내었다.

3. 흡·보습력

화장품에서 널리 사용되는 보습제의 하나인 글리세린과 본 실험에서 합성한 키토산올리고당에 대한 흡·보습력의 경시변화를 살펴보았다. Fig. 2와 Fig. 3에는 각각 상대습도 43%와 81%에서의 흡습성 결과를 나타내었다. 상대습도 43%에서 키토산 올리고당은 글리세린에 대하여 20, 60시간 후에 각각 약 63%, 24% 정도의 흡습력을 나타냈으며, 상대습도 81%에서는 각각 57%, 20% 정도의 흡습력을 지니는 것으로 나타났다. 그러나 키토산 올리고당은 그 자체로서 어느 정도의 흡습력을 지니고 있으며 5~10시간 정도의 시간범위에서는 글리세린과 유사한 흡습력을 보였으며 10시간 이후에는 일정한 흡습력을 유지했다. Fig. 4과 Fig. 5에는 상대습도 43% 분위기와 실리카겔 분위기(상대습도 30%)에서의 보습성 결과를 나타내었다. 각각의 경우에 있어서 키토산 올리고당의 보습력은 60시간 경과 후에도 글리세린의 98%, 91% 정도를 유지하고 있다. 따라서 키토산 올리고당을 피부화장품의 한 조성물인 글리세린과 같은 여러 보습제와 혼합하여 사용했을 경우 일시적으로 충분한 수분을 공급하여 줌으로써 피부에 탄력과 윤기를 부여할 수 있을 뿐만 아니라 기타 생리적 효과를 부여할 수 있을 것으로 사료된다.

4. 세포증식효과 및 상처치유효과

MTT 분석의 원리는 tetrazolinone salt인 MTT가 세포내에 존재하는 미토콘드리아의 succinate dehydrogenase에 의해 자주색의 MTT formazan을 형성하는 특성을 이용한 것이며, 이때 이러한 전환은 살아있는 세포에서만 가능하므로 MTT formazane의 양은 결국 살아 있는 세포의 수에 비례하게 된다. MTT 분석에 의한 키토산 올리고당의 인체 피부의 섬유아세포의 증식실험 결과를 Fig. 6에 나타내었다. 이 실험 결과에서 알 수 있듯이, 키토산 올리고당을 처리한 대조군은 0.000032~0.01% 농도범위에서 용액을 처리하지 않은 대조군보다 약 10~50% 정도의 세포증식이 이루워졌음을 알 수 있다.

표 2는 키토산 올리고당의 상처치유 효과에 대한 결과이다. 각각 2%, 20%로 처리한 키토산 올리고당은 대조군에 비해 높은 상처치유 효과를 확인할 수 있었다. 즉, 키토산 올리고당의 섬유아세포증식 효과에 의해 콜라겐 합성이 촉진되고 그 결과 상처치유 효과를 나타내 보인 것으로 생각된다.

표 2. 상처치유 효과

시 료	등 급
키토산 올리고당(20%)	+++
키토산 올리고당(2%)	+++
생리식염수	+

+++ : 흉터가 없이 완치됨, + : 흉터가 남고 완치가 느림

5. 자유라디칼 소거능과 미백효과

자유라디칼은 생체내에서 피부 노화의 원인으로 이 자유라디칼을 소거시켜 주면 어느정도 피부 노화를 억제할 수 있다. 본 실험에서 얻어진 중합도 2~6 사이의 키토산 올리고당의 경우 수용성이며 전 pH 범위에서 침전없이 안정했으며 자유라디칼 소거능 측정 실험결과 나타난 소거능은 자유라디칼의 50%가 제거되는 혼합물의 농도인 SC_{50} 값이 약 3213ppm이었다. 멜라닌 합성은 키토산 올리고당을 첨가했을 때 세포당 10배 정도 지연되었다(Fig. 7).

6. 상용성

화장품에 널리 폴리올류에 대한 상용성을 관찰하기 위해 표 3의 조성으로 시험물질을 혼합한 후 현탁 유무를 확인하였다.

표 3. 폴리올과의 상용성 테스트 조건

시 료	함량(%)
폴리올	10.0
키토산 올리고당	0.2
정제수	89.8

(단위 : w/w %)

표 4에는 여러 가지 폴리올류에 대한 상용성 측정 결과를 나타내었다.

표 4. 폴리올과의 상용성 측정 결과

시 료	상용성
글리세린	O
프로필렌글리콜	O
부틸렌글리콜	O
폴리에틸렌글리콜 400	O

표 5에는 화장품에 널리 상용되는 여러 가지 점증제에 대한 상용성 테스트를 위한 처방을 나타내었다.

표 5. 점증제와의 상용성 테스트 조건

시 료	함량(%)
점증제	1.0
키토산 올리고당	0.2
정제수	98.8

(단위 : w/w %)

실험에 사용된 점증제로는 히드록시에틸셀루로오즈, 히드록시프로필셀루로오

즈, 폴리에틸렌글리콜 디스테아레이트이며, 테스트 결과 실험에 사용된 모든 점증제들에 대해 모두 우수한 상용성을 나타내었다. 표 6에는 점증제에 상용성 테스트 결과를 나타내었다.

표 6. 점증제와의 상용성 측정 결과

시 료	상용성
히드록시에틸셀루로오즈	O
히드록시프로필셀루로오즈	O
폴리에틸렌글리콜 디스테아레이트	O

표 7에는 세정용 화장품에 널리 사용되는 여러 가지 음이온성 계면활성제에 대한 상용성 테스트를 위한 처방을 나타내었다.

표 7. 계면활성제와의 상용성 테스트 조건

시 료	함량(%)
계면활성제	15.0
키토산 올리고당	0.2
정제수	84.8

(단위 : w/w %)

실험에 사용된 음이온 계면활성제는 모발화장품 분야에서 널리 사용되는 소디움 라우릴설페이트, 소디움 라우릴에테르설페이트이며, 테스트 결과 실험에 사용된 계면활성제들에 대해 모두 우수한 상용성을 나타내었다. 표 8에는 계면활성제에 상용성 테스트 결과를 나타내었다.

표 8. 계면활성제와의 상용성 측정 결과

시 료	상용성
소디움 라우릴설페이트	O
소디움 라우릴에테르설페이트	O
코카미도 프로필베타인	O

실제 화장품에 첨가했을 때 경시에 따른 상분리 또는 침전여부를 확인하기 위해 대표적인 몇가지 화장품 처방을 작성하여 안정성 테스트를 실시하였다(표 9 10, 11, 12).

표 9. 현탁 화장수 처방

성분명	함량(%)
POE(60) hydrogenated castor oil	0.5
Glycerine	3.0
Propylene glycol	3.0
Phenyl dimethicone	0.5
Chitosan oligosaccharide	0.2
Ethanol	8.0
Methyl paraben	0.2
Propyl paraben	0.1
Perfume	0.2
Water	to 100

(단위 : w/w %)

표 10. 모이스쳐 크림 처방

성분명	함량(%)
Stearic acid	3.0
Cetostearyl alcohol	2.5
Glyceryl monostearate	2.2
Polysorbate 60	1.6
Sorbitan sesquioleate	0.5
Liquid paraffin	12.0
Squalane	2.0
Dimethicome	0.3
Glycerine	6.0
Chitosan oligosaccharide	0.5
Triethanol amine	0.2
Perfume	0.2
Water	to 100

(단위 : w/w %)

표 11. 샴푸 처방

성분명	함량(%)
Sodium lauryl sulfate (30%)	20.0
Sodium laureth sulfate (30%)	30.0
Cocamidopropyl betain (30%)	4.0
Lauramide DEA	5.0
Propylene glycol	1.0
Chitosan oligosaccharide	0.5
Acetamide MEA	0.2
Polyquaternium-10	0.2
Citric acid	0.1
Red No 33	q.s.
Perfume	q.s.
Water	to 100

(단위 : w/w %)

표 12. 헤어젤 처방

성분명	함량(%)
Carbomer 940	0.7
Hydroxypropyl cellulose	1.0
Phenyl dimethicone	0.1
Chitosan oligosaccharide	0.5
Nonoxynol-12	0.5
Propylene glycol	3.0
Triethanol amine	0.8
Ethanol	15.0
Perfume	0.2
Water	to 100

(단위 : w/w %)

제조된 스킨로션, 모이스쳐 크림, 샴푸, 헤어젤은 실온, 냉온, 37℃, 45℃ 항온조에 1주일 경시된 후 물성과 침전여부 등의 물리적인 변화를 관찰하였으나 뚜렷한 차이가 없음을 알 수 있었다.

Ⅳ. 결 론

천연고분자인 키틴으로부터 비교적 분자량이 낮은 키토산을 합성한 후 이를 아질산을 이용하여 가수분해시켜 세포증식효과 및 상처치유효과 등의 생리적인 효과가 있는 키토산 올리고당을 합성하였다. 합성한 키토산 올리고당은 중합도가 2~6이었으며 MBTH 시약을 이용하여 반응이 진행되었음을 확인하였다. 또한 흡·보습력을 글리세린과 비교·측정한 결과, 상대습도 43%와 81%에서는 글리세린에 대하여 각각 63%와 57%의 흡습력을 보였으며, 상대습도 43%와 실리카겔 분위기(상대습도 30%) 하에서는 각각 98%와 91%의 수분잔존률을 유지하였다. 키토산 올리고당은 0.000032~0.01% 농도 범위에서 세포증식효과가 있었으며, 2%와 20%로 처리한 경우 상처치유효과가 우수하였다. 또한 자유라디칼(SC_{50})은 3213ppm이었으며 전 pH 범위에서 안정하였다.

또한 화장품에서 사용되는 각종 성분들과의 상용성의 여부를 관찰한 결과 글리세린, 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜 400과 같은 폴리올류의 보습제, 히드록시에틸셀루로오즈 등의 고분자 점증제, 소디움 라우릴 설페이트와 같은 음이온계면활성제 등과 혼합되어도 경시변화에 따라 침전 등을 일으키지 않고 안정성에 문제가 없는 것으로 보아 기초화장품, 모발화장품 등의 분야에 유용하게 응용될 수 있음을 확인할 수 있었다. 실제로 현탁화장수, 모이스쳐 크림과 같은 기초화장품과 샴푸, 헤어젤과 같은 모발화장품의 처방에 배합한 결과 안정성에 문제가 없음을 알 수 있었다. 이와 같은 여러 생화학적인 효과가 있는 수용성 키토산 올리고당을 글리세린과 같은 보습제와 혼합하여 기능성 화장품에 첨가한다면 보습력뿐만 아니라 생리작용도 부여할 수 있을 것으로 기대된다.

Abstract

Chitosan oligosaccharide having physiological activity, such as cell proliferation and wound healing, was prepared by $NaNO_2$ oxidation-$NaBH_4$ reduction from

natural chitosan. After deamination by $NaNO_2$ oxidation, the reducing-end residue from $NaBH_4$ was converted to alditol unit, and the reduction was checked by MBTH reagent. The resulting chitosan oligosaccharide had a degree of polymeration of 2-6 from HPLC analysis. From moisture absorption test at relative humidity of 43% and 81%, the moisture absorption ability was 63% and 57%. Moisture retention ability at relative humidity of 43%, silica gel emvironment, was 98% and 97% respectively. Cell proliferation was showed in the range of 0.000032~0.01%, wound healing effect was also appeared in the concentration of 2% and 20%. Antioxidative effect (SC_{50}) was 3213 ppm. Chitosan oligosaccharide was compatible with most of ingredients used in cosmetic products.

감 사

본 연구를 수행하는데 있어 도움을 주신 (주) 태평양 기술연구원 화장품연구소 김준오 선임연구원, 최문재 선임연구원, 안전성센터의 조윤기 선임연구원께 감사드립니다.

참고 문헌

1. B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and J. D. Watson, Molecular Biology of the Cell, Garland Publishing Inc., New York, 3rd Edition, 1994
2. I. H. Blank, J. Invest. Dermatol., 18, 433(1952).
3. R. O. Potts, Cosmetics & Toiletries, 100, 27(1985).
4. P. T. Pugliese, Skin Inc., Fall (1988)
5. R. L. Rietschel, J. Invest. Dermatol., 70, 152(1978).
6. K. Laden, R. Spitzer, J. Soc. Cosmet. Chem., 18, 351(1967).

7. C. J. Brine, P. A. Sandford, and J. P. Zikakis, "Advances in Chitin and Chitosan", Elsevier Sciences Publisher, London, 1992.

8. R. A. A. Muzzarelli, "Chitin", Pergamon Press, Oxford, 1977.

9. S-B. Gudmund, A. Thorleif, and S. Paul, "Chitin and Chitosan", Elsevier Sciences Publisher, New York, 1989.

10. R. A. A. Muzzarelli, "Natural Chelating Polymer", Pergamon Press, New York, 1973

11. 하병조, "화장품학", 수문사, 서울, 1999.

12. 하병조, "키토산의 화학적 변형 및 응용에 관한 연구", 서울대학교 박사학위 논문, 1996.

13. E. Muraki, F. Yaku, and H. Kojima, *Carbohydr. Res.*, **239**, 227(1993).

14. S-I. Nagae, M. Izume, S. Nishimura, H. Kawagishi, and A. Ohtakara, Biosci. Biotech. Biochem., 56, 2, 344(1992).

15. M. Izume, S. Nagae, H. Kawagishi, and A. Ohtakara, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 1327(1992).

16. S. T. Horowitz, S. Roseman, H. J. Blumenthal, *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 5046(1957).

17. J. A. Rupley, *Biochim. Biophys. Acta.*, **83**, 245(1964)

18. G. G. Allan and M. Peyron, "Chitin and Chitosan", ed. S-B. Gudmund, A Thorleif, and S. paul, 443, Elsevier Sciences Publisher, New York(1989).

19. T. Mosmann, J. Immunological Methods, 65, 55(1983).

20. J. P. Johan, "Membrane Lipid Oxidation", CRC Press, New York, 1993.