

## Eugenol과 safrole을 부가한 chitosan 유도체 합성

김제중\* · 정병옥 · 장판식 · 박동기<sup>1</sup>

서울산업대학교 식품공학과, <sup>1</sup>건국대학교 응용생물화학과

### A Study on the Synthesis of Eugenolchitosan and Safrolechitosan

Je-Jung Kim\*, Byung-Ok Jung, Pahn-Shick Chang, and Dong-Ki Park<sup>1</sup>

Department of Food Science and Technology, Seoul National University of Technology

<sup>1</sup>Department of Applied Biology and Chemistry, Konkuk University

Safrolechitosan (SaCs) and eugenolchitosan (EuCs) were synthesized and characterized to increase water solubility and functionality of chitosan. Product impurities were removed by Soxhlet apparatus using methanol to obtain final product with high purity. Using Ubbelohde viscometer, molecular weights of chitosan, EuCs, and SaCs were determined as  $1.2 \times 10^5$ ,  $7.8 \times 10^5$ , and  $7.5 \times 10^5$  Da, respectively. IR spectrum of SaCs revealed chemical shift of amide II band ( $1,553 \text{ cm}^{-1}$ ) of chitosan grafted by safrole caused by generation of covalent bond between primary amine of chitosan and double bond of safrole. Due to graft reaction of safrole onto chitosan, vinyl bands ( $1,611$  and  $1,442 \text{ cm}^{-1}$ ) of safrole disappeared. In graft reaction of eugenol onto chitosan, shift of amide II band ( $1,553 \text{ cm}^{-1}$ ) and disappearance of vinyl band were observed. On <sup>1</sup>H-NMR spectrum of EuCs,  $\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-$  peak in eugenol (monomer) disappeared, whereas  $-\text{H}_2\text{C}-\text{CH}_2-$  peak appeared. Above results indicate safrole and eugenol were successfully grafted onto chitosan.

**Key words:** safrolechitosan (SaCs), eugenolchitosan (EuCs), chitosan, IR, NMR

### 서 론

Chitin 및 chitosan은 다양한 생리 기능성을 가지고 있어 의약, 식품, 재료분야 등 여러 산업분야에서 이용되고 있다. 특히 최근 10년 전부터 항균작용(1), 고혈압조절작용(2) 및 콜레스테롤 저하작용(3), 그리고 면역활성의 증강작용(4) 등 여러 가지 생리활성을 가지고 있다는 사실이 밝혀지면서 기능성 식품으로서의 개발에 이용되고 있다. 한편, 세신(細辛, 쥐방울과, *Aristolchoaceae*)은 다년생 초목인 죽두리풀(*Asarum Sieboldii Miquel*)로서 근경은 가늘고 길며 수염 뿌리가 많다. 잎은 줄기 끝에 2엽이 나며 엽병이 길고 둥근 난형 또는 신장 난형으로 길이 15 cm 가량이다. 뿌리는 10-15 cm, 지름이 약 0.1 cm로서 바깥 면이 담갈색이며 얇은 세로 주름이 있다. 우리나라 북부, 중부, 남부의 산기슭 등 부식질이 많은 넓은 나무 밑에서 서식하는데, safrole은 이 식물의 뿌리에서 추출한 것으로 그 효능은 해열, 진통, 항균, 진균 등의 효과가 있는 것으로 알려져 있다(5,6). 또한, 정향은 정향과(Myrtaceae)에 속하는 상록교목인 정향나무(*Eugenia caryophyllata* Thunberg)로서 여러해살이 풀이며 줄기는 곧추서고 높이는 40-80 cm 정도이다. 잎은 보통 어

긋나게 붙으나 드물게는 무질서하게 붙는 것도 있다. 잎몸은 버들잎 모양이고 길이 6-10 cm, 너비 1-2 cm이며 끝이 뾰족하고 잎 양면이 진한 풀색이다. 우리나라 중부 및 남부의 양지바른 산기슭, 들 언덕 등에 서식한다. Eugenol은 용근풀로부터 추출하며, 약효로는 항균효과 및 자궁 수축효과 등이 있는 것으로 알려져 있다(5,6). Eugenol은 일반적으로 산화이연과 혼합하여 zinc oxide-eugenol(ZOE) paste형태로 되어 우식와동의 임시 충전, 근관충전 및 치주수술 후 처치등에 활용되고 있으며, ZOE를 치아와동에 적용시 소량의 eugenol이 상아질을 통해 치주까지 확산되어 그 작용이 나타게 된다(7). Eugenol의 진통작용 기작에 대한 연구는 다양하게 이루어져 왔다. 가재의 감각신경활동 억제에 대하여 Ozeki가 보고(8)한 이래, Kozam도 eugenol이 좌신경의 활동전압 전달을 3시간 동안 비가역적으로 억제한다고 보고 하였다(9).

본 논문에서는 chitosan이 약산과 특수한 유기용매에만 용해되어 사용에 많은 제약이 있다고 판단되어 보다 효과적인 활용방안과 연구를 위하여 수용성인 eugenolchitosan(EuCs)과 safrolechitosan(SaCs)을 제조하여, eugenol과 safrole의 기능성을 부여하고, 이를 분말화함으로써 새로운 기능성 물질을 제조하였다.

### 재료 및 방법

본 실험에서의 시약으로는 safrole(Sigma Chemical Co., St. Louis, USA), eugenol(Sigma Chemical Co., St. Louis, USA), ceric ammonium nitrate(Sigma Chemical Co., St. Louis, USA),

\*Corresponding author: Je-Jung Kim, Department of Food Science and Technology, Seoul National University of Technology, 172 Kongneung-dong, Nowon-gu, Seoul 130-743, Korea  
Tel: 82-2-970-6732  
Fax: 82-2-976-6460  
E-mail: jejung@snut.ac.kr

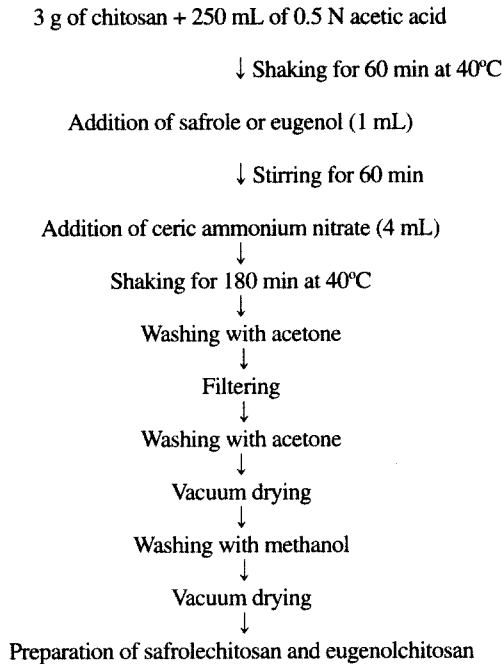


Fig. 1. Schematic procedures for the preparation of safrolechitosan and eugenolchitosan.

acetic acid, nitric acid, methanol, ethanol, acetone, 질소가스 등의 99.0% 이상 순도를 갖는 제품을 사용하였다. 또한 실험에 사용한 chitosan(D.A. 98% 이상)은 (주)CNC(경기도, 양주군)에서 구입하여 사용하였다.

Chitosan 유도체인 SaCs와 EuCs의 제조

Chitosan 유도체인 SaCs 및 EuCs의 합성방법은 Fig. 1에 나

타내었는데, chitosan을 초산용액에 녹여 반응플라스크에 넣고 질소가스 및 냉각수 기류하의 40°C 항온수욕조에서 oil상태의 safrole 및 eugenol을 1 mL씩넣고 60분 동안 반응시켰다. 0.1 M의 Ceric ammonium nitrate(CAN) 촉매를 4 mL넣고 다시 180 분간 반응시켜 acetone으로 석출시킨 후 진공건조하고, Soxhlet 장치에서 methanol을 사용하여 미반응물을 제거함으로써 최종 산물을 얻었다(10).

FT-IR 분석

Chitosan과 chitosan 유도체인 SaCs와 EuCs의 구조 및 합성 유무를 확인하기 위하여 Fourier transform infrared(FT/IR, Nicolet Model Magna IR 550, Madison, WI)를 사용하였으며, 각 시료는 KBr과 혼합하여 pellet으로 제조하여 상온에서 cell mount에 고정시킨 후 IR spectrum을 얻어 구조분석에 사용하였다.

<sup>1</sup>H-NMR 분석

Chitosan과 chitosan 유도체인 SaCs와 EuCs의 구조 및 합성 유무를 확인하기 위하여 500 MHz <sup>1</sup>H-NMR(Bruker AMX-500, Karlsruhe, Germany)을 이용하여 chitosan 2%-DCl/D<sub>2</sub>O, SaCs와 EuCs는 D<sub>2</sub>O, safrole과 eugenol은 CDCl<sub>3</sub>에 용해시켜 spectrum을 얻었다.

점도 및 분자량 측정

0.2 M acetic acid, 0.1 M sodium chloride, 4 M urea용액을 각각 1:1:1(v/v/v)로 혼합하여 chitosan 유도체인 SaCs 및 EuCs를 일정 농도로 용해시킨 후 희석하여 4°C의 냉암소에 3일간 방치하였으며, 25°C로 일정하게 유지되는 항온조에서 점도측정장치(Schott, Schott-Geraete GmbH, Postfach 1130, Germany)에 Ubbelohde 점도계를 사용하여 평균점도를 측정하였다. 측정용액이 모세관을 통과하는 시간을 5회 반복 측정하였으며 통과시간의 평균값을 점도 평균분자량(11,12) 계산을 위한 아

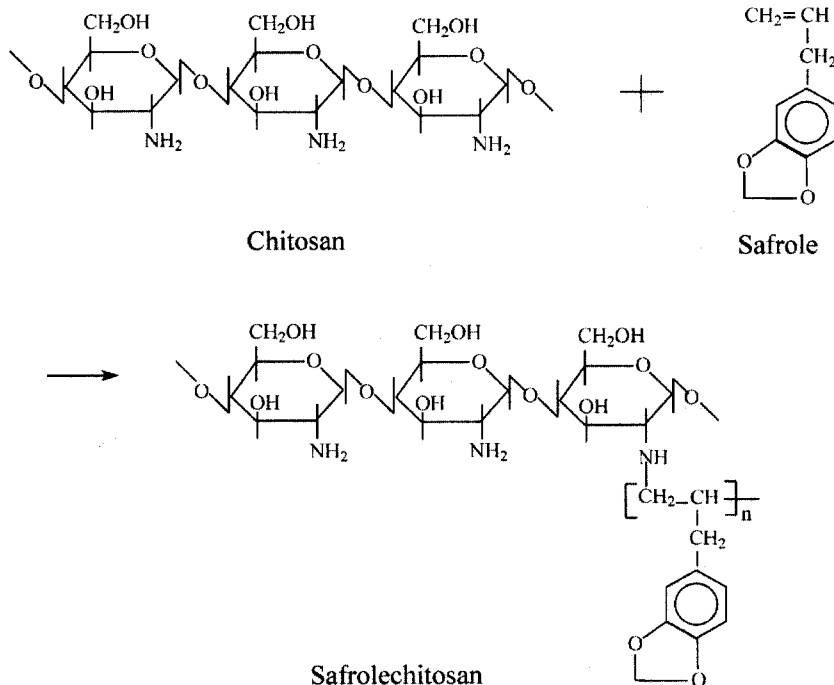


Fig. 2. Schematic procedure for preparation of safrolechitosan derivatives.

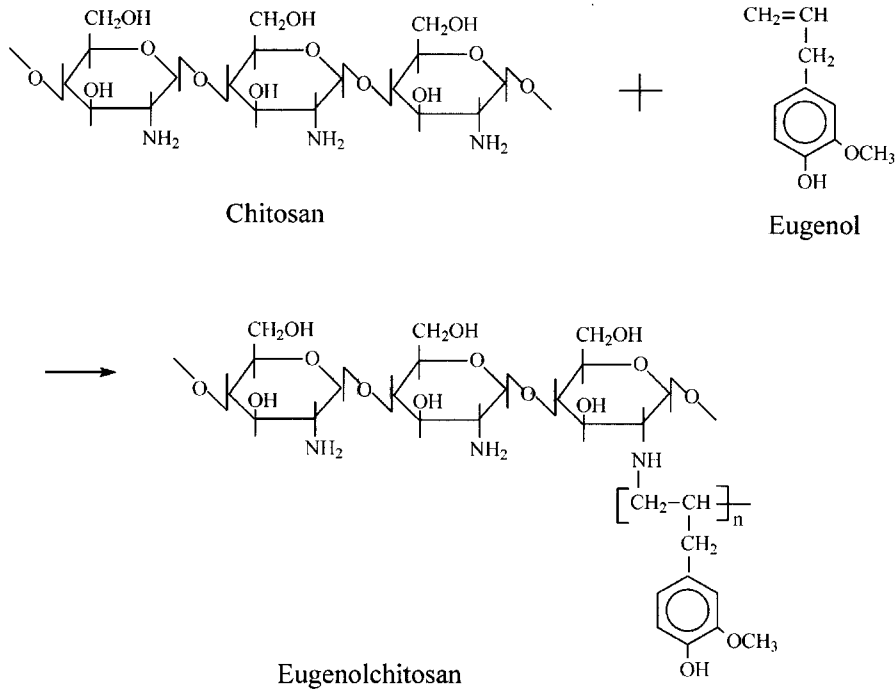


Fig. 3. Schematic procedure for preparation of eugenolchitosan derivatives.

래식 Mark-Houwink-Sakurada 방정식에 대입하여 산출하였다.

$$\bar{M}_v = ([\eta]/K)^{1/a}$$

여기서,

$\eta$ : 고유점도(intrinsic viscosity)

$M_v$ : 점도평균분자량

K: Mark-Houwink-Sakurada 상수(=  $8.93 \times 10^{-4}$ )

a: Mark-Houwink-Sakurada 지수(= 0.71)

### 결과 및 고찰

#### Chitosan 유도체의 제조 및 점도평균분자량 측정

Ubbelohde 점도계를 사용하여 점도평균분자량을 산출한 결과 chitosan 및 chitosan유도체인 EuCs와 SaCs의 경우 각각  $1.2 \times 10^5$  Da,  $7.8 \times 10^5$  Da 및  $7.5 \times 10^5$  Da인 것으로 확인되었다.

EuCs와 SaCs의 경우, 예상보다 3-4배 정도 큰 점도평균분자량을 갖는 것으로 나타났는데, 이러한 결과는 chitosan에 eugenol과 safrole이 합성된 EuCs와 SaCs의 자체점도가 증가하는 것에 기인하는 것으로 예측된다. 즉, Fig. 2와 3에서와 같이 chitosan 구조에 eugenol과 safrole의 고리구조가 첨가되어 고리구조의 함량이 증가하며 이러한 구조가 그물구조형성에 기여함으로써 EuCs와 SaCs의 자체점도가 증가하게 되며 이에 따라 점도평균분자량이 예상보다 더 크게 산출된 것으로 생각된다. 또한, 점도평균분자량이 감소하지 않는 결과로 볼 때, 본 연구에 의하여 제조된 EuCs와 SaCs는 원래 chitosan의  $\beta$ -1,4 결합 및 고리구조가 파괴되지 않았음을 시사한다. 또한, chitosan은 불용성이지만 수용성이 증대된 EuCs와 SaCs의 경우 점도 평균분자량이  $7.8 \times 10^5$  Da과  $7.5 \times 10^5$  Da 경우 5-7% 정도가 물에 용해된다.

#### FT-IR에 의한 SaCs와 EuCs의 구조분석

Chitosan 유도체인 SaCs가 그래프트된 chitosan 공중합체의 화

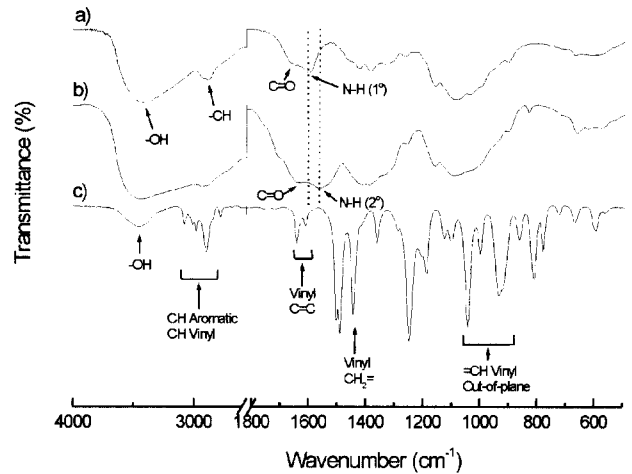


Fig. 4. IR spectra of chitosan (a), safrolechitosan (b), and safrole (c).

학구조 변화를 관찰하기 위하여 Fig. 4에서 (a) chitosan (b) safrolechitosan (c) safrole 단량체의 FT-IR spectrum을 나타내었다. Chitosan에 대한 FT-IR spectrum의 경우  $3,500 \text{ cm}^{-1}$ 에서 -OH의 흡수띠,  $2,920 \text{ cm}^{-1}$ 에서의 -CH stretching에 기인하는 흡수띠를 나타내고 있으며,  $1,653$ 과  $1,595 \text{ cm}^{-1}$ 에서 carbonyl기의 stretching vibration(amide I)과 1차 amine의 N-H bending vibration(amide II) 흡수 파장을 각각 발현하고 있다. Safrole의 경우 vinyl기에 대한 특징인 C=C 및  $\text{H}_2\text{C}=\text{}$ 가 각각  $1,642 \text{ cm}^{-1}$ 와  $1,434 \text{ cm}^{-1}$ 에서 흡수띠를 나타내고 있다. Safrole이 그래프트된 chitosan 공중합체의 경우, safrole의 공유결합에 의한 chitosan 내 amine기와의 반응으로 인하여 순수 chitosan보다 amide II의 흡수띠가  $1,553 \text{ cm}^{-1}$ 으로 이동함을 알 수 있었다. 이것은 chitosan 내의 1차 amine기가 safrole의 이중결합과 반응하여 공유결합을

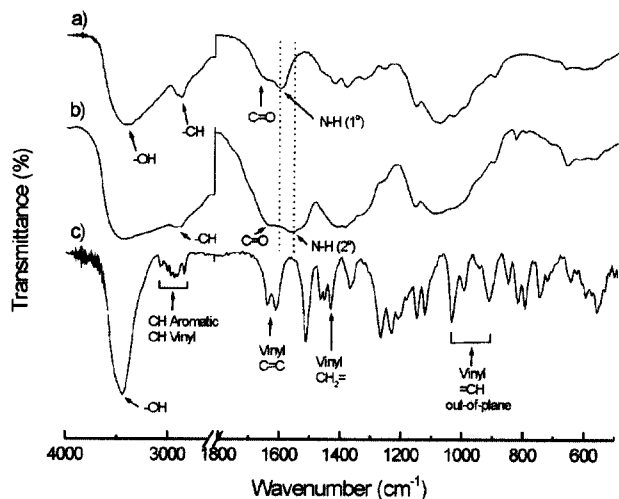


Fig. 5. IR spectra of chitosan (a), eugenolchitosan (b), and eugenol (c).

형성함으로써 흡수띠의 이동현상이 나타난 결과이다. 또한, safrole이 반응하면서 vinyl기의 특징인 C=C 및 H<sub>2</sub>C=의 1,611 cm<sup>-1</sup>와 1,442 cm<sup>-1</sup>에서의 흡수띠가 사라짐을 확인하였다. Eugenol과 chitosan을 합성한 EuCs의 구조분석을 위하여 Fig. 5에서와 같이 (a) chitosan (b) eugenolchitosan (c) eugenol 단량체의 FT-IR spectrum을 각각 나타내었다. Eugenol 단량체의 경우, 3,443 cm<sup>-1</sup>에서 매우 높은 흡수파장을 나타내고 있는데, 이는 benzene 고리에 붙어있는 -OH의 흡수띠를 나타내고 있으며, vinyl기의 특징인 C=C 및 H<sub>2</sub>C=는 1,610 cm<sup>-1</sup> 및 1,434 cm<sup>-1</sup>에서 각각의 흡수띠를 나타내고 있다. 또한, eugenol이 반응하면서 vinyl기의 특징적인 peak인 C=C 및 H<sub>2</sub>C=의 1,612 cm<sup>-1</sup>, 1,434 cm<sup>-1</sup>에서의 흡수띠가 사라짐을 관찰하였다. 그 외 흡수띠는 SaCs와 동일하였다.

이상의 결과로부터, safrole과 eugenol이 chitosan에 그래프트되어 SaCs 및 EuCs가 제조되었음을 확인하였으며, 본 논문에서의 IR spectrum에 대한 분석결과는 다른 단량체를 합성한 chitosan(13,14), *O*-carboxymethyl chitosan(13) 및 *O*-succinyl chitosan(14)의 경우와 유사하였다.

#### <sup>1</sup>H-NMR에 의한 SaCs와 EuCs의 구조분석

Chitosan 유도체인 SaCs와 EuCs를 합성한 후 <sup>1</sup>H-NMR에 적용하여 구조분석을 위한 spectrum을 얻을 수 있었으며 그 결과를 Fig. 6 및 7에 나타내었다. Chitosan 단량체의 경우(Fig. 6(a)), 3.7-3.9 ppm에서 대표적인 특성 peak를 나타내는데 이것은 chitosan의 H<sub>3</sub>-H<sub>6</sub> 수소에 기인한 것이며, H<sub>2</sub>는 3.1 ppm에서 나타난다. 또한, 1.8 ppm에서 나타나는 peak는 acetyl화된 탄소(CH<sub>3</sub>-CO-NH)에 붙은 수소의 흡수 peak이다. Fig. 6(c)의 결과로부터, safrole의 spectrum은 5.7-6.0 ppm에서 H<sub>2</sub>C=CH-에 기인한 peak를 나타내고 있으며, 6.5-6.6 ppm에서는 benzene고리에 붙은 수소에 의한 peak를 의미하는 것으로 각각 확인되었다. 합성 유도체인 SaCs의 경우(Fig. 6(b)), safrole 단량체의 5.7-6.0 ppm에서 나타난 이중결합(H<sub>2</sub>C=CH-) peak가 사라지는 대신, 2.1-2.2 ppm에서 단일결합(-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-)의 peak가 생성됨을 알 수 있었고, EuCs의 경우(Fig. 7(b)), eugenol 단량체의 5.7-6.0 ppm에서 나타난 이중결합(H<sub>2</sub>C=CH-) peak가 사라지는 대신, 1.9와 2.2 ppm에서 단일결합(-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-)의 peak가 생성됨을 알 수 있었다.

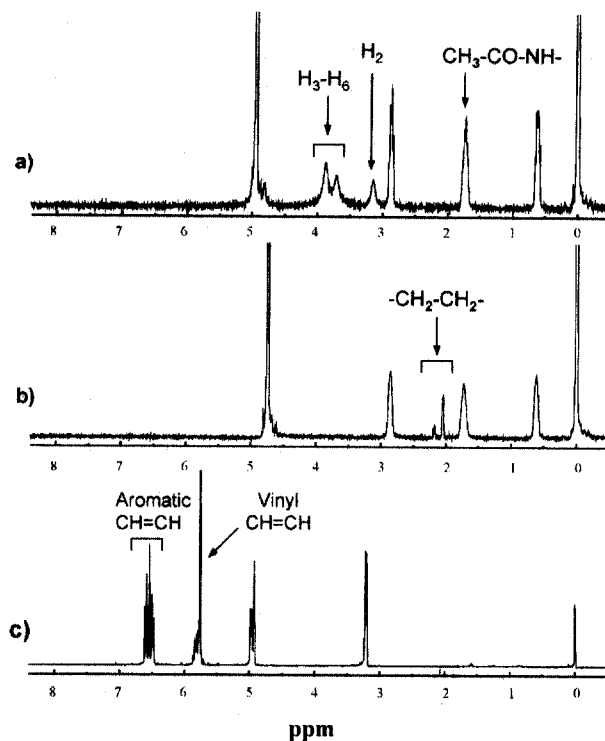


Fig. 6. <sup>1</sup>H-NMR spectra of chitosan (a), safrolechitosan (b), and safrole (c).

<sup>1</sup>H-NMR (Bruker AMX-500 MHz, Karlsruhe, Germany). Solvent: chitosan 2%-DCI/D<sub>2</sub>O, SaCs and EuCs in D<sub>2</sub>O, safrole and eugenol in CDCl<sub>3</sub>.

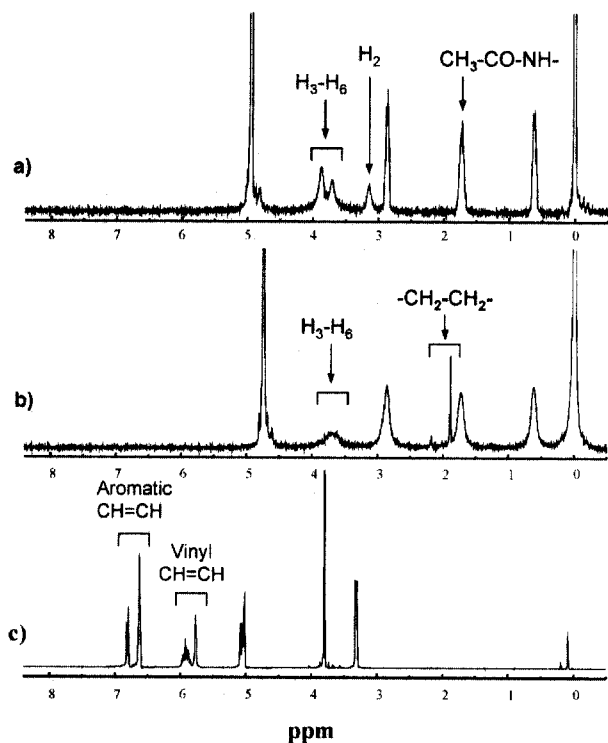


Fig. 7. <sup>1</sup>H-NMR spectra of chitosan (a), eugenolchitosan (b), and eugenol (c).

<sup>1</sup>H-NMR (Bruker AMX-500 MHz, Karlsruhe, Germany) Solvent: chitosan 2%-DCI/D<sub>2</sub>O, SaCs and EuCs in D<sub>2</sub>O, safrole and eugenol in CDCl<sub>3</sub>.

또한, Fig. 6 및 7을 통해 전체적으로 볼 때, safrole과 eugenol이 chitosan에 그래프트되면 chitosan내의 H<sub>3</sub>-H<sub>6</sub>의 수소 숫자가 감소함에 기인하여 3.1-3.9 ppm에서 나타나는 peak의 크기가 작아짐도 확인하였다.

이상의 결과로부터, SaCs 및 EuCs 합성을 위한 그래프트 반응이 정상적으로 일어났음을 알 수 있었으며, 합성유도체 구조 분석을 위하여 D<sub>2</sub>O를 용매로 사용하였으므로 benzene고리의 peak인 6.5-6.6 ppm은 나타나지 않았다(14-16).

## 요 약

신소재로 각광 받고 있는 chitosan의 낮은 수용성을 극복하기 위하여 chitosan 유도체인 safrolechitosan(SaCs) 및 eugenol-chitosan(EuCs)을 제조하고, Ubbelohde 점도계를 사용하여 이들의 점도평균분자량을 측정된 결과, chitosan 및 chitosan유도체인 EuCs와 SaCs의 경우 각각  $1.2 \times 10^5$  Da,  $7.8 \times 10^5$  Da 및  $7.5 \times 10^5$  Da인 것으로 확인되었다.

Chitosan과 chitosan유도체의 구조분석을 위한 IR spectrum에서 SaCs의 경우, safrole의 공유결합에 의한 chitosan내 amine기와의 반응으로 인하여 순수 chitosan보다 amide II의 흡수띠가  $1,553 \text{ cm}^{-1}$ 으로 이동함을 알 수 있었는데, 이것은 chitosan내의 1차 amine기와 safrole의 이중결합이 반응하여 공유결합을 형성함으로써 흡수띠의 이동현상이 나타난 결과이다. 또한, safrole이 반응하면서 safrole내의 vinyl기를 의미하는 특징적인 peak인 C=C 및 H<sub>2</sub>C=의  $1,611 \text{ cm}^{-1}$ 와  $1,442 \text{ cm}^{-1}$ 에서의 흡수띠가 사라졌으며, EuCs의 경우에도 반응물질로 사용된 eugenol내의 vinyl기를 나타내는  $1,612 \text{ cm}^{-1}$  및  $1,434 \text{ cm}^{-1}$ 에서의 흡수띠가 사라짐을 확인하였다. 또한 <sup>1</sup>H-NMR spectrum을 확인한 결과, 합성유도체의 경우 safrole과 eugenol 단량체의 5.7-6.0 ppm에서 나타난 이중결합(H<sub>2</sub>C=CH-) peak가 사라지고, SaCs는 2.1-2.2 ppm에서, 그리고 EuCs는 1.9와 2.2 ppm에서 단일결합(-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-)의 peak가 생성됨을 알 수 있었으며, safrole과 eugenol이 chitosan에 그래프트된 후 safrole과 eugenol의 영향으로 chitosan내의 H<sub>3</sub>-H<sub>6</sub>의 수소 숫자가 상대적으로 감소하여 3.1-3.9 ppm에서 나타나는 peak의 크기가 작아짐도 확인하였다. 이상의 결과들을 종합해 볼때, SaCs 및 EuCs를 합성하기 위한 그래프트 반응이 정상적으로 일어났음을 알 수 있었다.

## 감사의 글

이 논문은 보건의료기술연구개발사업 협동기초연구지원(02-

PJ1-PG10-22001-0001) 학술연구비 지원에 의하여 연구되었으므로 이에 감사하는 바이다.

## 문 헌

1. Sudarshan NR, Hoover DG, Knorr D. Antimicrobial action of chitosan. *Food Biotechnol.* 6: 157-272 (1992)
2. Okuda H, Kato K, Tsujita T. Antihypertensive and antihypertensive actions of chitosan. *J. Chitin Chitosan* 2: 49-59 (1997)
3. Kim SK, Teon YJ. Bioactivities of chitin and chitosan(II)-Antitumor activities by immunology function of chitin, chitosan oligosaccharides. *J. Chitin Chitosan* 2: 3-14 (1997)
4. Suzuki K, Tokoro A, Okawa Y, Suzuki S, Suzuki M. Enhancing effects of N-acetyl-chitooligosaccharides on the active oxygen-generating and microbicidal activities of peritoneal exudate cells in mice. *Chem. Pharm. Bull.* 33: 886-888 (1985)
5. Chang SM, Rho SH, Park SD. Hanyak Botanical Resources. Hak Mun Publishing Co., Seoul, Korea. pp. 239-242, 484-486 (1999)
6. Lee JR. Cho-Sun Medical Plant(2). Han Kuk Publishing Co., Seoul, Korea. pp. 19, 83-84 (1999)
7. Hume WR. Effect of eugenol on constrictor responses in blood vessels of the rabbit ear. *J. Dent. Res.* 62: 1013-1015 (1983)
8. Ozeki M. The effects of eugenol on the nerve and muscle in crayfish. *Comp. Biochem. Physiol.* 50: 183-191 (1975)
9. Kozam G. The effect of eugenol on nerve transmission. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 44: 799-805 (1977)
10. Jung BO, Kim CH, Chio KS, Lee YM, Kim JJ. Preparation of amphiphilic chitosan and their antimicrobial activities. *J. Polym. Sci.* 72: 1713-1719 (1999)
11. Cho SK, Jung BO, Kim JJ, Chio KS, Lee YM. Effect of wastewater treatment of partially deacetylated chitosan. *J. Korean Ind. Eng. Chem.* 5: 899-903 (1994)
12. Wang W, Bo S, Qin W. Determination of the Mark Houwink equation for chitosans with degrees of deacetylation. *Int. J. Biol. Macromol.* 13: 281-285 (1991)
13. Chen XG, Park HJ. Chemical characteristics of O-carboxymethyl chitosan related to the preparation conditions. *Carbohydr. Polym.* 53: 355-359 (2003)
14. Zhang C, Ping Q, Zang H, Shen J. Synthesis and characterization of water-soluble O-succinyl-chitosan. *Eur. Polym. J.* 39: 1629-1634 (2003)
15. Prashanth KVH, Tharanathan RN. Studies on graft copolymerization of chitosan with synthetic monomers. *Carbohydr. Polym.* 54: 343-351 (2003)
16. Lavertu M, Xia ZA, Serreqi N, Rodrigues A, Wang D, Buschmann MD, Gupta A. A validated <sup>1</sup>H NMR method of the determination of the degree of deacetylation of chitosan. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 32: 1149-1158 (2003)

(2004년 5월 13일 접수; 2004년 6월 2일 채택)