

界面活性剤による W/O 型エマルジョンを利用したキトサン微粒子の調製

前田 良輔・吉田航*・富田莉加**

Preparation of chitosan microparticles by W/O type emulsion with surfactant

Ryosuke MAEDA, Wataru YOSHIDA*, and Rika Tomita**

Abstract

Chitosan microparticles were prepared by W/O type emulsion with surfactant to apply as the carrier of protein or drug. The W/O type emulsion was comprised of both kerosene and paraffin as an oil phase, and of chitosan solution as a water phase in the micelle of the surfactant. In the case of Span-80 used as a surfactant, the chitosan microparticles were obtained as spherical shape, on the other hand, the particles which do not have a specific shape were prepared by using the other surfactants TritonX-100 and Tween-80. The diameter of the spherical chitosan particles were c.a. 5 – 50 μm and the particle size distribution was sharp having a peak at 42 μm . It is clear that the preparation condition of chitosan microparticles by emulsion, and Span-80 which has small HLB value is suitable for the W/O type emulsion system.

Key words : Chitosan, Microparticle, W/O type emulsion, surfactant

1. 諸言

キトサンは甲殻類の外骨格に多く含まれる多糖であるキチンを脱アセチル化して得られる。キチンは N-アセチル-D-グルコサミン(2-acetamido-2-deoxy-D-glucose) 残基が多数 β -(1,4)-結合した多糖であるが、これは典型的な場合であって、キチンは部分的にアセチル基を失っているのが普通である。一方、キトサンは典型的には D-グルコサミン(2-amino-2-deoxy-D-glucose) の β -(1,4)-重合体であるが、キチンと同様、普通、多少のアセチル基を含んでいるものを“キトサン”と称している。地球上でもっとも豊富なバイオマス資源であるセルロースは D-グルコースが β -(1,4)-結合した、キチンと類似の構造をもつ物質で、年間 10^{11} t が生合成されると推定されている。一方、キチンの年間生合成量はセルロースに匹敵する $10^9 \sim 10^{11}$ t と推定され、キチン・キトサンとして、その有効利用の観点から様々な研究が行われている。特にキトサンはその分子内に一級のアミノ基を有しており、その機能と莫大な生合成量から、これまで盛んに基礎ならびに応用研究がなされてきた。キトサンに関する研究は日本、中国、韓国、インドなどアジア諸国が特に活発である。Fig. 1 はキトサンの構造式である。

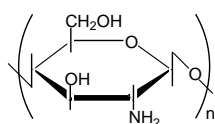


Fig. 1 Chemical structure of chitosan.

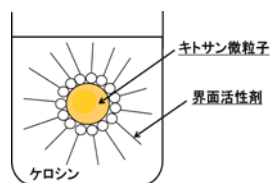


Fig. 2 Schematic representation of W/O type emulsion.

本研究では、タンパク質や薬剤などのキャリアーとして用いることを目的とし、キトサンの微粒子を調製した。ここでは、界面活性剤にポリエチレングリコールモノ-p-イソオクチルフェニルエーテル(Triton X-100)、ソルビタンモノオレート(Span-80)、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレート(Tween-80)、油相にケロシン、低粘度の流動パラフィンを用いた W/O (water in oil) エマルジョン法により微粒子を調製する手法を確立した。Fig. 2 は W/O 型エマルジョンのイメージ図である。

2. 実験方法

2.1 試薬

キトサンは大日精化工業(株)製脱アセチル化度 100%のものを使用した。酢酸、Triton X-100, Span-80, Tween-80, ケロシン, 流動パラフィン, トリポリリン酸ナトリウムはナカライテスク(株), グルタルアルデヒドは関東化学(株)から入手し、いずれの試薬もさらなる精製は行わずに使用した。

2.2 キトサン微粒子の調製

キトサン粒子の調製は Sun らの手法²⁾を改良して以下の通り行った。2 vol% 酢酸溶液で 2.5 wt% のキトサン溶液を調製し、油相 50 ml (a. ケロシンのみ、b. ケロシンと流動パラフィンを 1:1 で混合したもの) 中へ、界面活性剤(Triton X-100, Span-80, Tween-80) と調製したキトサン溶液 5 ml を加え、ホモジナイザー(IKA 社製 ULTRA-TURRAX® T18 basic) 30 分間 3500 rpm で攪拌し、乳化させた。キトサンを含む乳化液をスターラーで攪拌しながら、1% トリポリリン酸ナトリウム水溶液(TPP) 30ml を少しずつ滴下し、1 時間かけてゲル化させた。さらに 25% グルタルアルデヒド水溶液(GTA) を用いて、GTA が 3.0 vol% になるように攪拌しながら少しずつ滴下し、1.5 時間反応させ再架橋した。得られた懸濁液を遠沈管に移し、遠心分離

*現宮崎大学工学部環境応用化学科

**現九州化学工業(株)

機(KOKUSAN 社製 H-19F)を用いて 3000 rpm で 10 分間、遠心分離を行うと 3~4 層に分離した。そのうち褐色の層をパステールピペットで回収し、ケロシン約 150 ml 中に入れ攪拌して界面活性剤を除去し、続いてケロシンと水を交換して、固体層の分離および洗浄を行った。その後、ガラスフィルター (ADVANTEC 社製 KG-25)を用いた減圧濾過でキトサン微粒子を回収し、1mol/L NaCl 水溶液中で保存した。

2.3 キトサン微粒子の評価

2.3.1 レーザー顕微鏡観察

1M-NaCl 水溶液中でキトサン微粒子に超音波をかけた後、スラリーをスライドガラス上に滴下した。カバーガラスをかけた後、レーザー顕微鏡(KEYENCE 社製 VK-8700 COLOR 3D)を用いた形態観察を行った。

2.3.2 走査型電子顕微鏡観察

キトサン微粒子を減圧乾燥し、スライドガラスで軽く押しつぶし粉末状にした後、SEM (JEOL 社製 JSM-5600) を用いて形態観察を行った。

2.3.3 レーザー一回折式粒度分布測定

1M-NaCl 中でキトサン微粒子に超音波をかけた後、レーザー一回折式粒度分布測定(島津製作所社製 SALD-2000A)を行った。

2.3.4 拡散反射型 FT-IR 測定

保存溶液である NaCl を洗浄後、凍結乾燥、ならびに恒温下で減圧乾燥させ、調製したキトサン微粒子をブランクである KBr 粉末を均質になるように 10.9wt% の割合で混合した。入念にメノウ乳鉢中で混合した後、サンプルカップにとり、拡散反射型フーリエ変換赤外分光光度計 (FT-IR) (Perkin-Elmer 社製 Spectrum-One) を用い測定した。

3 結果と考察

3.1 レーザー顕微鏡観察

Fig. 3 に調製したキトサン微粒子の倍率 400 倍におけるレーザー顕微鏡画像を示した。図は 3 種類の界面活性剤に対して、流動パラフォンの有無における微粒子の形態を示している。キトサン微粒子の粒径は、いずれの界面活性剤においてもおよそ 5~50 μm であったが、その形状は大きな相違が見られた。すなわち、Triton X-100 と Tween-80 を用いて調製したキトサン微粒子は、特定の形状を有しておらず、流動パラフィンの影響は見られない。一方、Span-80 を用いて調製したキトサン微粒子はパラフィンを共存させた場合には、多くが球状を示しており、流動パラフィンの無い場合には球状の粒子が少なかった。

このように、界面活性剤種や流動パラフィンの有無によって微粒子の形態が大きく変化するのは、界面活性剤の親水性-疎水性バランス (Hydrophile-Lipophile Balance; HLB 値) から考察できる。HLB 値は高いほど親水性が強く、低いほど親油性が強い。今回用いた 3 種類の非イオン性界面活性剤の構造式を Fig. 4 に示したが、HLB 値は Triton X-100、Span-80、Tween-80 についてそれぞれ 13.5、5.0、15.8³⁾である。本研究では W/O 型エマルジョンを用いて微粒子を調製したため、必然的に HLB 値が低い Span-80 が適しており、他の 2 つの界面活性剤はケロシン・流動パラフィン中では十分なミセル形成が達成されなかったものと考えられる。また、流動パラフィ

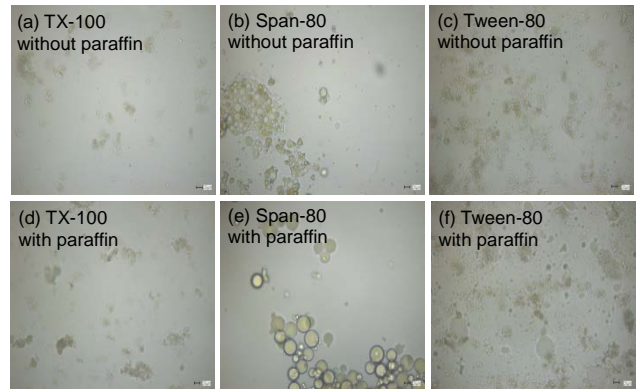


Fig. 3 Images of lasermicroscope of chitosan microparticles (x400).

ンは高度に精製された炭化水素の混合物で、乳化の促進や起泡の抑制など主に油層の状態を整える働きがあるとされ、その添加によって、ミセルの形成に伴う乳化作用に効果があったと考えられる。

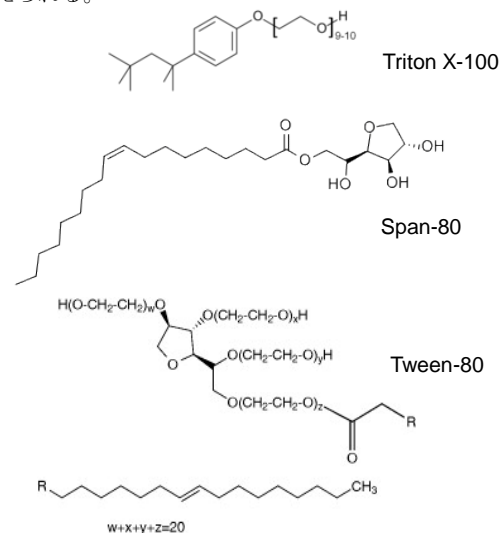


Fig. 4 Chemical structures of surfactants used in this research.

さらに、Span-80 のパラフィン有の場合について、200 倍から 1000 倍に倍率を変えて観察した結果を Fig. 5 に示した。200 倍の画像から、キトサン微粒子はあらゆる視野でほぼ球状となっていること、ならびに 1M NaCl 水溶液中であっても微粒子同士が凝集しやすいことが分った。さらに 1000 倍の画像からは、調製したキトサン微粒子は 2~3 層のカプセル状になっている可能性が考えられ、大変興味深い。しかしながら、レーザー顕微鏡による形態観察ではカプセル化の確証は得られず、今後の検討課題とする。

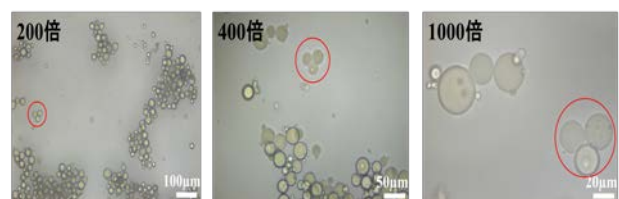


Fig. 5 Images of lasermicroscope of chitosan microparticles with Span-80 and paraffin.

3.2 走査型電子顕微鏡(SEM)観察

Fig. 6 はキトサン微粒子の倍率 5000 倍での SEM 画像である。3 種類の界面活性剤について、いずれも界面活性剤濃度 5% で流動パラフィンを加えたときのものである。レーザー顕微鏡による形態観察の結果と同様に、Triton X-100 と Tween-80 のキトサン微粒子は特定の形状を有しておらず、フレーク状であるのに対し、Span-80 を用いて調製した微粒子は、球状粒子が減圧乾燥等によって変形したものと考えられ、懸濁状態で球状を示しているものと考えられる。

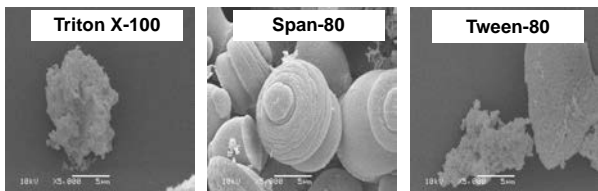


Fig. 6 SEM Images of chitosan microparticles (x 5000).

Fig. 7 は Span-80 を用いて調製したキトサン微粒子について、1000 倍および 10000 倍で撮影した SEM 画像である。レーザー顕微鏡観察により平面的に見て円形であることから球状であると判断したが、SEM 観察においてもおおむね球状であることがわかった。1000 倍の画像からも、レーザー顕微鏡観察の時は水分を含み膨潤していたキトサン微粒子の多くが、減圧乾燥により収縮していることが確認できる。そのため微粒子の粒径はレーザー顕微鏡観察の結果と比べ 1~10 μm となり、約 1/5 まで収縮したことが分った。さらに、視野を変えた 10000 倍の画像からは、レーザー顕微鏡観察の考察で述べたのと同様に、キトサン微粒子が薄いシェル層と厚い多孔質のコア層から成るカプセル状になっている可能性が示唆された。

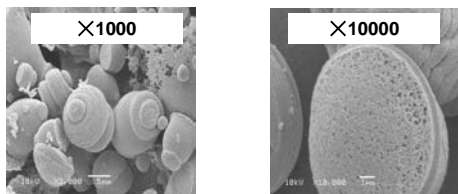


Fig. 7 SEM Images of chitosan microparticles by Span-80.

3.3 レーザー回折式粒度分布測定

Fig. 8 は 3 種類の界面活性剤を用いて調製したキトサン微粒子の粒度分布測定の結果である。いずれも、界面活性剤濃度 5% で流動パラフィンを含んだ調製条件である。棒グラフは粒度分布を示し、プロットは積算値を示している。粒度分布から明らかなように、Triton X-100 と Tween-80 を用いた微粒子は粒度分布が広い範囲に広がっているのに対し、Span-80 を用いた微粒子が非常にシャープな分布を示した。全体の約 70% が 40~60 μm に分布している。応用するにあたっての取扱いを考えると、粒径分布が狭いものが望ましく、今回用いた W/O 型エマルジョンによる微粒子の調製には乳化剤として Span-80 が非常に適していることが明らかとなった。これは、キトサン微粒子がエマルジョン中で調製された確証のひとつでもあり、加えて本実験で用いたレーザー回折式の粒度分布測定装置が原理的に球状粒子に適していることにも一因があると考えられる。

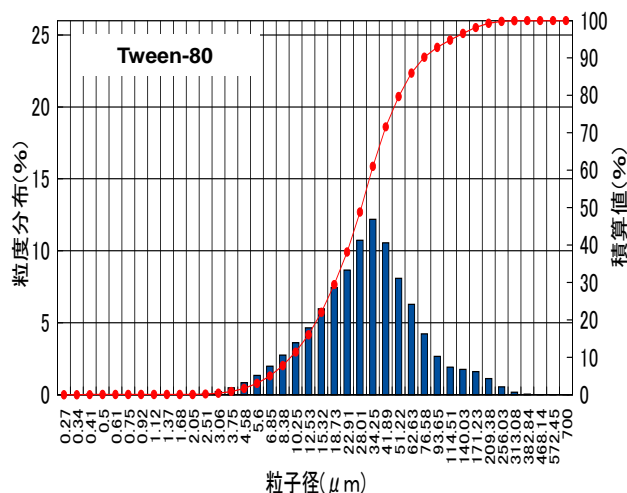
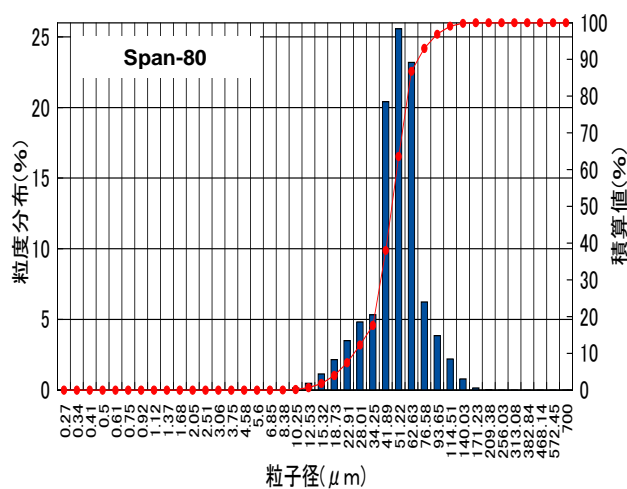
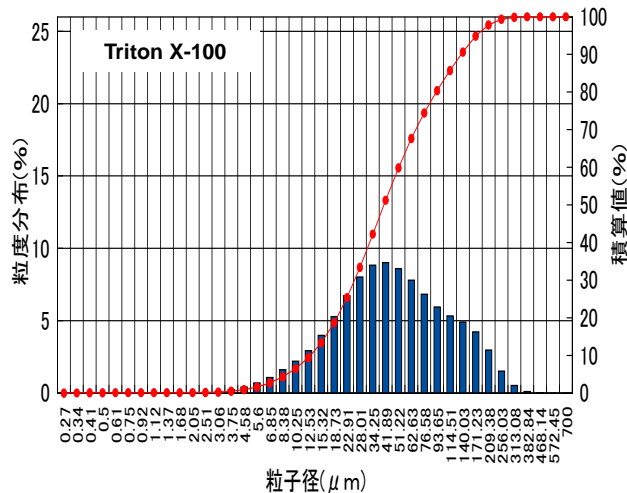


Fig. 8 Particle size distribution of the chitosan microparticles by using Triton X-100, Span-80, and Tween-80 as emulsifier.

3.4 拡散反射型 FT-IR 測定

Fig. 9 は調製したキトサン微粒子の拡散反射 FT-IR スペクトルを示した。図より、1082 cm⁻¹、1377 cm⁻¹、1659 cm⁻¹、2887 cm⁻¹、3276 cm⁻¹の吸収が見られた。この吸収は 1082 cm⁻¹がエーテルの伸縮振動、1377 cm⁻¹及び 2887 cm⁻¹がメチレンの伸縮振動、

1659 cm^{-1} がアミノ基の伸縮振動、 3276 cm^{-1} がアルコール基の伸縮振動と考えられ、キトサンの構造式からわかる原子団の特徴を満たしている。

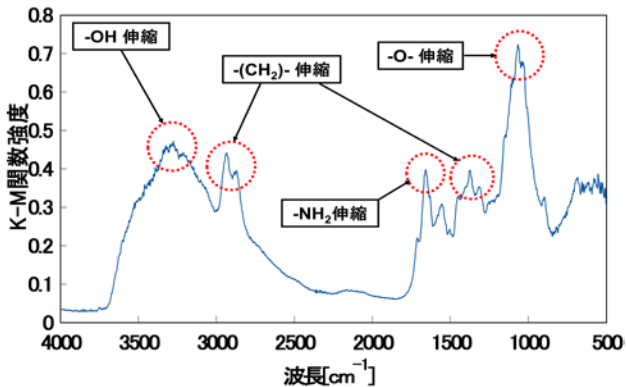


Fig. 9 Diffuse reflectance FT-IR spectrum of chitosan microparticles by Span-80.

4. 結言

界面活性剤を乳化剤とした W/O 型エマルション法を用いて、キトサン微粒子の調製を試みた。界面活性剤として、Triton X-100, Span-80, Tween-80 の 3 種類を用いたところ、Span-80 を乳化剤とし、油層にケロシンと流動パラフィンの等量混合物を用いた系で、膨潤状態でレーザー顕微鏡で形態観察したところ粒径 $5\sim 50\ \mu\text{m}$ の球状微粒子が作製された。得られた微粒子の粒子径分布は他の界面活性剤を用いた場合に比べて非常にシャープであり、粒子の約 70% が粒径 $40\sim 60\ \mu\text{m}$ にあることが明らかとなった。また、レーザー顕微鏡および SEM 観察の結果、得られた微粒子は、薄いシェル層と厚い多孔質のコア層からなることがわかった。

謝辞

キトサンを提供していただいた大日精化工業(株)に御礼申し上げます。また、レーザー回折式粒度分布測定について、九州工業大学鹿毛浩之 教授、馬渡佳秀 助教、走査型電子顕微鏡観察について、有明工業高等専門学校 物質工学科 藤本大輔 准教授、大木 技官、レーザー顕微鏡観察について、本校機械工学科 種健 准教授には、実験装置の利用ならびに適切な助言をいただきました。記して謝意を表します。

引用文献

- 1) キチン、キトサン研究会編, 最後のバイオマス キチン、キトサン, 技報堂出版(東京)(1988)
- 2) Y. Sun, L. Gu, Y. Gao, and F. Gao, *Chem. Pharm. Bull.* **58** (7) 891—895 (2010)
- 3) 吉田ほか共著, 新版界面活性剤ハンドブック, 工学図書株式会社(2000)

(2014 年 11 月 10 日 受理)