

赤エビの外骨格由来キトサンとポリアクリル酸のコンプレックス形成に及ぼす 脱アセチル化度の影響

二文字 真一[†]・前田 良輔^{*†}・杉村 和紀[‡]・西尾 嘉之[‡]

Influence of degree of deacetylation on complex formation of chitosan from red rice prawn and polyacrylic acid
Shin-ichi NIMONJI, Ryosuke MAEDA, Kazuki SUGIMURA and Yoshiyuki NISHIO

Abstract

Chitosan, poly (β -(1 \rightarrow 4)-D-glucosamine) was purified from chitin, which was obtained from exoskeleton of red rice prawn, *Metapenaeopsis barbata* by modified Hackman's method. To create biomedical materials such as wound dressing, endothermic gel and scaffold materials for tissue engineering, we attempted to conjugate of chitosan and other synthetic polymers. Polyacrylic acid (PAA, $M_w=2.5 \times 10^5$) was applied to obtain the composite materials with chitosan. The most important point of this work is control of degree of deacetylation (DD) of chitosan, and was controllable from 24 to 95% by concentrated alkali treatment with changing both treatment time and temperature. The complex might form through cancellation of carboxylic dimers of PAA in the solution, ionization of both carboxyl and amino groups having the opposite charges, and then complexation by electrostatic interaction forming insoluble matter. The complex yields were investigated with DD at pH 3, and the maximum yields appeared at 30-40% of chitosan in feed or 0.15-0.25 of mixing ratio, and influence of DD was not appeared at the pH. It was considered that the effects of DD on the complex yields were much weaker than that of the differences of ionization degree between each polymer, i.e. carboxylic acid of PAA and amino group of chitosan ionized c.a. 10% and c.a. 100% at pH 3, respectively. So it's very important to investigate for other pHs.

Key words : Chitosan, Polyacrylic acid, Polyelectrolyte complex, Degree of deacetylation

1. 諸言

キチンは **Figure 1(a)**に示したようにセルロースと同様のパイオマスとして、自然界に広く分布し、特に甲殻類の外骨格に多く含まれる。その年間生成量は10億~100億トンにもなっており、新規材料の基材として非常に注目を集めている。キチンの魅力は、莫大な生成量だけではなく、天然由来であるため生分解性、生体適合性等に優れ、さらに分子内に窒素原子を有する多糖であることにもある。この窒素原子に着目するならば、キチンを C2 位に第一級のアミノ基を有するキトサン(**Figure 1(b)**)に変換した上での利活用が主流である。

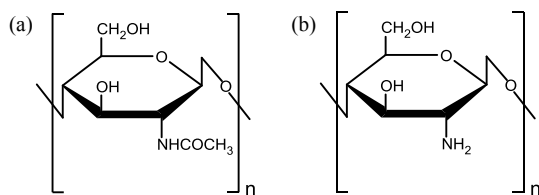


Figure 1 Chemical structures of chitin(a) and chitosan(b).

キチンおよびキトサンは一般的には *N*-アセチル-D-グルコサミンと D-グルコサミンから成る共重合体として捉えられ、しばしば脱アセチル化度 (DD) を用いて低 DD 試料をキチン、高 DD 試料をキトサンと区別する。キトサンはキチンと異なり、酢酸水溶液などの弱酸に溶解し電離するため高分子電解質と呼ばれる。また、相反する電荷を有する高分子電解質は、静電的相互作用により溶液中で高分子電解質錯体 (以降コンプレックスと称する) を形成する。キトサンは前述のとおり、分子内にアミノ基を有するため、酸性溶液中でカチオン性となる。これに対して、アニオン性高分子電解質のひとつとしてポリアクリル酸 (PAA) をキトサンとのコンプレックス形

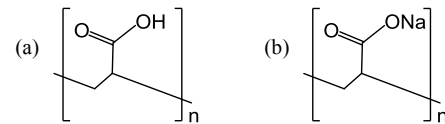


Figure 2 Chemical structures of PAA(a) and its sodium salts(b).

成に利用する。PAA は **Figure 2(a)**に示したように、ビニル系合成高分子であり、分子内にカルボキシル基を有しており、水やアルコール等に高い溶解性を示し、電離するとアニオン性となる。また、**Figure 2(b)**に示した PAA のナトリウム塩は高吸水性樹脂の原料としても広く利用されている。キトサンと PAA のコンプレックス形成に関する研究は、Chavasit ら¹⁾によって混合比、pH、イオン強度について、Nge ら²⁻³⁾によって膨潤特性等について、Wang ら⁴⁻⁵⁾は粘度、電位差、光透過といった方法で、それぞれ基礎研究が行われている。また、キトサン-PAA コンプレックスの薬剤保持や薬剤徐放担体としての応用を指向した研究が Torrado ら⁶⁻⁹⁾の研究グループによって行われている。

本研究では、創傷被覆材などの医用材料の開発を最終目的として、大分県宇佐市の水産加工会社から出る赤エビ *Metapenaeopsis barbata* の加工廃棄物中の外骨格 (殻) よりキチンおよびキトサンを精製し、合成高分子であり吸水性を有する PAA とのコンプレックス形成に対するキトサンの DD が及ぼす影響を調べた。

2. 実験方法

2.1 キトサンの精製

キトサンの精製は、まず前報¹⁰⁾のとおり大分県産赤エビ (*Metapenaeopsis barbata*) の殻を原料とし、Hackman 法を改良した方法でキチンを精製し、そのキチンをバイアル瓶中で 40wt% 水酸化ナトリウム水溶液中 25 および 35°C で所定時間攪拌しながら処理した。処理温度および処理時間ごとのキト

[†] 北九州高専, [‡] 京都大学大学院農学研究科

* Corresponding author

サン試料は、N/400 ポリビニル硫酸カリウム水溶液(PVSK)を用いたコロイド滴定と FT-IR 測定を(日本電子製 JNM-ECS400)併用して予め作成した検量線を用いて DD を決定した。

2.2 キトサンと PAA のコンプレックス形成

DD の異なるキトサン試料と PAA (和光純薬, M_w 2.5×10^5) をそれぞれ pH 3 に調整した酢酸緩衝液 (0.2 M 酢酸-0.2 M 酢酸ナトリウム) に溶解させ、1% のポリマー溶液を調製した。これらの溶液をキトサンの含有率が 10~90% となるように遠沈管内で混合した。混合溶液は 24 時間以上室温下でマグネチックスターラーによって攪拌した後、遠心分離を行った。上清を可及的に除去し、続いて pH 3 の酢酸緩衝液での洗浄を 1 回、イオン交換水での洗浄を 2 回行った。得られた白色沈殿を室温下で真空乾燥を行い、収量を測定した。得られた生成物は FT-IR により評価した。

3 結果と考察

3.1 キトサンの精製

Figure 3 に示すように、処理温度と処理時間を変化させることで DD が 24~95% で制御できることがわかった。今回キトサンを精製する前のキチンがすでに DD24% を有しており、処理時間 100 時間付近まで DD が比較的大きく変化し、その後は穏やかな増加となっている。

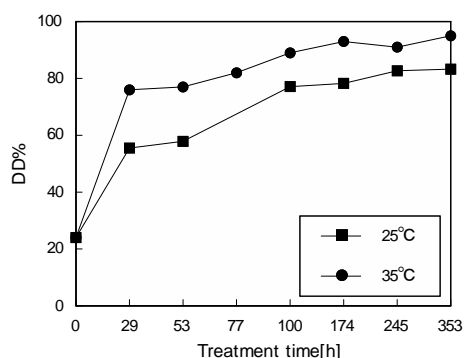


Figure 3 Time-course of alkali treatment on DD of chitin.

3.2 キトサンと PAA のコンプレックス形成

Figure 4 に示すように、キトサン溶液と PAA 溶液を混合すると、速やかに不溶性コンプレックスが生成した。本研

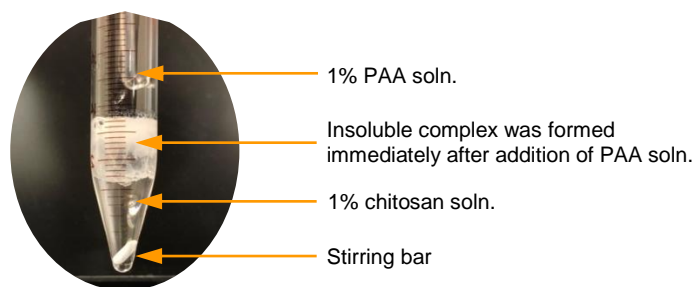


Figure 4 Photograph of when PAA solution was dropped into chitosan solution.

究において用いた緩衝液は、0.2 M 酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液であり、予め調べた溶解性実験の結果、塩酸-アンモニ

ア水溶液系、McIlvane 緩衝液では、キトサンが pH 3~5 の全範囲では溶解せず、逆に言えば今回用いた酢酸緩衝液はキトサンおよび PAA に対して良溶媒であるが、2 種類のポリマーが共存する場合には、不溶性コンプレックスを形成するため、pH 3 の酢酸緩衝液はコンプレックス形成に対して良好な貧溶媒といえる。

Figure 5 には、DD が 73, 78, 83, 91% のキトサンと PAA による pH 3 におけるコンプレックスの FT-IR スペクトルを示した。さらにカルボン酸の C=O カルボニルに関する情報を得るため波数 1200~1800 cm^{-1} でのスペクトルと PAA のスペクトルを合わせて Figure 6 に示した。Fig. 6 において、1260 cm^{-1} 付近のピークは、PAA のカルボン酸二量体 (Figure 7) に由来するものであり、キトサンとのコンプレックスの形成と共にほぼ消失している。1550 cm^{-1} 付近のピークは PAA のカルボキシラート (COO^-) 及びキチンアミド II に由来するものであり、それらを区別することは難しい。1630 cm^{-1} 付近のピークは、キトサンの NH_3^+ イオンに由来するものであり、1650 cm^{-1} 付近に現れるアミド I とは区別されると考えられる。1710~1730 cm^{-1} 付近のピークは、PAA のカルボニル (C=O) に由来するものである。また、本研究テーマの主眼である DD の影響については、ひとつの pH 条件下では構造的な相違を確認することはできなかった。これ

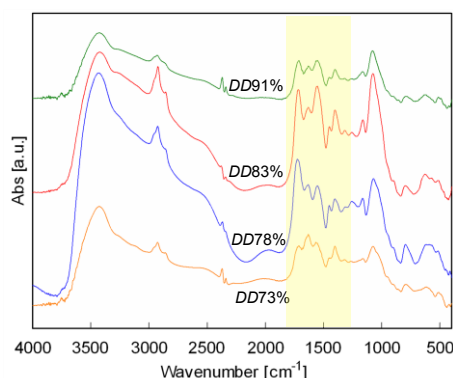


Figure 5 FT-IR spectra of chitosan/PAA complexes in different DD of chitosan.

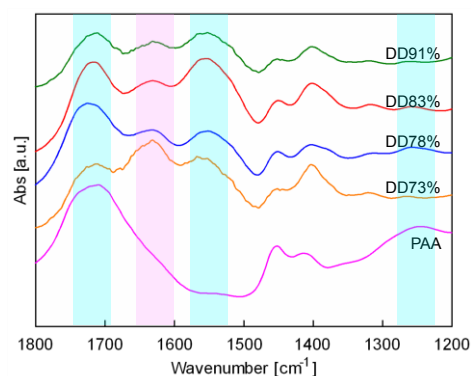


Figure 6 FT-IR spectra of PAA *per se* and chitosan/PAA complexes in different DD of chitosan ranging from 1800 to 1200 cm^{-1} of wavenumber. All the complexes were obtained from the mixed polymer solution prepared at the in-feed chitosan composition of 50 wt%.

については、すでに pH 4 および 5 におけるコンプレックスの生成を行っており、加えて固体 ¹³C NMR 測定も実施予定であることから、新たな知見が期待される。さらに FT-IR の結果からもコンプレックスの生成メカニズムは、Figure 8 に示したようにまず PAA の二量体構造の解消と各高分子電解質の持つカルボキシル基とアミノ基の所定 pH での電離が起こり、静電的相互作用による多点での結合に至るものと考えられる。

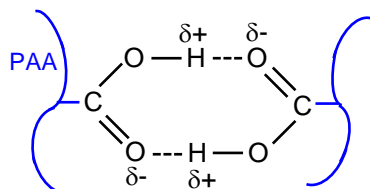


Figure 7 Schematic representation of dimerization of carboxylic groups in PAA.

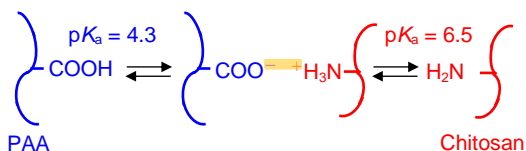


Figure 8 Schematic representation of mechanism of complex formation.

Figure 9 には、コンプレックス収率に及ぼすキトサンの添加割合の影響を示した。コンプレックス収率とは、PAA とキトサンの溶液に含まれるポリマーの全質量に対して、生成した不溶性コンプレックスの乾燥質量の割合である。その結果、DD については、73~91%の範囲では収率の変化に大きな差異はなく、いずれの DD においても最大収率が 90~100%に達し、そのときのキトサン含有率が 30~40%であった。興味深いのは、分子量的には PAA が 2.5×10^5 、キトサンが 1.7×10^5 程度であり、大きな差がないにも関わらず、混合割合が 50%付近で最大値を取らない点である。この点を考察するために、Figure 10 にコンプレックス収率と Mixing Ratio (MR) の関係を示す。MR の定義は以下に示す通りである。Fig. 10 から明らかなように、DD による収率の差異は小さいが、最大収率は 0.15~0.25 付近となり、

$$MR = A/(A+B)$$

A: Chitosan unit(in mol)

$$= \text{weight of chitosan} / M_w \text{ of chitosan unit}$$

B: PAA unit(in mol)

$$= \text{weight of PAA} / M_w \text{ of PAA unit}$$

Table 1 Degree of ionization of carboxylic acid in PAA and amino group in chitosan at pH 3, 4 and 5¹¹⁾.

	Degree of ionization	
	PAA (pKa=4.3)	Chitosan (pKa=6.5)
pH 3	0.1	1.0
pH 4	0.2	0.95
pH 5	0.5	0.85

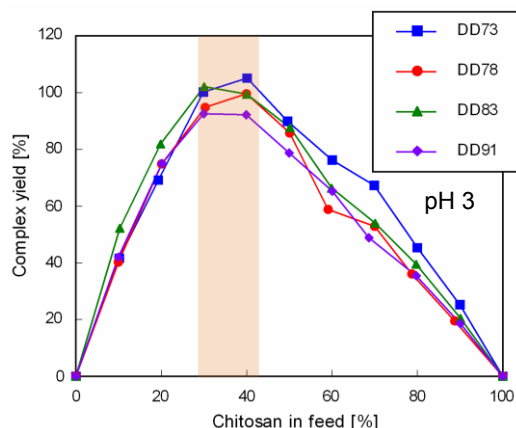


Figure 9 Plots of the yield of complex-like precipitation vs. chitosan composition.

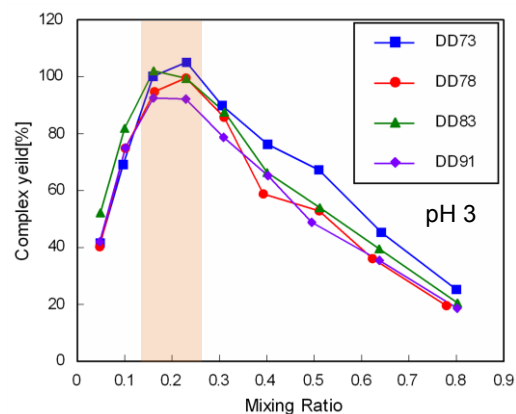


Figure 10 Plots of the yield of complex-like precipitation vs. mixing ratio.

キトサンのユニット割合が小さいところで最大収率をとることが明らかとなった。これは Table 1 に示した通り、pH 3 における PAA のカルボキシル基の電離の度合いが 0.1 と低く、一方キトサンのアミノ基の電離の度合いが 1.0 と高いことに起因すると考えられる。Figure 11 に概略図を示したように、pH 3 ではキトサンがほぼ 100%電離しており、キトサンユニット数が少なく PAA ユニット数が多い状況で最大収率に達したと推測できる。すなわち、MR が 0.1 以下では PAA が過剰となり、MR が 0.3 より大きな領域ではキトサンが過剰となり、いずれかのポリマーが溶液中に溶存したままで収率に関与しないと考えられる。

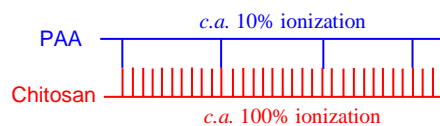


Figure 11 Proposed representation of ladder-type complex consisted of PAA and chitosan at pH 3.

以上の結果について更なる知見を得るために、pH 3 に加え pH 4 および pH 5 におけるコンプレックス生成挙動を調

べている。さらに、PAA 分子量の依存性については、本研究で用いた 2.5×10^5 以外に 5×10^3 , 2.5×10^4 , 1×10^6 の分子量をもつ PAA について検討準備を行っている。あわせて、固体 ^{13}C NMR 測定、DSC 測定などを行いコンプレックスの特性評価を行う予定である。

4. 結言

本研究では、天然高分子であるキトサンを水産加工会社から排出される赤エビの外骨格より精製し、これを創傷被覆材料などの医用材料に応用するため PAA との複合化を検討した。複合化法の一つとして、静電的相互作用によるコンプレックス形成に着目し、pH 3 におけるいくつかの DD でのコンプレックス生成挙動を調べた。FT-IR 測定の結果から、PAA の有するカルボン酸二量体の消失とカルボキシラートの生成、それと電離したキトサンのアミノ基との静電相互作用に起因するコンプレックス形成が示唆された。また、コンプレックス収率に対する DD の影響は小さく、最大収率は混合時のキトサン含有率が 30~40% で得られ、MR に対しては 0.15~0.25 で達成された。これは、各ポリマーの pKa と溶液 pH の関係から、はしご型のコンプレックスモデルを考える場合、pH 3 ではキトサンのアミノ基の電離が PAA のカルボキシル基の電離に比べて約 10 倍異なることで説明される。

5. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、原料である赤エビの外骨格を含む試料を、乾燥状態で十分な量を提供下さった、大分県宇佐市(有)上野水産関係各位には、心よりの謝意を表します。

6. 引用文献

- 1) V. Chavasit *et al.*, *Polym. Bull.*, **19**, 223-230(1988)
- 2) T. T. Nge, *et al.*, *J. Appl. Polym. Sci.*, **83**, 1025-1035(2002)
- 3) T. T. Nge, *et al.*, *J. Appl. Polym. Sci.*, **92**, 2930-2940(2004)
- 4) H. Wang, *et al.*, *J. Appl. Polym. Sci.*, **65**, 1445-1450(1997)
- 5) H. Wang, *et al.*, *J. Appl. Polym. Sci.*, **61**, 2221-2224(1996)
- 6) P. M. Torre, *et al.*, *Biomaterials*, **24**, 1459-1468(2003)
- 7) P. M. Torre, *et al.*, *Biomaterials*, **24**, 1499-1506(2003)
- 8) S. Torrado, *et al.*, *Biomaterials*, **25**, 917-923(2004)
- 9) P. M. Torre, *et al.*, *J. Biomed. Mater. Res. B*, **72**, 191-197(2005)
- 10) 前田ら, 北九州工業高等専門学校研究報告, 第 51 号, 65-69 (2018)
- 11) V. Chavasit and J. A. Torres, *Biotechnol. Prog.*, **6**, 2-6(1990)

(2018 年 11 月 5 日 受理)