

キトサンとポリアクリル酸のコンプレックス形成に影響する諸因子の検討

二文字 真一<sup>†</sup>, 前田 良輔<sup>\*†</sup>, 杉村 和紀<sup>‡</sup>, 上高原 浩<sup>‡</sup>, 西尾 嘉之<sup>‡</sup>

Investigation of factors affected the complex formation of chitosan and polyacrylic acid  
Shin-ichi NIMONJI, Ryosuke MAEDA, Kazuki SUGIMURA, Hiroshi KAMITAKAHARA and  
Yoshiyuki NISHIO

Abstract

Chitosan, poly( $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-glucosamine), was purified from chitin obtained from exoskeleton of red rice prawn, *Metapenaeopsis barbata*, by modified Hackman's method. To create biomedical materials such as wound dressing, absorbency gel, and scaffold materials for tissue engineering, we attempted to form complexes between cationic chitosan and an anionic synthetic polymer, polyacrylic acid (PAA,  $M_w = 2.5 \times 10^5$ ). The insoluble complexes were formed through dissociation of carboxylic dimers of PAA, ionization of both carboxyl groups of PAA and amino groups of chitosan in acetic acid buffer (pH 3-5), and complexation by electrostatic interaction. The yields of the complex for mixing ratio were investigated with various DD at pH 3, 4 and 5. Both the yields and chemical structures observed by FT-IR measurements of insoluble complexes at pH 3-5 showed no obvious effects on DD of chitosan. In DSC thermograms,  $T_g$  of the complexes appeared at considerably higher temperature than that of PAA.

Key words : Chitin, Chitosan, Polyacrylic acid, Degree of deacetylation, polyelectrolyte complex.

1. 諸言

キチンは、poly  $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4)-2-acetamide-2-deoxy- $\beta$ -D-glucose (*N*-acetylglucosamine)であり、化学構造は Fig. 1(a)に示す。キチン・キトサンはセルロースに類似したバイオマスとして、自然界に広く分布し、甲殻類の外骨格や菌類、昆虫類<sup>1)</sup>に多く含まれる。その年間生合成量は10億~100億<sup>2)</sup>トンにもぼり、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、莫大な生合成量だけではなく、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。

キチンはFig. 1(a)に示したように、セルロース(Fig. 1(c))と類似の構造を有しており、C2位が水酸基(-OH)ではなくアセトアミド基(-NHCOCH<sub>3</sub>)である点が大きく異なる。また、C3位の水酸基とC2位のアセトアミド基の分子内およびC6位の水酸基が水を介する分子間の水素結合<sup>3)</sup>により、非常に結晶性が高く、水や汎用な有機系溶媒には溶解しない。このことはエビ殻などの原料からの精製方法の煩雑さとあわせてキチンに関する研究の大きな課題となっている。一方でキチンを濃アルカリ処理にて脱アセチル化しC2位を1級のアミノ基(-NH<sub>2</sub>)に変換したキトサン(Fig. 1(b))は塩酸水溶液や酢酸水溶液などの酸性溶液に容易に溶解し、アミノ基の存在により抗菌性を備えている<sup>4)</sup>ためキチンに比べて多くの研究が行われている。またキチンは天然の状態ではホモポリマーとしては存在することはなく約10%は脱アセチル化していると考えられる<sup>5)</sup>。そしてキチンを脱アセチル化処理し、FT-IRなどから、そのキチンの脱アセチル化度(DD)を決定し、試料として用いられている。これらセルロースやキチン・キトサンといった天然高分子は、合成高分子にはない多くの優れた性質をもっており、それらの莫大な生合成量と合わせて考えると、非常に潜在能力を秘めた魅力的な素材で

あるといえる。これまでキチン・キトサンは、無機、有機、高分子物質などとの複合化によって、フィルム、繊維、微粒子、ナノファイバー、多孔質ビーズ等の形体で医療品、食品、農業、水処理等の幅広い分野での研究・応用がなされている<sup>6-9)</sup>。

本研究では、大分県宇佐市の水産加工会社から入手した赤エビ(*Metapenaeopsis barbata*)の加工廃棄物中に含まれる外骨格よりキチンを精製し、これをキトサンに変換した。またキトサンと複合化する異種ポリマーとして、カルボキシル基を有するアニオン性の合成高分子であり、吸水性樹脂や凝集剤として利用されているポリアクリル酸(PAA)を取り上げた(Fig. 2)。これらを基材とし高分子電解質間のコンプレックス及び相互侵入高分子網目(IPN)などの複合化手法を用い、複合材料の創製を目標とし、複合化形成におけるDDの影響を評価した。

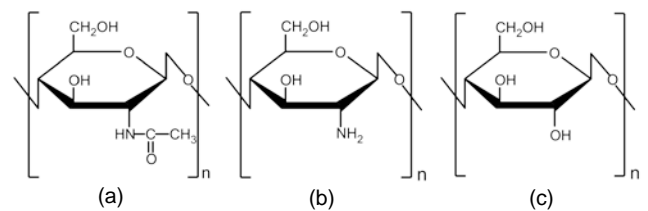


Fig. 1 Chemical structures of (a) chitin, (b) chitosan and (c) cellulose.

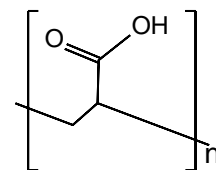


Fig. 2 Chemical structure of PAA.

<sup>†</sup> 北九州高専, <sup>‡</sup> 京都大学大学院農学研究科

\* Corresponding author

## 2. 実験方法

### 2.1 キトサンの精製

キトサンの精製は、大分県産赤エビの殻を原料とし、Hackman 法<sup>10)</sup>を改良した方法<sup>11)</sup>でキチンを精製した。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にて 25~35 °C 水浴中で所定時間処理し、様々な DD の有するキトサンを得た。

### 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<sup>5</sup>) をそれぞれ pH 3~5 に調整した酢酸緩衝液 (0.2 M 酢酸-0.2M 酢酸ナトリウム) に溶解させ、各 0.1~1% のポリマー溶液を調製した<sup>12)</sup>。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, DSC により評価した。

### 2.3 熱分析によるガラス転移温度の決定

得られた試料(pH 3, 4 : DD 76, 90 %, キトサン wt% = 20, 40, 60)は DSC7020(HITACHI 製)を用いて熱分析を行った。試料を 100 °C まで昇温し(1st heating)、直ちに液体窒素で -50 °C まで急冷後、再び 200 °C まで昇温して(2nd heating) 安定なサーモグラムを得た。ガラス転移温度( $T_g$ )は mid point 法で決定した。なお測定条件はすべて窒素雰囲気中、昇温速度 20 °C/min で行った。

### 2.4 PAA の X 線回析

PAA を X 線回析法(XRD)で結晶性の有無を確認した。装置は Ulitima IV(Rigaku 製)で条件は出力 40 kV-40 mA, 手法は Parallel beam にて測定した。またキトサンは結晶性である報告は多くされているため<sup>13), 14)</sup>、今回は測定していない。

## 3 結果と考察

### 3.1 キトサンと PAA のコンプレックス形成

キトサン溶液と PAA 溶液を遠沈管内で混合すると、各 pH において速やかに不溶性コンプレックスが生成した。コンプレックス収率と Mixing Ratio(MR)の関係を Fig. 3

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

A: Chitosan unit(in mol)  
= weight of chitosan/ $M_w$  of chitosan unit

B: PAA unit(in mol)  
= weight of PAA/ $M_w$  of PAA unit

示す。MR の定義は以下に示す通りである。Fig. 3(a) に示したように pH 3 において今回検討した DD 73~91 % の範囲では DD による収率の差異は、ほとんどなかった。また収率はいずれの DD に対しても 0.15~0.25 付近で最大であった。Fig. 3 (b) pH 4 については pH 3 と比べると最大収率を与える MR は 0.20~0.45 へとシフトした。また pH 4 についても DD による収率の差異には、ほとんど確認できなかった。Fig. 3(c) pH 5 に関しては pH3, 4 と比べて MR 0.3~0.55 にと比較的幅広く最大収率をむかえ

たが、DD の影響は確認できなかった。また pH が增大するにつれ最大収率が幅広くなった理由としては、キトサンと PAA のイオン化度が関わっていると考えられる。キトサンのイオン化度は pH 3, 4, 5 ではそれぞれ 100, 95, 85% ( $pK_a=6.5$ ,  $-NH_2 \rightleftharpoons -NH_3^+$ ), PAA のイオン化度は pH 3, 4, 5 でそれぞれ 10, 20, 50% ( $pK_a = 4.3$ ,  $COOH \rightleftharpoons -COO^-$ )と考えられる<sup>15)-17)</sup>。そのため pH の増大に伴って PAA のイオン化する相対的な確率が増大し、コンプレックス形成において MR の大きな、幅広い範囲で最大収率をむかえていると考えられる。またポリマー同士のコンプレックス形成においてはイオン化度の影響が大きく、DD の影響を定量的に得ることはできなかった。

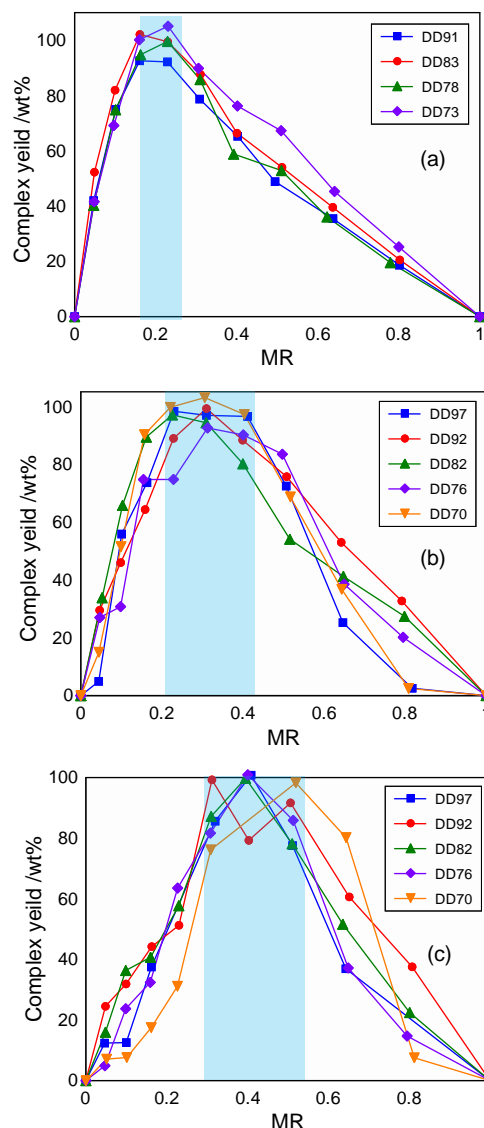


Fig. 3 Plots of the yield of complex-like precipitation vs. Chitosan composition (MR), at conditions of (a) pH 3, (b) pH 4, and (c) pH 5.

Fig. 4 には各 pH における DD の異なるキトサンと PAA コンプレックスにおけ FT-IR 測定の結果を示した。また Fig. 4 は PAA のカルボニル基(C=O)に関する考察を行うため 1200~1800  $cm^{-1}$  でのスペクトルの範囲で示している。

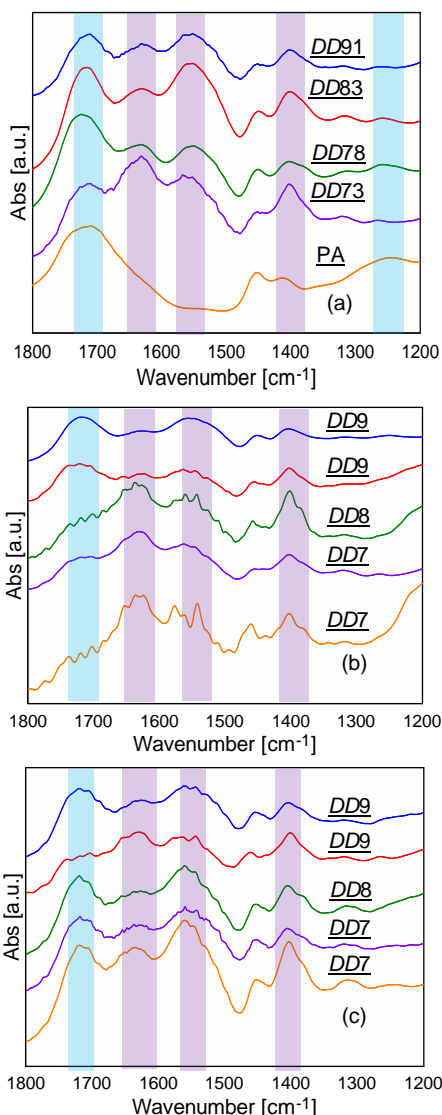


Fig. 4 FT-IR spectra of chitosan/PAA complexes in the same in-feed chitosan composition (50%) at pH (a) 3, (b) 4, and (c) 5.

Fig. 4 において、 $1260\text{ cm}^{-1}$  付近のピークは、PAA のカルボン酸二量体由来のものであり、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。 $1550\text{ cm}^{-1}$  付近のピークは PAA のカルボキシラート (COO<sup>-</sup>) 及びキチンの amide 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。 $1630\text{ cm}^{-1}$  付近のピークは、キトサンの NH<sub>3</sub><sup>+</sup> イオン由来のものであり、 $1650\text{ cm}^{-1}$  付近に現れる amide I とは区別されると考えられる。 $1710\sim 1730\text{ cm}^{-1}$  付近のピークは、PAA のカルボニル (C=O) に由来する新たなもので、すべてのサンプルにおいて複合化を示唆している<sup>18)</sup>。またキトサンのみと比べて低波数側にピークのシフトがみられるが、これは複合化による水素結合の影響と考えられる。FT-IR 測定の結果から DD の影響を改めて確認したが、その影響については、構造的な観点からも相違を確認することはできなかった。

### 3.2 熱分析による $T_g$ の決定

Fig. 5 には、pH 3 で生成したキトサン/PAA (20/80) コンプレックスの DSC サーマグラムを PAA 単独のデータと併せて示した。図中の矢印は mid point 法で決定した各サンプルの  $T_g$  を示している。DD 76 および 90 % のキトサン/PAA コンプレックスでは、それぞれ  $212.4\text{ }^\circ\text{C}$  (Fig. 5(a)) および  $207.3\text{ }^\circ\text{C}$  (Fig. 5(b)) に  $T_g$  が観測された。また PAA は  $130.4\text{ }^\circ\text{C}$  に明確な  $T_g$  を示した (Fig. 5(c))。キトサン/PAA コンプレックスの  $T_g$  はいずれも PAA よりもはるかに高温側に現れたが、明確な DD の影響は見られなかった。しかしながら  $T_g$  の高温側へのシフトはキトサンと PAA の複合化を示唆しており<sup>19)</sup>、コンプレックス形成においてキトサンの影響が大きいことを意味している。また試料によっては、キトサンの含有量の増大に伴い  $T_g$  と熱分解温度の明確な区別が困難な場合もあった。

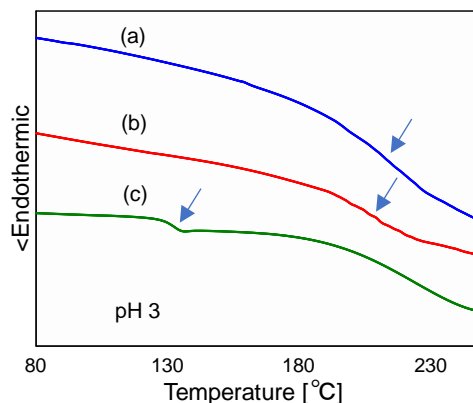


Fig. 5 DSC thermograms of chitosan/PAA complexes at (a) DD 76%, (b) DD 90%, and (c) PAA.

### 3.3 PAA の X 線回析

Fig. 6 に PAA の XRD の結果を示す。XRD の結果より PAA は非晶性であることが分かった。非晶性であったため、耐衝撃性や透明性の良い材料の創製が可能であると考えられる。

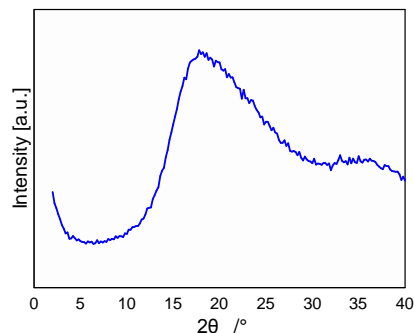


Fig. 6 Results of XRD measurement of PAA.

#### 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、静電的相互作用によるコンプレックス形成を用いて、様々な *DD* を有するキトサンと PAA との複合化を検討した。pH 3~5 のコンプレックス形成において収率に対する *DD* の影響はほとんどなかった。また 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、カルボキシラートの生成及び電離したキトサンのアミノ基などのピークから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。しかしながらコンプレックスの収率に対する *DD* の影響については検討した範囲内では小さく、バルクのポリマーのみに影響を及ぼす pH の効果が大きい考えられる。また DSC 測定からも *DD* の影響を確認することができず、他のアプローチから *DD* の影響を探る必要がある。また XRD 測定から PAA は非晶性のポリマーと確認した。

#### 5. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、的確なご助言をいただいた京都大学名誉教授西尾嘉之先生ならびに京都大学大学院農学研究科森林科学専攻上高原研究室の皆様へ謝意を表します。また、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御礼申し上げます。

#### 6. 参考文献

- 1) Muzzarelli, R. A. A : *Chitin*, Pergamon Press, New York, p.6 (1977).
- 2) 平野茂博 : キチン, キトサンの利用, シーエムシー, p.201 (1982).
- 3) Carlstorm, D : Crystal structure of  $\alpha$ -chitin, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **3**, 669-683 (1957).
- 4) 内田 泰 : キチン・キトサンの抗菌性, 月刊フードケミカル, 22 (1988).
- 5) 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、pp.9-13、(1988).
- 6) P. K. Dutta *et al.*, *J. Sci. Ind. Res.*, **63**, 20 (2004).
- 7) M. Rinaudo, *Prog. Polym. Sci.*, **31**, 603 (2006).
- 8) C. K. S. Pillai *et al.*, *Prog. Polym. Sci.*, **34**, 641 (2009).
- 9) 吉村昌也、鶴谷良一; 「創傷保護材からアキレス腱の再建まで活用できる」、*ibid*, pp.88-92.
- 10) Hackman, R.H.; *Austr. J. Biol. Sci.* 7168 (1954)
- 11) 前田ら, 北九州工業高等専門学校研究報告, 第 51 号, 65-69 (2018).
- 12) 二文字ら, 北九州工業高等専門学校研究報告, 第 52 号 45-48 (2019).
- 13) K. Sakurai. 繊維と工業, **46** 553-557 (1990).
- 14) K. Sakurai, T. Shibano, K. Kimura, T. Takahashi, 繊維学誌, **41**, T-361 (1985).
- 15) M. Nagasawa *et al.*, *J. Phys. Chem.*, **69**, 4005-4012 (1965).
- 16) V. Chavasit and J. A. Torres, *Biotechnol. Prog.*, **6**, 2-6 (1990).
- 17) K.-Sterzer C.A., PhD thesis, MIT (1984).

18) Y. Hu *et al.*, *Biomaterials*, **23**, 3193-3201 (2002).

19) Y. Nishio *et al.*, *J. Polym. Sci. B*, **37**, 1533-1538 (1999).

(2019 年 11 月 5 日 受理)