

赤エビ由来キトサンと PHEMA の複合材料の作製と評価

前田 良輔, 三小田 悠希

Fabrication and characterization of composites of chitosan from red rice prawn and PHEMA

Ryosuke MAEDA and Yuki MIKODA

Abstract

Chitin is the second most abundant natural polysaccharide on earth after cellulose, and is being studied in a wide range of fields as a renewable organic resource and functional material. Chitin is abundant in the exoskeletons of arthropods, including crustaceans, and in the cell walls of fungi. Heat treatment of chitin with concentrated alkaline solution causes hydrolysis of the acetamide group at the C-2 position to convert it into chitosan with free amino groups. Chitosan is a promising biomaterial for the future because it is an aminopolysaccharide with many reactive properties in addition to being biodegradable, biocompatible, non-toxic, and highly adsorbable. On the other hand, chitosan has some disadvantages such as a hard-molecular chain and poor processability. In this study, we aimed to develop a new material that is easier to handle than chitosan by compositing PHEMA, which has excellent processability and water absorption properties, with chitosan using the IPN method to compensate for the disadvantages of chitosan. Here we report on the preparation of chitin from natural red shrimp, control of the degree of deacetylation of chitosan, and the results and discussion of the preparation of chitosan and PHEMA composites using the IPN method under various conditions, swelling test, IR test, and SEM observation.

Key words: Chitin, Chitosan, PHEMA, composite material, IPN, IR, SEM

1. 諸言¹⁾⁻⁸⁾

キチンは地球上でセルロースに次いで豊富に存在する天然の多糖で、年間生合成量は $10^9 \sim 10^{11}$ t と推定されている。キチン・キトサンは再生可能な有機資源かつ機能性素材として食品、化粧品、医薬品といった幅広い分野の研究が行われている。キチンは、**Fig. 1(a)**に示したように *N*-アセチル-D-グルコサミン(GlcNAc)が β -1,4 結合した直鎖状多糖であり、甲殻類を含む節足動物の外骨格や真菌類の細胞壁に多く含まれる。本研究の基材であるキトサンは、キチンを濃アルカリ水溶液により加熱処理することによって、C-2 位のアセトアミド基の加水分解が起こり遊離アミノ基をもつ(**Fig. 1(b)**)。キチンは先に述べたように莫大な生合成量を持ち、再生可能な材料であることに加え、生分解性、生体適合性を有している。またキチンをキトサンに変換することで金属吸着能や抗菌性という機能が付与される。さらにキトサンは、高い反応性を有する遊離アミノ基をもつため、様々な材料へ利活用が期待できる将来有望なバイオマテリアルである。一方でキトサンは、キチンに比べれば希薄な酸性水溶液への溶解性が向上するようになるが、キチンと同様に分子内および分子間水素結合による高い結晶性のため、分子鎖が剛直であり、加工性が乏しいなどの欠点を有している。この欠点を補うために本研究では、透明性、保水性、加工性に優れたソフトコンタクトレンズの材料であるポリヒドロキシエチルメタクリレート(PHEMA, **Fig. 1(c)**)とキトサンを複合化させることで、キトサンの長所を活かしながら、吸水性、加工性に優れた新しい素材の開発を目的としており、ここでは、本来は食品廃棄物として廃棄されている大分県産赤エビの外骨格からキチンを精製し、さらにキトサンを調製する過程での脱アセチル化度(DD)の制御ならびに、様々な条件でのキトサンと PHEMA の相互侵入高分子網目(IPN)法による複合材料の作製と評価について報告する。

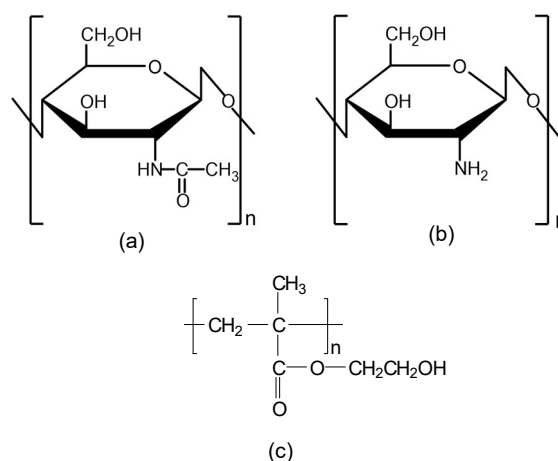


Fig. 1 Chemical structures of (a) chitin, (b) chitosan and (c) PHEMA.

2. 実験方法

2.1 キチンの精製

キチンは、大分県産赤エビの殻を原料とし Hackman 法⁹⁾を改良した方法¹⁰⁾で精製した。精製したキチンは、FT-IR を用いて市販品と比較し精製を確認した。

2.2 様々な DD を有するキトサンの精製

キチンのアルカリ処理時間と DD の関係を調べるため、2.1 で得られた精製キチン(DD22.5%)を、約 0.2 g ずつ各 5 個のバイアル瓶に加え、40wt%NaOH 水溶液で浸漬し、これを 35℃の恒温水槽に入れ、それぞれ 48 h、144 h、192 h、261 h、334 h 処理した。処理終了後、各サンプルはイオン交換水で入念に洗浄し、中性となったところで減圧乾燥した。その後 FT-IR 測定を行い、検量線より DD を決定した。FT-IR 測定は日本電子製(JNM-ECS400)を用いて KBr 法により、分解能 4.0 cm^{-1} 、積算回数 32 回で行った。

2. 3 IPN 法によるキトサンと PHEMA の複合化

PHEMA のモノマーであるメタクリル酸 2-ヒドロキシエチル(HEMA)を Aldrich 製重合禁止剤・安定剤除去カラムに通しヒドロキノン(HQ)系の重合禁止剤を除去し、使用まで遮光下、冷蔵庫内で保管した。重合前に HEMA 溶液を 50wt%水溶液とし、これに所定量の重合開始剤 HMPPh (2-hydroxy-2-methylpropiophenone) 及び架橋剤 EGDMA (Ethylene Glycol Dimethacrylate)をそれぞれ添加した。次に、2.2 で得た DD 80%または 100%のキトサンを、5%酢酸水溶液に溶解し 2.5%キトサン溶液を調製した。50wt%HEMA 溶液と 2.5%キトサン溶液を、4:1、3:1、2:1、1:1 [w/w]の割合で混合しスターラーで攪拌することで、均一な HEMA /キトサン混合溶液を得た。HEMA/キトサン溶液を直径 50 mm の円形テフロンシャーレ内に 5.0 g 流延し、ペルジャー内で 2 h 脱気処理を行った。続いて、ブラックライト蛍光灯(10W、 $\lambda=350$ nm)を用いて、 N_2 雰囲気下で室温下にて、光源と試料間の距離を 5.0 cm とし、2 h 紫外線を照射し、HEMA /キトサン溶液の重合および架橋を行った。また、HEMA 水溶液単独の重合も行った。紫外線照射後のサンプルはイオン交換水で入念に洗浄した。

2. 4 PHEMA/キトサン複合体の評価

洗浄したサンプルを室温下で風乾させ、質量変化や色調の変化を観察した。PHEMA /キトサンとPHEMA単体のサンプルを減圧乾燥し、減圧乾燥後ATR-FT-IR測定を積算回数64回で行い、PHEMAと1:1(PHEMA:キトサン) [w/w] のIRスペクトルを比較した。複合化後の生成物の形態を確認するために、切断した生成物の側面を走査型電子顕微鏡(SEM)により観察したサンプルに結晶性があるかを確認するため、PHEMA単体、4:1(PHEMA/キトサン(架橋剤 0.05wt%))、4:1(PHEMA/キトサン(架橋剤0.5wt%))の3つのサンプルを用いて、XRD測定を行った。

3. 結果と考察

3. 1 キチンおよびキトサンの精製

キチンは白色フレーク状で収率 9.8%で得られた。これを用いたキトサンの調製における DD の変化を Fig. 2 に示し

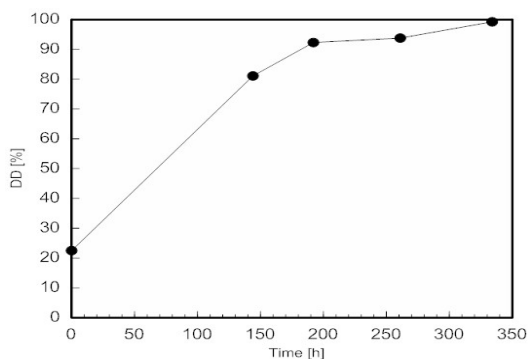


Fig. 2 Relationship between DD and treatment time.

た。DD が 90%程度まで急激に上昇し、それ以降穏やかに上昇し 334 h 処理するとほぼ 100%の DD を得た。

3. 2 PHEMA/キトサン複合体の色調および含水率

PHEMA 水溶液とキトサン水溶液の混合比が 4:1[w/w] の試料について複合体の色調変化を Fig. 3 に示した。キトサンと PHEMA の IPN による複合化直後は、無色透明の溶液が UV 硬化によって白く濁り、シリコンのような柔らかい生成物であった(Fig.3 左図)。風乾させる過程で質量の減少とともに、円形の素材の外側から徐々に透明に変化した。最終的には淡黄色の透明で硬い素材に変化した(Fig.3 右図)。これを再度イオン交換水に浸漬すると、再び白色のシリコンのような素材に戻り、その後 3 回これを繰り返したが、毎回同じ色調のスイッチングが観察された。また、1:1、2:1、3:1 (PHEMA:キトサン)[w/w] の割合での風乾過程での色調変化も確かめたが、4:1 (PHEMA:キトサン)[w/w] の時と同様の結果が得られた。このように含水率によって試料が

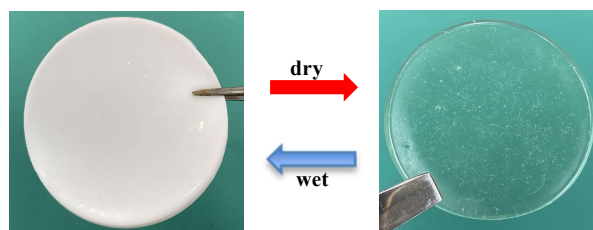


Fig. 3 Photographs of changes in color of PHEMA/chitosan composites. The left image is in wet condition and right image is in dry condition of the same composite.

濁ったり透明になったりする現象は、水分が多い状態下での PHEMA の相分離によるものと考えられる。

3. 3 PHEMA/キトサン複合体の質量変化

Fig.4 に PHEMA 水溶液とキトサン水溶液の混合比を変化させて調製した複合材料と PHEMA 単独の風乾時の質量減少の様子を示した。乾燥開始時はいずれの試料も約 3.5 g であり、風乾時間がおおよそ 300 時間付近で一定となった。

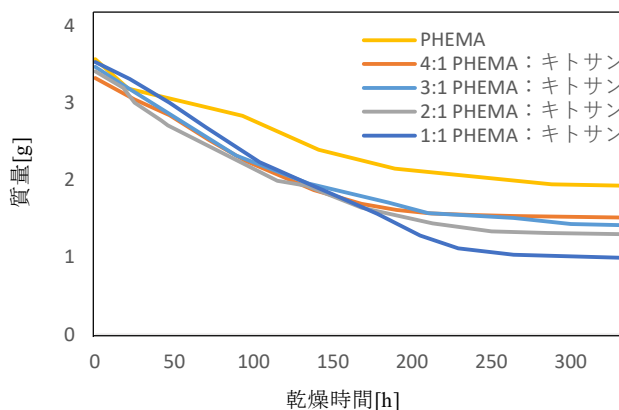


Fig. 4 Relationship of weight of the PHEMA/chitosan composites and drying time.

PHEMA 単独の試料が最も質量の減少が小さく、水分含有量が小さいことを示している。反対にキトサンの含有量が多い PHEMA 水溶液とキトサン水溶液の混合比が 1:1[w/w] の試料については、約 1 g まで質量が減少し、含水量が大きいたことが明らかとなった。これらの結果を含水率として Table 1 にまとめた。含水率とは以下のように定義した。

$$\text{含水率}[\%] = \frac{\text{重合直後の試料}[\text{g}] - \text{減圧乾燥後の試料}[\text{g}]}{\text{減圧乾燥後の試料}[\text{g}]} \times 100$$

Table 1 The water contents of PHEMA and PHEMA/chitosan composites.

PHEMA:chitosan[w/w]	含水率[%]
PHEMA	85
4:1	119
3:1	145
2:1	163
1:1	256

Table 1 から明らかなように、PHEMA 単独の場合に比較して、相対的なキトサンの含有量が大い混合比が 1:1 の試料では含水率が約 3 倍大きくなった。これは、比較的疎水的なポリマーである PHEMA の含有量の減少と親水性ポリマーであるキトサンの混合比に加え、PHEMA の網目が疎であるため、この大きなマトリックス中に多くの水を捕捉できたものと考えられる。

3. 4 PHEMA/キトサン複合体の ATR-FT-IR 測定

PHEMA および PHEMA/キトサン複合体いずれのスペクトルも、3300cm⁻¹ 付近に O-H 伸縮、2800cm⁻¹ 付近に C-H 伸縮による帰属を確認した。特に、PHEMA/キトサン複合体の方にキチンやキトサンに由来する大きな O-H 伸縮振動の吸収が見られ、あわせてその大きな吸収が分裂する形で 3250cm⁻¹ 付近にキトサン特有の N-H 伸縮振動に帰属される吸収も見られた。この 2 種類の試料における大きな違いとしては、PHEMA 単体では 1750cm⁻¹ 付近の C=O (エステル) 伸縮の鋭いピークがあったのに対し、PHEMA/キトサン

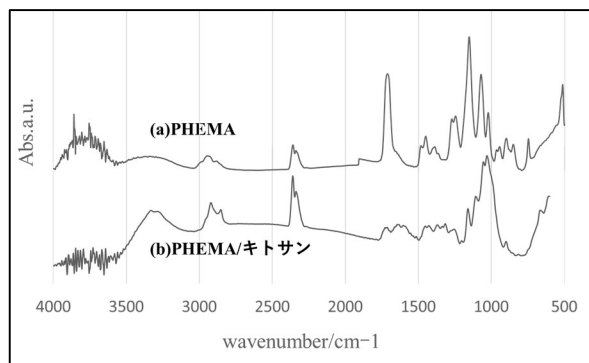


Fig. 5 ATR-FT-IR spectra of (a) PHEMA and (b) PHEMA/chitosan composites.

ではそのピークが抑制されており、これはキトサンを IPN 法により PHEMA と複合化時に用いた架橋剤 EGDMA と、重合した PHEMA が非常に似た構造であるため、エステル交換反応が行われて 1750cm⁻¹ 付近のピークが抑えられたと考えられる。

3. 5 PHEMA/キトサン複合体の SEM 観察

Fig. 6 に調製時の溶液組成が PHEMA:chitosan=4:1 の試料において、架橋剤濃度が 0.05% (Fig. 6(a))および 0.5% (Fig. 6(b))の場合の複合体の SEM 画像を示した。画像から明らかなように、架橋剤濃度の変化は、表面の緻密さに影響を及ぼし、架橋剤が多くなると表面が密になることが分かった。これらについて含水率を調べた結果、架橋剤濃度が 0.5%および 0.05%について、それぞれ 119%, 109%となり、表面の状態が密になっても、含水率は大きく減少しないことが明らかとなった。このことから、含水率は表面(あるいは内部)の構造的な緻密さより、構成される親水性ポリマーの含有率に大きく影響を受けると考えられる。

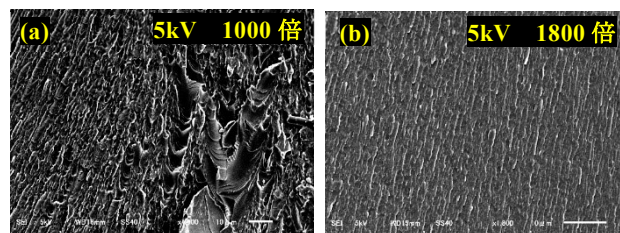


Fig. 6 SEM images of PHEMA/chitosan composites (PHEMA:chitosan=4:1), (a) 0.05% crosslinking agent, (b) 0.5% crosslinking agent.

3. 6 PHEMA/キトサン複合体の XRD 測定

3.5 と同様に、試料の結晶性を調べるため、調製時の溶液組成が PHEMA:chitosan=4:1 の試料において、架橋剤濃度が 0.05%および 0.5%の場合の複合体の XRD 測定結果を、**Fig. 7** に示した。いずれの試料についても、非晶性高分子に特有のブロードなハローパターンが観測され、非晶性高分子である PHEMA の特徴が現れたものと考えられる。

4. 結言

食品廃棄物として排出するエビ殻から、キチン・キトサンを精製し、それを基材とする材料開発を目的として研究を行った。今回はキチンをアルカリ処理することでキトサンとし、キトサンと合成高分子である PHEMA との複合体を IPN 法を用いて作製した。複合体の評価として、重合直後あるいは吸水後の複合体は、白色で弾力のある素材であるのに対し、乾燥すると透明で硬い素材に変化することが分かった。また含水率を調べた結果、相対的な PHEMA 含有率を下げることで大きな含水率を得た。この材料は、水との関りにおいて大きく変化することが明らかとなり、今後の材料開発に向けた多くの知見を得ることができた。

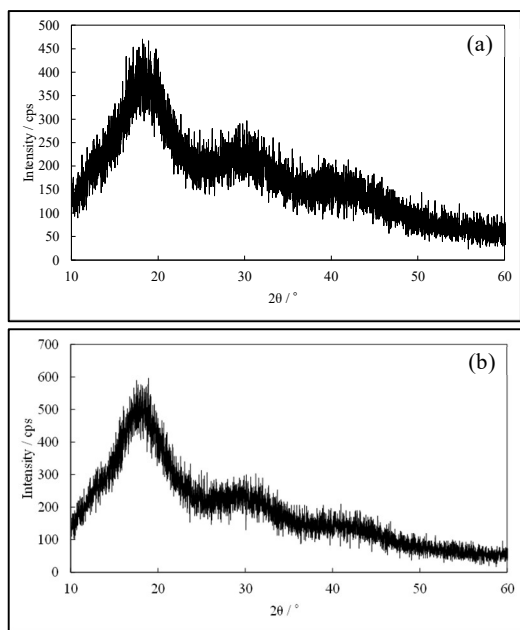


Fig. 7 XRD measurement of of PHEMA/chitosan composites (PHEMA:chitosan=4:1), (a) 0.05% crosslinking agent, (b) 0.5% crosslinking agent.

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原料を、乾燥状態で十分な量をご提供下さった、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. 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 α -chitin, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **3**, 669 (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) P. K. Dutta *et al.*, *J. Sci. Ind. Res.*, **63**, 20 (2004).
- 6) M. Rinaudo, *Prog. Polym. Sci.*, **31**, 603 (2006).
- 7) C. K. S. Pillai *et al.*, *Prog. Polym. Sci.*, **34**, 641 (2009).
- 8) 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.
- 9) Hackman, R.H., *Austr. J. Biol. Sci.* 7168 (1954).
- 10) 前田ら, 北九州工業高等専門学校研究報告, **第 51 号**, 65 (2018)

(2022年11月1日 受理)