

# キトサンおよびフィブロイン薄膜の製法

吉 田 大 介

## Methods of Casting Chitosan and Fibroin Membranes

Daisuke Yoshida

古くからキチンは甲殻類、昆虫類の組織支持体として知られていて、節足動物門をはじめ動物界に広く存在し、また菌界において、主にカビ、酵母、キノコを含む菌類の細胞壁に存在している<sup>1)</sup>。すなわち、地球上にはキチンは生物由来の高分子資源として莫大な量が存在しているのである。しかし、同じ様な生体高分子であるセルロースが広範に利用されているのと比べると、キチンの利用は非常に少ない。

キチンの誘導体であるキトサンは高分子凝集剤として以前から工業的に使われているが、その使用量は年間数100トン程度に過ぎない。近年、キチンの利用法に関する研究がおこなわれ、人工皮膚などの医療材料をはじめ製紙添加物、化粧品材料、健康食品などに利用されはじめてはいるが、資源としての利用はまだ始まったばかりといえる。

キチンは *N*-アセチル-D-グルコサミンが  $\beta$ -(1,4)-結合した高分子であり、キトサンはキチンの脱 *N*-アセチル化誘導体である。(Fig.1) 一般的に天然キチンは10%程度アセチル基を失っている。また、キトサンもある程度アセチル基を含んでいる物もその範疇に含まれる。

キチンそのものは、結晶性が大きいいため一般的な溶剤に難溶であるのと、天然高分子のため不融であるので、成型に関しては非常に扱いにくい物質である。最近キチンの溶解に関する研究がおこなわれ、それまで知られていた分子量の大きな低下を伴うギ酸、硫酸などの強酸を使用する方法以外に、ジクロロ酢酸またはトリクロロ酢酸とハロゲン化炭化水素との混合溶媒を使用する方法、アミド系溶媒を使用する方法などが報告されている。これらの方法はやはり分子量の低下があったり、溶媒が非常に高価であったりして、たとえばセルロースを原料とするレーヨンの製造のような資源を大量に加工するというような用途には用いられにくい。しかし、医療用の生体吸収性縫合糸や人工皮膚の様な付加価値の高いものには利用されるようになってきた。

キトサンは無機および有機酸に可溶で、用途にあった成型が容易である。キトサンの製造は一般的に精製キチンを原料とし30~60%の濃アルカリ水溶液中で加熱する事によっておこなわれる。また、熔融アルカリ中での短時間処理、アルカリ・エタノール-エチレングリコー

ル系での処理などがある。ただしこれらの強アルカリを用いるキトサンの製造において、解重合によって分子量の低下が起こる。アルカリを使用しない方法として chitin deacetylase によるキチンの脱 *N*-アセチル化の報告がある。

キトサンはイオン性高分子であるので、pH によっては反対荷電したイオンを特異的に吸着することができ、製膜すれば選択透過膜としての用途が考えられる。ここでは、溶質が高濃度側から低濃度側へ透過する化学的な機能性透過膜の基礎的な研究の一環として、天然高分子誘導体であるキトサン、部分 *N*-アセチル化キトサン、および天然高分子である絹フィブロインの流延法（キャスト法）による製膜方法について報告し、さらに、透過実験の一例として、製造したキトサン膜、および部分 *N*-アセチル化キトサン膜を用いた染料の透過実験について報告する。

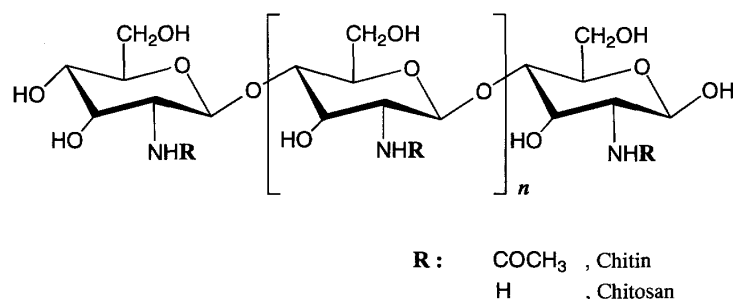


Fig. 1 Chitin and chitosan

## 材料および実験方法

### キトサン膜の製造

キトサン 2 g に 20 g の蒸留水を入れアスピレーターで減圧しながら 2 時間攪拌をおこない、キトサンを水で十分膨潤させた。これに 80 ml の 2.5% 酢酸を加え常圧で 4 時間攪拌を続け、2% のキトサン酢酸溶液を得た。これを 3 G ガラスフィルターでろ過したものを減圧脱泡し溶液中の空気を取り除いた。この溶液をピペットで 120 mm  $\phi$  の平面研磨シャーレにキャストし、水準器を用い水平になるようにして乾燥機内に入れ、60°C で 6 時間乾燥した。自然冷却した後、NaOH 1% 水溶液 30 ml を加え 2 時間放置した。端からゆっくりシャーレから剥がし、洗浄水の pH が 8 に下がるまで 3 回ほど洗浄を繰り返す。さらに 25°C で 24 時間水洗をおこなった。これをろ紙に挟み、軽く圧力をかけながら 60°C 6 時間の乾燥をおこない各種厚さを持つキトサン膜を得た。これらのキトサン膜はデシケーター中で保存した。

### キトサン膜の部分 *N*-アセチル化

キトサン膜を水で 4 時間膨潤させ、余分な水分をろ紙で取り、24 時間ピリジンに浸漬置換した。これを 2 回くり返し、余分のピリジンをろ紙で取った。100 ml の新たなピリジンの中に

入れ、攪拌しながら無水酢酸200mlを加え、さらに15分攪拌し *N*-アセチル化をおこなった。水洗後、飽和炭酸ナトリウム水溶液中で20℃、100時間放置した後、充分水洗し、ろ紙に挟み60℃ 6時間乾燥し、部分 *N*-アセチル化キトサン膜を得た。

## フィブロイン膜の製造

### フィブロインの精製

生糸12gを1 lの1%マルセル石けん水溶液中で100℃、30分処理する操作を2度おこない、セリシンを除去した。50℃に暖めた0.5%、0.3%、0.2%の炭酸ナトリウム水溶液各1 lで順に1時間ずつ処理し、さらに、充分水洗することによって残留石けん分を除き精製フィブロインを得た。

### フィブロインの製膜

平出の透析法<sup>2)</sup>を応用して<sup>3)</sup>フィブロインの製膜をおこなった。すなわち、精製したフィブロイン8.7gを9 M 臭化リチウム水溶液100mlに40℃で完全に溶解させた。この溶液を Viskase Sales Corporation の透析用セロファンチューブに空気を含まないように入れ、イオン交換水を用いた流水中で25℃、48時間透析をおこない臭化リチウムを除いた。この透析中に物理的な刺激を与えるとフィブロインが析出することがある。透析後、溶液をシャーレにキャストし水準器を用いて水平になるようにして乾燥機中で60℃で20時間乾燥させ透明なフィブロイン膜を得た。この膜を1:1エタノール水溶液を加えて不溶化処理をおこなった後、シャーレより剥離してからろ紙にはさみ軽く重石をして乾燥機中で乾燥させデシケータ中に保存した。透析により約99.9%の臭化リチウムが脱離され<sup>2)</sup>、9 M 臭化リチウムに溶解しても、フィブロインの分子量は3万から20万以上であることが確認されている<sup>4)</sup>。測定には膜厚の安定している中央部のみ用いた。

## 染料

Fig.2に示した、C.I. Acid Orange 7 (以下 OR と略す) の市販品を常法により精製して実験に用いた。

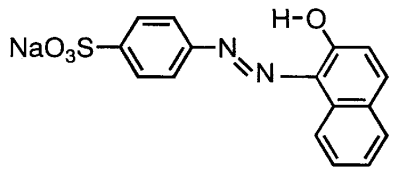
Dyes	Chemical Formulas
C.I. Acid Orange 7 (OR, Orange II, M.W. 350)	

Fig. 2 Dyes used in this study

### 等温吸着実験

酢酸ナトリウム $3.3 \times 10^{-2} \text{ mol/l}$ のバッファーを用いた種々の濃度の OR 溶液の中で、小片に切ったキトサン膜を恒温水槽中で48時間染色した。溶液中の OR の吸光度、およびキトサン膜を10%酢酸に溶解させ、酢酸溶液の吸光度を分光光度計で測定することによって、溶液中の OR 濃度とキトサン膜中の OR 濃度を求めた。

### 透過実験

染料の透過実験には、Fig.3に示したガラス製の装置を用いた。すなわち、A室(360ml)とB室(60ml)とを、直径30mm、厚さ0.01mmのキトサン膜で隔て、主としてA室からB室へ染料が移行するように実験をおこなった。一定経過時間ごとにA室およびB室から溶液を採取して分光法によって各室の染料濃度を測定し、B室の染料濃度から透過した染料の量を決定した。透過実験は恒温水槽中でおこなった。

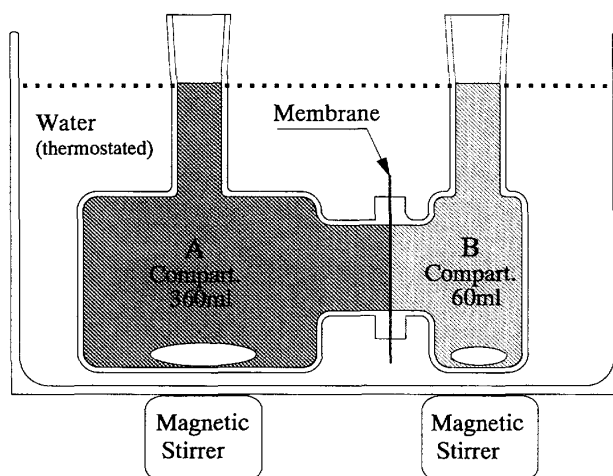


Fig. 3 Apparatus for permeation

## 結果と考察

### 膜の性能

製膜したキトサン膜および部分アセチル化キトサン膜は、透明で、キャスト液の量を変えることで0.01~0.03mmの厚さ(乾燥状態)のものが得られた。これらの膜の赤外線吸収スペクトルの測定から Roberts の IR 法<sup>5)</sup>により脱アセチル化度を算出した結果を Table 1 に示した。部分 *N*-アセチル化キトサン膜の脱アセチル化度は50.4%で、キトサン膜のものより30%ほどアセチル化されていることがわかる。この部分 *N*-アセチル化の反応を、酸溶液にキトサンを溶解させ均一系でおこなうと、*N*-アセチル化がランダムに起こり、50%辺りの脱アセチル化度においては水溶性をもち、水を溶媒とした透過実験用の膜としては使用できなくなる。この実験のような不均一系の反応では Fig.4 の様に膜の表面に近いところでアセチル化

Table 1 Rates by I.R. method

Membrane	Rate of dislocation of acetyl group
Chitosan	81.2%
Partially <i>N</i> -acetylated chitosan	50.4%

- : non *N*-acetylated unit
- : *N*-acetylated unit

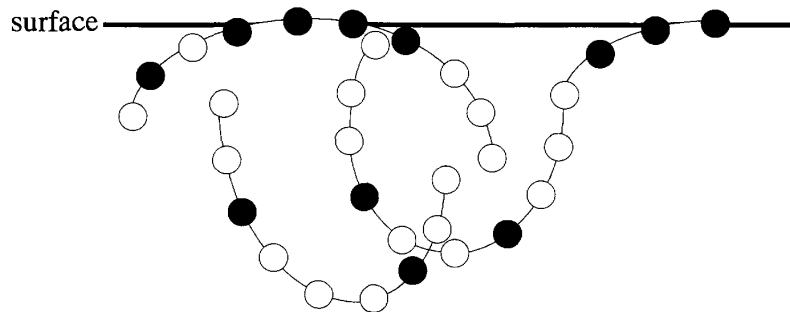


Fig. 4 Image of partially *N*-acetylated chitosan

が進み、内部ではあまり進まないというような状態が想像できる。

#### キトサンの飽和吸着量に与える部分アセチル化の影響

40°CにおけるORのキトサン膜と部分アセチル化キトサン膜に対する等温吸着曲線をFig. 5に示した。これはORとこれらの膜の吸着反応がLangmuir型の吸着であることを示唆している。この等温吸着曲線の逆数プロットをFig. 6に示した。また逆数プロットのy切片より飽和吸着量を求め、結果をTable 2に示した。30°Cおよび40°Cでおこなったどちらの実験も、キトサン膜の飽和吸着量は部分アセチル化キトサン膜のものよりかなり大きく、ナイロンに対するORの飽和吸着量<sup>6)</sup>と比べても数倍大きい。

Table 2 Infinite adsorption rates of OR dyeing of chitosan and partially *N*-acetylated chitosan membranes

Membrane	at 30°C	at 40°C
Chitosan	$3.07 \times 10^{-4} \text{ mol/g}$	$2.29 \times 10^{-4} \text{ mol/g}$
Partially <i>N</i> -acetylated chitosan	$1.22 \times 10^{-4} \text{ mol/g}$	$1.04 \times 10^{-4} \text{ mol/g}$

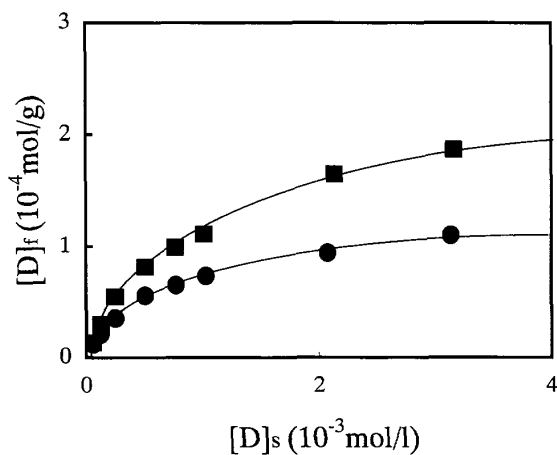


Fig. 5 Time-adsorption isotherms of OR dyeing of chitosan and partially N-acetylated chitosan membranes at 40°C

- : Chitosan membrane
- : Partially N-acetylated chitosan membrane

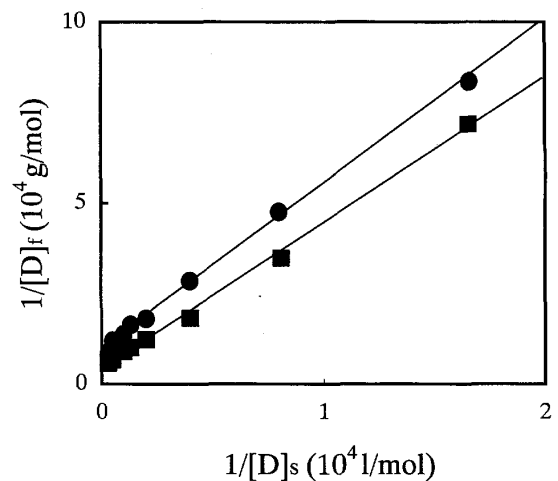


Fig. 6 Langmuir's reciprocal plots of time-adsorption isotherms of OR dyeing of chitosan and partially N-acetylated chitosan membranes at 40°C

- : Chitosan membrane
- : Partially N-acetylated chitosan membrane

この実験において、部分アセチル化キトサン膜は表面近くがやや疎水的環境であり、表面近くの染料濃度がそれほど大きくなり、内部の吸尽率は表面に比べてもともと大きくないので、IR法による脱アセチル化度とこの飽和吸着量は比例しないと考えることができる。

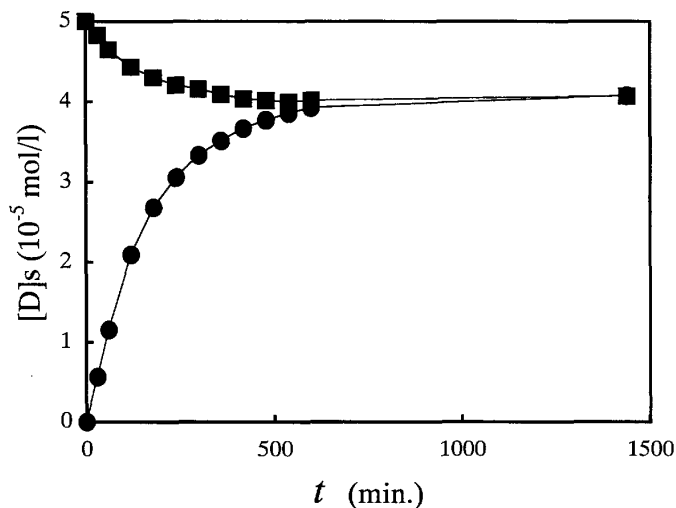


Fig. 7 Time course of OR concentrations in compartment A and B

- : in compartment A
- : in compartment B

#### 膜を透過する染料の例

40°Cにおいて、 $3.3 \times 10^{-2} \text{ mol/l}$  酢酸ナトリウムをA室およびB室に入れ、A室に  $5 \times 10^{-5}$

mol/l になるように OR を添加した場合の、A 室および B 室の染料濃度を透過時間に対してプロットしたものを Fig. 7 に示した。時間経過とともに濃度差は次第に小さくなり、B 室への透過速度も小さくなっていった。同様な透過曲線は他のすべての透過実験にも見られた。透過実験の後においてもキトサン膜には見かけ上損傷はなかった。

### 要 約

天然高分子誘導体であるキトサン、部分 *N*-アセチル化キトサン、および天然高分子である絹フィブロインの製膜方法について検討し、流延法（キャスト法）によって 0.01~0.03mm の膜厚をもつキトサン膜および絹フィブロイン膜をそれぞれ得た。またキトサン膜をピリジン-無水酢酸の系で処理することで部分 *N*-アセチル化キトサン膜を得た。キトサン膜および部分 *N*-アセチル化キトサン膜の脱アセチル化度は、I.R.法によると 81.2% および 50.4% であった。40℃における Orange II のキトサン膜および部分 *N*-アセチル化キトサン膜に対する飽和吸着量を示した。さらに、キトサン膜を用いた染料の透過実験の一例について報告した。

### 参 考 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, 技法堂出版, 2-9, (1988)
- 2) 平出, 長野県情報試験所研究報告, No.7, 48, (1991)
- 3) Yoshida, D., Jun, W., et al., *J. of Sericultural Sci. of Japan*, **67**, 183, (1998)
- 4) 陳, 谷岡ら, 繊維学会誌, **50**, 32, (1994)
- 5) Domszy, J.G. and G. A. F. Roberts, *Makromol. Chem.*, **186**, 1671 (1985).
- 6) Mitsuishi, M., Yoshida, D., et al., *Sen-i Gakkaishi*, **37**, 108, (1980)

(2000年1月31日受理)