

グルタリル化キトサンから合成した両親媒性高分子の界面特性

清水慶昭, 米田晶子, 道明美保子

滋賀県立大学

〒522-8533 滋賀県彦根市八坂町 2500 番地

Synthesis of Amphiphilic Polymers from Glutarylated Chitosan and the Interfacial Properties of the Resulting Polymer

Yoshiaki SHIMIZU*, Akiko YONEDA*, and Mihoko DOHMYOU**

Department of Materials Science, School of Engineering, The University of Shiga Prefecture, 2500 Hassaka-cho, Hikone, Shiga 522-8533, Japan**Department of Life Style Studies, School of Human Culture, The University of Shiga Prefecture, 2500 Hassaka-cho, Hikone, Shiga 522-8533, Japan*

2010年5月6日 受理

Amphiphilic polymers (AP) were synthesized by the reaction of O-glutarylated chitosan with an alkylglycidylether. The critical micelle concentration of the polymers obtained was determined in an aqueous solution by fluorescence spectroscopy with pyrene as a probe. Furthermore, the emulsification capacity of AP for squalane was judged macroscopically. It was demonstrated from the results obtained that AP has a high capacity for forming micelles as well as a high emulsification capacity.

Keywords: glutarylated chitosan, amphiphilic polymer, micelle, emulsification

1. 緒 言

界面活性剤は薬品, 化粧品, 食品など多様な分野で利用されている。しかし, 一般的に用いられる低分子界面活性剤は, 毒性や生分解性などの点で問題となる場合がある。そこで, 生分解性をもつ無毒のキトサンを原料とすることにより, このような問題点を解決することができると考えられる。また, キトサンは生体適合性があるので, キトサンベースの高分子界面活性剤は体内への服用や静脈への注入による薬物徐放システム (Drug Delivery System, DDS) への応用が可能である¹⁾。

前報²⁾では, キトサンのアミノ基にアルキルグリシジルエーテルを反応させて疎水基を導入し, 次に, ヒドロキシル基に無水コハク酸を反応

させて, O-サクシニル化を行い, 両親媒性高分子を合成した。本報では, コハク酸よりメチレン基を1個多く有する無水グルタル酸を用いて, O-グルタリル化キトサンを合成後, アミノ基に前報と同じ構造の疎水基を導入した両親媒性高分子を合成し, 得られた新規ポリマーのミセル形成能および乳化能を評価した。

2. 実 験

2.1 試料および試薬

用いたキトサンはダイキトサン 100D (脱アセチル化度 0.94, (株)大日精化工業)である。また, 疎水基導入のための化学修飾剤として, 前報²⁾と同じアルキルグリシジルエーテル (AG) ((株)ナガセケムテックス, デコナール EX-192) を用い

Main components:

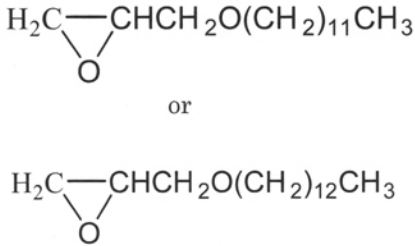


Fig. 1 Chemical structure of the alkylglycidylethers.

た。さらに、親水基導入のための化学修飾剤である無水グルタル酸は特級試薬（株和光純薬工業）を用いた。その他の試薬も特級試薬（株和光純薬工業または株ナカライテスク）を用いた。アルキルグリシジルエーテルの構造式を Fig. 1 に示す。

2.2 *N*-ベンジリデンキトサンの合成

キトサン 2.0g を 10vol% 酢酸水溶液 80mL に溶解し、メタノール 160mL で希釈した。これにベンズアルデヒド 12g を滴下し、室温で 48 時間攪拌した。生成物をろ過後、メタノールで洗浄し、凍結乾燥したものを *N*-ベンジリデンキトサン (B-キトサン) とした。反応式を Scheme 1 に示す。

2.3 *O*-グルタルリ化-*N*-ベンジリデンキトサンの合成

B-キトサン 1.0g をジメチルスルホキシド DMSO 50mL に加え、次に、無水グルタル酸 2.3g (無水グルタル酸 / B-キトサンの繰り返し単位 = 5.0) をジオキサン 10ml に溶解させた溶

液を滴下し、60℃で 24 時間攪拌した。生成物をろ過後、ジオキサン、アセトンの順で洗浄し、真空乾燥したものを *O*-グルタルリ化-*N*-ベンジリデンキトサン (*O*-グルタルリ化-B-キトサン) とした。また、無水グルタル酸の仕込み量を 4.6g および 6.9g (無水グルタル酸 / B-キトサンの繰り返し単位 = 10.0 および 15.0) に増加させた場合についても同様に合成を行った。このとき、無水グルタル酸を溶解するために加えたジオキサンは、それぞれ、20mL, 30mL である。

2.4 *O*-グルタルリ化キトサンの合成

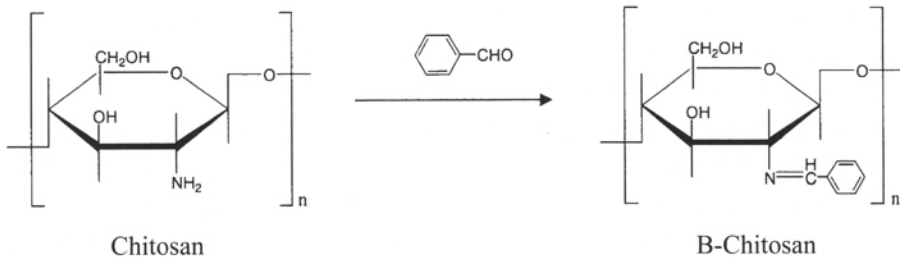
O-グルタルリ化-B-キトサン 0.6g を 0.5mol/L 塩酸 30mL に加え、室温で 24 時間攪拌してアミノ基を脱保護した。反応物は中和処理をしないでアセトン 300mL 中へ流し込み攪拌した。生成物をろ過後、エタノールで洗浄し、真空乾燥したものを *O*-グルタルリ化キトサンとした。B-キトサンのグルタルリ化および脱保護の反応を Scheme 2 に示す。

2.5 *N*-AG-*O*-グルタルリ化キトサンの合成

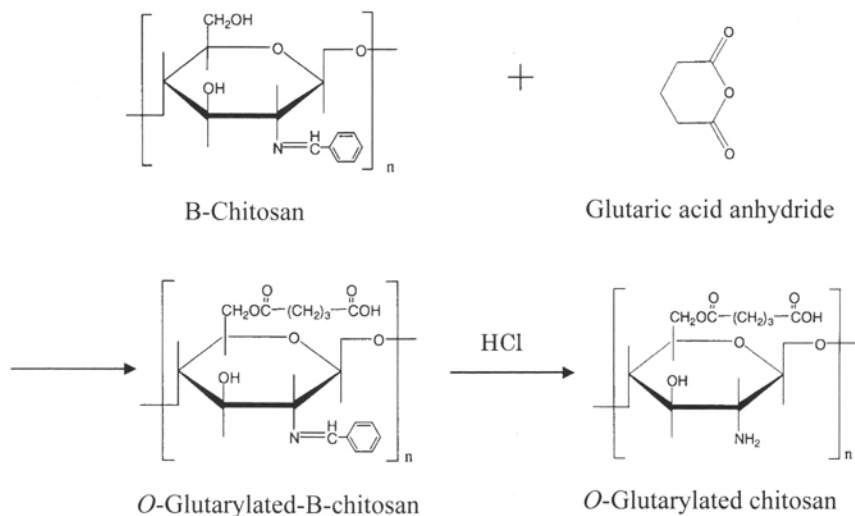
O-グルタルリ化キトサン 0.5g にエチレングリコール 20mL を加え、80℃で 3 時間膨潤させた。これに、所定量の AG をメタノール 20mL に溶解させた溶液 (エポキシ基 / アミノ基 = 1.0) を滴下し、還流下、70℃で 48 時間反応させた。生成物をアセトン 300mL 中に流し込み、攪拌後ろ過した。エタノール、ジエチルエーテルの順で洗浄し、真空乾燥した。合成したポリマーを以後 *N*-AG-*O*-グルタルリ化キトサンとする。反応式を Scheme 3 に示す。

2.6 FT-IR 吸収スペクトルの測定

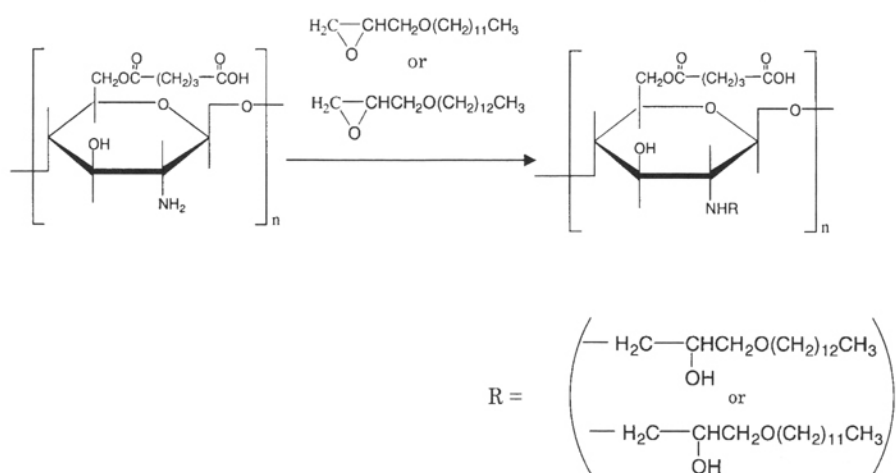
2.2 ~ 2.5 の各項で合成した生成物の FT-IR 吸



Scheme 1 Scheme for the synthesis of benzylidenechitosan (B-Chitosan).



Scheme 2 Scheme for the synthesis of *O*-glutarylated chitosan.



Scheme 3 Scheme for the synthesis of *N-AG-O*-glutarylated chitosan.

収スペクトルを(株)日本分光製フーリエ変換赤外分光光度計 (FT-IR 430) により, KBr 錠剤法 (透過法) によって測定した。

2.7 溶解度の測定

合成した *O*-グルタリル化キトサンおよび *N-AG-O*-グルタリル化キトサン各 1.0mg を溶媒 (水およびアルカリ性水溶液) 5.0mL に加え, 室温で 24 時間攪拌した。この条件で溶解しなかったときは 60℃ で 2 時間攪拌した。溶解の判定は目視で行った。なお, アルカリ性水溶液とし

て, 0.1mol/L の $\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ (pH8.0), $\text{NaHCO}_3 + \text{Na}_2\text{CO}_3$ (pH10.0) および NaOH (pH13) の各水溶液を用いた。

2.8 *N-AG-O*-グルタリル化キトサンおよび *O*-グルタリル化キトサン溶液のピレンをプローブとする蛍光測定

N-AG-O-グルタリル化キトサン 70mg を蒸留水 70mL に加え, 室温で 24 時間攪拌して溶解させた。この溶液を原液として, 0.01g/L ~ 1.0g/L の濃度の各種溶液を調製した。これらの溶液

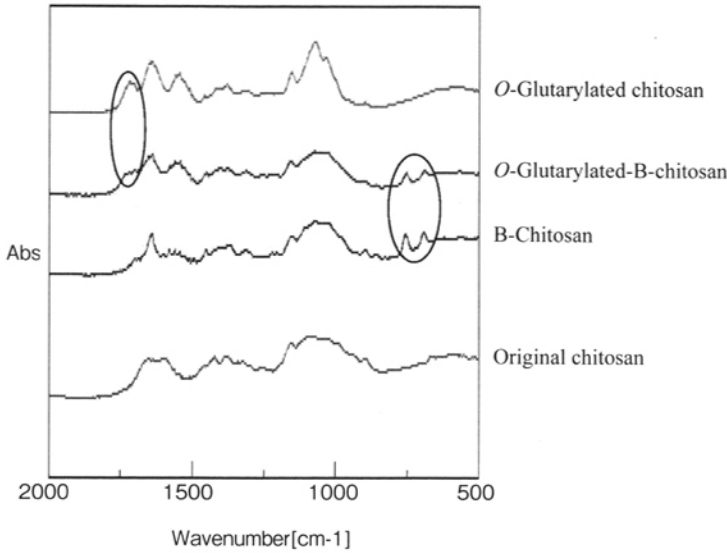


Fig. 2 FT-IR spectra of *O*-glutarylated chitosan, *O*-glutarylated B-Chitosan, B-Chitosan, and an original chitosan.

に 1.584×10^{-4} mol/L のピレンエタノール溶液 $170\mu\text{L}$ を加えて、 30°C で 24 時間振とうした。なお、調製後のピレン濃度は 2.693×10^{-6} mol/L であった。振とう後、蛍光分光光度計(株島津製作所, RF5300PC)で蛍光測定を行った。その際の励起波長は 338nm 、励起のバンド幅は 1.5nm 、蛍光のバンド幅は 1.5nm である。得られた蛍光スペクトルにおける 373nm の I_1 ピークと、 383nm の I_3 ピークの値の比 (I_1/I_3) を \log (ポリマー濃度) に対してプロットし、文献^{3), 4)} に記されている方法に基づいて臨界ミセル濃度 (CMC) を求めた。すなわち、曲線の屈折点におけるポリマー濃度を CMC とした。同様の方法で、*O*-グルタリル化キトサン溶液にピレンを加えた系についても蛍光測定を行った。

2.9 *N*-AG-*O*-グルタリル化キトサンの乳化能の測定

N-AG-*O*-グルタリル化キトサン 1mg および 10mg を 10mL の蒸留水に溶解させた後、疎水性の有機化合物であるスクアラン (サメ肝油主成分のスクアレンを水素添加し改質したもので、疎水性物質のモデルとして使われている⁵⁾) を 0.05mL 加えた。 30°C で 3 時間超音波を照射して

分散させ、分散直後および 24h 放置したときの分散状態を観察した。

3. 結果と考察

3.1 *O*-グルタリル化キトサンの合成の確認と置換率

Fig. 2 に原料キトサン、B-キトサン、*O*-グルタリル化-B-キトサンおよび *O*-グルタリル化キトサンの IR 吸収スペクトルを示す。

B-キトサンおよび *O*-グルタリル化-B-キトサンの IR 吸収スペクトルには 750cm^{-1} 、 700cm^{-1} にベンゼン環に由来する吸収ピークが見られるのに対して、*O*-グルタリル化キトサンの IR 吸収スペクトルにはこれらの吸収ピークが消失していることから、脱保護を確認した。

また、*O*-グルタリル化-B-キトサンおよび *O*-グルタリル化キトサンに見られる 1720cm^{-1} の吸収ピークはエステル結合中の C=O 伸縮振動に由来する特異な吸収ピークであることから、キトサンが無水グルタル酸と反応して、対応するエステルが生成していることを確認した。

Table 1 に *O*-グルタリル化キトサンの元素分析結果 (C/N 比) から求めたグルタリル化率を示す。

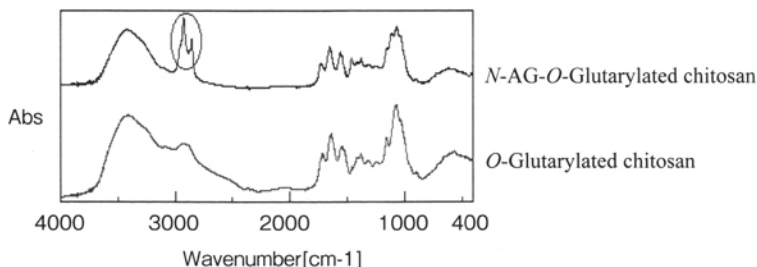


Fig. 3 FT-IR spectra of *N*-AG-*O*-glutarylated chitosan and *O*-glutarylated chitosan.

ここで、グルタリル化率が低い順に *O*-グルタリル化キトサン 1, 2, 3, 4 と称する。

3.2 *O*-グルタリル化キトサンの溶解度

O-グルタリル化キトサンの純水およびアルカリ性水溶液中における溶解度を測定した結果、全ての *O*-グルタリル化キトサンが純水およびアルカリ性水溶液に室温で溶解することが確認された。

3.3 *N*-AG-*O*-グルタリル化キトサンの合成の確認と置換率

Fig. 3 に *O*-グルタリル化キトサンおよび *N*-AG-*O*-グルタリル化キトサンの IR 吸収スペク

トルを示す。

N-AG-*O*-グルタリル化キトサンの IR 吸収スペクトル中には、 2925cm^{-1} 、 2855cm^{-1} に吸収ピークが見られる。これはメチレン基の C-H 伸縮振動に由来する吸収ピークであり、*O*-グルタリル化キトサンの AG 化が確認できた。

Table 2 に *N*-AG-*O*-グルタリル化キトサンの元素分析結果 (C/N 比) から求めた AG 化率を示す。

ここで、*O*-グルタリル化キトサン 1, 2, 3, 4 に対して、AG を反応させたものをそれぞれ *N*-AG-*O*-グルタリル化キトサン 1, 2, 3, 4 とする。

3.4 *N*-AG-*O*-グルタリル化キトサンの溶解度

N-AG-*O*-グルタリル化キトサンの溶解度を測定した結果、合成したすべての *N*-AG-*O*-グルタリル化キトサンはアルカリ性水溶液だけでなく、水にも室温で溶解した。

3.5 *O*-グルタリル化キトサン溶液のピレンをプローブとする蛍光測定

Fig. 4 にピレンを含む *O*-グルタリル化キトサ

Table 1 Degrees of glutarylation

Sample	Glutarylation(%)
<i>O</i> -glutarylated chitosan 1	37.8
<i>O</i> -glutarylated chitosan 2	38.3
<i>O</i> -glutarylated chitosan 3	51.2
<i>O</i> -glutarylated chitosan 4	61.9

Table 2 Degrees of substitution

Sample	Degrees of the introduction of AG (%)
<i>N</i> -AG- <i>O</i> -glutarylated chitosan 1	4.84
<i>N</i> -AG- <i>O</i> -glutarylated chitosan 2	7.99
<i>N</i> -AG- <i>O</i> -glutarylated chitosan 3	5.09
<i>N</i> -AG- <i>O</i> -glutarylated chitosan 4	6.64

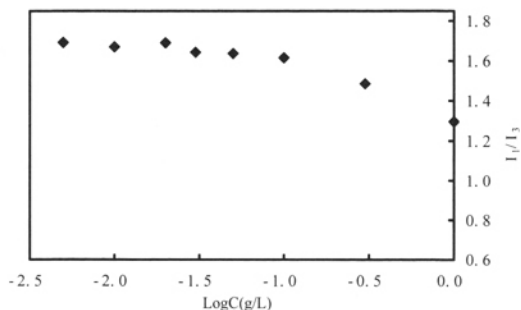


Fig. 4 Relation between I_1/I_3 and the concentration of *O*-glutarylated chitosan 2.

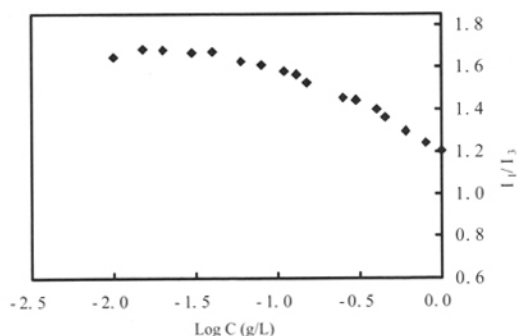


Fig. 5 Relation between I_1/I_3 and the concentration of *N*-AG-*O*-glutarylchitosan 1.

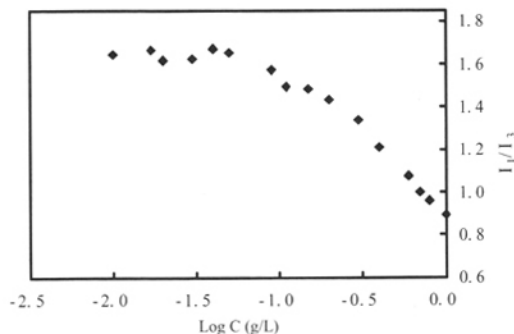


Fig. 6 Relation between I_1/I_3 and the concentration of *N*-AG-*O*-glutarylchitosan 2.

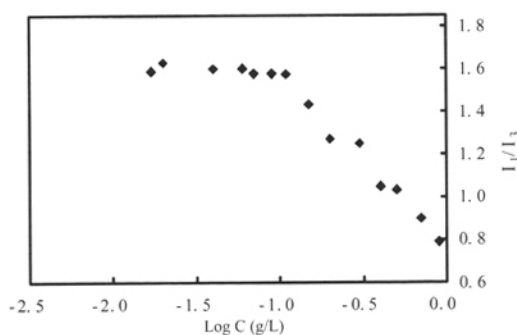


Fig. 7 Relation between I_1/I_3 and the concentration of *N*-AG-*O*-glutarylchitosan 3.

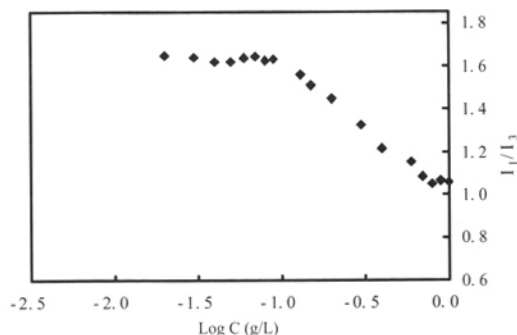


Fig. 8 Relation between I_1/I_3 and the concentration of *N*-AG-*O*-glutarylchitosan 4.

ン溶液の蛍光測定結果の一例を示す。

O-グルタリル化キトサン2において、ポリマー濃度の増加とともに、 I_1/I_3 はゆるやかに低下した。この傾向はその他の*O*-グルタリル化キトサンの場合も同様であった。疎水基を導入していないにも関わらず、 I_1/I_3 が低下するのは*O*-グルタリル化キトサン中に存在するわずかなアセチルアミノ基とピレンが相互作用しているからだと考えられる。しかしながら、曲線には屈曲点は見られず、ミセルは形成していないと推定される。

3.6 *N*-AG-*O*-グルタリル化キトサン溶液のピレンをプローブとする蛍光測定

Fig. 5, 6, 7, 8にピレンを含む*N*-AG-*O*-グルタリル化キトサン1, 2, 3, 4の各水溶液の蛍光測定結果を示す。 I_1/I_3 が急激に減少し始める濃度から、CMCを決定した^{3), 4)}。

N-AG-*O*-グルタリル化キトサン2, 3, 4にお

いては、Fig. 6, 7, 8からCMCを求めることができるのに対し、AG化率がより低い*N*-AG-*O*-グルタリル化キトサン1の場合には水溶液中のポリマー濃度が増加するにつれ、 I_1/I_3 がゆるやかに低下しており (Fig. 5)、CMCを求めることができない。このことから、CMCを求めるためには、ミセル内にピレン分子を完全に取り込めるだけの疎水性部分が必要であると考えられる。

また、*N*-AG-*O*-グルタリル化キトサン2, 3, 4のCMCはそれぞれ0.09 g/L, 0.08 g/L, 0.1 g/Lであり、一般に用いられている界面活性剤であるドデシル硫酸ナトリウムのCMC 2.1g/Lより非常に小さい値であると言える。

さらに、*N*-AG-*O*-グルタリル化キトサン3においてLog C=0 (ポリマー濃度=1.0g/L)における I_1/I_3 値0.8 (Fig.7)はピレンをヘキサンに溶解させたときに示す I_1/I_3 値0.6に近い値であり、ミセ

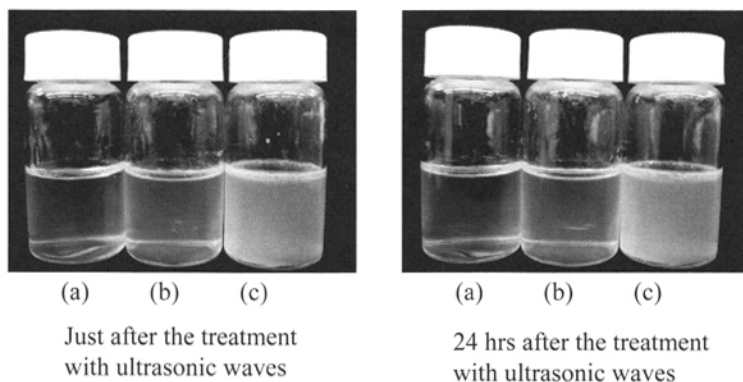


Fig. 9 Photographs of emulsion state in compared to those under water-squalane system and *O*-glutarylated chitosan-squalane system.

- (a) water-squalane system
 (b) *O*-glutarylated chitosan-squalane system
 (c) *N*-AG-*O*-glutarylated chitosan-squalane system

ル内が疎水性環境であることがわかった。

3.7 *N*-AG-*O*-グルタリル化キトサンの乳化能

Fig. 9 に *N*-AG-*O*-グルタリル化キトサン 1 のスクアランに対する乳化結果を示す。

蒸留水を用いた場合はまったく濁っていないのに対し、*O*-グルタリル化キトサン水溶液を用いた場合は少し濁っている。そして、乳化されないスクアランは水面上に浮いている。一方、*N*-AG-*O*-グルタリル化キトサンを用いた場合は、非常に白濁していることから、十分に乳化されていることがわかった。24 時間放置後もこの状態に変化がなかったことから、*N*-AG-*O*-グルタリル化キトサン 1 の乳化能が高いことがわかった。最も AG 化率が低いものでさえも乳化能が高いことから、より AG 化率が高い *N*-AG-*O*-グルタリル化キトサン 2, 3, 4 の乳化能はさらに高いものと推測される。

4. 結 論

キトサンのヒドロキシル基に無水グルタル酸を、アミノ基にアルキルグリシジルエーテル (AG) をそれぞれ反応させることにより、両親媒性高分子である *N*-AG-*O*-グルタリル化キトサンの合成に成功した。得られたポリマーはピレンをプローブとする蛍光測定により求めた CMC から

はミセル形成能が高いこと、乳化実験の結果からは疎水性物質スクアランに対する乳化能が高いことがわかった。

謝 辞

キトサンを御供与頂いた(株)大日精化工業、化学修飾剤を御供与頂いた(株)ナガセテムテックスに厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) キチン, キトサン研究会編, キチン, キトサンの応用. (1990).
- 2) 清水慶昭, 田中優紀, 井上吉教, キチン, キトサン研究, **14**, 54-63 (2008).
- 3) F.M.Winnik, M.A.Winnik, and S.Tazuke, *J. Phys. Chem.*, **91**, 594 (1987).
- 4) J.Ngimhuang, J.Furukawa, T.Satoh, T.Furuike, and N.Sakairi, *Polymer*, **45**, 837-841 (2004).
- 5) 伊藤智博, 酒井康雄, 吉岡 寿, キチン, キトサン研究, **10**, 128-129 (2004).
- 6) O. E. Philippova, E. V. Volkov, N. L. Stinikova, and A.R. Khokhlov, *Biomacromolecules*, **2**, 483-490 (2001).
- 7) K. Kalyanasundaram and J. K. Thomas, *J. Am. Chem. Soc.* **99**:7, 2039-2044 (1977).



清水慶昭 (Yoshiaki SHIMIZU)

- 1966年 福井大学工学部繊維染科学科卒業
- 同年 福井大学工学部繊維工業施設 助手
- 同年 滋賀県立短期大学工業部工業化学科 助手
- 1973年 滋賀県立短期大学工業部工業化学科 講師
- 1978年 滋賀県立短期大学工業部工業化学科 助教授
- 1984年 工学博士 (大阪府立大学)
- 1995年 滋賀県立大学工学部材料科学科 助教授
- 2009年 同上 定年退官