

コアシェル型多分岐性高分子の分子放出挙動

本九町卓*・稲葉健**・小椎尾謙*・古川睦久**

Molecular Release Behavior of Core-shell Type Hyperbranched Polymer

by

Suguru MOTOKUCHO*, Takeshi INABA**, Ken KOJIO* and Mutsuhisa FURUKAWA**

Polyglycerol-polyethylene imine (PGL-PEI) was synthesized from glycidol and polyethylene imine (PEI) as a core-shell type hyperbranched polymer. PGL-PEI was characterized by ^1H , ^{13}C nuclear magnetic resonance (^1H , ^{13}C -NMR) spectroscopy, gel permeation chromatography (GPC). Using benzylcinamate (BC) as a guest molecule, release behavior of PGL-PEI was investigated by ultraviolet visible (UV-vis) spectroscopy. The ^{13}C -NMR spectrum is complicated and suggests a highly branched structure for the PGL-PEI. And GPC profile of PGL-PEI gave a unimodal profile. These results suggest that the PGL-PEI was successfully prepared by the monomer slow addition method. To confirm the PGL-PEI release behavior by UV-vis measurement, the PGL-PEI after loading BC was dissolved in water at the pH 10.01. For UV-vis spectra of B-band of BC decreased with pH decreasing. We demonstrated the PGL-PEI successfully shows release behavior.

Key words: hyperbranched polymer, stimuli-responsive polymer, capture-release behavior

1. 緒言

両親媒性のブロック共重合高分子は、溶液中で自己組織化により球状ミセル¹⁾、ベシクル²⁾、ロッド状ミセル³⁾など様々な構造を形成することが報告されている。これらの自己組織化体(高分子ミセル)は、ドラッグデリバリーシステム(DDS)の薬物キャリアーおよび遺伝子治療のベクターとしての応用や、塗料、接着剤などの工業材料および無機材料のナノ、メソスケールの構造体形成のテンプレートとしての利用が期待されており精力的に研究が進められている。高分子ミセルの形態のコントロールには、両親媒性共重合高分子の組成、高分子溶液の濃度、温度、溶媒の種類が強く影響を与える¹⁻⁴⁾。このため、近年多くの科学者が、種々の新しい両親媒性共重合高分子を精密な分子設計から合成し、その溶液中で高分子ミセルが形成する特殊なモルフロジーについて報告している⁵⁾。しかしながら、これらの両親媒性共重合高分子が形成する高分子ミセルは、溶液中で動的で

あるために、溶液を流体としたときに働く剪断応力および臨界ミセル濃度以下の高分子溶液あるいは、他の界面活性剤や塩が存在するとそのモルフロジーに大きな影響を受け高分子ミセルを安定に形成しない⁶⁾。そこで近年では、多分岐性高分子をコア、線状高分子をシェルに有する高分子一分子がミセル様の Fig. 1(a)に示す構造を形成するコア-シェル型マルチアーム高分子の合成が多数報告されている。コア-シェル型マルチアーム高分子は、コアとなる多分岐性高分子が共有結合からなるので、濃度によらずミセル様の形態をとりうる。このため、臨界ミセル濃度が存在しない。さらに他の界面活性剤が存在してもミセルの形態が変化しないという分子構造由来の特徴を示す⁷⁾。コア-シェル型マルチアーム高分子は、従来の線状高分子ではミセルを形成できない希薄条件下でもミセル様の構造を形成することから、これまで線状高分子による高分子ミセルを用いての DDS や無機材料創製のテンプレートのみならず、希釈高分子

平成19年06月22日受理

* 材料工学科 (Department of Materials Science and Engineering)

** 大学院生産科学研究科 (Graduate school of Science and Technology)

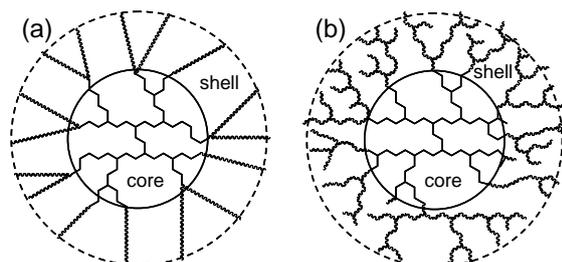


Fig. 1 Schematic illustration of core-shell multi-arm polymer (a) and core-shell hyper-branched polymer (b).

溶液を用いた抽出剤や高分子触媒としての応用が検討されている⁸⁾。

しかしながら、これらのコア-シェル型マルチアーム高分子は、シェルに当たる高分子鎖が線状高分子であるために、高濃度の高分子溶液では、分子間相互作用あるいは分子鎖絡み合いによって流動性のない物理架橋ゲルを形成する⁹⁾。このように濃度に依存せず安定に高分子ミセル様の形態を保持することは、現在までに提案された手法では困難である。そこで、Fig. 1 (b)に示す分子鎖絡み合いのない分岐性高分子をコア、シェルともに有するコア-シェル型多分岐性高分子を合成すれば、濃度に依存せずミセル様の構造を安定に形成することが予想される。

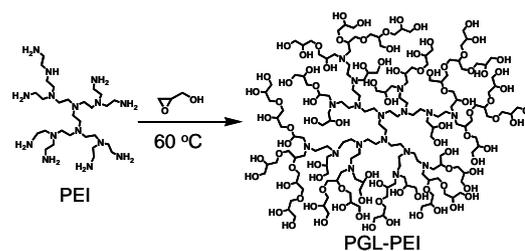
しかしながら、これまでの多分岐性高分子は、逐次重合および連鎖移動反応によって合成される¹⁰⁾。このために、同一分子内のコアとシェルにそれぞれ組成の異なる成分を有する多分岐性高分子の合成は、これまでに報告が成されていない。

本論文ではコアに多分岐性ポリアミンのポリエチレンジアミン(PEI)、シェルに多分岐性ポリエーテルであるポリグリセロール(PGL)を有するコア-シェル型多分岐性高分子(PGL-PEI)を合成した(Scheme 1)。また、このPGL-PEIの水溶液中における疎水性化合物の包摂と放出に関するpH応答挙動についても検討した。

2. 実験

2.1 原料

試薬はすべて和光純薬工業(株)製を用いた。メタノール、アセトニトリル、*N,N*-ジメチルホルムアミド(DMF)、pH 10.01 標準炭酸ナトリウム水溶液、(37w%)濃塩酸、ポリエチレンジアミン(PEI)、ベンジルシナメート(BC)は、精製を行わずそのまま用いた。グリシドールは、水素化カルシウム存在下で蒸留直後、反応に用いた。



Scheme 1 Schematic presentation of synthesis of PGL-PEI.

2.2 PGL-PEI の合成

PGL-PEI の反応スキームを Scheme 1 に示す。ガラス製の攪拌羽をつけたメカニカルスターラーを備えた 300 mL のセパラブルフラスコに PEI (2.0 g, 1.1 mmol) を加えた。その後、これを 60 °C に加熱し、滴下ろうとを用いてグリシドール(34.16 g, 470 mmol) を 2 時間かけて滴下した後、24 時間攪拌反応させた。¹H-NMR 測定により反応液中のグリシドールのシグナルが消失したことを確認した後、反応終了した。反応混合物をメタノール 100 mL に溶解し、その溶液を 600 mL のアセトニトリルに滴下して加え、反応物を得た。この粘稠物を減圧下で溶媒を留去することで粘稠な無色透明の生成物(34.1 g, 収率 94.3%)を得た。

2.3 測定

(1) ¹H, ¹³C 核磁気共鳴吸収スペクトル(¹H, ¹³C-NMR) 測定

0.03 g の試料を 0.8 mL の重水素化溶媒(DMSO-*d*₆, MeOH-*d*₄)に溶解させ測定に供した。測定には、超伝導多核種核磁気共鳴装置 JNM-GX400(日本電子(株)製)を用いた。

(2) ゲルパーミエーションクロマトグラフィー(GPC) 測定

PGL-PEI を 20 mg 秤量し、DMF を 5 ml 加え溶解した後、メンブランフィルターでろ過し、測定試料溶液を得た。測定条件を溶離液に DMF、カラムには Shodex GPC KD 803(分離範囲 400~70000) Da、Shodex GPC KD 805(分離範囲 5000~5000000) Da、カラム温度 40 °C、検出器を示差屈折率計とした。

(3) 紫外可視吸収(UV-vis)スペクトル測定

PGL-PEI のゲスト分子の可溶性および放出挙動が溶媒の pH に対して応答することを検討するために UV-vis スペクトル測定を行った。ゲスト分子には、疎水性の化合物である BC を用いた。

BC を PGL-PEI へ可溶性させることを目的として PGL-PEI (50 mg) と BC (4 mg) を両化合物が溶解するメ

タノールに加え攪拌し BC を PGL-PEI の分子内部へ可溶化させた。その溶液を減圧下で濃縮し、メタノールを十分に留去した。その後、得られた混合物に pH=10.01 (25 °C)の炭酸塩 pH 標準液 (50 ml)を加え 6 時間攪拌し PGL-PEI と BC の水溶液の調製を行った。調整した 30 mL の PGL-PEI 溶液に 1 μ L の濃塩酸を加えて pH の調整を行なった。また、すべての溶液は、UV-vis 測定前にメンブランフィルターでろ過した。

UV-vis 測定は、分光光度計 V-560(日本分光製)を用いた。測定条件を、バンド幅 0.5 nm、走査速度 200 nm/min、測定波長領域は 200~600 nm とした。

3. 結果と考察

3.1 PGL-PEI の構造同定

Fig. 2 に、PEI および PGL-PEI の ^{13}C -NMR スペクトルを示す。PGL-PEI のスペクトルには、53.0~54.0 ppm に第三級アミンに隣接する炭素に由来するブロードなシグナル(A₃)が観測された。原料である PEI が有する第一級アミン、第二級アミンに隣接する炭素に由来するシグナル(それぞれ (A₁) 47.5 および(A₂) 49.5 ppm のシグナル)は、観測されなかった。このことは、PEI が有する第一級アミン、第二級アミンが、グリシドールとの付加反応により第三級アミンとなったことを示している。一方、オキシラン類の開環重合体は、1,3 付加構造を繰り返す直鎖状の重合体であるがグリシドールの開環重合体(PGL)は、水酸基を有するために連鎖移動反応などの副反応が起こり Fig. 3 に示す直鎖状の 1,3 および 1,4 付加構造、1,3 付加と 1,4 付加の両方が起こった分岐した構造および末端水酸基を有する。Fig. 2 の PGL-PEI の ^{13}C -NMR のスペクトルは、ポリグリシドールについて報告した既報¹¹⁾とよく一致するスペクトルを示し、64.0 および 71.5 ppm に PGL の末端水酸基に隣接する炭素 (T_{CH₂OH} および T_{CHOH, CH₂}) に由来するシグナルが観測された。この他に、71.5 および 79.0 ppm にそれぞれ

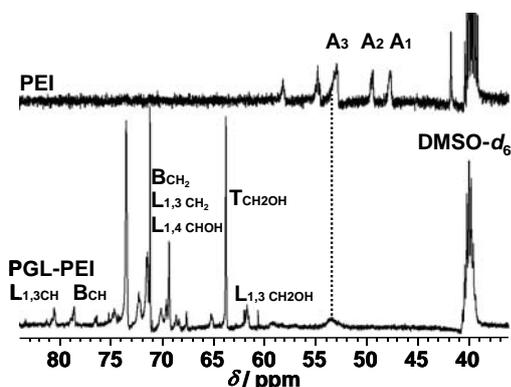


Fig. 2 ^{13}C -NMR spectra of PEI and PGL-PEI (in DMSO-*d*₆).

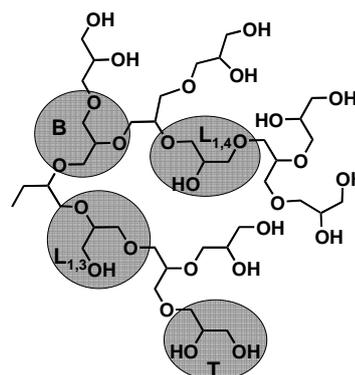


Fig. 3 Schematic architecture of polyglycerol. Examples of terminal (T), branched (B), linear 1,3 (L_{1,3}), linear 1,4 (L_{1,4}), are shaded.

分岐した PGL のメチレン炭素(B_{CH₂})およびメチン炭素(B_{CH}) に由来するシグナルが、62.0, 70.5, 73.5 ppm および 69.5, 80.5 ppm に直鎖状の PGL のメチレン炭素(L_{1,3} CH₂OH、L_{1,3} CH₂、L_{1,4} CH₂)およびメチン炭素(L_{1,4} CHOH、L_{1,3} CH) に由来するシグナルが観測された。このことより PGL-PEI は、グリシドールの 1,3 および 1,4 付加構造をからなる複雑な分子骨格を有する多量体であることが分かる。

Fig. 4 に、PGL-PEI の ^1H -NMR スペクトルを示す。2.4~2.8 ppm に PEI のメチレンのプロトンに由来するブロードなシグナルが、3.4~4.0 ppm に PGL の末端水酸基に隣接するメチレンのプロトン、PGL のエーテル基に隣接するメチレンプロトン、メチンおよび末端水酸基のプロトンに由来するブロードなシグナルがそれぞれ観測され PGL は、不規則な分子構造を有することが明らかとなった。このことは、 ^{13}C -NMR スペクトルにおいて PGL-PEI の構造中に PGL の分岐構造を有することと一致する。PEI と PGL のそれぞれの 1 モノマーユニットが有するプロトンに由来するシグナルの積分値の比は、4:5 である。Fig. 4 に示す積分値より算出された PEI

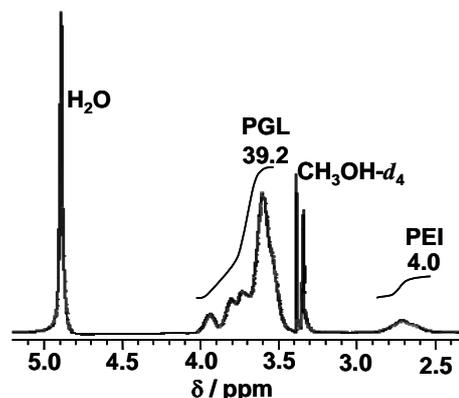


Fig. 4 ^1H -NMR spectrum of PGL-PEI (in CH₃OH-*d*₄).

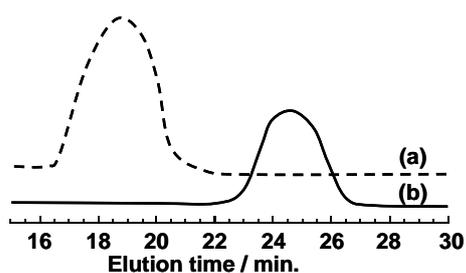


Fig. 5 GPC profiles of PEI (a) and PGL-PEI (b).
(a) $M_n=600$, $M_w/M_n=1.21$, (b) $M_n=14700$,
 $M_w/M_n=1.24$.

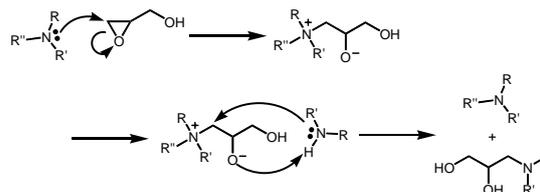
と PGL の比は、約 4:39 であった。このことより PGL-PEI は、平均で PEI に対して 8 倍の PGL を有することが明らかとなった。

Fig. 5 に、PEI および PGL-PEI の GPC 曲線を示す。ポリスチレン換算で GPC 曲線より算出した PEI および PGL-PEI の数平均分子量(M_n)は、それぞれ 600 および 14700、分子量分布(M_w/M_n)は、1.21 および 1.24 であり、PGL-PEI は、PEI に比べて高分子量であることが確認された。また、PGL-PEI の溶出曲線は、単峰性を示し、原料である PEI とは、完全に独立していることから、PGL-PEI 中に原料である PEI は、存在しないことが確認された。PGL-PEI の溶出曲線が単峰性を示したことおよび PGL-PEI の ^{13}C -NMR スペクトルにおいて第一級アミン、第二級アミンに隣接する炭素に由来するシグナルが確認されなかったことから目的とする PGL-PEI のみが得られ、グリシドールの単独重合体(PGL)を含まないことを明らかとした。

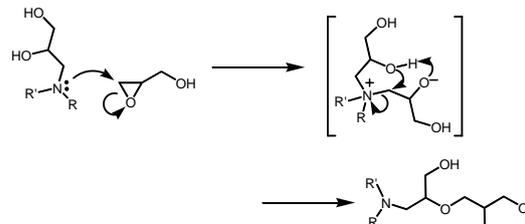
3.2 反応機構

Scheme 2 に PEI を用いた PGL の重合機構を示す。開始反応は、第三級アミンがルイス塩基としてグリシドールを活性化し、zwitterion(ツィッターイオン)を生成する。このツィッターイオンへ求核性の高い PEI の第一級アミンおよび第二級アミンが求核攻撃し、開環付加物を生成し、第三級アミンを再生する。この開始反応により、PEI のアミノ基はすべて第三級アミンとなる(initiation reaction)¹²⁾。PEI の有するアミノ基がすべて第三級アミンとなった後に滴下によってさらに加えられた余剰のグリシドールは、第三級アミンによって活性化され、ツィッターイオンを生成する。発生したツィッターイオンの周辺には、グリシドールの開環付加反応によって生成した水酸基が存在するので、これがツィッターイオンのアンモニウム基の隣の炭素へ求核攻撃することで、ポリグリシドールユニットは生長する(propagation reaction)。この生長反応を繰り返すことでグリシドールは、開環重合体を与える。このとき、グリシドールを活性化する第

Initiation reaction



Propagation reaction



Scheme 2. Polymerization mechanism of glycidol initiated by PEI.

三級アミンは、PGL-PEI の分子のコア部に存在し、そのシェル部をポリグリシドールユニットが覆うことになるので、ポリグリシドールの生長反応は、分子内反応で起こる。このためポリグリシドールの単独重合体は生成せず、コアシェル型多分岐性高分子 PGL-PEI が生成する。

3.3 PGL-PEI のゲスト分子の包摂と pH 変化に伴う放出挙動

PGL-PEI は、多分岐性ポリアミンである PEI をコア、多分岐性ポリエーテルである PGL をシェルとするコア-シェル型多分岐性高分子である。ポリアミンである PEI は、塩基性の水溶液中では疎水性で、酸性の水溶液中では親水性である。一方 PGL は、pH に依存せず水に溶ける親水性高分子である。PGL-PEI は、塩基性の水溶液中でコアの PEI 部が疎水性を示すミセル様の構造を形成するので、疎水性化合物を可溶化し、水溶液の pH が低くなると PEI は、親水性となって可溶化した疎水性化合物を放出すると考えられる。このことを紫外可視分光法によって評価するために塩基性の水溶液中で PGL-PEI に疎水性化合物であるベンジルシナメート(BC)を可溶化させた。この水溶液の pH を低くしたときの BC の吸光度の変化から PGL-PEI の疎水性分子の放出挙動について検討した。

Fig. 6 に、水と PGL-PEI 水溶液の BC 飽和溶液の紫外可視吸収(UV-vis)スペクトルを示す。E-吸収帯および B-吸収帯がそれぞれ 200 nm および 280 nm に観測された。PGL-PEI 水溶液を用いた場合の方が水のみを用いた場合より BC の吸光度が上昇した。このことは、水溶液中で PGL-PEI が、疎水性の BC を可溶化することを示し

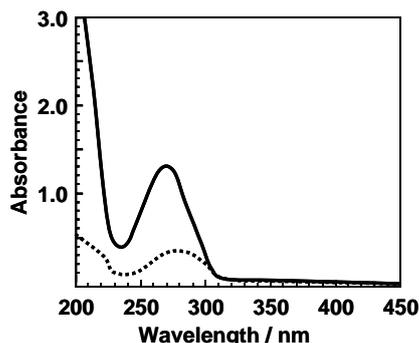


Fig. 6 UV-vis spectra of saturated benzylcinnamate aqueous solution in the presence of PGL-PEI (solid line) and in the absence of PGL-PEI (dashed line).

ている。

Fig. 7 に、PGL-PEI 水溶液の pH 変化に伴う BC の吸光度($\lambda_{\max} = 280 \text{ nm}$)の変化を示す。塩基性条件下において PGL-PEI は、コア部である PEI が疎水性であるためミセル様の形態をとる。このとき BC が共存すれば PGL-PEI は、コア部に BC を取り込むことを明らかとした。一方、酸性条件下において PEI は、プロトン化され親水性を示すので PGL-PEI は、BC を放出すると予想される。Fig. 7 より塩基性から酸性条件下に変化するに従い PGL-PEI 水溶液中の BC の吸光度は減少した。このことから塩基性から酸性の pH 変化に伴って PGL-PEI は、疎水性低分子化合物の放出挙動を示すことを明らかとした。

4. 結論

コア-シェルともに多分岐性高分子からなるコア-シェル型多分岐性高分子である PGL-PEI の合成に成功した。PGL-PEI を合成するための PEI とグリシドールの反応は、グリシドールの単独重合体を副生せず、目的の PGL-PEI のみを生成した。このことは、PEI がグリシドールを活性化することで分子内生長反応を誘起するためであると考えられる。また、得られた PGL-PEI は、

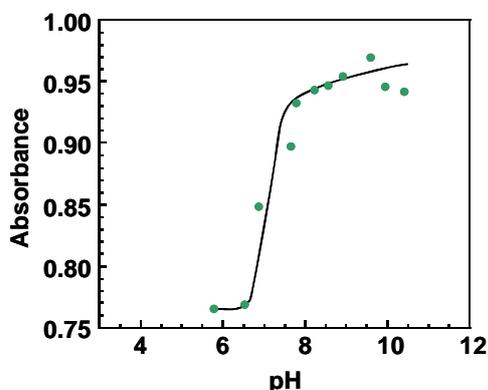


Fig. 7 Plots of B-band ($\lambda_{\max}=280 \text{ nm}$) absorption for the benzylcinnamate as a function of pH.

水溶液中で疎水性化合物(ゲスト分子)を包摂することを明らかとした。水溶液の pH を塩基性から酸性へと変化させることで、この PGL-PEI は、ゲスト分子を放出することを明らかとした。

参考文献

- 1) Croy, S. R.; Kwon, G. S.: *Current Pharmaceutical Design* Vol. 12(36), pp. 4669-4684, 2006.
- 2) Yoshida, T., Doi, M., Kanaoka, S., Aoshima, S.: *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* 43, pp. 5704-5709, 2005.
- 3) Kimberly L. M., Hanadi, S.: *Macromolecules* 40, pp. 3733-3738, 2007.
- 4) Bhargava, P., Tu, Y., Zheng, J. X., Xiong, H., Quirk, R. P., Cheng, S. Z. D.: *J. Am. Chem. Soc.* 129, pp. 1113-1121, 2007.
- 5) (a) Chou, S.-H., Tsao, H.-K., Sheng, Y.-J.: *Journal of Chemical Physics* Vol. 125, 194903/1-194903/6, 2006. (b) Bhargava, P., Tu, Y., Zheng, J. X., Xiong, H., Quirk, R. P., Cheng, S. Z. D.: *J. Am. Chem. Soc.* 129, pp. 1113-1121, 2007.
- 6) (a) Osaka, N., Okabe, S., Karino, T., Hirabaru, Y., Aoshima, S., Shibayama, M.: *Macromolecules* 39, pp. 5875-5884, 2006. (b) Mitsukami, Y., Hashidzume, A., Yusa, S., Morishima, Y., Lowe, A. B., McCormick C. L.: *Polymer*, 47, pp. 4333-4340, 2006.
- 7) (a) Adeli, M., Haag, R.: *J. Polym. Sci.: Part A: Polym. Chem.* Vol. 44, pp. 5740-5749, 2006. (b) Xiaoying, S., Xiaohui, Y., Yunhang, L., Xinling W.: *J. Polym. Sci.: Part A: Polym. Chem.* 42, pp. 2356-2364, 2004.
- 8) Terashima, T., Kamigaito, M., Baek, K.-Y., Ando, T., Sawamoto, M.: *J. Am. Soc. Chem.* 125(18), pp. 5288-5289, 2003.
- 9) (a) Berge, C. T., Fryd, M., Johnson, J. W., Moad, G., Rizzardo, E., Scopazzi, C., Thang, S. H.: WO 2000002939. (b) Connal, L. A., Gurr, P. A., Qiao, G. G., Solomon, D. H.: *Journal of Materials Chemistry* 15(12), pp. 1286-1292, 2005.
- 10) (a) Frechet, J. M. J., Henmi, M., Gitsov, I., Aoshima, S., Leduc, M. R., Grubbs, R. B.: *Science* 269, pp. 1080-1083, 1995. (b) Hawker, C. J., Frechet, J. M. J., Grubbs, R. B., Dao, J.: *J. Am. Chem. Soc.* 117, pp. 10763-10764, 1995.
- 11) Sunder, A.; Hanselmann, R.; Frey, H.; Mulhaupt, R.: *Macromolecules* 32, pp. 4240-4246, 1999.
- 12) Li, M, Ma, C., Chen, J., Lin, M.: *Chang, F.: Macromolecules* 29, pp. 499-506, 1996.