

# L-ロイシンセグメントとエチレングリコールセグメントを含む ABA 型 トリブロック・コポリマーの合成と水溶液の粘度に対する濃度の効果

中埜 達朗\* 田中 穰\*

## Synthesis of ABA Triblock Copolymer Containing L-leucine Segments and Ethylene Glycol Segments and Effect of Concentration on Viscosity of Solution

Tatsuro NAKANO\* and Yutaka TANAKA\*

(Received February 8, 2012)

In this research, the synthesis of ABA triblock copolymer(PLL-PEG) containing L-leucine segments and ethylene glycol segments, and the effect of concentration on viscosity of solution was investigated. In order to obtain the triblock copolymer, PLL-PEG was synthesized from L-leucine and polyethylene glycol. The details of FT-IR and <sup>1</sup>H-NMR spectra were clarified for syntheses. PLL-PEG has critical chain length. With the increase in repeating number of L-leucine segments, the melting temperature measured by DSC is lowered. PLL-PEG solution shows critical concentration *c\** which characterise the plot of viscosity and concentration.

**Key Words :** Tri-block Copolymer, L-leucine, Poly(ethylene glycol), Viscosity

### 1. 緒言

この研究では、ABA 型のトリブロックコポリマー (A が L-ロイシンセグメント, B がエチレングリコールセグメント) を合成し、水溶液の粘度、ゲル形成、プロパノール添加による増粘効果を調べた<sup>[1],[2]</sup>。トリブロックコポリマー合成のために①L-ロイシンからロイシン NCA(n-カルボン酸無水物)の合成, ②ポリエチレングリコール(PEG-OH)からアミノ化ポリエチレングリコール(PEG-NH<sub>2</sub>)の合成, ③ロイシン NCA とアミノ化 PEG からポリ-Lロイシン-ポリエチレングリコール(PLL-PEG)の合成, の 3 つの実験段階を経ている。それぞれの生成物の同定を行い、FT-IR, <sup>1</sup>H-NMR スペクトルの詳細を明確にした。

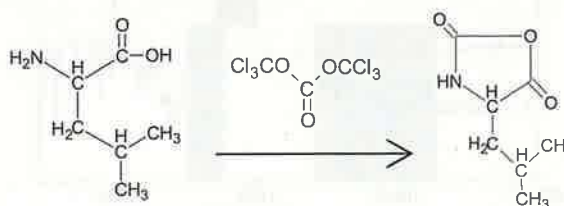
PLL-PEG 水溶液の還元粘度は、PLL-PEG の濃度を増加するとある濃度(*c\**)で急激に変化する。*c\**以上の濃度では PLL-PEG 鎖の数に加えて L-ロイシンセグメント同士の分子間架橋も影響する。この影響を粘度測定によって調べた。

また、PLL-PEG 水溶液の溶媒に 2-プロパノール (PrOH) を添加することで、還元粘度を変化させることが期待できる。何故ならば、PLL-PEG の側鎖の L-ロイシンセグメントはイソプロピル基を持っているため PrOH と構造が似ていることと、PrOH は水に溶解するためである。このことから、PLL-PEG 水溶液に PrOH を添加したサンプルについても実験を行った。

### 2. 実験

#### 2.1 ロイシン NCA の合成

L-ロイシンとトリホスゲンからロイシン NCA を合成した (Scheme 1)。ロイシン NCA は水と反応すると分解して L-ロイシンに戻るため、溶媒はすべて脱水したものを使用した。



Scheme 1 Reaction for leucine NCA.

\* 材料開発工学専攻

\* Materials Science and Engineering Course, Graduate School of Engineering

### <合成>

ベーキングを行った三ツ口フラスコに L-ロイシンとトリホスゲンを加えた。ここに THF を加えて、窒素を吹き込みつつ 50°C で 1 時間攪拌して反応した。

### <精製>

L-ロイシンは THF に溶けず、ロイシン NCA は溶解する。このことでロイシン NCA が合成できたことを確認し、ロータリーエバポレーターを使用して THF を留去した。ある程度 THF が留去できたら、ヘキサンを加えてロイシン NCA を再沈殿した。未反応の L-ロイシンとトリホスゲンを取り除くために、再沈殿したロイシン NCA を THF で溶解し再沈殿した。ロイシン NCA の純度を上げるために、この手順を 3 回繰り返した。

### <乾燥>

ベンゼンを加えて試料を凍結した。凍結乾燥を行ってベンゼンを昇華し粉末状のロイシン NCA を得た。

## 2.2 ロイシン NCA の同定

合成したロイシン NCA の FT-IR 測定と  $^1\text{H-NMR}$  測定を行った。L-ロイシンは  $\text{CDCl}_3$  に不溶だが  $\text{D}_2\text{O}$  に溶解し、ロイシン NCA は  $\text{CDCl}_3$  に溶解する。

### <FT-IR 測定の結果>

Fig.1 から分かる様に L-ロイシンの IR スペクトルでは、 $3300\text{--}2400\text{cm}^{-1}$  付近の O-H 伸縮振動(カルボン酸)による幅の広いピークと、 $1580\text{ cm}^{-1}$  付近の C-O 伸縮振動(カルボン酸)によるピークが見られた。

ロイシン NCA の IR スペクトルでは、L-ロイシンの IR スペクトルでは見られなかった  $3310\text{ cm}^{-1}$  付近の N-H 伸縮振動(第二級アミン)によるピークと、 $1750\text{ cm}^{-1}$  と  $1820\text{ cm}^{-1}$  付近の C-O 伸縮振動(カルボン酸無水物)によるピークが見られた。

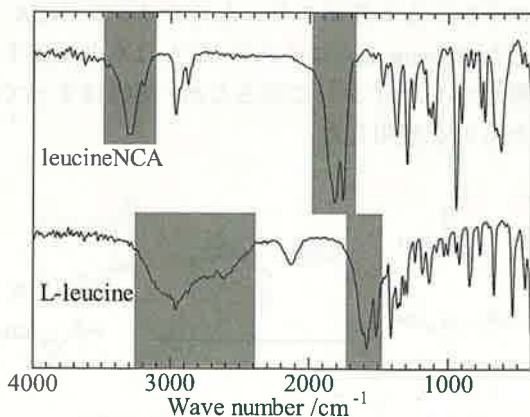


Fig. 1 IR spectra for leucineNCA and L-leucine.

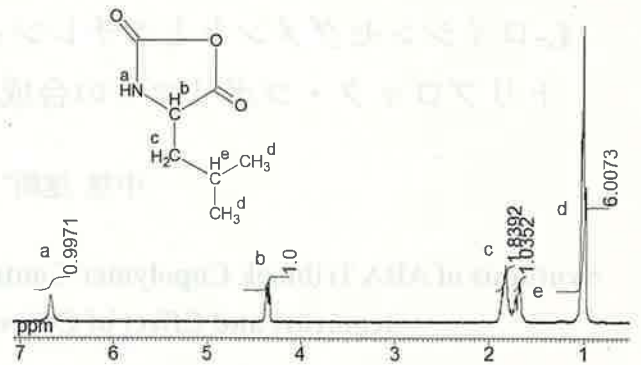


Fig. 2  $^1\text{H-NMR}$  spectrum for leucineNCA.

Table 1 Peak intensity in  $^1\text{H-NMR}$  spectrum for leucineNCA.

	Chemical shift(ppm)	Intensity(Cal. Val.)
$\text{H}^d$	0.978-1.02	6.00(6)
$\text{H}^e$	1.68	1.06(1)
$\text{H}^c$	1.82-1.84	1.87(2)
$\text{H}^b$	4.32-4.37	1.0(Ref.)
$\text{H}^a$	6.71	0.98(1)

### < $^1\text{H-NMR}$ 測定の結果>

ロイシン NCA の  $^1\text{H-NMR}$  測定の結果を Fig.2 と Table1 に示す<sup>[3]</sup>。ロイシン NCA の構造式は Fig.2 に示した。計算値と積分値はほぼ等しいことが分かる。

## 2.3 PEG-NH<sub>2</sub> の合成と同定

PEG-OH( $M_n=35k$ )から PEG-NH<sub>2</sub> を合成した。その過程を三段階に分けて次に示す<sup>[4]</sup>。

### 2.3.1 PEG-Ts の合成

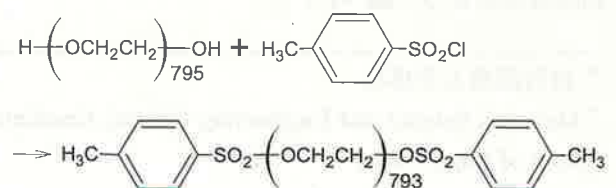
PEG-OH からトシル化ポリエチレングリコール(PEG-Ts)を合成した(Scheme 2)。

### <合成>

ピリジンで溶解した PEG-OH を、ベーキングした三ツ口フラスコに加えた。15°C で 10 分間放置後、ピリジンに溶解した p-トルエンスルホン酸クロライド(TsCl)を滴下した。滴下後、15°C で 12 時間攪拌した。

### <精製>

クロロホルムを加えてよく攪拌した。ここに HCl (1.0mol/L)を加えた後、分液漏斗を用いて水の相を除



Scheme 2 Reaction for PEG-Ts.

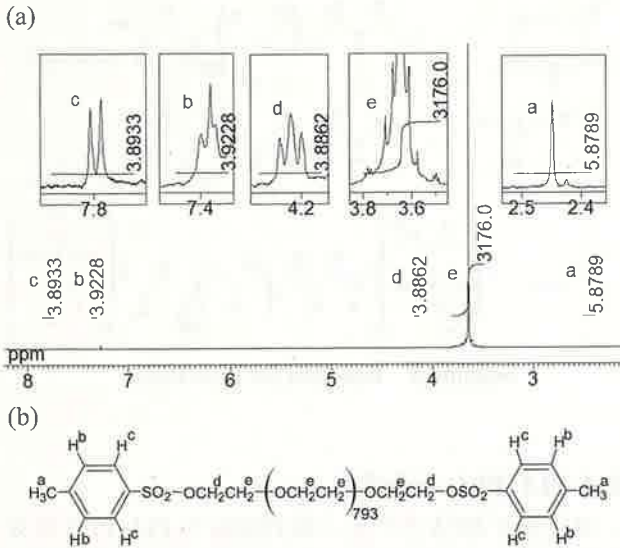


Fig. 3  $^1\text{H-NMR}$  spectrum(a) and chemical structure(b) for PEG-Ts.

Table 2 Peak intensity in  $^1\text{H-NMR}$  spectrum for PEG-Ts.

	Chemical shift(ppm)	Intensity(Cal. Val.)
$\text{H}^a$	2.45	5.88(6)
$\text{H}^c$	3.78-3.50	3176(Ref.)
$\text{H}^d$	4.17-4.15	3.89(4)
$\text{H}^b$	7.35-7.34	3.92(4)
$\text{H}^e$	7.81-7.79	3.89(4)

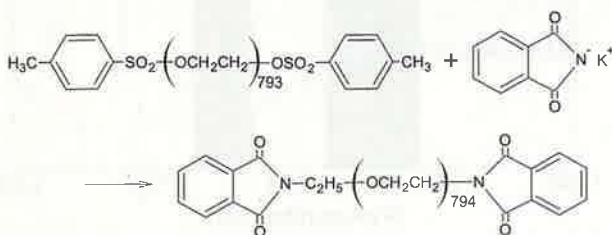
いた<sup>[5]</sup>. 次に 4%の  $\text{NaHCO}_3$  水溶液を加えた後、分液漏斗を用いて水の相を除いた。最後に 20%の  $\text{NaCl}$  水溶液を加えた後、分液漏斗を用いて水の相を除いた。一連の抽出でピリジンを取り除いた。

硫酸ナトリウムで脱水してろ過した。クロロホルムを留去し 20 倍量のヘキサンに沈殿させた。この再沈殿で未反応の  $\text{TsCl}$  を取り除いた。

ヘキサンを除き、ベンゼンに溶解して凍結乾燥を行った。得た PEG-Ts は FT-IR 測定、 $^1\text{H-NMR}$  測定、DSC 測定によって同定した。

### 2.3.2 PEG-Ts の同定

合成した PEG-Ts の DSC 測定を行い  $\text{TsCl}$  の吸熱ピーク ( $68.8^\circ\text{C}$ ) が出ていないことで単離を確認した。



Scheme 3 Reaction for PEG-Pi.

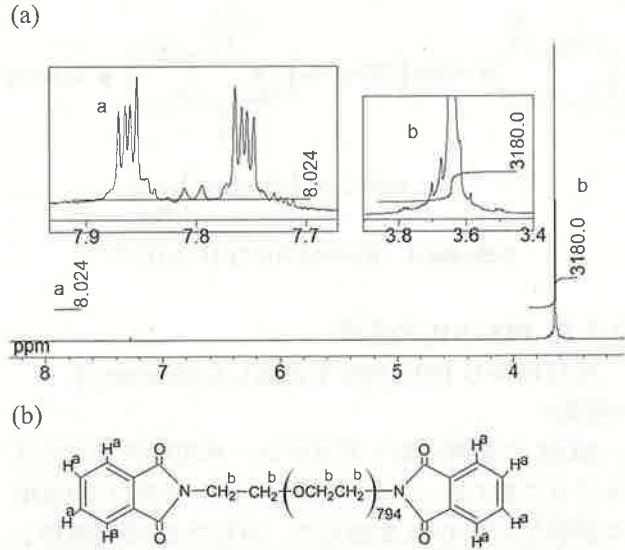


Fig. 4  $^1\text{H-NMR}$  spectrum(a) and chemical structure(b) for PEG-Pi.

Table 3 Peak intensity in  $^1\text{H-NMR}$  spectrum for PEG-Pi.

	Chemical shift(ppm)	Intensity(Cal. Val.)
$\text{H}^b$	3.78-3.51	3180(Ref.)
$\text{H}^a$	7.87-7.75	8.02(8)

### < $^1\text{H-NMR}$ 測定の結果>

PEG-Ts の  $^1\text{H-NMR}$  測定の結果を Fig.3 と Table2 に示す<sup>[6],[7]</sup>. 全てのピークが重ならずに見えた。エチレングリコールユニット内のプロトンを基準に積分値を決定した。

### 2.3.3 PEG-Pi の合成

PEG-Ts から PEG-Pi (フタルイミド化ポリエチレングリコール) を合成した (Scheme 3).

### <合成>

フタルイミドカリウム (PiK) を三ツ口フラスコに入れ、DMF に溶解した PEG-Ts を加えた。  $120^\circ\text{C}$  で 3 時間攪拌しながら懸濁した。

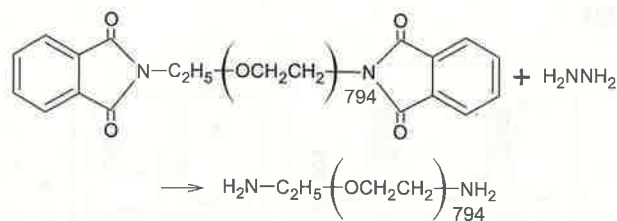
### <精製>

沈殿物をろ過し DMF を留去して、クロロホルムを加えた。ろ過した後、留去し 20 倍量のヘキサンに沈殿させた。この再沈殿で、未反応 PiK とトルエンスルホン酸カリウムを取り除いた。ヘキサンを除き、ベンゼンに溶解して凍結乾燥した。

### 2.3.4 PEG-Pi の同定

### < $^1\text{H-NMR}$ 測定の結果>

PEG-Pi の  $^1\text{H-NMR}$  測定の結果を Fig.4 と Table3 に示す。PEG-Ts の  $^1\text{H-NMR}$  スペクトルでは  $\text{H}^d$  と  $\text{H}^e$  に分けたが、PEG-Pi ではトシル基がフタルイミドに置換されたことによって  $\text{H}^b$  とした。

Scheme 4 Reaction for PEG-NH<sub>2</sub> [8].

### 2.3.5 PEG-NH<sub>2</sub> の合成

PEG-Pi から PEG-NH<sub>2</sub> を合成した(Scheme 4).

<合成>

EtOH に溶解したヒドラジン-水和物を三ツロフラスコに加えた。ここに、滴下ロートを用いて EtOH に溶解した PEG-Pi を加えた。80°C で 24 時間攪拌しながら還流した<sup>[9]</sup>。

<精製>

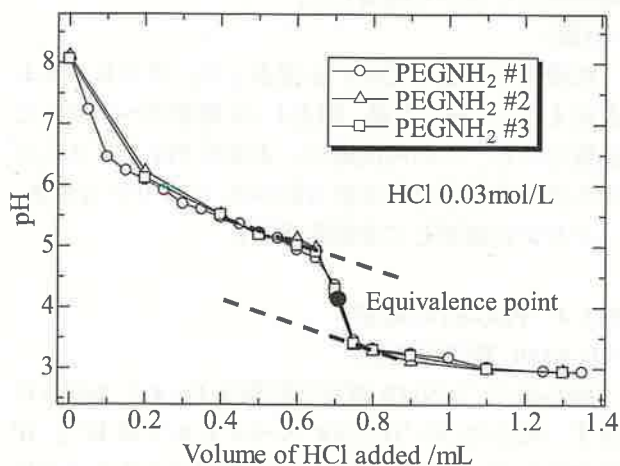
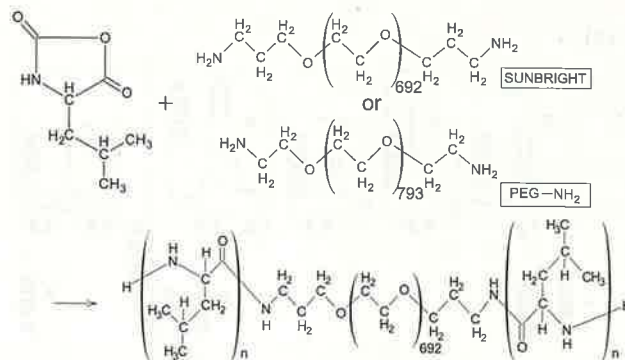
EtOH を留去して、クロロホルムを加えた。吸引ろ過してから留去し 20 倍量のヘキサンに沈殿した。この再沈殿で 1,4-ジケトフタラジンを除いた。

沈殿物を蒸留水に溶解し、48 時間透析した。ここで低分子の残渣をすべて取り除いた。水を留去して、ベンゼン・ジオキサン(体積比 7:3)混合溶媒を加え、凍結乾燥して粉末にした。得た PEG-NH<sub>2</sub> は FT-IR 測定, <sup>1</sup>H-NMR 測定, UV 測定, 中和滴定で同定した。

### 2.3.6 PEG-NH<sub>2</sub> の同定

<中和滴定の結果>

0.03mol/L の HCl を用いて、合成した PEG-NH<sub>2</sub> の両末端アミン基の数(活性化率)を求めた。中和滴定の結果を Fig.5 に示す。この研究で合成した PEG-NH<sub>2</sub> の活性化率は 85~90%であった。参考値として、市販品のアミノ化 PEG(日油株式会社、品名 SUNBRIGHT DE-300PA)の活性化率は 80%である。

Fig. 5 Titration curves for PEG-NH<sub>2</sub>.

Scheme 5 Reaction for PLL-PEG.

### 2.4 PLL-PEG の合成

ロイシン NCA とアミノ化 PEG から PLL-PEG を合成した(Scheme 5)。PLL-PEG\$1\sim 4\$ は SUNBRIGHT DE-300PA を使用し、PLL-PEG\$5, 6\$ は PEG-NH<sub>2</sub> を使用した。

<合成>

DMF に溶解したロイシン NCA と DMF に溶解したアミノ化 PEG を 50°C で 18 時間攪拌して反応させた。

<精製>

DMF を留去して、ヘキサンに滴下して PLL-PEG を再沈殿した。ヘキサンを除き THF に溶解してろ過した。ろ液を留去してベンゼンを加え、凍結乾燥を行い PLL-PEG 粉末を得た。

### 2.5 PLL-PEG の同定

<FT-IR 測定の結果>

PLL-PEG の FT-IR スペクトルでは 1660cm<sup>-1</sup> 付近の C=O 伸縮振動(アミド基)によるピークと、1540cm<sup>-1</sup> 付近の N-H 変角振動(アミド基)によるピークが見られた。

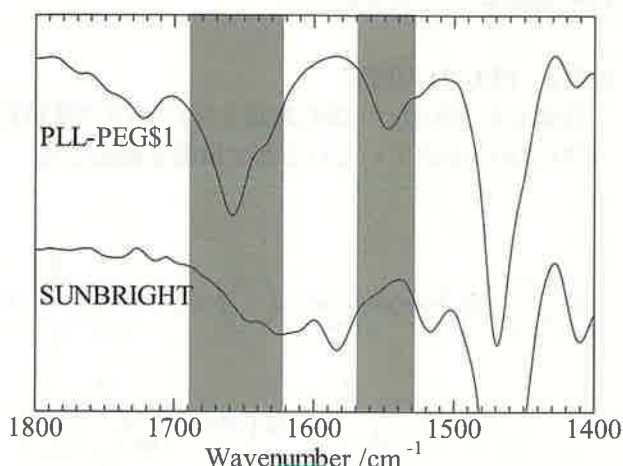


Fig. 6 IR spectra for PLL-PEG\$1 and SUNBRIGHT.

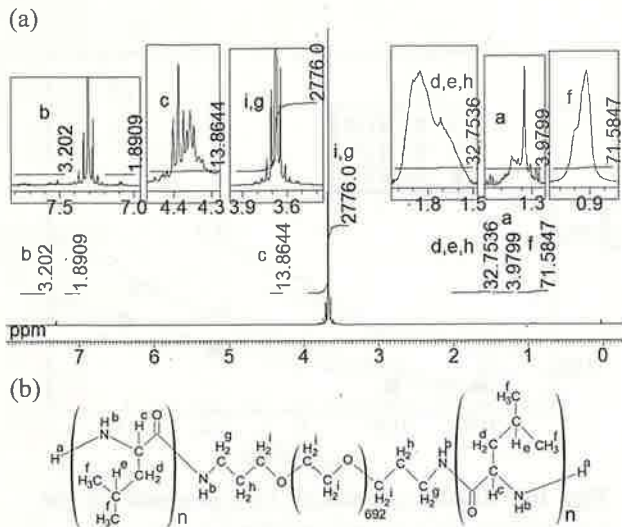


Fig. 7  $^1\text{H-NMR}$  spectrum(a) and chemical structure(b) for PLL-PEG\$1.

Table 4 Peak intensity in  $^1\text{H-NMR}$  spectrum for PLL-PEG\$1.

	Chemical shift (ppm)	Intensity (Cal. Val.)
$\text{H}^f$	0.93	71.58(120)
$\text{H}^a$	1.29-1.35	3.98(2)
$\text{H}^d, \text{H}^c, \text{H}^h$	1.72-1.86	32.75(64)
$\text{H}^e, \text{H}^i$	3.53-3.582	2776(Ref.)
$\text{H}^c$	4.36-4.40	13.86(20)
$\text{H}^b$	7.10-7.74	5.09(20)

### 3. PLL-PEG の物性

#### 3.1 側鎖の繰り返し数の決定

PLL-PEG の  $^1\text{H-NMR}$  測定の結果を Fig.7 と Table4 に示す。また、側鎖の L-ロイシンセグメントの繰り返し数を  $n$  とした。 $n$  は、 $\text{H}^d$  と  $\text{H}^e$  の積分値から  $4(\text{H}^d$  の数) を引き  $6(\text{L-ロイシンユニットの } \text{H}^d \text{ と } \text{H}^e \text{ の数})$  で割った値、 $\text{H}^e$  を  $2(\text{L-ロイシンユニットの } \text{H}^e \text{ の数})$  で割った値、 $\text{H}^f$  を  $12(\text{L-ロイシンユニットの } \text{H}^f \text{ の数})$  で割った値の平均値とした。Table4 の計算値は仕込み値の値から求めたプロトンの数を示す。

Table 5 Repeating number,  $n$  for PLL-PEG\$1-\$6 calculated with the peak intensity in  $^1\text{H-NMR}$  spectrum.

\$ //Amino-PEG	Feed	$n$
1 //SUNBRIGHT	10	5.90
2 //SUNBRIGHT	10	6.84
3 //SUNBRIGHT	10	7.64
4 //SUNBRIGHT	10	8.44
5 // PEG-NH <sub>2</sub>	2	2.07
6 // PEG-NH <sub>2</sub>	10	7.94

Table 6 Solution properties for PLL-PEG\$1-\$6.

\$	Soluble	Tranparency	Gelation
1	○	Trans.	Gel
2	○	Trans.	Sol
3	○	Opaque.	Sol
4	×	Opaque.	Sol
5	○	Trans.	Sol
6	×	Opaque.	Sol

合成時に PLL-PEG の側鎖の繰り返し数を任意に定めて、種々の繰り返し数を持つ PLL-PEG を合成した。PLL-PEG 合成の仕込み値と  $n$  を Table5 に示す。

#### 3.2 側鎖の繰り返し数が水溶液に与える影響

合成した PLL-PEG を脱気した蒸留水に溶解し、水溶液の特徴を観察した。L-ロイシンセグメントの繰り返し数が異なると、PLL-PEG 水溶液の溶解性、透明度、ゲル形成、という物性が異なった。この結果を Table6 に示す。物性の変化が小さな範囲で起こったため、PLL-PEG は臨界鎖長を持つと考えた。

#### 3.3 融点降下

PEG-OH, PLL-PEG\$5, \$6 について昇温 DSC 測定した結果を Fig.8 に示した(昇温速度=3°C/min)。Fig.8 から分かる様に、L-ロイシンセグメントの繰り返し数が増えると、融解ピークが低温側に移動する。また、ポリ L-ロイシン単体について DSC 測定を行ったが、20°Cから 250°Cに融解ピークは無かった。この結果から L-ロイシンセグメントが PEG の融点降下を起こすと考えた<sup>[10]</sup>。

#### 3.4 粘度測定

水槽の温度を 25°Cに保ち、ウベローデ粘度計を用

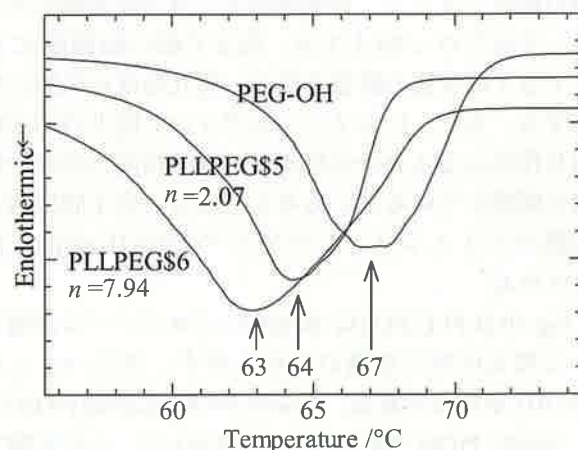


Fig. 8 Heating DSC curves for PEG-OH,PLLREG\$5,\$6. Melting temperatures are indicated by arrows in the figure.

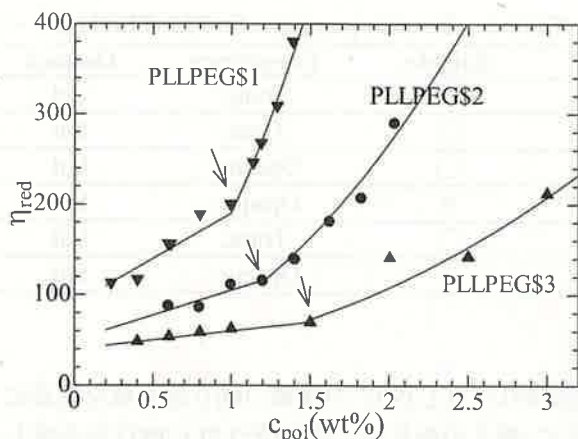


Fig. 9 Reduced viscosity for aqueous solutions of PLL-PEG\$1-\$3. Arrows in the figure indicate  $c^*$ .

いて落下時間  $t(\text{sec})$  を測定した。

$t$  から還元粘度  $\eta_{red}$  を計算した。  $\eta_{red}$  は、

$$\eta_{red} = (t - t_0) / t_0 \cdot c \quad \dots (1)$$

から計算した。  $t_0$  は溶媒の落下時間、  $c$  は水溶液の濃度を示す。

### 3.5 粘度測定結果

Fig.9 は、(1)式を使用して求めた PLL-PEG\$1, 2, 3 水溶液の還元粘度の挙動を示す。側鎖のポリ L-ロイシンセグメントの  $n$  によって還元粘度の挙動が変化する。矢印は還元粘度が急激に変化する濃度  $c^*$  を指す<sup>[11]</sup>。

$c^*$ 未満では還元粘度は濃度に比例しており直線で表される。このことから、還元粘度は水溶液中の高分子鎖の数(濃度)に依存していて、PLL-PEG は水溶液中では互いに影響せずに孤立している。

$c^*$ 以上、即ち準希薄溶液では、還元粘度が急激に増加する。PLL-PEG 水溶液中では高分子鎖の数が増加して、高分子鎖同士が接近し始める。この高分子鎖の接近によって、官能基同士で分子間架橋を生じる。そのため  $c^*$ 以上では、高分子鎖の数(濃度)に加えて分子間架橋の影響を受け、還元粘度が急激に増加する。また、L-ロイシンセグメント同士の疎水性相互作用による会合の形成が、還元粘度の急激な増加に関係していることも考えられる。分子間架橋は側鎖のポリ L-ロイシンのアミド(-CONH-)の間で形成される。

Fig.10 は PLL-PEG\$2 水溶液のプロパノール添加による還元粘度の挙動の変化を示す。プロパノール(PrOH)-水混合溶媒は、10mol% PrOH 水溶液(PrOH10)と 5mol% PrOH 水溶液(PrOH5)を用いた。この実験では、粘度の増加という結果が得られたため、分子間架橋が増加したことが考えられる。

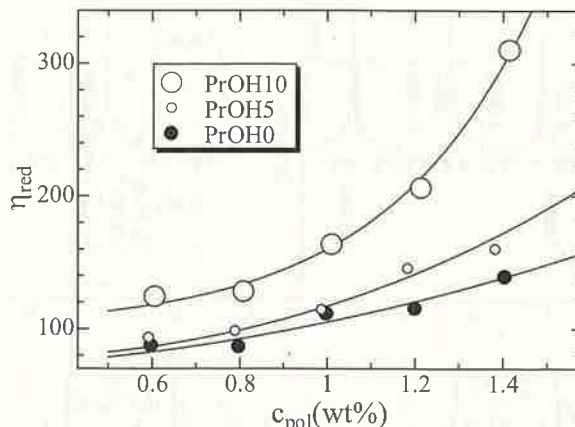


Fig. 10 Effects of addition of 2-propanol on the viscosity for aqueous PLL-PEG\$2 solution.

### 4. 参考文献

- [1] N. Sanabria-DeLong, S. K. Agrawal, S. R. Bhatia, G. N. Tew: *Macromolecules*, **39**, 1308 (2006)
- [2] K. A. Aamera, H. Sardinhab, S. R. Bhatiab, G. N. Tew: *Biomaterials*, **25**, 1087 (2004)
- [3] C. H. Len: *Radiat. Phys. Chem.*, **46**, 851 (1995)
- [4] M. Mutter: *Tetrahedron Letters*, **31**, 2839 (1978)
- [5] H. Tamiaki, K. Ogawa, K. Toma: 特開 2010-052764 [0065]
- [6] H. A. Klok, G. W. M. Vandermeulen, J. R. Hernandez: *Macromolecules*, **36**, 3673 (2003)
- [7] R. J. De Vos and E. J. Goethals: *Makromol. Chem. Rapid Commun*, **6**, 53 (1985)
- [8] M. N. Khan: *J. Org. Cem.*, **60**, 4536 (1995)
- [9] K. Matsuoka, T. Kohzu, T. Hakumura, T. Koyama, K. Hatano and D. Terunuma: *Tetrahedron Letters*, **50**, 2593 (2009)
- [10] E. Brown and M. G. Laborie: *Biomacromolecules*, **8**, 3074 (2007)
- [11] N. Cathebras, A. Collet, M. Viguiet and J. F. Berret: *Macromolecules*, **31**, 1305 (1998)

### 5. 結言

この研究では、PLL-PEG を合成するために FT-IR, <sup>1</sup>H-NMR スペクトルの詳細を明確にした。また、繰り返し数の決定と水溶液の特徴から、PLL-PEG が臨界鎖長を持っていることが分かった。粘度測定では、分子間架橋による水素結合と疎水性相互作用による PLL-PEG 水溶液の  $c^*$  と、アルコール添加による粘度の増加を示すことが出来た。