報 文

ポリアミノ基とカルボキシル基を有する熱応答性高分子の凝集特性

嶋田 武志*, 清水 得夫*, 上原 伸夫®*

Aggregation property of thermo-sensitive copolymers having polyamino groups and carboxyl groups

Takeshi SHIMADA, Tokuo SHIMIZU and Nobuo UEHARA*

*Department of Applied Chemistry, Faculty of Engineering, Utsunomiya University, 7-1-2, Yoto, Utsunomiya-shi, Tochigi 321-8585

(Received 15 May 2002, Accepted 3 July 2002)

Thermo-sensitive copolymers of poly(*N*-isopropylacrylamide) having polyamino groups and carboxyl groups were synthesized. The aggregation properties of the thermo-sensitive copolymers were investigated in terms of the solution parameters, such as pH and the concentration of heavy metal ion. The distribution of biomolecules between the aqueous phase and the polymer phase mediated by phase transition was also considered. The lower critical solution temperatures (LCST) of the thermo-sensitive copolymers increased with an increase of pH of the solution. The responses of the synthesized thermo-sensitive copolymers were superior to that of poly(*N*-isopropylacrylamide) having only pH-responsive carboxyl groups. The addition of heavy metal ions into a polymer solution increased the LCST of the solution. Although the thermo-sensitive copolymers reacted with Cu^{2+} ion to form a blue complex, they released Cu^{2+} ions from aggregates by a phase transition. Anionic compounds tended to be distributed to the polymer aggregates, in contrast with cationic compounds which were not distributed to the polymer phase.

Keywords: poly(*N*-isopropylacrylamide); thermo-sensitive; pH-sensitive; distribution of biomolecules; polyamino; carboxyl.

1 緒 言

熱応答性高分子は、溶液温度の変化に伴って親水性/疎水性の相転移を示す性質を持つ機能性高分子である^{1)~3)}。この相転移を示す温度は下限臨界溶液温度 (LCST) と呼ばれており、LCST より低温側で熱応答性高分子は水分子と水和した状態をとって親水性を示す。しかし、LCST 以上に溶液を加熱することで、水和していた水分子は高分子から脱離し、高分子は疎水性へと変化する。疎水性に変化した高分子は凝集相を形成する。このような性質を持つ熱応答性高分子として、ポリ(*N*-イソプロピルアクリルアミド) (PNIPAAm)⁴⁾ やポリ(ビニルメチルエーテル)⁵⁾⁶⁾ が知られている。齋藤らは熱応答性高分子を捕集媒体として利

用する均一固相抽出法を開発した^{4)7)~10)}。これは均一水溶液中の成分から形成した凝集相への分配現象に基づく抽出法であり、水溶液中の Fe-1,10-フェナントロリン錯体⁷⁾や金属-8-キノリノール錯体⁸⁾、疎水性有機化合物やリン脂質¹⁰⁾、リボ多糖¹⁰⁾などの捕集、分離に関する報告がなされている。また、PNIPAAm は捕集媒体としてだけでなく、HPLC 用充填剤としても研究されており^{11)~13)}、この充填剤は外部からの熱刺激により生体高分子などの保持を制御できる。

熱応答性高分子を重合する際に、種々の官能基を有するモノマーを共重合させることによって、熱応答性以外の新たな機能を付与することが可能である¹⁴⁾。例えば、2-メタクリロイルオキシエチルホスホン酸¹⁵⁾やヒドロキサム酸基¹⁶⁾を導入した PNIPAAm 共重合体を用いる重金属イオンの捕集が検討されている。Cu^{II}-1-ビニルイミダゾール錯体

* 宇都宮大学工学部応用化学科: 321-8585 栃木県宇都宮市陽東 7-1-2

を官能基とする PNIPAAm 共重合体はタンパク質の精製に用いられている^{17)~20)}。また、pH により熱応答性を制御するために、アクリル酸¹³⁾²¹⁾や 4 ビニルピリジン²²⁾を導入した PNIPAAm 共重合体が合成されている。pH により熱応答性を制御できる熱応答性高分子はドラッグデリバリーシステム (DDS)²³⁾ のための有用な媒体として注目されている。すなわち、温度と pH を DDS 媒体の制御因子とすることで、薬剤放出を的確にコントロールすることができる。しかし、カルボキシル基やピリジル基といった単一の官能基の導入では、pH により熱応答性の制御を的確に行うには十分ではない。

そこで本研究では、PNIPAAm の熱応答性に対する pH の制御をより行いやすくすることを目的として、ポリアミノ基とカルボキシル基とを併せ持つ熱応答性高分子を合成した。酸解離定数の異なる 2 種類の官能基の導入により、熱応答性を比較的広い pH 範囲で制御することが可能になる。また、同一高分子内でカルボキシル基の酸解離反応とポリアミノ基のプロトン付加反応が起こるため、分子全体としてはほぼ電荷が中和された状態をとりやすくなり、凝集性の低下を抑制できる。加えて、高分子に導入されたカルボキシル基やポリアミノ基には、重金属イオンとの反応性あるいはバイオアフィニティーの発現も期待できる。そこで、合成した PNIPAAm 共重合体と重金属イオンとの反応性及び生体関連物質の凝集相/水相間の分配挙動についても検討した。

2 実 験

2.1 装 置

透過率の測定には、日立製 U-2000A 型ダブルビーム分光光度計を使用した。pH の測定には、堀場製 F-13 型 pH メーターを使用した。Cu^{II} イオン濃度の測定には、日立製 Z-6100 型偏光ゼーマン原子吸光光度計を使用した。

2.2 試 薬

N-イソプロピルアクリルアミド (NIPAAm) は和光純薬製のものをヘキサンで再結晶して使用した。メタクリル酸 (MA)、トリエチレントトラミン (TETA)、ジエチレントリアミン (DETA)、エチレンジアミン (EDA) 及び α,α' -アゾビスイソブチロニトリル (AIBN) は、関東化学製を使用した。塩化アクリロイル (AC) は Acros Organics 製を使用した。3-メルカプトプロピオン酸 (3-MPA) は東京化成製を使用した。

子ウシ血清アルブミン (BSA) は Sigma 製を使用した。レシチン及びサケ精液から抽出したデオキシリボ核酸 (DNA) は、和光純薬製を使用した。リゾチームは生化学工業製を使用した。 $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -テトラフェニルボルフィンテトラスルホン酸二硫酸四水和物 (TPPS) 及び $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -テ

ラキス (4-N-メチルピリジル) ボルフィンテトラ (*p*-トルエンスルホン酸) (TMPyP) は、同仁化学製を使用した。銅クロロフィリンナトリウムは、関東化学製を使用した。クロロフィル a 及びクロロフィル b は、パセリから抽出したものをカラムクロマトグラフィーにより精製し、メタノール溶液として使用した。

$1.000 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ 重金属標準溶液は、それぞれの硝酸塩を水に溶解し、0.1 M 硝酸酸性となるように調製した。それぞれの溶液は EDTA を用いるキレート滴定によって標定した。

塩酸及び硝酸は関東化学製原子吸光分析用を、その他の試薬はすべて特級あるいは分析試薬級のものを使用した。水は蒸留-イオン交換水を、Millipore 製 Mill-Q 超純水製造システムで精製したものを使用した。

2.3 モノマー及び共重合体の合成

ポリアミン (TETA, DETA または EDA) 0.1 mol を含む 1,4-ジオキサン溶液 100 cm³ を冷却、かくはんしながら、AC 1.63 cm³ (0.01 mol) を溶解した 1,4-ジオキサン溶液 25 cm³ を徐々に滴下する。析出した白色沈殿を汙別し、これを少量のメタノールで溶解する。この溶液に水酸化カリウム 0.59 g (0.01 mol) を含むメタノール溶液 100 cm³ を加えかくはんする。析出した塩化カリウムを汙別し、汙液は直ちに以下に示す重合反応に用いた。

ポリアミンと AC との反応物を含むメタノール溶液を 500 cm³ 三つ口セパラブルフラスコに採り、NIPAAm 20.37 g (0.18 mol) と MA 0.86 g (0.01 mol) を加える。フラスコを 60℃ に加熱、かくはんしながら 3-MPA 0.5 cm³, AIBN 0.82 g (5×10^{-3} mol) を加えて、窒素雰囲気下で 4 時間ラジカル共重合を行う。ジエチルエーテルを用いる沈殿法を 2 回繰り返し、共重合体を精製する。その後、共重合体を水に溶解し、凍結乾燥する。

また、比較のために、ポリアミノ基を有する共重合体、及びカルボキシル基のみを有する共重合体も合成した。PNIPAAm 共重合体の構造を Fig. 1 に示す。以下、共重合体の表記には Fig. 1 に示した略号を用いる。

2.4 実験操作

2.4.1 PNIPAAm 共重合体の温度-透過率曲線 0.10 g cm⁻³ の共重合体を含む水溶液 50 cm³ をバイアル瓶に採り、水浴で加熱、かくはんしながら透過率の測定を行った。透過率の測定波長は共重合体の吸収を示さない 750 nm とした。但し、Cu^{II} イオンを含む水溶液の場合には、測定波長を 850 nm とした。共重合体の LCST は、溶液の透過率が 50% を示す温度とした。

2.4.2 凝集相への分配 Cu^{II} イオンの水相/凝集相間の分配は以下の手順により行った。 $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$

Fig. 1 Structure of poly(*N*-isopropylacrylamide-co-(acryloylpolyamine)-co-metacrylic acid)

Copolymers	Molar feed ratio			
	l	m	n	x
Poly(NIP-TETA-MA)	90	5	5	2
Poly(NIP-DETA-MA)	90	5	5	1
Poly(NIP-EDA-MA)	90	5	5	—
Poly(NIP-TETA)	90	10	—	2
Poly(NIP-DETA)	90	10	—	1
Poly(NIP-EDA)	90	10	—	—
Poly(NIP-MA)	90	—	10	—

の Cu^{II} イオンを含む 0.10 g cm^{-3} の poly(NIP-TETA-MA) 水溶液 50 cm^3 を遠心沈殿管に採り, 所定の pH に調整する. 60°C の水浴に 30 分間浸漬した後, 約 10 秒間激しく振り混ぜ, 再び水浴に 1 分間浸漬する. この上澄み液の Cu^{II} イオン濃度をフレイム原子吸光法により測定した.

生体関連物質として BSA, リゾチーム, DNA 及びレシチンを用い, その分配挙動の検討を以下の手順により行った. 0.10 g cm^{-3} の poly(NIP-polyamine-MA) 水溶液 50 cm^3 を遠心沈殿管に採り, 1.0 mg cm^{-3} となるように BSA, リゾチーム, DNA 又はレシチンを添加し, 塩酸を用いて pH 5.0 に調整する. 40°C の水浴に 30 分間浸漬した後, 約 10 秒間激しく振り混ぜ, 再び水浴に 1 分間浸漬する. この上澄み液に含まれる各物質の濃度を吸光光度法により測定した.

クロロフィル類縁体の分配挙動の検討は以下の手順で行った. 0.10 g cm^{-3} の poly(NIP-polyamine-MA) 水溶液 50 cm^3 を遠心沈殿管に採り, 銅クロロフィリンナトリウムでは濃度が $1.0 \times 10^{-6} \text{ g cm}^{-3}$ となるように, また TPPS 及び TMPyP では $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ となるようにそれぞれ添加した. また, クロロフィル a 及びクロロフィル b はメタノール溶液として適量加えた. これらのクロロフィル類縁体については最終溶液の吸光度が 0.4 ~ 1.0 となるように濃度を調整した. これらの溶液を塩酸で pH 5.0 に調整し, 吸収スペクトルを測定した. その後, 40°C の水浴に 30 分間浸漬した後, 約 10 秒間激しく振り混ぜ, 再び水浴に 1 分間浸漬する. この上澄み液を分取して吸収スペクトルの測定を行った.

Table 1 Data of elemental analysis of PNIPAAm copolymers

Copolymer		Elemental analysis, %			C/N ratio
		C	H	N	
poly(NIP-TETA-MA)	Calcd	62.55	9.72	13.27	4.71
	Found	59.46	9.97	12.32	4.83
poly(NIP-DETA-MA)	Calcd	62.68	9.68	12.91	4.86
	Found	60.30	9.89	12.37	4.88
poly(NIP-EDA-MA)	Calcd	62.81	9.64	12.53	5.01
	Found	59.71	9.80	12.14	4.92
poly(NIP-TETA)	Calcd	62.08	9.84	14.94	4.16
	Found	56.50	9.65	12.30	4.59
poly(NIP-DETA)	Calcd	62.32	9.77	14.30	4.36
	Found	57.51	9.79	12.21	4.71
poly(NIP-EDA)	Calcd	62.59	9.70	13.61	4.60
	Found	57.98	10.01	12.62	4.59
poly(NIP-MA)	Calcd	63.07	9.58	11.42	5.52
	Found	60.45	10.30	10.50	5.76

3 結果と考察

3.1 PNIPAAm 共重合体の合成と同定

ポリアミノ基とカルボキシル基とを有する熱応答性高分子を合成するために, まずビニル基を有するポリアミンを合成した. 大過剰のポリアミンと塩化アクリロイル (AC) とを反応させることにより, ポリアミンへの複数の AC の導入を抑えることができた. この際, 反応生成物が重合してしまうことを避けるために, 得られたメタノール溶液を精製せずに次の重合に用いた.

合成した PNIPAAm 共重合体の元素分析を行った結果を Table 1 に示す. モノマーの仕込み比より算出した C, H, N の計算値と実測値とを直接比較しても明確な相関関係は見られなかった. $^1\text{H-NMR}$ スペクトルの解析結果より水分子のピークが確認されたことから, 計算値と実測値のずれは共重合体に取り込まれている水分に起因するものと考えられる. 残存する水分の影響を差し引くため, 炭素含有率と窒素含有率の比 (C/N 値) を算出した (Table 1). いずれの共重合体においても, 実測値から算出した C/N 値と仕込み比から算出した C/N 値とは近い値を示したが, 完全には一致しなかった. これは共重合時のモノマーの反応性が互いに若干異なることによる.

pH 滴定でカルボキシル基の含有量を定量できた poly(NIP-MA) に着目すると, その C/N 値には計算値と実測値との間に 4% の差がある. 一方, pH 滴定の結果から決定した poly(NIP-MA) の組成比は, モル比で NIPAAm : MA = 6 : 1 であった. この組成比から C/N 値を計算すると 5.72 となり, この値は Table 1 の C/N 値とほぼ一致する. このことから, 実測した C/N 値は合成した共重合体の組成比を正確に反映しているものと判断される. ポリアミノ基を有する共重合体では, pH 滴定において明確な当

Fig. 2 Temperature dependence of transmittance of aqueous solution containing 0.10 g cm^{-3} PNIPAAm copolymer on pH

(a) Poly(NIP-TETA-MA), ○: pH 5.0; ●: pH 6.0; △: pH 7.0; ▲: pH 7.8; ▽: pH 8.0; ▼: pH 9.0; □: pH 10.0; (b) Poly(NIP-MA), ○: pH 3.0; ●: pH 3.4; △: pH 4.0; ▲: pH 5.0; ▽: pH 6.0; ▼: pH 7.0

量点が観察されなかったため、モノマーの組成比を決定することはできなかった。

合成した PNIPAAm 共重合体の IR スペクトルを測定した。一例として poly(NIP-TETA-MA) の結果について述べる。 1550 cm^{-1} にアミド結合 (CO-NH) の N-H 変角振動, 1131 cm^{-1} にアミドの C-N 伸縮振動, 3432 cm^{-1} にアミンの N-H 伸縮振動, 1172 cm^{-1} に C-N 伸縮振動, 1650 cm^{-1} にカルボン酸の C=O 伸縮振動, 1458 cm^{-1} に O-H 面内変角振動, 及び $1367, 1387 \text{ cm}^{-1}$ にイソプロピル基由来の特性吸収が観察された。ほかの共重合体においても同様の吸収バンドが確認できた。

合成した共重合体のうち、テトラヒドロフラン (THF) に溶解した poly(NIP-polyamine) 及び poly(NIP-MA) の分子量をゲル浸透クロマトグラフィーにより測定したところ、いずれの共重合体においても平均分子量が 15000 から 25000 と 2 万前後の高分子が得られた。poly(NIP-polyamine-MA) は分子内で双性イオンを形成しているため、THF への溶解性が低く、分子量の測定はできなかった。

Fig. 3 Variation of LCST of 0.10 g cm^{-3} PNIPAAm copolymer as a function of pH LCST is defined as a temperature which gives 50% transmittance of solution

○: Poly(NIP-TETA); □: Poly(NIP-DETA); △: Poly(NIP-EDA); ◇: Poly(NIP-MA); ●: Poly(NIP-TETA-MA); ■: Poly(NIP-DETA-MA); ▲: Poly(NIP-EDA-MA)

3・2 PNIPAAm 共重合体の凝集に及ぼす pH の影響

ポリアミノ基とカルボキシル基を有する共重合体の凝集に及ぼす pH の影響を検討した。poly(NIP-TETA-MA) はそれ自身の持つポリアミノ基やカルボキシル基により、緩衝作用を持つ。このため、特に緩衝剤を加える必要がなかった。また、poly(NIP-TETA-MA) 溶液は相転位前後において pH の変動はなかった。各 pH における poly(NIP-TETA-MA) 溶液の温度-透過率曲線を Fig. 2(a) に示す。また、比較としてカルボキシル基のみの poly(NIP-MA) 溶液の温度-透過率曲線の pH 依存性を Fig. 2(b) に示す。poly(NIP-MA) では pH 4 まで温度-透過率曲線に大きな変化は見られないが、pH 5 になると相転位温度が高温側へシフトし、pH 6 以上では相転移を示さなくなった。カルボキシル基の酸解離定数 (pK_a) がおよそ 5 前後である。ことから推測すると、pH の上昇に伴いカルボキシル基の酸解離反応が進み、共重合体全体の水溶性が増加したことが、相転位温度の上昇を引き起こした原因であると考えられる。これに対して、カルボキシル基とポリアミノ基を同時に導入した poly(NIP-polyamine-MA) では、温度-透過率曲線のプロファイルが変化する範囲は pH 5~8 と、poly(NIP-MA) に比べて広くなるとともに、その範囲は中性側へとシフトした。また、カルボキシル基がほぼ酸解離している pH 7 においても明確な相転移を示している。これは導入したポリアミノ基によるプロトン付加反応がこの pH でも一部起こり、共重合体全体として電荷の打ち消しに寄与しているためであると考えられる。

LCST との pH 関係を Fig. 3 に示す。ポリアミノ基のみの poly(NIP-polyamine) では、pH を変化させても相転位挙動は変化せず、LCST もほぼ一定の値を示した。これは、

Fig. 4 Effect of heavy metal ions on temperature dependence of transmittance of aqueous solution containing of 0.10 g cm^{-3} poly(NIP-TETA-MA)

Measurement wavelength is 750 nm except Cu^{II} (850 nm); $\circ$: Without metal; $\bullet$: Cd^{II} ; $\square$: Co^{II} ; $\blacksquare$: Cu^{II} ; $\triangle$: Ni^{II} ; $\blacktriangle$: Pb^{II} ; ∇ : Zn^{II} ; Concentration of heavy metal ion is $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$; pH: 7.0

Fig. 5 Effect of the concentration of Cu^{II} on temperature dependence of transmittance of aqueous solution containing of 0.10 g cm^{-3} poly(NIP-TETA-MA)

$\circ$: 0; $\bullet$: 1.0×10^{-3} ; $\square$: 5.0×10^{-4} ; $\blacksquare$: 1.0×10^{-4} ; $\triangle$: 5.0×10^{-5} ; $\blacktriangle$: $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$; pH: 7.0

プロトン付加したポリアミノ基は、疎水的構造形成イオンと呼ばれる第四級アンモニウムイオン²⁴⁾と同様に、その周囲に氷構造を形成ためであると推測される。このため、プロトン付加したポリアミノ基は高分子の水和にはあまり寄与していないものと考えられる。

低い pH 領域において、poly(NIP-polyamine-MA) のカルボキシル基の酸解離は抑制されている。このため、poly(NIP-polyamine-MA) の LCST は poly(NIP-polyamine) の LCST と同様に、エチレンイミン鎖長が長いものほど高くなった。これとは逆に、中性領域、特に pH 7 ではエチレンイミン鎖長が短いものほど LCST はわずかに高くなっている。この結果は次のように解釈することができる。

共重合体内には酸解離したカルボキシル基とプロトン付加したポリアミノ基が存在しており、静電相互作用を起こすことが考えられる。このとき、エチレンイミン鎖長が長いものほど立体構造上、分子内でイオン会合体を形成しやすい。鎖長が短くなるにつれて立体障害が大きくなり、ポリアミノ基とカルボキシル基とはイオン対を形成することが困難になる。これによりエチレンイミン鎖長が短い場合には電荷の打ち消しが抑制され、共重合体全体の親水性が高くなり、LCST が高くなるものと推測される。

以上の結果から、今回合成した熱応答性高分子では、カルボキシル基の酸解離反応が熱応答性を制御する主因であり、ポリアミノ基は補助的な因子として作用しているものと考えられる。

3.3 PNIPAAm 共重合体の凝集に及ぼす重金属イオンの影響

ポリアミノ基及びカルボキシル基は重金属イオンと反応して錯体を形成する。そこで重金属イオンが凝集に及ぼす

影響について検討した。重金属イオン共存下における poly(NIP-TETA-MA) 溶液の温度-透過率曲線を Fig. 4 に示す。poly(NIP-TETA-MA) の LCST は検討したすべての重金属イオンとの反応により高温側へとシフトした。LCST に与える影響は $\text{Cu}^{\text{II}} < \text{Pb}^{\text{II}} < \text{Cd}^{\text{II}} < \text{Co}^{\text{II}} < \text{Zn}^{\text{II}} < \text{Ni}^{\text{II}}$ の順となったが、その差はわずかであった。また、この順列は Irving-Williams の系列²⁴⁾とは一致していない。これらのことから、共重合体の凝集は金属イオンとの反応性に単純に支配されているわけではないと考えられる。

次に、凝集における金属イオンの濃度依存性を、 Cu^{II} イオンを用いて検討した結果を Fig. 5 に示す。温度-透過率曲線を概観すると、 Cu^{II} イオン濃度の増加とともに高温側へとシフトする傾向がある。しかし、 $1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ と $5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ とでこの傾向は逆転している。この逆転する挙動は再現するものの、逆転する Cu^{II} イオン濃度は実験毎に若干異なった。このことは水溶液中で高分子のとりうる立体的な構造が Cu^{II} イオン濃度により変化することに起因しているものと推測される。相転位現象はポリマーの溶存形態に影響されることが知られている²³⁾。温度-透過率曲線のシフトが Cu^{II} イオン濃度によって一部逆転する現象は、ほかの poly(NIP-polyamine-MA) でも同様に観察された。

poly(NIP-TETA-MA) は Cu^{II} と反応し、その水溶液は深青色を呈する。この溶液を加熱すると、析出する凝集相は深青色ではなく、白色となった。このことは、 Cu^{II} イオンと錯形成している poly(NIP-TETA-MA) は、そのままでは凝集していないことを示している。このとき、上澄み液の吸収スペクトルを測定したところ、相転移前における溶液の吸収スペクトルとはほぼ同じであった。また、上澄み液中に残存する Cu^{II} イオン濃度を原子吸光法により測定した

Fig. 6 Fraction of biomolecules remaining at aqueous phase after phase transition

0.10 g cm^{-3} of poly(NIP-TETA-MA) is used. Concentration of biomolecule is 1.0 mg cm^{-3}

結果, 相転移前と変わらなかった. これらの結果は, Cu^{II} イオンが凝集相には取り込まれていないことを示している. もし Cu^{II} イオンと反応していない poly(NIP-TETA-MA) のみが相転移により凝集するのであれば, poly(NIP-TETA-MA) の温度-透過率曲線は Cu^{II} イオンの濃度には依存しない. しかし, Fig. 5 の結果は Cu^{II} イオンと poly(NIP-TETA-MA) との間に相互作用があることを示している. 以上の結果から, Cu^{II} イオンと錯形成した共重合体は凝集相を形成する際に Cu^{II} イオンを放出しているものと考えられる.

高分子に導入したカルボキシル基による影響を明らかにするために, カルボキシル基を含まない poly(NIP-TETA) と Cu^{II} イオンとの反応特性についても検討した. poly(NIP-TETA) も poly(NIP-TETA-MA) と同様に, Cu^{II} イオンと反応してその溶液は深青色を呈した. この溶液を加熱して形成させた凝集相には, poly(NIP-TETA-MA) と同様に, Cu^{II} イオンは取り込まれなかった. しかし, 凝集相の形成しやすさは, poly(NIP-TETA-MA) のほうが poly(NIP-TETA) よりも優れていた. 以上のことから, カルボキシル基は錯形成よりもむしろ凝集特性の改善に寄与しているものと考えられる.

3.4 生体関連物質の凝集相への分配

配位部位として導入したポリアミノ基やカルボキシル基にはバイオアフィニティーの発現を期待できる. そこで生体関連物質として BSA, リゾチーム, レシチン及び DNA を用い, PNIPAAm 共重合体への分配挙動について検討した. poly(NIP-TETA-MA) を用いたときに得られた結果を Fig. 6 に示す. BSA とリゾチームは共に水溶性タンパク質であるため凝集相へはほとんど分配しなかった. また, 配位部位を持たない PNIPAAm へもこれらのタンパク質は分配しないことが報告されている¹⁰⁾. これに対して, DNA は水溶性の生体高分子ではあるものの, poly(NIP-TETA-MA) 凝集相へ 61.4% 分配した. DNA はリン酸基の解離

Fig. 7 Fraction of chlorophyll analogues between polymer phase and aqueous phase

(a): $1.0 \times 10^{-3} \text{ g/l}$ of copper-chlorophyllin sodium salt; (b): $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ of TPPS; (c): $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ of TMPyP; (d): chlorophyll a; (e): chlorophyll b; Concentration of copolymers: 0.10 g cm^{-3}

によって陰イオン性となるため, DNA の取り込みには正に荷電したポリアミノ基との静電相互作用が関係していると考えられる. 一方, リン脂質であるレシチンは高い疎水性を持つため, poly(NIP-TETA-MA) に 63% 分配した. この値は PNIPAAm への分配⁷⁾に比べると若干低い. これは PNIPAAm に導入したポリアミノ基とカルボキシル基により, 凝集相内部の親水性が増したことがその原因であると推測される.

次に, クロロフィル類縁体の分配について検討した結果を Fig. 7 に示す. 陽イオン性のポルフィリンである TMPyP は, ほとんど凝集相に取り込まれなかった. これに対して, 陰イオン性の TPPS は, エチレンジアミン鎖長の長いポリマーほど凝集相によく取り込まれた. このことは, poly(NIP-polyamine-MA) にはエチレンジアミン鎖へのプロトン付加による陰イオン選択性を有することを示している. 銅クロロフィルも陰イオン性であるため, poly(NIP-polyamine-MA) に 85% 以上分配した.

クロロフィル a はすべての poly(NIP-polyamine-MA) に

において, その凝集相にはほぼ完全に分配した. 一方, クロロフィル b は poly(NIP-DETA-MA) 及び poly(NIP-EDA-MA) には 95% 以上分配するものの, poly(NIP-TETA-MA) の凝集相にはほとんど分配しなかった. この原因として, poly(NIP-TETA-MA) にクロロフィル b を加えた場合には, 凝集相の形成がわずかであったことが挙げられる. poly(NIP-TETA-MA) とクロロフィル b との相互作用については現在検討中である.

4 結 言

ポリアミノ基とカルボキシル基を同時に有する PNIPAAm 共重合体は, pH による熱応答性の制御が可能であり, 熱応答性を制御できる pH 範囲はカルボキシル基のみを有する PNIPAAm 共重合体よりも広がった. これに対して, ポリアミノ基だけを PNIPAAm に導入した共重合体では, pH による熱応答性の制御を行うことはできなかった.

今回合成した PNIPAAm 共重合体は, Cu^{II} イオンと均一溶液の状態で錯形成はするものの, 凝集相に Cu^{II} イオンは取り込まれなかった. 生体関連物質及びクロロフィル類縁体の分配挙動について検討した結果, 配位部位による電荷選択性を有していることが分かった.

文 献

- 1) W. C. Wooten, R. B. Blanton, H. W. Coover, Jr.: *J. Polym. Sci.*, **25**, 403 (1957).
- 2) M. Heskins, J. E. Guillet: *J. Macromol. Sci. Chem.*, **A2**, 1441 (1968).
- 3) Y. Hirokawa, T. Tanaka: *J. Chem. Phys.*, **81**, 6379 (1984).
- 4) C. Matsubara, S. Izumi, K. Takamura, H. Yoshioka, Y. Mori: *Analyst* (London), **118**, 553 (1993).
- 5) C. Matsubara, N. Kikuchi, I. Denpouya, K.

Takamura: *Chem. Lett.*, **1993**, 849.

- 6) M. Hiraide, A. Morishima, H. Kawaguchi: *Anal. Sci.*, **13**, 295 (1997).
- 7) T. Saitoh, T. Ohyama, K. Takamura, T. Sakurai, T. Kaise, C. Matsubara: *Anal. Sci.*, **13**, 1 (1997).
- 8) T. Saitoh, T. Ohyama, T. Sakurai, T. Kaise, K. Takamura, Y. Suzuki, C. Matsubara: *Talanta*, **46**, 541 (1998).
- 9) T. Saitoh, Y. Yoshida, T. Matsudo, S. Fujiwara, A. Dobashi, K. Iwaki, Y. Suzuki, C. Matsubara: *Anal. Chem.*, **71**, 4506 (1999).
- 10) 齋藤 徹, 浜園陽子, 櫻井照明, 松原チヨ: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **49**, 631 (2000).
- 11) K. Yamamoto, H. Kanazawa, Y. Matsushima, K. Oikawa, A. Kikuchi, T. Okano: *Environmental Sciences*, **7**, 47 (2000).
- 12) H. Kanazawa, T. Sunamoto, Y. Matsushima, A. Kikuchi, T. Okano: *Anal. Chem.*, **72**, 5961 (2000).
- 13) J. Kobayashi, A. Kikuchi, K. Sakai, T. Okano: *Anal. Chem.*, **73**, 2027 (2001).
- 14) N. Monji, C.-A. Cole, A. S. Hoffman: *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.*, **5**, 407 (1994).
- 15) K. Takeshita, Y. Nakano: *Solvent Extraction and Ion Exchange*, **18**, 375 (2000).
- 16) 田鎖和代, 上原伸夫, 清水得夫: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **50**, 257 (2001).
- 17) A. Kumar, I. Yu. Galaev, B. Mattiasson: *Bioseparation*, **7** 185 (1999).
- 18) A. Kumar, I. Yu. Galaev, B. Mattiasson: *Biotechnology and Bioengineering*, **59**, 695 (1998).
- 19) I. Yu. Galaev, A. Kumar, B. Mattiasson: *J. Macromol. Sci., Pure Appl. Chem.*, **A36**, 1093 (1999).
- 20) B. Mattiasson, A. Kumar, I. Yu. Galaev: *J. Molecular Recognition*, **11**, 211 (1998).
- 21) K. Fujinaga, Y. Ashiwa, S. Ujiie, Y. Seike, M. Okumura: *Anal. Sci.*, **15**, 477 (1999).
- 22) Y. Min, L. Jun, Z. Jianbo, J. G. Q. Jianhua, H. Hongfei: *Rapidat. Phys. Chem.*, **52**, 261 (1998).
- 23) A. S. Hoffman: *Macromol. Symp.*, **98**, 645 (1995).
- 24) 大瀧仁志, 田中元治, 船橋重信: “溶液反応の化学”, p. 34, 94 (1977), (学会出版センター).

要 旨

ポリアミノ基とカルボキシル基を導入したポリ(*N*-イソプロピルアクリルアミド) (PNIPAAm) 共重合体を合成し, その凝集に及ぼす pH や重金属イオンの影響について検討した. また, PNIPAAm 共重合体が相転移したときに形成する凝集相への重金属イオンや生体関連物質の分配についても検討した. 合成した PNIPAAm 共重合体の下限臨界溶液温度 (LCST) は pH 5 から 8 の範囲で pH の上昇に伴い高温側へとシフトし, 重金属イオンの添加によっても高温側へとシフトした. 合成した PNIPAAm 共重合体は Cu^{II} イオンと錯形成反応して青色を呈したが, 相転移する際に Cu^{II} イオンを放出し, 形成した凝集相には Cu^{II} イオンは取り込まれていなかった. 生体関連物質の捕集を検討した結果, 凝集相への分配には電荷選択性があることが分かった. すなわち, 陽イオン性化合物はほとんど分配せず, 陰イオン性化合物がよく分配した.