(昭和56年6月10日受理)

ポリ(γ -メチル L-グルタメート)膜と重水との 水素交換反応と水の拡散挙動について

山形大学工学部 鈴木 文 男・小野里健二
石田 和 泉・高橋 直 通

ACTIVE HYDROGEN EXCHANGE REACTION OF POLY (γ -METHYL L-GLUTAMATE) MEMBRANE WITH DEUTERIUM OXIDE AND MOVEMENT OF DIFFUSION OF WATER IN THE MEMBRANE

By Fumio Suzuki, Kenji Onozato, Izumi Ishida and
Naomichi Takahashi

(Department of Polymer Chemistry, Faculty of Engineering,
Yamagata University, 4-Johann, Yonezawa, 992, Japan)

Diffusion of H_2O in poly(γ -methyl L-glutamate) (PMLG) membrane was examined through the hydrogen exchange reaction of active hydrogen ($-\text{NH}$) of PMLG by D_2O . α -Helical PMLG (α -PMLG) membrane cast from its solution in α -helical solvent and partially β -coiled PMLG (β -PMLG) membrane prepared by treatment of α -PMLG with formic acid were used as samples.

From the diffusion coefficient of H_2O at 30°C , the α -PMLG membrane should be equilibrated within one minute. However, the deuteration of the membrane was not equilibrated even in thousands of hours at 60°C . At above 100°C , the active hydrogens in the membrane, even when it was stretched two times, were deuterated completely. The deuteration rate followed a logarithmic relation between the degree of deuteration and reaction time, which had been suggested for a reaction in micell. These results showed that H_2O (or D_2O) diffused in the helix assembly and reacted with the active hydrogens in the α -helix at an extremely slow rate by breaking the hydrogen bonds. In the case of deuteration of β -PMLG membrane, the logarithmic relation had two stages, depending on the hydration of β -coiled chains and α -helical chains. Active hydrogen in the side chain of poly(γ -L-glutamic acid) (PLGA) membrane obtained by saponification of α -PMLG was deuterated completely within one hour, but the deuteration rate of the active hydrogen in main chain (in helix) was extremely slow as in the case of α -PMLG. These results showed that the diffusion of H_2O in the PMLG membrane advanced in two types of diffusion, one through the region of the side chains and the other through the hydration of peptide bonds.

(Received June 10, 1981)

1. 緒 言

ポリ γ -メチル L-グルタメート(以下PMLGと略称)は α -アミノ酸重合体の一種として工業的にも生産されており、学術的にも、産業的にも興味深いポリマーである。その分子鎖の溶液中あるいは固体中における二次構造が α -ヘリックス、 β -コイルあるいはランダムコイル状など種々のものとなる特異性を示すことから多くの研究者の興味をひいている。

これから作られた皮膜に対する水および有機化合物の透過拡散性に関しても多くの研究^{1,2)}がなされている。中でも滝沢ら¹⁾によれば、水およびアルコール類のPMLGに対する拡散係数の温度変化からのアウレニウスプロットがほぼ転移点(側鎖の分子運動開始点とされている)に近い温度でクニックを生ずる。このことから、これらペネトラントは主としてPMLGの側鎖の部分を移動し、主鎖によって形成されるヘリックス内を通ることはほとんどないと結論されている。このことについては、ヘリックス

を形成している主鎖中のアミド基の水素と活性重水素をもつトレーサーとの水素交換反応性の有無を確認することによって直接検討することが可能と思われる。

よって α -PMLG, それをギ酸処理して一部 β 化した β -PMLG, さらにケン化して側鎖をグルタミン酸基に転じたポリL-グルタミン酸(PLGA)などの試料について, 重水による重水素化挙動を調べた。

2. 試料及び実験

2.1 α -ヘリックス PMLG 皮膜の調製

PMLG 試料には味の素(株)製の“アジコート A-2000”を用いた。その PMLG の 1, 2-ジクロロエタン/パークロロエチレン(7:3) 混合溶液を平滑なガラス板上に流延し, これをシリカゲルと共に密閉容器に入れ, 20℃, 常圧で溶媒を揮発させて製膜した。

皮膜は水中でガラス板から剥離し, ソックスレーを用いて沸点下のメタノールで 2 日間洗浄し, 膜厚 2 μm のものを得た。

その IR 吸収スペクトルを図 1 (実線グラフ) に示したが, 1658, 1550 あるいは 620 cm^{-1} に分子内水素結合による独特の吸収帯を示しているから, 分子鎖はほとんどが α -ヘリックスを形成しているものとみられる。

Fig. 1 IR spectra of (——) α -PMLG and (-----) β -PMLG.

2.2 β -コイル PMLG 皮膜の調製

α -PMLG 皮膜に中島³⁾の方法に準じて β 化処理をほどこした。すなわち, ガラス板上に製膜展着されたままでギ酸と共に密閉容器に入れ, 20℃で約 2 カ月間放置し, 皮膜をギ酸蒸気に接触させた。その後, 水中でガラス板から剥離し, メタノールで洗浄した。その IR スペクトルを図 1 (点線グラフ) に示したが, α -ヘリックスに基づく吸収帯は, それぞれ 1630, 1530, 700 cm^{-1} に移動し, 分子間水素結合の発生を示している。しかし 1558, 1550 cm^{-1} にショルダーが認められ, またアミド V の吸収帯が 620 cm^{-1} に残存していることからみて,

完全には β 化していないものと思われるが, 各バンドの吸光度比 $D_{700}/D_{2950}=D$, $D_{620}/D_{2950}=D'$ から $\alpha \rightarrow \beta$ 転移率は $D/D' \approx 55$ (%) であった。このように β 化率の不十分なものではあるが, ここでは β -コイル PMLG 膜と呼ぶことにする。

2.3 ギ酸処理の PMLG 分子鎖に及ぼす影響

α -PMLG 及び β -PMLG の元素分析結果を表 1 に示した。これによれば α -PMLG はその実測値が計算値とよく一致しているが, β -PMLG はやや相違している。しかし, これはその吸湿性のためと思われ, 吸湿度 0.0445 g/g-PMLG として補正するとよく一致した。また両者をトリフロロ酢酸(ランダム溶媒)に溶解したのち再生した両者の皮膜の IR を比較したが, ほとんど相違が認められなかった。これらのことからギ酸処理は PMLG 分子の一次構造に何ら変化を与えないことがわかった。

Table 1 Elemental analyses of α - and β -PMLG.

	Calculated (%)		Experimented (%)	
	Humidified*		α -PMLG	β -PMLG
C	50.34	48.10	50.26	48.10
H	6.34	6.50	6.41	6.28
N	9.79	9.35	9.19	9.44

*; These values are obtained by assuming that β -PMLG is fumified 0.0445 g-H₂O/g-PMLG.

さらに両者のトリフロロ酢酸溶液の粘度を測定し, Mark-Houwink-Sakurada 式により, $K=2.02 \times 10^{-8}$, $\alpha=0.73$ ⁴⁾ として粘度平均分子量を求めた結果, α -PMLG については 176,000, β -PMLG については 145,000 の値が得られた。これらの値からギ酸処理による分子鎖の開裂度を星野⁵⁾の方式によって求めると, 1.7×10^{-4} となり, 極めて小さいことがわかった。すなわち, ギ酸処理によって PMLG の主鎖の切断はほとんど起っていない。

以上の検討によって, α -PMLG 膜をギ酸処理しても, 二次構造的には β 化は起っているが, 分子鎖に本質的な変化は起っていないことが確かめられた。

2.4 α -ヘリックス PLGA 皮膜の調製

α -PMLG 皮膜を 2 枚のポリエチレン網の間にはさみ, 濃度 1.8% NaOH / メタノール・水 (75:25) 溶液中に, 常温下で約 3.5 時間浸漬してケン化を行なった⁶⁾。ケン化皮膜は直ちにメタノール中に投入して十分に洗浄した後, 手早くシリカゲルデシケーターに入れて乾燥した。この状態のものは吸湿性が極めて大きいので, すばやく操作しないと吸湿して溶解する。次に 43% リン酸水溶液中に一夜浸漬して Na 塩を分解し, 水洗, 乾燥したのち, ソックスレー抽出器に入れ, メタノールで 2 日間洗浄し

た。

この皮膜のIRスペクトルを図2に示したが、NHバンドは側鎖カルボン酸OHバンドと重なり、また $-\text{COOCH}_3$ の 1440 cm^{-1} のバンドが消失し、代りに $-\text{COOH}$ のバンド(1410 cm^{-1})が発生していることから、結晶、非晶領域の如何を問わずケン化がかなり進んでいることが推察される。これに対して α 型の特性吸収バンド(1658 , 1550 , 620 cm^{-1})はそのまま残っているので、 α -ヘリックス構造は保たれていることがわかる。

元素分析結果を表2に示したが、計算値との相違は3.5%の吸湿が避けられなかったためであり、これを補正すると両者はよく一致している。

Fig. 2 IR spectrum of α -PLGA.

Table 2 Elemental analysis of α -PLGA.

	Calculated (%)		Experimented (%)
	Humidified*		α -PLGA
C	46.51	44.82	44.82
H	6.63	5.64	5.50
N	10.85	10.46	10.10

*; These values are obtained by assuming that α -PLGA humidified 0.035 g- H_2O /g-PLGA.

2.5 重水(D_2O)

昭和電工(株)の製品(D濃度 99.8%)をそのまま用いた。

2.6 重水素化反応装置及び実験法

PMLG皮膜の重水素化反応装置は既報⁶⁾におけるものと同じであり、それによる実験法も同じである。

2.7 拡散係数測定装置及び実験法

ガスクロマトグラフのカラムを取りはずし流路に透過セルを取りつけた微分透過法によって PMLG 膜による水の微分透過曲線を測定した。

3. 実験結果及び考察

3.1 PMLG に対する水の拡散係数

微分透過法による水の透過曲線を図3に示した。これより Meares⁸⁾の方法に従って $\ln(t^{1/2} \cdot \frac{dmV}{dt})$ と $1/t$ についてプロットした結果を図4に示した。

この傾きより水の拡散係数(D_E)を求め、又定常状態法より求めた拡散係数($\bar{D}$)を温度の関数として表3に示したが、この両者はよく一致している。Mearesの方法により求めた値は透過の極めて初期の値を用いているのでペネトラント濃度ゼロにおける拡散係数に近いものと考えられる。したがってこの両係数の一致は PMLG に対

Fig. 3 Differential permeation curves of water through α -PMLG membrane at various temperatures. Membrane thickness is $86\text{ }\mu\text{m}$.

Fig. 4 Relation between $1/t$ and $\log t^{1/2} \frac{dmV}{dt}$ of water to PMLG membrane. Membrane thickness is $86\text{ }\mu\text{m}$.

Table 3 Diffusion coefficients of water to α -PMLG membrane obtained from Meares's (D_E) and steady state ($\bar{D}$) methods.

Temp. (°C)	$D_E \times 10^8$ (cm ² /sec)	$\bar{D} \times 10^8$ (cm ² /sec)
20	6.1	5.3
25	6.5	7.2
30	10.4	9.6
35	11.0	12.5
40	16.0	16.5

する水の拡散はFick型であり、又拡散係数はペネトランス濃度に依存性をもたないことを示している。

アミド結合を持つナイロン4等の場合には水の拡散は非Fick型⁷⁾であるのに対してPMLGの場合にFick型を示すのは、すでに滝沢ら¹⁾によって報告されているように、水の拡散が主としてPMLG分子鎖の側鎖近傍でなされるために、水による水素結合の開裂に基づく分子鎖の緩和の現象がない。したがって拡散係数がペネトランス濃度あるいは拡散時間等に見かけ上依存しないためと考えられる。

3.2 PMLGと重水蒸気との活性水素交換反応

種々の温度でPMLGと重水蒸気を接触させ、交換反応速度を測定した結果を図5に示した。この結果からPMLGの重水素交換反応は各温度で進行するが、一般に反応速度が異常に小さいことがわかる。すでに石川⁹⁾によって α 型のPMLGの重水による重水素交換反応が試みられている。その結果によると、24時間の反応では低温ではほとんど交換が起こらないのに対して、60℃以上では反応率は急上昇しているが、これは高温、高圧のもとではPMLGの水和が急速に進行するためと解釈されている。著者らの実験で24時間位の反応では石川の結果とほとんど同じ値を示しているが、それ以上の時

Fig. 5 Rates of deuteration of α -PMLG membrane at the temperature of (●) 20, (○) 60 and (Δ) 100°C.

間をかけると反応率は着実に進行していくことがわかる。4,000~5,000時間において60℃の反応温度では75%の反応率を示し、20℃でも約40%の値を示すが、なお交換反応率は上昇の傾向をみせている。

PMLGの反応速度がナイロン類に較べて極めて小さいこの理由について考えてみる。水の収着率をみるとナイロン2に相当するイミド基密度をもつにもかかわらず、0.3mol H₂O/mol PMLG程度であり、ナイロン4の%に比べてすら非常に小さい。また先に求めた見かけの拡散係数を用いてMcBain¹²⁾式よりPMLG内の収着水の濃度分布の時間依存性を求めてみると図6に示すようになる。この結果は反応に用いた程度の膜厚では水分子は1分以内に膜内に均一な分布をもつことを示している。したがってこの反応が不均一系で一般に認められているような拡散律速の反応ではないことがわかる。

Fig. 6 Concentration distribution of water in α -PMLG membrane at various sorption times. $D=96 \times 10^{-8}$ cm²/sec at 30°C. $C_{eq}=0.04$ g/g. Membrane thickness (L) is 2 μ m.

このように拡散が早い場合にはPMLGと重水との間の水素交換においては反応速度が律速段階となる場合もあり得る。この交換反応の実験においては膜の重水収着および乾燥を繰り返し行なっているが、拡散係数が大きいのでPMLG膜内部にはほとんど反応生成物である軽水が残留することがなく、ポリマー内の重水濃度の変化を無視することができる。したがってこの反応はPMLGのNH基の残存率に比例する一次反応を仮定してよい。NH基の残存率の対数と反応時間をプロットした結果を図7に示したが、明らかに直線を示していない。したがってこの反応は単純な反応律速ではないといえる。

すでに著者ら¹⁰⁾はポリビニルアルコールについてプロトントランスファー機構によって結晶内部まで重水素化が進行することを認めたが、ナイロン3、4および6のようなポリアミド類においては水素結合間の間隔が長いことによりプロトントランスファーが起らないであろう

Fig. 7 Relation between logarithm of degree of deuteration (x) and deuteration time at 60°C.

と考えてきた。しかしPMLGの場合は α -アミノ酸重合体でありナイロン2に相当する短い水素結合間隔を有することになるのでプロトン移動の可能性も大きく、又ケト-エノール型互変異性の共鳴によって α -ヘリックス内で水素結合を通してプロトン転送の連鎖を考えることも可能と思われる。低温の場合は反応速度が著しく遅いが、側鎖に収着された重水が非常にゆっくりと主鎖のペプチド基と水和し、交換反応していくと考えれば、いずれの場合も重水素交換反応率はほぼ100%になる筈である。

次に交換反応率が100%近くなるような反応温度(80°C以上)における初期速度(ランダムコイルに相当する部分との反応はあらかじめ20°C 24時間重水素化して系から実験的に除外しておいた)のアウレニウスプロットを行なった結果を図8に示した。これより活性化エネルギーを求めると100°C以上では32 kJ/mol、100°C以下で

Fig. 8 Arrhenius plot of deuteration of α -PMLG membrane.

は51 kJ/molであり高温高压のもとで水和しやすいとする石川⁹⁾の結果と一致する。ペプチド基にもとづく水素結合の解離エネルギー(結合エネルギー)は30 kJ/mol前後と見積られていることから考えて、プロトン転送機構よりも、PMLGのヘリックス配向領域に浸透し、側鎖に収着した重水分子が、ヘリックスを形成している水素結合を切断してNH基の活性水素と反応したと考える方が自然と思われる。

松田によって提案されたミセル内反応速度式

$$x = k t^n$$

を用いて反応率 x と時間 t のプロットを行なうと図9のように直線グラフが得られこの式を満足する。このことからミセルを形成しているヘリックス基間の側鎖部分に収着した重水は次いでヘリックスに水和し、そのNH基と水素交換反応するものと思われる。又100°C以上で長時間水に浸漬したPMLGを観察すると半溶解状態を示していることから、水和によってヘリックスがほどけて、ランダムコイルに転移してゆくのではないかと思われる。

Fig. 9 Logarithmic relation between the deuteration time (t) and degree of deuteration (x) at the temperature of (●) 20, (○) 60 and (△) 100°C.

反応速度がナイロン類にくらべて遅いわけは、ナイロン類では非晶部分のNH基はほとんど水の拡散流に露出しているのに対し、PMLGではNHがヘリックス内部にとじこめられているために直ちに重水分子と接触することなく側鎖を介してゆっくり行なわれるためではないかと推定される。

PMLGを熱水中で2倍に延伸したもののX線図を未延伸試料とともに図10に示した。明らかに $2\theta = 8^\circ 32'$ の α -ヘリックスにもとづく反射が増大していることがわかる。この程度の延伸では β 構造にもとづく $18^\circ 48'$ における反射は表われず、又IRの測定でも β 構造の存在が

Fig. 10 X-ray diffraction patterns of (A) stretched (2 times) in boiled water and (B) non-stretched one.

否定されているが、延伸によって α 溶媒に対する抵抗はいちじるしく増大する。

この2倍延伸のPMLGを重水素交換反応した速度曲線を図11に示したが、未延伸PMLGに比べて更におそくなっている。これは配向にもつきミセルが増加しそのため重水分子のミセル内侵入が困難になったためと解釈される。又両対数プロットはやはり良い直線性を示した。

ギ酸処理によって α ヘリックスからその一部が β コイルに移された試料の重水素交換反応速度を図12に、その両対数プロットを図13に示した。図13において初期の急激な立ち上がりはギ酸処理によってランダムコイルも形成された事を示すものである。両対数グラフに折れまがりが生じた理由は β コイルは α ヘリックスよりも水和され易いために重水の浸入によって容易に水素結合が切断されて水素交換反応し、その後 α ヘリックス部分の交換反応がゆっくりと行なわれたことにあるのである

Fig. 11 Rates of deuteration of (O) original and (Δ) 2 times stretched α -PMLG at 100°C.

Fig. 12 Rates of deuteration of β -PMLG membrane at the temperature of (Δ) 20 and (O) 60°C.

Fig. 13 Logarithmic relation between the deuteration time (t) and degree of deuteration (x) at the temperature of (Δ) 20 and (O) 60°C.

う。このことは水の収着量がギ酸処理によって増加するという仲川²⁾の結果ともよく相関する。

3.3 PLGAと重水との水素交換反応

α -PMLGをケン化して得たPLGAの重水素化反応を行なった。反応によるIR図の変化を図14に示した。(A)にみられるようにNH基と側鎖のCOOH基からのOH基の吸収がほとんど重なって存在している。しかし(B)にみられるように両者の反応速度が著しく異なるから両者をお互に程度分離して定量することが可能である。その交換反応の速度曲線を図15に示した。側鎖カルボキシル基との反応は1時間以内では完了し、次いでペプチド基との遅い反応が観察される。この結果は水分子(重水分子)は側鎖部分を優先的に拡散していることを裏付けているものと思われる。

Fig. 14 IR spectra of PLGA (A) and partially deuterated PLGA (B) membrane. Deuteration time is 45 min at 20°C.

Fig. 15 Rate of deuteration of PLGA membrane at 20°C.

4. 結 言

PMLG皮膜に対する水の拡散は短時間で観察すると濃度依存のないFick型を示し、水は側鎖部分を拡散しているように見受けられる。しかし重水との水素交換反応を長時間にわたって検討すると、ヘリックスをなしている主鎖中のペプチド結合のNHとも交換反応が行なわれることから、主鎖との水合もまた行なわれていることが観察された。又 β コイル中の水素結合は水との接触によって容易に切断されることが重水素化反応から認められた。

PLGAの重水素化反応によれば側鎖カルボキシル基の反応はきわめて容易に進行するがヘリックスのNHとの反応はPMLGと同様きわめて遅く、これは側鎖に多量に収着した水もヘリックス内には容易には入れないことを示した。

以上より、PMLGに対する水の拡散挙動は、見かけ上はFick型で側鎖部分を主として拡散している様に見えるが、きわめて遅い速度ではあるがヘリックス内にも水合が進行しているものと考えられた。したがってPMLG膜への水(又は重水)分子の浸透は側鎖の間隙を通る速い拡散と、ヘリックス内のペプチド結合との水合を伴ったきわめて遅い拡散の二つの型が存在しているものと考えられた。

なおプロトトランスファー機構については全く否定された訳ではなく更に理論的、実験的な検討の余地があると考えている。

付記：本研究は化学系7学協会連合東北地方大会(1979. 9)で講演したものである。

終りにあたって本研究にご協力いただいた鈴木恵美子技官に感謝申し上げます。

文 献

- 1) 例えば、滝沢 章, 浜田敏裕, 下川順造; 高分子化学, **28**, 751(1971)
- 2) N. Minoura and T. Nakagawa; *J. Appl. Polymer Sci.*, **23**, 2729 (1979)
- 3) A. Nakajima, T. Fujiwara, T. Hayashi and K. Kaji; *Biopolymer*, **12**, 2681 (1973)
- 4) 寺本 明, 第21回高分子夏期大学予稿集, p.177 (1973)
- 5) K. Hoshino and M. Watanabe; *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 4816 (1951)
- 6) 高橋重三, 相宅省吾, 森 茂郎, 正本順三; 「ポリアミノ酸」(藤本康夫編), 講談社, p.204(1974)
- 7) F. Suzuki and N. Takahashi; 繊維学会誌, **36**, 61(1980)
- 8) P. Meares; *J. Appl. Polymer Sci.*, **9**, 917 (1965)
- 9) 石川佐武郎; 高分子, **14**, 1078(1965)
- 10) 高橋直通, 鈴木文男, 小野里健二; 高分子化学, **28**, 380(1971)
- 11) 谷崎 寛, 梶山千里, 高柳素夫; 日化, **1975**, 897
- 12) J. W. McBain; *Z. Phys. Chem.*, **68**, 471 (1909)