

PGA/PVPブレンドの相溶性に与えるPGAの2次構造の影響

(菅野 等教授に捧ぐ)

浅野 敦志* 田中 千香子** 黒津 卓三***

(平成18年2月13日受付：平成18年4月5日受理)

Effect of Secondary Structure of PGA on Miscibility of PGA/PVP Blends
(Dedicated to Prof. Hitoshi Kanno)

By Atsushi Asano*, Chikako Tanaka** and Takuzo Kurotsu***

概要 : The miscibility of a poly α -L-glutamic acid / Poly(vinyl pyrrolidone) (PGA/PVP) = 1/1 blend cast from the acidic, neutral, and basic water solution was investigated by the high-resolution solid-state ^{13}C NMR technique. The ^{13}C NMR spectra revealed that the content of the α -helix of PGA in the PGA/PVP=1/1 blend obtained from the water-solution at pH=5 is comparable to that of pure PGA. It is also shown that the agreement of ^1H spin-lattice relaxation rates in the rotating frame ($T_{1\rho}^{\text{H}}$) of PGA and PVP for the blend is much less than those obtained from both neutral- and basic-solutions. These suggest that the miscibility of the PGA/PVP blend is influenced by the pH induced structural change of PGA.

Keywords : PGA, PVP, Polymer Blend, Miscibility, Solid-State ^{13}C NMR, $T_{1\rho}^{\text{H}}$

1. 緒言

高機能ポリマーを、新規に開発することが技術的、コスト的に困難な場合に、2種類以上の異なる特性のポリマーをブレンドし、複合化する。これはポリマー素材を高機能化・高性能化する最も容易な手法の一つであり、工業的によく用いられている¹⁾。

ポリマーブレンドにより得られる素材の特性や物性は、ポリマー同士の相溶性に大きく影響を受ける。したがって、必要な物性を得るためには相溶性の制御が重要となる。最近では、工業用ポリマーに生分解性を付与するために、生物由来ポリマーをブレンドする試みもなされている²⁾。生物由来ポリマーを用いる場合には、その2次構造の変化が相溶性に影響を与えることが考えられ、相溶性との関連性を知ることは有意義である。

本研究では、ブレンド中の生物由来ポリマーの2次構造とブレンドポリマーの相溶性との関連性を、固体高分解能 ^{13}C 核磁気共鳴 (NMR) 法を用いて調

べた。用いたポリマーは、ポリ α -L-グルタミン酸 (PGA) である。PGAは、pHにより2次構造が変化することが知られており、酸性下で α -ヘリックス構造、中性・塩基性下でランダムコイルに可逆的に変化する²⁾。したがって、PGAの2次構造変化のみの影響を調べるために、pHに依存せずに常時非晶質となるポリビニルピロリドン (PVP) とのポリマーブレンドを作成した。どちらも水溶性ポリマーであるためpHの制御が容易である。

2. 実験

2.1 試料の作成

PGA [$\left(\text{NHCH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{CO}\right)_n$]は、ペプチド研究所 (株) から購入した重合度 (n) 157のナトリウム塩を用いた。重量平均分子量が約4万のPVP [$\left(\text{CH}_2\text{CH}(\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{CO})\right)_n$]を東京化成 (株) から購入した。

PGA/PVPブレンドは水溶液から溶媒キャスト法により作成した。PGAとPVPをユニットモル比が1/1になるように混合して純水に10 wt%で溶解した。pHの調整は、塩酸 (pH \approx 1) と水酸化ナトリウム水

*防衛大学校 応用化学科 助教授

**防衛大学校 応用化学科 助手

***防衛大学校 応用化学科 教授

溶液 (pH≈13) を用いて行い、pH=5, 7, 10の3種類とした。溶媒キャスト法により得られた3種類のブレンドフィルムは、約60 °Cにて1～2日間減圧乾燥し溶媒を完全に蒸発させた。同様にPGA単体、PVP単体の両フィルムを、pHを5, 7, 10に調整した水溶液から作製した。

2.2 固体高分解能¹³C NMR測定

固体高分解能¹³C NMR測定は、Bruker DMX 500分光計を用いて行った。¹³C核と¹H核の共鳴周波数はそれぞれ125.76 MHzと500.13 MHzである。用いたパルスシーケンス (ラジオ周波数の矩形パルスを試料に照射する手順を記したスキーム図; 図中の90°の区切りは、磁化を静磁場方向から90°倒す強さの矩形パルス波を照射することを意味する。) を図1に示す。固体高分解能¹³C NMRスペクトルを得るため、固体中の強い化学シフト異方性を除去する高速マジック角回転法 (MAS法、本実験ではMAS=6~7 kHzに設定) と、¹H核のエネルギーを¹³C核に分極して感度を上げる交差分極 (CP) 法を併用した^{3,4}。さらに固体中の強い¹³C-¹H双極子相互作用を効率よく除去するため高出力¹Hデカップリング (DD) にTPPM法⁵を用いた。ラジオ波強度は55.6 kHzに設定し、CPコンタクト時間を1 msとした。¹³Cの化学シフトは、固体アダマンタンのメチンピークをテトラメチルシラン (TMS) からの外部基準として29.47 ppmに設定した。

¹H核の回転系でのスピン-格子緩和時間 ($T_{1\rho}^H$) の測定は、図1に示したパルスシーケンスのCPコンタクト時間の長さを50 μsから15 msまで変化させて¹³Cの磁化の強度変化から間接的に観測した⁶。

3. 結果と考察

3.1 αヘリックス含有量

図2にPGAフィルムの固体高分解能CPMAS ¹³C NMRスペクトルのpH依存性を示した。側鎖のメチレン基 (CH_{2β}、CH_{2γ}) と主鎖のメチン基 (CH) によるシグナルのピークは、それぞれ28 ppmと34 ppm、55 ppm付近に観測された。主鎖カルボニル基と側鎖カルボキシル基 (共にCOで表示) によるピークはそれぞれ174 ppmと182 ppmに観測された。120ppmと230ppm付近に観測される強度の小さなピークは、MAS法によりCO基の化学シフト異方性が除去されたために出現した人工ピーク (アーティファクト) である。

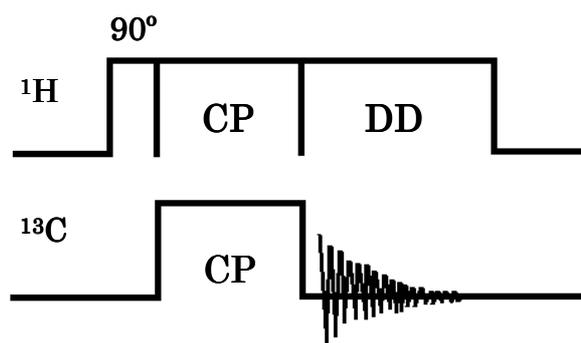


図1 固体高分解能¹³C NMRスペクトルを観測するためのパルスシーケンス、CPMAS法
Fig. 1 A pulse sequence for measuring a solid-state CPMAS ¹³C NMR spectrum.

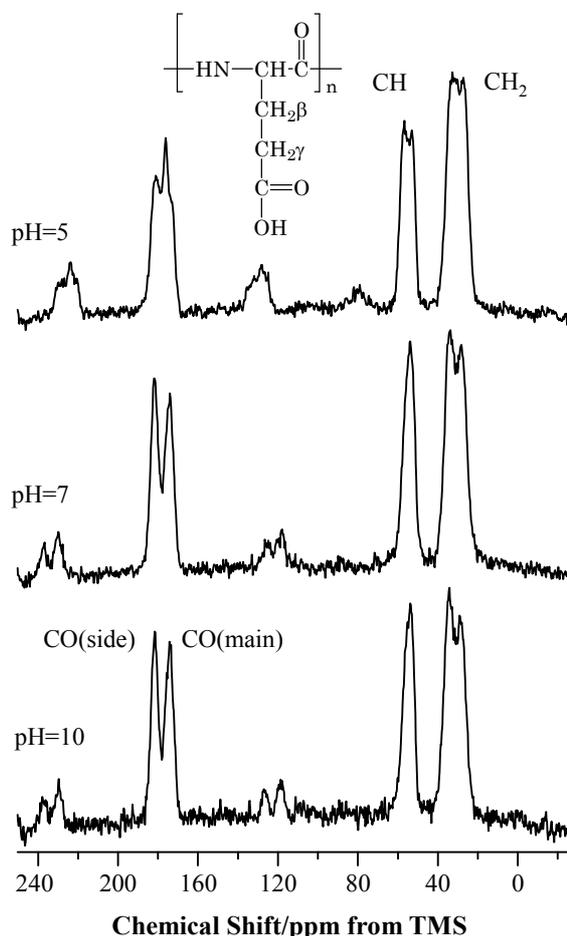


図2 各pHの水溶液から得られたPGAフィルムの固体CPMAS ¹³C NMRスペクトル
Fig. 2 Observed solid-state CPMAS ¹³C NMR spectra of PGA cast film obtained from each pH water solution.

pH=5のスペクトルを見ると、側鎖CH基によるピークが53 ppm と57 ppmの2本に分裂していることがわかる。さらに、主鎖CO基による(174 ppm)ピークも同様に173 ppmと176 ppmの2本に分裂している。このようなピークの分裂はpH=7と10の水溶液から得られたフィルムスペクトルでは観測されない。さらに側鎖CH₂基によるピークおよび側鎖CO基によるピーク(182 ppm)がほとんどpHの影響を受けないのに対し、主鎖¹³C核によるピークのみが分裂している。PGAは酸性条件下で側鎖カルボキシル基の解離が抑えられて電荷の反発が消滅し、 α -ヘリックス構造となる。中性から塩基性では側鎖カルボキシル基が解離して負電荷に帯電するため、電荷の反発によりランダムコイルとなることが知られている。つまりこのスペクトル変化は、PGAの2次構造変化が固体高分解能¹³C NMRスペクトルの化学シフト値の変化として観測されていることを示している。多くのペプチドやポリアミノ酸のNMR研究から、主鎖¹³C核によるピークの化学シフト値は2次構造の違いを鋭敏に反映して変化することが報告されている⁷⁻⁹⁾。したがって、176 ppmの主鎖CO基ピークならびに57 ppmに観測される主鎖

CH基のピークは α -ヘリックス構造由来のピークと帰属できる。

図3には、pH=5のPGA、PVP、PGA/PVP=1/1ブレンドのCO基領域とアリファティック(CH₂、CH)残基領域を拡大した固体高分解能CPMAS ¹³C NMRスペクトルを示した。PGAのT_{1ρ}^H値がPVPのT_{1ρ}^H値よりも短いため、1 msのCPコンタクト時間中にPGAの¹H磁化がPVPよりも速く減衰し、PGA/PVP=1/1ブレンドの固体高分解能CPMAS ¹³C NMRスペクトルは、PVPのピークが相対的に強調されて現れる。他のpHのスペクトルも同様の傾向を示した。また、PVPのスペクトルは、ここでは掲載していないが、pHに依存せず全く同じスペクトルを示した。ブレンド中のPGAのCO基ピークは、相対的に巨大なPVPのCO基ピークのために隠蔽されてしまう。そのため、PGA単体の場合のように、PGAの α -ヘリックス構造由来のCO基ピーク強度から α -ヘリックス含有量を算出することが困難である。しかしPGAの主鎖CH基はPVPのCH₂基ピークから分離して観測される。したがって、このピーク強度比からブレンド中のPGAの α -ヘリックス含有量を計算することが可能である。

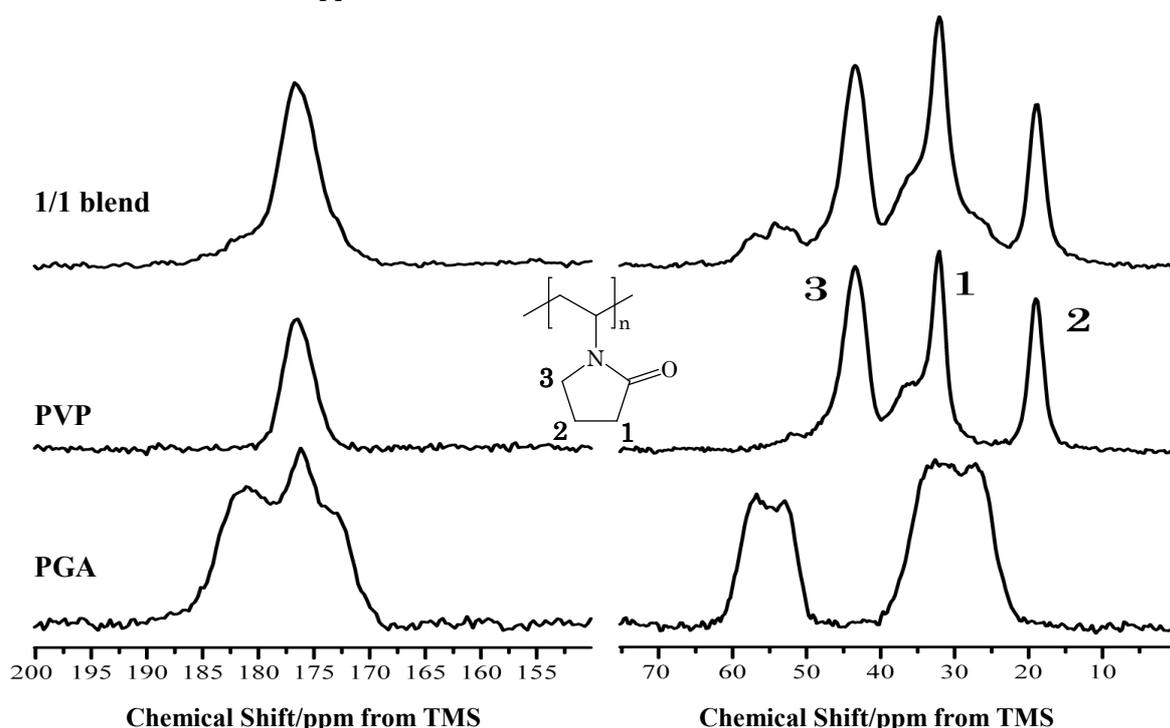


図3 pH=5の水溶液から得られたPGA、PVP、PGA/PVP=1/1ブレンドの固体CPMAS ¹³C NMRスペクトル (図中の数字はPVPの5員環CH₂基の帰属を示す)

Fig. 3 Observed solid-state CPMAS ¹³C NMR spectra of PGA, PVP, and the PGA/PVP=1/1 blend

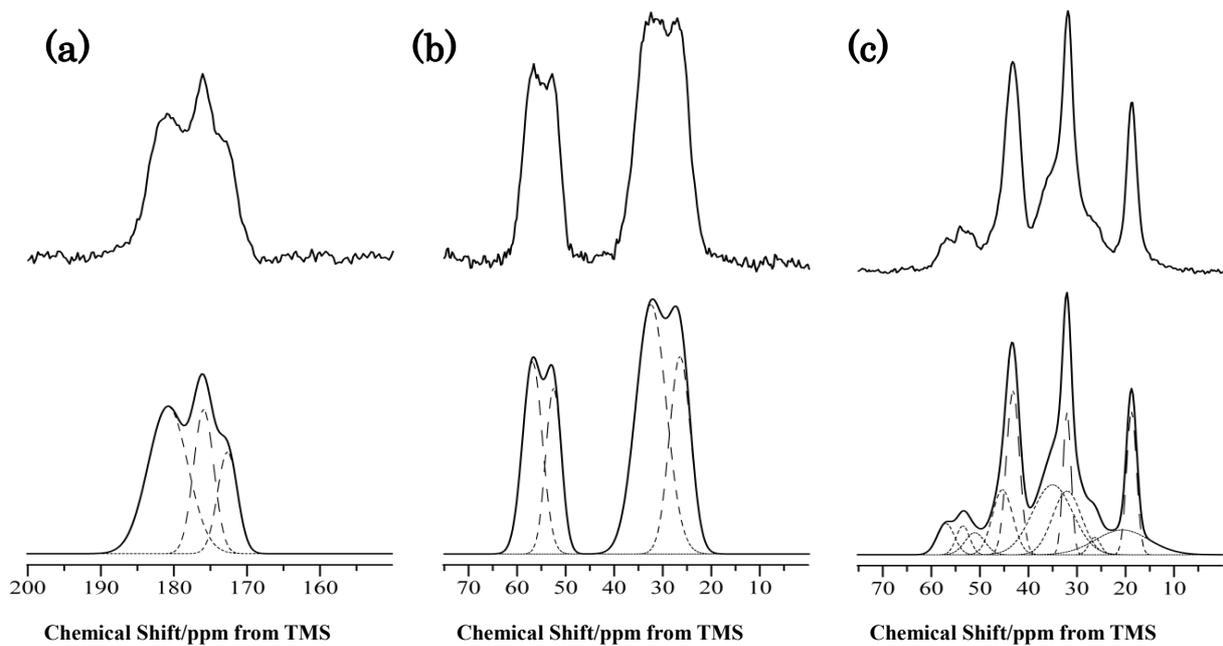


図4 pH=5における実測の固体CPMAS ^{13}C NMRスペクトル (上) とシミュレーション (下) ;
 (a) PGAのCO基シグナル領域、(b) PGAのアリファティック残基シグナル領域、
 (c) PGA/PVP=1/1ブレンドのアリファティック残基シグナル領域

Fig. 4 Observed (top) and simulated (bottom) CPMAS ^{13}C NMR spectra of PGA and the PGA/PVP=1/1 blend at pH=5; (a) CO region of PGA, (b) aliphatic region of PGA, (c) aliphatic region of the PGA/PVP=1/1 blend.

α -ヘリックス含有量を計算するために、得られた固体高分解能CPMAS ^{13}C NMRスペクトルを波形分離して各ピークに分離した。その各ピークの面積強度比から α -ヘリックス含有量を求めた。図4にPGAのCO基によるシグナル領域とアリファティック残基によるシグナル領域、PGA/PVP=1/1ブレンドのアリファティック残基によるシグナル領域それぞれの、実測のスペクトルとガウス関数を用いて行った波形分離の結果を共に示した。ガウス関数を用いた計算スペクトルと実測のスペクトルは非常に一致していることがわかる。

PGAの主鎖CO基領域の2つに分裂したピーク(173 ppmと176 ppm)の面積比より、pH=5でのPGAの α -ヘリックス含有量は約59%と計算できた。PGAの側鎖カルボキシル基の解離定数は $\text{p}K_a = 4.3$ であるため¹⁰⁾、pH=5では約半分のカルボキシル基が解離している。このことを踏まえると、 α -ヘリックス含有量が約59%であることは理にかなっていると言える。主鎖CH基の2つに分裂したピーク(53 ppmと57 ppm)の面積比からも約59%と求まる。これら両者から得られた値が一致することは当然である

が、この波形解析の結果より、CO基によるピーク、CH基によるピークどちらの面積比を用いても、求めた α -ヘリックス含有量に差が無いことがわかる。したがってブレンド中のCHピークから求められる α -ヘリックス含有量は、信頼し得る値である。図4(c)の53 ppmと57 ppmに観測されるピークの面積比から、ブレンド中の α -ヘリックス含有量は約58%という値が得られる。この値はブレンド前のPGAの α -ヘリックス含有量と等しい。このことは、pH=5においてPGAはPVPの影響をほとんど受けずに、 α -ヘリックスを形成することを示している。

次に、PGA/PVPブレンド中でPGAが α -ヘリックスを形成している時のPVPとの相溶性と、PGAが α -ヘリックスを形成していないときの相溶性を論じた。pH=7と10ではPGAは同じランダムコイル状態である。しかし側鎖カルボキシル基の解離度が異なるため、より解離してPGAが負電荷に帯電しているpH=10において、相溶性がどのような影響を受けているのかを調べることは、電荷状態と相溶性との関連性を知る上でも重要である。

数nmの相溶性を議論するため、回転座標系におけ

る¹H核のスピン-格子緩和時間 ($T_{1\rho}^H$) を¹³C核から間接的に求め論じた。

3.2 相溶性解析

図1のパルスシーケンス中、CP時間が長くなるとCPにより¹Hから¹³Cに磁化が分極すると同時に、 $T_{1\rho}^H$ に応じて¹H核の磁化が減衰するため、CPで¹H核のスピンエネルギーを分極される¹³C核の磁化も同様に減衰する。したがって、図1のパルスシーケンスでCP時間を変えて実験を行い、各ピークの強度変化をCP時間に対してプロットすれば、最初は交差分極により磁化の増加が観測され、次いで $T_{1\rho}^H$ に応じた減衰を観測することとなる。その実測の様子を図5に示した。

固体中の¹H核の緩和では、ブレンド中のPGAとPVPが数nmの近距離に存在する場合に、¹Hスピン拡散という現象によりエネルギー交換が起こる¹¹⁾。ブレンド後、PGAとPVPの分子運動に変化が無い場合には、互いの $T_{1\rho}^H$ 減衰速度が¹H核のモル比に応じた平均化を受け、PGA、PVP共に単体の $T_{1\rho}^H$ 値の中間値となる。しかし相溶が不十分な時には、ブレンド中で観測される $T_{1\rho}^H$ 値は完全には一致せず、単体の $T_{1\rho}^H$ 値から互いに近づいた減衰曲線となる。つまり、減衰曲線がPGA単体やPVP単体に比べてブレンド中でどの程度変化するか定量化すれば、相溶性の度合いを知ることが可能となる。

CPによる¹³C磁化の増大は、¹³C-¹Hの距離の3乗に反比例するため、CP時間が約1 msまでに観測される¹³C磁化の増大は、¹³C核に最も近い¹H核からの影響に左右され、どのpH領域においても磁化の増加速度に差は観測されない。

一方、CP時間が約1 ms以降の¹³C磁化の減衰は $T_{1\rho}^H$ を反映しているため、ポリマーの分子運動や¹H核の密度等に影響されて、PGA、PVP個別の減衰曲線を描く。ブレンド中のPGAとPVPの減衰は、pH=7においては互いによく一致している。一方、pH=5と10では完全には一致しないものの、ブレンド前の減衰に比べると互いに接近していることがわかる。

規格化された¹³C磁化の変化 ($dM_z(t)/dt$) は、CP時間内で起こる交差分極の速さを規定する交差緩和時間 T_{CH} と¹³Cの回転座標系における緩和時間 $T_{1\rho}^C$ 、そして $T_{1\rho}^H$ を用いて次式で表される⁶⁾。

$$\frac{dM_z(t)}{dt} = \frac{e^{-t/T_{1\rho}^H} - M_z(t)}{T_{CH}} - \frac{M_z(t)}{T_{1\rho}^C} \quad (1)$$

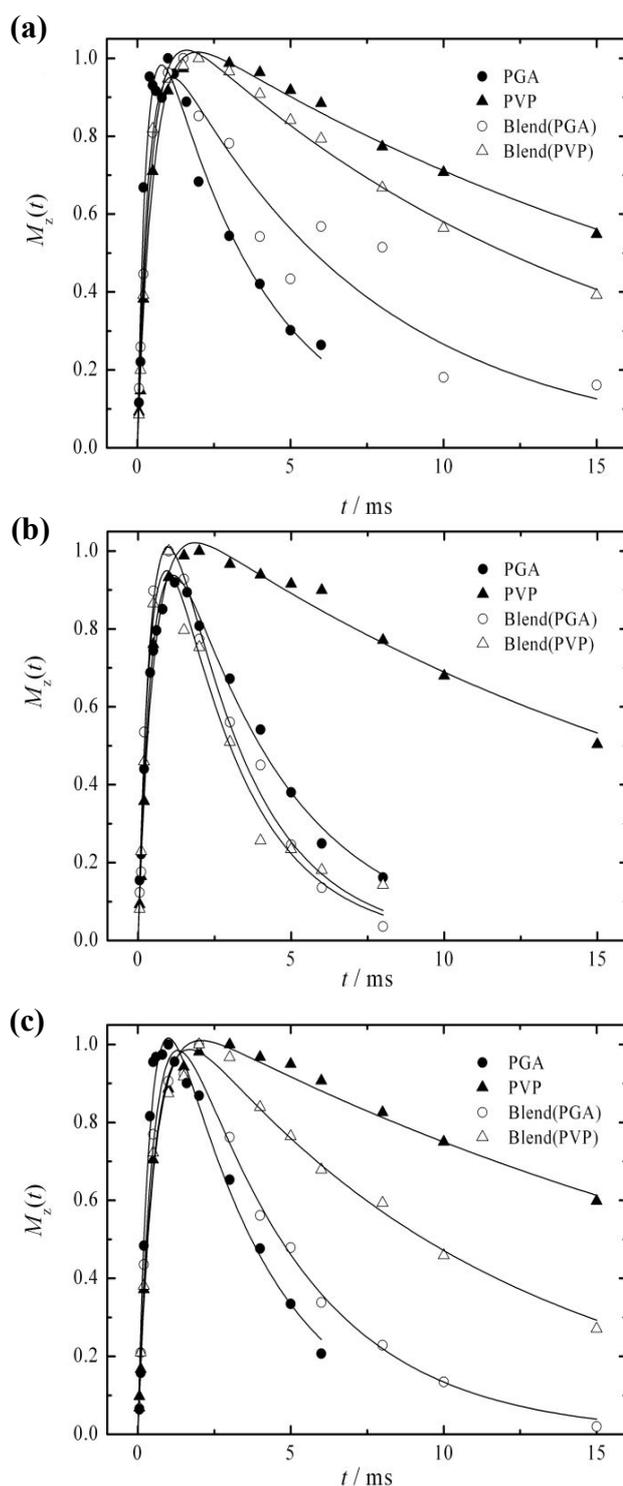


図5 CP時間に対する規格化された¹³C磁化の変化；主鎖CO基(a) pH=5, (b) pH=7, (c) pH=10
Fig. 5 The normalized ¹³C magnetizations against the CP contact time for the main-chain CO carbon: (a) pH=5, (b) pH=7, (c) pH=10.

通常 $T_{CH} \ll T_{1\rho}^H$ が成り立つので、(1) 式の微分方程式を解いてこの条件を適用すると、

$$M_z(t) \cong \left(\frac{1}{T_{CH}} \right) \frac{e^{-t/T_{1\rho}^H} - e^{-t/T_{CH}}}{1/T_{CH} - 1/T_{1\rho}^H} \quad (2)$$

を得る。

図5の実測データを式(2)を用いて T_{CH} と $T_{1\rho}^H$ をパラメータとし最小二乗フィットした。得られた理論曲線(図5中の実線)と実測のデータ点は非常によく一致していることがわかる。最小二乗フィットにより得られた $T_{1\rho}^H$ 値を表1に示した。

ブレンド前のPGAがpH=5で約5ms、その他で約3-4msであり、PVPは約20ms前後である。pHに依存して緩和時間の値が若干異なるが、これはPGAでは2次構造(α -ヘリックス)を形成している酸性側で運動がランダム状態より遅いことを示しており、PVPにおいては酸性と塩基性においてPVPの電荷状態が中性領域と比較して若干変化するため分子運動が変化しているものと推察される。ブレンド中では、pH=7の中性でPGA、PVPともに2.5msとなり一致した。その一方、pH=5と10ではPGAは単体の値より若干長くなり、PVPはより短い値を示した。

固体中において、 1H 核の緩和時間はスピン拡散の影響を受ける。この影響が顕著になるのは、 $T_{1\rho}^H$ を観測した場合には、異なるポリマー同士が数nmの距離に均一なドメインを構築している時である¹¹⁾。したがって、pH=7のブレンド中で観測されたようにPGAの $T_{1\rho}^H$ 値とPVPの $T_{1\rho}^H$ 値が一致する現象は、PGAとPVPが数nmのドメイン内で均一に接近していることを示し、NMRの観測からは相溶であると言える。さらにブレンド中の $T_{1\rho}^H$ 値はブレンド前のPGAとPVPの中間値ではなく、PGAよりもさらに速く減衰(短い値)していることから、非常に均一度が高い状態において分子運動が劇的に変化していることを示している。

表1の $T_{1\rho}^H$ 値から、どの程度ブレンドが相溶であるかの目安を次式より求めることが可能である¹²⁾。

$$\left\{ 1 - \frac{\text{Blend}(T_{1\rho}^H - T_{1\rho}^H)}{\text{pure}(T_{1\rho}^H - T_{1\rho}^H)} \right\} \times 100\% \quad (3)$$

上式は、ブレンド前に存在するポリマー単体(pure)同士の緩和時間の差が、ブレンド後にどの程度一致しているかを表す。ブレンド後、PGAとPVPの緩和

表1 PGA、PVP、PGA/PVP=1/1ブレンドの各pHにおける $T_{1\rho}^H$ 値(ms)

Table 1 Obtained $T_{1\rho}^H$ values (ms) for PGA, PVP, and PGA/PVP=1/1 blend at each pH.

	pH=5	7	10
PGA	4.6±0.2* 5.4±0.2**	3.7±0.2	3.2±0.4
PVP	21.1±1.4	19.4±1.5	24.8±1.5
Blend			
PGA	6.7±0.9**	2.5±0.3	4.0±0.3
PVP	14.1±0.9	2.5±0.3	10.5±0.7

*: Obtained from the peak at 176 ppm.

** : Obtained from the peak at 173 ppm.

時間が一致すれば相溶度は100%となり、全く一致しなければ0%となる。式(3)と表1から、pH=5では54% (173、176 ppm両方の値から計算し、平均値を求めた)、pH=7で100%、pH=10で70%の相溶度と計算される。

pHが中性の領域において数nmのドメイン内でPGAとPVPが均一に混ざり合うことが示された。酸性下では約58%のPGAが α -ヘリックスを形成する。その他はランダム状態であるため、この部分とPVPが数nmのドメイン内で均一となると考えられる。相溶度が最も低く算出されるのは、PGAが独立に α -ヘリックスを形成しているためである。塩基性において相溶度が若干低下するのは、PGAの電荷が関係していると考えられる。塩基性ではPGAの側鎖がほぼ全て解離し、pHが中性領域のランダム状態よりもPGAは全体的により多く負に帯電する。そのため、同じランダムコイルでも電荷が帯電しているポリマーと帯電していないポリマー同士では、相溶性が劣ると考えられる。

4. まとめ

PGA/PVPブレンドにおいて、PGAが2次構造を形成している場合、形成していない部分が相溶状態となる。また、両者がランダム状態となっている場合では、PGAが負電荷に帯電し過ぎているとPVPと反発し、相溶性が低下する。そのためpHが中性の時に最もよく相溶すると考えられる。イオンコンプレックスのように一方が正電荷に帯電するポリマーであれば、ランダム状態でもクーロン力によりコンプレックスを形成すると考えられるが、電荷を持たないPVPのような場合には反発することが明らかとなった。

参考文献

- 1) “高分子ナノ材料”, 西敏夫, 中嶋健 著, 共立出版, 2005年.
- 2) T. Kurotu, *Inor. Chim. Acta*, 1992, **191**, 141.
- 3) A. Pines, M.G. Gibby, and J.S. Waugh, *J. Chem. Phys.*, 1973, **59**, 569.
- 4) J. Schaefer, E.O. Stejskal and R. Buchdahl, *Macromolecules*, 1975, **8**, 291.
- 5) A.E. Bennet, C.M. Rienstra, M. Auger, and K.V. Lakshmi, R.G. Griffin, *J. Chem. Phys.*, 1995, **103**, 6951.
- 6) E.O. Stejskal, J. Schaefer, M.D. Sefcik and R.A. McKay, *Macromolecules*, 1981, **14**, 275.
- 7) “高分子の固体NMR”, 安藤勲 編, p.127, 講談社サイエンティフィック, 1994年.
- 8) H. Saito, R. Tabeta, A. Shoji, T. Ozaki, and I. Ando, *Macromolecules*, 1983, **16**, 1050.
- 9) I. Ando, H. Saito, R. Tabeta, A. Shoji, and T. Ozaki, *Macromolecules*, 1984, **17**, 457.
- 10) 真鍋敬、電気泳動 in “新生化学実験講座1 タンパク質 I” 日本生化学会編, 1990, 12章, p.329.
- 11) A. Asano and K. Takegoshi, *Polymer Blends and Miscibility* in “Solid State NMR of Polymers” I. Ando and T. Asakura Eds., Elsevier Science B.V., 1998, Chapter 10, p.351.
- 12) 浅野敦志, 竹腰清乃理, 引地邦男, 表面, 1993, 31, 835.