

## アルブチンの酸化重合によるポリフェノールの合成と展開

(岩手大理工) 芝崎祐二

**【要旨】** 梨の皮に含まれるアルブチンは天然フェノールとして知られ、メラミン色素の沈着を防ぐことから広く、美白化粧品として製品化されている。このアルブチンをトリス塩酸塩緩衝溶液中で銅アミン触媒を用いて酸化カップリング重合を試みたところ、ほぼ完全な C-C カップリング生成物である高分子量のポリアルブチンが高収率で得られた。このポリマーは主鎖がポリフェニレンと非常に硬い骨格をしており、側基としてフェノール性水酸基ならびにグルコース基を有する水溶性ポリマーである。フェノール性水酸基の一部をアルキルイソシアネートと反応させることで定量的なアルキル化が可能であった。得られたアルキル化ポリアルブチンは選択溶媒中にてミセルを形成し、その剛直な骨格のため、ワーム状の特殊なモルフォロジーをとることを明らかとした。ミセル内部にはフェノール性水酸基が残存しており抗酸化特性、抗菌性を示すとともに、表面は完全にグルコースでおおわれており、MTT 試験により、マウス由来の L929 細胞、ならびにヒト由来の HeLa 細胞において、無毒であった。

**【緒言】** 天然において、フェニルアラニンから誘導されるフェニルプロパノイド類の酵素酸化重合により、リグニンの生合成が行われている。天然を模倣した酵素触媒重合は広く研究されているが、酵素が高価であること、酵素触媒反応が可逆反応であること、重合条件が非常に限られることなどから、工業的な展開は困難である<sup>1)</sup>。我々は天然フェノールの工業的な酸化カップリング重合の実現に興味を持ち、様々な天然フェノール類の重合を検討してきた。その結果、梨の皮に含まれるアルブチン (Arb) を緩衝溶液中で銅触媒を用いて酸化カップリング重合することで、選択的 C-C カップリング反応を経るポリフェノール (主鎖はポリフェニレン) の合成を達成した<sup>2)</sup>。本発表ではアルブチンの酸化重合、得られるポリマーの特性、アルキル化によるミセル形成能の付与、抗酸化特性、抗菌特性について述べる<sup>3),4)</sup>。

**【実験】 試薬 :** Arb、塩化銅—テトラメチルエチレンジアミン錯体 (CuCl-TMEDA)、その他の試薬、溶媒は東京化成工業から購入したものをそのまま用いた。**重合 :** pH9.0 のトリスヒドロキシメチルアンモニウム (トリス塩酸塩) 緩衝液を調整し、攪拌子を入れたナスフラスコに塩化銅 0.00403 g (0.0407 mmol) を加え、これを溶媒として攪拌した。ここにアルブチン 0.544 g (2.00 mmol) を加え、所定温度で所定時間攪拌した。反応終了後、溶液を透析フィルムに移し、イオン交換水を用いて透析、内容物を凍結乾燥し、茶色の繊維状固体を得た。

### 【結果と考察】

#### 1. ポリマーの合成

様々な条件下での Arb の酸化重合の結果を表 1 にまとめた。水中での重合を行うため、銅イオンに塩化銅、配位子としてエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) を用いて 80°C で 4 日間反応させた。しかしこの条件ではポリマーは得られなかった。塩化銅にテトラメチルエチレンジアミンを配位子と

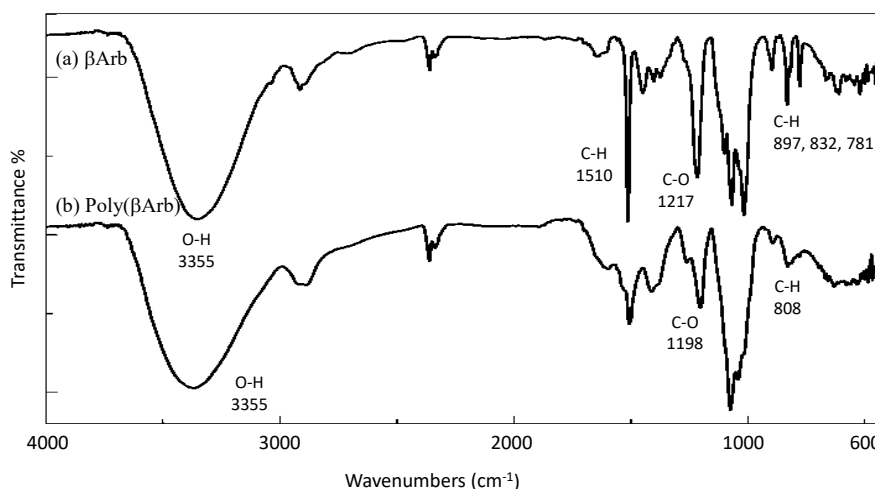
**Table 1.** Polymerization of arbutin<sup>a</sup>

Run	Solvent	Catalyst	Amine	Yield (%)	$M_n^d$	$M_w/M_n^d$
1 <sup>b</sup>	Water	CuCl <sub>2</sub>	EDTA	< 1	-	-
2 <sup>b</sup>	Water	CuCl <sub>2</sub>	EDTA + TMEDA	< 1	-	-
3 <sup>b</sup>	Water	CuCl <sub>2</sub>	TMEDA	10.2	3,600	1.7
4 <sup>b</sup>	Tris-HCl buffer	Cu-TMEDA	-	58.0	5,950	1.6
5 <sup>c</sup>	Tris-HCl buffer	CuBr	-	22	2,000	2.2
6 <sup>c</sup>	Tris-HCl buffer	CuI	-	7.0	1,400	1.7
7 <sup>c</sup>	Tris-HCl buffer	CuOAc	-	15	2,300	1.8
8 <sup>c</sup>	Tris-HCl buffer	CuCl <sub>2</sub>	-	4.0	4,400	1.5

<sup>a</sup> Catalyst 8 mol%. [Ligand] / [catalyst] = 2. [Arb] = 0.6 mol/L under O<sub>2</sub> atmosphere. <sup>b</sup> 80 °C for 4 days. <sup>c</sup> 60 °C for 24 h. Determined by GPC (NMP with LiBr, PSt standards).

して用いたところ、収率の向上が認められた。酵素重合での条件を参考に、トリス塩酸塩緩衝溶液を溶媒として、CuCl-TMEDA 錯体を用いて重合を行ったところ、収率、分子量の大幅な改善が認められた。そこでこの触媒と重合溶媒を最適条件として重合温度、重合時間を検討したところ、80°Cで4日間の重合で、数平均分子量 7,240 の高分子量体の合成を達成した。

得られたポリマーの赤外吸収スペクトルを測定したところ、3355 cm<sup>-1</sup>に O-H、2913 cm<sup>-1</sup>に C-H、1510 cm<sup>-1</sup>に C=C、1198 cm<sup>-1</sup>に Ph-OAli、808 cm<sup>-1</sup>に C-H の吸収がそれぞれ観測された (図 1)。モノマーにはこれらに加えて 897, 832, 781 cm<sup>-1</sup>に C-H の偏角振動に由来する吸収が認められることから、重合が C-C カップリングで進行したと考えられる。また、図 2 にはモノマーとポリマーの <sup>1</sup>H-NMR スペクトルを示す。3.5 ppm 付近に観測されている糖の CH<sub>2</sub> の水素の積分比を 6 とした際、モノマーではフェニル水素が 4 であるが、ポリマーでは 1.8 であることから、C-C カップリング重合がほぼ選択的に進行していることを確認した (式 1)。図 3 には、ポリマーの <sup>13</sup>C-NMR スペクトルを示す。フェノーラートが生成した場合、h 位でカップリングすると考えられるが、g', h' の強度はともに同等に低下している。このことは、反応がフェノーラートを經由しないラジカル付加反応であることを示唆している。したがって、ポリマーの C-C 結合位置は、OH



**Figure 1.** FT-IR (KBr) spectra of (a)  $\beta$ -Arb and (b) poly( $\beta$ -Arb).

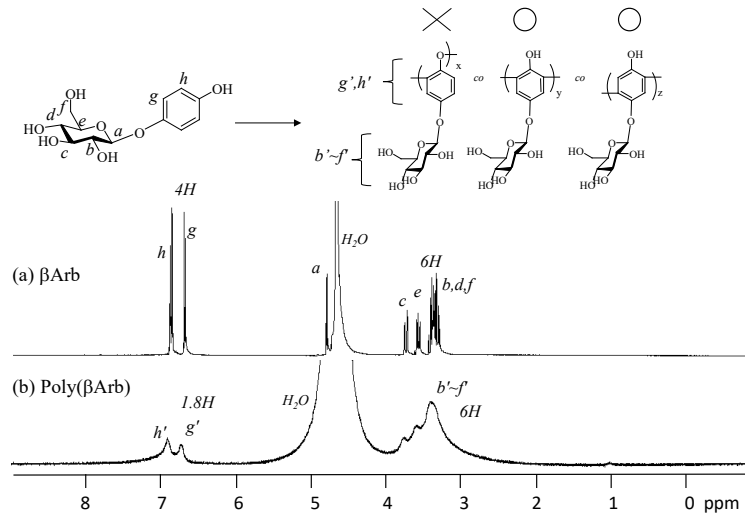


Figure 2. <sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O) spectra of (a) βArb and (b) poly(βArb).

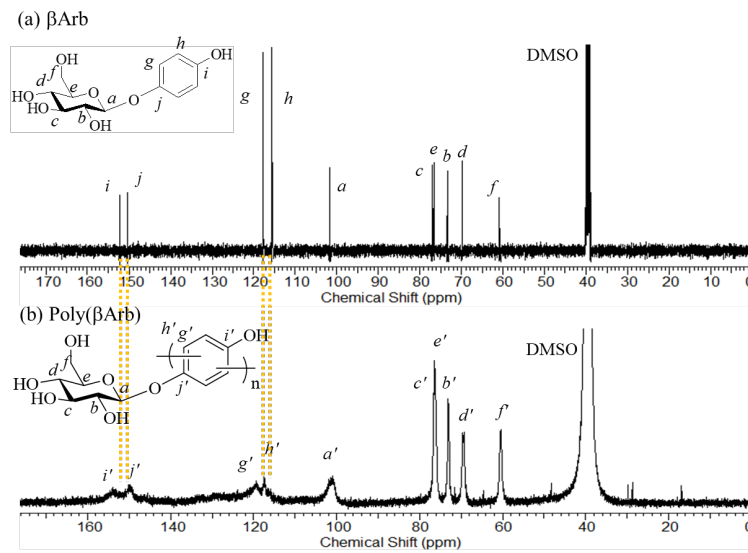
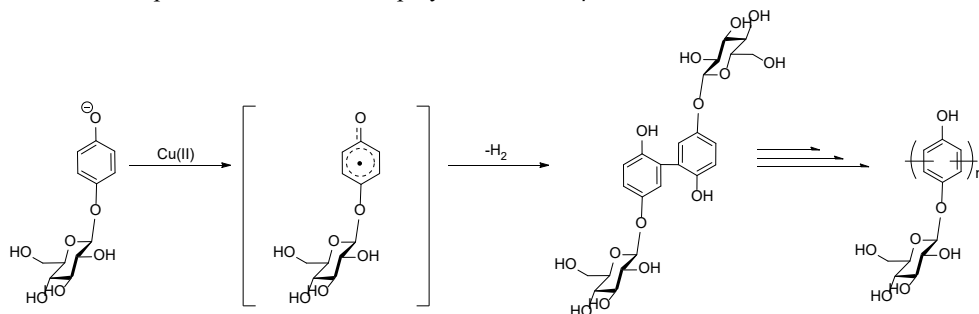


Figure 3. <sup>13</sup>C NMR spectra of (a) Arb, (b) poly(Arb) in DMSO-*d*<sub>6</sub>.

Scheme 1. Proposal mechanism of the polymerisation of βArb



のオルト位ならびにメタ位が混在しており、正確なカップリング位置の決定は困難であると言える。

2. アルキル化ポリマーの合成

合成したポリマーは主鎖がポリフェニレンで、すべてのユニットにフェノール性水酸基とグルコース基が存在する。ポリフェノールには抗菌性や抗酸化性があることが報告されていることから、合成したポリアルブチンにも抗酸化特性、抗菌活性が期待できる<sup>9)</sup>。また、フェノールにアルキル基を部分的に導入してミセルを形成させれば、ミセル内部が抗酸化雰囲気中で表面がグルコースに完全に覆われた生態的合成組織体を形成できると考えられる。そこでまず、フェノール性水酸基へのアルキル鎖の導入について検討した。

表2に、アルキルハライドを用いたS<sub>N</sub>2反応による各種アルキル基の導入反応結果をまとめた。ポリマーをDMFに溶解し、各種塩基存在下、室温24時間の条件でアルキル化反応を行い、アルキル基の導入をNMRスペクトルから計算した。

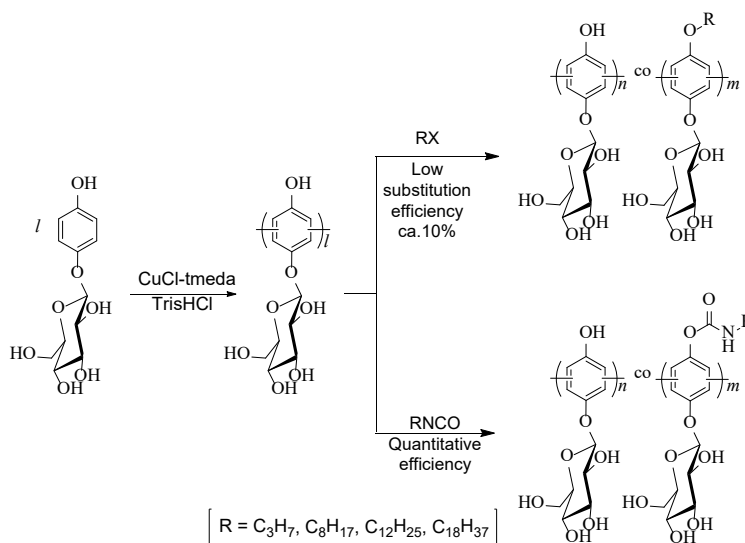
**Table 2.** Partially OH protected poly(Arb)<sup>a)</sup>

RX	Base	RX/ArOH (equiv.)	Yield (%)	Alkylation <sup>b)</sup> (%)
CH <sub>3</sub> I	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1	26	—
		1	46	3.0
	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	6	16	8.0
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> Br	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.5	46	5.8
		1	49	10.5
	KOH	6	17	13.6
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>15</sub> Cl	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1	10	2.0

a) Condition; polymer = 0.200 g, DMF = 1 mL at r.t. for 24 h. b) Calculated by <sup>1</sup>H NMR.

しかしながらアルキル基の導入率は非常に低く、これはDMF中でポリマー内の隣接するヒドロキシル基が水素結合により強く会合しており、アルキルハライドへの求核反応性を大きく低下させているためであると考えた。

そこで、アルキルイソシアネートを用いる付加反応を検討した。図4には、ポリアルブチンに対してトリエチルアミンを触媒に用いたオクチルイソシアネート(アルブチンOHに対して10 mol%)との反応前後の<sup>1</sup>H-NMRスペクトルを示す。0.9、1.2 ppm付近にアルキル基末端シグナルが観測され、その積分強度からアルキル基の導入量を計算すると約7.3%であった。このとき、糖の6位のαメチレンシグ



**Scheme 2.** Alkylation of pol(Arb)

ナル強度に変化がないことから、イソシアネートはポリマー中のフェノール性水酸基とほぼ定量的に反応したと考えられる。表3に高分子反応の結果をまとめた。オクチルイソシアネートのフェノール性水酸基に対する仕込み比を10:100から90:100まで変化させたところ、ポリマー中のOHとアルキル基の組成比は7.3:100から98.7:100であり、ほぼ望みのアルキル鎖の導入が可能であるといえる。一部、仕込み比よりも過剰のアルキル鎖の導入が認められたが、これは、ポリマーの精製時に、導入率の低いポリマー鎖が除去されたためであると考えられる。

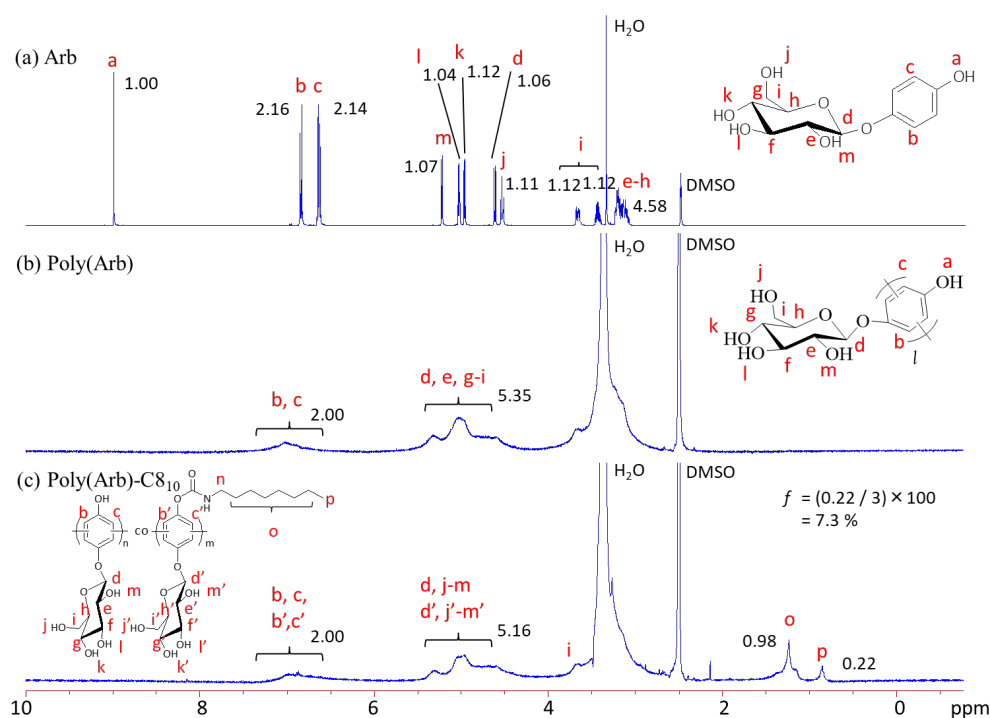


Figure 4.  $^1\text{H}$  NMR spectra of (a)Arb, (b)poly(Arb), (c)poly(Arb)-C8<sub>10</sub> in DMSO-*d*<sub>6</sub>

Table 3. Alkylation of poly(Arb) using alkyl isocyanate (RNCO)

Run	Polymer <sup>a</sup>	Yield (%)	$M_n^b$	$M_w/M_n^b$	OH in poly(Arb) : RNCO	
					feed	DS <sup>c</sup>
1	Poly(Arb)-C8 <sub>10</sub>	63.4	6,470	1.55	1 : 0.10	7.3
2	Poly(Arb)-C8 <sub>20</sub>	63.7	6,640	1.53	1 : 0.20	20.0
3	Poly(Arb)-C8 <sub>30</sub>	85.5	6,500	1.54	1 : 0.30	33.1
4	Poly(Arb)-C8 <sub>40</sub>	68.3	6,570	1.52	1 : 0.40	44.3
5	Poly(Arb)-C8 <sub>50</sub>	83.1	6,900	1.41	1 : 0.50	54.2
6	Poly(Arb)-C8 <sub>70</sub>	78.6	7,110	1.38	1 : 0.70	74.0
7	Poly(Arb)-C8 <sub>90</sub>	70.3	7,180	1.39	1 : 0.90	98.7
8	Poly(Arb)-C3 <sub>10</sub>	49.0	4,350	1.58	1 : 0.10	11.1
9	Poly(Arb)-C3 <sub>30</sub>	30.9	4,530	1.56	1 : 0.30	25.0
10	Poly(Arb)-C3 <sub>50</sub>	57.9	4,810	1.53	1 : 0.50	41.9
11	Poly(Arb)-C12 <sub>10</sub>	61.7	6,340	1.56	1 : 0.10	9.8
12	Poly(Arb)-C12 <sub>30</sub>	47.6	7,289	1.52	1 : 0.30	23.1
13	Poly(Arb)-C12 <sub>50</sub>	66.9	7,470	1.54	1 : 0.50	31.3
14	Poly(Arb)-C18 <sub>10</sub>	65.3	7,780	1.46	1 : 0.10	8.4
15	Poly(Arb)-C18 <sub>30</sub>	75.6	8,010	1.45	1 : 0.30	16.0
16	Poly(Arb)-C18 <sub>50</sub>	78.6	8,200	1.67	1 : 0.50	23.2

<sup>a</sup> The  $M_n$ s of the starting poly(Arb)-C8<sub>x</sub>, poly(Arb)-C12<sub>x</sub> and poly(Arb)C3<sub>x</sub> were 4180 and 5950, respectively. <sup>b</sup> Determined by GPC (NMP with LiBr, PSt standards). <sup>c</sup> Degree of substitution of OH group calculated by  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>).

### 3. アルキル化ポリマーのミセル形成能の評価

続いてこのポリマーのミセル形成能について評価した。図5には各種ポリマーの動的  
光散乱測定結果を示している。アルキル側鎖が短い poly(Arb)-C3<sub>10</sub> では直径 257.8 nm の

凝集体が観測されるがその分布は比較的大きい。一方、より長いアルキル鎖を有する poly(Arb)-C8<sub>10</sub> では凝集体のサイズは 615 nm と大きいものの、その分布は比較的小さい。図中にポリマーの模式図を示しているが、アルキル側鎖が十分に長くないと安定なミセルが形成できないと考えられる。なお、置換度に応じてミセルサイズは減少した。

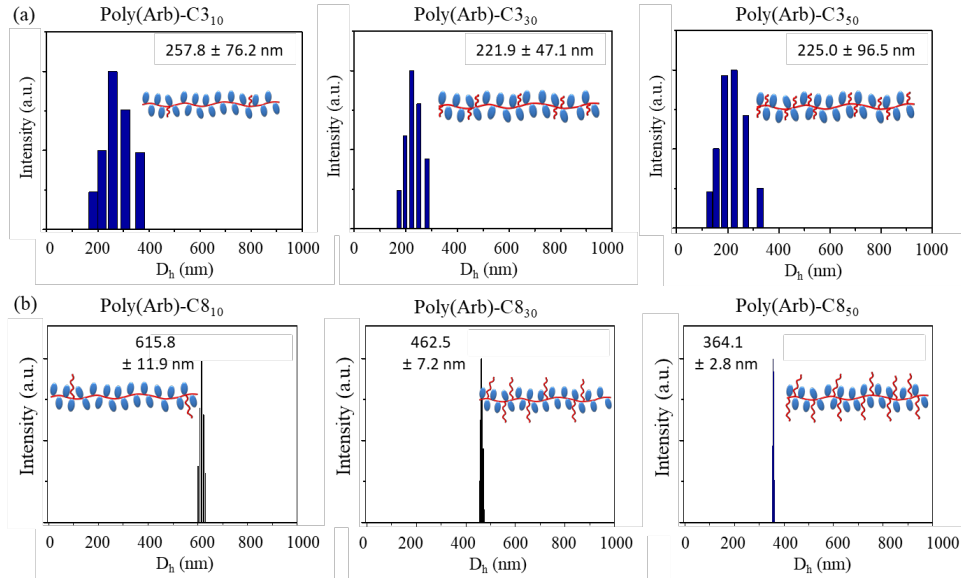


Figure 5. DLS profiles of alkylated poly(Arb) in water

臨界ミセル濃度を決定するため、ポリマー水溶液の界面張力を測定した。図6には、プロピル C3、オクチル C8、ドデシル C12、オクタデシル C18 置換基を約 10 mol% 有するアルキル化ポリマーの界面張力とポリマー濃度の関係をプロットしたものである。いずれのプロットにおいても水の界面張力である 72 mN/m からポリマーの濃度とともに減少し、ある濃度でその傾きが変わっている。この変曲点を臨界ミセル濃度 CMC として決定した。CMC は、アルキル基が長いほど低くなる傾向を示し、3.5 から 5.0 mg/mL の値であった。この値は、一般的な界面活性剤、たとえばラウリル硫酸ナトリウムの CMC (1.730 mg/mL) と同等の値である。

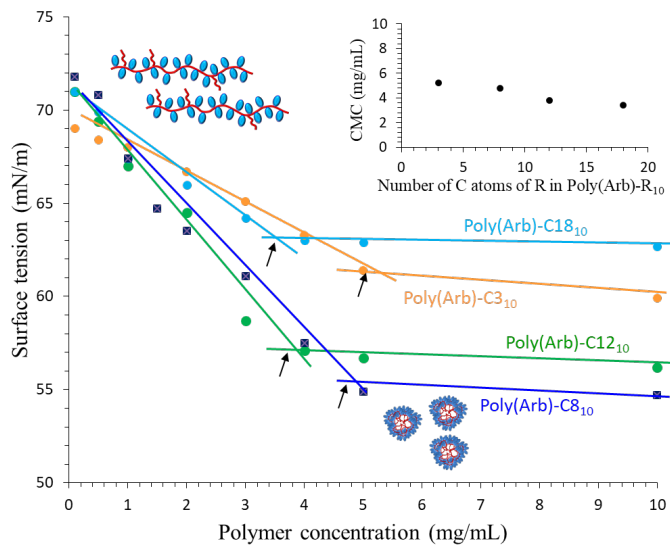


Figure 6. Surface tension vs polymer concentration of polymers

図7には、アルキル置換度と CMC の関係を調べたものである。無置換のポリアルブチンでは、ポリマーの濃度によらず界面張力は一定であるが、アルキル鎖の導入とともに、界面張力は低下する傾向を示した。また CMC は、PArb-C8<sub>30</sub> で最小値である 1.5 mg/mL を示し、ミセル形成には疎水基と親水基のバランスが重要であると言える。

図7には調整したミセルの電子顕微鏡写真を示す。C3 置換基の場合、10 mol%では観測されたミセルはロッド状であり、その直径は約 13.6 nm であった。置換度とともにミ

セル直径は増加し、また、会合ども増加している。C8 置換基では直径 53.1 nm のロッド状ミセルが湾曲した構造体であるが、C12、C18 では再び細いロッド状ミセルとなっている。親水性部位が支配的な両親媒性ポリマーでは通常、球状ミセル構造をとるが、我々の合成したポリアルブチンでは、その主鎖骨格が非常に硬いポリフェニレンであることから、球状ミセルを形成することができずロッド状になり、それが湾曲した球状体を形成しやすかったといえる。

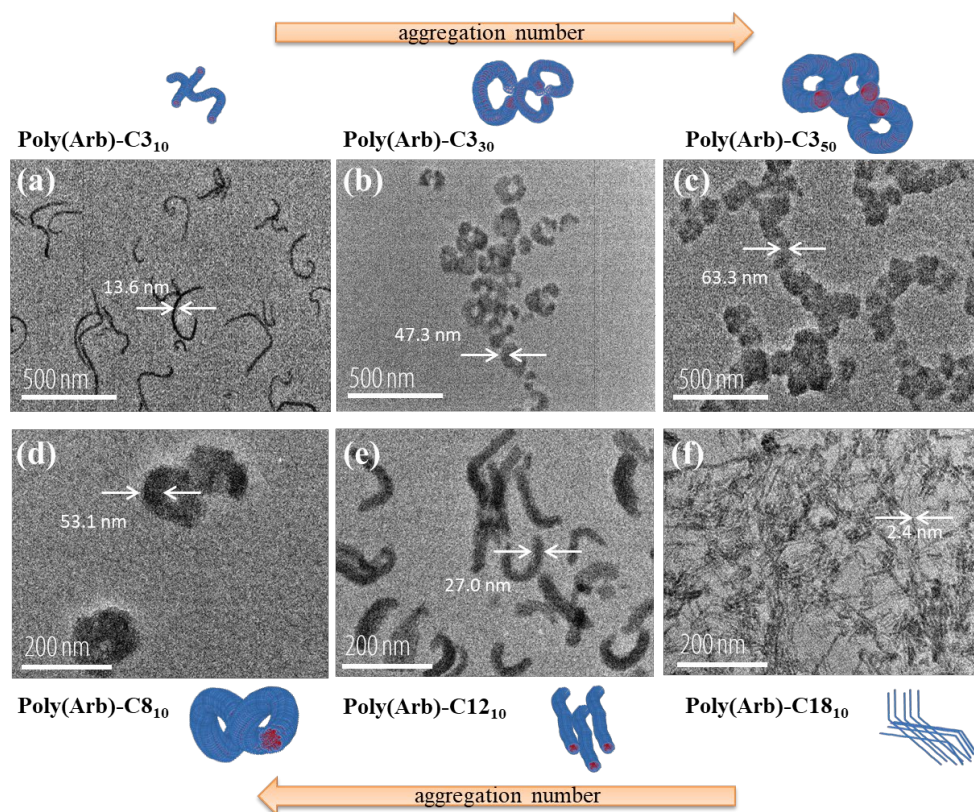


Figure 7. TEM images of alkylated poly(Arb)s

#### 4. ポリマーの毒性評価

今回合成したポリマーがミセル形成能を有していることから、このポリマーは生体内でキャリアーとして機能することが期待される。その際、ポリマーの毒性を調べておくことは大変重要である。そこで、ポリマーの毒性を MTT 試験により調査した。各細胞 7000 株を容器に入れ、24 時間培養し、ここにポリマー (poly(Arb)-C8) 溶液を加え、さらに 24 時間培養した (図 8)。アルキル置換度を 10 から 30 mol%まで増大させたサンプルを濃度 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  から 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  まで変化させて用いたが、いずれのポリマーにおいても、両細胞に対して毒性はほとんどないといえる。このことは、細胞にやや有害であると考えられるフェノール性水酸基はミセルの内側に完全に隠れており、ミセルの表面がほぼ完全にグルコースで被覆されていることを示唆している。

以上の結果は、合成したポリマーが生体的合成材料として、ドラッグキャリアーとなりうることを示しており、新たな抗酸化性を有するキャリアーの開発を期待させるものである。

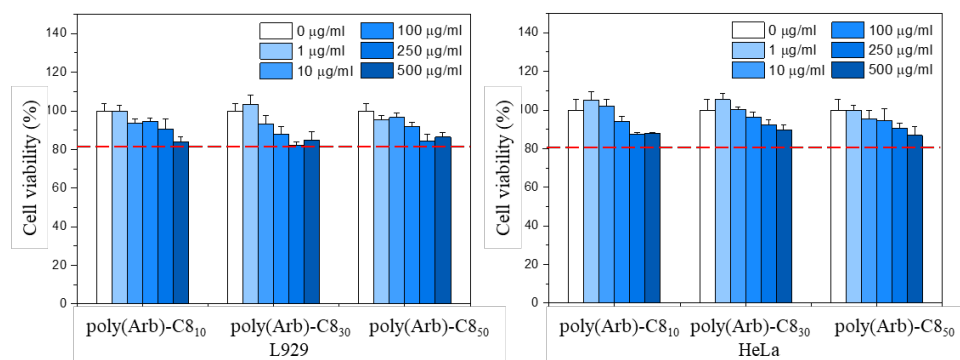


Figure 8. MTT assay of alkylated poly(Arb)s against L929 and HeLa cells

**【結論】** 本研究では、梨の皮に含まれるアルブチンをトリス塩酸塩緩衝溶液中で銅アミン触媒を用いて酸化カップリング重合することで、ほぼ完全な C-C カップリング生成物である高分子量のポリアルブチン合成法を明らかとした。このポリマーは主鎖がポリフェニレンと非常に硬い骨格をしており、側基としてフェノール性水酸基ならびにグルコース基を有する水溶性ポリマーであり、フェノール性水酸基の一部をアルキルイソシアネートと反応させることで定量的なアルキル化が可能であった。さらに得られたアルキル化ポリアルブチンは選択溶媒中にてミセルを形成し、その剛直な骨格のため、ワーム状の特殊なモルフォロジーをとるとともに、MTT 試験により、マウス由来の L929 細胞、ならびにヒト由来の HeLa 細胞において、無毒であることを明らかとした。

#### 【参考文献】

- [1] (a) S. Kobayashi, S. Kimura, *Enzymatic Polymerization*, Chem. Rev. 2001, 101, 3793-3818.  
(b) R.A. Gross, A. Kumar, B. Kalra, *Polymer synthesis by in vitro enzyme catalysis*, Chem. Rev. 2001, 101, 2097-2124. (c) S. Kadokawa, *Polymer synthesis by enzymatic catalysis*, Curr. Opin. Chem. Biol. 2010, 14, 145-153.
- [2] M. Hashimoto, S. Iwabuchi, Y. Oishi, Y. Shibasaki, *Water-soluble polyphenol synthesis via oxidative coupling polymerisation of  $\beta$ -arbutin with copper catalyst in alkaline media*, Europ. Poly. J. 2016, 81, 152-160.
- [3] A. Seto, R. Kajiwara, J. Song, E. Shin, B.S. Kim, H. Kofujita, Y. Oishi, Y. Shibasaki, *Preparation of Glycoside Polymer Micelles with Antioxidant Polyphenolic Cores Using Alkylated Poly(arbutin)s*, RSC Advances in press.
- [4] R. Kajiwara, A. Seto, H. Kofujita, Y. Shiba, Y. Oishi, Y. Shibasaki, *Enhanced antimicrobial activities of polymerized arbutin and its derivatives prepared by oxidative polymerization of arbutin*, React. & Funct. Polym. in press.
- [5] X. Chen, E. Mukwaya, M.S. Wong, Y. Zhang, *A systematic review on biological activities of prenylated flavonoids*, Pharm. Biol. 52 (2014) 655-660.