

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2011-237291

(P2011-237291A)

(43) 公開日 平成23年11月24日(2011.11.24)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 21/78 (2006.01)	GO 1 N 21/78 C	2 G O 4 2
CO 8 G 69/48 (2006.01)	CO 8 G 69/48	2 G O 5 4
GO 1 N 31/00 (2006.01)	GO 1 N 31/00 V	4 C O 8 3
A 6 1 K 8/88 (2006.01)	GO 1 N 31/00 Y	4 J O O 1
	A 6 1 K 8/88	
審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 12 頁)		

(21) 出願番号	特願2010-109161 (P2010-109161)	(71) 出願人	309007911
(22) 出願日	平成22年5月11日 (2010.5.11)		サントリーホールディングス株式会社
			大阪府大阪市北区堂島浜二丁目1番40号
		(74) 代理人	100083301
			弁理士 草間 攻
		(72) 発明者	王 飛
			大阪府三島郡島本町若山台1-1-1 サ
			ントリー生物有機科学研究所内
		(72) 発明者	石黒 正路
			大阪府三島郡島本町若山台1-1-1 サ
			ントリー生物有機科学研究所内
		(72) 発明者	堀川 学
			大阪府三島郡島本町若山台1-1-1 サ
			ントリー生物有機科学研究所内
		Fターム(参考)	2G042 BD10 BD19 DA08
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 架橋γ-ポリグルタミン酸の架橋構造の解析方法

(57) 【要約】

【課題】 γ-ポリグルタミン酸のγ線照射により得られる架橋γ-ポリグルタミン酸について、その架橋構造の解析方法の提供。

【解決手段】 解析すべき架橋γ-ポリグルタミン酸を加水分解して得られる2-ケトグルタル酸量とグルタミン酸量の比率を求め、

一方、解析すべき架橋γ-ポリグルタミン酸中の一本鎖γ-ポリグルタミン酸のN末端に存在するグルタミン酸量を求め、架橋γ-ポリグルタミン酸中のグルタミン酸量をN末端グルタミン酸量で除することにより架橋γ-ポリグルタミン酸における一本鎖γ-ポリグルタミン酸中のグルタミン酸ユニット数を求め、

得られたグルタミン酸ユニット数と、2-ケトグルタル酸及びグルタミン酸の比率より架橋γ-ポリグルタミン酸における一本鎖γ-ポリグルタミン酸当たりの2-ケトグルタル酸の存在数を求め、さらに、

得られた2-ケトグルタル酸の存在数から架橋構造を解析する方法。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

γ －ポリグルタミン酸を γ 線照射することにより製造された架橋 γ －ポリグルタミン酸の架橋構造を解析する方法において、

解析すべき架橋 γ －ポリグルタミン酸を加水分解して得られる 2－ケトグルタル酸量とグルタミン酸量の比率を求め、

一方、解析すべき架橋 γ －ポリグルタミン酸中の一本鎖 γ －ポリグルタミン酸の N 末端に存在するグルタミン酸量を求め、架橋 γ －ポリグルタミン酸中のグルタミン酸量を N 末端グルタミン酸量で除することにより架橋 γ －ポリグルタミン酸における一本鎖 γ －ポリグルタミン酸中のグルタミン酸ユニット数を求め、

得られたグルタミン酸ユニット数と、2－ケトグルタル酸及びグルタミン酸の比率より架橋 γ －ポリグルタミン酸における一本鎖 γ －ポリグルタミン酸当たりの 2－ケトグルタル酸の存在数を求め、さらに、

得られた 2－ケトグルタル酸の存在数から架橋構造を解析する、
ことを特徴とする架橋 γ －ポリグルタミン酸の架橋構造を解析する方法。

【請求項 2】

加水分解により生成した 2－ケトグルタル酸の生成量を、フェニレンジアミン誘導体との反応生成物の定量で行う請求項 1 に記載の架橋 γ －ポリグルタミン酸の架橋構造を解析する方法。

【請求項 3】

架橋 γ －ポリグルタミン酸における一本鎖 γ －ポリグルタミン酸の N 末端のグルタミン酸量を、架橋 γ －ポリグルタミン酸を 2，4－ジニトロフルオロベンゼンと反応させて得られる架橋 γ －ポリグルタミン酸の 2，4－ジニトロベンゼン誘導体中の 2，4－ジニトロベンゼンユニットの定量で行うことを特徴とする請求項 1 に記載の架橋 γ －ポリグルタミン酸の架橋構造を解析する方法。

【請求項 4】

架橋 γ －ポリグルタミン酸の加水分解を酸により行うことを特徴とする請求項 1 に記載の架橋 γ －ポリグルタミン酸の架橋構造を解析する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、架橋 γ －ポリグルタミン酸の架橋構造の解析方法に関する。

【背景技術】

【0002】

γ －ポリグルタミン酸（以下、 γ －PGA と記す場合もある）は、納豆菌などが産生する納豆粘質物質の一成分として知られており、生分解性を有するゲル化物質であり、近年にあっては、これを新しい素材として利用した各種機能性製品の開発が種々検討されてきている。

この生分解性を有する γ －PGA は、架橋することにより、より吸水性の高い樹脂、いわゆるヒドロゲルに加工することができることから、 γ －PGA について様々な化学反応による架橋反応が行われ、報告されている。

すなわち、 γ －PGA を架橋剤により架橋させて得られた架橋 γ －ポリグルタミン酸（以下、架橋 γ －PGA と記す場合もある）は、より優れたゲル化能を示し、保水性に優れたものであることから、化粧品等の材料、あるいは水質浄化剤として架橋 γ －PGA のヒドロゲルの利用が注目され、その製造方法が提供されている。

【0003】

例えば、特許文献 1 には、ポリアミンを架橋剤として用いた架橋 γ －PGA、及びその製造方法が記載されている。また、特許文献 2 には、ポリグシリジルエーテルを架橋剤として用いた γ －ポリグルタミン酸ヒドロゲルの製造方法が記載されている。

さらに、非特許文献 1 には、縮合剤として水溶性カルボジイミド（WSC）〔1－エチ

10

20

30

40

50

ル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド 塩酸塩]を用い、 γ -PGAをポリアミンで架橋する方法が開示されている。

【0004】

これらの方法により提供される架橋 γ -PGAは、いずれも各種架橋剤を用いて架橋させて得られた架橋 γ -PGAであり、ある程度の保湿性を有するものであるが、使用する架橋剤の種類によっては、得られた架橋 γ -PGAが分解しやすいものであったり、ゲルの膨潤度が低く、ヒドロゲルとして使用する際の保湿性が劣るものであったりする欠点があった。更に、架橋構造形成についての直接的な情報がなく、その根拠は、保湿性の向上などの状況証拠によるものだけである。また、各種架橋剤を用いた架橋 γ -PGAは、架橋剤や縮合剤の除去が難しいと考えられるが、いずれもその純度についての記載がない。

10

【0005】

ところで、 γ -ポリグルタミン酸を γ 線照射することにより、高吸水能を有する架橋 γ -PGA（すなわち、架橋 γ -PGAヒドロゲル）を製造する方法が報告されている（非特許文献2）。この γ 線照射による γ -PGAの架橋では、 γ -PGA中のグルタミン酸のカルボキシル基が他のグルタミン酸の α -位炭素に結合したエステル結合により架橋されているものと推定されるものの、その架橋構造の詳細は明らかになっていない。

【0006】

γ 線照射により得られる架橋 γ -PGAは、架橋剤を使用しないで架橋されたものであることから、その品質の安全性は架橋剤を用いて架橋させた架橋 γ -PGAに比較して優れたものである。しかしながら、未だその架橋構造の詳細は解明されておらず、また、照射条件により架橋 γ -PGAの分子量、その架橋構造、架橋結合の数などが異なることが考えられ、ヒドロゲルにおける保水性能も異なってくるものといえる。

20

【0007】

したがって、 γ 線照射により得られる架橋 γ -PGAについて、その架橋結合構造を解析することは、より保水性能の高い架橋 γ -PGAを製造するための条件を設定する上で重要なことであり、架橋 γ -PGAについて、架橋構造中の一本鎖 γ -PGAの平均分子量、その分子量に基づく架橋構造、架橋結合の数の解析方法が求められているのが現状である。

【先行技術文献】

【特許文献】

30

【0008】

【特許文献1】国際公開WO 2007/034795号

【特許文献2】特開2005-179534号公報

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】Appl. Polym. Sci., vol. 65, pp1889-1896 (1997)

【非特許文献2】高分子論文集、50巻10号、755頁（1993年）

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

40

上記の現状を鑑み、本発明は、 γ -ポリグルタミン酸の γ 線照射により得られる架橋 γ -ポリグルタミン酸について、その架橋構造の詳細を解析する方法を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0011】

かかる課題を解決するための本発明は、その基本的態様は、以下の構成からなる。

(1) γ -ポリグルタミン酸を γ 線照射することにより製造された架橋 γ -ポリグルタミン酸の架橋構造を解析する方法において、

解析すべき架橋 γ -ポリグルタミン酸を加水分解して得られる2-ケトグルタル酸量とグルタミン酸量の比率を求め、

50

一方、解析すべき架橋 γ -ポリグルタミン酸中の一本鎖 γ -ポリグルタミン酸の N 末端に存在するグルタミン酸量を求め、架橋 γ -ポリグルタミン酸中のグルタミン酸量を N 末端グルタミン酸量で除することにより架橋 γ -ポリグルタミン酸における一本鎖 γ -ポリグルタミン酸中のグルタミン酸ユニット数を求め、

得られたグルタミン酸ユニット数と、2-ケトグルタル酸及びグルタミン酸の比率より架橋 γ -ポリグルタミン酸における一本鎖 γ -ポリグルタミン酸当たりの2-ケトグルタル酸の存在数を求め、さらに、

得られた2-ケトグルタル酸の存在数から架橋構造を解析する、
ことを特徴とする架橋 γ -ポリグルタミン酸の架橋構造を解析する方法。

【0012】

10

より具体的には、本発明は、以下の各構成から成る。

(2) 加水分解により生成した2-ケトグルタル酸の生成量を、フェニレンジアミン誘導体との反応生成物の定量で行う上記(1)に記載の架橋 γ -ポリグルタミン酸の架橋構造を解析する方法、

(3) 架橋 γ -ポリグルタミン酸における一本鎖 γ -ポリグルタミン酸の N 末端のグルタミン酸量を、架橋 γ -ポリグルタミン酸を2, 4-ジニトロフルオロベンゼンと反応させて得られる架橋 γ -ポリグルタミン酸の2, 4-ジニトロベンゼン誘導体中の2, 4-ジニトロベンゼンユニットの定量で行うことを特徴とする上記(1)に記載の架橋 γ -ポリグルタミン酸の架橋構造を解析する方法、

(4) 架橋 γ -ポリグルタミン酸の加水分解を酸により行うことを特徴とする上記(1)に記載の架橋 γ -ポリグルタミン酸の架橋構造を解析する方法、
である。

20

【発明の効果】

【0013】

本発明により、これまでその架橋構造の詳細が判明していない γ -PGA の γ 線照射により製造される架橋 γ -PGA について、その分子量に基づく架橋構造の詳細、架橋結合の数等を解析することができる。

γ -PGA の γ 線照射により得られた架橋 γ -PGA は、その特異的架橋構造を有するが故に保水性に優れたものであるが、その照射条件により得られる架橋 γ -PGA の分子量、架橋結合数は種々異なっており、その保水性能も異なるものである。

30

したがって、本発明が提供する解析方法により解析される γ 線照射により得られた架橋 γ -PGA の構造解析することによりその物性を解明し、より保水性能を有する架橋 γ -PGA を製造する条件を設定することが可能となる。

【0014】

また、より保水性能に優れた架橋 γ -PGA を選択的に製造することが可能となることから、機能性に優れた化粧品材料等を提供できる利点を有している。

【発明を実施するための形態】

【0015】

本発明者らは、 γ 線照射により得られた架橋 γ -PGA は、架橋剤を用いて製造された架橋 γ -PGA とは異なり、 γ -ポリグルタミン酸以外に、他の成分が混在しているものではない点に注目した。また、 γ 線照射による架橋は、架橋剤を用いた架橋反応と異なり、 γ 線照射により活性化されたラジカルによる架橋反応であると推定された。

40

したがって、得られた架橋 γ -PGA を加水分解した場合には、加水分解物の殆どは γ -PGA を構成するグルタミン酸であるが、存在する架橋部分における加水分解物は、グルタミン酸と2-ケトグルタル酸であると推定された。

【0016】

かかる推定に立脚し、 γ 線照射により得られた架橋 γ -PGA を加水分解して、架橋構造数に応じて生成するであろう2-ケトグルタル酸を同定、定量することができれば、これにより、架橋構造数を解析する場合の一つの情報を得ることができる。

そして、かかる情報を得た上で、架橋 γ -PGA 中の chain 数、すなわちグルタミン酸

50

の分子個数、並びに架橋 γ -PGA 中のグルタミン酸ユニット数が解れば、架橋 γ -PGA の構造の解析が可能となる。

【0017】

本発明は、基本的にはかかる考え方に基づく架橋 γ -ポリグルタミン酸の架橋構造の解析方法を提供するものであり、その実際の検討を、実施例に代えて以下に説明することにより、本発明を詳細に説明する。

【0018】

I： γ 線照射により架橋されて得られた架橋 γ -PGA の架橋構造の推定

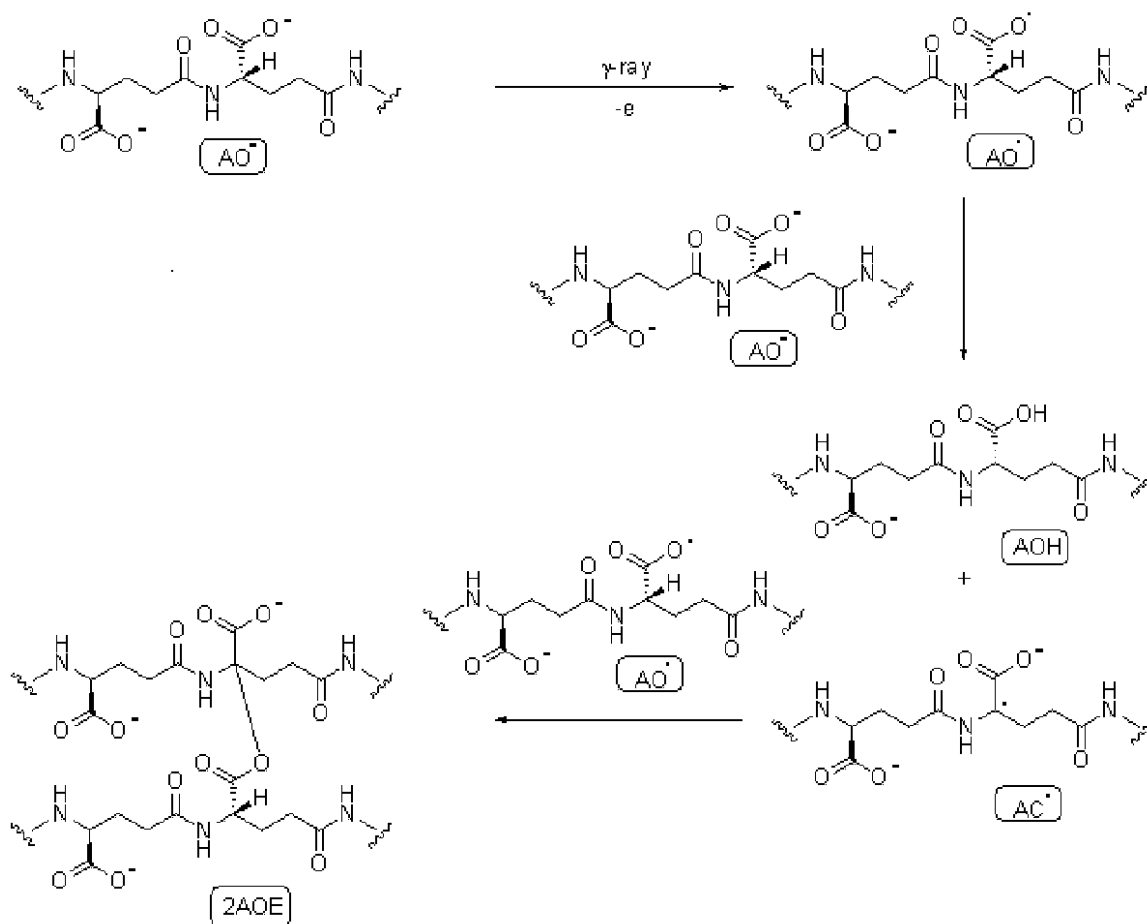
前記したように、 γ 線照射により得られた架橋 γ -PGA は、架橋剤を用いて製造された架橋 γ -PGA とは異なり、 γ -ポリグルタミン酸以外に、他の成分が混在しているものではない特徴点を有している。

【0019】

したがって、 γ 線照射によって架橋された架橋 γ -PGA における架橋構造は、下式反応式：

【0020】

【化1】



【0021】

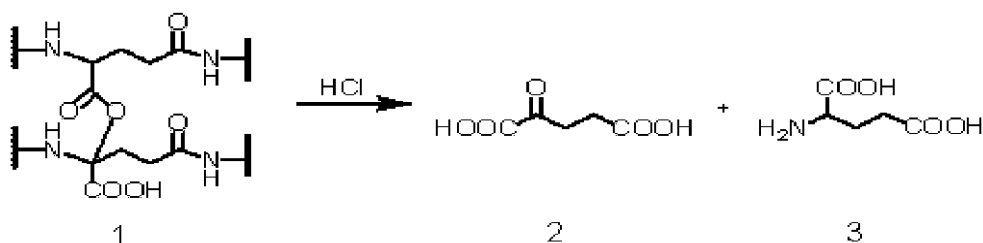
に示すように、 γ 線照射により活性化されたカルボキシル基のオキシラジカル ($AO^\cdot$) が γ -PGA の α 位プロトンを引き抜き、新たに生成した炭素ラジカル ($AC^\cdot$) と別のカルボキシルラジカル ($AO^\cdot$) が結合することにより形成されていると推定される。

【0022】

上記した架橋構造が形成された場合には、架橋構造部分の加水分解反応では、下記化学式：

【0023】

【化 2】



【0024】

10

に示すように、その加水分解物のほとんどはグルタミン酸（3）であるが、一部、架橋構造に由来する2-ケトグルタル酸（2）を含んでいることが予想される。

【0025】

I I：2-ケトグルタル酸の同定

上記化学式に示すように、架橋 γ -PGAの加水分解生成物のほとんどはグルタミン酸（3）であり、その加水分解生成物の混合物の中には、架橋構造に由来する2-ケトグルタル酸（2）が存在していることになるので、かかる2-ケトグルタル酸が存在しているかどうかを同定する試みを、いくつか検討した。

その結果、混合物のままでは、2-ケトグルタル酸（2）を同定することはできなかった。そこで、2-ケトグルタル酸（2）とグルタミン酸（3）の構造的な違いに着目し、

20

強酸性イオン交換樹脂を利用した2-ケトグルタル酸（2）の同定を検討した。
すなわち、架橋された架橋 γ -PGAの加水分解生成物（混合物）を強酸性イオン交換樹脂に担持させ、水で溶出し、LC-MS（液体クロマトグラフィー/質量分析法：Liquid Chromatography / Mass Spectrometry）により同定したところ、グルタミン酸（3）はまったく検出されず、2-ケトグルタル酸（2）のみが検出できることが判明した。

【0026】

その一方、架橋されていない γ -PGAを加水分解して本操作を同様に言い、LC-MSにより同定したところ、グルタミン酸ばかりではなく、2-ケトグルタル酸も検出できなかった。

したがって、架橋された架橋 γ -PGAの加水分解物として検出された2-ケトグルタル酸は、架橋構造にのみ由来した加水分解生成物であることが判明し、この2-ケトグルタル酸を同定・定量することで架橋 γ -PGA中の架橋構造の存在を解析することが可能となる理論が成立した。

30

【0027】

それに先立ち、 γ -PGA、及び架橋 γ -PGAの純度が不明であるため、容易に分子量等の値を求めることができないので、 γ -PGA、及び架橋 γ -PGA単位量あたりのグルタミン酸量を求めた。

方法は、 γ -PGA、及び架橋 γ -PGAの加水分解生成物より直接グルタミン酸量を秤量するか、或いは、内部標準物質を用いたNMRによる絶対定量法が考えられるが、簡便な後者の方法を用い、単位量あたりのグルタミン酸ユニット数を求めた。

40

【0028】

I I I： γ 線照射により架橋された架橋 γ -PGA中のグルタミン酸ユニット数の同定

フタル酸水素カリウムを内部標準物質として、NMRによる絶対定量法により単位量あたりのグルタミン酸のユニット数を求めた結果、 γ 線照射により架橋された架橋 γ -PGAでは、 4.96×10^{-3} モル/グラムという値が得られ、架橋していない γ -PGAでは、 5.33×10^{-3} モル/グラムという値が得られた。

【0029】

I V：2-ケトグルタル酸の定量（架橋構造単位の定量）

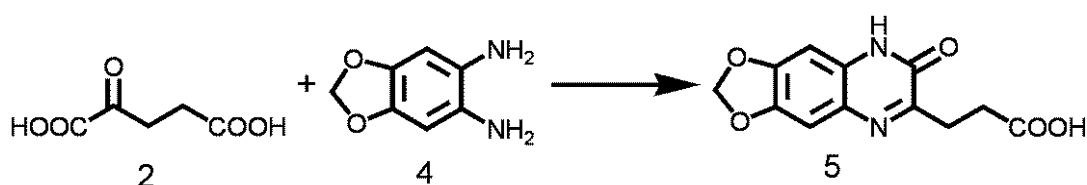
そこで、検出される2-ケトグルタル酸の定量を試みた。

2-ケトグルタル酸のような α -ケト酸は、例えば、下記反応式：

50

【 0 0 3 0 】

【 化 3 】



【 0 0 3 1 】

に示すように、*o*-フェニレンジアミン類 (4) と反応して蛍光物質 (5) に変換されることが知られている。

10

そこで、種々の濃度の 2-ケトグルタル酸 (2) を *o*-フェニレンジアミン (4) と反応させ生成する蛍光物質 (5) の検量線を作成し、その検量線を基準として、実サンプルにおける 2-ケトグルタル酸の存在比を求めることにより、架橋された架橋 γ -PGA の架橋構造単位の定量をおこなった。

その結果、2-ケトグルタル酸 (2) の割合は、グルタミン酸量との比から 0.025 % 程度であることが判明した。すなわち、2-ケトグルタル酸とグルタミン酸の比がおおよそ 1 : 4000 であることが判明した。

【 0 0 3 2 】

この事実は、架橋 γ -PGA におけるグルタミン酸 chain 中、グルタミン酸 4000 個の chain に対し一つの架橋結合が存在する比率となる。

20

そうすると、一定量の γ -PGA に対して、そこに含まれる PGA の chain 数がわかれば、架橋構造を形成した γ -PGA の構造を明らかにすることが可能になる。

【 0 0 3 3 】

V : 架橋された架橋 γ -PGA の chain 数 (架橋を無視した場合のモル数) の同定

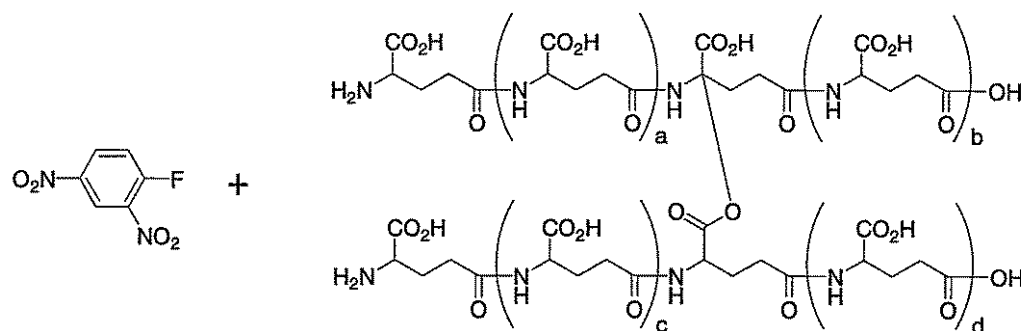
上記したように、一定量の γ -PGA に対して、そこに含まれる PGA の chain 数がわかれば、架橋構造を形成した γ -PGA の構造を明らかにすることが可能になる。

そこで、 γ -PGA の chain 数は、 γ -PGA の N 端アミノ酸の数と一致することを利用し、アミノ基と特異的な反応をする 2,4-ジニトロフルオロベンゼン (1-fluoro-2,4-dinitrobenzene : FDNB) により γ -PGA の N 末端 (N 末端アミノ基) を修飾し、得られた DNB-架橋 γ -PGA 中の DNB 量をあらかじめ作成した DNB-グルタミン酸の検量線から見積った (下記化学式参照)。

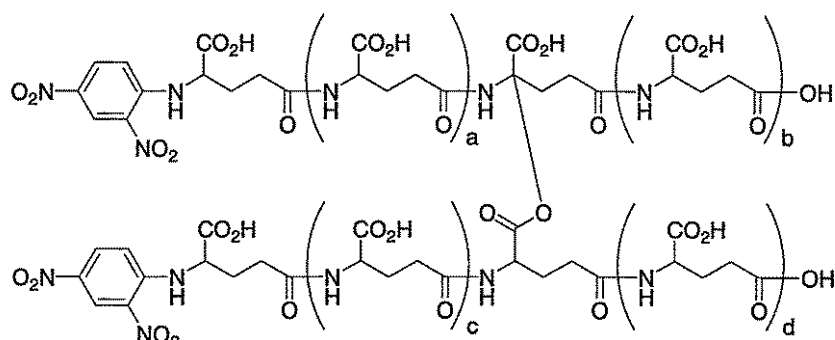
30

【 0 0 3 4 】

【化 4】



10



20

【0035】

その結果、使用した架橋 γ -PGA (10 mg) 中に含まれる γ -PGA の chain 数 (DNB 量) は、 3.21×10^{-8} モルであると見積もられたことから、単位量あたりの chain 数は、 3.21×10^{-6} モル/グラムであると導いた。

また、参考のために γ 線照射していない γ -PGA についても単位量あたりの γ -PGA の chain 数を同様の方法により求め、 1.82×10^{-6} モル/グラムであると導いた。

【0036】

30

V I : γ 線照射により架橋された架橋 γ -PGA の構造の解析

上記した I V における検討の結果、2-ケトグルタル酸とグルタミン酸の比がおよそ 1 : 4000 となった。また、単位量あたりのグルタミン酸ユニット数を単位量あたりの γ -PGA の chain 数で除することにより、 γ -PGA 一本鎖のグルタミン酸のユニット数は 1550 ($= 4.96 \times 10^{-3} / 3.21 \times 10^{-6}$) と導き出されたことから、架橋された架橋 γ -PGA の chain 1 本あたり 0.39 個 ($= 1550 / 4000$) の 2-ケトグルタル酸が存在していることになり、chain 5 本では大体 2 個の 2-ケトグルタル酸が存在していることになる。

【0037】

また、架橋されていない γ -PGA 一本鎖のグルタミン酸のユニット数は 2920 ($= 5.33 \times 10^{-3} / 1.82 \times 10^{-6}$) と算出され、 γ 線照射により γ -PGA の長さは二分の一になっていることが解る。

40

今回用いた γ -PGA は、分子量 50 万のサンプルであるが、ユニット数 2920 から算出される平均分子量 44 万 (Na form) とほぼ一致する。架橋 γ -PGA では、chain 数 5 本に対して架橋構造が 2 箇所存在することが見積られたが、分子量が二分の一になっているため、このような架橋の割合では効果的な架橋構造が形成されていないことが示唆される。

実際に、今回用いた γ -PGA、及び架橋 γ -PGA がほとんど吸水性を示さなかったことは、上記に示した架橋状態を裏付けることができる。

【0038】

50

したがって、本発明はその基本的態様は、上記で説明したとおり、 γ -PGAを γ 線照射することにより製造された架橋 γ -PGAの架橋構造を解析する方法において、

解析すべき架橋 γ -ポリグルタミン酸を加水分解して得られる2-ケトグルタル酸量とグルタミン酸量の比率を求め、

一方、解析すべき架橋 γ -ポリグルタミン酸中の一本鎖 γ -ポリグルタミン酸のN末端に存在するグルタミン酸量を求め、架橋 γ -ポリグルタミン酸中のグルタミン酸量をN末端グルタミン酸量で除することにより架橋 γ -ポリグルタミン酸における一本鎖 γ -ポリグルタミン酸中のグルタミン酸ユニット数を求め、

得られたグルタミン酸ユニット数と、2-ケトグルタル酸及びグルタミン酸の比率より、架橋 γ -ポリグルタミン酸における一本鎖 γ -ポリグルタミン酸当たりの2-ケトグルタル酸の存在数を求め、さらに、

得られた2-ケトグルタル酸の存在数から架橋構造を解析する、
ことを特徴とする架橋 γ -ポリグルタミン酸の架橋構造を解析する方法となる。

【0039】

この場合、 γ -PGA、及び架橋 γ -PGA中のグルタミン酸量は、最も基本となる重要な値であるが、 γ -PGA、及び架橋 γ -PGAの純度が分からないため、解析すべき γ -PGA、及び架橋 γ -PGA単位量あたりのグルタミン酸量は、加水分解後のグルタミン酸を直接秤量し求めることもできるし、NMRを用いた絶対定量法によっても求めることができる。

【0040】

具体的には、 γ -PGA、及び架橋 γ -PGA単位量あたりのグルタミン酸量は、より簡便な方法を用い、フタル酸モノカリウム塩を内部標準物質とした積分値の比較（NMRを用いた絶対定量用法）により、それぞれ γ -PGAの単位量あたりのグルタミン酸量は、 5.33×10^{-3} モル/グラム、架橋 γ -PGAは、 4.96×10^{-3} モル/グラムであると導いた。

【0041】

本発明の方法における、 γ -PGA、及び架橋 γ -PGAの酸による加水分解において用いる酸としては、塩酸、硫酸、臭化水素酸等が挙げられ、中でも塩酸による加水分解が好ましい。

かかる加水分解は、具体的には、機密性の高いバイアル中で、10mgの γ -ポリグルタミン酸、或いは架橋 γ -ポリグルタミン酸に6規定塩酸水溶液（1mL）を加え、110℃で1時間攪拌することによって行うことができる。

【0042】

上記の加水分解により、架橋結合の開列並びにPGAの鎖構造の開列により、式（2）で示される2-ケトグルタル酸と式（3）で示されるグルタミン酸との混合物が生成するが、2-ケトグルタル酸の定量は具体的には以下のようにして行うことができる。

すなわち、生成した式（2）で示される2-ケトグルタル酸を蛍光化試薬としてのフェニレンジアミン類と反応させ、蛍光分析によりその定量を行うことができる。

【0043】

反応させる蛍光化試薬としてのフェニレンジアミン類としては、種々のフェニレンジアミンを挙げることができるが、なかでも3,4-メチレンジオキシフェニレンジアミンを主成分とするタカラバイオ（株）製のシアル酸蛍光標識用試薬キットを用いるのが好ましい。

この試薬キットを用いて反応させることにより、具体的には上記「化3」に示した化学式による反応が進行し、得られた生成物について、励起波長362nm、発色波長446nmの蛍光度を測定することにより、2-ケトグルタル酸の定量を行うことができる。

【0044】

架橋 γ -PGAの加水分解生成物中の2-ケトグルタル酸の定量は、具体的には、上記加水分解で得られた反応溶液を直ちに凍結乾燥し、更に残渣に水（1mL）を加えて凍結乾燥する操作を5回繰り返し、わずかに残っている塩酸を除去する。得られた残渣に、水

10

20

30

40

50

1 mLを加え、この内の50 μ Lを別の容器に写し、3, 4-メチレンジオキシフェニレンジアミンを含む試薬キット溶液(200 μ L)を加え、50℃で、2時間半攪拌し、得られた溶液の蛍光強度から架橋していない γ -PGAで得られる蛍光強度を差し引くことにより、2-ケトグルタル酸の定量を行うことができる。なお、事前に、種々の濃度に調整した2-ケトグルタル酸-グルタミン酸混合物についても同様の条件により、加水分解、蛍光化を行い、検量線を作成し、単位量あたりの2-ケトグルタル酸量は、 1.24×10^{-6} モル/グラムと導かれ、架橋 γ -PGA中の2-ケトグルタル酸の割合は、0.025% ($= 1.24 \times 10^{-6} / 5.33 \times 10^{-3}$) と見積もられた。

【0045】

一方、架橋 γ -PGAの一本鎖ポリグルタミン酸中のグルタミン酸ユニット数は、基本的には架橋 γ -PGA単位量あたりのグルタミン酸量をN末端グルタミン酸量で除することにより得ることが可能となる。

すなわち、架橋 γ -PGA中の γ -PGAのN末端に存在するグルタミン酸量は、N末端特異的な反応試薬を作用し、定量することにより求めることができることから、架橋 γ -PGAにおける一本鎖 γ -ポリグルタミン酸中のグルタミン酸ユニット数を求めることができる。

【0046】

具体的には、架橋 γ -PGA中の γ -PGAのN末端に存在するグルタミン酸量は、架橋 γ -PGAに2, 4-ジニトロフルオロベンゼン(DNFB)を反応させ、N末端アミノ基に2, 4-ジニトロフェニル(DNB)基が結合した架橋DNB- γ -PGAを得、DNB-グルタミン酸で作成した検量線からN末端グルタミン酸量を見積もり、上記で得られた架橋 γ -PGA単位量あたりのグルタミン酸量をN末端グルタミン酸量で除することにより、架橋 γ -PGAにおける一本鎖 γ -ポリグルタミン酸中のグルタミン酸ユニット数を求めることができる。

【0047】

さらに具体的には、10 mgの架橋 γ -PGAを水(1.35 mL)とアセトニトリル(0.15 mL)の混合溶媒に溶解し、この溶液に、炭酸ナトリウム(14.4 mg)、及び、2, 4-ジニトロフルオロベンゼン(8.5 μ L)を加え、50℃で2時間攪拌する。反応溶液は、分子量2000の透析膜を用い過剰な試薬を除去する。得られた溶液は、分子量30000の限外濾過膜を用い、遠心により更に不純物を濾過し、得られた溶液のUV吸収を測定し、DNB-グルタミン酸で作成した検量線から架橋 γ -PGAにおける一本鎖 γ -ポリグルタミン酸量を 3.21×10^{-6} モル/グラムと導いた。

また、単位量あたりのグルタミン酸量を上記の値で除することにより、架橋 γ -PGA中の一本鎖 γ -PGAに含まれるグルタミン酸ユニット数を、1550 ($= 4.96 \times 10^{-3} / 3.21 \times 10^{-6}$) と導いた。

【0048】

本発明者等の検討の結果、ある特定時間の γ 線照射により得られた架橋 γ -PGAについて検討した結果、解析すべき架橋 γ -PGAを加水分解して得られる2-ケトグルタル酸とグルタミン酸の比率は、1:4000であり、一本鎖 γ -PGA中のグルタミン酸ユニット数は、約1550であることが判明した。

【0049】

それをもとに架橋構造を見積もると、2-ケトグルタル酸とグルタミン酸の比率が1:4000であることから、架橋された γ -PGAの一本鎖当たり、0.39個の2-ケトグルタル酸が存在していることになり、5本鎖ではおよそ2個の2-ケトグルタル酸が存在していることになる。

ただし、架橋されていない γ -PGA一本鎖のグルタミン酸のユニット数は2920 ($= 5.33 \times 10^{-3} / 1.82 \times 10^{-6}$) と算出され、 γ 線照射により γ -PGAの長さは二分の一になっていることから、このような架橋の割合では効果的な架橋構造が形成されていないことが示唆される。

【0050】

以上に説明した解析方法により、種々の照射条件で架橋された架橋 γ -PGA の架橋構造が解析され、得られた架橋 γ -PGA の保水性能と対比し、どのような照射条件によれば、最も好ましい架橋 γ -PGA を得ることができるか決定することが可能となる。

【産業上の利用可能性】

【0051】

本発明により、これまでその架橋構造の詳細が判明していない γ -PGA の γ 線照射により製造される架橋 γ -PGA について、その分子量に基づく架橋構造の詳細、架橋結合の数等を解析することができることとなった。

γ -PGA の γ 線照射により得られた架橋 γ -PGA は、その照射条件により得られる架橋 γ -PGA の分子量、架橋結合数は種々異なり、その保水性能も異なるものであるが、本発明が提供する解析方法により解析される γ 線照射により得られた架橋 γ -PGA の構造解析することによりその物性を解明し、より保水性能を有する架橋 γ -PGA を製造する条件を設定することが可能となり、その産業上の利用性は多大なものである。

フロントページの続き

Fターム(参考) 2G054 AA02 CA30 CB01 EA03 GA10
4C083 AD071 AD072 CC01 DD41
4J001 DA01 DB09 DC12 EA36 FA03 GE11 JA20