

アミロースによるフタル酸エステル類の分子吸着挙動

水野陽介（化学技術部 材料化学グループ）

1. はじめに

フタル酸エステル類は樹脂の可塑剤として広く用いられているが内分泌かく乱物質として懸念されており、近年、EUのRoHS指令¹に記載されるなど環境規制の対象物質となっている。そのため、フタル酸エステルを検出する技術の需要が高まっている。現在の規制は樹脂製品へのフタル酸エステル類含有量を対象としたものであり、固体に対する含有率の算出²や検出を目的としたものが積極的に開発・規定されている。一方で水環境へのフタル酸エステル類の流出も懸念すべき問題の1つである。しかし、フタル酸エステル類の水環境への流出については、現状管理目標程度にとどまっている。その検出方法は濃縮を伴うGC-MS測定による煩雑なバッチ式であり³、積極的に検討されている検出方法も同じくバッチ式のクロマトグラフィーを用いたものである。しかし、製品と異なり水環境は絶えず変化するため、流出量を簡便で連続的に測定可能な技術が望まれる。

そこで本研究は多糖類のアミロースを用いたフタル酸エステル類の分子吸着について検討した。アミロース分子鎖はらせん構造を形成し、らせん内部に様々な分子を包接できる^{4,5}。この分子吸着可能なアミロースとナノグラムオーダーで質量変化の検出可能な水晶振動子マイクロバランズ(QCM)法を組み合わせることで、水環境中の微量分子の検出がリアルタイムで可能になる⁶。しかし、アミロースによるフタル酸エステル類の吸着挙動はこれまでに報告されておらず、その可能性について精査する必要がある。そのため、本研究では水中におけるアミロースフタル酸エステル類の複合体形成について、物質添加により生じる沈殿量および沈殿物のX線構造解析により検討した。また、QCMセンサー上にアミロース膜を塗布し、QCM法によって水中に存在するフタル酸エステル類の吸着挙動について明らかにした。

2. 実験

2.1 試料

アミロースは市販のでんぷん（北海道産ジャガイモ使用）をSchochのブタノール法^{7,8}で精製して得た。青価⁹は1.14であった。超純水にはMilli-Q水(Merck)を用いた。その他の試薬は購入したものをそのまま用いた。

2.2 水溶液中でのアミロース複合体形成実験

1.11 gのアミロースを50 mLのイオン交換水に分散し、15 mLの1M NaOH水溶液を加えて溶解した。1M塩酸でpH 6まで中和し、500 mLに定容した。調製したアミロー

ス溶液は45 mL分取し、密閉容器中で沸騰させた。添加する物質を1 mLのメタノールまたはエタノールに溶解し4 mLのイオン交換水で乳化させ、分取したアミロース溶液に添加した。添加後、90°C程度のお湯で満たしたデュワー瓶の中で徐冷した。2-3日後に水溶液中に沈殿が生じているか、目視で確認を行った。生じた沈殿物は10000 rpmで遠心分離を15分間行い回収した。さらに、メタノールで数回洗浄して40°Cで真空乾燥を行った。その後、沈殿物を秤量してアミロース添加量との重量比を得た。添加物質にはフタル酸エステル類6種およびセバシン酸エステル類2種を用いた。

2.3 X線回折(XRD)

乾燥した沈殿物を粉末状にした後、ガラス板製の試料ホルダー（試料部深さ0.2 mm）に充填し、Ultima-IV（リガク）で室温にて測定を行った。検出器はシンチレーションカウンターまたは高速一次元検出器D/teX Ultraを用いた。X線源はCu封入管球（波長 $\lambda=1.54187 \text{ \AA}$ ）で管電流、管電圧はそれぞれ40 mAおよび40 kVとした。スキャン範囲は $2\theta=5-25(\text{deg})$ とした。

2.4 アミロース塗布QCMセンサーの作成

100 mgのアミロースを沸騰したイオン交換水50 mLに加え溶解させる。10 vol%程度のブタノールを添加し、徐冷することで生じた沈殿を遠心分離により回収し、ブタノール複合体を得た。次に、ブタノール複合体がアミロースの乾燥重量換算で1 μg となるように超純水に分散した上でセンサー電極上に30 μL 滴下し、さらにブタノールを5 μL 滴下した。滴下した溶液を自然乾燥させた後にメタノールで数回洗浄し、真空乾燥することでアミロース塗布QCMセンサーを作成した。

2.5 QCM法

測定にはNAPiCOSシステム（日本電波工業）および30MHzツインセンサーを用いた。そのシステムの概略図をFig.1に示す。測定温度は恒温チャンバーを用いて25°Cとした。キャリアは超純水を真空脱気して用いた。流量は10 $\mu\text{L}/\text{min}$ とした。重量変化量 Δm は周波数の変化量 ΔF からSauerbreyの式¹⁰より求めた。

$$\Delta m = \frac{S \sqrt{\rho_q \cdot \mu_q}}{2N \cdot F_0^2} (-\Delta F)$$

ここで、 F_0 ：公称周波数 (30.834 MHz)、 S ：電極面積 (0.075 cm²)、 ρ_q ：水晶の密度 (2.65 g/cm³)、 μ_q ：水晶のせん断応力 (2.95×10¹¹ g·cm⁻¹·s⁻²)、 N ：オーバートーン次数(1)である。つまり、 $\Delta m / \Delta F = -0.035$ (ng/Hz)となる。

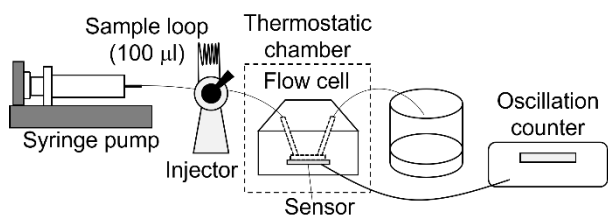


Fig.1 QCM system.

3. 結果・考察

3. 1 水溶液中でのアミロースのフタル酸エステル類との複合体形成

添加物質濃度が 0.02 % (w/v) の場合、添加物質を加えていない参照試料も含めてすべての試料で沈殿が生成した。そこで参照試料よりも多くの沈殿が生じた試料において添加物質による沈殿が生成していることとした。添加物質による沈殿生成の有無を Table 1 にまとめた。

Table 1 アミロース水溶液への物質添加による沈殿生成の有無

添加物質	沈殿の生成
フタル酸ジブチル	×
フタル酸ブチルベンジル	△
フタル酸ジ (2-エチルヘキシル)	×
フタル酸ジシクロヘキシル	×
フタル酸ジイソデシル	×
フタル酸ジメチル	×
セバシン酸ジ (2-エチルヘキシル)	×
セバシン酸ジブチル	○

特異的に沈殿が生成したと考えられるのはセバシン酸ジブチル(DBS)のみであった。その沈殿量は 32.5wt% であり、参照試料の 4.6 wt% に対して多くの沈殿が生じた。フタル酸エステル類に関して添加物質濃度を 1 % (w/v) とした場合には、フタル酸ブチルベンジル(BBP)を添加した系における沈殿量がアミロース添加量に対して 9.1 wt% であった。この沈殿量は、リファレンスの沈殿量 (7.8 wt%) に対してわずかながら大きく、BBP において特異的な沈殿が生じた可能性がある。

DBS および BBP 添加により生成した沈殿物 (それぞれ AM-DBS、AM-BBP とする) の XRD 測定結果を Fig.2 に示す。AM-DBS では $2\theta = 7.71, 13.09, 20.08$ (deg) において回折ピークが観測され、左巻き 6/5 らせんのシングルヘリックスの V₆-amylose¹¹ とよく似た回折パターンであった。このことから水中のアミロース分子は DBS を包接し V₆-amylose を形成することが示唆された。一方で、AM-BBP ではピークがブロードなことから、多くの成分はアモルファスである。検出された主要なピークは $2\theta = 5.39, 8.60,$

16.97 (deg) であった。ここで、 $2\theta = 5.39$ (deg) のピークはシンチレーションカウンターを検出器に用いた測定で観測されている。 $2\theta = 5.39, 16.97$ (deg) のピークは、右巻き 6/1 らせんの 2 本らせん構造を形成した B-amylose¹² の回折パターンにおける高強度のピークと一致していた。この結果から、BBP 添加時の沈殿物はアミロース分子の多くがランダムコイルであり、一部 2 本のアミロース分子が絡まりあっている状態であることが示唆された。そのため、水中においてアミロース分子は BBP を包接しないと考えられる。

DBS の添加時のみアミロースによる包接が示唆された結果を踏まえて分子包接選択性を考察する。DBS はエステル基、セバシン酸骨格ともに柔軟であり、アミロース分子によって包接が容易であったと考えられる。一方でフタル酸骨格は剛直であり、オルト位にエステル基が存在してかさ高いため、フタル酸エステル類は十分に包接されなかったと考えられる。

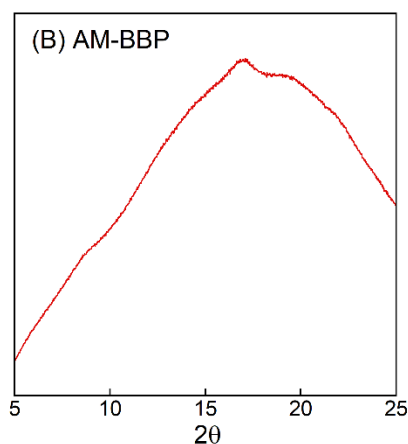
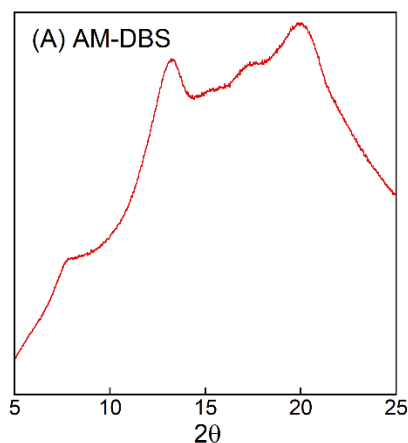


Fig.2 XRD patterns of (A) AM-DBS and (B) AM-BBP.

3. 2 アミロース薄膜への物質吸着

QCM 法において DBS および BBP 飽和水溶液をそれぞれ 100 µL 注入した際のアミロース塗布電極と参照電極の周波数差分 $F_{CH1} - F_{CH2}$ の時間変化を Fig.3 に示す。DBS を注入した系では参照電極、アミロース塗布電極ともに周

波数の低下が見られ $F_{\text{CH1}}-F_{\text{CH2}}$ の変化量 ΔF は -1.2 Hz であった。これはアミロース塗布電極において 4.2 pg の物質吸着を示している。BBP を添加した系においても同様に $F_{\text{CH1}}-F_{\text{CH2}}$ の減少が見られた。 ΔF は -2.4 Hz であり、8.4 pg の物質吸着が起こった。BBP の水溶解度(25°C)は 2.69 ppm と知られており¹³、アミロース塗布センサーを用いることで水中に低濃度で存在する BBP の検出が可能であった。

QCM 法で検出された物質の吸着は、水溶液中でのアミロースと添加物質の複合体形成の有無に関わらず起こった。そのため、アミロース薄膜における DBS や BBP の分子吸着メカニズムは水中でのアミロース分子の包接と異なると考えられ、更なる検討が必要である。

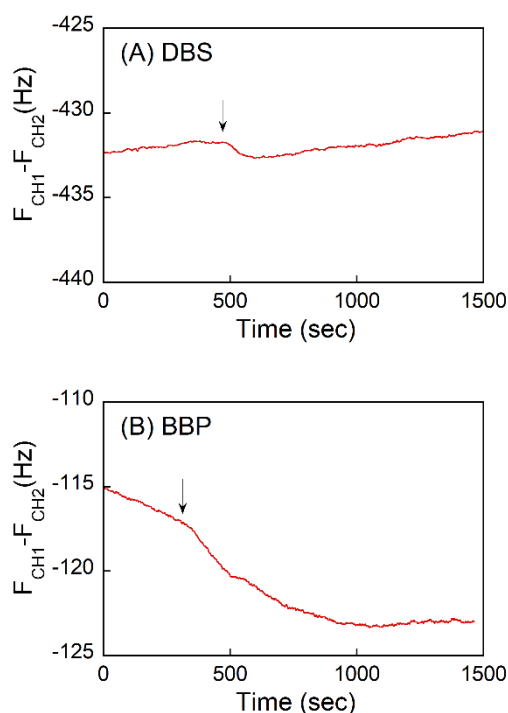


Fig.3 Frequency responses of amylose coated QCM sensors to injections of 100 μl of saturated aqueous solutions of (A) DBS and (B) BBP. Arrows indicate the sample injection points.

4. 結論と今後の展望

じゃがいもでんぷんより精製したアミロースを用いてフタル酸エステル類を中心とした分子吸着の検討を行った。アミロース水溶液中ではフタル酸エステル類の添加による沈殿量は参照試料と同等であった。また、BBP を添加した系の沈殿物の多くはアモルファスであり、一部 2 本らせん構造の B-amylose を形成していた。このことから、水中においてアミロース分子はフタル酸エステルを包接しなかったと考えられる。一方、DBS を添加した場合、アミロース分子によって包接され 1 本らせん構造の V₆-amylose を形成することが示唆されたことから、フタル酸エステル分子のかさ高さが包接の障壁となったと考えられる。QCM 法を用いたアミロース膜への分子吸着評価では DBS だけでなく BBP を注入した系においても、わずか

ながら対象分子が吸着されることが明らかになった。このことから、アミロース塗布 QCM センサーによるフタル酸エステル類の検出可能性が示された。

今後の展開として、アミロース膜への分子吸着メカニズムが不明であるため、温度や濃度といった条件検討により吸着挙動の時間依存性や吸着量の変化を検討する。得られた結果から吸着様式を明らかにし、そのメカニズムを解明していく。さらに、吸着挙動が最大となる条件を検討することでフタル酸エステル類の環境モニタリングシステムへの応用へとつなげていきたい。

【謝辞】

QCM 法において貴重なご助言をいただきました関西大学伊藤 健 教授に感謝いたします。

【参考文献】

- (1) European Union, *O. J. E. U.*, L 174, 1. 7. 2011, 88-110 (2021).
- (2) IEC 62321-8:2017, Determination of certain substances in electrotechnical products – Part 8: Phthalates in polymers by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), gas chromatography-mass spectrometry using a pyrolyzer/thermal desorption accessory (Py/TD-GC-MS).
- (3) JIS K0450-30-10, 工業用水・工業排水中のフタル酸エステル類試験法(2006).
- (4) T. Kuge, K. Takeo, *Agr. Biol. Chem.*, 32, 1232-1238 (1968).
- (5) C. A. K. Le, *Doctoral Thesis*, University of Grenoble Alpes, Grenoble (2018).
- (6) Z. Cao, T. Tsoufis, T. Svaldo-Lanero, A.-S. Duwez, P. Rudolf, and K. Loos, *Biomacromolecules*, 14, 3713-3722 (2013).
- (7) 福場 博保: アミロースとアミロペクチンの分別. 澱粉科学ハンドブック (中村道徳、鈴木繁男 編), p.170-173 (1977).
- (8) T. J. Schoch, *Method in Enzymol.*, 3, 5-6 (1954).
- (9) R. M. McCready and W. Z. Hassid, *J. Am. Chem. Soc.*, 65, 1154-1157 (1943).
- (10) G. Sauerbrey, *Z. Phys.* 155, 206-222 (1959).
- (11) R. E. Rundle, F. C. Edwards, *J. Am. Chem. Soc.*, 65, 2200-2203 (1943).
- (12) A. Imberty, S. Perez, *Biopolymers*, 27, 1205-1221(1988).
- (13) D. Mackay, W. Y. Shiu and K. C. Ma ed.: *Illustrated Handbook of Physical-Chemical Properties and Environmental Fate for Organic Chemicals*, Vol. IV: Oxygen, Nitrogen, and Sulfur Containing Compounds, Boca Raton, CRC Press, p.668-676 (1995).