熱分解分析法および質量分析法による 高分子材料の生分解性評価[†]

Evaluation of Biodegradability of Polymeric Materials by Analytical Pyrolysis and Mass Spectrometry

佐藤 浩 昭*

Hiroaki SATO

(Received October 23, 2002; Accepted November 5, 2002)

In order to develop a noble evaluation method for biodegradability of polymeric materials, various biodegradable polymers have been characterized mainly by using pyrolysis-gas chromatography (Py-GC) and matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry (MALDI-MS). First, the degree of biodegradation of poly-(butylene succinate-co-butylene adipate) (PBSA) film samples during the soil burial degradation test was evaluated by Py-GC. This technique was further applied to evaluate the compositional change of biodegradable polymer blends during enzymatic degradation test. On the other hand, enzymatic degradation behavior of a biodegradable polyester with a controlled terminal structure was monitored by MALDI-MS mainly focused on the changes in molecular weight distribution and terminal structure. Finally, biodegradation intermediates of nonionic surfactant were characterized by MALDI-MS. By using ¹⁸O-labelled water as an incubation medium, detailed biodegradation mechanisms of the surfactant were proposed.

1. はじめに

自然環境中で微生物の作用によって分解される生分解性高分子材料は、優れた環境調和型材料として、最近大きく注目されている。従来、その生分解性は、重量変化や形状の変化などの巨視的な変化、機械的強度などの物理的な変化、および分解過程におけるCO₂の発生量などに基づく生化学的な変化などによって評価されることが多く、生分解過程における高分子鎖の微妙な化学構造変化を解析することは困難であった。

そこで、筆者らは、分子構造と生分解性の相関を解析することにより、材料として必要な諸物性と、使用される環境に応じた生分解特性を兼ね備えた、優れた環境調和型材料の設計・開発に有用な情報を提供できるのではないかと考え、生分解性高分子材料の分解挙動を、分子レベルで解析する新しい解析手法の開発に取り組んできた。その解析

手段の一つとして用いてきた熱分解ガスクロマトグラフィー (Py-GC) は、微量の試料 (～100 μg) を瞬間的に熱分解し、生じたフラグメントをGC分析することによって、高分子化合物の微細化学構造に関する情報を定量的に解析することができる特徴を有している。また、もう一つの解析手段として用いてきた、マトリックス支援レーザー脱離イオン化-質量分析法 (MALDI-MS) は、Py-GCとは対照的に、高分子鎖をほとんど分解することなくイオン化し、主として分子量関連イオンピークから構成されるマススペクトルを観測することによって、高分子鎖の分子量分布や末端基構造などの解析を行うことができる¹⁾。本稿では、こうした解析手法を相補的に用いて行ってきた、生分解性高分子材料の生分解過程における微細化学構造の変化を解析した研究例として、生分解性ポリエステルと非イオン系界面活性剤の生分解挙動を解析した最近の研究内容を簡単に紹介する。

2. 土中埋没試験により生分解したポリエステルの Py-GC による分解性評価²⁾

生分解性高分子材料の環境適合性を評価するための分解試験法として、フィルム状の高分子材料を微生物が繁殖している土中に埋没し、一定期間が経過してからフィルム片

* (独)産業技術総合研究所 環境管理研究部門 (☎305-8569 つくば市小野川 16-1)

*Institute for Environmental Management Technology,
National Institute of Advanced Industrial Science and
Technology (AIST) (16-1 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305-
8569, Japan)*

[†] Congratulations on winning the 2002 Nobel Prize

Prof. John B. Fenn and Dr. Koichi Tanaka were jointly awarded this year's Nobel Prize in Chemistry.

を回収して分解特性を解析する、土中埋没試験法がよく用いられる。この試験法では、試料片の形態変化や重量変化などの巨視的な変化に基づいて生分解性が評価されることが一般的であるが、本研究では、土中埋没試験を行った後に回収された残存試料を Py-GC 測定し、微細化学構造の変化を詳細に解析することによって試料の生分解の進行度を評価する、新しい生分解性評価法の開発を試みた。

試料には、市販されている脂肪族ポリエステル共重合体（商品名 Bionolle #3000, 昭和高分子）を用いた。この試料は、コハク酸ブチルとアジピン酸ブチルからなるランダム共重合体であり、鎖長を延長するためにヘキサメチレンジイソシアネートがウレタン結合を介して微量導入されていることが、 ^1H NMR 測定などによって確認されている。また、高分子鎖の末端は、基本的には水酸基およびカルボキシル基であるが、一部がアルキル基に変性していることが報告されている。

土中埋没試験法による生分解試験は、名古屋大学実習農場において堆肥を 10 年与え続けた土に、最大 60 日間、フィルム状の試料片を埋没して行った。所定の時間が経過後、土中に残留した試料フィルムを回収し、水洗・乾燥した後に Py-GC 測定に供した。Py-GC 測定では、約 $100\ \mu\text{g}$ の試料を、GC 試料注入口に取り付けた小型熱分解装置内で、 500°C で瞬間的に熱分解し、生じた熱分解生成物をオンラインで GC 分析した。

Fig. 1 に、生分解試験前の試料から得られたパイログラム（熱分解ガスクロマトグラム）を示す。パイログラム上には、主鎖の熱分解に起因するコハク酸エステル類 (S) やアジピン酸エステル類 (A) が主成分として生成し、そのほか、微量成分としてイソシアネート部分から生じた熱分解生成物 (N) および高分子末端の異常構造である末端アルキル基部分を起源とすると考えられるアルキルエステル類 (A_E) が観測された。次に、生分解試験を行った試料について、各ピークの強度変化を調べたところ、主鎖より生じる熱分解生成物 (S, A, および N) の相対ピーク強度の変化はほとんど観測されなかったが、末端の異常構造を反映する A_E の相対ピーク強度が、生分解試験の進行に伴い、フィルム試料の回収重量の減少と良い相関をもって減少していることがわかった。そこで、 A_E の相対ピーク強度を指標にし

Fig. 1. Typical pyrogram of biodegradable polyester (Bionolle #3000) at 400°C . (S, succinates; A, adipates; N, hexamethylene diisocyanate; A_E , fatty-acid esters; B, butadiene; THF, tetrahydrofuran; Cp, cyclopentanone.)

て、生分解させた同一試料フィルム内での局所的な生分解の進行度の評価に応用することを試みた。ここでは、生分解試験後に回収されたフィルム上で、外観上、生分解の進行度がかかなり異なっていると推定される複数の部位から、直径 2 mm の測定試料を採取し、Py-GC 測定した。その結果、回収フィルム上で半透明の部分では、 A_E の相対ピーク強度は元の試料とほぼ等しかったが、白濁した部分ではその強度が約 $2/3$ に減少し、穴の周囲ではほぼ半減していることがわかり、Py-GC 測定によって、Bionolle #3000 の局所的な生分解の進行度を半定量的に評価することができた。

3. 生分解性ポリマーブレンドの反応熱分解 GC による生分解性評価³⁾

生分解性高分子材料は、単独の成分では目的とする機械的強度などの諸物性や生分解性を達成できない場合が多いため、こうした特性を制御するために、複数の生分解性高分子をブレンドしたハイブリッド材料の開発が試みられている。こうしたハイブリッド材料の設計・開発に際しては、その生分解過程における化学構造や組成変化を詳細に解析することが求められている。そこで本研究では、代表的な生分解性ポリマーの一種であり、農業用シートや包装容器などの素材として工業的にも利用され始めている、ポリ-L-乳酸 (PLA) とポリ(ϵ -カプロラクトン) (PCL) とのブレンドを試料として酵素分解試験を行い、分解の進行に伴うブレンド組成の変化を、試料に有機アルカリ試薬を共存させて熱分解する「反応熱分解 GC」により求め、分解過程におけるブレンド試料の構造変化を解析することを試みた。

ここでは、溶媒キャスト法によって PLA と PCL を重量比で 50/50 (モノマーモル比: 61/39) となるブレンド試料を調製した。このブレンド試料は、PLA 相の中に PCL 相が分散した「海島」型の相分離構造をもつ不均一なブレンド系である。酵素分解試験は、エステル分解酵素である *Pseudomonas* sp. 由来のコレステロールエステラーゼを用い、リン酸緩衝液 (pH 7.0) 中で最大 48 時間にわたって行った。なお、この酵素は PLA に対する分解能力をほとんどもたないことがわかっている。

通常、ポリエステルを熱エネルギーのみで分解すると、しばしば GC 分析が困難な高沸点・高極性の熱分解生成物が生じる。そこで、ポリエステル試料に水酸化テトラメチルアンモニウム (TMAH) などの有機アルカリ試薬を共存させて熱分解する「反応熱分解法」を用いると、エステル結合が選択的に加水分解されると同時に高効率でメチル誘導体化され、高分子鎖の構造情報を正確に反映したパイログラムが観測されるようになる。本実験では、約 $50\ \mu\text{g}$ のブレンド試料に TMAH の 25% メタノール溶液を $4\ \mu\text{L}$ 添加し、 350°C で瞬間的な試料の反応熱分解を行った。

Fig. 2 に、TMAH 共存下での反応熱分解 GC で得られた酵素分解試験前のブレンド試料のパイログラムを示す。パイログラム上には、PLA 成分からの主生成物である乳

Fig. 2. Typical pyrogram of biodegradable polymer blend (PLA/PCL) at 350°C in the presence of TMAH.

酸のメチルエステル誘導体と、PCL成分からの主生成物であるカプロラクトンおよびカプロン酸のメチル誘導体のピークが高強度で観測されている。これらの各ピーク強度を基にして、酵素分解試験後に回収された残留試料のブレンド組成の変化を調べたところ、酵素分解の進行に伴ってPCL成分の組成が徐々に減少していくことがわかった。これは、本酵素がPLAに対する分解性をもっていないためであるが、各試料の回収重量から求めた各構成成分の正味の分解率を算出したところ、PLA成分もある程度分解していることがわかった。その理由として、海島型の相分離構造をもつブレンド試料内で、「海」に相当するPCL相に取り込まれた「島」のPLA相の一部が、周囲のPCL成分の分解によって剥離したために、PLA成分も見かけ上分解したように観測されたのであると推測された。

4. MALDI-MSによるポリカプロラクトンの生分解挙動の解析⁴⁾

生分解性高分子材料の分解パターンは、分子鎖中でランダムに切断が起こる「endo型」と、高分子鎖の末端から順次分解反応が起こる「exo型」の二つのタイプに大別することができる。特に後者の場合、高分子鎖の末端化学構造は、生分解特性に大きく影響するであろう。しかしながら、従来は、生分解過程での平均分子量の変化や分解生成物の生成量の変化から、反応速度論的な解析を行うことによって、間接的に分解特性の判定がなされる場合が多く、簡便かつ正確な評価手法の開発が望まれている。そこで本研究では、PCLをモデル試料に用い、MALDI-MSによって、PCLを酵素分解処理した後に回収された残存物の末端化学構造や分子量分布の変化を観測し、その生分解挙動を解析することを試みた。

試料には、PCLのカルボキシル末端側にベンジル基が導入されたモデル試料を用いた。この試料は、分子量を比較的精密に制御しながら合成されたものである。フィルム状に成形した試料を、*Pseudomonas* sp. 由来のコレステロールエステラーゼを含んだリン酸緩衝溶液に最大36時間浸漬して、その酵素分解試験を行った。

Fig. 3に、酵素分解試験前後のPCL試料のMALDI-

Fig. 3. Typical MALDI-MS spectra of (a) original PCL sample and (b) PCL sample recovered after the enzymatic degradation for 36 h. Mass numbers in the expanded spectra indicate for monoisotopic mass.

MSスペクトルを示す。まず、Fig. 3(a)の酵素分解試験前のPCL試料のMALDI-MSスペクトルでは、質量数600から2,800付近にかけて、質量数1,500付近を極大とする正規分布状の分子量分布が観測されている。このマススペクトルから、この試料の数平均分子量(M_n)は1,550であり、多分散度は1.06であると求められた。また、各ピークの質量数から、この試料は、末端にベンジル基をもつPCL成分(Bz-PCL)が主成分であることが確認された。

次に、Fig. 3(b)に示した、PCL試料を酵素分解処理した後に回収された残存フィルムのMALDI-MSスペクトルを見ると、質量数1,500付近に分布の極大をもつBz-PCLの分子量分布に加えて、興味深いことに、質量数1,000付近を分子量分布の極大とする新たなピーク系列が現れている。このピーク系列の質量数から、これらは高分子鎖の末端に水酸基とカルボキシル基をもつPCL成分(n -PCL)であると帰属された。もし、生分解の進行過程で高分子鎖内でのランダムな分解(endo型生分解)が起こっていたら、残存試料中のBz-PCL成分のピーク分布は低分子量側にシフトするはずであるが、実際には、観測されたBz-PCL成分の分子量分布は、生分解試験前のもの(Fig. 3a)とほとんど変化していない。さらに、Py-GCを相補的に用いることによって、末端ベンジル基の相対濃度が、酵素分解試験の時間経過とともに減少する様子を定量的に解析することができた。以上の結果から、今回行った実験条件下では、ベンジル末端側から逐次分解が進行する「exo型」の生分解

反応が主として進行したことを、明らかにすることができた。

5. 非イオン系界面活性剤の新しい 生分解機構解析法の開発^{5), 6)}

オクチルフェノールポリエトキシレート (OPEO) は、オクチルフェノールとポリエチレンオキシド (PEO) が結合した非イオン性界面活性剤 (商標 Triton X) であり、工業用洗剤や農薬補助剤などの素材として多量に使用されてきた。OPEO が環境中に漏出すると、微生物の作用により PEO 鎖部分が選択的に生分解され、その結果、オクチルフェノール類や短鎖の OPEO およびその酸化物が環境中に残存する。これらは、内分泌かく乱作用が強く疑われている、いわゆる「環境ホルモン」の一種である。そこで本研究では、MALDI-MS を用いて、土壌微生物による OPEO の生分解過程で生じる分解中間物の化学構造や分子量分布の経時的な変化を観測し、その生分解機構を解析することを試みた。

Fig. 4 に、生分解試験前の試料 (a) と、生分解試験を 48 時間行った試料 (b) に対して観測された MALDI マススペクトルを比較して示す。まず、生分解試験前の試料のマススペクトル (Fig. 4a) では、OPEO のピーク群が、ナトリウムカチオン付加体 $[M + Na]^+$ として、質量数 400 から 1,000 付近にかけて正規分布状に観測されている。これに対して、48 時間生分解試験を行った試料のマススペクト

Fig. 4. Typical MALDI mass spectra of OPEO. (a) original sample, (b) the sample recovered after the incubation for 48 h. *Corresponding to impurities and/or matrix peaks.

ル (Fig. 4b) では、分子量分布は低質量数側へシフトしており、主鎖の分解がかなり進行したことがわかる。さらに、図中▽および◇印で示した新たなピーク系列が現れており、観測された質量数から、これらは試料分子の EO 鎖の水酸基末端側がカルボキシル基に酸化された成分 (OPEC) およびそのナトリウム塩 (OPECNa) のナトリウムカチオン付加体であると帰属された。この末端酸化物の生成から、Fig. 5 に示すように、末端水酸基側の酸化とそれに続くエーテル結合の加水分解が繰り返される exo 型の分解機構によって生分解反応が進行したことを明らかにすることができた⁵⁾。

この OPEC の生成機構を詳細に解析するために、重酸素 (^{18}O) でラベル化した水 ($H_2^{18}O$) を用いた培養実験を行い、分解中間物の化学構造を MALDI-MS で解析した。その結果、Fig. 6 に示すように、OPEC のカルボキシル基に ^{18}O が導入されることがわかり、バクテリアが水を利用して OPEO の水酸基末端側を酸化している過程を詳細に解析することができた。さらに、マススペクトル上に観測される各成分ピークの同位体強度比を解析したところ、末端酸化物のカルボニル酸素が溶媒の水とある程度の割合で酸素交換反応していることがわかり、このことから界面活性

Fig. 5. Proposed biodegradation mechanism of OPEO.

Fig. 6. Enlarged MALDI mass spectra (trimer region) of the biodegraded OPEO recovered after 48 h incubation using normal water (a) and ^{18}O -labeled water (b).

剤分子は分解酵素と共有結合を介したエステル中間体の形成を経由して生分解されることが推測された⁶⁾。

6. おわりに

高分子材料の特徴として、腐食・分解されにくいことが利点として挙げられるが、そのことが結果として廃棄物処理問題などを引き起こす原因の一つにもなっている。そのため、環境中で微生物の作用によって分解される生分解性高分子材料を利用することが、こうした問題を解決する手段の一つであると考えられ、すでにいくつかの生分解性高分子材料が実用化されている。しかしながら、その材料がまずは生分解するの否かに力点が置かれているのが現状であり、その材料が実際に使用する環境中で、どのような分解が起こるのか、さらに生分解の結果、何らかの環境負荷物質が新たに生じる可能性はないのか、などという「環境調和」に関する研究は、まだ緒についたばかりである。生分解性高分子材料の分解機構を分子レベルで詳細に解析することによって、材料の環境適合性を評価し、その情報を優れた材料の設計・開発へとフィードバックすることは、今後、ますます重要視されていくものと考えられる。筆者らは、本稿で紹介したように、熱分解分析法や質量分析法などを相補的に用いて、生分解性高分子材料の微細化学構造とその経時的な変化を総合的に解析する分析手法の開発に取り組んでおり、今後は、その材料が使用される環境の微生物相などとも関連づけて、生分解性高分子材料の環境適合性を評価する手法の開発へと発展させたいと考えている。

謝 辞 以上の研究は、博士後期課程に在籍していた名古屋大学大学院工学研究科および博士研究員として在籍していた名古屋大学難処理人工物研究センターおよび名城大学農学ハイテクリサーチセンターにおいて行ったものである。ご指導およびご鞭撻を賜りました名古屋大学大学院工学研究科の柘植 新名誉教授（現 愛知工業大学教授）および大谷 肇助教授および名城大学の田村廣人助教授をはじめ、共同研究者各位に深く感謝します。

文 献

- 1) 佐藤浩昭, 大谷 肇, *ぶんせき*, 467 (2001).
- 2) H. Sato, M. Furuhashi, D. Yang, H. Ohtani, S. Tsuge, M. Okada, K. Tsunoda, and K. Aoi, *Polym. Degrad. Stab.*, **73**, 327 (2001).
- 3) 古橋資丈, 佐藤浩昭, 大谷 肇, 柘植 新, 岡田鉦彦, 中村力也, 青井啓悟, 第4回高分子分析討論会講演要旨集, p. 84 (1999).
- 4) H. Sato, Y. Kiyono, H. Ohtani, S. Tsuge, H. Aoi, and K.

Aoi, *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, 投稿中. b) 佐藤浩昭, 清野雄介, 大谷 肇, 柘植 新, 古川裕美, 青井啓悟, 第6回高分子分析討論会講演要旨集, p. 133 (2001).

- 5) H. Sato, A. Shibata, Y. Wang, H. Yoshikawa, and H. Tamura, *Polym. Degrad. Stab.*, **74**, 69 (2001).
- 6) H. Sato, A. Shibata, Y. Wang, H. Yoshikawa, and H. Tamura, *Biomacromolecules*, in press.

Keywords: MALDI-MS, Py-GC, Biodegradation, Polymer characterization

PROFILE

氏 名: 佐藤浩昭
 所 属: 独立行政法人 産業技術総合研究所 環境管理研究部門
 博士取得年: 1998 年 (工学博士)
 取得大学: 名古屋大学
 主 査: 柘植新先生
 趣 味: 釣り (特に氷上ワカサギ穴釣り), 旅行, 地図を見ること, 家庭菜園
 連絡先: 〒305-8569 茨城県つくば市小野川 16-1
 (独)産業技術総合研究所 環境管理研究部門
 計測技術研究グループ (勤務先)