

プラスチック、ポリプロピレンの亜臨界水抽出より得られた植物伸長促進物質

横田 正 (愛知学泉短期大学 食物栄養学科, tyokota@gakusen.ac.jp)
 川口 佳佑 (静岡大学 農学部, anger-anchor-alpha-and-omega@docomo.ne.jp)
 鈴木 俊佑 (静岡大学 農学部, srqe4yjl@qc.commufa.jp)
 鈴木 貴博 (静岡大学 農学部, srqe4yjl@qc.commufa.jp)
 宮下 知也 (静岡大学 創造科学技術大学院, p52102001@yahoo.co.jp)
 森田 明雄 (静岡大学 農学部, aamorit@ipc.shizuoka.ac.jp)
 衛藤 英男 (静岡大学 農学部, srqe4yjl@qc.commufa.jp)

Plant promoting substances from plastic of polypropylene by subcritical water extraction

Tadashi Yokota (Nutrition and Food Sciences, Aichi Gakusen College, Japan)
 Keisuke Kawaguchi (Faculty of Agriculture, Shizuoka University, Japan)
 Shunsuke Suzuki (Faculty of Agriculture, Shizuoka University, Japan)
 Takahiro Suzuki (Faculty of Agriculture, Shizuoka University, Japan)
 Tomoya Miyashita (Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University, Japan)
 Akio Morita (Faculty of Agriculture, Shizuoka University, Japan)
 Hideo Etoh (Faculty of Agriculture, Shizuoka University, Japan)

要約

近年、環境保全などの観点から、廃プラスチックなどの有効利用が進められている。廃プラスチックを亜臨界水抽出することで、多くの有用成分が抽出することが考えられる。今回、廃プラスチックの亜臨界水抽出物のレタス種子に対する根伸長試験を行った。その結果、プラスチックのポリプロピレンの亜臨界水抽出物に根伸長効果が認められた。活性物質は、3-(3-t-ブチル-4-ヒドロキシフェニル)プロピオン酸であり、この化合物はプラスチックに添加されている紫外線吸収剤由来と考えられた。また、この活性物質である3-(3-t-ブチル-4-ヒドロキシフェニル)プロピオン酸の関連化合物とレタス根伸長試験を行った結果、側鎖の構造と関連があることが確認された。さらに、レタス以外の植物にも伸長効果が認められ、廃プラスチックの植物成長剤としての利用が考えられる。

キーワード

亜臨界水抽出, プラスチック, 3-(3-t-ブチル-4-ヒドロキシフェニル)プロピオン酸, レタス根伸長物質, 紫外線吸収剤

1. はじめに

近年、環境保全、資源の有効利用、循環型社会の実現などの観点から、廃プラスチック、食品廃棄物、廃木材などの有効利用が進められている。食品廃棄物からのアミノ酸の製法(吉田, 2007)や廃木材から糖類の製造(植田・近藤, 2005)などの報告がある。今回、プラスチック((ポリスチレンフタレート(PET)、ポリプロピレン(PP)、ポリカーボネート(PC)および繊維状強化プラスチック(FRP))廃材の有効利用を目的とし、それらの亜臨界水抽出を行い、抽出物のレタス種子の根に対する効果を調べた。その結果、PPおよびPCの亜臨界水抽出物が根の伸長効果を示したため、含まれている活性物質について検討した。

2. 実験方法

2.1 試料

(1) プラスチック廃材

プラスチックとして、ポリスチレンフタレート (PET)、ポリプロピレン(PP)、ポリカーボネート(PC)および繊維状強化プラスチック(FRP)の廃材(切れ端)を用いた。

(2) 亜臨界水抽出法

各プラスチック 20 g に水 200 ml を加え、1 分間の攪拌後に 7 MPa、300 °C、5 分間の亜臨界水抽出を行った(Kulkarni et al., 2008)。

- (3) 各亜臨界水抽出物添加によるレタス種子の根伸長試験
 シャーレにろ紙を入れ、脱塩水をレタス種子が浸るようにして、25 °C の培養室(暗所)に 20 日間静置して、発芽根が 3 mm のものを選んだ。90 mm シャーレにろ紙をひ

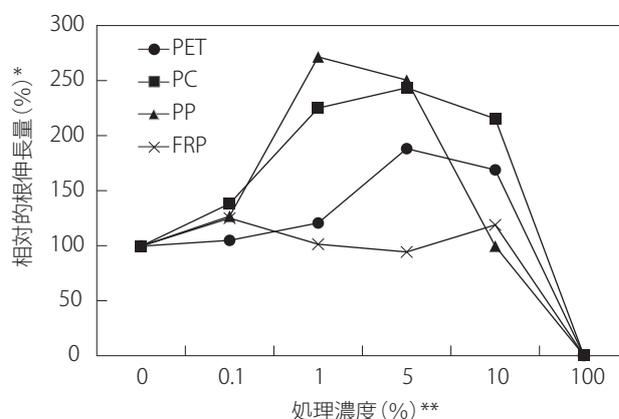


図 1 : 各プラスチックの亜臨界水抽出部のレタス種子根伸長効果

注 : * 蒸留水のみコントロールの値を 100 とした相対量 (%), ** 亜臨界水抽出液添加後の最終濃度 (%)

き、各垂臨界水抽出物の濃度を調整した0.5 %DMSO水溶液を2.5 ml加えた。各垂臨界水抽出物の最終濃度は0 % (蒸留水のみ：コントロール)、0.1 %、1 %、5 %、10 %、100 %となるように調整した。6個の発芽種子を円状に並べ、ふたをして、25 °Cの培養室 (暗所) に24時間静置した。その後、発芽種子の根の長さを測定した。その結果、濃度1 %および5 %でPPおよびPCにレタス種子の根伸長効果が認められた (図1)。そこで、PPおよびPCの垂臨界水抽出物からの活性物質の単離を試みた。

2.2 PPからの活性物質の単離

垂臨界水抽出物濃度1 %で根の伸長が一番強く観察されたPPの垂臨界水抽出物から、活性物質の単離を行った。PPの垂臨界水抽出物をヘキサン、クロロホルム、酢酸エチルおよびブタノールで抽出した。その結果、ヘキサン抽出物14 mg、クロロホルム抽出物12 mg、酢酸エチル抽出物5 mgおよびブタノール抽出物5 mgを得た。活性が見られた酢酸エチル抽出物 (5 mg) をシリカゲルカラム (酢酸エチル：クロロホルム (1 : 4)) で分離した。その結果、化合物A (2 mg) および化合物B (1 mg) が得られた。

2.3 PCからの活性物質の単離

垂臨界水抽出物濃度5 %で根の伸長が一番強く観察されたPCの垂臨界水抽出物から、活性物質の単離を行った。PCの垂臨界水抽出物をヘキサン、クロロホルム、酢酸エチルおよびブタノールで抽出した。その結果、ヘキサン抽出物14 mg、クロロホルム抽出物120 mg、酢酸エチル抽出物5 mgおよびブタノール抽出物5 mgを得た。活性が見られたクロロホルム抽出物 (120 mg) をシリカゲルカラム (酢酸エチル：クロロホルム (1 : 9)) で分離した。その結果、化合物Cが83 mg得られた。

2.4 活性物質の構造解析

2.4.1 化合物A

スペクトルデータ：MS: m/z:222, $^1\text{H-NMR } \delta (\text{CDCl}_3)$: 1.33 (9H, s, CH_3), 2.48 (2H, t, $J = 7.5 \text{ Hz}$, CH_2), 2.75 (2H, t, $J = 7.5 \text{ Hz}$, CH_2), 6.61 (1H, d, $J = 8.0 \text{ Hz}$, CH), 6.77 (1H, dd, $J = 2.0, 8.0 \text{ Hz}$, CH), 7.00 (1H, $J = 2.0 \text{ Hz}$, CH). $^{13}\text{C-NMR: } \delta (\text{CDCl}_3)$: 30.0 (q, 3CH_3), 31.3 (t, CH_2), 35.2 (s, C), 37.1 (t, CH_2), 117.1 (d, CH), 127.1 (d, CH), 127.4 (d, CH), 132.0 (s, C), 136.8 (s, C), 155.1 (s, C), 177.5 (s, C).

以上のスペクトルデータから3-(3-*t*-ブチル-4-ヒドロキシフェニル)プロピオン酸と推定されたため、特許の合成法 (中井他, 2008) に従って同化合物を合成した。3-(3-*p*-ヒドロキシフェニル)プロピオン酸、酸触媒としてリン酸溶液を加え、トルエン中で、80 °Cにして、*t*-ブチルアルコールのトルエン溶液を6回に分け加え、2時間攪拌した。反応液を冷やし、分液ロートに水を入れ、有機層を濃縮した。その後逆相HPLC (Develosil-C-30-UG5) を用い、メタノール：水 (95 : 5) の溶媒で分離精製し、53 %の収率で3-(3-*t*-ブチル-4-ヒドロキシフェニル)プロピオン酸が得られた。この合成品のスペクトルデータは、化合物Aのスペクトルデータと完全に一致した。その結果、化合物Aを3-(3-*t*-ブチル-4-ヒドロキシフェ

ニル)プロピオン酸と同定した。

2.4.2 化合物B

スペクトルデータ：MS: m/z:116, $^1\text{H-NMR } \delta (\text{CD}_3\text{OD})$: 2.52 (2H, t, $J = 8.0 \text{ Hz}$, CH_2), 2.80 (2H, t, $J = 8.0 \text{ Hz}$, CH_2), 6.69 (2H, d, $J = 9.0 \text{ Hz}$, CH), 7.02 (2H, d, $J = 9.0 \text{ Hz}$, CH). $^{13}\text{C-NMR: } \delta (\text{CD}_3\text{OD})$: 31.4 (t, CH_2), 37.5 (t, CH_2), 116.2 (d, CH), 130.2 (d, CH), 133.1 (s, C), 156.7 (s, C), 177.3 (s, C).

以上のスペクトルデータから、既知物質の3-(3-*p*-ヒドロキシフェニル)プロピオン酸と推定されたため、市販品を購入し、スペクトルデータを比較したところ、完全に一致した。その結果、化合物Bは、3-(3-*p*-ヒドロキシフェニル)プロピオン酸と同定した。

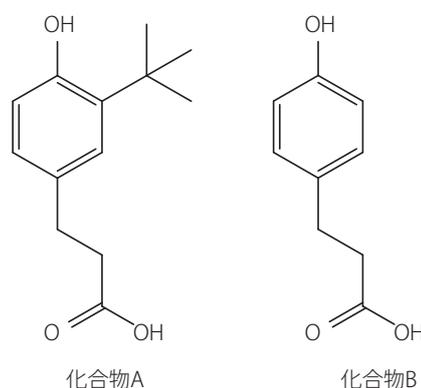


図2：化合物AおよびBの構造

2.4.3 化合物C

スペクトルデータ：MS: m/z:228, $^1\text{H-NMR } \delta (\text{CD}_3\text{OD})$: 1.62 (6H, s, CH_3), 6.72 (4H, d, $J = 9.0 \text{ Hz}$, CH), 7.09 (4H, d, $J = 9.0 \text{ Hz}$, CH). $^{13}\text{C-NMR: } \delta (\text{CD}_3\text{OD})$: 31.0 (q, CH_3), 41.7 (s, C), 114.7 (d, CH), 127.9 (d, CH), 153.2 (s, C).

以上のスペクトルデータから、既知物質のビスフェノールAと推定されたため、市販品を購入し、スペクトルデータを比較したところ、完全に一致した。その結果、化合物Cは、ビスフェノールAと同定した。

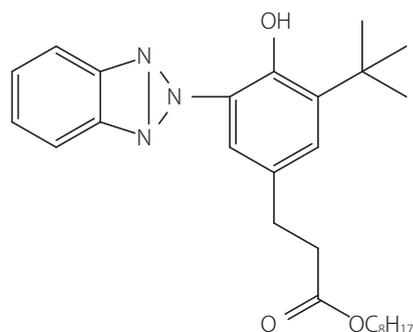
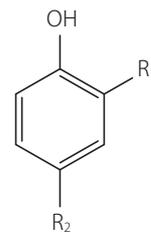


図3：紫外線吸収剤EVERSORB 81

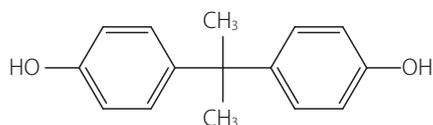
2.5 化合物 A および B の生成機構

化合物 A、B の構造から、PP に添加されている紫外線吸収剤の亜臨界水抽出によって生成したことが考えられた。そのため、紫外線吸収剤 EVERSORB 81 の亜臨界水抽出を行ったところ、HPLC によって化合物 A および B が生成することを確認した。このことから化合物 A、B は紫外線吸収剤の亜臨界水抽出によって生成することがわかった。

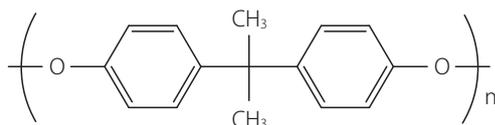


2.6 化合物 C (ビスフェノール A) の生成機構

PC からビスフェノール A の生成は、亜臨界水抽出の特徴である加水分解反応によって PC から直接生成したと考えられる。ビスフェノール A は典型的な環境ホルモンであることから、今後の伸長活性の試験は行わなかった。



化合物 C (ビスフェノール A)



ポリカーボネート (PC)

図 4：PC およびビスフェノール A の構造

2.7 化合物 A の関連化合物の合成

化合物 A の関連化合物を、島田化学研究所に依頼し、数種の関連化合物 (D ~ I) を得た。これらの化合物に対して、レタス種子の根伸長試験を行った。

2.8 各化合物添加による各植物の根伸長試験

(1) レタス種子の根伸長試験

シャーレにろ紙を入れ、脱塩水をレタス種子が浸るようにして、25 °C の培養室 (暗所) に 20 日間静置して、発芽根が 3 mm のものを選んだ。90 mm シャーレにろ紙をひき、0.5 % DMSO 水溶液を 2.5 ml と各試料を添加した。6 個の発芽種子を円状に並べ、ふたをして、25 °C の培養室 (暗所) に 24 時間静置した。その後、発芽種子の根の長さ

R ₁	R ₂
A: C(CH ₃) ₃	CH ₂ CH ₂ COOH
B: —	CH ₂ CH ₂ COOH
D: C(CH ₃) ₃	CH ₂ CH ₂ COOH
E: CH(CH ₃) ₂	CH = CHCOOH
F: C(CH ₃) ₂ CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₂ COOH
G: C(CH ₃) ₂ CH ₂ CH ₃	CH = CHCOOH
H: CO-Ph	CH ₂ CH ₂ COOH
I: CH ₂ -Ph	CH ₂ CH ₂ COOH

図 5：化合物 A 関連化合物の構造

を測定した。

(2) カイワレ大根およびブロッコリースプラウト種子の根伸長試験

保持版のあるポットに処理液 (0.5 % DMSO) 30 ml を加えた。選別したそれぞれの種子 10 粒を均等に並べた。23 °C、暗所に 24 時間静置し、発芽させたのち、4 日間明所に置き、長さを測定した。

(3) ひまわりおよび芝生種子の根伸長試験

ひまわりは、タキイ配合 F1 グッドスマイルの種子を用いた。ポットに植え、根の長さをコントロール (水のみ) と比較した。芝生 (ペントグラス) は、0.8 % アガー培地に滅菌した種子をまき、ろ紙をひいたシャーレで 7 日間栽培した。

3. 結果および考察

3.1 化合物 A 関連化合物 (A、B、D ~ I) のレタス種子根伸長活性

各化合物の添加量に対するレタス種子の根伸長効果を表 1 に示した。各化合物の根伸長効果を比較すると、その強さは、F、G > A > H、I > D、E > B の順であった。まず、化合物 B が最も低かったことから、R₁ の側鎖が大きく関係しているこ

表 1：各化合物添加によるレタス種子根伸長効果 (%) *

添加量 (ppm)	化合物							
	A	B	D	E	F	G	H	I
0.1	—	111 ± 5	—	—	145 ± 16	163 ± 15	122 ± 14	109 ± 5
1	179 ± 8	91 ± 3	—	96 ± 9	194 ± 7	198 ± 24	119 ± 2	136 ± 7
10	203 ± 11	118 ± 13	125 ± 5	122 ± 8	232 ± 16	251 ± 23	160 ± 6	164 ± 4
100	169 ± 4	70 ± 11	75 ± 7	111 ± 12	80 ± 16	51 ± 16	101 ± 6	157 ± 7

注：* 蒸留水のみをコントロールの値を 100 とした相対量 (%)

とがわかり、F、Gのようにアルキル基が大きくなるほど活性が高くなることがわかった。ただ、H、Iのようにベンゼン環がある場合はそれほど活性が強くないことがわかった。また、化合物DとE、化合物FとGはほぼ同じ活性であったことから、R2のオレフィンに活性に影響はなかった。今後、より活性の強い化合物の発明に繋がることが考えられる。

3.2 レタス以外の植物に対する効果

3.2.1 カイワレ大根およびブロッコリースプラウトの根伸長に対する効果

レタスに効果のあった化合物の中でA、F、GおよびHについてカイワレ大根およびブロッコリースプラウトの根伸長に対する活性を行った。カイワレ大根の根伸長効果を表2に、ブロッコリースプラウトの根伸長効果を表3に示した。化合物A、F、G、およびHは、10 ppmの濃度で、カイワレ大根およびブロッコリースプラウトのいずれの根に対しても約1.2倍の伸長効果を示した。

表2：各化合物添加によるカイワレ大根の根伸長効果(%) *

添加量 (ppm)	化合物			
	A	F	G	H
1	95 ± 12	91 ± 12	105 ± 8	96 ± 9
10	115 ± 6	121 ± 10	118 ± 7	122 ± 8
100	91 ± 6	105 ± 11	102 ± 5	111 ± 12

注：* 蒸留水のみコントロールの値を100とした相対量 (%)

表3：各化合物添加によるブロッコリースプラウト根伸長効果(%) *

添加量 (ppm)	化合物			
	A	F	G	H
1	115 ± 9	115 ± 16	104 ± 7	109 ± 10
10	128 ± 7	125 ± 4	122 ± 8	130 ± 8
100	102 ± 7	101 ± 8	101 ± 4	106 ± 6

注：* 蒸留水のみコントロールの値を100とした相対量 (%)

3.2.2 化合物Aのひまわりおよび芝生の根伸長に対する効果

化合物Aの実際の使用を考えて、ひまわりおよび芝生の種子を用いて、成長効果を調べた。ひまわりの76日後の根の長さは、116 ± 16 (コントロールを100とした時) であり、伸長効果が認められた。

芝生 (ペントグラス) は、添加1 ppmで170、10 ppmで180、100 ppmで151 (コントロール100として) と伸長効果が認められた。

以上のことから、レタス以外の植物に対しても活性が認められ、幅広い植物に対して使用ができることが考えられる。

4. まとめ

プラスチック廃材の有効利用を考え、PET、PP、PCおよびFRPの廃材を亜臨界水抽出によって水溶化し、レタス種子の

根伸長効果を調べた。その結果、PPの亜臨界抽出物が強い根伸長効果を示したため、活性物質を調べたところ、活性物質は化合物A、Bであった。これらの化合物は、PPに含まれている紫外線吸収剤から生成していることが分かった。このことから、PP廃材を亜臨界水抽出することによって、植物成長剤としての利用が可能になり、新しい廃材の利用が考えられた。

この植物に対する活性機構はよくわからないが、理由のひとつとして、細胞内に存在する脂肪酸結合タンパク質へのこれらの化合物の結合のしやすさが影響していると考えられる (Maria et al., 2002)。

今後、植物成長機構の解明、利用可能である植物、安全性などを検討する予定である。

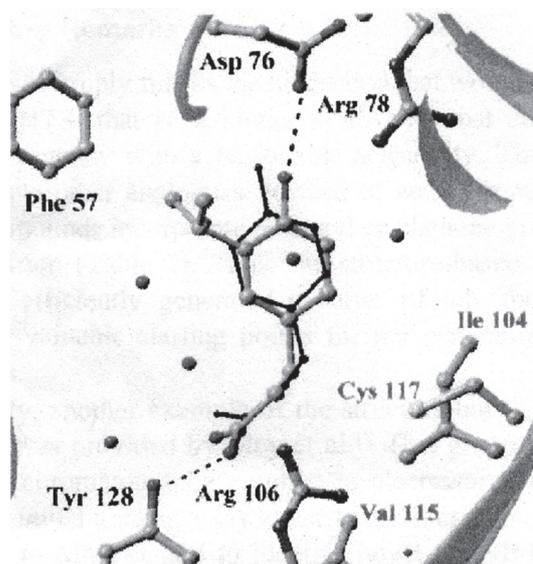


図6：脂肪酸結合タンパク質の結晶構造と化合物Bの結合状態 (Maria et al., 2002)

引用文献

- Kulkarni, A., Suzuki, S., and Etoh, H. (2008). Antioxidant compounds from *Eucalyptus grandis* biomass by subcritical liquid water extraction. *Journal of Wood Science*, Vol. 54, 153-157.
- Maria, J. P. D., Jonas, U., Stefan, S., Thomas, L., Tomas, A., Mats, W., and Johan, S. (2002). Structure-based screening as applied to human FABP4: High efficient alternative to HTP for hit generation. *Journal of American Chemical Society*. Vol. 124, 1174-11880.
- 中井康人・水島隆博・孫珠姫 (2008). ビスフェノール誘導体の製造法. 特開2008-44859.
- 植田克美・近藤昭彦 (2005). エコバイオエネルギーの最前線. シーエムシー出版.
- 吉田弘之 (2007). 亜臨界水反応による廃棄物処理と資源化・エネルギー化. シーエムシー出版.

(受稿：2016年5月23日 受理：2016年5月30日)