

博士論文

L-バリン結晶への添加剤の吸着と 結晶成長に対する影響

2017 年 9 月

工学研究科 博士後期課程
フロンティア物質機能工学専攻
洗 洵

目次

1 章. 緒言	1
1.1. はじめに	2
1.2. アミノ酸	3
1.3. アミノ酸の利用	5
1.4. アミノ酸製造プロセス	7
1.5. アミノ酸製造プロセスにおける晶析	9
1.6. アミノ酸の晶析方法	10
1.7. アミノ酸結晶の特徴	11
1.8. 分岐鎖アミノ酸とは	12
1.9. 分岐鎖アミノ酸の結晶構造	13
1.10. Val の晶析	15
1.11. 晶析に関する既往研究	19
1.11.1. 添加剤と結晶成長の関係	19
1.11.2. アミノ酸晶析におけるテイラーメイド添加剤に関する既往研究	21
1.11.3. アミノ酸晶析における界面活性剤に関する既往研究	26
1.12. 本研究の目的	27
2 章. 添加剤添加による外観の変化	30
2.1. 目的	31
2.2. 実験方法	31
2.3. 使用添加剤	32
2.4. スルホン酸系添加剤存在下における Val 結晶外観	35
2.4.1. Val 結晶の外観	35
2.4.2. 考察	37

2.5. 4 級アンモニウム塩系添加剤存在下における Val 結晶外観.....	39
2.5.1. Val 結晶の外観.....	39
2.5.2 考察.....	41
2.6. 類縁アミノ酸存在下における Val 結晶外観.....	42
2.6.1. Val 結晶の外観.....	42
2.6.2. 考察.....	43
2.7. まとめ.....	43
3 章. 添加剤の構造と Val 表面への吸着挙動.....	44
3.1. 目的.....	45
3.2. 吸着モデルの決定.....	46
3.2.1. 実験方法.....	46
3.2.2. 分析条件.....	48
3.2.3. Langmuir モデルによるフィッティング.....	49
3.2.4. Freundlich 式によるフィッティング.....	51
3.2.5. ヘミミセルモデルによるフィッティング.....	53
3.3. Val 表面への吸着に対するアルキル鎖長の影響.....	60
3.4. Val 表面への吸着に対するベンゼン環の影響.....	63
3.5. 添加剤の吸着に対する共存 Na の影響.....	65
3.5.1. 背景・目的.....	65
3.5.2. 実験方法.....	65
3.5.3. 結果・考察.....	67
3.6. DBS 吸着の面選択性.....	69
3.6.1. 背景.....	69
3.6.2. 実験方法.....	69

3.6.3. 結果	69
3.7. Val 結晶の各面における活性吸着点の間隔	71
3.8. 4 級アンモニウム系添加剤の吸着挙動	73
3.8.1. 実験方法	73
3.8.2. 分析方法	73
3.8.3. 吸着等温線	74
3.8.4. 考察	76
3.8.5. 結論	78
3.9. まとめ	79
4 章. Val 結晶に対する添加剤の結晶成長阻害挙動	81
4.1. 目的	82
4.2. マイクロスコープを用いた DBS の結晶成長速度の測定	82
4.2.1. 実験方法	82
4.2.2. Val 結晶の外観の変化	84
4.2.3. 結晶成長阻害における、添加剤 DBS の応答性	88
4.3. 結晶成長速度比 G/G_0 を用いた DBS の結晶成長阻害度評価	91
4.4. DBS 添加による晶癖変化機構の考察	96
4.5. 多層化面の観察	98
4.6. DBS の(100)、 $(\bar{1}00)$ への吸着パラメーター算出	102
4.6.1. 算出方法	102
4.6.2. 結果・考察	103
4.7. Val 結晶表面への吸着量の分布評価	105
4.7.1. 背景・目的	105
4.7.2. 実験方法	105

4.7.3. 結果・考察	105
4.8. DBS のアルキル鎖長と結晶成長速度比の関係	109
4.9. DBS 添加による結晶外観変化の機構の考察	113
4.10. 厚み方向の成長制御	117
4.10.1. 実験方法	117
4.10.2. 結果・考察	118
4.11. まとめ	121
5 章. Val に対する類縁体 L-Leu および その立体異性体 D-Leu の影響	123
5.1. 背景・目的	124
5.2. 実験方法	125
5.3. 分析・測定条件	127
5.4. ゲストアミノ酸の立体による取り込み挙動の違い	128
5.5. XRD から見た結晶構造の違い	130
5.6. D-Leu / L-Val 共結晶の組成比の算出	133
5.7. 固溶体の組成比と結晶格子の変化	135
5.8. 結晶外観	137
5.9. D-Leu / L-Val の結晶構造	139
5.9.1. 単結晶作成	139
5.9.2. 単結晶 X 線測定条件	139
5.9.3. 結果	140
5.10. 母液中のホスト、ゲストアミノ酸の溶解度変化	142
5.11. D-Leu / L-Val の共結晶生成機構	145
5.11.1. 分子模型による共結晶生成機構の推定	145
5.11.2. 相互作用エネルギーの推算	147

5.12. まとめ	150
6 章. 今後の展望	152
6.1. Val 結晶形の最適化に向けて	153
Appendix	157

1 章. 緒言

1.1. はじめに

ヒトの身体は約 16%~20%がタンパク質で構成され、主に筋肉や内臓、血中のヘモグロビン等を構成する。アミノ酸はそのタンパク質の構成単位であり、生物にとって生命現象を担う非常に重要な物質であると言える。

アミノ酸は 19 世紀初頭にフランスのヴォークランによってアスパラギンが初めて発見され、その存在が明らかになった。20 世紀前半には池田ら¹⁾によって初めてグルタミン酸ナトリウムが単離・同定され、うま味調味料として応用された。その後応用範囲は広がり、飼料、医薬品、栄養補助食品、香粧品、飲料等様々な分野、目的で利用されている。

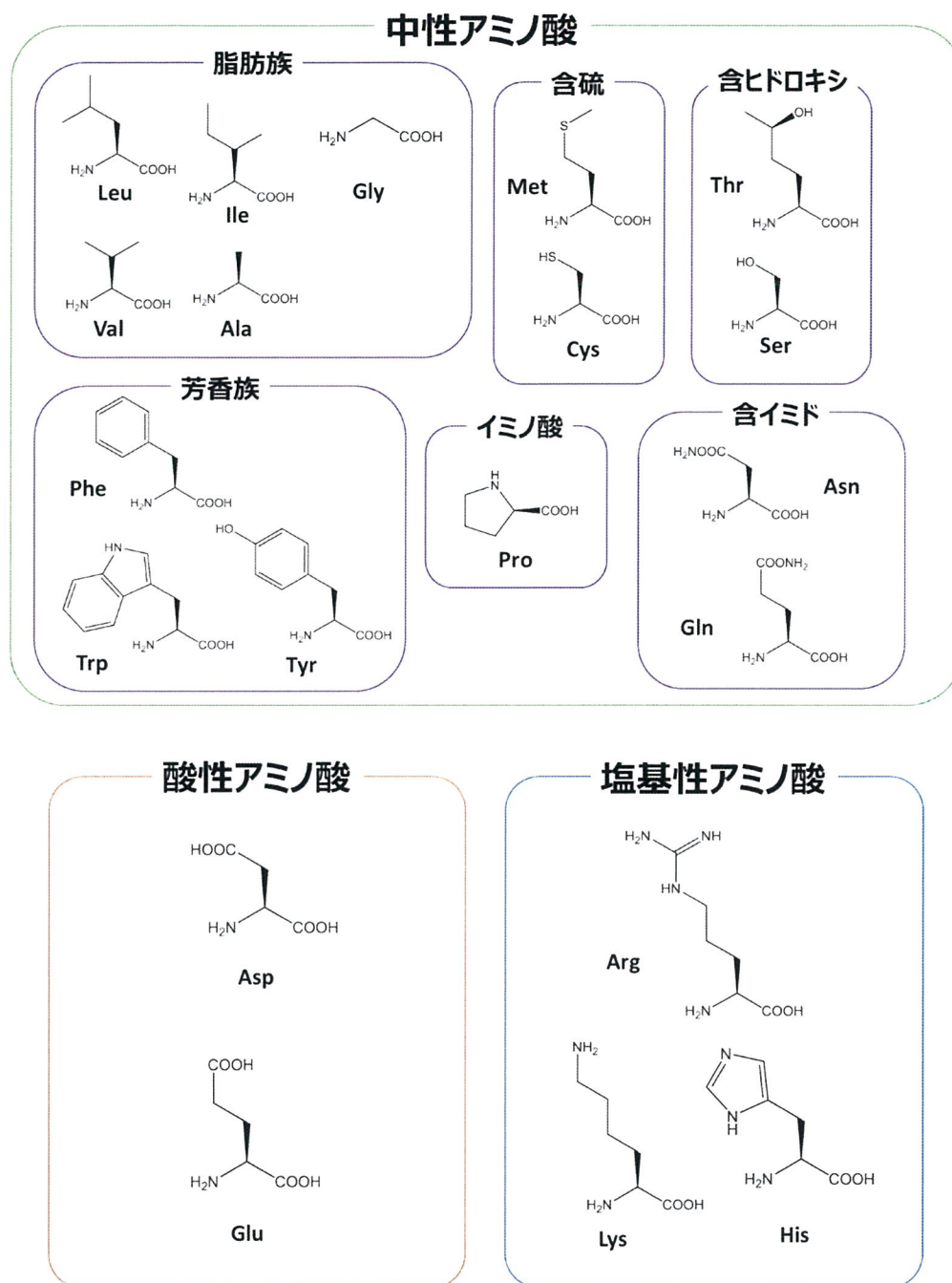
アミノ酸の製法も時を経るにつれて発展している。初の工業的製法はグルタミン酸の小麦グルテンからの抽出法である。その後化学合成を用いた合成法が確立されたが、コストや安全性の観点から合成法は普及しなかった。一方で 1950 年代には協和発酵社によってグルタミン酸発酵を用いた発酵法が確立され、安価かつ大量に生産することが可能になった。現在でも殆どのアミノ酸製造では発酵法が主流であり、システイン(Cys)やチロシン(Tyr)など従来は抽出法、合成法で作られているアミノ酸についても発酵法に代替されていくトレンドである。

1.2. アミノ酸

アミノ酸はアミノ基とカルボキシ基の両方を持つ化合物の総称である。主鎖に対してのカルボキシル基の位置によって α 、 β 、 γ ... に分類されるが、タンパク質を構成するアミノ酸は全て α 体である（ただし、プロリンのみ α -イミノ酸）。単にアミノ酸と呼称する場合、 α -アミノ酸を指す。アミノ酸の示性式は $R-CH(NH_2)-COOH$ で表わされ、R を側鎖、その他を主鎖と呼ぶ。側鎖は H または原子団を示し、その種類によってアミノ酸の呼称が変化する。R が水素であるグリシン(Gly)を除いて α 炭素は不斉炭素であり、タンパク質を構成するアミノ酸は全て L 体である。RS 表記では Cys を除いて S 体である。

アミノ酸は同一分子内に電子供与基であるアミノ基と電子求引基であるカルボキシ基を持つ zwitterion（双性イオン）であり、酸性、塩基性どちらの条件でもイオンが解離することで水に溶解できる。

タンパク質を構成する 20 種類のアミノ酸は、その側鎖によって化学的性質が異なる。20 種類のアミノ酸の分類を **Figure 1-1** に示す。特に正電荷のアミノ酸は溶解することで塩基性を示し、負電荷のアミノ酸は酸性を示す。



1.3. アミノ酸の利用

アミノ酸の利用は 20 世紀初頭から精力的に研究されており、利用範囲も非常に多岐に渡る。アミノ酸の機能や利用は各アミノ酸によって異なる。以下、特記が無い場合アミノ酸は全て L 体とする。

例えば、バリン(Val)、ロイシン(Leu)、イソロイシン(Ile)は筋肉構成する主要なアミノ酸であり、筋疲労回復の効果を持つ²⁾。そのため、運動後のサプリメントやサルコペニア(筋肉減少)を防止する健康食品として用いられる。グルタミン酸(Glu)ナトリウムはうま味を呈するため、合わせ調味料の原料や、そのものをうま味調味料として用いられる。プロリン(Pro)は皮膚等を構成するコラーゲンの主要な成分であり、保湿クリームや化粧水等の基礎化粧品や、美容サプリメント等に利用される。グリシン(Gly)は睡眠の質を向上させる機能を持つ³⁾ため、健康サプリメントとして利用される。

また、アミノ酸は人間だけではなく、豚や牛等家畜の飼料に添加する必須栄養素としても広く利用される⁴⁾。家畜飼料は **Figure 1-2** に示す様に、栄養豊富な大豆を使うのが理想的だが、高価であるためより安価なトウモロコシや小麦を使うことが多い。しかし、これらだけでは家畜の成長に必要な一部のアミノ酸を得られず、満足に成長することができない。特に不足するのが、豚では順にリジン(Lys)、スレオニン(Thr)、トリプトファン(Trp)である。これら不足するアミノ酸を別途配合することで家畜の成長を促進し、収量を増加することができるため、アミノ酸は飼料に配合する栄養素として非常に高い需要がある。

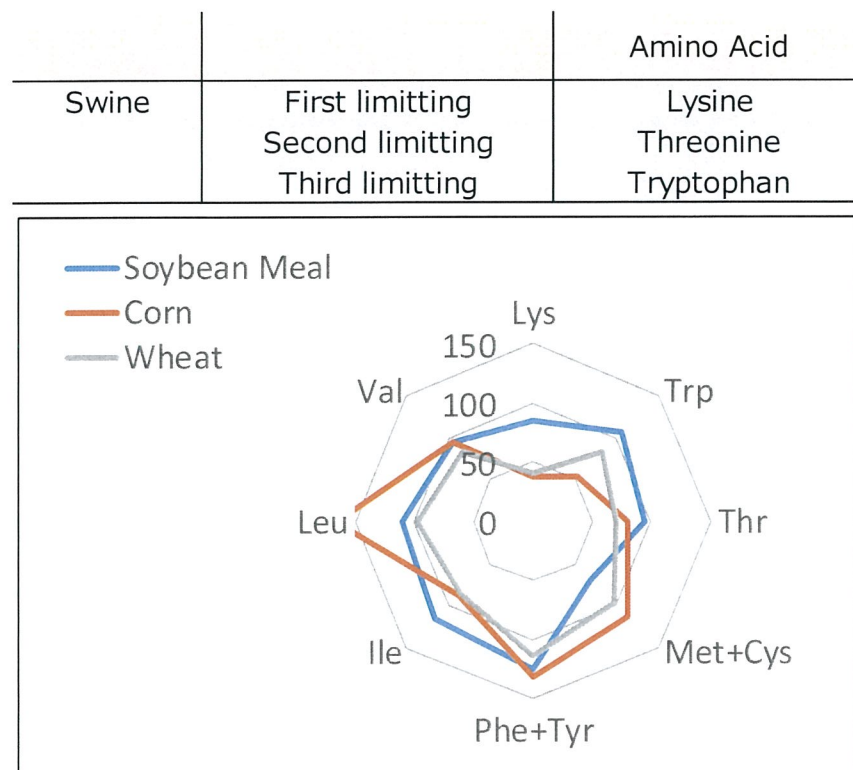


Figure 1-2. The essential amino acids for swine. Figure is percentages of amino acids when compared with ideal protein for 15-50 kg swine.

1.4. アミノ酸製造プロセス

アミノ酸の製造プロセスとしては大きく分けて抽出法、合成法、発酵法があるが、一部を除いて殆どのアミノ酸は発酵法で製造されている。なぜなら、一部の医薬品や試薬を除いて大部分のアミノ酸は L 体のみが流通しており、L 体のみを得られる微生物発酵が最も効率的だからである。発酵法では *E.coli*. を始めとした様々な菌をかけ合わせる、もしくは遺伝子を改変してより効率良く目的のアミノ酸を生産させるようにしている。

発酵液から単離・精製されるアミノ酸の規格上の純度は、比較的低純度の飼料用で一部例外はあるが高純度の医薬品、食品添加物用では 98%以上であり、ほぼ 100%の純品であることが要求される。これに対し、アミノ酸の発酵液中には菌体そのもの、発酵原料である糖分、無機金属、有機物や、発酵で副次的に生産される有機酸、タンパク質等多様な不純物を含有している。これら不純物はその後の単離・精製工程で取り除く必要がある。単離・精製工程には基本となる単位工程として膜、イオン交換樹脂、晶析、活性炭があり、各アミノ酸の物性、含有不純物、安定性等のファクターを元に単位工程を組み合わせ、最適化する。アミノ酸発酵における不純物の分類、及び各不純物について有効な単位工程を **Table1-1** に示す。

例えば、菌体は熱凝集性があり、菌体より目の細かい膜を用いて容易に分離できる。無機塩は電荷をおびているためイオン交換樹脂での分離が可能である。このように不純物の性質によって分離工程を使い分け、最終的に不純物を限りなくゼロに近づける。

Table1-1. Impurities and unit process which is good separation capacity for impurities.

	溶解性	性質	有効な単位工程
副生アミノ酸	○	晶析以外の分離が難しい	晶析
菌体	×	熱凝集性あり	膜
有機酸	○	濃縮中に揮発、 有機溶媒中で析出	イオン交換樹脂
糖分	○	熱により褐変	晶析 イオン交換樹脂
無機塩	○	有機溶媒中で析出	イオン交換樹脂
色素	○	疎水性、加熱により増加	活性炭、晶析
タンパク質	○	界面活性剤による凝集	膜、活性炭

1.5. アミノ酸製造プロセスにおける晶析

アミノ酸の発酵法における単離・精製工程において基本となる単位工程の中で、晶析は特に重要な工程である。副生アミノ酸のような目的アミノ酸と構造・物理化学的性質が近い不純物の分離には、樹脂や膜での分離は難しい。しかし、晶析では、目的分子自身が 3 次元構造を認識し、自身の結晶を分離剤として構造・化学的性質が近い不純物を分離することに優れている。

また、最終製品の純度だけではなく、結晶粒径、結晶多形等の外観も晶析によって決定される。結晶多形は濾過性、スラリー粘度、比容、流動性などに影響を与え、ひいては晶析後の固液分離や乾燥、包装工程の操作性、生産性に大きな影響を与える。また、アミノ酸の結晶形状は顧客毎に多様な要求をされることが多く、結晶多形、結晶粒径を規定内に収めるためにも晶析工程の制御は非常に重要である。グルタミン酸ナトリウム(MSG: Monosodium Glutamate)の例を挙げると、家庭用向けの製品では大きい結晶の方が見栄えが良いため重宝されるが、一方で加工会社向けの製品は、見栄えより溶解速度が速く操作性の良い小さい結晶の方が求められることが多い。また Lys の場合、医薬用では溶解性が重視されるため小さい結晶が求められるが、飼料用では使用時の粉舞いを嫌うため大きい結晶が求められる。

1.6. アミノ酸の晶析方法

アミノ酸の一般的な晶析方法を示す。

1. 飽和水溶液を冷却する（冷却晶析）
2. 飽和水溶液を蒸発する（蒸発晶析）
3. 飽和水溶液に貧溶媒を添加する（貧溶媒晶析）
4. pH をアミノ酸の等電点に近づけ、溶解度を下げることで晶析する（中和晶析）

実際の工業プロセスではグルタミン酸ナトリウムなど溶解度の温度依存性が高いアミノ酸は冷却晶析、高溶解度のアミノ酸は貧溶媒晶析、溶解度が極めて低いアミノ酸は中和晶析を用いることが多い。一般的にアミノ酸の製造プロセスにおいて良い結晶と言われているのは、結晶粒径が大きく、沈降性の高い結晶である。その良い結晶を得るためには通常比較的低過飽和の状態下でゆっくりと成長させることが必要であると言われている。しかし、特定の面成長が極めて遅いと理想的な結晶形とはかけ離れた薄板状の結晶が生成する。しかも薄板状の結晶は成長する前に攪拌によって破碎され、微細な結晶やそれらが集まった集合晶になりやすい。このような結晶構造を持つアミノ酸の代表的なものが分岐鎖アミノ酸(BCAA)である。BCAA は疎水性のアルキル基が露出する面を持ち、その表面の方向には殆ど成長しないため、薄板状の結晶が生成する。

1.7. アミノ酸結晶の特徴^{5), 6)}

アミノ酸は等電点付近の水溶液中では双性イオンであるが、それは結晶中においても同様である。イオン分子としてアミノ酸の結晶中に働く力として水素結合、イオン間のクーロン力、側鎖間の Van der Waals 力等があるが、相互作用力の大きさは水素結合が支配的であり、基本的には水素結合が最も安定な状態な構造が安定系の結晶構造である。水素結合はアミノ酸分子のイオン化したアミノ基とカルボキシ基間に作るネットワークであり、アミノ基の 3 個の H が電子供与体となるため基本的には 3 種類、又は H を共有する叉状水素結合を含む 4 種類である。

アミノ酸の中でも、Val、Leu、Ile、フェニルアラニン(Phe)のような極性官能基を持たない側鎖を持つアミノ酸は、一般的に 2 分子が親水的な主鎖を向い合わせにして水素結合し、疎水的な側鎖を外側にして形成された分子 2 重層が Van der Waals 力で積層する。一方で極性官能基を持つ Glu、アスパラギン酸(Asp)、Lys などは複雑な水素結合を形成するため、アミノ酸によってそれぞれ異なる形状を示す。

更に、アミノ酸は単体の結晶以外にも塩酸や有機酸との塩、ナトリウム等の金属との塩、更にはアミン類とも塩を形成する。その他にも結晶多形、水和物の疑似多形が存在し、非常に多様な結晶を形成する。それぞれの結晶は異なった結晶構造と物性を有するため、アミノ酸の製造プロセス構築においては各結晶の特性を知り、単離精製の手段として最適な結晶の状態を選択することが重要である。

1.8. 分岐鎖アミノ酸とは

Figure 1-1 で示した 20 種のアミノ酸のうち、9 種類は生体内で全く合成できない、もしくは合成量が少ないため体外からの摂取が必要とされる「必須アミノ酸」である。そのうち、側鎖が枝分かれしている Val、Leu、Ile を総称して分岐鎖アミノ酸（BCAA: Branched-Chain Amino Acid）と呼ぶ。BCAA は、食物タンパク質に含まれる必須アミノ酸の約 50%、筋タンパクに含まれる必須アミノ酸の約 35%を占めており、BCAA を補給することで筋肉修復、維持のための材料となる。そのため、運動時の筋組織破壊後の筋肉のエネルギー源として、また経口食事ができない患者の栄養状態改善のために輸液等に用いられ、国内外問わず年々需要が高まっている⁷⁾。

1.9. 分岐鎖アミノ酸の結晶構造

Val, Leu, Ile 結晶は $P2_1$ の空間群を持つ単斜晶を形成¹⁾し、**Figure 1-3** に示すように外観は薄い板状晶である。結晶構造を見ると、Val 結晶は Val 分子 4 つを 1 単位格子として成長する。 a 軸方向、 b 軸方向はカルボキシ基とアミノ基の水素結合によって成長するため、親水基が露出する。一方、 c 軸方向は単位格子同士がアルキル基の Wan der Waals 力による弱い相互作用で結合するため、疎水基が露出する。 c 軸方向は相互作用が弱いため、成長速度が a 軸、 b 軸と比較して遅く、薄い板状結晶となる。

Val の結晶構造に焦点を当てると、(001)面は一般に面積が最も大きくなる面である。(001)面は表面に露出する官能基が側鎖のイソプロピル基であり、表面に高い疎水性を持つ。そのため、Val 結晶は真比重が 1 を超えているにも関わらず、水面に置くと表面張力で浮遊する。

Val 結晶は浮遊することで水への接触面積を低下させているため、溶解性が悪い。本性質は Val 結晶を溶解、加工するユーザー側のハンドリング性を低下させる大きな要因の一つであり、改善することで製品価値が向上すると考える。そこで、結晶の形を変えて沈降させることで低溶解性や浮遊性等の物性を改善し、製品価値の向上、プロセス改善に寄与すると考えられる。

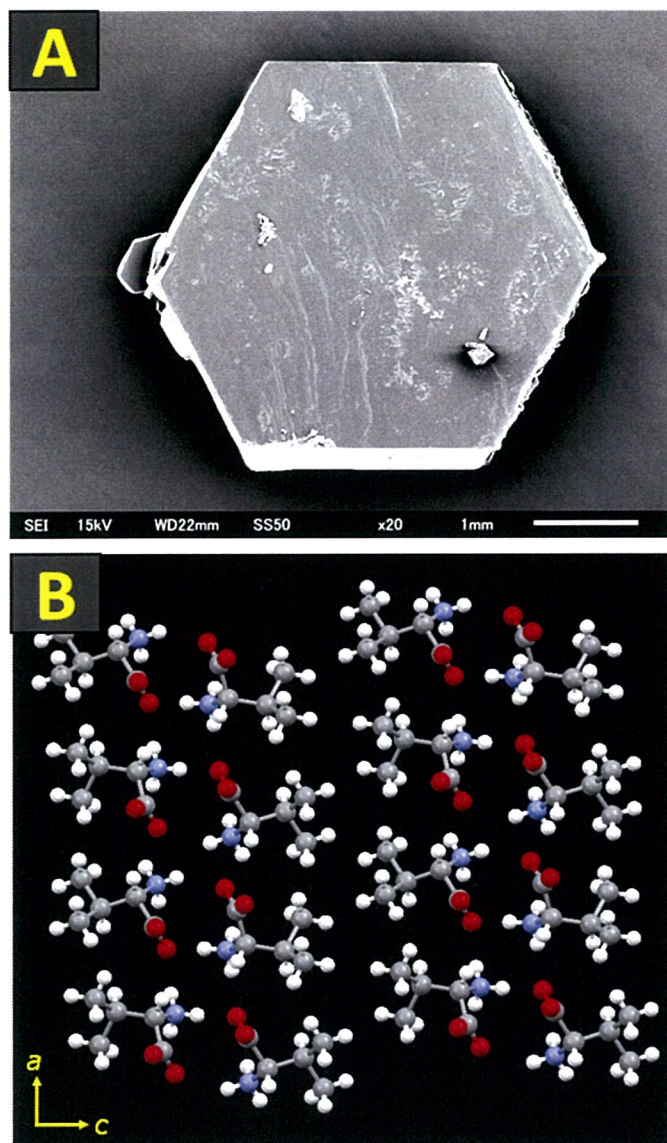


Figure 1-3. (A) SEM photograph of Val crystal. (B) Structure of Val crystal, where gray is carbon, white is hydrogen, red is oxygen, and blue is nitrogen.

1.10. Val の晶析

Val の晶析プロセスにおける課題は、結晶成長、不純物の分離の 2 つに大別される。

まず、結晶成長についてはその結晶の薄さから、工業晶析において成長前に晶析缶内の攪拌によって破碎され、微細化してしまう。微細化すると沈降性が悪く、浮遊しやすい Val は気液界面で固い泡層を作り、均一に攪拌することを困難にする。また、固液分離時の分離性が悪くなるため晶析工程の生産性を低下させる大きな問題となる。発泡は消泡剤を用いることである程度防ぐことはできるが、高純度を求められる最終の晶析工程では使用することはできない。また、市場で流通する殆どの Val は発酵法によって製造されるが、発酵の際に目的のアミノ酸以外にも **Figure 1-4** に示す生合成経路の近い類縁体を生産している。これら類縁体は構造および物理化学的性質が非常に近く、樹脂や膜による分離が困難であるため晶析工程での分離を期待するしかない。最も単純な晶析方法は水を溶媒とした濃縮晶析、冷却晶析だが、しばしば類縁体が結晶中に取り込まれ、品質が低下する問題が発生してきた⁸⁾。これは Val だけではなく、Leu、Ile 等他の BCAA でも同様の物性であるため、同様の問題が発生している。育種や発酵技術は格段に進歩したが、類縁体を完全に生産させないまでには至っておらず、これまでも晶析を工夫して類縁体を除去してきた。

Steinmetzer ら⁹⁾は BCAA に塩酸を多量に添加し、塩酸塩として晶析することで純度が上がることを見出した。しかし、BCAA 塩酸塩の水への溶解度が高いことから、収率が低くなる問題があった。また、工業プロセスにおいて製造環境における管理が難しく、かつ塩酸は腐食性が高く設備に大きな負荷がかかるため、多量に添加するフローは好まれない。

一方で、沈殿剤と呼ばれる有機低分子を添加し、複塩を形成させて晶析する沈

殿剤晶析も古くから研究されている。沈殿剤としては、 β -ナフタレンスルホン酸が Bergmann ら¹⁰⁾、ベンゼンスルホン酸、*p*-トルエンスルホン酸が千畑ら^{11),12)}、エチルベンゼンスルホン酸、3,4-ジメチルベンゼンスルホン酸が長谷川^{13),14)}らによって報告されている。これらは全て **Figure 1-5** に示すようなベンゼンスルホン酸およびその誘導体であり、構造によって液中のどの BCAA と複塩を形成するかが変化するため、通常の晶析と比較して類縁体の分離を精度良く行うことができる。

塩酸塩晶析法、沈殿剤晶析法どちらも実際に工業化されているが、複塩を形成しているため、純品を取得するためには脱塩酸、脱沈殿剤のための工程が必要になる。したがってプロセスが複雑化する課題がある。更に、沈殿剤は排水処理で一般的に用いられる活性汚泥が資化できないため、環境負荷が非常に高く、排水処理が複雑になるデメリットがある。

以上から、簡素なプロセス構築が要求される工業生産では、前述した水を溶媒とする濃縮晶析、冷却晶析を基本とし、煩雑な工程を経ない添加剤の開発が求められている。

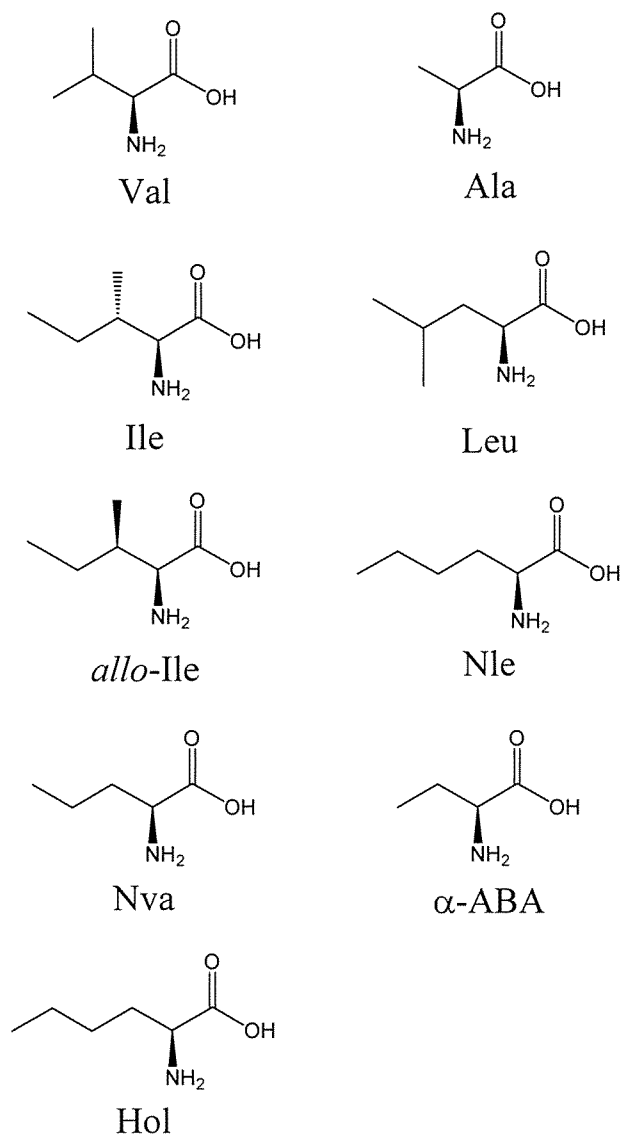


Figure 1-4. Val and Val analog. The figure shows valine (Val), alanine (Ala), isoleucine (Ile), leucine (Leu), allo-isoleucine (*allo*-Ile), norleucine (Nle), norvaline (Nva), α -aminobutyric acid (α -ABA) and homoleucine (Hol).

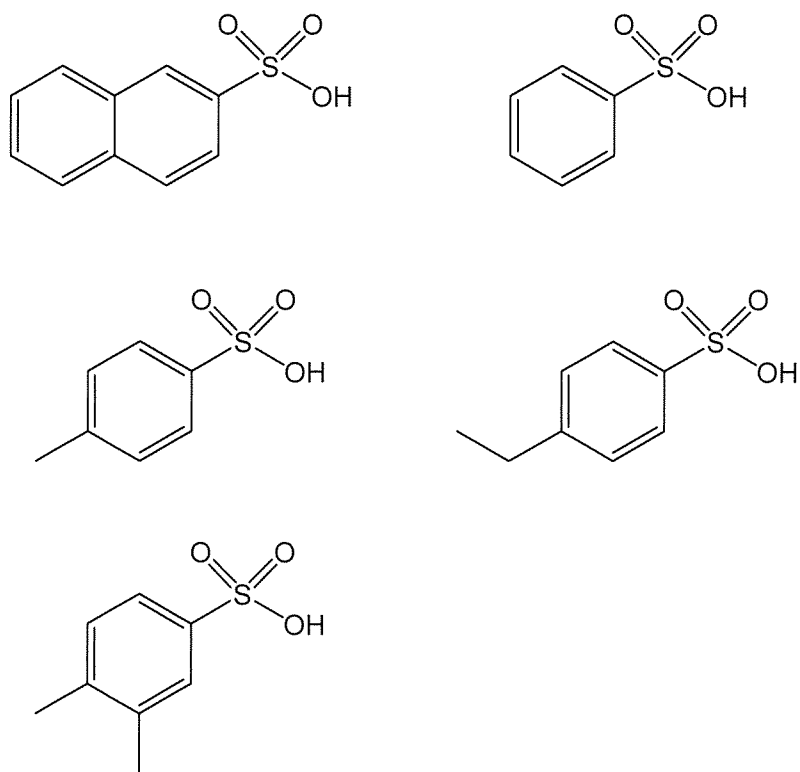


Figure 1-5. Aromatic sulfonate-based reagent. The figure shows β -naphthalenesulfonic acid, benzenesulfonic acid, *p*-toluenesulconic acid, *p*-ethylbenzensulfonic acid and 3,4-dimethylbenzensulfonic acid.

1.11. 晶析に関する既往研究

アミノ酸の晶析では、塩酸塩や沈殿剤のような複塩を形成する添加剤だけではなく、目的アミノ酸以外の類似アミノ酸のようなテイラーメイド添加剤や、界面活性剤等について研究されてきた。

1.11.1. 添加剤と結晶成長の関係

まず、添加剤と結晶成長の関係について既往の研究を紹介する。

Cabrera¹⁵⁾らは、添加剤と結晶成長阻害について検討を行った。多くの場合、結晶表面上のキンクに添加剤が取り込まれることで添加剤がピンのような働きをし、ステップの前進が抑止される。その際、ピン止めされた箇所以外のステップは曲げられて前進するが、前進速度は低下する。これを Cabrera-Vermilyea のピン止め効果と呼ぶ。

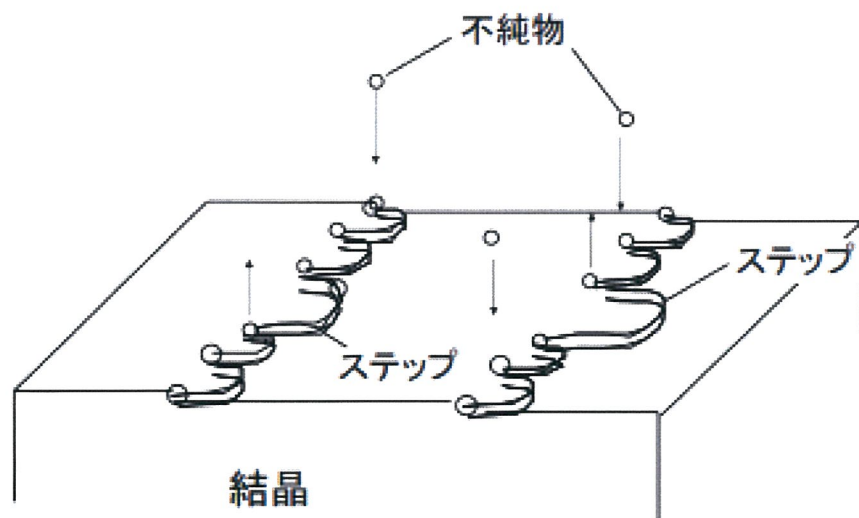


Figure 1-6. The illustration for impurity-induced step pinning.¹⁶⁾

このピン止め効果のモデルについて、Kubota ら¹⁶⁾は、添加剤の吸着と脱着はいずれも起こりうるを考え、Cabrer-Vermilyea のモデルに Langmuir¹⁷⁾が提唱した吸着平衡の概念を適用することで、不純物存在下における工学的なステップ前進速度式 1-1 を導いた。これは Kubota-Mullin モデルと呼ばれ、不純物による結晶成長阻害のモデルとして広く知られている。

$$\frac{G}{G_0} = 1 - \alpha\theta$$

$$\frac{G}{G_0} = 1 - \alpha \frac{KC}{1+KC} \quad \text{---(1-1)}$$

G は添加剤存在下の成長速度、 G_0 は添加剤非存在下の成長速度、 α は不純物有効定数、 K は平衡定数、 C は添加剤濃度を示す。

1.11.2. アミノ酸晶析におけるテイラーメイド添加剤に関する既往研究

アミノ酸の結晶形制御において、数多く研究されているのは類似アミノ酸存在下による結晶成長阻害である。目的アミノ酸に対する類似アミノ酸の取り込みは、全てのアミノ酸に共通するアミノ基およびカルボキシ基を不純物が結晶近傍で脱溶媒和し、表面に吸着することで起こる。吸着した不純物は側鎖構造が異なるために目的アミノ酸の結晶成長を阻害し、結晶成長速度の低下を引き起こす。このような作用を起こす添加剤はテイラーメイド添加剤と呼ばれている¹⁸⁾。Weissbuch ら^{19),20)}はメインとなるアミノ酸以外のゲストアミノ酸は全てテイラーメイド添加剤になりうると論じており、アミノ酸の制御したい軸方向を選択し、それに合ったテイラーメイド添加剤を選択することで結晶の形状を制御し出来るとしている。テイラーメイド添加剤は従来から研究が行われており、以下にいくつかの例を示す。

Addadi ら²¹⁾はテイラーメイド添加剤としてアミノ酸の D 体と L 体を添加し、結晶成長を観察することで、結晶への取り込み機構を提唱した。ホストに Glu を用い、Lys, D-Lys, Thr, D-Thr 等のゲストアミノ酸を用いて検討を行った結果、ゲストアミノ酸は次の機構で取り込まれるとされた。まず、結晶成長面における主鎖の $\text{NH}_3^+ - \text{COO}^-$ と成長面近傍に存在するゲストアミノ酸が通常の結晶成長と同様の機構で結合する。次に、ゲストアミノ酸が結晶表面に結合したら、それに応じて結晶表面の側鎖の配向が変化し、規則的にホストアミノ酸が配列することを阻害する。

Sano²²⁾らは Glu・Na 結晶外形に及ぼす夾雑アミノ酸の影響に関して系統的に解明した。各種アミノ酸を添加した Glu・Na 溶液中で結晶を成長させ、その結晶形の変化や挙動を解析した。例えば、Ala、Lys を添加すると、無添加系と比較して長軸方向が短くなった。これは Ala や Lys が Glu・Na 結晶の長軸端に選択的に吸着し、長軸方向への成長を阻害しているためと考察している。また、D-Glu を添加すると無添加系と比較してより細長い結晶が得られた。これは D-Glu が Glu・Na 結晶の短軸端に選択的に吸着し、短軸方向への成長を阻害しているためである。一方で、Asp を添加した場合は無添加系と同じ姿ながら、粒径が小さい結晶が得られた。これは Glu と非常に近い構造の Asp が Glu・Na 結晶に均一に取り込まれたためであると考察している。このように、添加するアミノ酸の種類によって成長方向を制御可能であることを示した。

Kamei ら^{23),24)}は、Ile の晶析において、結晶成長に深く関与し、且つ純度低下の主要因である類似アミノ酸の取り込みの機構について明らかにした。L-Ile 溶液中にノルロイシン(Nle)等の BCAA 類や Ala を添加して晶析し、取り込まれた量や結晶形の変化から類似アミノ酸存在下での結晶成長モデルを提唱している。結晶が成長するためには結晶化成分が結晶近傍で脱溶媒和する必要があるが、疎水性度の高い、即ち溶解度の低いアミノ酸が優先的に脱溶媒和しやすい。また、脱溶媒和し、結晶に水素結合で吸着するが、Ile より側鎖が長い Nle の場合、結晶格子が側鎖方向に拡張し、新たな Ile の吸着を阻害するため結晶が微細化する。一方、L-Ile より側鎖が短い L-Ala の場合、側鎖による結晶成長の阻害は見られない。結晶成長阻害を起こした結晶の方が相対的に類似アミノ酸の取り込みが多くなるため、Nle の方が Ala より取り込みが多く、Ile の純度が低下すると考察している。

Yoshiura ら^{25),26)}は、Val の回分晶析において、Glu を添加することで Val が凝集し、無添加と比較して結晶粒径が大きく、沈降性の高い結晶が得られること報告した。Val 結晶は通常鱗片様の薄板状結晶を形成し、表面が疎水性のため水系晶析中では浮遊している。そこに Glu を 0.1~1 %添加することで L-Val 結晶中に Glu が取り込まれ、表面に負電荷を帯びたカルボキシ基が露出する。そこに正に帯電した Val クラスターのアミノ基が引き寄せられ、凝集することで結晶が大きくなり沈降性が改善する。Glu だけでなく、同じく側鎖にカルボン酸を持つ 2-アミノアジピン酸(AAA)でも同等の効果を確認できており、側鎖のカルボン酸が大きな役割を担っている本メカニズムを支持する。

Ballesteros²⁷⁾らは Ala の結晶成長および形状に及ぼすゲストアミノ酸の影響について検討を行った。Ala に対して Leu、Phe を添加すると、Ala 結晶は(210)面が発達する。また、無添加時と Leu、Phe 添加時の成長速度の差を測定し、添加するゲストアミノ酸の種類によって成長機構の変化がないことを示した。また、成長速度の抑制効果は Langmuir 吸着モデルと良く相関することから、ゲストアミノ酸は Van der Waals 力等の弱い相互作用力で吸着することが律速であると考察している。

Anuar ら²⁸⁾はテイラーメイド添加剤の添加時における結晶形状の変化について、吸着エネルギーのシミュレーションで算出し、比較することで予測している。水系の濃縮晶析において、Ile をホストとし、Leu を添加したときの各面の吸着エネルギーを Habit95 および Material Studio というソフトを用いて算出し、取り込まれやすい面を予測している。計算すると、Leu は Ile の(100), $(\bar{1}00)$, $(01\bar{1})$, (110) 面に吸着しやすく、その中でも特に $(\bar{1}00)$ 面への吸着エネルギーが低いという

結果になった。よって (100) 面に優先的に吸着し、 b 軸方向の成長が阻害される。Ile は通常 b 軸方向に長い六角形の薄板状の結晶になるが、Leu を添加することで b 軸方向への成長が阻害され、結晶形が正六角形の薄板状結晶に近づくと予測した。本結果は実験系でも良く再現されているため、著者らは結晶成長を制御するテイラーメイド添加剤をスクリーニングする際の 1 手法として、吸着エネルギーの比較という方法を提案している。

Koolman ら²⁹⁾は、Ile 結晶について晶析実験と Plot 3D を用いたシミュレーションを行うことで実験結果に対して理論的な考察をしようと試みている。Ile 溶液中に Val、Leu をそれぞれ添加したときの晶析挙動を観察した。その結果、Leu を添加した場合は結晶形の変化が見られた一方、Val では殆ど見られなかった。Ile 結晶は単位格子あたり Ile 分子が 4 分子存在し、分子同士が水素結合を介して強固に結合している。また、単結晶 X 線回折の結果、Ile の側鎖同士は b 軸方向では 3.74Å の距離を空けて隣接している。そこに Leu が取り込まれると、Leu 側鎖の炭素と Ile 側鎖の炭素間の距離が最短 2.69Å まで近くなる。Kitaigorodsky²⁷⁾によると、炭素原子同士には斥力が働いているため、結合していない炭素同士の距離は通常的环境だと 3.0Å が最短であり、 3.0Å 未満の距離だと存在するのが厳しいと述べている。そのため、Leu の存在下では新たな Ile が吸着しにくくなり、 b 軸方向の結晶成長を阻害している。一方で、Val は Ile 結晶中に取り込まれても Val 側鎖と Ile 側鎖の炭素間距離が最短 3.9Å と長いため、Ile 分子が近づきやすく、結晶成長は殆ど阻害されない。これによって、類似構造、類似物性を持つ BCAA 同士でも、ホスト、ゲストの組み合わせによって取り込まれた時の結晶成長の挙動が変化することが明らかになった。

Poloni ら³⁰⁾は、Cys 分子がジスルフィド結合したアミノ酸である Cystine ((Cys)₂)の結晶成長と添加剤の構造による結晶成長阻害能の相関について、ステップ伸長速度の実測と動力学分析を用いて検討した。まず、(Cys)₂の *c* 軸方向である {0001} 面に対し、(Cys)₂ 誘導体、Cys 誘導体、更にシスチン尿症治療用の FDA 承認薬を用いて、ステップ速度比を液中 AFM による観察から測定すると、(Cys)₂ のジエステル、およびジアミドが高い結晶成長阻害を見せた。キンク結合エネルギーを動力学計算から算出、しても同様にジエステル、ジアミド体のエネルギーが最も低く、計算値と実験の傾向が一致した。一方で、添加剤存在下で成長させた(Cys)₂を偏光顕微鏡で見ると、結晶成長阻害は明らかに面選択的に起こっており、添加剤は{10 $\bar{1}$ 0}面に選択的に吸着していた。更に、モノエステルのような非対称の添加剤に結晶成長阻害能が低かった。シスチン尿症の治療薬として、チオール-ジスルフィド交換反応によって非対称のシスチン誘導体を合成し、結晶成長を阻害する機構でシスチン尿症を治療する化合物がある。ただし、その化合物自体に結晶成長阻害剤としての効果ではないことを明らかにした。

1.11.3. アミノ酸晶析における界面活性剤に関する既往研究

アミノ酸のテイラーメイド添加剤以外にも添加剤の検討がされている。その中でも、結晶成長は分子の吸着と相関性があることが報告されているため、結晶表面の電荷を変化させる界面活性剤は結晶成長に影響を及ぼすと考えられた。

Zumstein ら³¹⁾は Ile の結晶の結晶成長における界面活性剤の影響を調べている。まず、Ile の結晶面の相対成長速度は界面活性剤無添加系において Ile 表面のアミノ基およびカルボキシ基由来の電荷によって制御される。そこに界面活性剤を添加して結晶成長を変化させるが、その種類によっても Ile の結晶成長の挙動は変わる。例えば、アニオン系、ノニオン系（非イオン系）界面活性剤は成長の速い a 軸方向の成長面に吸着することで成長を阻害し、結晶形をウィスカー状にする。一方で、カチオン系界面活性剤は吸着の面選択性がなく、晶癖に大きな変化をおよぼさない。また、疎水性の高い界面活性剤は疎水性面である(001)面と非常に良い親和性を持ち、結晶表面に分散吸着する。臨界ミセル（CMC）濃度は界面活性剤の疎水性を測る指標として使うことができ、CMC 濃度が低い程疎水性度が高い。

Garti ら³²⁾は界面活性剤を用いて Glu の多形を制御し、その機構を考察している。Glu には準安定形 α 、安定形 β の 2 種類の多形が存在する。はじめ α 結晶を取得していても、温度や過飽和の条件によっては α 結晶の表面から β 結晶が析出してきて、やがて β 結晶が大半を占めるという現象が起こる。しかし、界面活性剤は添加することで α 結晶表面からの β 結晶析出を阻害することが明らかになった。すなわち、結晶表面に付着する界面活性剤が β 結晶の成長を阻害することになる。また、 β 結晶の成長を阻害するためには界面活性剤を CMC 濃度

未満にする必要がある。なぜなら、結晶表面に緩いミセル様の構造 (Hemimicelle) を形成することが重要であり、Hemimicelle を作る濃度領域は CMC 濃度以下であるため、と述べている。界面活性剤の吸着状態である Hemimicelle に関しては最も可能性の高い構造を予測しているが、その検証については議論していない。

これら既往の研究は、例えばテイラーメイド添加剤の場合、主にホストアミノ酸に取り込まれることによって結晶形を変えており、実プロセスに応用するに際し、大量の副原料が必要であり、かつ純度の低下が懸念される。一方、界面活性剤の場合、テイラーメイド添加剤と比較してより低濃度で結晶成長速度を変化させることができると考える。しかし、より望む結晶形にしたい場合、添加剤の最適化を行う必要がある。その際、構造と結晶成長に与える影響との相関を把握することが必要だが、明らかになっていないのが現状である。

1.12. 本研究の目的

本研究では Val に焦点を当て、結晶成長を変化させる添加剤の構造と結晶成長の変化との相関を明らかにする。最終的に、任意の結晶形に変化させる添加剤をデザインするための基礎的な知見とすることを目的とする。

・参考文献

- 1) K. Ikeda, inventor and assignee. A production method of seasoning mainly consists of salt of L-glutamic acid. Japanese patent 14805. 1908
- 2) C. S. Katsanos et.al., *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.***2006**, 291, 381.
- 3) Yamadera et al., *Sleep Biol. Rhythms*, **2007**, 5, 126.
- 4) 味の素株式会社 2014 年度 IR ファクトシート「飼料用アミノ酸事業」.
- 5) 長嶋伸也, アミノ酸と結晶多形, 日本結晶学会誌 **1993**, 35, 381.
- 6) 平山令明, 有機結晶作成ハンドブック, 丸善株式会社, **2000**.
- 7) Bio Industry, CMC 出版, **2011**, 28(1), 64-65.
- 8) J. C. Givand et al., *J. Crystal Growth*, **1999**, 198, 1340.
- 9) W. Steinmetzer, et al., US PATENT, 4263450 A, **1980**.
- 10) M. Bergmann et al., *J. Biol. Chem.*, **1939**, 129, 609.
- 11) 千畑一郎ら, 高純度ロイシンの製造法, 公開特許公報, 51-149222, **1976**.
- 12) 千畑一郎ら, 高純度ロイシンの製造法, 公開特許公報, 52-3016, **1976**.
- 13) K. Hasegawa et al., *Acta Crystallogr. C*, **1998**, C54, 637.
- 14) 長谷川和宏ら, 分岐鎖アミノ酸の精製法, 公開特許公報, 10-237030, **1997**.
- 15) N. Cabrera and D. A. Vermilyea, *Growth and Perfection of Crystals*, **1958**, 393.
- 16) N. Kubota, *Cryst., Res., Tech.*, **2001**, 36, 749.
- 17) I. Langmuir, *J. Am. Chem. Soc.*, 1918, 40, 1361.
- 18) 佐藤清隆, 溶液からの結晶成長, 共立出版, **2002**.
- 19) I. Weissbuch et al., *Science*, **1991**, 253, 637.
- 20) I. Weissbuch et al., *Acta Crystallogr. B*, **1995**, B51, 115.
- 21) L. Addadi et al., *Nature*, **1982**, 296, 21.

- 22) C. Sano et al., *J. Crystal Growth*, **1990**, 99, 1070.
- 23) T. Kamei et al., *Org. Proc. Res. Dev.*, **2008**, 12(5), 850.
- 24) T. Kamei et al., *J. Chem. Eng. Jpn.*, **2008**, 41(6), 460.
- 25) H. Yoshiura et al., *Chem. Eng. Technol.* **2013**, 36,(12) 2013.
- 26) H. Yoshiura et al., *J. Crystal Growth*, **2013**, 363, 55.
- 27) D. L. Ballesteros et al., *J. Colloid Interface Sci.*, **1993**, 157, 143.
- 28) N. Anuar et al., *Cryst. Growth Des.*, **2012**, 12, 2195.
- 29) H.C. Koolman et al., *AIChE Journal*, **1996**, 42(1), 147.
- 30) L. Poloni et al., *Cryst. Growth Des.*, **2017**, 17 (5), 2767..
- 31) R. C. Zumstein, *Ind. Eng. Chem. Res.*, **1989**, 28, 334.
- 32) N. Garti et al., *J. Crystal Growth*, **1997**, 172, 486.

2 章. 添加剤添加による外観の変化

2.1. 目的

既往の研究から、結晶成長に及ぼす添加剤が数多くあることが明らかになっている。特に、界面活性剤が結晶外観に影響を与えていたため、本章では界面活性剤を振り、結晶の外観に影響をおぼやすか検討した。また、特に界面活性剤のどの構造が外観変化に寄与したのか検討を行った。次に、非常に多く取り込まれることが知られている BCAA 類縁体についても検討を行った。これらの検討結果から、どの構造が結晶成長を変化させるかを明らかにすることを目的とする。

2.2. 実験方法

まず、Val 65 g を 60 °C の温浴中で水 1000 g に溶解し、6.5 g/100 g-H₂O 水溶液 (40 °C 飽和水溶液) を作製した。その水溶液を分注し、添加剤濃度が 5.6 mmol/dm³ (1 mol% vs Val) になるようにそれぞれ添加剤を添加した。作成した添加剤入り Val 飽和水溶液を 10 cm³ とり、直径 6 cm のシャーレに入れ、蓋をして室温で 3 日放置した。結晶が析出するので、析出した結晶を精密ピンセットで液中から取り出し、表面の付着溶液を丁寧にふき取った。得られた結晶を走査型電子顕微鏡 (SEM) で撮影し、外観を比較した。

2.3. 使用添加剤

スクリーニング対象とした添加剤を **Figure 2-1**、**Figure 2-2**、**Figure 2-3** に示す。

(1) スルホン酸系添加剤

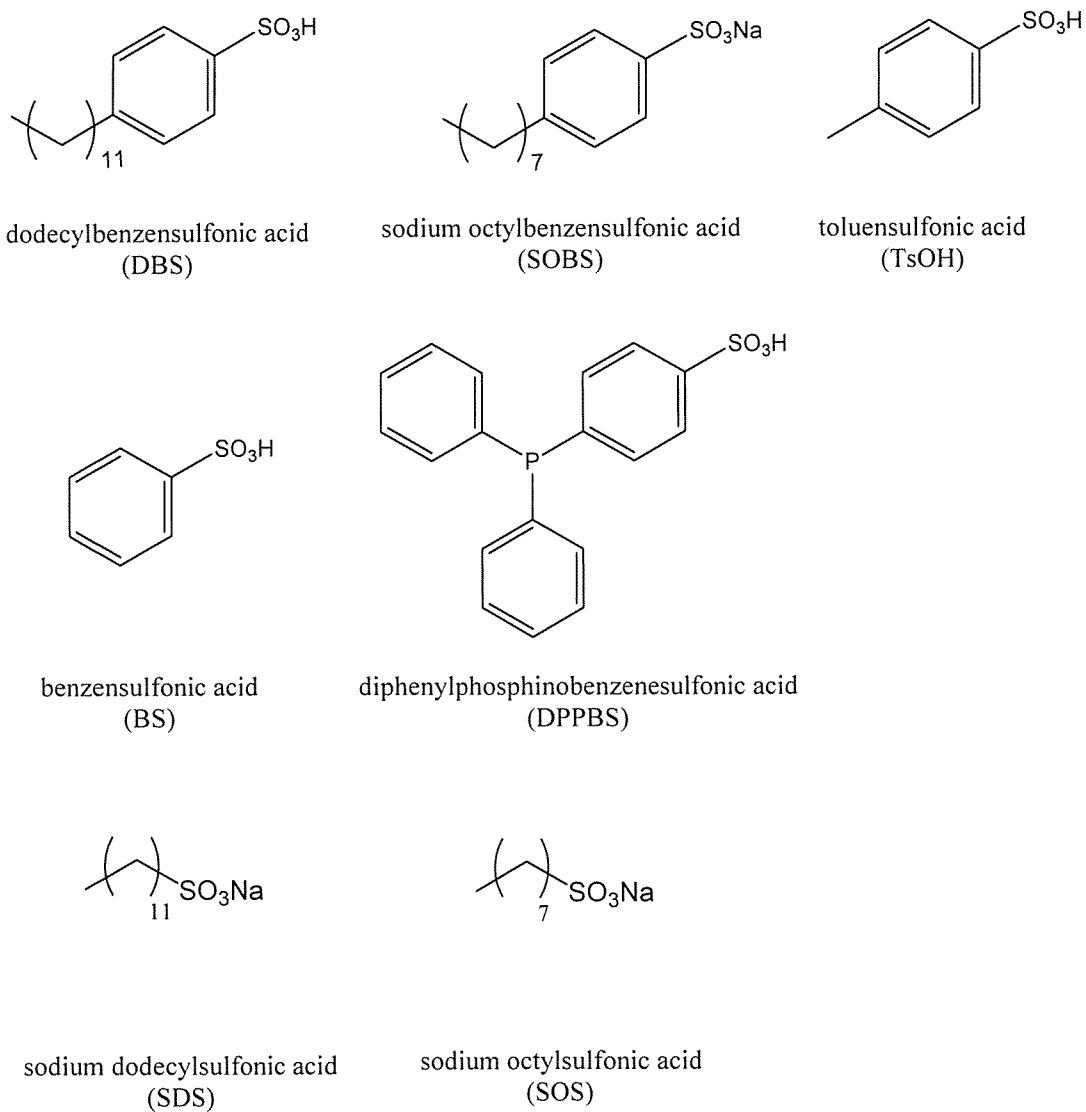
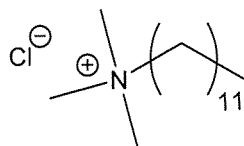
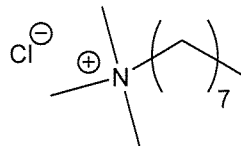


Figure 2-1. Chemical structures of sulfonic acid-based additive. The figure shows dodecylbenzensulfonic acid (DBS), sodium octylbenzensulfonic acid (SOBS), toluenesulfonic acid (TsOH), benzensulfonic acid (BS), diphenylphosphinobenzenesulfonic acid (DPPBS), sodium dodecyl sulfonic acid (SDS) and sodium octylsulfonic acid (SOS).

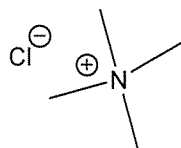
(2) 4 級アンモニウム塩系添加剤



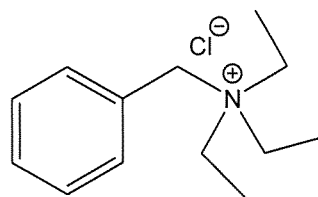
dodecyltrimethylanmonium chloride
(DTMAC)



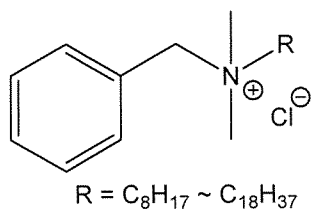
dodecyltrimethylammonium chloride
(OTMAC)



tetramethylanmonium chloride
(TMAC)



benzyltriethylammonium chloride
(BTEAC)



benzalkonium chloride
(BzCl)

Figure 2-2. Chemical structures of quaternary ammonium-based additive. The figure shows dodecyltrimethylammonium chloride (DTMAC), dodecyltrimethylammonium chloride (OTMAC), tetramethylammonium chloride (TMAC), benzyltriethylammonium chloride (BTEAC) and benzalkonium chloride (BzCl).

(3) 類縁アミノ酸系添加剤

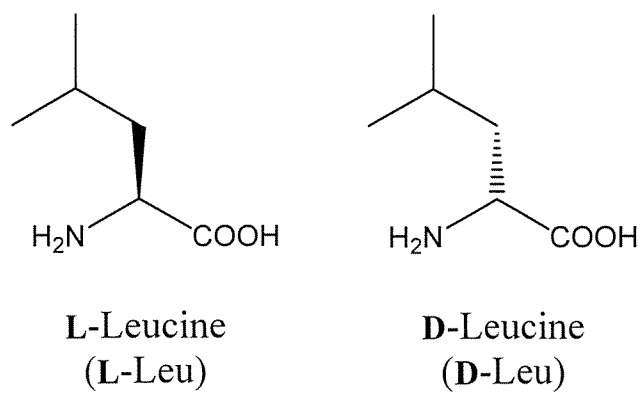


Figure 2-3. Chemical structures of Val analog. The figure shows L-Leucine (L-Leu) and D-Leucine (D-Leu).

2.4. スルホン酸系添加剤存在下における Val 結晶外観

2.4.1. Val 結晶の外観

SEM で撮影した外観の写真を **Figure 2-4** に示す。無添加ではほぼ正六角形の板状結晶が得られるが、ドデシルベンゼンスルホン酸 (DBS) を添加すると非常に細長い六角形の柱状結晶になった。また、DBS よりアルキル基が短いオクチルベンゼンスルホン酸ナトリウム (SOBS) を添加すると DBS 程細長くないが、細長い結晶が得られた。更に短い *p*-トルエンスルホン酸 (TsOH)、アルキル鎖を無くしたベンゼンスルホン酸 (BS) を添加すると、ひし形の結晶が得られた。アルキル鎖の代わりに嵩高いジフェニルホスフィノ基を付けたジフェニルホスフィノベンゼンスルホン酸 (DPPBS) を添加すると、六角形を維持できず、一部輪郭が曲線的な結晶が得られた。DBS からベンゼン環を除いたドデシルスルホン酸ナトリウム (SDS) を添加すると、SOBS のような若干細長い六角形の結晶が得られた。SDS のアルキル鎖を短くしたオクチルスルホン酸ナトリウム (SOS) を添加すると、殆ど無添加時と同じ形状の結晶が得られた。

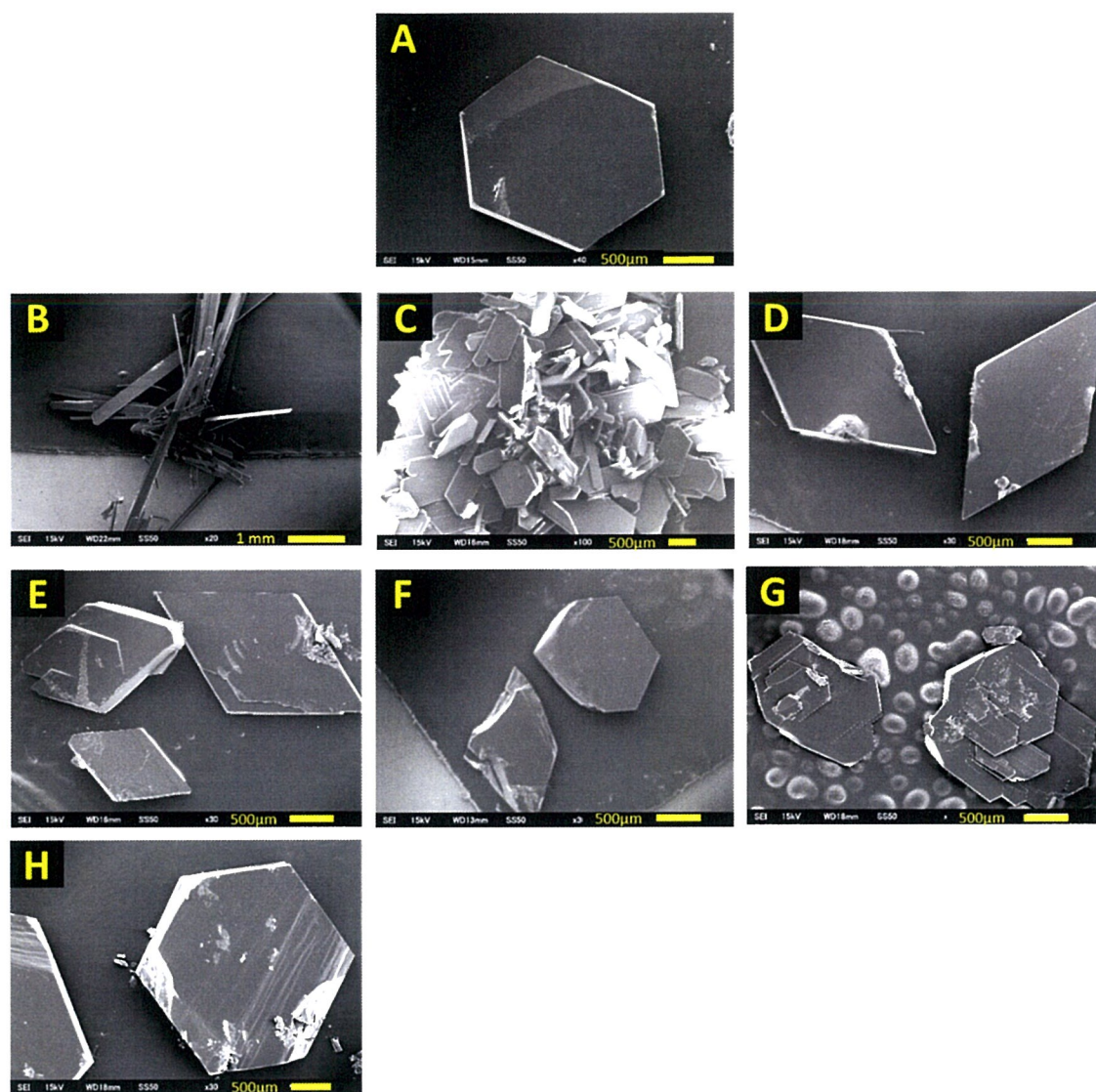


Figure 2-4. SEM photographs of Val crystal crystallized in the absence of additives (A), and in the presence of 5.6 mmol/dm³ DBS (B), SOBS (C), TsOH (D), BS (E), DPPBS (F), SDS (G) and SOS (H).

2.4.2. 考察

スルホン酸系添加剤は主にスルホン酸基が Val 表面のアミノ基に吸着し、結晶成長を阻害すると考えられる。結晶構造の単位格子から各面の露出する置換基を判断すると、 a 軸方向が(100)、 $(\bar{1}00)$ 面共にアミノ基が露出しており、阻害があると推測される。対して、(110)、 $(1\bar{1}0)$ 面方向は片面にアミノ基、もう一方にカルボキシ基が露出しており、 a 軸方向程の阻害は受けないと考えられる。以上から、 a 軸方向に大きな結晶阻害が生じるため、DBS 添加時の結晶に代表されるように、結晶が細長くなったと考えられる。

添加剤の構造と結晶の外観の関係について考察する。まず、アルキル鎖が長い程結晶が細長くなる傾向が観察された。アルキル鎖が長い程(100)、 $(\bar{1}00)$ 面方向に吸着しやすいと考えられる。一方、BS、TsOH ではひし形の結晶が得られた。ひし形の結晶は、 a 軸面方向に殆ど吸着せず、(110)、 $(1\bar{1}0)$ 面等の b 軸方向が結晶成長阻害を受けることで生じると考える。即ち、アルキル鎖が殆どない添加剤は(100)、 $(\bar{1}00)$ 面に殆ど吸着しないと推測される。また、DBS と SDS を比較すると、ベンゼン環を有する添加剤の方が結晶の形状はより細長く変化した。このことから、ベンゼン環の存在が吸着しやすさに大きく影響していると考えられる。これから吸着挙動の詳細に関しては、3 章、4 章で詳しく検討する。

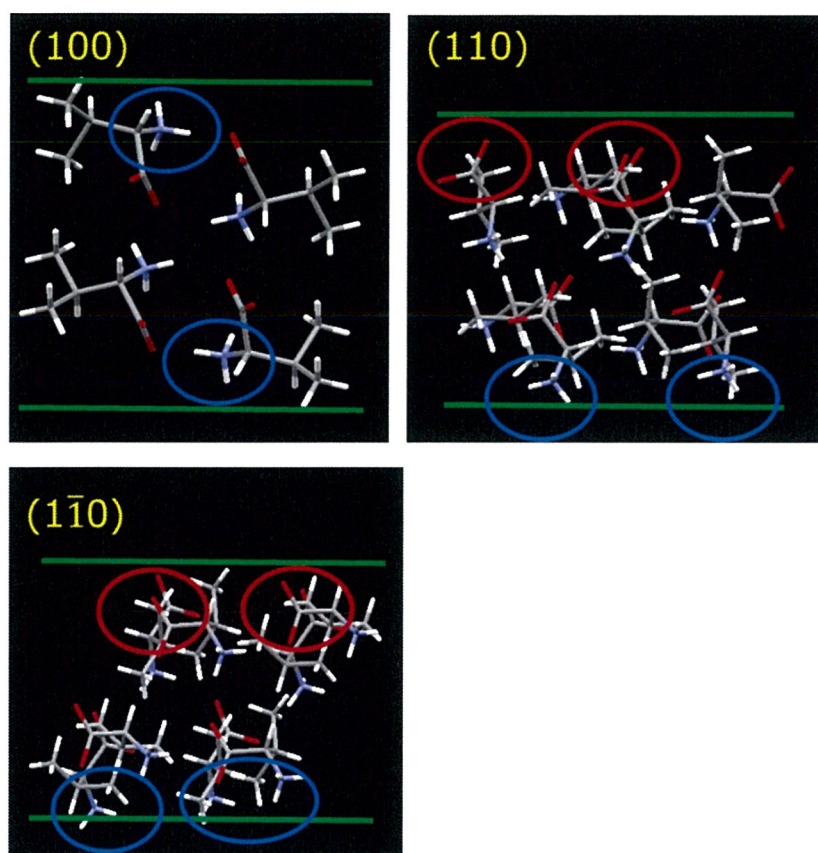


Figure 2-5. The crystal structure of Val crystal. Green line shows crystal face, blue circle shows amino group, and red circle shows carboxy group.

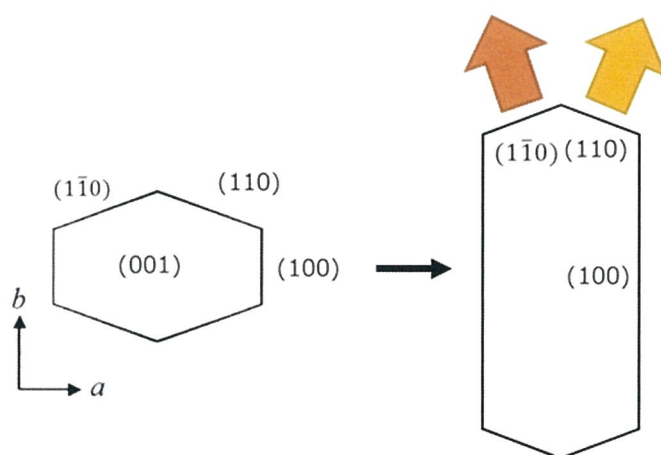


Figure 2-6. The crystal shape of Val crystal when DBS is added.

2.5. 4 級アンモニウム塩系添加剤存在下における Val 結晶外観

2.5.1. Val 結晶の外観

SEM で撮影した外観の写真を **Figure2-7** に示す。塩化ドデシルトリメチルアンモニウム (DTMAC) を添加すると、DBS 程細長くはならないが、無添加と比較して結晶が細長くなった。DTMAC のアルキル鎖を短くした塩化オクチルトリメチルアンモニウム (OTMAC)、塩化テトラメチルアンモニウム (TMAC) を添加すると、無添加と殆ど変わらない六角形の結晶が得られた。アルキル基の代わりにベンゼン環をつけ、かつトリエチルアンモニウム基にした塩化ベンジルトリエチルアンモニウム (BTEAC) を添加すると、上から見ると TMAC と同様の外観であった。ただし、厚みが増加している傾向が観察された。塩化ベンザルコニウム (BzCl) を添加すると今度は逆に非常に薄く、細長い結晶が得られた。

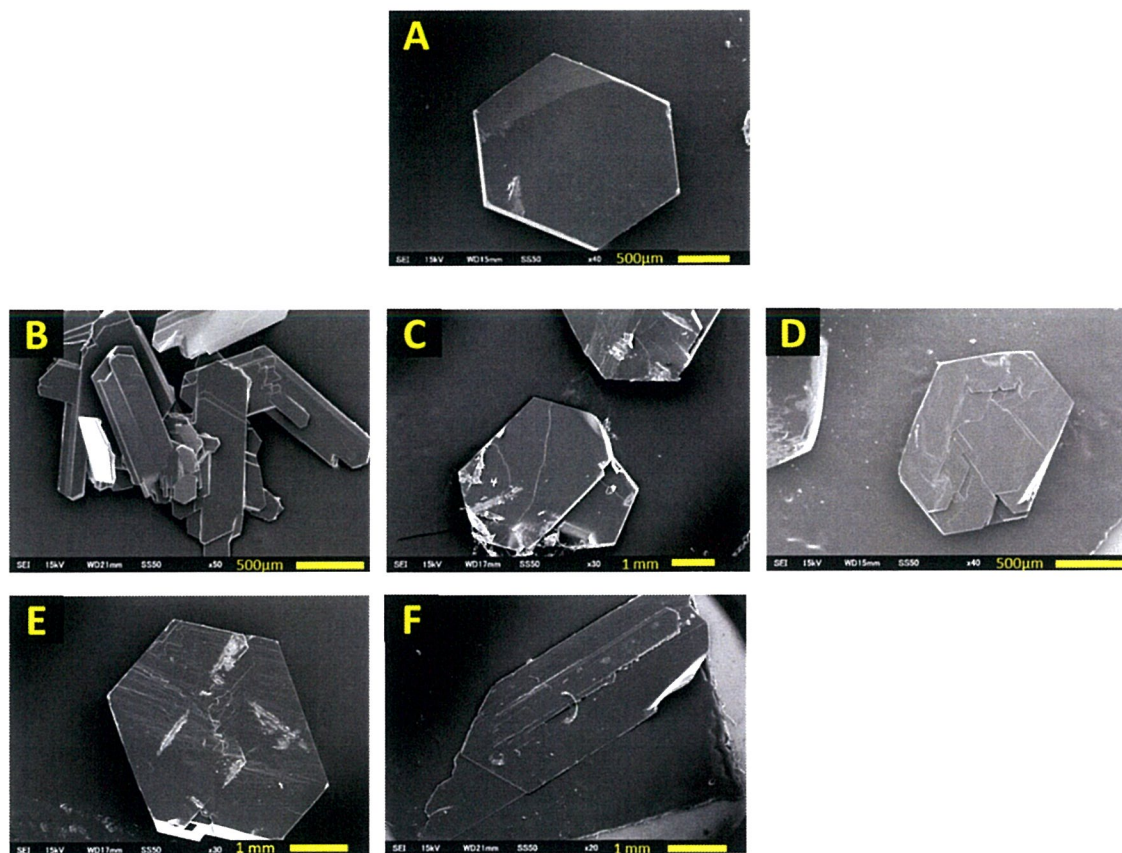


Figure 2-7. SEM photographs of Val crystal crystallized in the absence of additives (A), and in the presence of 5.6 mmol/dm³ DTMAC (B), OTMAC (C), TMAC (D), BTEAC (E) and BzCl (F).

2.5.2 考察

スルホン酸系と比較すると、BzCl を除き、水平方向の外観の変化は小さかった。その中でも、最も側鎖が長い DTMAC が最も細長くなる傾向が観察された。OTMAC や TMAC は殆ど変化が見られないことから、殆ど吸着されないと考えられる。

BTEAC を添加すると、水平方向への変化は殆どなかったが厚み方向に成長する傾向が観察された。本現象に関しては 4 章で考察する。

BzCl を添加すると、薄く、細長い結晶が得られた。厚み方向である c 軸方向の(001)面はイソプロピル基が露出しており、疎水性を有している。そこに長鎖で疎水性が高い BzCl が吸着することで、 c 軸方向が阻害され薄くなったと考える。

2.6. 類縁アミノ酸存在下における Val 結晶外観

2.6.1. Val 結晶の外観

SEM で撮影した外観の写真を **Figure 2-8** に示す。L-Leu を添加すると結晶面がところどころ削れ、面に凹凸がある結晶が得られた。一方、D-Leu を添加すると、無添加時と殆ど変化がない結晶が得られた。

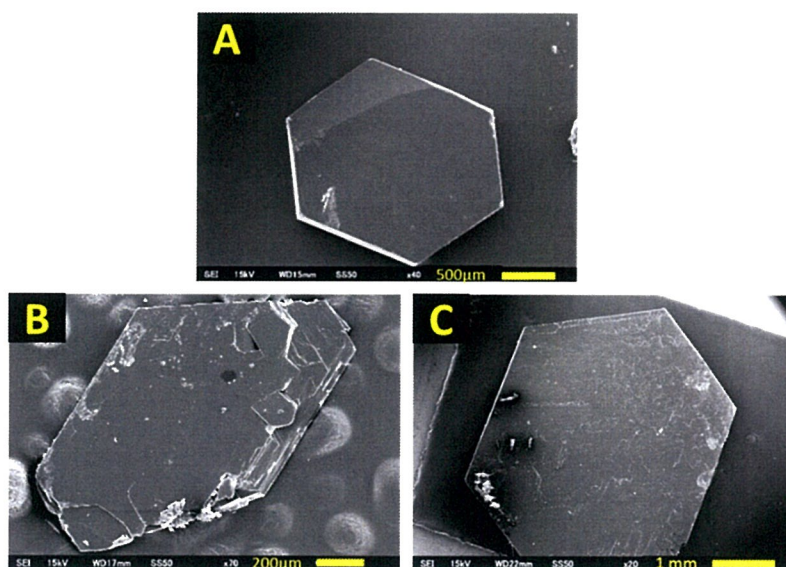


Figure 2-8. SEM photographs of Val crystal crystallized in the absence of additives (A), and in the presence of 5.6 mmol/dm³ L-Leu (B) and D-Leu (C).

2.6.2. 考察

L-Leu を添加するとは結晶表面が直線的ではなく、輪郭に細かい凹凸がある結晶が生じた。結晶表面に L-Leu が吸着することで部分的に結晶成長が阻害されることで、凹凸がある結晶が生成したと考える。それに対し、L-Leu のエナンチオマーである D-Leu 添加時の結晶は BLK と殆ど変化はなかったことから、殆ど吸着、相互作用しなかったと考える。立体が反転することで相互作用に大きな差が生じた機構については、5 章にて深く検討する。

2.7. まとめ

本章ではスルホン酸系、4 級アンモニウム系、類縁アミノ酸系の 3 種類についてスクリーニング、結晶形の変化の傾向を観察した。

スルホン酸系、4 級アンモニウム系は共にベンゼン環、アルキル基が存在する界面活性剤の方が界面活性剤ではない添加剤と比較して結晶形の変化は大きく、細長い結晶が得られる傾向が観察された。類縁アミノ酸系について、L 体は輪郭に凹凸を生じられるが、D 体は殆ど変化がなく、同じ立体の物質のみが結晶に対して影響を及ぼした。

まず、3 章、4 章では結晶形に変化をおよぼしたスルホン酸系界面活性剤を中心に、構造と吸着、結晶成長について深く考察する。また、5 章では類縁アミノ酸系添加剤と Val 結晶との相互作用と晶析時に得られた結晶の特徴について検討する。

3 章. 添加剤の構造と Val 表面への吸着挙動

3.1. 目的

2 章では様々な種類の添加剤を用い、結晶の外観が変化することを示した。添加剤は結晶に付着し、Cabrerá-Vermilyea のピン止めモデルによってステップの成長を抑制し、結晶成長を阻害すると考えられる。すなわち、結晶の外観を変化させるためには、添加剤が Val 表面に吸着する必要がある、Val 表面への吸着挙動は外観変化と大きな相関があると考えられる。一方、結晶は面によって露出する置換基が異なるため、付着量、すなわち結晶成長阻害能が面ごとに異なると推測される。そこで、添加剤の構造と吸着挙動の相関を明らかにし、結晶形を変化させるために重要な構造を明らかにすることを目的とする。

3.2. 吸着モデルの決定

まず、2 章にて最も結晶形の変化が多様であったスルホン酸系添加剤について、どの構造が Val 結晶への吸着に寄与しているのか、吸着実験を用いて評価を行った。評価を行う前に、どのような吸着状態であるかを決定するため、吸着モデルへのフィッティングを行い、スルホン酸系添加剤の吸着モデルを決定した。

3.2.1. 実験方法

- ① 25 °C 飽和 Val 水溶液を作成した。
- ② ①に添加剤を濃度が 10^{-3} ~ 10^1 mmol/dm³ まで広範囲になるように添加した。
- ③ 添加剤含有 Val 飽和溶液 7 cm³ を 50 cm³ ファルコンチューブに入れ、結晶 0.5 g を投入した。BS と TsOH は DBS 吸着量が非常に少なかったため、結晶を 1 g 投入した。
- ④ 事前検討において 10 分以内に平衡に達することを確認したため、ボルテックスを用いて 2 分に 1 回攪拌する作業を 20 分行って吸着平衡状態にした。
- ⑤ 結晶添加後の溶液を濾過し、上清を取得した。
- ⑥ ⑤で得た上清と、結晶投入前の溶液中に含まれる添加剤濃度を HPLC で定量した。
- ⑦ 結晶添加前後の添加剤濃度から吸着量を定量した。

実験に使用した DBS およびその誘導体の構造を **Figure 3-1** に示す。吸着に使用した結晶は味の素株式会社製造の医薬用グレードの Val である。粉碎前の Val の結晶粒度分布はメジアン径 (D50) が 146 μ m だったが、吸着量を増やすために表面積を増やし、かつ各結晶面がなるべく均一に露出させるように D50 を 33 μ m まで粉碎した結晶を使用した。

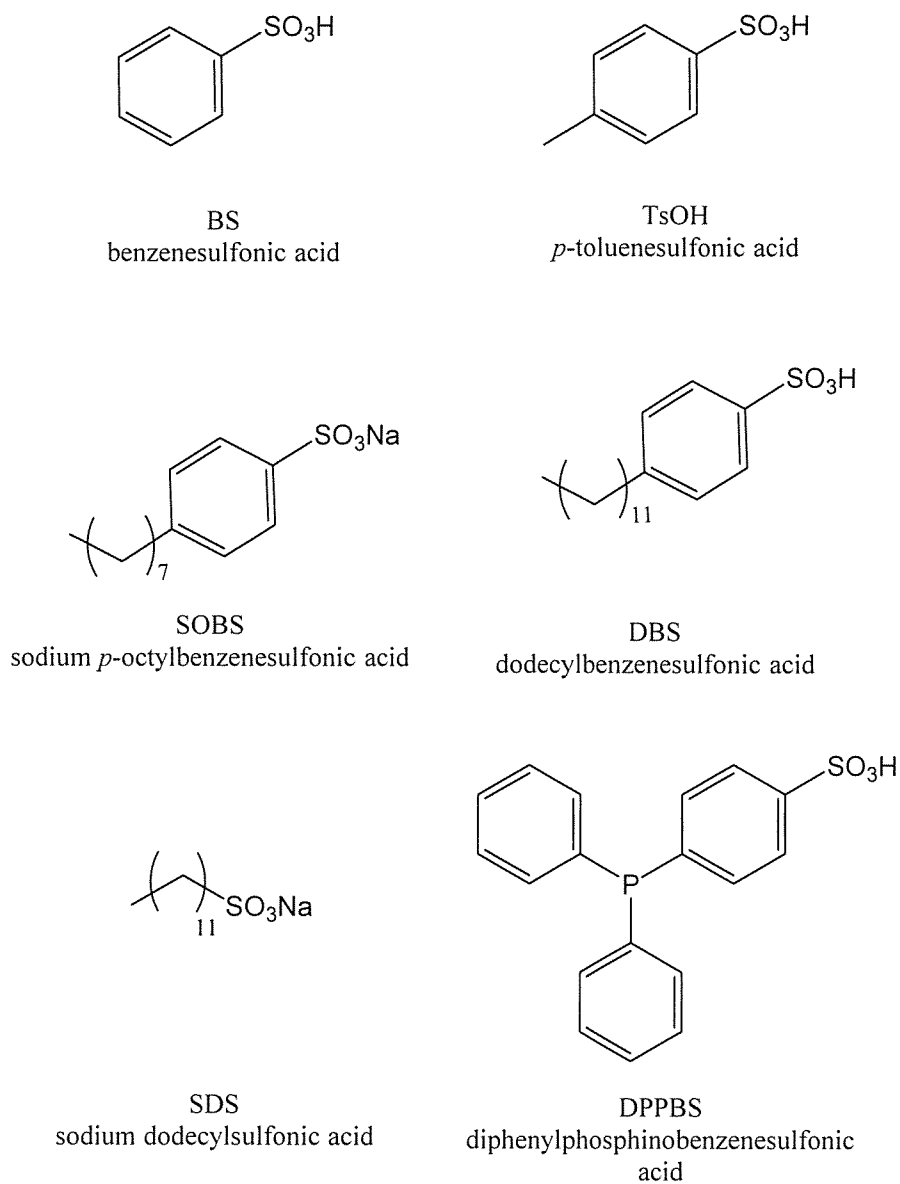


Figure 3-1. The chemical structure of DBS, benzenesulfonic acid (BS), toluenesulfonic acid (TsOH), sodium octylbenzenesulfonic acid (SOBS), dodecylbenzenesulfonic acid (DBS), sodium dodecylsulfonic acid (SDS) and diphenylphosphinobenzenesulfonic acid (DPPBS).

3.2.2. 分析条件

装置: SHIMADZU HPLC 10AD

カラム: Shodex Asahipak GF-310HQ (7.5mm I.D. × 300mm)

注入量: 0.02 cm³

流量: 0.6 cm³ / min

分析時間: 25 min

カラム温度: 40 °C

バッファー: 50 mmol/dm³ NaCl aq. / MeCN = 33 / 67

検出法:

①芳香環を含む添加剤: UV 220 nm

②芳香環を含まない添加剤: 示唆屈折率計(RI)、positive.

3.2.3. Langmuir モデルによるフィッティング

Langmuir 式³³⁾は 3-1 式で示される吸着等温式であり、活性炭工程における不純物の淘汰能の試算等に頻用される。

$$q = \frac{q_s KC}{1 + KC} \quad \dots (3-1)$$

q は吸着量、 q_s は単位表面積あたりの飽和吸着量、 K は吸着平衡定数、 C は平衡濃度を示す。

3-1 式を 3-2 式に変形し、横軸に C 、縦軸に C/q をとって吸着等温線を引くと、Langmuir モデルに則って吸着する物質は直線となる。これを Langmuir プロットと呼ぶ。

$$\frac{C}{q} = \frac{1}{q_s} C + \frac{1}{q_s K} \quad \dots (3-2)$$

取得したスルホン酸系界面活性剤の吸着等温線について、3-2 式から直線性を確認した。その結果を **Figure 3-2** に示す。BS や TsOH、DPPBS のような界面活性を持たない添加剤では、Langmuir プロットの直線は 1 本になった。一方で、DBS、SOBS、SDS の様に界面活性を持つ添加剤は Langmuir プロットが折れ曲がる現象が確認された。このことから、界面活性を持つ添加剤は全濃度領域で Langmuir モデルの吸着として近似することができないと考える。

直線が折れ曲がる界面活性剤の場合、従来は低濃度側の直線の傾き、切片から K を算出し、高濃度側の直線の傾きから q_s を算出していた。しかし、直線が折れ曲がるということは、単層モデルである本モデルを用いることが不適であり、1 つの式で広い濃度範囲をカバーできる別のモデルを適用すべきであると考え

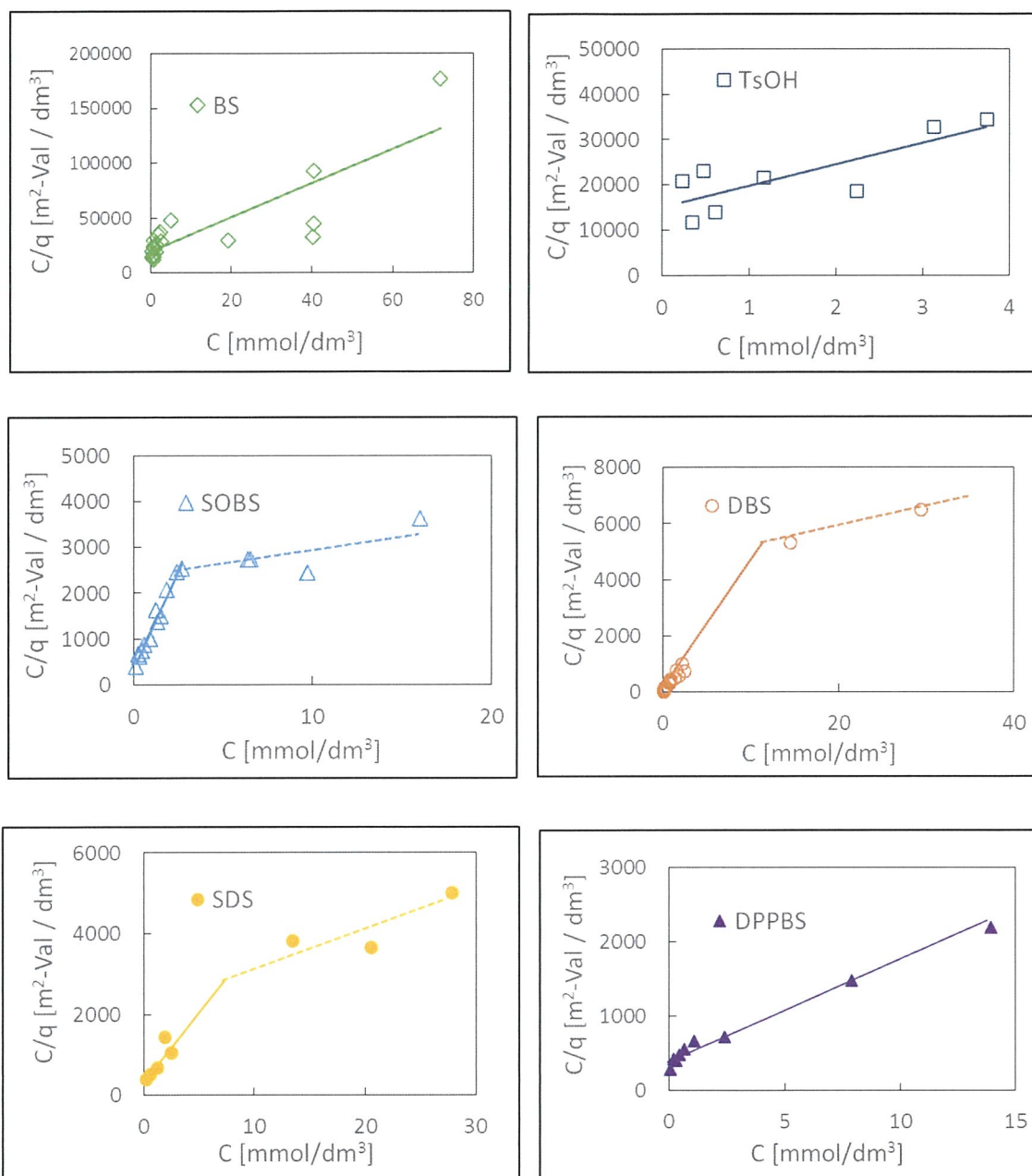


Figure 3-2. Langmuir plotting for adsorption of each additive. Symbols show BS (\diamond), TsOH (\square), SOBS (\triangle), DBS (\circ), SDS (\bullet) and DPPBS (\blacktriangle).

3.2.4. Freundlich 式によるフィッティング

Freundlich 式は、3-3 式に示す Herbert Freundlich によって提唱された経験式である。

$$q = kC^{\frac{1}{n}} \quad \dots (3-3)$$

q は吸着量、 C は濃度、 k と n は定数である。横軸を C 、縦軸を q にして両対数グラフにすると直線に乗るという特徴がある。そこで、実験結果のプロットが直線に乗るか検証を実施した。**Figure 3-3** に吸着等温線の両対数グラフを示す。DBS は 10 mmol/dm³ 以上の濃度で直線の傾きが減少したそれ以外の添加剤は全て直線性が確認された。両対数グラフであり、ある程度データの振れは吸収できるのが Freundlich 式の特徴であるため、Langmuir 式と比較して広い濃度範囲でプロットが直線に乗っていると考ええる。

一方、Freundlich 式で吸着挙動を議論するにはいくつか課題がある。まず、Freundlich 式は C を無限大まで大きくすると、 q は Langmuir 式の様に飽和吸着量に漸近せず、無限に発散してしまう。そのため、Freundlich 式はある程度低濃度の領域でしか使用することができない。そのことを示している DBS のグラフは、10 mmol/dm³ 以上の高濃度のプロットが若干直線より下に位置している。吸着が飽和に近づき、傾きが減少していると考ええる。以上から、Freundlich 式は高濃度領域でのフィッティングには不向きであると考ええる。

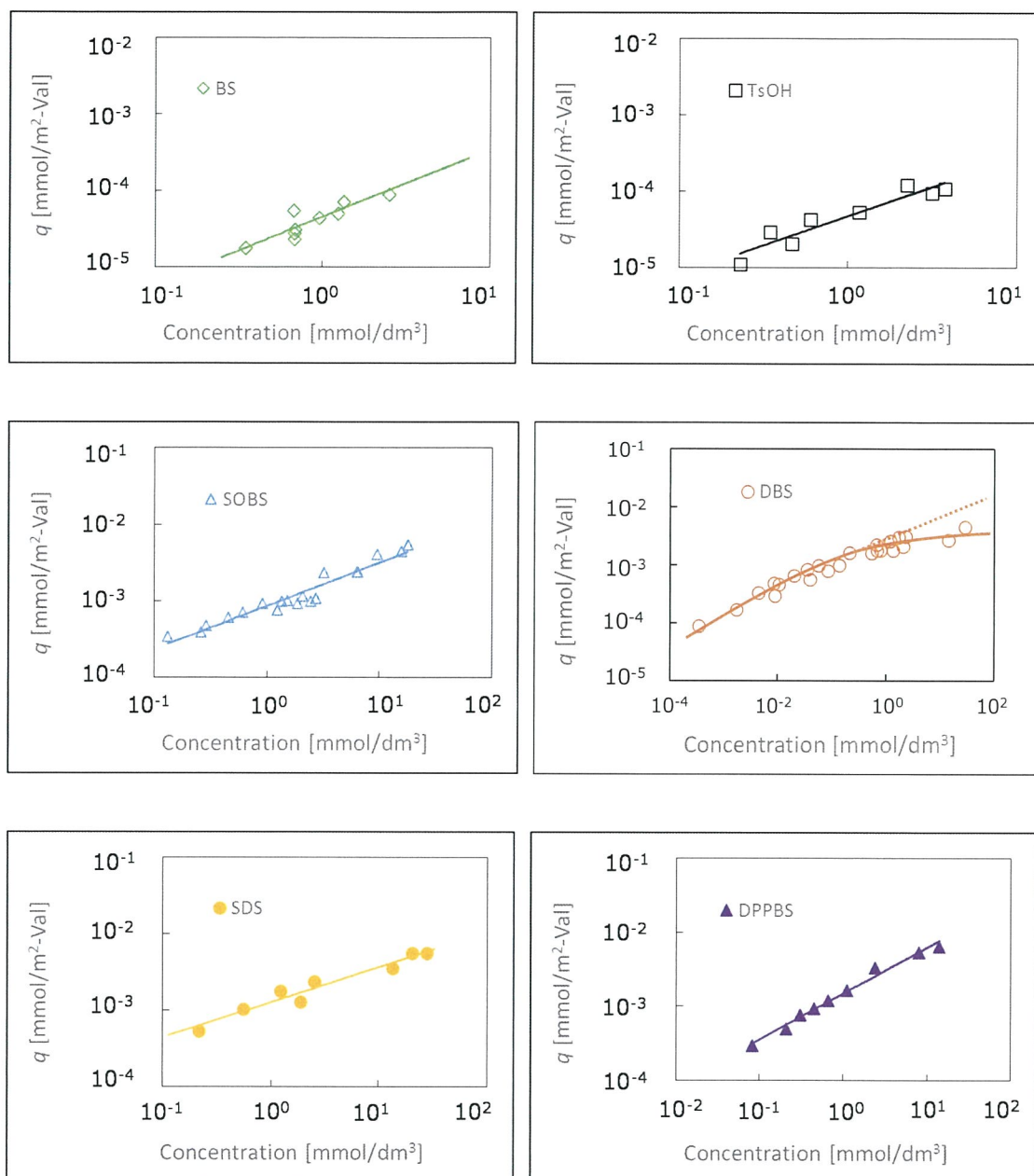


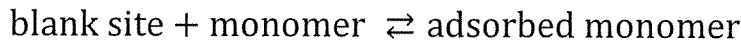
Figure 3-3. Adsorption isotherm of each additive to Val crystal. Symbols show BS (◇), TsOH (□), SOBS (△), DBS (○), SDS (●) and DPPBS (▲).

3.2.5. ヘミミセルモデルによるフィッティング

界面活性剤の吸着は **Figure 3-4** に示す Scamehorn ら⁶⁾の提唱する reverse orientation モデル、**Figure 3-5** に示す Rupprecht ら⁷⁾の提唱する small surface micelle モデルに代表されるように、吸着面の表面に集合体（ヘミミセル）を形成して吸着することが知られている。ヘミミセルを形成するということは、1つの吸着点に対して複数の分子が吸着していることになる。即ち、Langmuir のような単層吸着ではなく、ヘミミセルを考慮したモデルが原理上最適であると考ええる。

そこで、ヘミミセルを考慮した吸着等温式が Zhu^{8),9)}らによって提唱された。著者らの報告では導出過程を一部省略していたので、本報告では改めて原理、原則から式の導出を行った。

ヘミミセルの形成の模式図を **Figure 3-6** に示す。ヘミミセルの形成は2ステップに分けられる。1ステップ目は、吸着サイトへモノマーが吸着する。



モノマーが吸着するときの吸着速度 V_a 、および脱離速度 V_d は次の様に表される。

$$V_a = k_a C (q_b + q_1) (1 - \theta)$$

$$V_d = k_d (q_b + q_1) \theta$$

q_b は空の吸着サイト数、 q_1 は単層吸着しているモノマー量、 θ は吸着サイトの被覆率、 C は平衡濃度である。吸着平衡時において V_a と V_d が等しくなる。

$$V_a = V_d$$

$$k_a C (q_b + q_1) (1 - \theta) = k_d (q_b + q_1) \theta$$

被覆率 θ は次のように定義される。

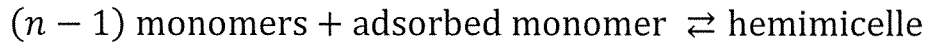
$$\theta = \frac{q_1}{q_b + q_1}$$

$$1 - \theta = \frac{q_b}{q_b + q_1}$$

以上から、1 ステップ目の平衡定数 k_1 は 3-4 式で表される。

$$k_1 = \frac{k_a}{k_d} = \frac{q_1}{q_b C} \quad \dots (3-4)$$

2 ステップ目は、**Figure 3-7** に示すようにモノマー吸着層に対して $n-1$ 個のモノマーが集まり、 n 個のモノマーが会合したヘミミセルを形成する。



ヘミミセルが形成されるとき形成速度 V_{a2} 、およびヘミミセルがモノマーになる脱離速度 V_{d2} は次の様に表される。

$$V_{a2} = k_{a2} C^{n-1} (q_1 + q_{hm}) (1 - \theta_2)$$

$$V_{d2} = k_{d2} (q_1 + q_{hm}) \theta_2$$

q_{hm} は形成されたヘミミセルの数、 θ_2 はヘミミセル形成率である。吸着平衡時において V_{a2} と V_{d2} が等しくなる。

$$k_{a2} C^{n-1} (q_1 + q_{hm}) (1 - \theta_2) = k_{d2} (q_1 + q_{hm}) \theta_2$$

$$k_{a2} C^{n-1} (1 - \theta_2) = k_{d2} \theta_2$$

ヘミミセル形成率 θ_2 は次のように定義される。

$$\theta_2 = \frac{q_{hm}}{q_1 + q_{hm}}$$

$$1 - \theta_2 = \frac{q_1}{q_1 + q_{hm}}$$

以上から、2 ステップ目の吸着平衡定数 k_2 は 3-5 式に表される。

$$k_2 = \frac{k_{a2}}{k_{d2}} = \frac{q_{hm}}{q_1 C^{n-1}} \quad \dots (3-5)$$

表面に対する界面活性剤の吸着量 q は 3-6 式に表される。

$$q = q_1 + nq_{hm} \quad \dots (3-6)$$

また、高濃度において、全ての吸着サイトに添加剤によるヘミミセルが形成される状態における吸着量 q_∞ （単位面積当たりの飽和吸着量 q_s とほぼ同義）は 3-7 式の様に表される。

$$q_\infty = n(q_1 + q_b + q_{hm}) \quad \dots (3-7)$$

3-6 式に 3-4、3-5、3-7 式を代入すると、3-8 式が導出される。本報告では、このモデルをヘミミセルモデルと表記する。

$$q = \frac{q_s k_1 C \left(\frac{1}{n} + k_2 C^{n-1} \right)}{1 + k_1 C (1 + k_2 C^{n-1})} \quad \dots (3-8)$$

q は吸着量、 q_s は単位面積当たりの飽和吸着量である。3-8 式はヘミミセルを形成しない場合、即ち $k_2 = 0, n = 1$ の条件で 3-9 式に示す通り、Langmuir 型に近似することができる。このことから、単層吸着になる非界面活性剤の添加剤についても適用可能である。

$$q = \frac{q_s k_1 C}{1 + k_1 C} \quad \dots (3-9)$$

ヘミミセルモデルを用い、吸着実験で得られた吸着等温線のプロットについて Excel のソルバーを用いてフィッティングを実施した。その結果を **Figure 3-7** に示す。いずれの添加剤も広い濃度範囲で精度良くフィッティングできることが分かった。ヘミミセルモデルは Langmuir モデルや Freundlich 式と比較して、広い濃度範囲で適応可能である。また、吸着モデルが明確であるため、各定数に

も物理的意味を持つ。以上から、界面活性剤の吸着に関する議論はヘミミセルモデルを使用することが最適であると考ええる。

以上より、Val への界面活性剤の吸着挙動は Reverse orientation モデル、または Small surface micelle モデル等のヘミミセルを形成する機構で吸着していると考ええる。どちらの機構も比較的高濃度領域の吸着挙動としてはほぼ同等であり、どちらかを断定することは本吸着実験だけではできないため、液中 AFM 等での観察によってヘミミセルの状態を観察する必要がある。

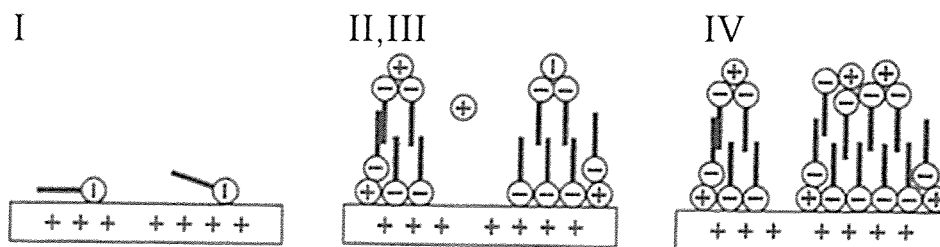


Figure 3-4. Illustration of reverse orientation model.³⁴⁾ Additive is SDS, and adsorbent is alumina. In quite low concentration, adsorption amount is increased linearly following Henry law (I). Adsorption amount is increased because SDS is interacted each other and hemimicelle is formed (II). Hemimicelle is grown (III). When SDS concentration is over CMC, adsorption amount is saturated (IV).

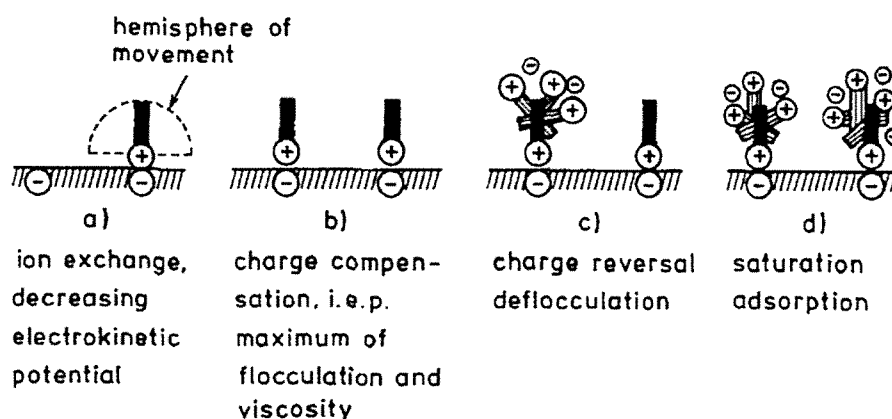


Figure 3-5. Illustration of small surface micelle model.³⁶⁾ Additive is dodecyltrimethylammonium bromide, and adsorbent is silica gel. Additive is adsorbed single layer at low concentration (a). Active point is saturated by additive (b). Adsorption amount is increased because SDS is interacted each other and hemimicelle is formed (c). Adsorption amount is saturated because hemimicelle is achieved the limit of growth (d).

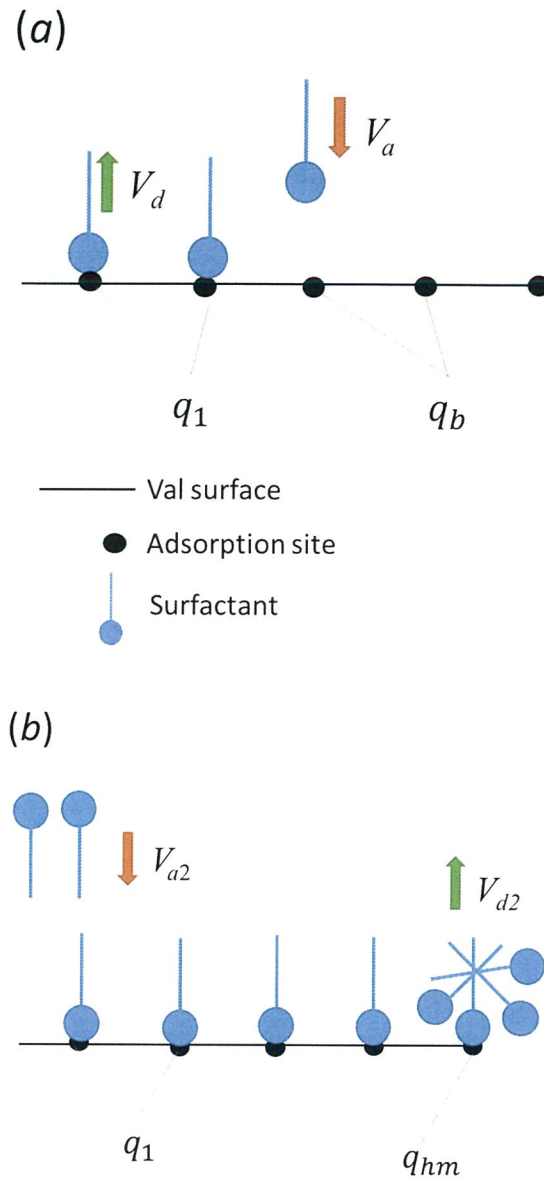


Figure 3-6. Illustration of hemimicelle model as 2 step adsorption. In first step, monomer surfactant adsorbed onto Val surface as single layer (a). In second step, monomer surfactant was assembled in the surfactant adsorbed to Val crystal and hemimicelle was constructed (b).

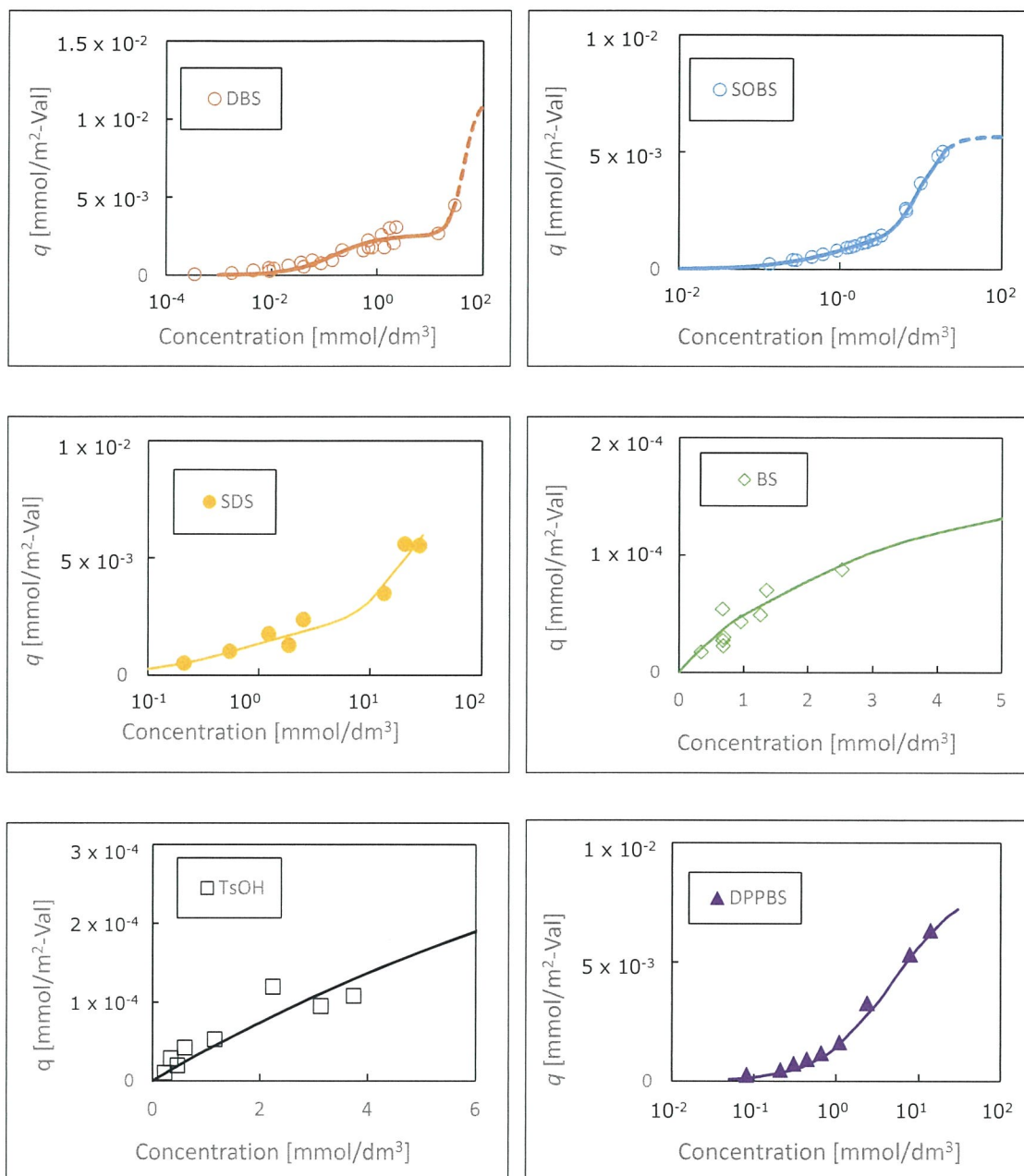


Figure 3-7. Adsorption isotherm of each additive to Val crystal and fitting result by using hemimicelle model. Symbols show BS (◇), TsOH (□), SOBS (△), DBS (○), SDS (●) and DPPBS (▲).

3.3. Val 表面への吸着に対するアルキル鎖長の影響

ヘミミセルモデルを用い、アルキル鎖長と吸着に関わる定数の相関を検討した。まずは、アルキル鎖長の異なる BS、TsOH、SOBS、DBS の 4 添加剤について、**Figure 3-7** で示したフィッティングによって得られた定数を **Table 3-1** に示す。BS、TsOH はヘミミセルを形成しないため、 $k_2=0$ 、と置いてフィッティングを実施した。

まず k_1 に注目すると、アルキル鎖が長くなるにつれて k_1 は上昇する傾向が見られた。即ち、アルキル鎖が長くなるにつれて Val 結晶の吸着活性点への吸着がしやすいということを示す。疎水性面への吸着については、疎水性相互作用による駆動力が考えられる。疎水性はアルキル鎖が長くなるにつれて強くなる。そのため、疎水性面へ吸着しやすくなり、 k_1 が増加したと考えられる。また、親水性面への吸着においても、単層吸着時に両隣の添加剤分子同士で相互作用しあうと考えられる。その際、アルキル鎖が長い方が相互作用しやすく、単層吸着が安定すると考えられる。





k_2 に注目すると、 k_2 もアルキル鎖が長くなるにつれて上昇する傾向が観察された。ヘミミセルを形成する臨界濃度は CMC と相関があることが知られており、CMC はアルキル鎖が長い方が低い値であった。このことから、アルキル鎖長が長い方がより低濃度でヘミミセルを形成することができるため、DBS は SOBS より k_2 が高かったと考える。

次に、平衡定数同士を比較すると、 k_2 は k_1 と比較して非常に低かった。このことから、低濃度範囲では単層吸着が支配的であり、吸着活性点が殆ど飽和に近い状態にならないとミセルは形成しないことを示していると考ええる。

また、 q_s は BS、TsOH が 10^{-4} mmol/dm³ オーダーである一方、SOBS、DBS は 10^{-3} mmol/dm³ オーダーと大きく異なった。ヘミミセルを形成する SOBS、DBS は

ヘミミセルの分だけ BS、TsOH と比較して q_s が大きくなると考える。しかし、吸着活性点 1 つ当たりの分子数 n は 2~4 程度であることから、オーダーレベルで q_s が変化する現象には別の理由があると考ええる。その理由について仮説を挙げる。添加剤濃度が CMC を超えると、水中の界面活性剤の殆どはミセル分子となり、吸着した分子の一部は吸着活性点への単層吸着を経由してヘミミセルを形成するのではなく、1 会合体あたりの分子数が 10~100 程度の大きいミセルが直接 Val 表面に吸着した可能性が考えられる。本仮説を立証するためには、水中 AFM 等で Val 結晶表面に吸着したミセルの状態（ミセルサイズ等）を確認する必要があると考える。

Table 3-1. Correlation between alkyl length and adsorption parameters.

構造式	CMC [mmol/dm ³]	k_1	k_2	q_s [mmol/m ² -Val]	n
 BS	--	0.27	0	2.27×10^{-4}	1.0
 TsOH	--	0.45	0	1.82×10^{-4}	1.0
 SOBS	10.5	1.02	2.81×10^{-3}	5.66×10^{-3}	3.6
 DBS	1.3	7.81	6.23×10^{-3}	6.20×10^{-3}	2.5

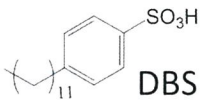
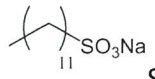
3.4. Val 表面への吸着に対するベンゼン環の影響

ヘミミセルモデルを用いて、DBS のベンゼン環の有無による影響について比較、考察を実施した。**Figure 3-7** で示した吸着等温線について、フィッティングで算出されたパラメーターを **Table 3-2** に示す。

まず k_1 を見ると、ベンゼン環の存在によって Val 結晶表面の吸着活性点に非常に吸着しやすくなっていることが明らかとなった。また、 k_2 も同様にベンゼン環の存在によって吸着しやすくなる傾向を示しており、アルキル鎖長のときと同様でベンゼン環があることで CMC が低下し、対応して k_2 が上昇したと考える。また、 q_s はいずれもほぼ同等の数値を示した。どちらもミセルを形成し、かつ n も大きく変わらないことから、 q_s は同等になったと考える。

DBS と SDS を比較すると、疎水性面に対しては SDS の場合アルキル鎖同士の疎水性相互作用のみだが、DBS はそれに加えて **Figure 3-8** に示すようなベンゼン環の π 電子とアルキル鎖間の弱い水素結合である CH / π 相互作用が存在する。それによって、より吸着しやすくなったと考えられる。

Table 3-2. Correlation between benzen ring and adsorption parameter.

Additive	CMC [mmol/dm ³]	k_1	k_2	q_s [mmol/m ² -Val]	n
 DBS	1.3	7.81	6.23×10^{-3}	6.20×10^{-3}	2.5
 SDS	8.1	1.28	1.72×10^{-3}	7.48×10^{-3}	3.1

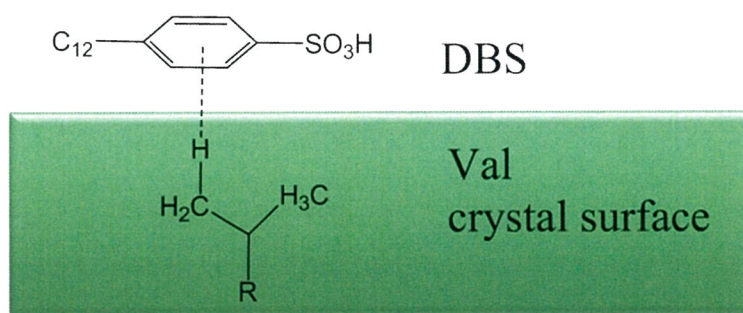


Figure 3-8. CH/ π interaction.

3.5. 添加剤の吸着に対する共存 Na の影響

3.5.1. 背景・目的

これまで使用してきた添加剤の中で、試薬として購入可能な形態によって SOBS の様にナトリウム塩である添加剤と、DBS のようにフリー体である添加剤が混在していた。そこで、ナトリウム塩になることによって Val 表面への吸着量に差が生じるか否か、検証を実施した。

3.5.2. 実験方法

実験方法を **Figure 3-9** に示す。添加剤は最も吸着量が大きく評価しやすい DBS を選択した。

- ① 25℃ 飽和 Val 水溶液を作成した。
- ② 飽和 Val 水溶液に添加剤を所定の濃度になるように添加した。添加剤濃度は 10^{-3} ~ 10^1 mmol/dm³ オーダーまで広範囲になるように振った。
- ③ 添加剤溶液に NaCl を添加剤と等モル添加し、ナトリウム塩相当の濃度になるようにした。
- ④ 添加剤含有 Val 飽和溶液 7 cm³ を 50 cm³ ファルコンチューブに入れ、結晶 0.5 g を投入した。
- ⑤ 2 分に 1 回攪拌する作業を 20 分行って吸着平衡状態にした。
- ⑥ 結晶添加後の溶液を濾過し、上清を取得した。
- ⑦ ⑥で得た上清と、結晶投入前の溶液中に含まれる添加剤濃度を HPLC で定量した。
- ⑧ 結晶添加前後の添加剤濃度から吸着量を算出した。

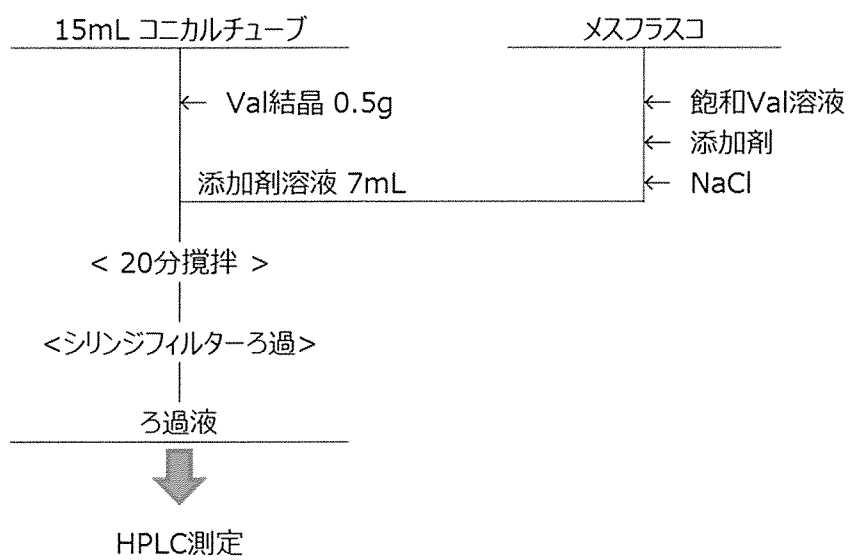


Figure 3-9. Experimental flow of adsorption test.

3.5.3. 結果・考察

等モルの NaCl 存在下での吸着等温線と、NaCl 非存在下の吸着等温線を比較した結果を **Figure 3-10** に示す。低濃度では殆ど変化はなかったが、およそ CMC 以上で NaCl 非存在下より NaCl 存在下の DBS 吸着量が若干多くなるという結果になった。また、ヘミミセルモデルでフィッティング比較した結果を **Table 3-3** に示す。Val 結晶面への吸着平衡定数 k_1 は殆ど変化がなく、ヘミミセル形成時の吸着平衡定数 k_2 が上昇した。 q_s や n にも殆ど変化は確認できなかった。

本結果について考察する。DBS はヘミミセルを形成すると、スルホン酸基同士の距離が近くなり、同じマイナス電荷同士が反発しあうと考えられる。そこに Na^+ がいることでマイナス電荷が中和され、反発せずにヘミミセルが安定していただけるため吸着しやすくなり、吸着量が増加したと考えられる。既往の研究³⁴⁾でも NaCl を添加することでヘミミセルが安定化すると報告されており、今回も同様の現象として説明できると考える。

以上から、共存ナトリウムは k_2 を増加させる効果があった。ナトリウム塩として吸着を評価したのは SOBS と SDS の 2 種類である。いずれも DBS と比較しているが、**Table 3-1** で示した通り k_2 はどちらの場合も DBS の方が高いため、アルキル鎖長とベンゼン環が k_2 を増加させるという考察は変わらないことが確認された。

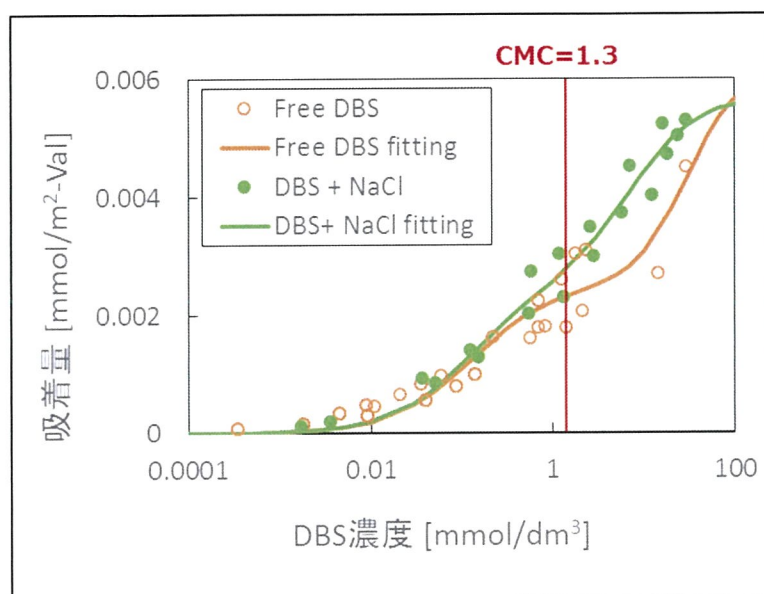


Figure 3-10. Adsorption isotherm of DBS in the presence and absence of NaCl.

Symbols show adsorption isotherm of DBS in the absence of NaCl (○) and adsorption isotherm of DBS with equimolar NaCl (●). Solid line shows the result of fitting by hemimicelle model.

Table 3-3. Effect of adding NaCl on the adsorption parameters of DBS to Val crystal.

Additive	k_1	k_2	q_s [mmol/m ² -Val]	n
DBS	7.81	6.23×10^{-3}	6.20×10^{-3}	2.5
DBS + NaCl	7.91	9.34×10^{-3}	5.70×10^{-3}	2.2

3.6. DBS 吸着の面選択性

3.6.1. 背景

Val 結晶は面によって露出する置換基が異なり、面ごとに吸着挙動も異なることが想定される。そこで、面ごとの吸着パラメーターを推定することができないか、検討を行った。

3.6.2. 実験方法

実験は 3.2.1 と同様の方法で実施した。使用する Val 結晶の平均粒径は粉碎条件を変え、 $D50 = 33, 60, 90 \mu\text{m}$ の 3 種類を用意した。Val 結晶は表面積に占める(001)面の割合が高い。そこで、粉碎することで(001)面の割合が減少し他の面を露出させ、(001)面とそれ以外の面の q_s, k_1 を推算することができる。また、Val を気液界面で晶析させた(001)面が殆どを占める結晶も用意した。

3.6.3. 結果

結果を Table 3-4 および Figure 3-11 に示す。結晶は粉碎することで比表面積が増加する。比表面積が増加しても単位面積当たりの飽和吸着量 q_s に大きな差は見られなかったが、平衡定数 k_1 が上昇する傾向が見られた。つまり、粉碎により(001)面の比率を少なくすることで吸着しやすくなることから、(001)面の飽和吸着量は他の面と大きく変化しない。一方で、(001)面自体の k_1 は低下、すなわち他の面と比較して吸着しにくいということである。

以上から、(001)面の q_s は約 $0.013 \text{ mmol/m}^2\text{-Val}$ 、 k_1 は約 1.4 であると考え。その他の面の吸着パラメーターに関しては本実験で推定することはできないため、別のアプローチが必要であると考え。

Table 3-4. Correlation among Val crystal size, saturated adsorption amount q_s and equilibrium constant k_1 .

Crystal size [D50 [†]]	Specific surface area [m ² /g-Val]	q_s [mmol/m ² -Val]	k_1 [-]
33	1.654	0.013	7.37
60	1.141	0.012	7.49
90	0.847	0.013	4.82
Val crystallized at gas-liquid interface	† †	† †	1.42

† D50 = Median size.

† † Under the quatisation limit.

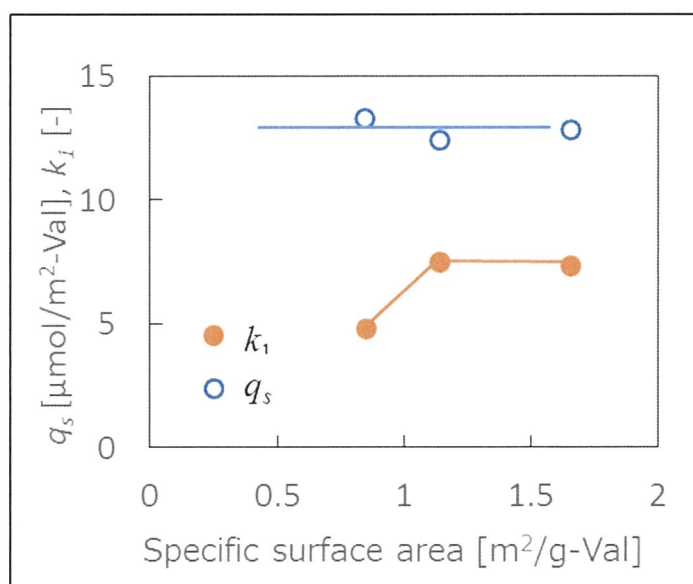


Figure 3-11. Correlation among specific surface area, equilibrium constant k_1 (●) and saturated adsorption amount q_s (○).

3.7. Val 結晶の各面における活性吸着点の間隔

DBS の吸着量を(001)とその他の面で比較すると、(001)面は他の面と比較して q_s は同等だが、 k_1 が低かった。本結果について、活性点の数や露出する官能基と相関があると仮定し、検証を実施した。Table 3-5 に各面の吸着活性点密度を示す。

Val 分子中で DBS と相互作用しうる官能基は、DBS と水素結合を形成するアミノ基と Van der Waals 力による疎水性相互作用をおよぼす側鎖のイソプロピル基である。一般に結合エネルギーは水素結合の方が Van der Waals 力と比較して非常に高い。(001)面はイソプロピル基のみが表面に露出しており、他の面と比較して吸着し辛く、 k_1 が低くなることは理に適っている。DBS の分子サイズと活性点間隔を比較した。活性点間隔は 2.5~6.4 Å であり、DBS の分子サイズはアルキル鎖をまっすぐ伸ばしたときの全長を分子モデリングソフトである Winmostar を用いて計算すると 24.5 Å であったため、真横に置かれた場合、他の活性点を覆ってしまう。しかし、DBS のドデシル基はフレキシブルに曲がることのできるため、アルキル鎖の長さによる立体障害は比較的小さいと考える。吸着点の密度を計算すると、面によって顕著に変化しなかった。このことは、結晶を粉砕しても q_s が殆ど変化しなかった結果を支持する。

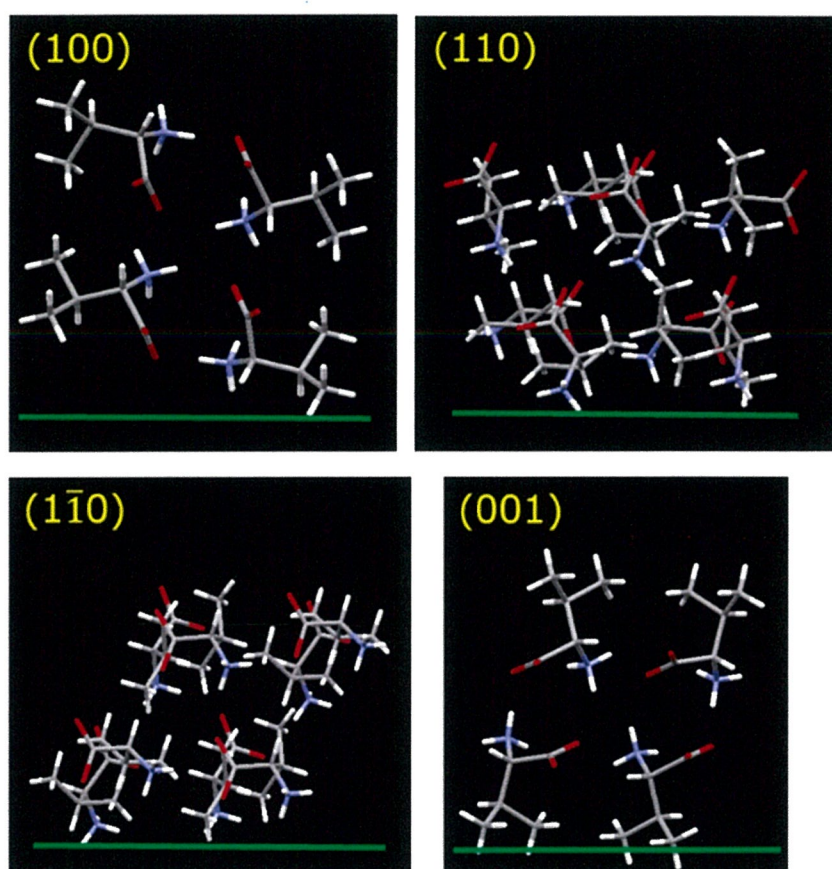


Figure 3-12. Crystal structure of each Val crystal face. Green line shows crystal face.

Table 3-5. Active points of adsorption in each Val crystal face.

	(100)	(110)	(110)	(001)
吸着活性点	アミノ基	アミノ基	アミノ基	イソプロピル基
吸着駆動力	水素結合	水素結合	水素結合	ファンデルワールスカ
活性点間隔 [Å]	5.3	6.4	6.4	2.5
活性点密度 [個/m ²]	1.57E+18	1.50E+18	1.50E+18	3.91E+18

3.8. 4 級アンモニウム系添加剤の吸着挙動

3.8.1. 実験方法

3.2.1 と同様の方法で吸着実験を実施した。

3.8.2. 分析方法

芳香環を持つ BTEAC に関しては UV で検出すれば良いが、DTMAC 等の芳香環を持たない 4 級アンモニウム系添加剤は、SDS で使用していた示唆屈折率計での測定も困難であった。そのため、カチオンクロマトグラフィーを用いて測定を実施した。

使用機器: DIONEX ICS-1600 (Thermo Fisher Scientific Inc.)

カラム: CS 12A

注入量: 0.01 cm³

流量: 1 cm³/min

分析時間: 15 min

カラム温度: 35 °C

バッファー: 20 mmol/dm³ メタンスルホン酸

検出法: 電気伝導度

3.8.3. 吸着等温線

結果を **Figure 3-13** に示す。参考として SDS の吸着等温線を載せた。SDS のスルホン酸基を 4 級アンモニウム塩に誘導化した DTMAC は、SDS と比較して非常に吸着量が低かった。スルホン酸と比較してアンモニウム塩は Val 表面に吸着しにくいことがわかる。また DTMAC のドデシル基を短くし、メチル基にした TMAC は更に吸着量が低下した。これはスルホン酸系添加剤と同様の傾向である。

更に、DTMAC のドデシル基をベンゼン環に替え、トリエチル体にした BTEAC と比較すると、BTEAC の吸着量が DTMAC より増加した。このことから、4 級アンモニウム系添加剤においては、ドデシル基よりベンゼン環の方が吸着に寄与していると考ええる。

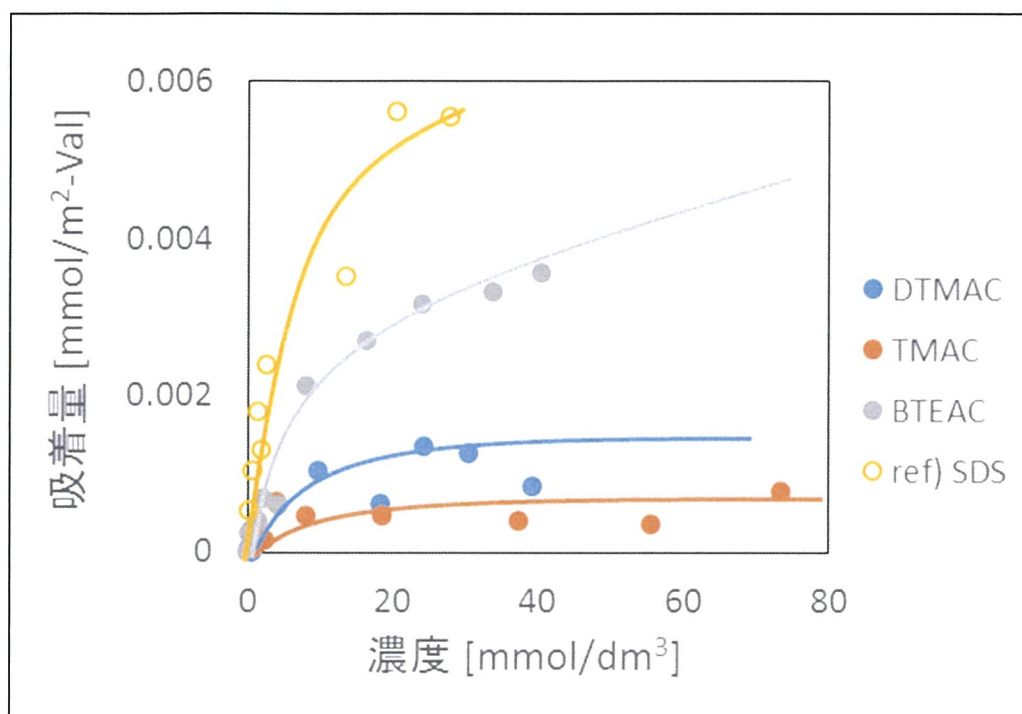


Figure 3-13. Adsorption isotherm of quaternary ammonium-based additive to Val crystal. Symbols show DTMAC (●), TMAC (●), BTEAC (●) and SDS (○).

3.8.4. 考察

親水性面の吸着はヘミミセルを形成することで吸着量が多くなる。すなわち、CMC が低い程、低濃度でも吸着量が高くなる。そこで、SDS と DTMAC の CMC、吸着等温線から算出した q_s 、 k_1 を **Table 3-5** に示す。DTMAC は SDS と比較して CMC が高く、低濃度では殆ど吸着できないことが想定される。そのため、 k_1 が SDS より低下したと考えられる。一方、高濃度でも DTMAC は SDS ほど吸着量に変化しなかった。Val の結晶面において、4 級アンモニウムと相互作用し得るカルボキシ基が露出する面を **Figure 3-14** に示すが、SDS と相互作用し得るアミノ基が露出する面と比較して少ないことが挙げられる。(110)、(1 $\bar{1}$ 0)面にアミノ基が露出しているとする、その対面である(1 $\bar{1}$ 0)、(110)面にカルボキシ基が露出する。Val 結晶において、アミノ基が露出する結晶面が 4 つ、対してカルボキシ基が露出結晶面は 2 つしかない。そのため、DTMAC が吸着しうる結晶面は SDS より少なく、DTMAC の飽和吸着量は SDS より低かったと考えられる。

BTEAC と DTMAC を比較すると、BTEAC の方が多く吸着する結果となった。BTEAC は界面活性剤ではないため、親水性面への吸着はヘミミセルを形成できる DTMAC の方が優位であると考えられる。一方、疎水性面に対してはベンゼン環による CH/ π 相互作用によって BTEAC の方が吸着しやすいと考えられる。4 級アンモニウムは吸着活性があるカルボキシが露出する結晶面が少ないため、疎水性面の吸着量の影響が大きくなり、CH/ π 相互作用を持つ BTEAC の方が高い吸着量を示したと考える。

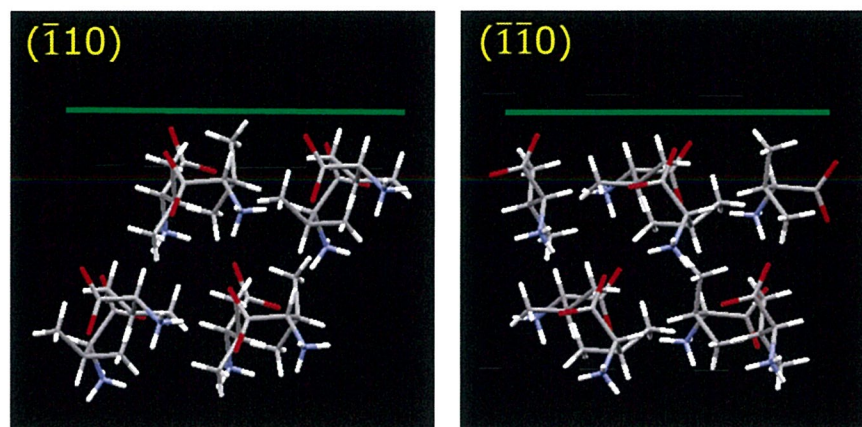
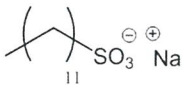



Figure 3-14. Crystal face which is exposed carboxy group. Green line shows crystal face.

Table 3-5. Each adsorption parameter of SDS and DTMAC

	Chemical Structure	CMC [mmol/dm ³]	q_s [mmol/m ² -Val]	k_1 [-]
SDS		8.1	0.007	1.28
DTMAC		20	0.003	0.02

3.8.5. 結論

4級アンモニウム系添加剤はスルホン酸系添加剤を比較すると、 q_s 、 k_1 共に低く、Val 結晶へ吸着しにくかった。理由は主に2点考えられる。1点は、4級アンモニウム界面活性剤のCMCがスルホン酸系界面活性剤より低く、ミセルを形成しにくかったため吸着量が少なかったと考える。もう1点は、カルボキシ基が露出する結晶面が、アミノ基が露出する結晶面より少ないため吸着活性点が少なく、それに応じて飽和吸着量が減少したと考える。また、活性基以外の部分では、ドデシル基とベンゼン環がVal結晶への吸着に大きく寄与していることを確認した。

3.9. まとめ

3 章では吸着に着目し、添加剤の構造と吸着量についての相関を明らかにした。アニオン系、カチオン系問わず、界面活性剤の Val 表面への吸着には長鎖アルキル基と芳香環が大きく寄与していることが明らかになった。長鎖アルキル基の存在によって親水性面、疎水性面への吸着を安定させるため、平衡定数 k_1 を上昇させた。それによって、低濃度でも吸着量が多くなったと考える。また、アルキル鎖が長ければ長い程 CMC は低下し、より低濃度でヘミミセルを形成することができる。それによって、低濃度で多く吸着することができ、 k_2 はアルキル鎖の長さに依存して増加したと考える。

芳香環の存在は Val 表面への吸着に対して、主に 2 つの現象に寄与する。一つ目は CMC の低下である。芳香環があることで CMC が低下し、先ほどと同じく低濃度でヘミミセルを形成することができるため、 k_1 が上昇する。また、疎水性面に対しては疎水性相互作用より強い CH/ π 相互作用が寄与することで吸着しやすくなると考えられる。

また、スルホン酸系と 4 級アンモニウム系を比較すると、スルホン酸系の方が多く Val 結晶に吸着し、それが外観の変化に結びついたと考える。また、活性基以外の部分では、ドデシル基とベンゼン環が Val 結晶への吸着に大きく寄与していることを確認した。

次に、各結晶面の吸着挙動を推測できないかという検討を実施した。平衡定数の算出に関しては、気液界面で晶析させた Val 結晶の結晶面は殆ど(001)面であるため、その結晶を用いて算出した。その他の面については、4 章以降にて議論する。

参考文献

- 33) I. Langmuir, *J. Am. Chem. Soc.*, **1918**, 40, 1361.
- 34) J. Scaimehorn *et al.*, *J. Colloid Interface Sci.*, **1982**, 85, 463.
- 35) S. Paria *et al.*, *Adv. Colloid and Interface Sci.*, **2004**, 110, 75.
- 36) H. Rupprecht *et al.*, *Colloid Polym. Sci.*, **1991**, 269, 506.

4 章. Val 結晶に対する添加剤の結晶成長阻害挙動

4.1. 目的

各種添加剤の吸着挙動について、比較、考察を実施した。その吸着挙動が結晶成長阻害にどのように関係しているのか、結晶成長速度を定量的に測定、議論することで明らかにすることを目的とする。

4.2. マイクロ스코ープを用いた DBS の結晶成長速度の測定

4.2.1. 実験方法

添加剤添加時の結晶成長の経時変化の様子について、マイクロ스코ープを用いて観察した。実験フローを **Figure 4-1** に示す。まず、過飽和度 $\sigma = 1.13$ (25℃) の Val 溶液を 25℃ で静置し、核化させた。核化した 100 μm 程度の微細な結晶の内、測定対象となる結晶を決定したら一度液を捨て、 $\sigma = 1.13$ (25℃) の過飽和 Val 水溶液を再度添加した。

マイクロ스코ープで約 10 分観察し、その後 Val 水溶液を捨て、DBS を 1 mol% vs Val (5.56 mmol/dm³) 添加した過飽和度 $\sigma = 1.13$ の Val 水溶液を入れて、結晶を 20 分程度成長させた。成長している期間、数分置きにマイクロ스코ープで結晶写真を撮影し、経時変化を観察した。

測長方法は **Figure 4-2** に示したように、結晶表面の移動しない傷や模様等を起点に、各面に対して番号を付け、垂線を引いて距離を測長した。測長にはキーエンス製マイクロ스코ープ VHS-5000 を使用した。

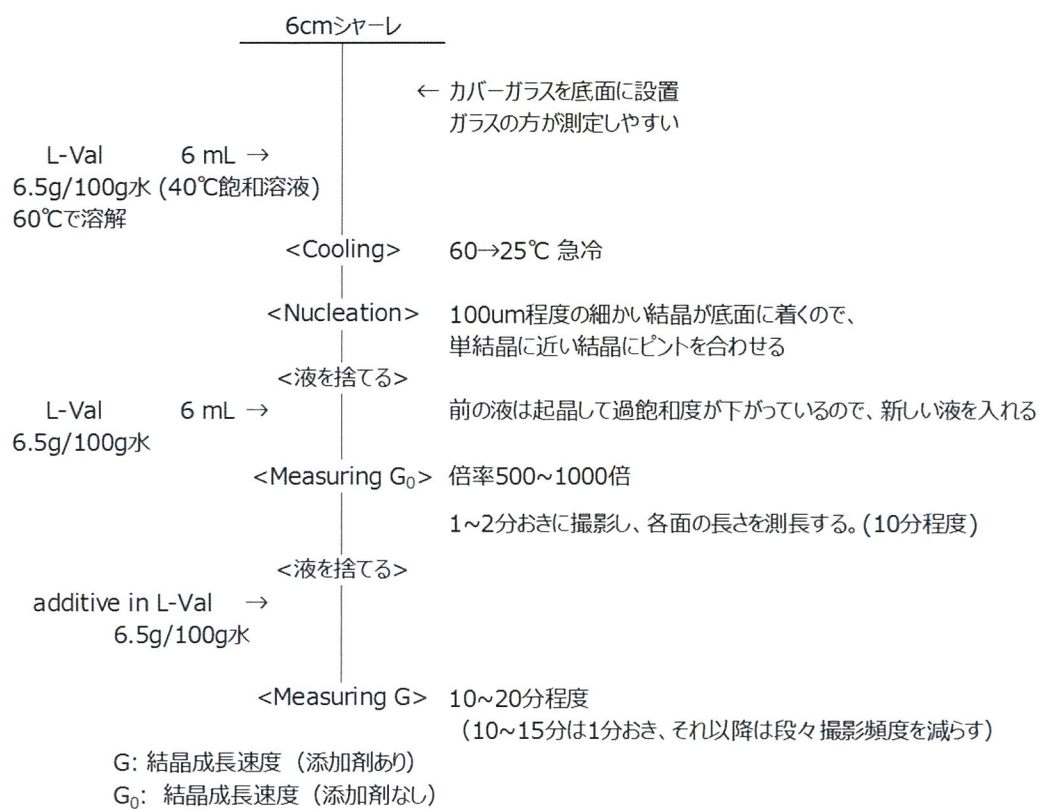


Figure 4-1. Procedure of crystal growth experiment.

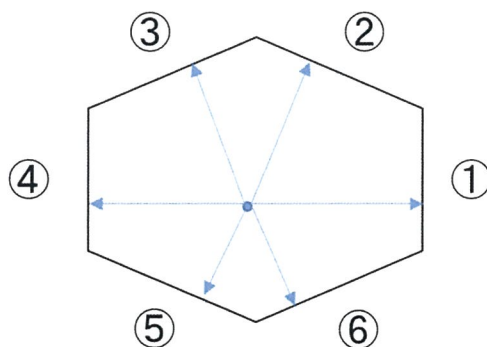


Figure 4-2. Method of measuring length. Perpendiculars were drawn from fixed point to each crystal face. Then, the length of perpendiculars was measured as distance to crystal face.

4.2.2. Val 結晶の外観の変化

マイクロスコープ写真を **Figure 4-3** に示す。DBS を添加していない 11 min までは結晶は 0 min と比較して結晶形が変わらずにサイズが大きくなった。一方、11 min に DBS を添加すると、(100)面方向の①、④面の成長は完全に止まり、(110)面、(1 $\bar{1}$ 0)面方向である②、⑤、③、⑥面は成長していた。このことから、①、④面に強い結晶成長阻害があると考えられる。更に、マイクロスコープ写真から輪郭を切り取り、**Figure 4-4** に示す様に重ね合わせてどの面が成長しているのか視覚的に理解できるようした。その結果、①およびその対面の④面は両方成長が停止していた。一方、②、③面は成長していたが、その対面である⑤、⑥面の成長は停止していることが確認された。

一般に、面成長速度を測定する際は、添加剤の結晶成長阻害能について②と⑤のような対面が等価であることを前提に対面間の距離を測長することが多い。しかし Val 結晶の場合、対面は等価ではなく②と⑤は別々に評価すべきであることが示唆された。また、本結果は 3.3.3 で示した(110)、(1 $\bar{1}$ 0)面とその対面は等価ではないという結果を支持する。

②、③面からは新たな層が出現するような様子が観察された。また、⑤、⑥面からも別の層が下から突き出しているような様子が観察された。対照実験として DBS 無添加の条件で結晶成長をさせたが、**Figure 4-5** に示すようにいずれの現象も無添加時には観察されなかった。再現性を確認するために同様の方法で結晶成長実験を実施すると、**Figure 4-6** に示すように②、③面が多層化を伴って成長する様子がより鮮明に観察された。一方、⑤、⑥面のような下部からの突き出すような挙動は観察されなかったことから、⑤、⑥面の方は異なる異方性を持つ結晶が偶然析出したと考える。

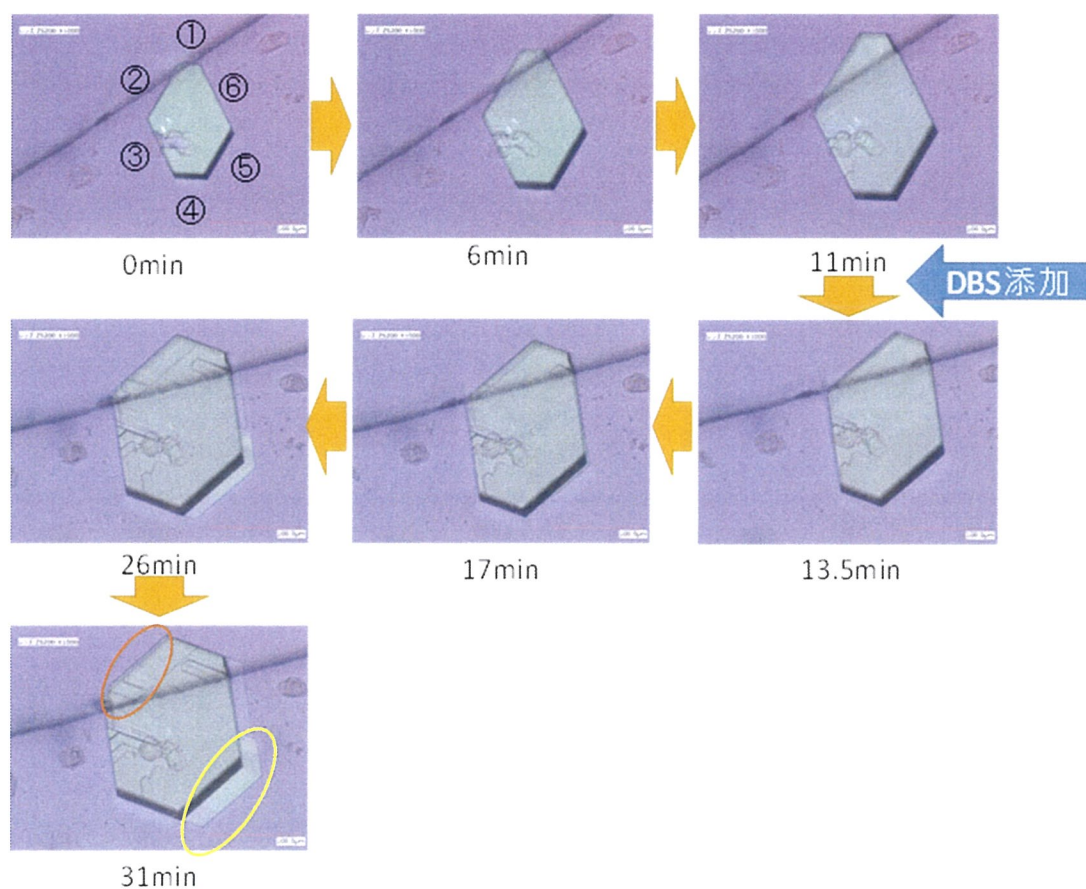


Figure 4-3. Microscope photographs of crystal growth in the presence of 5.6 mmol/dm³ DBS. Val crystal was grown in the Val aqueous solution which was in the absence of additive at 0~11 min. Val crystal was grown in the presence of 5.6 mmol/dm³ DBS in the Val aqueous solution at 11~31 min. Orange circle showed multilayer extracted after adding DBS. Yellow circle showed that other crystal was extracted under observed crystal.



Figure 4-4. Outlines of the crystal before and after addition of DBS. Outlines of the crystal taken at the time shown in the figure was superimposed. (Blue line) outlines of the crystal before addition of DBS, (Yellow line) outlines of the crystal after addition of DBS.

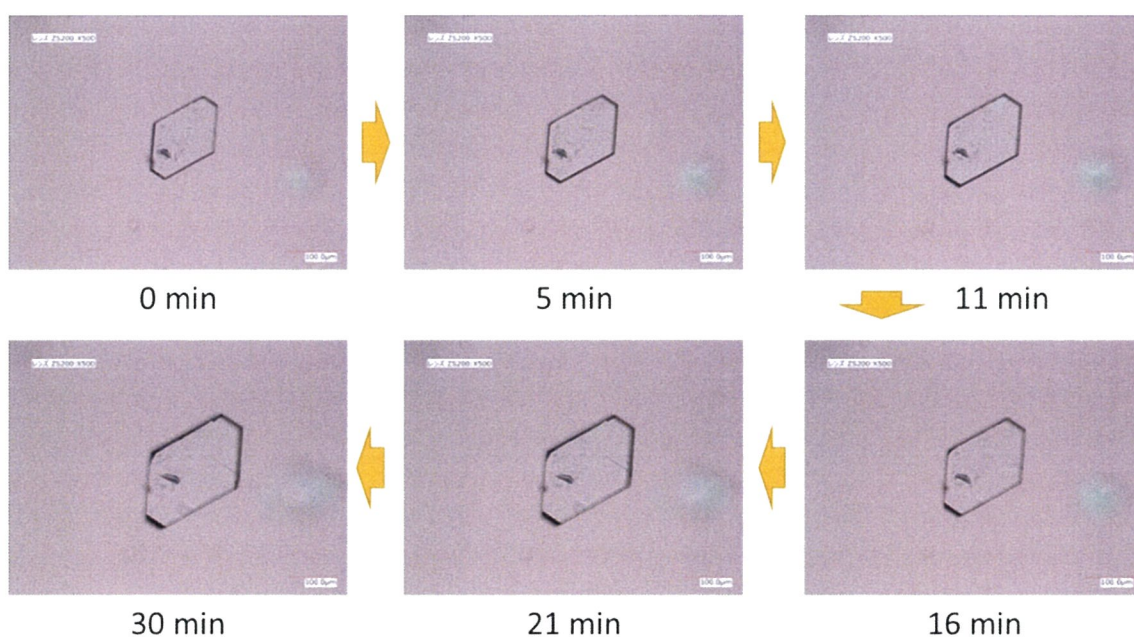


Figure 4-5. Microscope photographs of crystal growth in pure Val aqueous solution.

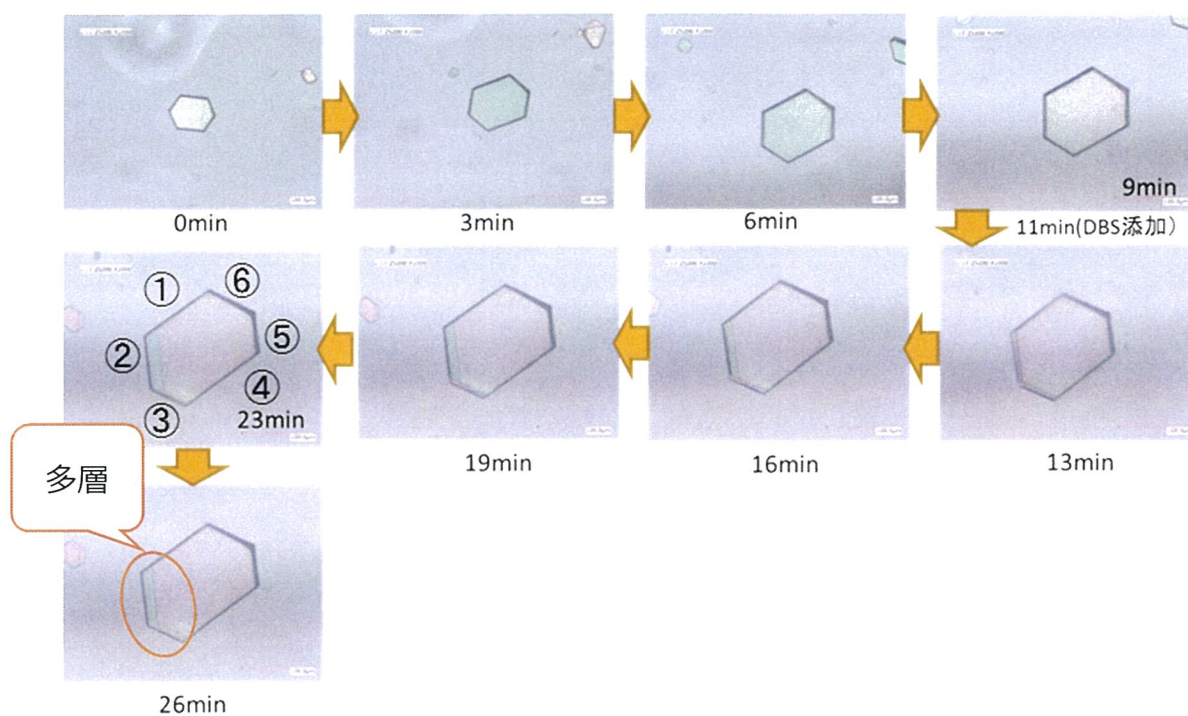


Figure 4-6. Microscope photographs of crystal growth in the presence of 5.6 mmol/dm³ DBS. Val crystal was grown in the Val aqueous solution which was in the absence of additive at 0~11 min. Val crystal was grown in the presence of 5.6 mmol/dm³ DBS in the Val aqueous solution at 11~31 min. This experiment was performed with another crystal different from Figure 4-3 for confirmation of repeatability.

4.2.3. 結晶成長阻害における、添加剤 DBS の応答性

DBS の結晶成長阻害能を議論する際、結晶成長速度比 G/G_0 を指標として用いて評価したい。その際、速度の算出において DBS 添加時の応答性が重要となる。例えば、DBS の結晶成長阻害の応答性が良い場合、添加後すぐに結晶成長が阻害されるため、添加直後から速度を測定すれば良い。一方、応答性が悪い場合、段々と結晶成長が阻害されることが予測されるため、瞬間の速度を取るか平均の速度を取るかで数値が変わってくる。そこで、DBS の結晶成長阻害に対する応答性を確認するために、各面の距離の経時変化を観察した。結果を **Figure 4-7** に示す。

まず、①、④面方向は DBS によって完全に成長が停止するが、経時変化をみると完全に停止するまで 2~3 分時間がかかることが明らかになった。タイムラグは吸着にかかる時間であると仮説を立て、3 章と同様の実験方法で DBS 吸着の経時変化を測定した。その結果、**Figure 4-8** に示す通り、およそ 2 分で吸着平衡に達することが分かった。このことから、添加剤投入から結晶成長停止までのタイムラグは DBS が Val 表面に吸着するために要する時間であると考えられる。

次に、多層化が観察された②、③面を見ると、12 分に結晶成長が一時的に止まり、15 分過ぎてから多層化した面（新面）が再び成長を開始した。一方、多層化する前の面は新面が成長している間も成長は見られなかった。一方⑤、⑥面は他の面と全く異なり、添加剤を添加する前から全く成長しない様子が観察された。マイクロ스코プの写真を見ると⑤、⑥面側が大きく濁っており、ステップが荒れていると推測される。そのため、結晶が成長しなかったと考えられる。このような成長しない面は必ず発生するわけではなく、全ての面が成長しているケースの方が多い。もし、結晶成長しない面が発生した場合は添加剤の評価時に評価できないため、測定対象から外す。

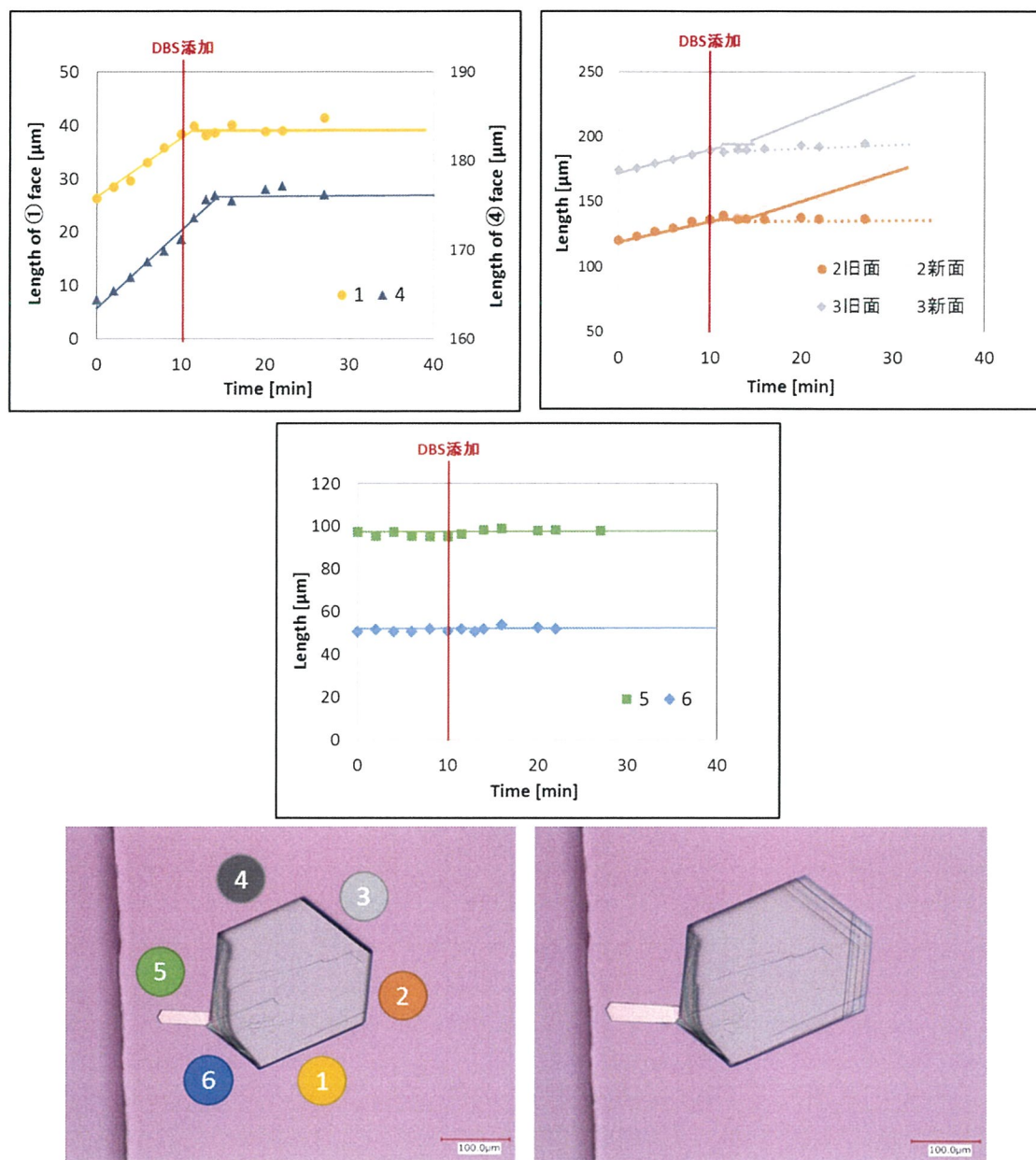


Figure 4-7. Time course of crystal growth. Val crystal was grown in no additive Val aqueous solution at 0~10 min. Val crystal was grown in the presence of 5.6 mmol/dm³ DBS in the Val aqueous solution 10~30 min. Symbols shows face ① (●), face ② (○), face ③ (◆), face ④ (▲), face ⑤ (■) and face ⑥ (◇). Open symbols show the distance to new layer after multilayer, and closed symbols show the distance to old layer which is measured before multilayer. Left crystal photograph was taken at 10 min. Right crystal photograph was taken at 30 min.

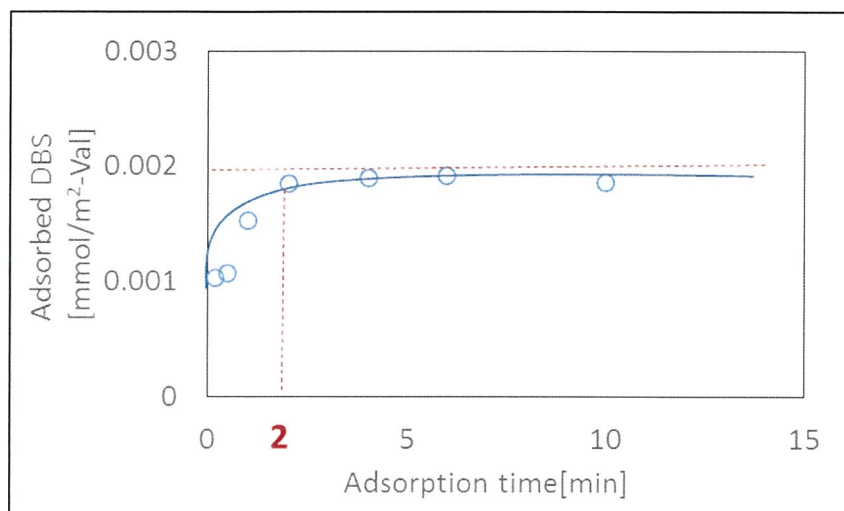


Figure 4-8. Time course of adsorption amount of DBS on Val crystal surface.

4.3. 結晶成長速度比 G/G_0 を用いた DBS の結晶成長阻害度評価

DBS の濃度と結晶成長阻害度との関係を明らかにするために、結晶成長阻害の指標として添加剤添加前の成長速度 G_0 と添加後の成長速度 G の比 G/G_0 を使用し、DBS 濃度との相関を取得した。その結果を **Figure 4-9** に示す。取得した濃度範囲が非常に広いため、片対数グラフにして表示した。また、多層を経て成長した面（新面と表記する）については白抜きのプロットで示した。

①、④面は 1 mmol/dm^3 という低濃度の DBS で成長が完全に停止した。一方、②、③、⑤、⑥面は低濃度でも成長しないケースや、高濃度でも成長するケースがあり、一見すると規則性が無いように見える。しかし、多層と単層でプロットを分けると、成長している面は全て多層で成長しており、かつ多層は DBS が 0.2 mmol/dm^3 程度から発生していることが確認された。CMC はミセルを形成する最小濃度であるが、ヘミミセルは CMC 未満の濃度でも形成されるため、ヘミミセルが多層化に寄与していると考えられる。

DBS を添加すると多層化することを報告したが、添加剤の評価として用いている G/G_0 の G_0 は多層化前に観察していた古い面（旧面と表記する）である。したがって、**Figure 4-9** の図に示すようにピン止め効果によってステップ形成が阻害され、結晶成長が阻害されるという Cabrera–Vermilyea のピン止めモデルの原理から考えると、新面の成長速度に適用することは結晶成長阻害の評価に適さない。そこで、多層化前の旧面までを測定し、その値を用いて G/G_0 を算出した。その結果を **Figure 4-10** に示す。CMC 以上の濃度で G/G_0 が 0 になることが明らかとなった。即ち、DBS が一度結晶成長を停止させ、その上から新しい面が成長していることを示している。

また、多層化が起きる場合と起きずに全く成長しない場合の両方が②、③、⑤、⑥面でみられた。実験の再現性が無い様に見えるが、その理由として結晶が回転

した状態で観察していた可能性が考えられる。単結晶 X 線構造解析から、Val 結晶の各面に対して **Figure 4-11 (A)** のようなミラー指数が与えられている。一方で、結晶が a 軸又は b 軸を中心に 180° 回転した状態で観察していた場合、**(B)** や **(C)** の配置となり当初考えていた面とは別の面を評価している可能性が考えられる。結晶の表裏、向きをマイクロスコープから判断することは困難であり、本来ではミラー指数で議論すべきなのだが、本研究では「①面」といった番号の表記で議論する。

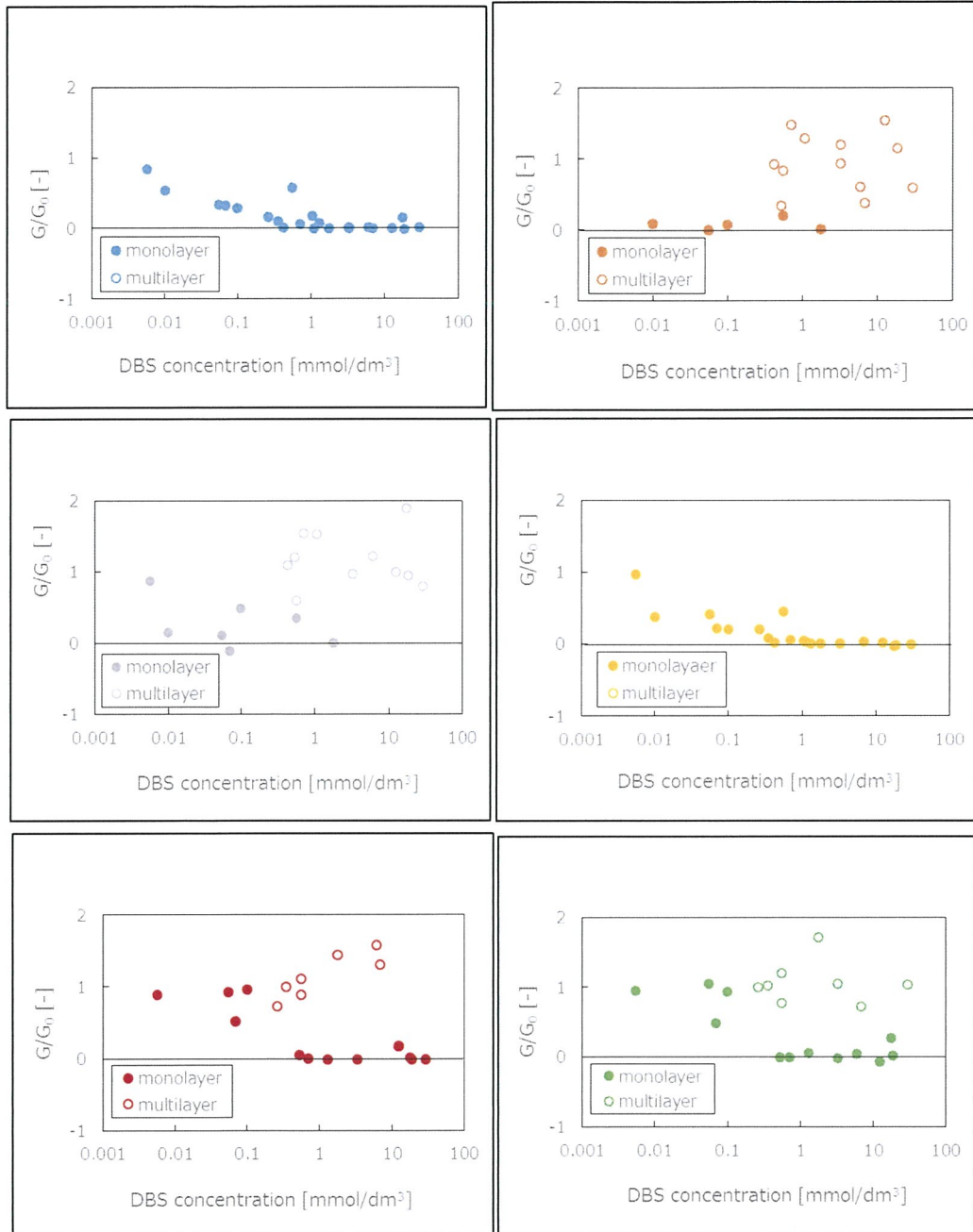


Figure 4-9. Correlation between concentration of DBS and G/G_0 . Symbols show face ① (●), face ② (●), face ③ (●), face ④ (●), face ⑤ (●) and face ⑥ (●). Open circle shows the case of calculation G at the outermost face when the face was multilayered, and closed circle shows the case of calculation G when the face wasn't multilayered.

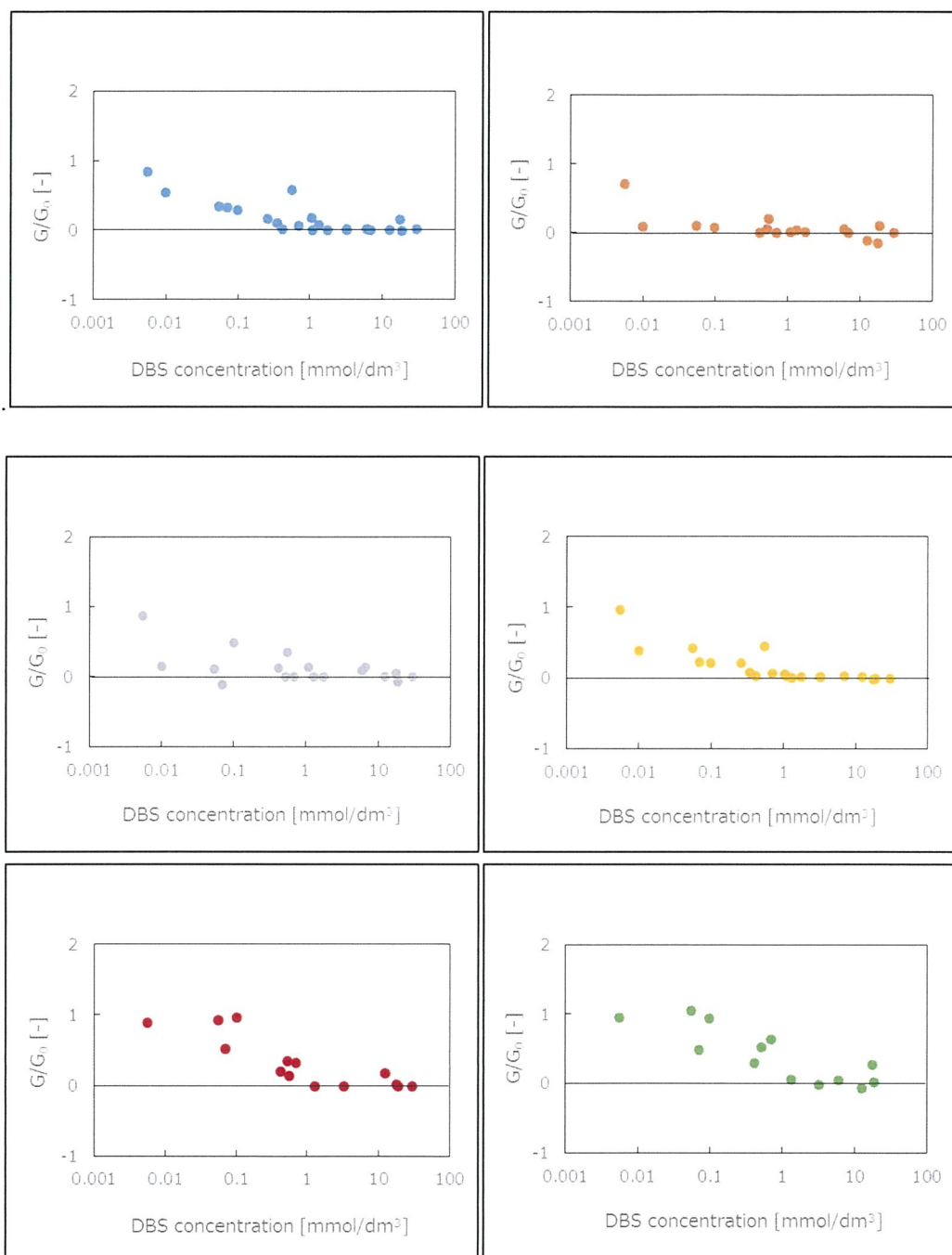


Figure 4-10. Correlation between concentration of DBS and G/G_0 . Symbols show face ① (●), face ② (●), face ③ (●), face ④ (●), face ⑤ (●) and face ⑥ (●). Different from Figure 4-9, the crystal growth rate was measured on the old layer, even the surface was multi-layered.

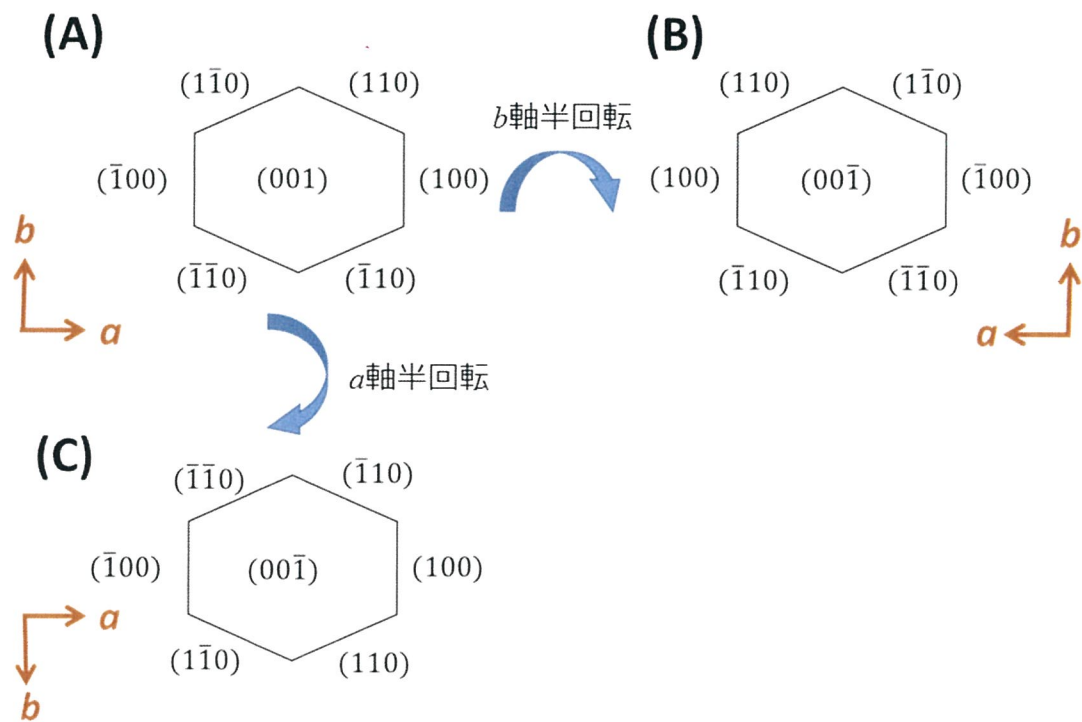


Figure 4-11. Miller index of Val crystal.

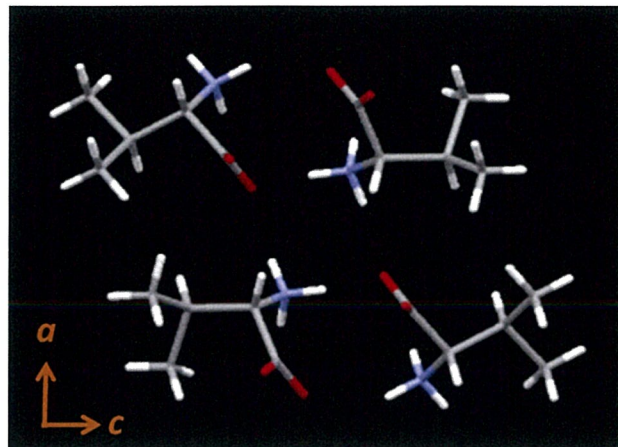
4.4. DBS 添加による晶癖変化機構の考察

まず、Val の結晶構造を **Figure 4-12** に示す。結晶面を示す緑色の線が各面 2 本ずつ書いてあるが、表記している結晶面とその対面の結晶面である。

①、④面に相当する(100)、 $(\bar{1}00)$ 面は格子単位でみると、結晶面の両方ともアミノ基が最も外の面に出るため、(100)、 $(\bar{1}00)$ 面に DBS のスルホン酸基が近づくと強く相互作用し、吸着することで結晶成長を阻害したと考えられる。

一方、②、③、⑤、⑥面に相当する (110)、 $(\bar{1}\bar{1}0)$ 、 $(1\bar{1}0)$ 、 $(\bar{1}10)$ 面では表面に露出する可能性のある置換基がアミノ基とカルボキシ基の 2 種類存在する。カルボキシ基の場合、同じ負電荷をもつスルホン酸基と反発しあい、吸着しないと予測される。そのため、これらの面においては、片方は結晶成長が止まり、その対面は結晶成長したと考えられる。

一方、**Figure 4-10** で示した通り、成長している面に関しても旧面の成長が停止した後、新面が成長しているため、一度は結晶成長が停止しているということになる。スルホン酸系添加剤はカルボキシ基と吸着しないように思えるが、多層化がヘミミセルと関係しているならば、ヘミミセルを形成することで一旦は結晶成長阻害を引き起こし、その後カルボキシ基側が成長すると推測される。



Unit cell of Val crystal

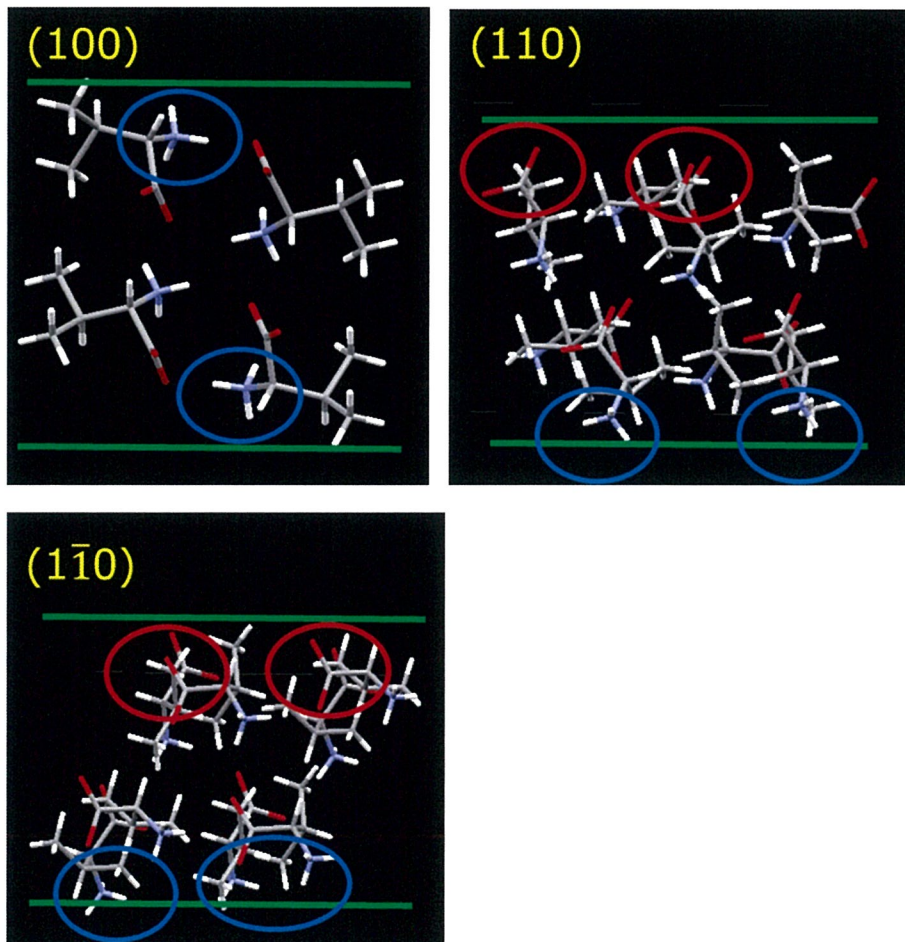


Figure 4-12. Crystal structure of Val crystal. Green line shows crystal face, red circle shows carboxy group, and blue circle shows amino group.

4.5. 多層化面の観察

DBS 添加時に多層化しながら成長する様子が観察された。また、その多層化にはミセル、ヘミミセルが寄与していることが示唆された。その機構について多層化した面を観察、検討する。

透過光を用いるマイクロ스코プの観察では、結晶表面の 3 次元的な凹凸を観察することは難しい。そこで、4.2.1 の方法で作成した結晶を用い、SEM で結晶表面を観察することで多層構造の生成機構を推察した。まず、マイクロスコプ写真、および撮影箇所を **Figure 4-13** に示す。また、撮影箇所に対応する SEM 写真を **Figure 4-14** に示す。1、2 が DBS 無添加条件で成長させた結晶で、3、4 が DBS 添加条件で成長させた結晶の SEM 写真である。DBS 無添加で Val 結晶を成長させた場合、SEM 写真 1 の様に側面は直線的であり、SEM 写真 2 に見られるような階段状の層が観察された。一方、DBS 添加条件で成長させた場合、SEM 写真 3 のように側面が荒れており、かつ表面に多数の層が観察された。また、SEM 写真 4 を見ると下部に歪んだ層があり、その上から直線的できれいな層が形成されて、覆いかぶさっている様子が観察された。

面成長速度が層によらず一定である場合、始めに形成された下層の面積が最も大きく、上層に行くにしたがって面積が小さくなる階段状になる。DBS 無添加時の層は SEM 写真 2 のように階段状になっており、面成長が層によらず一定であることを示す。一方、DBS の効果により、旧面の面成長速度が強く阻害されている場合、SEM 写真 4 の様に階段状にならず **Figure 4-15** に示す模式図の様に、上層の面積が下層より大きくなってしまふことが考えられる。

形成される層にも特徴が表れている。DBS 無添加時はいずれの層も直線的である。それに対し、DBS 添加時は下層（旧面）の輪郭が歪んでおり気泡のような、上層（新面）は輪郭が明瞭である。更に、下層の側面にはクレーターのよ

うな凹凸が多数確認された。このことから、旧面は DBS の影響を受けて結晶成長が停止し、対して新面は未だ DBS の影響を受けていないと推測される。

多層化が発生する理由について考察する。DBS は本来カルボキシ基が露出する成長面には吸着しないが、一定濃度以上で形成されたヘミミセルがカルボキシ基の面に相互作用し、結晶成長を阻害した。その上から新たな成長面が成長することで多層化したと考えられる。複数の多層が出現することから、新面が出てきてはミセルによって阻害される工程を繰り返していると考えられる。また、ある程度成長しているということは成長が阻害されるまで時間がかかるということであり、ミセルの吸着速度は DBS 単分子の吸着速度と比較して遅いと考えられる。

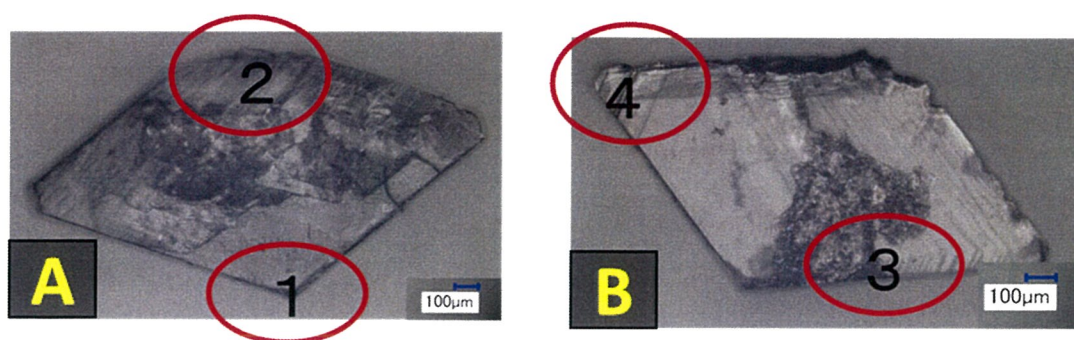


Figure 4-13. Microscope photographs of Val crystal. (A) Val crystal grown in the pure Val aqueous solution, (B) Val crystal grown in the presence of DBS 5.6 mmol/dm³ in Val aqueous solution.

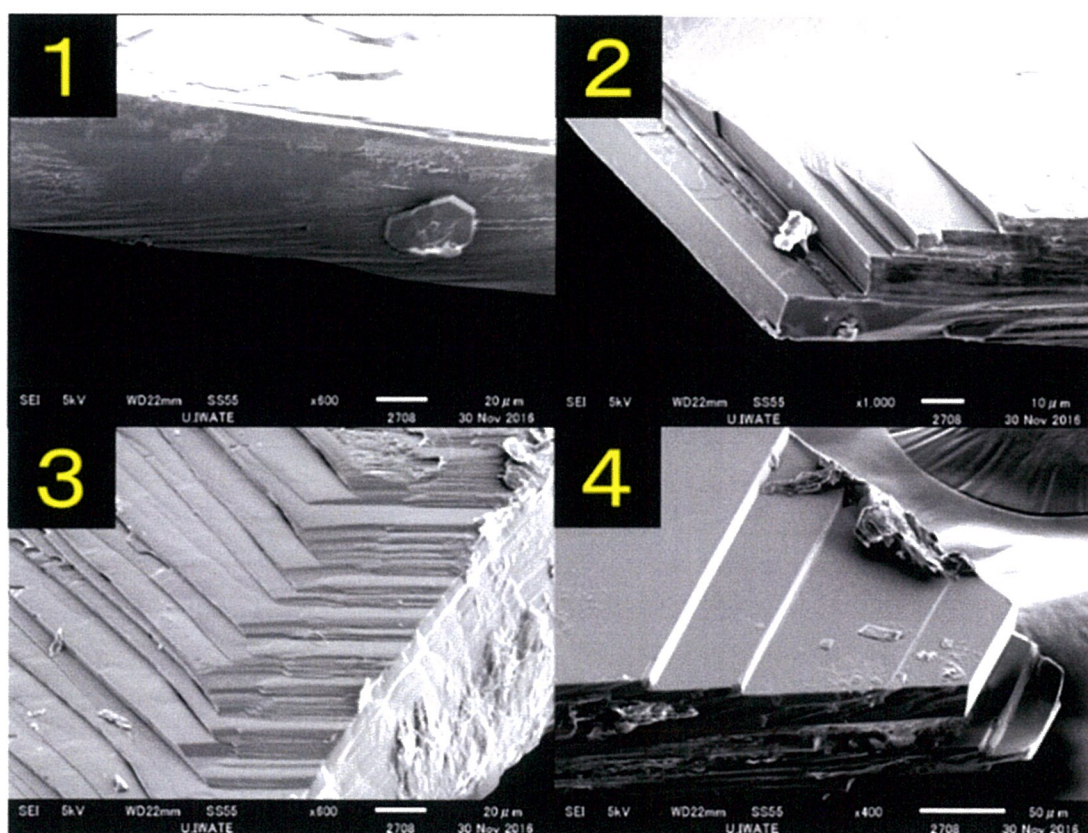


Figure 4-14. SEM photographs of Val crystal. The photograph number shows at the place of Val crystal shown in Figure 4-13.

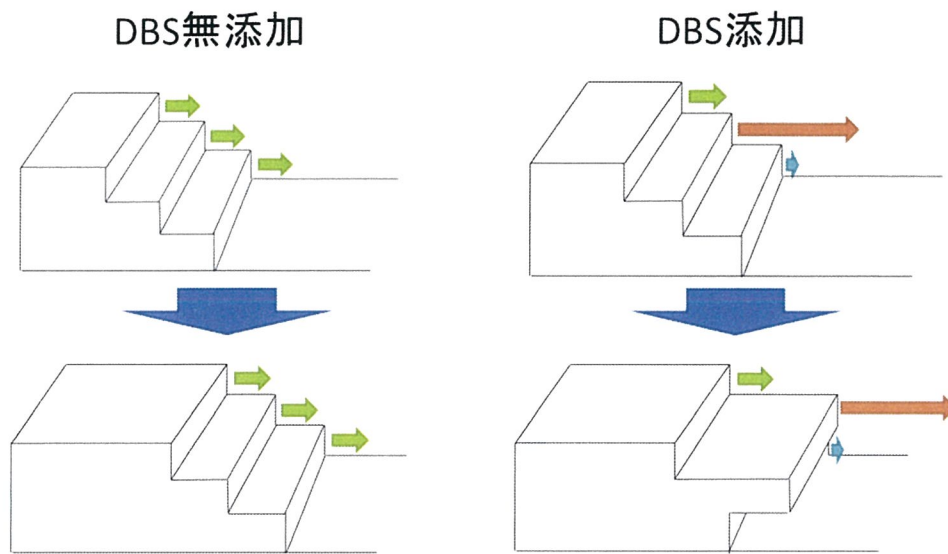


Figure 4-15. Mechanism of generating multilayer. Left figure shows the step growing in the absence of DBS Right figure shows the step growing in the presence of DBS.

4.6. DBS の(100)、 $(\bar{1}00)$ への吸着パラメーター算出

3 章では Val 結晶全体における吸着パラメーターを吸着等温線から算出した。しかし、Val 結晶の各面に対する吸着パラメーターは吸着等温線からは算出できない。そこで、結晶成長阻害度から各種吸着パラメーターの算出を試みた。

4.6.1. 算出方法

本章では、Kubota-Mullin モデルを拡張したモデルを用いてパラメーターを算出した。Kubota-Mullin モデルの式を 4-1 式に示す。

$$\frac{G}{G_0} = 1 - \alpha\theta$$
$$\frac{G}{G_0} = 1 - \alpha \frac{KC}{1 + KC} \quad \dots (4-1)$$

θ は成長活性点に対する添加剤の被覆率、 α は定数、 K は吸着平衡定数、 C は添加剤濃度を表す。Kubota-Mullin モデルは Cabrera-Vermilyea のピン止めモデルに基づき、添加剤の吸着項を Langmuir の単層吸着モデルを用いて表現している。一方、DBS をはじめとした界面活性剤の吸着はヘミミセルモデルで表現することが適当であるため、本研究では Kubota-Mullin モデルを拡張し、4-2 式に示すような吸着項をヘミミセルモデルで表現するモデルを用いた。

$$\frac{G}{G_0} = 1 - \alpha\theta$$
$$\theta = \frac{q}{q_s}$$
$$\frac{G}{G_0} = \alpha \frac{k_1 C \left(\frac{1}{n} + k_2 C^{n-1} \right)}{1 + k_1 C (1 + k_2 C^{n-1})} \quad \dots (4-2)$$

評価は a 軸方向の面である(100)、 $(\bar{1}00)$ 面に相当する①、④面を対象に実施した。

この両面は結晶構造から点対称の面であり、 G/G_0 の傾向からもほぼ等価の面であると言える。両面を合わせたプロットについて、4-2 式を用いてフィッティングし、パラメーターを算出した。

4.6.2. 結果・考察

フィッティングの結果のグラフを **Figure 4-16** に示す。全濃度範囲でフィッティングの曲線と殆ど乖離していないことを確認した。また、フィッティングで得られた吸着パラメーターを①、④面の吸着パラメーターとして、3 章で得られた DBS の吸着等温線から得られた吸着パラメーターを結晶全体の吸着パラメーターとして **Table 4-1** に示す。

両者を比較すると、 k_1 、 k_2 共に Val 結晶全体と比較して数十～数百倍高かった。このことから、Val 結晶の中で①、④面は DBS を吸着しやすい面であるということが示唆された。

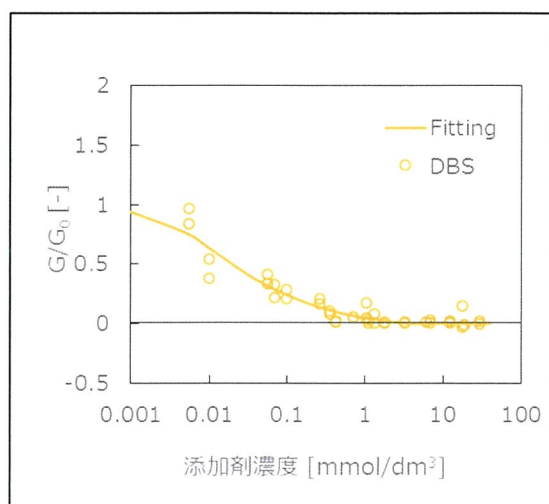


Figure 4-16. Correlation between DBS concentration and G/G_0 at ①, ④face.

Symbols show actual data (○) and fitting result (—).

Table 4-1. Comparison of adsorption parameters of DBS to whole Val faces and that to ①, ④ faces.

	α	k_1	k_2	q_s [mmol/m ² -Val]	n
Whole faces	—*	7.81	6.23×10^{-3}	6.20×10^{-3}	2.5
①, ④ faces	1.0	110	4.6	—*	2.0

* These parameters could not be calculated.

(Whole faces) Adsorption parameters calculated from the adsorption isotherm of DBS obtained in Chapter 3. (①,④faces) adsorption parameters calculated from the correlation between DBS concentration and crystal growth rate ratio G/G_0 for ①,④faces.

4.7. Val 結晶表面への吸着量の分布評価

4.7.1. 背景・目的

Val 結晶面の中で①、④面が吸着しやすい面であることが示唆された。それを検証するため、Val 結晶表面への吸着量の分布を実測、評価した。

4.7.2. 実験方法

1. Val 結晶を静置で1ヶ月ゆっくり成長させ、2 cm 程度の大きい Val 単結晶を取得した。
2. 得られた結晶を DBS 5.6 mmol/dm³ 添加された飽和 Val 水溶液に浸し、20 分静かに振とうした。
3. 結晶を取り出し、結晶に付着する水分を慎重に取り除いた。
4. 各結晶面の表面を厚さ 0.5~1 mm になるように精密ナイフで薄く切り、2 cm³ の超純水で溶解した。
5. HPLC で Val 濃度と DBS 濃度を測定した。

4.7.3. 結果・考察

DBS 濃度と Val 濃度の比から得られた DBS の分布を結果 **Figure 4-17** に示す。吸着量の分布は⑤、⑥面 > ①、④面 > ②、③面 > ⑦面であった。Val 結晶は六角形の板状結晶であり、⑦面およびその裏面の面積が最も大きいため、Val 結晶全体の吸着平衡定数を押し下げた。そのため、Val 結晶全体の吸着平衡定数を均した値は、①、④面より大幅に低かったと考える。また、①、④面は結晶構造や、結晶成長速度比のグラフから同等の面であると考えられる。④面に比べて①面の吸着量が約半分になったのは、測定時に切った Val の厚みの差に起因すると考えられる。①面および④面のサンプル中の Val 濃度を確認すると、それぞれ

5.3 mmol/dm³ と 3.4 mmol/dm³ であり、対面の面積は同じとすると、①面の結晶表面を厚く切断していたと考える。厚く切断することで、定量する Val に対する DBS 濃度が減少するため、DBS の見かけの吸着量が下がる。薄く切断した方がより実際の吸着量に近いと、DBS の吸着量は④面の 262 ppm vs Val に近い値であると考えられる。

また、**Figure 4-17** で示した分布について Val 結晶全体の k_1 が 7.81 であることを利用し、吸着の分布から各面の吸着平衡定数を推算した。前提条件 2 点を以下に示す。

1. ①～⑥面の面積は同じで、⑦面は①～⑥面の 5 倍の面積がある。
2. ①～⑦面の単位面積当たりの吸着活性点数は同じ。

その結果を **Figure 4-18** に示す。①、④面の k_1 は 14、28 と算出され、結晶成長速度比から算出された 110 と乖離があるように見えた。そこで、4.5 で実施したフィッティングに対して k_1 の影響を検証した。その結果を **Figure 4-19** に示す。先に示した通り、吸着量は④面の数値に近いと考えられるため $k_1 = 28$ として検証した。 $k_1 = 28$ と 110 を比較すると、0.1 mmol/dm³ 程度の非常に低濃度の環境下では若干の差が見られるが、それ以上の濃度ではあまり差が見られなかった。このことから、28 と 110 は結晶成長速度比では大きな差はなく、吸着の分布評価で妥当な結果が得られたと考える。

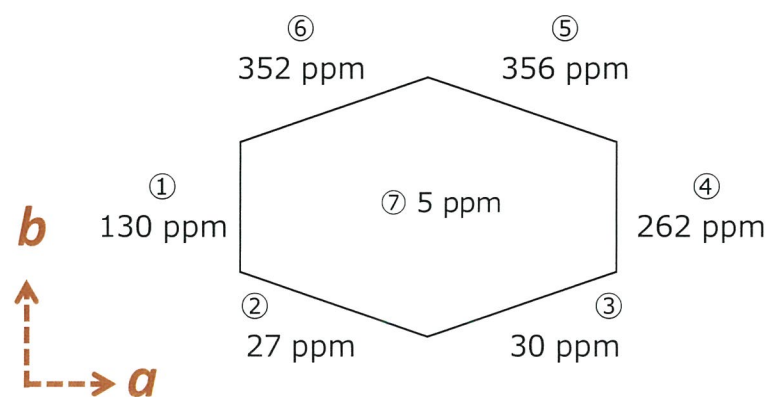


Figure 4-17. Adsorption distribution of DBS (mol/mol vs Val) on each face of Val crystal.

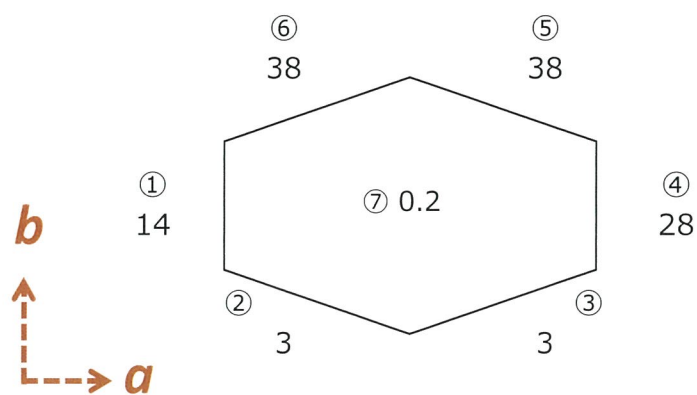


Figure 4-18. k_1 of each face calculated from the adsorption distribution of DBS.

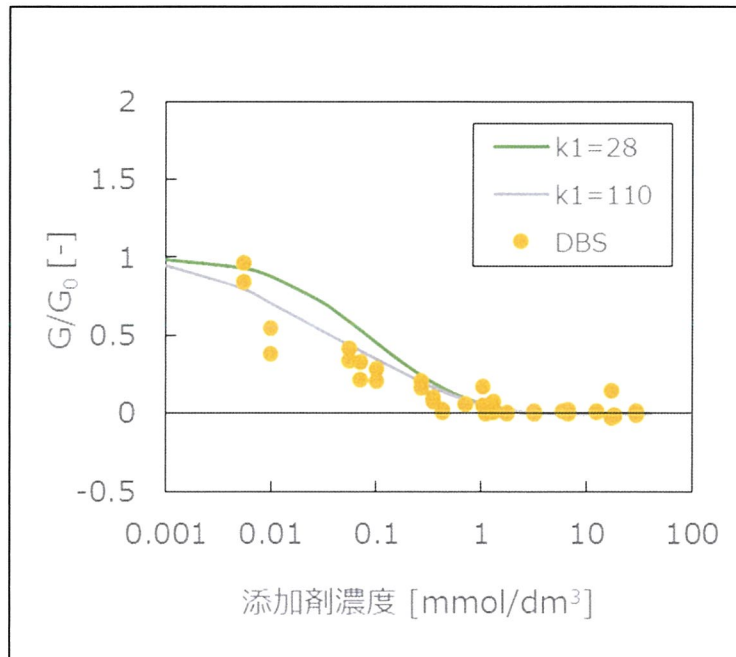


Figure 4-19. Influence of k_1 on G/G_0 of ①, ④ faces. Other parameters were the same as those shown in Table 4-1.

4.8. DBS のアルキル鎖長と結晶成長速度比の関係

DBS の構造を変えると吸着挙動が大きく変化することを 3 章で示した。そこで、結晶成長にはどのような影響を及ぼすのか、結晶成長を測定して算出した。アルキル基を短くした SOBS、BS についても G/G_0 を算出し、横軸に濃度を置いてプロットした。添加剤濃度と①、④面の結晶成長速度比のグラフを **Figure 4-20** に示す。DBS は 1.3 mmol/dm^3 の低濃度条件で結晶成長が完全に停止した。一方、SOBS、BS は 1.0 mmol/dm^3 未満の低濃度では殆ど結晶成長は阻害されなかった。SOBS と BS と比較すると、結晶成長阻害能は DBS、SOBS、BS の順番に強かった。これは吸着実験で算出した k_1 の大きさと関連している。

次に、4-2 式を用いてフィッティングを行い、各添加剤の①、④面に対する吸着パラメーターを算出した。算出結果を **Table 4-2** に、SOBS、BS のフィッティング結果を **Figure 4-21** に示す。まず k_1 は DBS が非常に高く、対して SOBS、BS が非常に低い結果となった。 k_2 も、BS はヘミミセルを形成しないので 0 になるが、 k_1 と同様の傾向を示した。このことから、①、④面はアルキル鎖長の影響を非常に受けやすい面であると言える。

次に、②、③、⑤、⑥面に注目する。②、③、⑤、⑥面は互いに等価な面ではなく、かつどの向きの結晶を観察しているか、本来把握することが困難である。一方、片面は明らかに吸着しやすく、その対面は吸着し辛いことが明らかとなった。そこで、②、③、⑤、⑥面それぞれについて、 G/G_0 の低い方の数値を②、③面に、多層化し G/G_0 の高い方の数値が⑤、⑥面であるとし、データを整理、比較した。その結果を **Figure 4-22** に示す。いずれの面も SOBS、BS と比較して DBS の方が高い結晶成長阻害を有することが分かった。SOBS と BS を比較、評価する。⑤、⑥面の場合、SOBS が 1 mmol/dm^3 未満でも強い結晶成長阻害を受

けていた。一方、BS は強い結晶成長阻害を受けるのは 5 mmol/dm^3 程度であった。②、③面の場合、どちらも低濃度では殆ど吸着せず、結晶成長阻害は観察されなかった。SOBS は、CMC である 10.5 mmol/dm^3 付近から急激に結晶成長を阻害し、多層化することが分かった。一方、BS は高濃度条件下においても多層化せず、結晶成長を阻害しなかった。多層化とヘミミセルが密接に関係していることが本結果から示唆された。

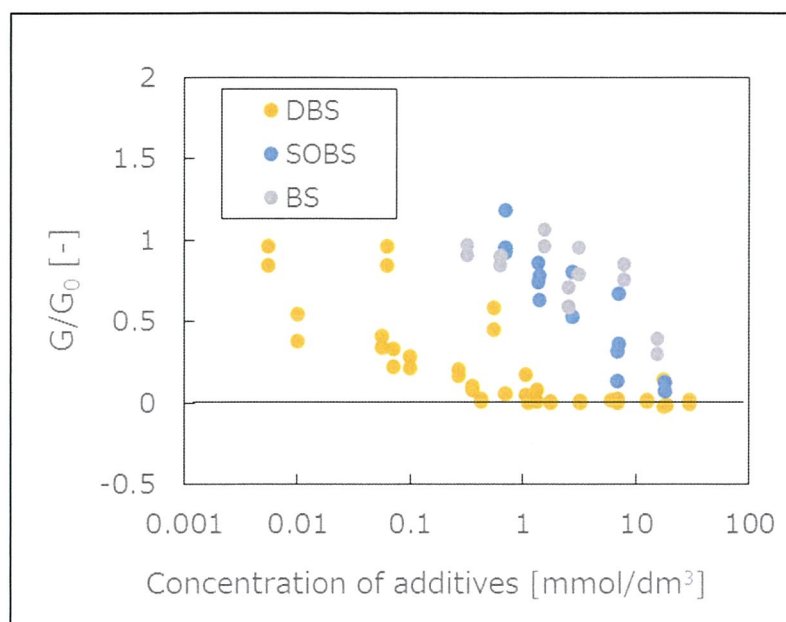
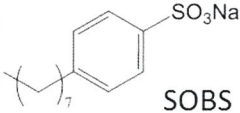


Figure 4-20. Correlation between concentration of additives and G/G_0 of ①, ④ faces. Symbols show DBS (●), SOBS (●) and BS (●).

Table 4-2. Correlation between adsorption parameter of DBS to ①, ④ faces and alkyl length.

構造式	α	k_1	k_2	n
 BS	1.0	0.07	0	1.0
 SOBS	1.1	0.2	0.3	2.0
 DBS	1.0	110	4.6	2.0

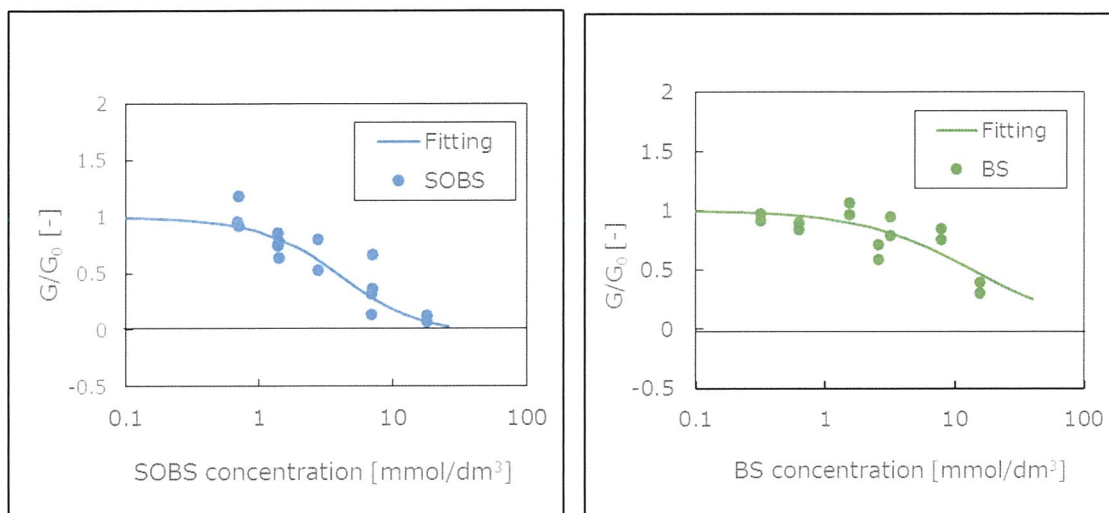


Figure 4-21. Fitting result by using hemimicelle model. Symbols show SOBS (●) and BS (●).

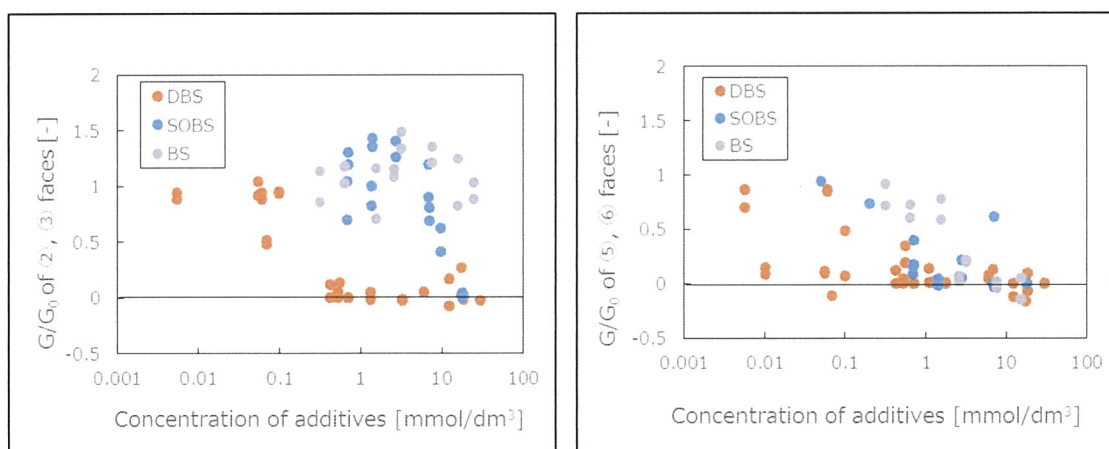


Figure 4-22. Correlation between concentration of additives and G/G_0 . Left figure shows G/G_0 of ②, ③ faces, and right figure shows the G/G_0 of ⑤, ⑥ faces.

4.9. DBS 添加による結晶外観変化の機構の考察

DBS を添加して晶析すると Val 結晶が非常に細長くなった。その機構について詳しく考察する。

まず、Val の各結晶面を **Figure 4-23** に示す。結晶面を示す緑色の線が各面 2 本ずつ書いてあるが、表記している結晶面とその対面の結晶面である。面①、④に相当する(100)、($\bar{1}00$)面は格子単位でみると、結晶面の両方ともアミノ基が最も外の面に出るため、(100)、($\bar{1}00$)面に DBS のスルホン酸基が近づくと強く相互作用し、吸着することで結晶成長を阻害したと考えられる。しかし、直鎖アルキル鎖長を短くすると、 k_1 が大きく減少したことから(100)、($\bar{1}00$)面への吸着にアルキル鎖が大きく寄与していると考えられる。結晶面を見ると、アミノ基のすぐ横に Val のイソプロピル基が露出している。疎水性であるイソプロピル基の存在から、親水性が比較的高い BS や TsOH が吸着活性点に近づきにくく、逆に比較強い疎水性基を持つ DBS は吸着しやすかったと考える。

面②、③、⑤、⑥に相当する(110)、($\bar{1}\bar{1}0$)、($1\bar{1}0$)、($\bar{1}10$)面では表面に露出する可能性のある置換基がアミノ基とカルボキシ基の 2 種類存在する。カルボキシ基の場合、同じ負電荷をもつスルホン酸基と反発しあい、吸着し辛いと考えられる。そのため DBS の吸着が局在化し、片方の結晶成長が止まり、その対面は成長したと考えられる。 a 軸方向の面は両方結晶成長が阻害され、 b 軸方向は片方の面が結晶成長を続けるため、**Figure 4-25** の様に DBS を添加すると細長い結晶が得られたと考える。

DBS のアルキル基を短くした SOBS、BS についても、⑤、⑥面に結晶成長阻害が確認された。特に、BS は①、④面へ殆ど吸着しないため、10 mmol/dm³ 以上でやっと G/G_0 が 0.5 を下回る程度の結晶成長阻害能しか観察されなかったが、⑤、⑥面に関しては約 3 mmol/dm³ で G/G_0 がほぼ 0 になることが確認された。す

なわち、2 章で評価した時の濃度 5.6 mmol/dm^3 では b 軸方向に結晶成長阻害がかかり、 a 軸方向には殆どかからないことになる。よって、**Figure 4-26** の機構で結晶がひし形になったと考えられる。

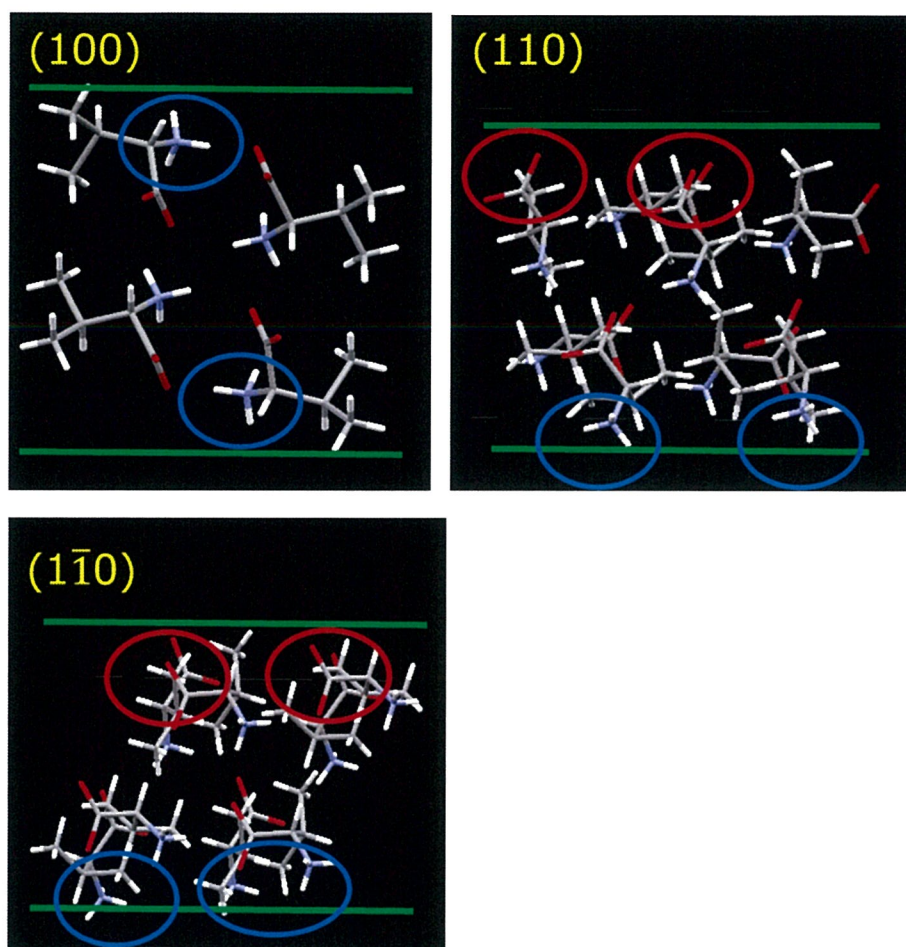


Figure 4-23. Crystal structure of each crystal face. Green line shows Crystal face, blue circle shows Amino group, and red circle shows carboxy group.

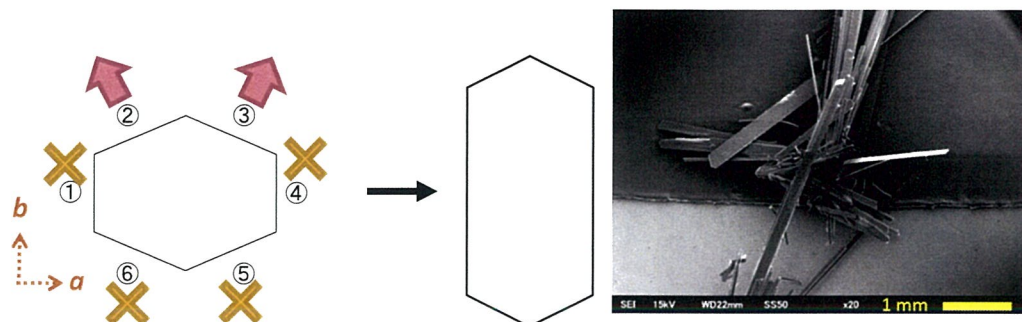


Figure 4-24. Left illustration shows the mechanism of changing crystal shape after adding DBS. Right SEM photograph shows Val crystal crystallized in the presence of 5.6 mmol/dm³ DBS.

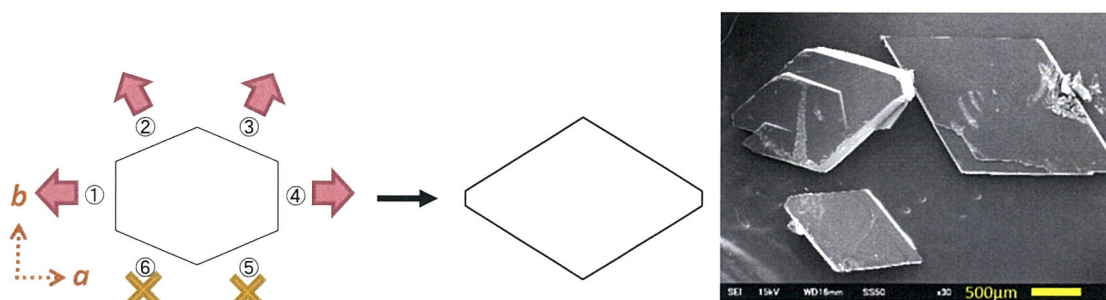


Figure 4-25. Left illustration shows the mechanism of changing crystal shape after adding BS. Right SEM photograph shows Val crystal crystallized in the presence of 5.6 mmol/dm³ BS.

4.10. 厚み方向の成長制御

2 章で示した通り、4 級アンモニウム系添加剤 BTEAC には厚み方向、*c* 軸方向への成長に寄与していることが示唆された。そこで、実際にどの程度厚み方向に寄与するのか検討を実施した。

4.10.1. 実験方法

実験方法を **Figure 4-26** に示す。まず、L-Val 6.5 g/100g-水の過飽和水溶液を 60℃で溶解する。その液に添加剤 BTEAC を加え、直径 6 cm のシャーレに 6 cm³ 添加した。上に蓋を軽くかぶせ、3 日放置させ、冷却晶析した。析出した結晶をピンセットで取り、水分を拭き取り、乾燥させてから SEM 画像を取得した。今回は 60° に傾いた台座を用い、台座自身も傾けてなるべく水平に近い状態で SEM 画像を取得した。得られた画像を測長し、厚みを計測した。

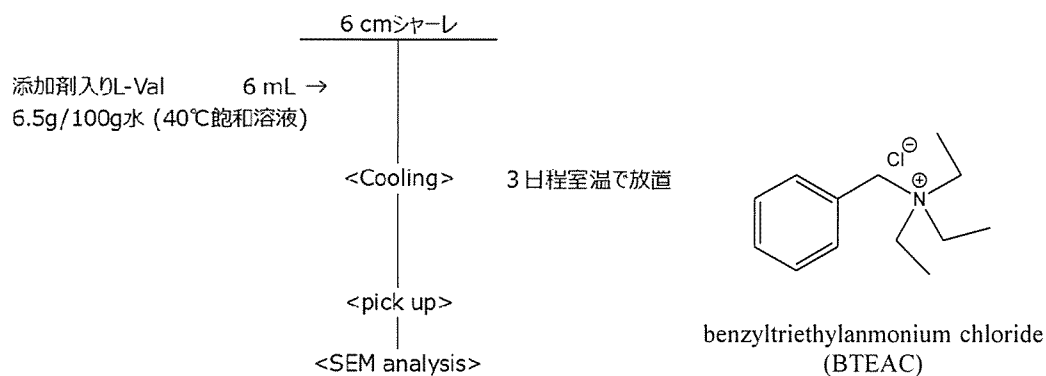


Figure 4-26. Left flow shows experimental procedure of measuring thickness of Val crystal, and right figure shows chemical sturcture of BTEAC.

4.10.2. 結果・考察

横軸に BTEAC 濃度、縦軸に厚さを取った結果を **Figure 4-27** に示す。0.56 mmol/dm³ までは BTEAC 無添加と殆ど変化はなかったが、5.56 mmol/dm³ (1 mol% vs Val)添加することで、厚みが約 20%増加した。更に、28 mmol/dm³ (5 mol% vs Val)まで増加させると、厚みが約 2 倍になった。

各添加濃度条件で析出した結晶を撮影した SEM 写真を **Figure 4-28** に示す。結晶写真を見ると、BTEAC 0.55 mmol/dm³ までは比較的きれいな六角形の薄い板状結晶が得られていることがわかる。一方、5.56 mmol/dm³、28 mmol/dm³ と BTEAC 濃度が増加するにつれて、Val 結晶が積層しているような様子が観察された。このことから、BTEAC による *c* 軸方向の成長の促進は一般的な結晶で見られる細かいステップが成長するものではなく、非常に大きなマクロステップの様に見える層を形成して成長しているものであると考えられる。

では、なぜ上記のような成長の違いが発生したのか考察した。まず(001)面の表面に注目すると、BTEAC が無添加や低濃度条件の場合、得られた結晶の 1 つ 1 つの層が非常に薄い。一方、最も BTEAC が高濃度の条件では 1 ステップが厚く、かつマクロステップの段数が他の結晶と比較して非常に多い。マクロステップ密度の濃さが結晶の厚さに寄与していると考ええる。

DBS 添加条件での結晶成長の際、多層化した新面の結晶成長速度比 G/G_0 は 1 より大きくなるケースが多いと報告したが、BTEAC 存在下での(001)面方向の成長が DBS と同様に一度結晶成長が止まって、その後新面が出て成長するという成長機構であった場合、 G/G_0 が 1 より高くなり、無添加時と比較して(001)面方向の成長が促進されたのではと推測される。

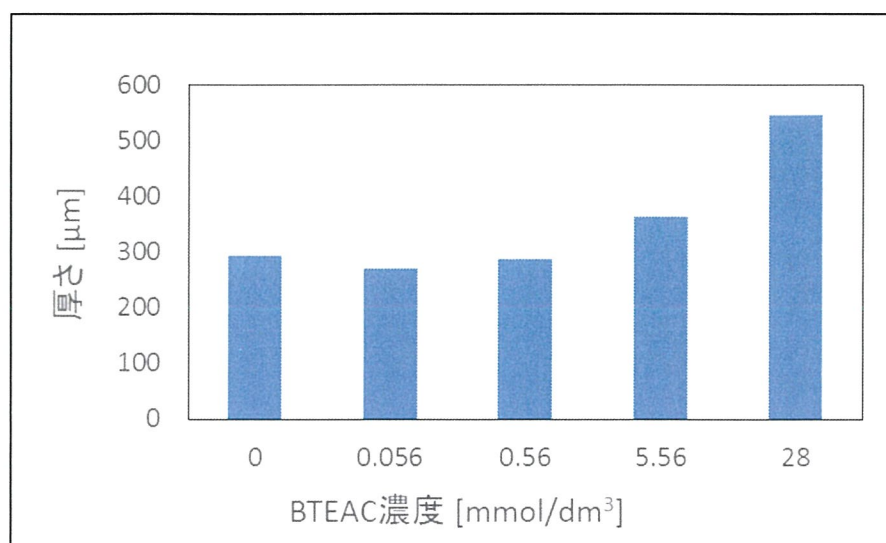


Figure 4-27. Correlation between concentrations of BTEAC and thickness of Val crystal. These results were average thickness of Val crystal (N=4~10).

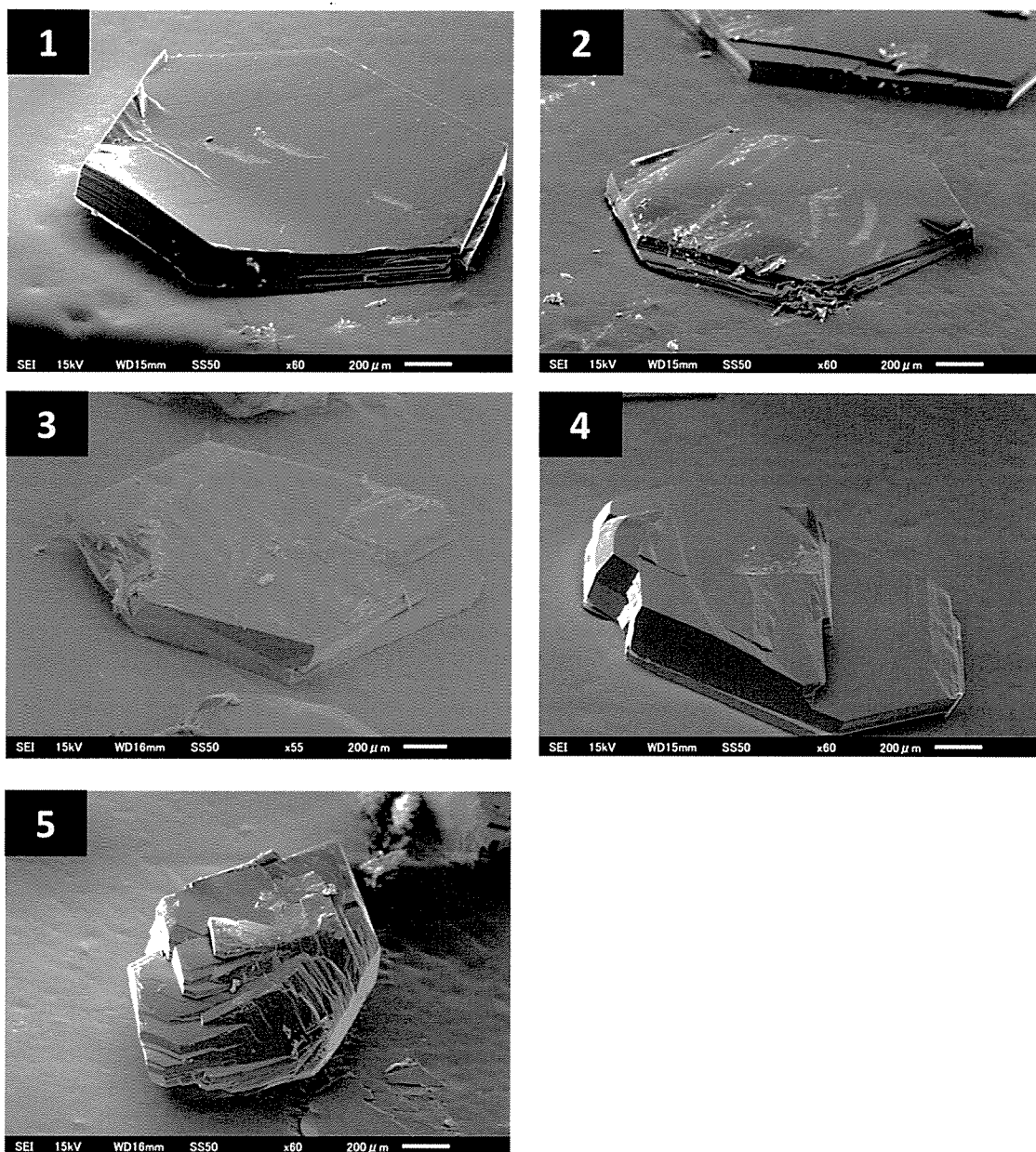


Figure 4-28. SEM photographs of Val crystal crystallized in the absence of BTEAC (1), and in the presence of 0.056 mmol/dm³ BTEAC (2), 0.56 mmol/dm³ BTEAC (3), 5.5 mmol/dm³ BTEAC (4) and 28 mmol/dm³ BTEAC (5).

4.11. まとめ

本研究では添加剤における Val 各結晶面のへの成長阻害に関して、マイクロスコプの連続写真から結晶成長速度を測定し、評価した。

DBS は主に(100)面方向に大きく吸着、結晶成長阻害を引き起こし、(100)面方向の成長を止めた。(110)、(110)面方向に関しては片側だけ結晶成長が止まり、もう片方は多層化を経て成長する挙動を確認できた。

また、DBS 誘導体との比較から、添加剤のアルキル基が特に a 軸方向の(100),($\bar{1}$ 00)面への吸着に対して大きく寄与していることを確認した。それによって、アルキル鎖長が長い DBS は a 軸方向を強く阻害するため細長い結晶が晶析され、対して BS は a 軸方向を殆ど阻害しないため、比較的結晶成長が阻害される b 軸方向より a 軸方向が成長し、ひし形の結晶が晶析されたと考える。

更に、多層化面を SEM で観察し、多層化は一度結晶成長が停止し、その上から新たな面が覆いかぶさるように成長することが示唆された。

結晶の厚み方向の成長変化については、結晶の厚み測定から、添加剤 BTEAC を 5.5 mmol/dm^3 又はそれ以上添加することで結晶の厚みが増すことが示唆された。(001)面方向に多層化し、それが結晶成長の加速に影響していると推測された。

参考文献

- 37) 松下幸司, 修士論文, **2007**.
- 38) N. Cabrera and D. A. Vermilyea, *Growth and Perfection of Crystals*, **1958**, 393.

5 章. Val に対する類縁体 L-Leu および その立体異性体 D-Leu の影響

5.1. 背景・目的

本章では D 体のアミノ酸を使用しているため、混乱を防ぐために L 体も「L-Val」と表記する。

2 章にて L-Val 結晶に同じ BCAA 類縁体である L-Leu、または D-Leu を添加した L-Val 溶液を用いて成長させると、L-Leu では輪郭に凹凸が発生し、表面が脆い結晶が得られた。一方、D-Leu を添加しても結晶に変化は殆ど見られず、無添加と同様輪郭が直線的な結晶が得られた。L-Leu は L-Val と固溶体を形成する性質を持っていることは緒言でも示したが、その立体異性体である D-Leu との取り込み挙動に関しては報告されていない。そこで、L 体と D 体で取り込み挙動が異なると仮説を立てた。

そこで、本章では L 体のアミノ酸をホストとした際のゲストアミノ酸が L 体の場合と D 体の場合における取り込まれ方の違いを比較する。また、ゲスト分子の構造と取り込みの挙動についての相関を明らかにすることを目的とする。

5.2. 実験方法

実験方法を **Figure 5-1** に示す。取り込み、固液平衡を評価するには晶析した結晶を評価する方法が適しているため、実際に濃縮、冷却晶析を行い、結晶を取得した。

まず、ナスフラスコに L-Val 30 g/dm³ 水溶液を用意し、L-Leu および D-Leu を任意の量添加し、攪拌・溶解した。L-Val と L-Leu または D-Leu を含む混合液を L-Val 濃度が 20 wt% vs H₂O になるまで濃縮した。結晶スラリーが入ったナスフラスコを 50 °C 温浴に浸し、10 °C まで 10 °C/hr の速度で冷却し、一晩熟成した。得られたスラリーを 0.45 µm メンブレンフィルターでろ過し、結晶と母液に分離した。取得した乾燥前結晶の重量に対して 500 wt% のメタノールを添加し、10 分攪拌後に 0.45 µm メンブレンフィルターで濾過することで母液を除いた洗浄結晶を得た。晶析前の晶析フィード液、洗浄結晶、母液をそれぞれ HPLC で分析し、L-Val、L-Leu、D-Leu をそれぞれ定量した。

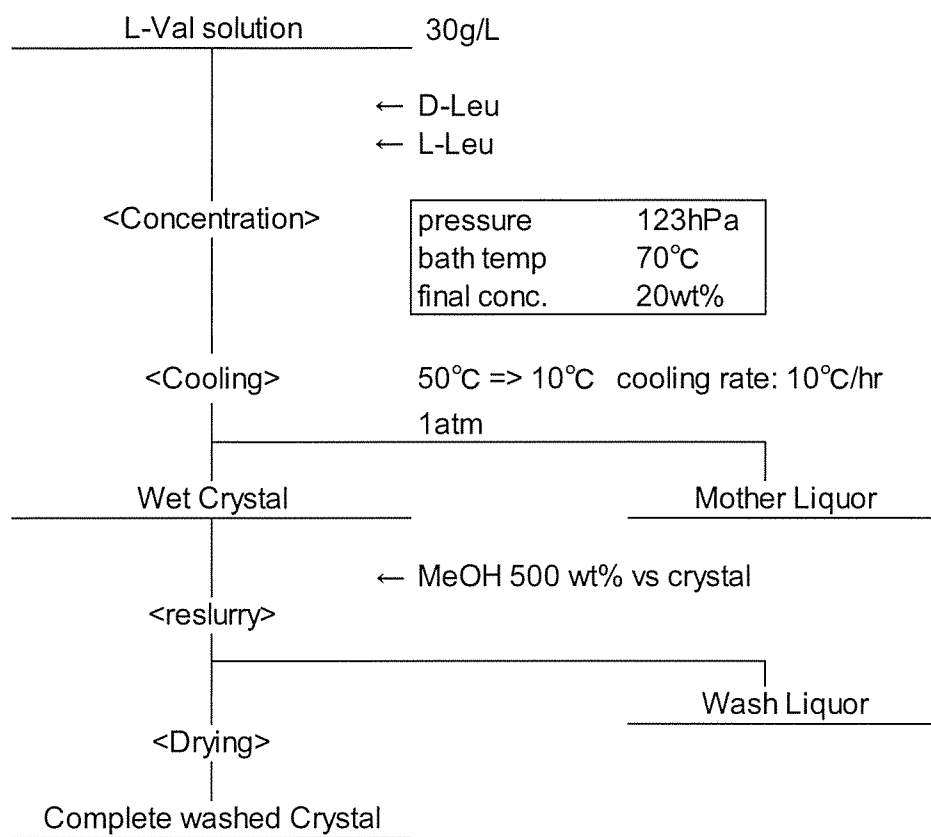


Figure 5-1. Experimental procedure of evaluating the incorporation of D-Leu and L-Leu to L-Val crystal.

取り込み挙動の比較に際し、以下の項目について測定を実施した。

- ・ 高速液体クロマトグラフィー（HPLC）： 結晶中、母液中の組成比
- ・ 粉末 X 線回折（PXRD）： 結晶構造
- ・ SEM： 結晶外観

5.3. 分析・測定条件

【HPLC】

一般に、アミノ酸の定量には日立アミノ酸アナライザ L-8900 に代表されるポストカラムニンヒドリン法が用いられることが多い。しかし、本方法では L-Leu と D-Leu を分離することができないため、光学分割カラムを用いた HPLC 分析系を用いて定量を行った。

使用機器: HITACHI Chromaster

Column: 三菱化学 MCIGEL CRS10W

カラム温度: 30 °C

検出波長: 254nm

測定時間: 15 分

流速: 1 cm³/min

移動相: 1 mM CuSO₄ aq./MeOH = 85 : 15

定量法: 3 点検量線法 (STD: 100, 200, 300 mg/dm³)

【PXRD】

使用機器: Bruker D2 PHASER

X 線源: CuK α (1.54184 Å)

照射強度: 30V

測定角: 4~40°

【SEM】

使用機器: 日本電子 JSM-6510

5.4. ゲストアミノ酸の立体による取り込み挙動の違い

まず、ゲストアミノ酸の立体による取り込み挙動について、固液の分配比から違いを比較した。まず、固液平衡の図を **Figure 5-2** に示す。

L-Val に対して L-Leu を添加して晶析を行った場合、L-Leu は結晶中の比率が 0.1 まではほぼ 1:1 の比率で分配されていた。結晶中の比率が 0.1 を超えてくると L-Leu の取り込む量が多くなる挙動を見せている。一方で、D-Leu を添加して晶析を行った場合、D-Leu 添加量が母液の L-Val に対する D-Leu 比率 0.12 までは結晶に全く取り込まれず母液に移行する。しかし、D-Leu 比率 0.12 を超えると、母液には D-Leu 比率 0.12 以上は移行せず、すべて結晶中に移行する。母液中の D-Leu 溶解度を超えているため析出したと考えられる。

以上から、取り込み挙動は次の通りにまとめられる。L-Val に対して L-Leu は晶析前の組成に関わらず結晶中に取り込まれており、一方で D-Leu は溶解度までは取り込まれずに、溶解度を超過した分のみ析出しているような挙動を見せる。

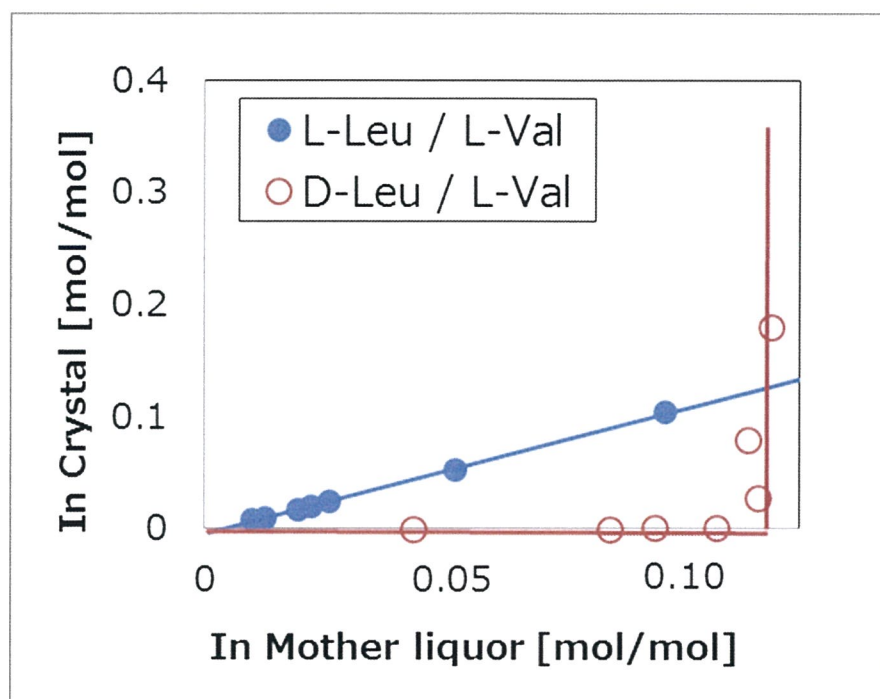


Figure 5-2. Distribution ratio of Leu / L-Val. Symbols show the ratio of L-Leu to L-Val crystal (●) and the ratio of D-Leu to L-Val (○).

5.5. XRD から見た結晶構造の違い

L-Val に対する L-Leu、D-Leu の取り込み挙動は大きく異なっていた。そこで、L-Val とゲストアミノ酸が混在する結晶の構造について比較した。以下、固溶体の組成を「ゲストアミノ酸/ホストアミノ酸」と表記する。数字は結晶中の mol ベースの組成比を示している。

L-Leu / L-Val の PXRD スペクトルを **Figure 5-3** に示す。L-Val の(001)面に該当する $2\theta = 7.3^\circ$ 、(002)面に該当する $2\theta = 14.7^\circ$ のピークが低角度側にシフトし、L-Leu の含量が増加するにつれてピークがブローディングする傾向を見せた。これは L-Val 単位格子中に L-Leu 分子が取り込まれ、*c* 軸側の格子長が拡張したことを示している。また、L-Val 単体のピークは検出されないことから、L-Val 単体は析出せず、L-Leu / L-Val 固溶体のみが析出していることを示している。

一方、D-Leu / L-Val についても **Figure 5-4** に示す PXRD スペクトルを取得した。L-Val 単体のピークと D-Leu ではない新規ピークの 2 種類が検出された。例えば、L-Val、D-Leu の(001)面反射ピークはそれぞれ $2\theta = 7.3^\circ$ 、 6.0° だが、いずれにも該当しない $2\theta = 7.0^\circ$ のピークが新たに検出された。

D-Leu / L-Val = 50/50 に限っては L-Val、D-Leu 単体のピークは検出されず、新規ピークのみが検出された。また、全ての組成で D-Leu 単体のピークは検出されなかった。

以上から、D-Leu / L-Val 系では析出する結晶は全てが固溶体として存在しているわけではなく、L-Val の単体と D-Leu / L-Val の固溶体との物理混合物であることが示唆された。また、得られた固溶体の組成は D-Leu / L-Val = 50 / 50 であり、1 本のシャープなピークのみが検出されていることから、D-Leu と L-Val が規則正しく整列している固溶体の 1 種である共結晶を形成したと考えられる。

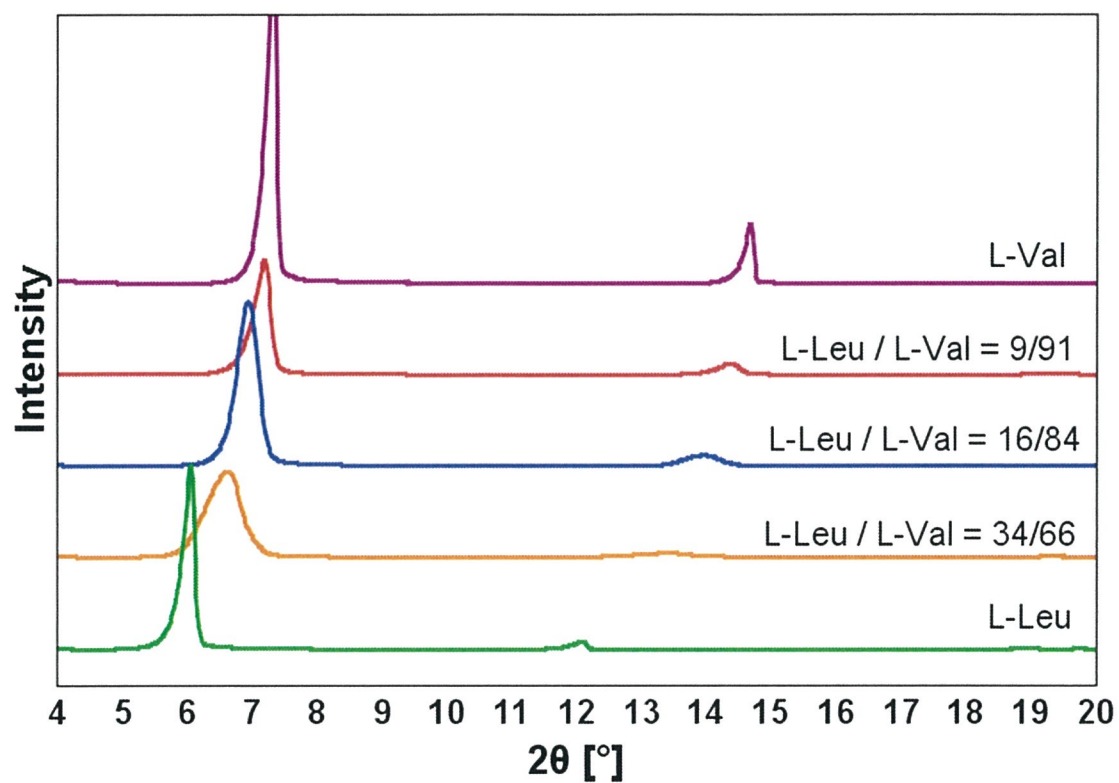


Figure 5-3. PXRD spectra of L-Leu / L-Val crystal. The composition ratio is represented by mol/mol. (purple) L-Leu / L-Val = 0 / 100, (red) L-Leu / L-Val = 9 / 91, (blue) L-Leu / L-Val = 16 / 84, (orange) L-Leu / L-Val = 34 / 66, (Green) L-Leu / L-Val = 100 / 0.

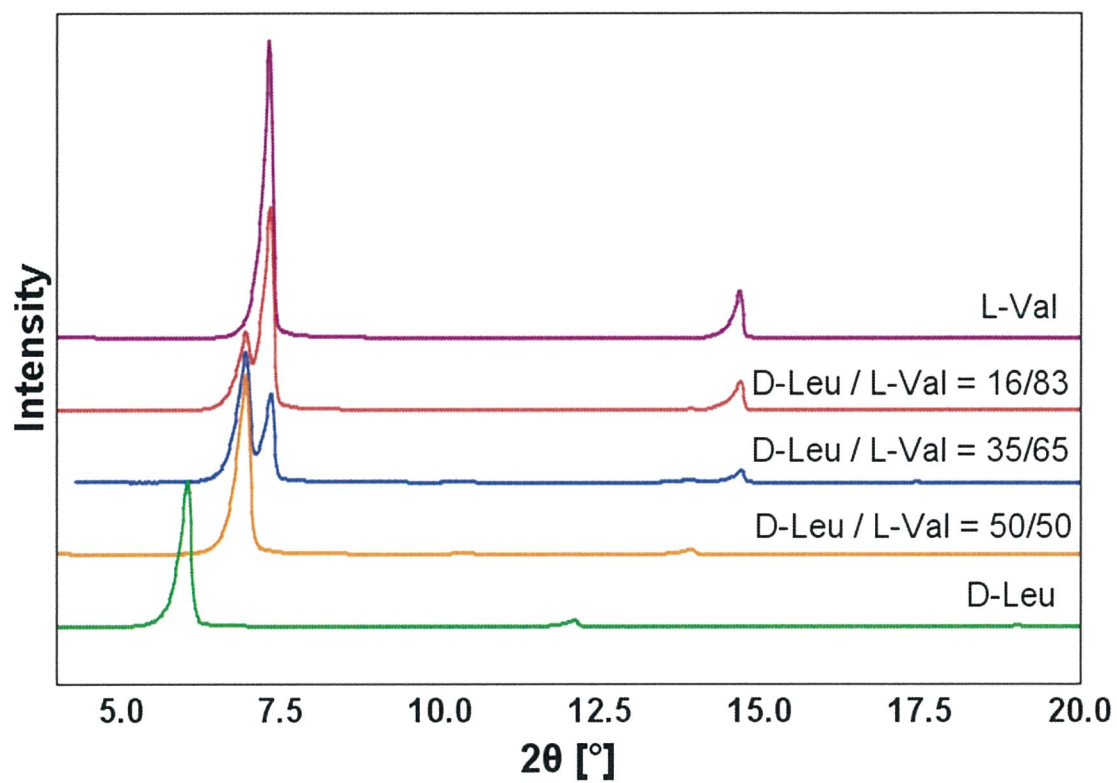


Figure 5-4. PXRD spectra of D-Leu / L-Val crystal. The composition ratio is represented by mol/mol. (purple) D-Leu / L-Val = 0 / 100, (red) D-Leu / L-Val = 16 / 83, (blue) D-Leu / L-Val = 35 / 65, (orange) D-Leu / L-Val = 50 / 50, (Green) D-Leu / L-Val = 100 / 0.

5.6. D-Leu / L-Val 共結晶の組成比の算出

D-Leu / L-Val 共結晶の組成比が本当に 50/50 であるか、PXRD のピーク強度の比から検証を実施した。その結果を **Table 5-1** に示す。

【検証方法】

- ① HPLC を用いて L-Val と D-Leu のモル分率を測定した。
- ② L-Val の(001)面の反射ピーク $2\theta = 7.3^\circ$ の強度比から、各結晶中に含まれる L-Val 単体のモル分率を算出した。
- ③ L-Val 単体以外は全て D-Leu / L-Val の固溶体を形成していると想定し、固溶体中の L-Val 量を算出した。

【計算例 (Run1)】

PXRD の強度比から L-Val 単体の比率は

$$1412161 / 2064157 = 68.5\%$$

HPLC で測定した共結晶も含めた L-Val は 84.8%なので、共結晶として存在する L-Val は

$$84.8 - 68.5 = 16.4\%$$

D-Leu は全て固溶体として存在していると仮定するため、共結晶中の L-Val 比率は以下ようになる。

$$16.4 / (16.4 + 15.2) = \underline{51.8\%}$$

同様の計算を run2、3 でも実施し、それぞれについて共結晶中の L-Val 比を算出した。その結果、検証に用いた 3 サンプル全てで L-Val 含量はいずれもほぼ 50 mol%と算出されたため、得られた共結晶の組成比は D-Leu / L-Val = 1 / 1 である。

Table 5-1. The L-Val content in the solid solution calculated from the result of PXRD.

Run	HPLC結果 [mol%]		intensity	L-Val 存在比 [mol%]		固溶体中のL-Val比 [mol%]
	L-Val	D-Leu	L-Val	単体	L-Val/D-Leu	
L-Val	100	0	2064157	100	0	
1	84.8	15.2	1412161	68.4	16.4	51.8
2	67.2	32.8	614536	29.8	37.4	53.3
3	50.5	49.5	28810	1.4	49.1	49.8

5.7. 固溶体の組成比と結晶格子の変化

固溶体の組成が変わることで結晶格子にどのような変化があるかを PXRD から検証した。L-Leu / L-Val 系では、固溶体中の L-Leu 含量が高くなるにつれて、 $2\theta=7^\circ$ や 15° 付近のピークが低角度側にシフトしていることがわかる。その角度の変化と Leu 含量についての相関を確認した。その結果を **Figure 5-5** に示す。

対象ピークを(001)面相当の反射ピークである $2\theta = 6.5^\circ \sim 7.5^\circ$ とした。L-Leu / L-Val 系は L-Leu 含量が増えるにしたがって低角度側に対数関数的にシフトしていたが、D-Leu / L-Val 系は D-Leu 含量によらず変化は見られなかった。変化があった L-Leu / L-Val 系について、(001)面ピークの面間隔 d を Bragg's 式(5-1)から算出した。

$$\lambda = 2d \sin\theta \quad \text{---(5-1)}$$

λ : X 線波長

X 線回折で使用した X 線源 Cu K α の波長は 1.54184 \AA であり、それを代入して算出した結果を **Figure 5-6** に示す。低角度側にシフトするということは、即ち結晶格子が c 軸方向に拡張されているということである。L-Leu / L-Val 系では L-Leu との固溶体を形成し、L-Leu 比率が高くなるほど結晶格子が拡張される。一方、D-Leu / L-Val 系で得られる固溶体は D-Leu 比に関係なく、常に同じ格子長の結晶が得られる。

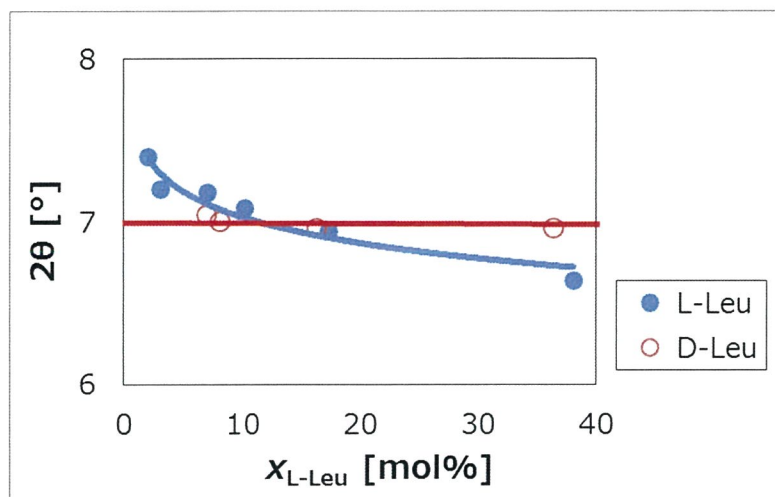


Figure 5-5. Correlation between concentration of Leu and 2θ of (001) face in PXRD spectrum. Horizontal axis shows Leu ratio in crystal [mol%] and Vertical axis shows 2θ [°]. Symbols show L-Leu / L-Val (●) and D-Leu / L-Val (○).

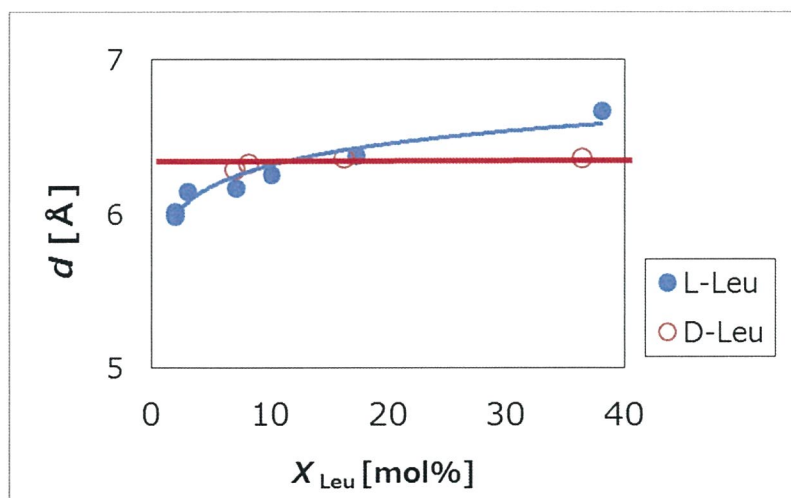


Figure 5-6. Correlation between concentration of Leu and lattice spacing d of (001) face. Horizontal axis shows Leu ratio in crystal [mol%], vertical axis shows lattice spacing [Å]. Symbols show L-Leu / L-Val (●) and D-Leu / L-Val (○).

5.8. 結晶外観

Figure 5-7 に示す SEM 写真から結晶の外観を比較すると、結晶形が顕著に異なることが分かる。L-Val 単体は通常六角形の板状晶①になるが、L-Leu / L-Val の固溶体は②、③のように輪郭が明瞭にならない結晶として取得された。固溶体はランダムに結晶格子内にゲスト分子が置換されるため、結晶格子が局所的に拡張される。結晶格子が拡張された部分は結晶成長が阻害されることが知られているため、均一な結晶成長が阻害され、滑らかな結晶面に成長できなかったことに起因すると考える。

一方、D-Leu / L-Val の固溶体は、④のように平坦な結晶面上に非常に微細な柱状晶が生成された結晶であった。結晶組成は L-Val と D-Leu / L-Val の固溶体の混合物であるため、大きく平坦な結晶は L-Val の単体結晶であり、その上に D-Leu / L-Val の固溶体である微細な柱状晶が凝集していると考えられる。

D-Leu / L-Val の固溶体は微細ではあるが結晶の輪郭が非常に明確であることから、ランダムに結晶格子内に置換されるタイプの固溶体ではなく、規則正しい結晶配列を持つ共結晶であることを支持する。

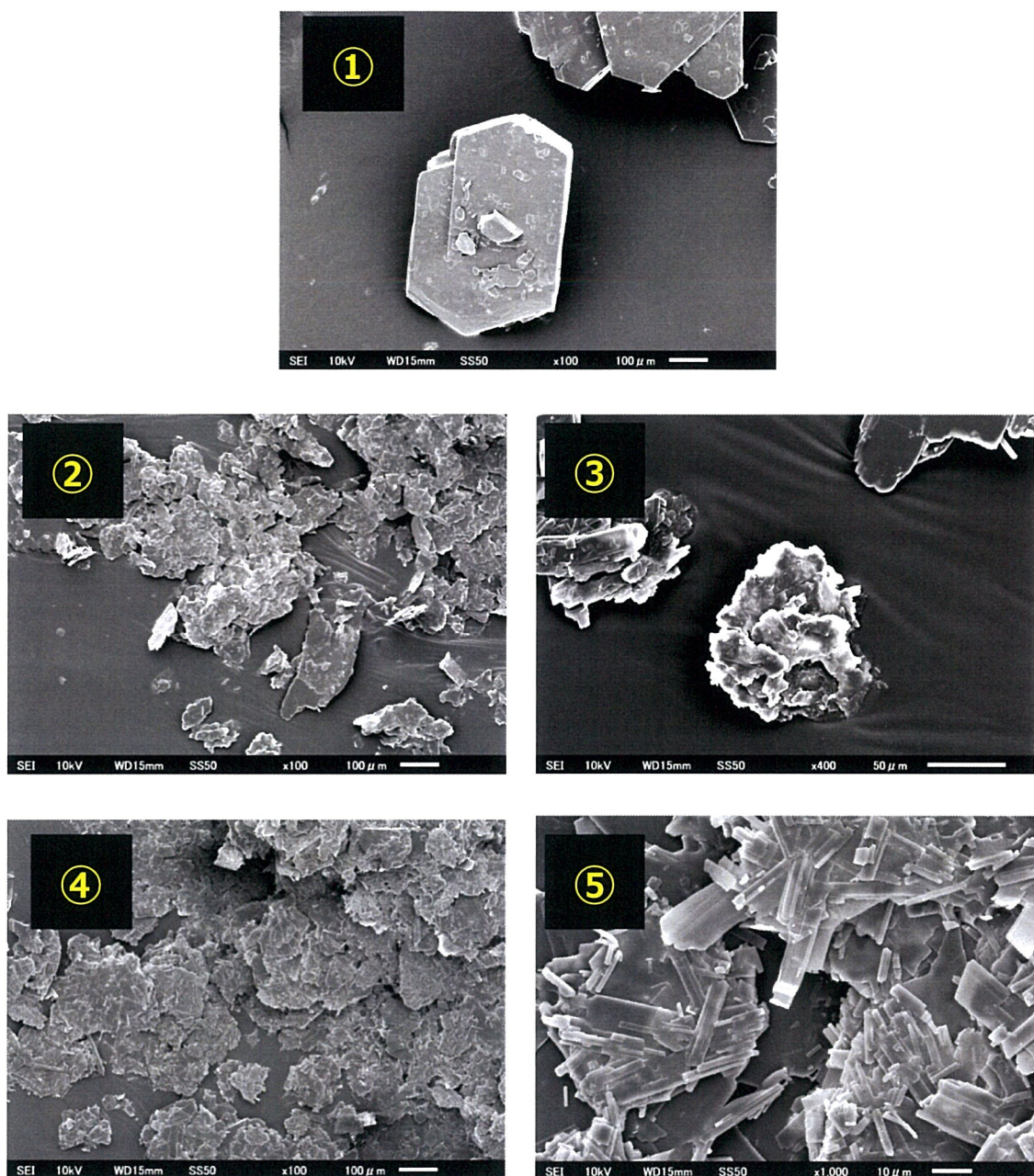


Figure 5-7. SEM photographs of crystals. ① L-Val (x100), ② L-Leu / L-Val = 2 / 98 (x100), ③ L-Leu / L-Val = 2 / 98 (x400), ④ D-Leu / L-Val = 35 / 65 (x100), ⑤ D-Leu / L-Val = 35 / 65 (x1000).

5.9. D-Leu / L-Val の結晶構造

5.9.1. 単結晶作成

PXRD および HPLC の結果より、D-Leu / L-Val は 1:1 の共結晶を形成していることが示唆された。それを証明するため、単結晶を取得し、X 線構造解析を行おうと考えた。しかし、単に静置で冷却晶析を行うだけで結晶が微細化し、X 線構造解析を行うに適する結晶を取得することができなかった。そのため液液拡散法³⁹⁾を用いて単結晶を作製した。

まず、Val の飽和水溶液を直径 2 cm のサンプル瓶に 2 cm³ 入れ、その上から、エタノールを 8 cm³ を水層と混ざらないように壁面に沿って滴下した。栓で密封し、3 日静置することで 300 μm 程の単結晶が得られた。

5.9.2. 単結晶 X 線測定条件

つくば市の高エネルギー加速器研究機構 PF-AR NW12A を用いて X 線を照射し、回折像を取得した。

- ・ X 線波長: 0.75 Å
- ・ 測定温度: 100K (冷却乾燥窒素ガスを吹き付けながら測定)

5.9.3. 結果

構造解析で得られた各種パラメーターを以下に記す。十分な精度で構造解析ができていることを確認した。

- ・ 反射数/パラメーター数： 16.55
- ・ 分解能： 0.69 Å
- ・ R 1 （構造解析結果の代表的統計値）： 0.0819
- ・ Goodness of Fit （構造解析結果の代表的統計値）： 1.439
- ・ Flack パラメーター（絶対構造決定の精確さの指標）： 0.03

次に、結晶のパッキング図を **Figure 5-8** に示す。*c* 軸方向には、L-Val と D-Leu が交互に層を形成していることが明らかとなった。各層間は、側鎖同士の疎水性相互作用からなる層と、アミノ基、カルボキシ基の水素結合相互作用からなる層が交互に連なっていた。

また、各結晶学的定数を **Table 5-2** に示す。結晶形、空間群、格子定数等のパラメーターは立体が反転している D-Val / L-Leu 結晶の文献値と全く同じであった。また、ラセミ結晶である DL-Val と結晶形、空間群が同等であることから、ラセミ結晶と同様の機構で D-Val / L-Leu 共結晶が形成されたと推測される。DL-Val と比較して *c* 軸方向が若干拡張されているが、Val の側鎖より Leu の側鎖の方がメチル基 1 つ分長いためであると考ええる。

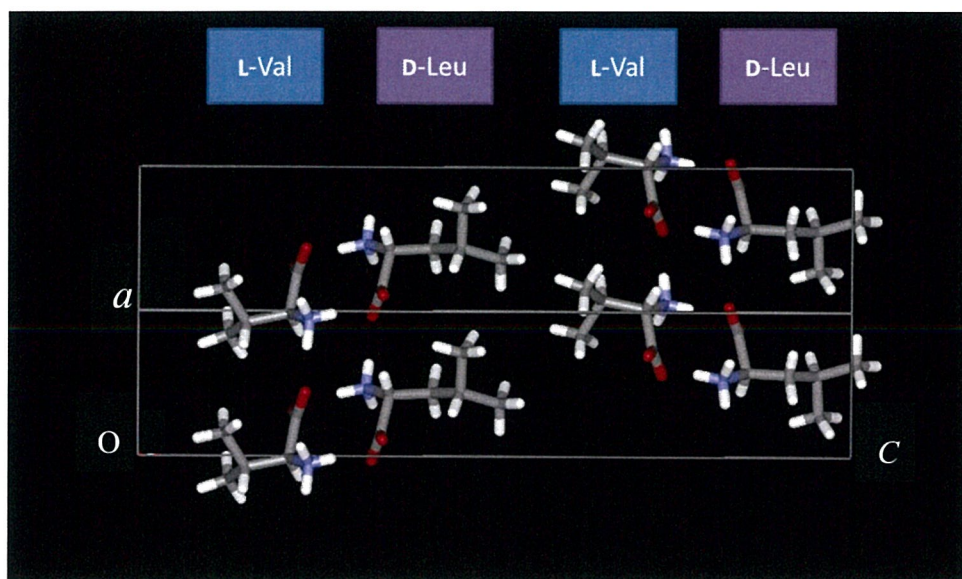


Figure 5-8. Crystal structure of D-Leu / L-Val co-crystal at *b* axis projection.

Table 5-2. Crystallographic constant of D-Leu / L-Val co-crystal.

	D-Leu / L-Val	D-Val / L-Leu^{†1}	DL-Val^{†2}
Crystal system	Monoclinic	Monoclinic	Monoclinic
<i>a</i> (Å)	5.18	5.20	5.21
<i>b</i> (Å)	5.40	5.41	5.41
<i>c</i> (Å)	25.0	25.1	22.1
α (°)	90	90	90
β (°)	110.9	110.8	109.2
γ (°)	90	90	90
Space group	<i>P</i> 2 ₁	<i>P</i> 2 ₁	<i>P</i> 2 ₁

† 1 *Acta Cryst.*,**1999**, C55, 1547-1555.

† 2 IDCC (International Digital Curation Conference)

5.10. 母液中のホスト、ゲストアミノ酸の溶解度変化

L-Val に対して、L-Leu と D-Leu の取り込み挙動が違うことを様々なツールで確認した。取り込み挙動が違うということは、固液平衡も異なり、液側である母液の相互作用も変化することが想定される。そこで、溶液中の各アミノ酸の組成を測定すると **Figure 5-9** に示すように母液中の溶解度に大きな差があった。

L-Leu / L-Val 系では、母液中の L-Leu 濃度が上昇するにしたがって L-Val の濃度も上昇した。無機塩でいう塩溶効果に近い。一方で D-Leu / L-Val 系では、母液中の D-Leu 濃度が 10 g/dm³ 未満の場合溶解度は変わらず、10 g/dm³ 以上の領域では L-Val 濃度が減少していた。こちらは無機塩でいう塩析効果に近い。この違いについて考察した。

L-Leu / L-Val 系では任意の組成で固溶体を形成する。L-Leu 低濃度領域では得られた固溶体と母液はほぼ同じ組成比である。一般に、任意の組成で形成することができる固溶体は、ホストアミノ酸とゲストアミノ酸の組成比が 1:1 に近づくにつれて結晶格子が拡張されることが知られている (Vegard の法則)。また、化合物の溶解度と密接な関係がある格子エネルギー(U)は結晶格子内の化合物間の距離(r_0)に反比例する(5-2 式)。結晶格子が拡張、即ち r_0 が大きくなることで U は小さくなり、溶解度は高くなる。したがって、固溶体の L-Leu 比が高くなるにつれて、L-Val の溶解度も高くなったと考えられる。

$$U = -\frac{N_A M_{Z+Z-} e^2}{4\pi\epsilon_0 r_0} \left(1 - \frac{1}{n}\right) \quad \text{— (5-2)}$$

一方、D-Leu / L-Val 系は得られる結晶が D-Leu / L-Val = 1:1 の共結晶と L-Val 単体である。どちらも組成、結晶格子共に変化しないため、水に対する溶解度は一定であると推測される。まず、D-Leu が低濃度の領域では D-Leu と L-Val の共通溶解度を超えず D-Leu / L-Val の固溶体が析出してこないため、D-Leu 濃度によらず L-Val 濃度は一定になる。D-Leu 濃度が約 10 g/dm³ を超えると、共通溶解度を超えて析出する。更に D-Leu 濃度を上げていくと、L-Val の水和に必要な水和水が D-Leu 分子の水和に使われてしまうため、L-Val の溶解度が減少したと考える。

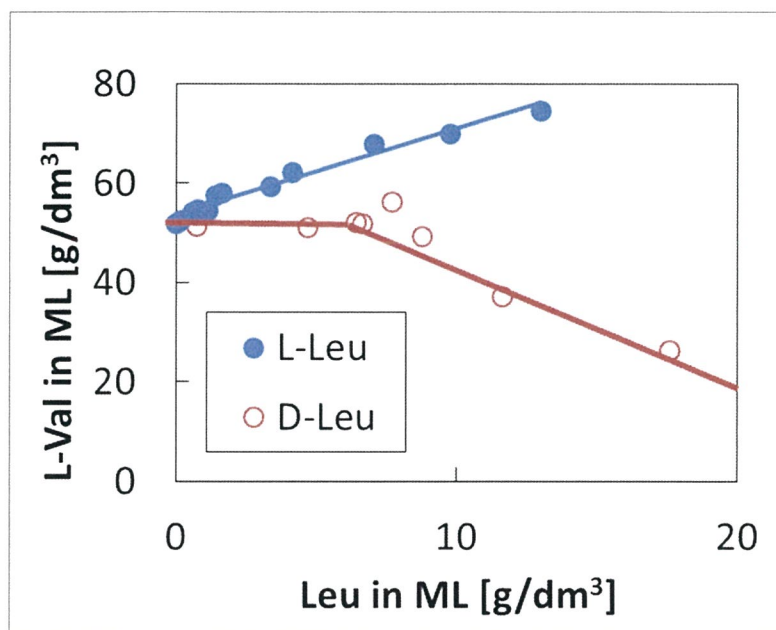


Figure 5-9. Correlation between Leu concentration and L-Val solubility in mother liquor. Concentration of L-Val in the various concentration of L-Leu in mother liquor (●), concentration of L-Val in the various concentration of D-Leu in mother liquor (○).

5.11. D-Leu / L-Val の共結晶生成機構

5.11.1. 分子模型による共結晶生成機構の推定

これまでの結果から、D-Leu / L-Val 系において D-Leu は共通溶解度に達するまで全く析出せず、共通溶解度を超えると D-Leu / L-Val の共結晶として析出した。これは機構が分かっている L-Leu / L-Val の系とは異なる。L-Leu / L-Val 系では結晶成長の際に L-Leu 分子が結晶表面に吸着し、L-Val 結晶格子に取り込まれる。一方で、DBS 分子も L-Val 結晶表面に吸着はすると推測されるが、結晶格子に取り込まれなかったと考えられる。

L-Val 結晶は a 軸方向沿って L-Val 分子が規則正しく整列しており、カルボキシ基とアミノ基がそれぞれ水素結合を形成している。

L-Val の結晶構造を分子模型で再現し、L-Val、D-Leu それぞれ結合させたときの結合状態を **Figure 5-10** に示す。L-Leu を結合させた場合、通常の L-Val 結晶と同様に a 軸方向に並行になるようにアミノ基の N とカルボキシ基の O の 1 つが整列している。一方、D-Leu を結合させてみると、N が a 軸方向に並行にならず、 b 軸方向に歪んだ水素結合が形成された。水素結合の結合エネルギーは定量的でないが、歪んだ水素結合の方がエネルギー的に不利であり、水素結合の安定性は L-Leu / L-Val > D-Leu / L-Val であると推測される。以上から、L-Val の結晶に対して、L-Leu は任意の組成で固溶体を形成するが、D-Leu はある濃度までは固溶体を形成できなかったと仮説を立てた。

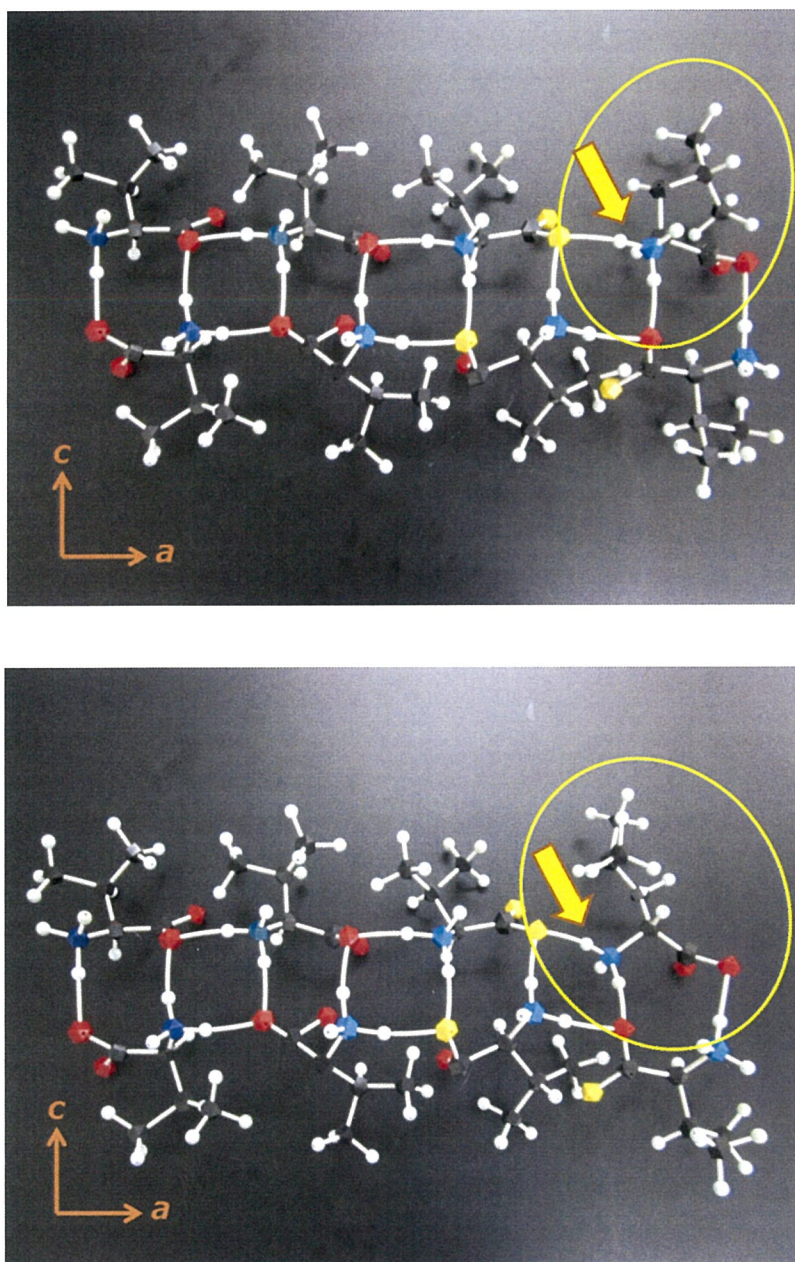


Figure 5-10. The state of the molecule when L-Leu or D-Leu binds to the L -Val crystal structure was reproduced with a molecular model. L-Leu molecule was placed in the yellow circle in upper figure. D-Leu molecule was placed in the yellow circle in bottom figure. (black) carbon, (white) hydrogen, (blue) nitrogen, (red and yellow) Oxygen.

5.11.2. 相互作用エネルギーの推算

結晶格子への取り込まれやすさは結晶格子とゲスト分子間の相互作用の安定性と相関があると考えられる。そこで、相互作用のエネルギーを比較し、L-Leu が取り込まれやすく D-Leu が取り込まれにくいということを証明できないか検証した。今回は相互作用エネルギーを実測することが困難であることから、Material Studio というソフトウェアを用いてエネルギーの試算を実施した。

【計算方法】

- ① L-Val 分子 4x4x4 の結晶を作製した。
- ② Val 結晶のうち 1 分子をゲスト分子に置き換えた。(構造 A)
- ③ 構造 A のうち、ゲスト分子を除いた系を作製した (構造 B)
- ④ 構造 A のうち、L-Val 分子全てを除き、格子内にゲスト分子 1 のみ存在する系を作製した (構造 C)

各構造を **Figure 5-11** に示す。各構造の系のエネルギーを E_A, E_B, E_C とすると、結晶とゲスト分子との相互作用エネルギー E_I は(5-3)式のようにになる。

$$E_I = E_A - E_B - E_C \quad \cdots (5-3)$$

【計算環境】

ソフトウェア: Material Studio (ダッソー・システムズ・バイオビア株式会社)

計算モジュール: Forcite⁴⁰⁾ (古典分子力場計算モジュール)

ポテンシャル関数: cvff^{41), 42)} (広範囲の有機化合物の小さな結晶をモデル化するために用いられる一般的な価電子ポテンシャル関数)

ゲスト分子: L-Val, L-Leu, D-Leu

結果を **Table 5-3** に示す。 E_1 が低ければ低いほどゲスト分子と結晶格子の親和性は高く、取り込まれやすい。まず、**L-Val** をゲスト分子とした場合、**L-Val** 同士の親和性が高く、 E_1 がマイナス、即ちゲスト分子が存在した方が系として安定ということである。**L-Leu** も **L-Val** とほぼ同様であり、親和性が高いため任意の濃度で取り込まれ、固溶体を形成したと考える。一方、**D-Leu** は **L-Val** 結晶との親和性は非常に低く、 E_1 がプラス、即ち **D-Leu** が存在することで系が不安定になるということである。**D-Leu** は周りの分子と反発し、水素結合をうまく形成することができなかったため、系のエネルギーが増加したと考えられる。系のエネルギーが高いということは系が不安定であるということなので、**D-Leu** は取り込まれにくかったと考えられる。以上の結果から、**D-Leu** は **L-Leu** と比較して取り込まれることによって系が非常に不安定になるため、**L-Leu** のように任意の濃度固溶体を形成することができなかったと考える。

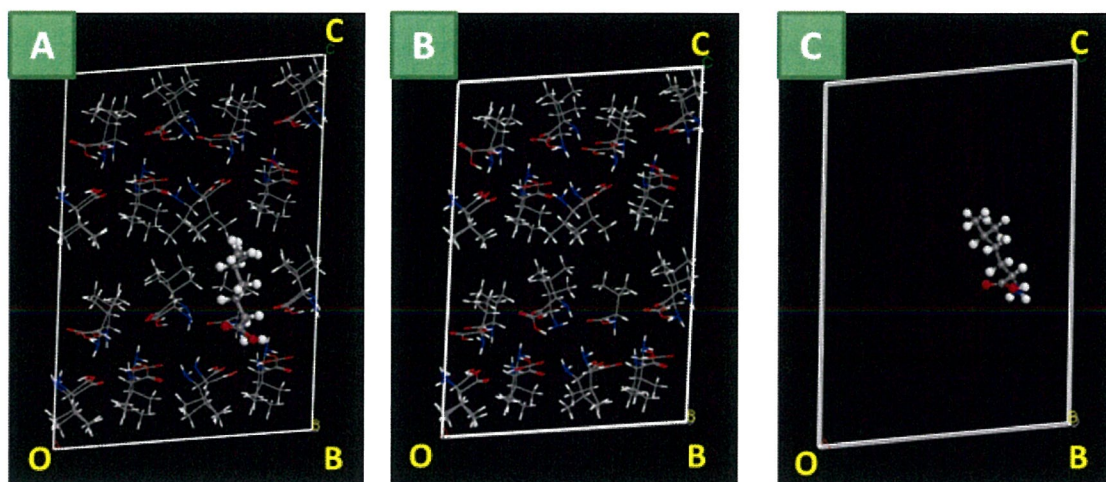


Figure 5-11. Structures of system used for interaction energy estimation. The structure in which one molecule in the crystal lattice of L-Val $4 \times 4 \times 4$ is replaced by a guest amino acid (A). In the structure A, a guest molecule was removed to form a vacuum layer (B). In the structure A, all the L-Val molecules were removed to form a vacuum layer (C).

Table 5-3. Interaction energy E_I .

ゲストアミノ酸	E_I [kJ/mol]
L-Val	-34.5
L-Leu	-30.5
D-Leu	185.7

5.12. まとめ

本章では、L-Val の類縁体の相互取り込みについて、ホストアミノ酸を L-Val、ゲストアミノ酸をエナンチオマーである L-Leu と D-Leu に設定し、取り込み挙動の比較を行った。その結果、L-Leu は L-Val と任意の割合で固溶し、結晶が微細化した。一方で、D-Leu は母液濃度が L-Val に対して 0.12 までは全く固溶せず、0.12 を超えると $\text{D-Leu} / \text{L-Val} = 1/1$ の共結晶を形成することが分かった。

更に、取り込み挙動を結晶構造から考察した。L-Leu / L-Val 結晶の場合、L-Val 結晶格子中に L-Leu がランダムに置換する置換型固溶体であった。吸着した L-Leu が一定の割合で取り込まれていると考えられる。一方 D-Leu / L-Val 結晶の場合、D-Leu と L-Val が 1 対 1 で規則正しく配列されている共結晶であった。ラセミ結晶と同様の機構で共結晶として析出したと考えられる。

参考文献

- 39) 平山令明, 有機化合物結晶作成ハンドブッカー原理とノウハウ, 丸善出版, **2008**, 41.
- 40) ダッソー・システムズ・バイオビア株式会社, Forcite plus.
<http://accelrys.co.jp/resource-center/datasheets/Materials-Studio/forcite-plus-jp.pdf>
- 41) P. Dauber-Osguthorpe et al., *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, **1988**, 4, 31.
- 42) N. Anuar et al., *Cryst. Growth Des.*, **2012**, 12, 2195.

6 章. 今後の展望

6.1. Val 結晶形の最適化に向けて

本研究では、界面活性剤やその誘導体、アミノ酸類縁体等様々な添加剤を用いて結晶形を変化させ、その中でアニオン系界面活性剤である DBS、比較でカチオン系界面活性剤として DTMAC、類縁体として L-Leu とそのエナンチオマーである D-Leu について検討を実施した。そして、添加剤の化学構造と吸着、および結晶成長阻害に対する相関を明らかにした。

本研究の最終的な目標は得られる Val 結晶の結晶形を最適化し、使用時の操作性改善や、製造プロセスにおける生産性向上である。その目標に対して、課題となる Val 結晶の浮遊性を改善するためのアイデアとして、結晶を厚くする方法が挙げられる。厚さ方向は Val 結晶で言うところの *c* 軸方向であり、今回結晶成長実験で重点的に評価した *a* 軸、*b* 軸方向とは異なる。今後の課題として、*c* 軸方向の結晶成長のより定量的な評価の手法が必要になると考える。

一方、4 級アンモニウム系の添加剤である BTEAC が厚み方向の成長に有意に寄与していることが示唆された。ではこの化合物を用いれば課題が解決するかとはいえ、そう簡単なことではない。例えば、BTEAC の類縁体である Benzyltrimethylammonium Chloride(BTMAC)も Ile に対して厚み方向の成長に効果があることが既往の研究³⁵⁾で示唆されていたが、BTMAC は労働安全衛生法第 57 条の 4 で「強い変異原性が認められた化学物質」として登録されており、実験室での使用もある程度制限されてしまう。そのため、変異原性物質の指定を受けていない BTEAC を用いていた。しかし、BTEAC も非常に構造が近い物質であり、今後変異原性物質に登録されるリスクがある。医薬、食添等に用いる場合、製造プロセスに用いる副原料の安全性が非常に重要になるため、上記のリス

クになりうる物質を製造プロセスに導入することは困難であると考える。

そこで、BTEAC の厚み方向に寄与する機構を明らかにし、化学構造と厚み方向への寄与との相関を明確にすることが重要である。機構が明確化することで最適な添加剤の化学構造の決定につながる可能性がある。その際、本研究で得られた結晶形状変化の評価方法等の知見が大いに役立つと考える。

もう一つの課題は、攪拌系と静置系とのギャップである。添加剤の評価として今回は主に評価しやすい系である静置系を採用した。しかし、実際プロセスや使用時に静置系で使用することは殆どなく、攪拌系で同様の効果が得られるかが重要になる。攪拌系での評価は攪拌に関するパラメーターを考慮する必要がある、より評価が複雑になる。納得の行く攪拌系での評価が重要になると考える。

これらの課題を解決し、顧客観点、製造観点共に大きく貢献することがプロセス技術者、研究者にとって最も重要なことであり、これは研究対象が Val から変わっても不変であると考ええる。

謝辞

始めに、本研究の推進に際し、指導教官として 3 年半の長い期間多大なご指導を頂いた岩手大学理工学部化学・生命理工学科結晶工学研究室 横田 政晶教授に深く感謝いたします。横田先生から研究の進め方は勿論、結晶の研究の難しさ、その難しさを超えたところにあるやりがい、面白さを教えて頂きました。実験系構築への多大なご助言、ご支援を頂き、また副査として論文審査、博士課程専門科目をご指導頂いた土岐 規仁 准教授に深く感謝いたします。また副査として論文審査、博士課程専門科目をご指導頂いた大石 好行 教授、平原 英俊 教授に深く感謝いたします。また、御在任中に多大なご指導、および貴重な発表の機会を頂いた清水 健司 名誉教授に深く感謝いたします。

共同研究としてご尽力頂いただけでなく、私の実験に協力してくださり、出張中大変お世話になった原 沙也加 様を始め、結晶工学研究室の皆様にも深く感謝いたします。また、出張の際は深酒にならない程度にお酒に付き合ってください。電子顕微鏡室の佐々木 邦明 技術専門職員様には実験や、AFM、SEM 等のデータ取得に関して多大なご助力を頂き、深く感謝いたします。

本研究の推進のため、多大なご助言、ご助力頂いた味の素株式会社 児島 宏之 バイオ・ファイン研究所長、吉良 郁夫 プロセス開発研究所長、辻本 信晴 プロセス開発研究室長に深く感謝いたします。また、晶析基盤テーマとして研究、発表する機会を頂き、ミーティングでは多大なご助言を頂いた岸野 光洋 基盤研究テーマリーダー、国分 紀元 主任研究員、金子 雅哉 主任研究員および晶析基盤メンバーの方々に深く感謝いたします。また、社会人博士として二足の草鞋を履くことに対して応援して下さい上田 洋 前単離・精製グループ長、丸田 恭弘 元医食アミノ酸テーマリーダーに深く感謝致します。また、

開発業務と大学の業務の調整にご尽力頂き、研究内容に関して多くの貴重なご助言を頂いた大森 一成 単離・精製グループ長、剣持 直之 医食アミノ酸テーマリーダー、小松 陽平 ユニットリーダー、昨年までの上司である亀井 利道 前医食アミノ酸テーマリーダー、中村 和之 主任研究員、およびこれまで関わってくださった医食アミノ酸ユニットメンバー、単離・精製グループメンバーに深く感謝いたします。

また、日本化学工学会の晶析技術分科会にて研究内容や、晶析技術について相談に乗って頂き、情報交換して下さった月島機械株式会社 須田 英希 部長、佐竹機械化学工業株式会社 佐藤 誠 課長、東京農工大 工藤 翔慈 助教、サントリー食品インターナショナル株式会社 浦井 聡一郎 様に深く感謝いたします。またお酒の席で色々教えて下さい。

最後に、一貫して博士課程に進むことに賛成し、3年半にわたる在学中に応援、支えてくれた妻、両親、弟に深く感謝し、謝辞と致します。

Appendix

(1) Study of incorporation behavior of L-Leu and D-Leu in L-Val crystallization.

Jun Sen, Norimoto Kokubun, Toshimichi Kamei, Kazushige Ohmori, Mitsuhiro Kishino, Tatsuki Kashiwagi, Masaaki Yokota and Norihito Doki.

Advances in Chemical Engineering and Science., **2016**, 6, 262-268.

Study of the Incorporation Behavior of L-Leu and D-Leu in L-Val Crystallization

Jun Sen^{1,2*}, Norimoto Kokubun², Toshimichi Kamei², Kazushige Ohmori²,
Mitsuhiro Kishino², Tatsuki Kashiwagi³, Masaaki Yokota¹, Norihito Doki¹

¹Department of Chemistry and Bioengineering, Iwate University, Morioka, Japan

²Research Institute for Bioscience Products & Fine Chemicals, Ajinomoto Co., Inc., Kawasaki, Japan

³Research Institute for Innovation, Ajinomoto Co., Inc., Kawasaki, Japan

Email: jun_sen@ajinomoto.com

Received 30 May 2016; accepted 10 July 2016; published 13 July 2016

Copyright © 2016 by authors and Scientific Research Publishing Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

Branched-Chain Amino Acids (BCAAs) are essential amino acids mainly produced through fermentation. With respect to BCAA crystallization, the incorporation behavior of L-form BCAAs as a guest amino acid in the crystallization of L-form BCAAs is well known. However, the incorporation behavior of D-form BCAAs as a guest amino acid in the crystallization of L-form BCAAs is not clear. In this study, we focused on the crystal conformation and incorporation behavior of D-Leucine (D-Leu) and L-leucine (L-Leu) in the crystallization of L-valine (L-Val). Moreover, the difference in the incorporation behavior was investigated on the basis of the distribution ratio of crystals to mother liquor, and the crystal structure and interaction energy were calculated using a molecular dynamics method. The crystal composed of L-Leu in L-Val formed as a solid solution and L-Leu was substituted into the crystal lattice of L-Val. In the case where D-Leu was added as a guest amino acid during L-Val crystallization, D-Leu was not incorporated into the L-Val lattice because the interaction energy between a D-Leu molecule and the L-Val crystal lattice was substantially greater than that between an L-Leu molecule and the L-Val crystal lattice.

Keywords

Branched Chain Amino Acid, Crystallization, L-Valine, Leucine, Solid Solution

1. Introduction

Amino acids are the fundamental building blocks of peptides and proteins and are used in numerous applications

*Corresponding author.

including pharmaceuticals, medical food, and fine chemicals. Collectively, L-leucine (L-Leu), L-isoleucine (L-Ile), and L-valine (L-Val) are known as Branched-Chain Amino Acids (BCAAs). BCAAs are essential amino acids and necessary for proper muscle function. Recently, BCAAs have been reported to prevent locomotive syndrome in the elderly [1] [2]. In most cases, BCAAs are commercially produced through fermentation. Small quantities of other amino acids, including other BCAAs, are also produced as impurities during the BCAA fermentation process. The target BCAAs must be separated from impurity-containing mixtures to be shipped as a product. In BCAA crystallization, other BCAAs are known to be difficult to separate because of their common components and tendency to form solid solutions [3]. In this case, “solid solution” refers to a crystal structure produced by random inclusion of impurities into the lattice of the host amino acid (*i.e.*, the target amino acid) crystal. The formation of a solid solution during BCAA crystallization has been reported to be a consequence of the host and the guest amino acids (impurity amino acids) having similar branched hydrophobic side chains and crystal structures [4]–[8]. Co-crystals with a 1:1 ratio of D-form and L-form BCAAs have been reported [9]–[11]; however, quantitative evaluations of their mutual incorporation behavior are rare.

In this report, we focus on the crystal conformation and incorporation behavior of D-leucine (D-Leu) in crystalline L-Val (D-Leu/L-Val). For comparison, the incorporation behavior of L-Leu in L-Val crystals was also studied.

2. Experimental

2.1. Materials

The D-Leu used in this study was a special grade (purity > 98.0%) and purchased from WAKO Pure Chemicals. L-Leu and L-Val used in this study were pharmaceutical grade and purchased from AJINOMOTO Co., Inc.

2.2. Methods

The experimental flow is shown in **Figure 1**. First, a 30 g/L L-Val aqueous solution was prepared. L-Leu or D-Leu was added to this solution and the resulting solution was stirred. The solution was then evaporated until the concentration of L-Val in the solution (C_{L-Val}) was 20 wt%. Crystals formed in the solution. The resulting slurry was subsequently placed in a 50°C water bath, cooled from 50°C to 10°C at a cooling rate of 10°C/h, and

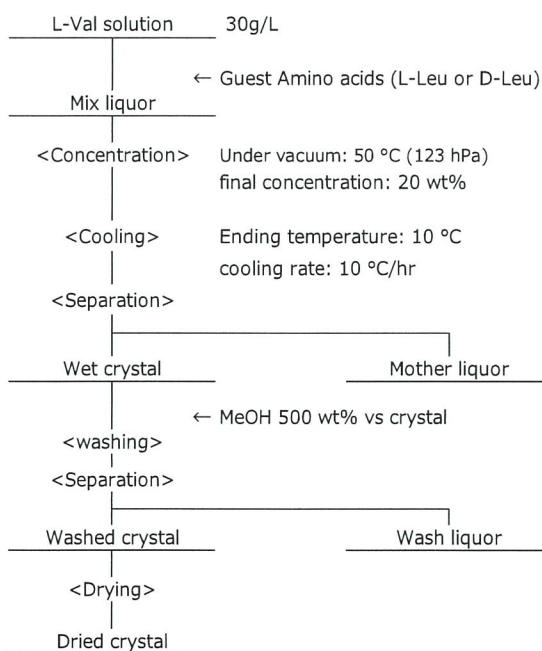


Figure 1. Experimental flow of L-Leu or D-Leu crystallization in L-Val.

then maintained at 10°C overnight. The slurry was filtrated using 0.45 μm membrane filters. The wet crystals were washed using MeOH. The concentrations of L-Leu, D-Leu, and L-Val were analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC; column: MCIGEL CRS10W; column temperature: 30°C; detection wavelength: 254 nm; measuring time: 15 min; mobile phase: 1 mM CuSO_4 aq./MeOH [v/v] = 85/15; flow rate: 1 mL/min). The crystal structure was analyzed using powder X-ray diffraction (PXRD; Bruker D2 PHASER, $\text{CuK}\alpha$, 30 kV) and the crystal shape was analyzed by scanning electron microscopy (SEM; JEOL JSM-6510).

3. Results and Discussion

3.1. Solid-Liquid Equilibria of L-Leu/L-Val and D-Leu/L-Val

The initial experimental system is represented as the molar ratio between the guest amino acid and the host amino acid. For example, L-Leu crystallization in L-Val is represented as “L-Leu/L-Val”. A comparison of the incorporation behaviors of L-Leu/L-Val and D-Leu/L-Val is shown in Figure 2, where the ratios of guest amino acids to L-Val in the crystals are plotted against those in the mother liquor at equilibrium. In the case of L-Leu used as a guest amino acid (blue solid circles), L-Leu was incorporated into L-Val crystals. The impurity content in the crystals was linearly plotted against that in the mother liquor. By contrast, in the case where D-Leu was used as a guest amino acid (red open circles), all D-Leu remained in the mother liquor. When the molar ratio of D-Leu to L-Val (represented as $x_{\text{D-Leu}}$) in the mother liquor was less than 0.12, D-Leu was not incorporated into L-Val crystals. However, when $x_{\text{D-Leu}}$ was greater than 0.12, D-Leu crystallized with L-Val crystals. Thus, the solubility of D-Leu in the mother liquor was $x_{\text{D-Leu}} = 0.12$.

In summary, L-Leu was incorporated in a certain ratio of $x_{\text{L-Leu}}$ in the mother liquor. D-Leu was not incorporated when its concentration in the mother liquor was less than the solubility limit; however, D-Leu was crystallized when its concentration in the mother liquor was greater than the solubility limit. In this report, we mainly discuss cases where $x_{\text{L-Leu}} < 0.12$ and $x_{\text{D-Leu}} < 0.12$ in the mother liquor.

3.2. Crystal Conformation

The structure of crystals obtained by crystallization was analyzed by PXRD (Figure 3). The molar ratio between L-Val and L-Leu in the crystal is denoted as L-Leu/L-Val in this figure. The diffraction angles (2θ) of the (001) and (002) peaks in the pattern of L-Val were detected at $2\theta = 7.3^\circ$ and 14.6° , respectively. The diffraction angles of the (001) and (002) peaks in the pattern of L-Leu were detected as $2\theta = 6.0^\circ$ and 12.1° , respectively. In the case of L-Leu incorporated into L-Val crystals, these peaks were shifted to lower angles than those of single-crystalline L-Val and the extent of their shift was dependent on $x_{\text{L-Leu}}$ in the crystals. The relationship between the diffraction angle and lattice spacing, known as Bragg’s law, is shown in Equation (1):

$$2d \sin \theta = n\lambda \quad (1)$$

where d is the lattice spacing, n is an integer ($n = 1, 2, 3, \dots$) representing the order of diffraction, and λ is the X-ray wavelength ($\text{CuK}\alpha$: 1.5418 Å). As θ decreases, d increases. Our PXRD results show that L-Leu was

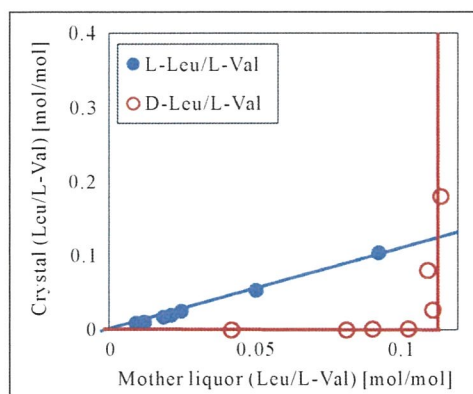


Figure 2. Plot of the distribution ratio of Leu and L-Val in crystals and mother liquors.

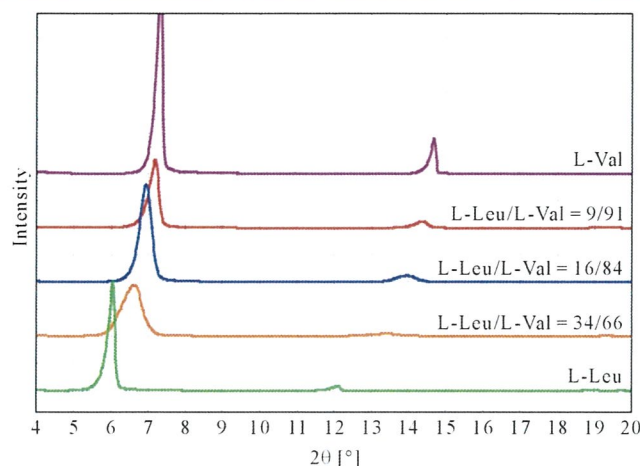


Figure 3. PXRD patterns of L-Leu/L-Val crystals. The molar ratio of L-Val and L-Leu in the crystal is represented as “L-Leu/L-Val” [mol/mol] in the figure.

incorporated into the unit cell of an L-Val crystal and that the c -axis expanded. Moreover, the incorporation of greater amounts of L-Leu into L-Val crystals resulted in broader peaks. It was speculated that the regularity of the crystal array decreased because L-Leu was randomly incorporated into the L-Val crystal lattice. We therefore considered these crystals to be a solid solution. L-Val and L-Leu peaks were not detected in any of the PXRD patterns of L-Leu/L-Val. Therefore, L-Val and L-Leu single crystals did not form; only the L-Leu/L-Val solid solution crystallized.

3.3. Crystal Morphology

The crystal shape differed markedly between the L-Leu/L-Val crystal and the D-Leu/L-Val crystal (Figure 4). When $x_{\text{D-Leu}}$ was less than 0.12 in the mother liquor, the molar ratio of the obtained crystal was D-Leu/L-Val = 0.03/99.97. D-Leu was hardly incorporated into L-Val by crystallization. The crystal clearly exhibited a hexagonal-plate morphology, which was identical to that of the L-Val single crystal. However, vaguely outlined fine crystals were obtained in the case of L-Leu/L-Val crystallization; this morphology was a result of the formation of a solid solution. In the L-Leu/L-Val solid solution, L-Leu was randomly incorporated into the L-Val crystal lattice. Because the side chain of L-Leu is larger than that of L-Val, L-Val crystal growth was stopped at the point of L-Leu incorporation, disturbing the normal growth of L-Val crystals. Therefore, the L-Leu/L-Val solid solution crystallized as vaguely outlined and fine crystals.

3.4. Estimation of Interaction Energy

L-Leu was incorporated into L-Val crystals, whereas D-Leu was not. We speculate that this difference in incorporation behavior was due to the magnitude of the interaction energy between a molecule of the guest amino acid (L-Leu or D-Leu) and an L-Val crystal. The interaction energy is correlated with the stability of the crystal structure: when the interaction energy is lower, the crystal structure is more stable.

We calculated the interaction energy on the basis of this assumption. The interaction energy is difficult to determine experimentally; we therefore calculated it using a molecular dynamics package (Materials Studio, from Dassault Systemes Biovia K.K.). The L-Val $4 \times 4 \times 2$ crystal structure was drawn and optimized geometrically using the cvff function, which is a generalized valence potential function used to model small organic crystals and gas-phase structures such as amides, carboxylic acids, proteins, and a wide range of organic compounds [12] [13]. A guest amino acid was used to replace one of the existing L-Val (100) surfaces (structure A). The crystal lattice in which the guest compound was removed from structure A was constructed (structure B). The crystal lattice in which all L-Val except the guest compound was removed from structure A was also constructed (structure C). Structures A-C are shown in Figure 5. The interaction energy (E_I) was estimated from Equation (2):

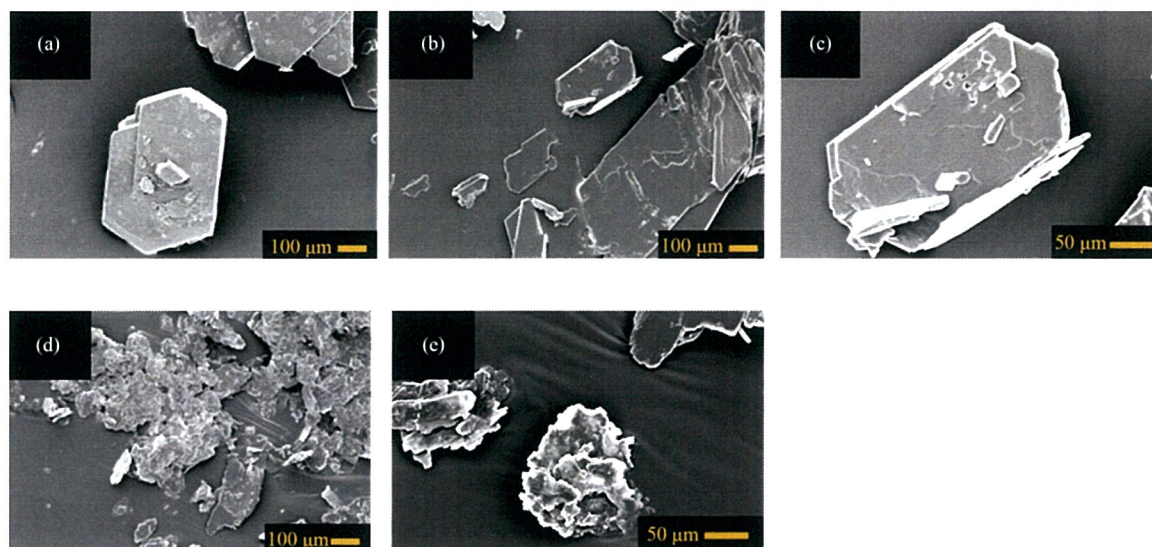


Figure 4. SEM micrographs of crystals: (a) L-Val single crystal (100 \times), (b) D-Leu/L-Val = 0.03/99.97 (100 \times), (c) D-Leu/L-Val = 0.03/99.97 (300 \times), (d) L-Leu/L-Val = 2/98 (100 \times), and (e) L-Leu/L-Val = 2/98 (400 \times), where the molar ratio between L-Val and L-Leu or D-Leu in the crystals is represented as L-Leu/L-Val [mol/mol] and the magnification is denoted in parentheses.

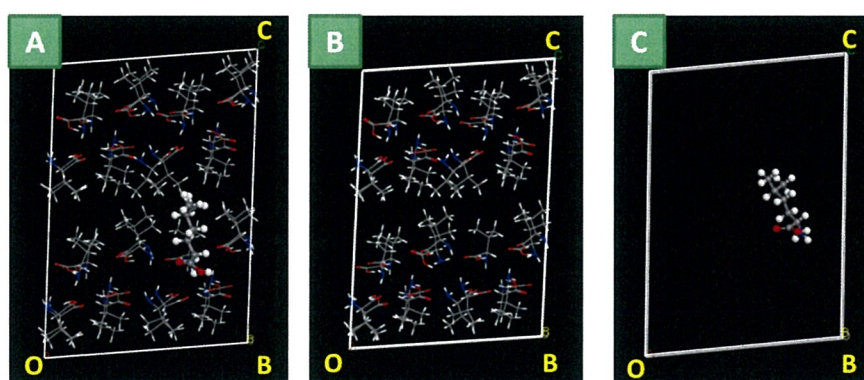


Figure 5. Crystal structure (projection figures from the a -axis). This figure shows the case of D-Leu in an L-Val crystal lattice. L-Val molecules are shown as stick models, D-Leu molecules are shown as ball-and-stick models, and the void represents vacuum. Structure A: L-Val $4 \times 4 \times 2$ crystal lattice in which one of the L-Val molecules in the (100) surface was substituted with D-Leu and the lattice was optimized geometrically using Materials Studio. Structure B: Substituted D-Leu was removed from structure A. Structure C: Only D-Leu remained in structure A.

Table 1. Calculated interaction energies between guest amino acid molecules and an L-Val crystal [kJ/mol].

Guest amino acid	E_A	E_B	E_C	E_I
L-Val	123	128	29	-34
L-Leu	120	136	15	-31
D-Leu	340	143	12	185

“Guest amino acid” means substituted amino acid. Materials Studio was used to estimate the interaction energy (module: forcite, potential function: cvff).

$$E_1 = E_A - (E_B + E_C) \quad (2)$$

where E_A , E_B , and E_C were calculated as the total energy of structure A, structure B, and structure C, respectively.

The estimated interaction energy is shown in Table 1. In the case where L-Val was used as a guest amino acid, E_1 represents the interaction energy between a molecule of L-Val and an L-Val crystal. A comparison of the interaction energies reveals that the energy of D-Leu was remarkably higher than those of L-Leu and L-Val. The interaction energy is correlated with the likelihood of incorporation. In the case of a high interaction energy, the crystal lattice became unstable and difficult to construct; therefore, D-Leu was difficult to be incorporated.

4. Conclusion

A mixture of L-Leu and L-Val crystals was formed as a solid solution randomly constructed by L-Leu and L-Val in the crystal lattice. By contrast, D-Leu was not incorporated into L-Val crystals and did not result in the formation of a solid solution when $x_{D\text{-Leu}}$ was less than 0.12 in the mother liquor because the interaction energy between a D-Leu molecule and the L-Val crystal lattice was remarkably higher than that between an L-Leu molecule and the L-Val crystal lattice.

References

- [1] Kim, H.K., Suzuki, T., Saito, K., Yoshida, H., Kobayashi, H., Kato, H. and Katayama, M. (2012) Effects of Exercise and Amino Acid Supplementation on Body Composition and Physical Function in Community-Dwelling Elderly Japanese Sarcopenic Women: A Randomized Controlled Trial. *Journal of the American Geriatrics Society*, **60**, 16-23. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1532-5415.2011.03776.x>
- [2] Katsanos, C.S., Kobayashi, H., Sheffield-Moore, M., Aarsland, A. and Wolfe, R.R. (2006) A High Proportion of Leucine is Required for Optimal Stimulation of the Rate Of Muscle Protein Synthesis by Essential Amino Acids in the Elderly. *American Journal of Physiology—Endocrinology and Metabolism*, **291**, E381-E387. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpendo.00488.2005>
- [3] Kamei, T., Hasegawa, K., Yokota, M., Doki, N. and Shimizu, K. (2009) AFM Observation of the Blocking of Step Motion Caused by L-Norleucine on (100) and (001) Faces of an L-Isoleucine Crystal. *Journal of Chemical Engineering of Japan*, **42**, 464-470. <http://dx.doi.org/10.1252/jcej.08we311>
- [4] Harding, M.M. and Howieson, R.M. (1976) L-Leucine. *Acta Crystallographica Section B*, **32**, 633-634. <http://dx.doi.org/10.1107/S0567740876012405>
- [5] Torii, K. and Itaka, Y. (1970) The Crystal Structure of L-Valine. *Acta Crystallographica Section B*, **26**, 1317-1326. <http://dx.doi.org/10.1107/S0567740870004065>
- [6] Torii, K. and Itaka, Y. (1971) The Crystal Structure of L-Isoleucine. *Acta Crystallographica Section B*, **27**, 2237-2246. <http://dx.doi.org/10.1107/S0567740871005612>
- [7] Kamei, T., Hasegawa, K., Kashiwagi, T., Suzuki, E., Yokota, M., Doki, N. and Shimizu, K. (2008) Mechanism of Mutual Incorporation of L-Isoleucine and Isomorphous Amino Acids in Batch Crystallization. *Organic Process Research & Development*, **12**, 850-854. <http://dx.doi.org/10.1021/op800093x>
- [8] Kamei, T., Hasegawa, K., Fuke, I., Nagai, H., Yokota, M., Doki, N. and Shimizu, K. (2008) Mechanism of Mutual Incorporation of Branched Chain Amino Acids and Isomorphous Amino Acids in Batch Crystallization. *Journal of Chemical Engineering of Japan*, **41**, 460-469. <http://dx.doi.org/10.1252/jcej.07we284>
- [9] Dalhus, B. and Görbitz, C.H. (1999) Molecular Aggregation in Selected Crystalline 1:1 Complexes of Hydrophobic D- and L-Amino Acids. I. The L-Isoleucine Series. *Acta Crystallographica Section B*, **55**, 424-431. <http://dx.doi.org/10.1107/S0108768198013494>
- [10] Dalhus, B. and Görbitz, C.H. (1999) Molecular Aggregation in Selected Crystalline 1:1 Complexes Of Hydrophobic D- and L-Amino Acids. II. The D-Norleucine Series. *Acta Crystallographica Section C*, **55**, 1105-1112. <http://dx.doi.org/10.1107/S0108270199003649>
- [11] Dalhus, B. and Görbitz, C.H. (1999) Molecular Aggregation in Selected Crystalline 1:1 Complexes of Hydrophobic D- and L-Amino Acids. III. The L-Leucine and L-Valine Series. *Acta Crystallographica Section C*, **55**, 1547-1555. <http://dx.doi.org/10.1107/S0108270199006162>
- [12] Dauber-Osguthorpe, P., Roberts, V.A., Osguthorpe, D.J., Wolff, J., Genest, M. and Hagler, A.T. (1988) Structure and Energetics of Ligand Binding to Proteins: *Escherichia coli* Dihydrofolate Reductase-Trimethoprim, a Drug-Receptor System. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, **4**, 31-47. <http://dx.doi.org/10.1002/prot.340040106>

- [13] Anuar, N., Daud, W.R.W., Roberts, K.J., Kamarudin, S.T. and Tasirin, S.M. (2012) Morphology and Associated Surface Chemistry of L-Isoleucine Crystals Modeled under the Influence of L-Leucine Additive. *Crystal Growth & Design*, **12**, 2195-2203. <http://dx.doi.org/10.1021/cg200266e>



Scientific Research Publishing

Submit or recommend next manuscript to SCIRP and we will provide best service for you:

Accepting pre-submission inquiries through Email, Facebook, LinkedIn, Twitter, etc
A wide selection of journals (inclusive of 9 subjects, more than 200 journals)
Providing a 24-hour high-quality service
User-friendly online submission system
Fair and swift peer-review system
Efficient typesetting and proofreading procedure
Display of the result of downloads and visits, as well as the number of cited articles
Maximum dissemination of your research work

Submit your manuscript at: <http://papersubmission.scirp.org/>