

極性化合物の捕捉に好適な新奇固相抽出剤 に関する研究

2022年1月

三木 雄太

目次

第 1 章 緒論	1
1.1 はじめに.....	1
1.2 固相抽出剤の合成方法.....	6
1.3 固相抽出剤の形状.....	8
1.4 研究の目的.....	11
参考文献.....	13
第 2 章 極性化合物に適用可能な逆相分配系固相抽出剤の開発	17
2.1 緒言.....	17
2.2 実験.....	19
2.2.1 試薬.....	19
2.2.2 装置.....	20
2.2.3 固相抽出剤の合成.....	21
2.2.4 固相抽出特性の評価.....	21
2.3 結果および考察.....	22
2.3.1 DVB と共重合する親水性モノマーの影響.....	22
2.3.2 DVB と親水性モノマーの配合比の影響.....	23
2.3.3 細孔調節剤の影響.....	24
2.3.4 DVB の純度の影響.....	26
2.3.5 市販 HLB 型固相抽出剤との比較.....	27
2.4 結言.....	29
参考文献.....	30
第 3 章 アデニンを修飾した新奇 HILIC 型固相抽出剤の開発	31
3.1 緒言.....	31
3.2 実験.....	33
3.2.1 試薬.....	33
3.2.2 装置.....	33
3.2.3 Adenine 修飾固相抽出剤の調製.....	35
3.2.4 固相抽出特性の評価.....	36
3.3 結果および考察.....	37
3.3.1 Adenine 修飾固相抽出剤へ修飾されたアデニンの導入量の測定.....	37
3.3.2 HILIC 条件下での Adenine 修飾固相抽出剤の固相抽出特性.....	37
3.3.3 逆相分配条件下での Adenine 修飾固相抽出剤の固相抽出特性.....	39

3.3.4 非水条件下での Adenine 修飾固相抽出剤の固相抽出特性	40
3.4 結言	42
参考文献	43

第 4 章 SPG 膜乳化法を用いた懸濁重合法による固相抽出に好適な均一径多孔質ポリマー粒子合成法の確立と合成した固相抽出剤の固相抽出特性評価

4.1 緒言	44
4.2 実験	47
4.2.1 試薬	47
4.2.2 装置	47
4.2.3 多孔質ポリマー粒子の合成：SPG 膜乳化	48
4.2.4 多孔質ポリマー粒子の合成：懸濁重合	49
4.2.5 粒度分布の測定	49
4.2.6 固相抽出特性の評価	50
4.3 結果および考察	51
4.3.1 分散系の安定化	51
4.3.2 膜透過速度と連続相の攪拌速度の影響	53
4.3.3 界面活性剤の種類と濃度の影響	56
4.3.4 連続相に対する分散相の容積比の影響	59
4.3.5 SPG 膜乳化法を用いて合成した多孔質ポリマー粒子の細孔物性と固相抽出特性	60
4.4 結言	63
参考文献	64

第 5 章 市販汎用接着剤を用いて固相抽出剤粒子を成形する技術の開発と成形した吸着媒体の固相抽出特性評価

5.1 緒言	67
5.2 実験	69
5.2.1 試薬	69
5.2.2 装置	69
5.2.3 固相抽出剤粒子の調製	70
5.2.4 M-SPEM の調製	72
5.2.5 細孔物性評価用の M-SPEM の調製	72
5.2.6 固相抽出特性の評価	72
5.3 結果および考察	73
5.3.1 接着剤の構成成分の影響	73
5.3.2 固相抽出剤粒子含有率の影響	75

5.3.3 固相抽出剤粒子の粒子直径の影響.....	79
5.4 結言.....	83
参考文献.....	84
第6章 結論.....	85
謝辞	88
関連論文	89
関連特許	89

第 1 章 緒論

1.1 はじめに

2015 年に開催された国連気候変動枠組条約第 21 回締約国会議（21th Conference of the Parties to the United Nations Convention on Climate Change, COP21）において、気候変動に関連した国際的な枠組みであるパリ協定が採択された。2020 年以降の枠組みであるパリ協定は、その中で第二条として、産業革命以降の世界の平均気温の上昇幅を 2 °C あるいは 1.5 °C 以下に抑制する努力をすること、21 世紀後半に温室効果ガスの排出量と吸収量の均衡を保つこと（カーボンニュートラル）を世界共通の長期目標として定めている。また、パリ協定では 5 年毎での削減目標の提出と更新が要求されている。これを受けて我が国の政府は「パリ協定に基づく成長戦略としての長期戦略¹⁾」を閣議決定し、温室効果ガス排出量の削減について、中期目標として、2030 年度までに 26 %（2013 年度比）、長期目標として 2050 年までに 80 %の削減を目標とした。

同年の 2015 年にアメリカのニューヨークにある国際連合本部で開催された国連持続可能なサミットにおいて、「我々の世界を変革する：持続可能な開発のための 2030 アジェンダ（Transforming Our World: 2030 Agenda for Sustainable Development）」²⁾が採択され、これを実現するための宣言および目標として、17 の目標、169 のターゲットおよび 230 の指標から成る「持続可能な開発目標（Sustainable development goals, SDGs）」が設定された。SDGs はパリ協定のように法的拘束力は有していないが、SDGs という言葉、これが目指すものは一般の人々にも広く周知され始めている。

本研究は、液性試料の高度な精製・濃縮を目的としたものであり、SDGs における 17 の目標のうち、水資源の衛生管理に関連する以下の二つの目標に該当し、これらの推進に資する研究である。

- 目標 3 :あらゆる年齢のすべての人々の健康的な生活を確保し、福祉を促進する。
- 目標 6 :すべての人々の水と衛生の利用可能性と持続可能な管理を確保する
より詳細なターゲットとしては、以下の二つが該当する。
- 目標 3-ターゲット 9 :2030 年までに、有害化学物質、ならびに大気、水質及び土壌の汚染による死亡及び疾病の件数を大幅に減少させる。
- 目標 6-ターゲット 3 :2030 年までに、汚染の減少、投棄廃絶と有害な化学物質や物質の放出の最小化、未処理の排水の割合半減及び再生利用と安全な再利用の世界的規模での大幅な増加させることにより、水質を改善する。

パリ協定や SDGs を実現するために、科学的知見の充実は必要不可欠である。例えば、国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構（New Energy and Industrial

Technology Development Organization, NEDO) に対して 10 年間で 2 兆円もの「グリーンイノベーション基金」³の産業政策など、研究遂行のための取り組みや研究予算についての支援が盛んに計画・施行されている。支援の対象となる研究内容について、一般に直ちに想起される分野は、エネルギーや材料に関するものと考えられる。

これらの研究を推進するためには、大気・水・土壌あるいは材料に含まれる化学物質の量や状態についての詳細な解析および理解が必要である。そのために分析化学は重要な役割を担っている。分析化学とは、自然界のあらゆる物質を対象として、その中に何が、どれくらい、どのような状態で含まれているかを「はかる」技術を確立するだけでなく、化学物質の化学的特性や物理特性への理解を深める学問である。分析化学が探求する、ものはかること、化学物質の特性についての理解は、他化学分野を支える重大な技術および知見であり、カーボンニュートラルや持続可能な社会の実現のために大きく貢献するものと考えられる。

近年の化学分析操作は、ほとんどが手分析から機器分析へ代替されている。手分析とは、人間の手技と五感を用いて行う分析方法である。機器分析とは、簡単にいえばコンセントがついている分析装置を使用する分析方法である。機器分析は、迅速、簡便、高感度、個人間誤差が小さい、省試料、といった利点を有しており、広く普及している。また、質量分析装置等のハード、情報処理技術等のソフトの両面の発達によって、機器分析の検出感度・精度は飛躍的に向上している。機器分析の登場および発達によって、誰もが簡便かつ容易に高感度な分析を行うことが可能になった。

ただし、機器分析が必ずしも手分析に対して優位であるという訳ではない。例えば、測定値の“精度”については手分析のほうが精確な値を得ることができる。市販試薬の調製や標定の方法には JIS K 8001：試薬試験方法通則が適用されており、 0.1 mol L^{-1} 水酸化ナトリウム等のファクター (f) は、機器分析ではなく手分析である滴定によって求められている。

本研究は、機器分析の中の分離分析に該当する。分離分析は、試料採取、測定試料の前処理、測定およびデータ処理の四つの工程で行われる。測定試料中には、測定対象成分の他に複雑かつ多量の夾雑成分が存在していることが多い。夾雑成分は測定（分離や検出）の際に悪影響を及ぼし、測定対象成分の定性・定量分析を妨害する。そのため、旧来は測定試料をていねいに前処理しなければ、高感度・高精度な分析を行うことは不可能であった。しかし、分析装置の発達・高機能化によって、質量分析計など一部の分析装置では、これまでよりも簡素な前処理で分析が可能となっている。しかし、分析装置が高度に発達した現代においても、未だ前処理は重要な役割を担っている。例えば、図 1.1-1 および図 1.1-2 に示す様に、分離分析の各工程における所要時間比率として 61 %、エラー原因比率として 30 %を前処理工程が占めている⁴。なぜ分析操作の中で未だに前処理に種々の問題

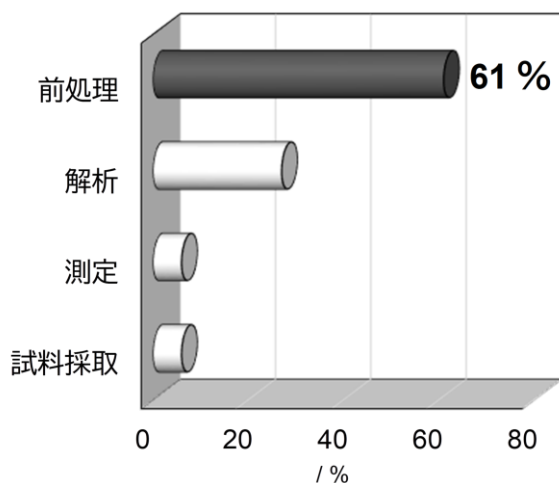


図 1.1-1 分離分析の所要時間における各分析工程の比率

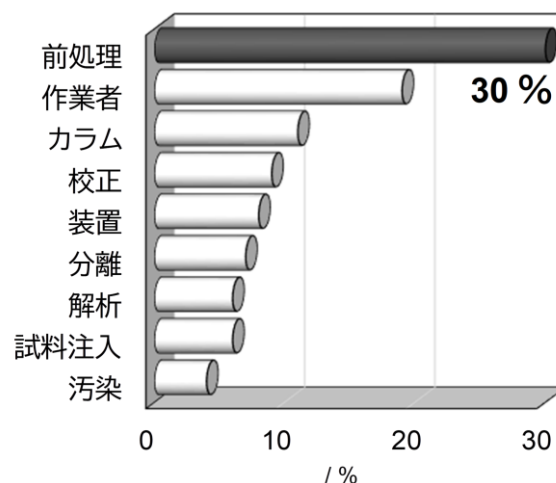


図 1.1-2 分離分析で発生するエラーの原因の比率

を抱えているかについては、分析装置の高機能化が関係している。分析装置の高機能化によって、誰もが簡単に高感度な分析を行えるようになった一方で、機器分析に対してこれまでよりも高度な要求が生じている。例えば、これまで（夾雑成分が過剰等の原因によって）分析が困難とされていた試料の分析や、分析装置の検出下限よりも低濃度の極微量分析等が構想されるようになった。これは現代に限った話ではなく、いつの時代も、その時の分析装置の機能を超える分析手法が望まれてきた。その度にブレークスルーとなってきたのが試料の前処理である。つまり、旧来から「...→分析装置の高機能化→要望の高度化→前処理技術の発達→分析装置の高機能化→...」を繰り返している。このサイクルを繰り返すたびに、高度な前処理が要求されるようになる。すなわち、測定対象成分はより微量化する一方、夾雑成分はますます複雑かつ過剰量に存在する試料を精製しなければならない。そのため、前処理技術と分析装置が発達した現代でも、前処理は機器分析の命運を左右する重要な工程となっている。

前処理では、測定対象成分に対する選択的な捕捉/分離はもちろんのこと、前処理にかかる所要時間を短縮するために操作時間が迅速であること、ヒューマンエラーを抑制するために操作性が簡便であることが要求される。前処理の手法としては、測定試料の溶媒や溶質の特性に合わせて、蒸留法や共沈法、液-液（溶媒）抽出法および固相抽出（solid-phase extraction, SPE）法等が用いられる。種々ある前処理手法の中でも、選択性が高い、操作が簡便・迅速、試薬および溶媒の使用量が少ない、器具や作業環境中からのコンタミネーションが少ない、マニホールド^{5,6}や流れ分析⁷のシーケンシャルインジェクション分析（sequential injection analysis, SIA）装置⁸等との接続が容易といった多くの利点を有する固相抽出法が汎用されている⁹⁻¹¹。

固相抽出法は、1970年代から高速液体クロマトグラフィー（high performance liquid

chromatography, HPLC) の前処理法として検討され、食品¹²、生物学⁵および環境^{11,13,14}等多くの分野で用いられている¹⁵。また、固相抽出法は種々の公定法にも採用されている。JIS K 0102 の工場排水試験方法では、銅、亜鉛、鉛、カドミウム、鉄、ニッケル、コバルトおよびウランの分離濃縮法としてイミノ二酢酸キレート樹脂による固相抽出法が採用され、水道法における水質管理目標設定項目の検査方法では、アシュラムやグリホサート、チオベンカルブ等の農薬に対して固相抽出法が採用されている。環境省が定める環境基準においても固相抽出法が採用されており、チウラム、シマジンおよびチオベンカルブにはスチレン-ジビニルベンゼン共重合体（ポリスチレン系ゲル）、全亜鉛にはイミノ二酢酸キレート樹脂、ノニルフェノール、直鎖アルキルベンゼンスルホン酸およびその塩には化学結合型シリカゲル又はスチレン-ジビニルベンゼン共重合体を用いた固相抽出が行われている。

固相抽出に用いる固相抽出剤（吸着分離剤）の形状は、一般には粒子状である。広範な測定対象成分および試料組成に対応するために、固相抽出に用いられる相互作用（分離モード）や固相抽出剤の素材は多岐にわたる。分離モードについて、固相抽出や HPLC 等における代表的なものとして、順相分配や逆相分配^{16,17}、親水性相互作用クロマトグラフィー（hydrophilic interaction chromatography, HILIC）¹⁸、イオン交換^{19,20}、錯形成²¹⁻²³およびこれらのミックスモード（例えば逆相分配/イオン交換等）^{24,25}が挙げられる。固相抽出において、水溶液試料中の有機化合物の捕捉には逆相分配モードが適用される場合が多い。

逆相という言葉は、クロマトグラフィーの歴史の中で、順相の反対という意味で派生したものである。クロマトグラフィーは、1900 年頃に Tswett がクロロフィル等の植物色素の分離に炭酸カルシウムの粉体を充填したカラムと石油エーテルを用いたのが原点である。Tswett はこの分離を chromatographie と名付けた。ギリシア語で色を意味する chroma と描くを意味する graphien を語源とする。Tswett が発見した分離の機構は物理吸着によるものであるとされ、現在では吸着（順相）クロマトグラフィーと呼ばれている。順相と逆相は、固定相と移動相（固相抽出の場合は固相抽出剤と試料溶液の溶媒）の極性の相対的な関係で以下のように定義される。移動相よりも固定相の方の極性が高いものを順相、反対に固定相よりも移動相の方の極性が高いものを逆相と呼ぶ。1940 年頃に Martin らによって開発された分配クロマトグラフィーにおいて、固定相と移動相の極性の関係が順相と“逆”の分離モードが登場したため、この分離モードは逆相と名付けられた。

逆相分配モードを発現する固相抽出剤の素材として、シリカゲルにオクタデシル基（C18）やオクチル基（C8）を化学結合したシリカ系固相抽出剤や、スチレン-ジビニルベンゼン共重合体等の多孔性の有機ポリマー系固相抽出剤が用いられる⁹。固相抽出剤は各企業から市販されており、その代表例として OASIS[®] HLB (Waters Corporation) が挙げられる。OASIS[®] HLB は、世界で最も汎用される逆相分配モードの固相抽出剤であり、固相抽出剤における

ゴールドスタンダードと称されている^{10,26}。OASIS[®] HLB はジビニルベンゼンと *N*-ビニルピロリドンとの共重合体であり、疎水性モノマーと親水性モノマーとの共重合体は、親水性親油性バランス (hydrophilic-lipophilic balance, HLB) 型の固相抽出剤と呼ばれる^{10,26}。ジビニルベンゼン等の疎水性モノマーに親水性モノマーを配合して共重合することで、合成される固相抽出剤の濡れ性が向上し、極性化合物の液相から固相への物質移動・接近を補助することで、極性化合物に対する捕捉率が向上するとされている^{10,26,27}。

OASIS[®] HLB などの市販固相抽出剤は、多種多様なニーズを満たすために様々な製品が展開され、広範な測定対象成分に対応している。しかしながら、市販固相抽出剤を用いれば直ちに満足のいく精製度を得られるという訳ではない。固相抽出剤固有の能力を有効に活用し、期待する精製度を得るためには、固相抽出剤の合成法や化学構造、細孔物性や官能基等の化学的・物理的物性と捕捉対象成分の固相抽出特性との関係を基に最適抽出条件を設定する必要がある。しかし、固相抽出剤に関する詳細な物性情報は製造企業におけるノウハウとして秘匿されている。そのため、市販固相抽出剤と捕捉対象成分の間の化学的・物理的物性との相関が不明瞭である。測定試料は今後ますます複雑化していくものと考えられ、前処理における特異性/選択性はより重要になる。それにも関わらず、市販固相抽出剤を利用する前処理では、捕捉対象成分を選択的に捕捉するための抽出条件の設定や調節基準が不明確である。そのため、市販の固相抽出剤に依存している限り、前処理における高度な精製は困難になるものと推定される。

以上の理由から、市販固相抽出剤を使用する限り前処理の最適化・高度化を達成するのは困難である。そこで、固相抽出剤の化学的・物理的物性と固相抽出特性との関係を把握・解明するために、物性が明白である固相抽出剤を設計、合成して評価試験を行う基礎研究に着手した。本研究により得られた知見より、実験的に得られた固相抽出特性から固相抽出剤の物性を推定できると共に、捕捉対象成分に好適な固相抽出条件の設定が可能となる。さらに、本研究における知見から固相抽出剤の設計指針を設定可能であり、新奇な固相抽出剤の開発に活用できる。

本研究では、水溶性の極性化合物を固相抽出による捕捉対象成分としており、より具体的な化合物として核酸関連化合物を選定した。核酸関連化合物は、食品や医薬品等の分野で頻繁に研究・分析対象となる化合物であり、これらを効率的に捕捉可能な固相抽出剤は有用であると考えられる。核酸関連化合物の研究例として、DNA 付加体に関する研究が挙げられる。DNA 付加体は正常細胞のがん化の原因になるとされている化合物である。そのため、発がんリスクのバイオマーカーとして期待されており、DNA 付加体を網羅的に分析、評価する手法の開発が望まれている。

本学位論文では、水溶性の極性化合物を高度に捕捉するために研究・開発した逆相分配系²⁸および HILIC 型^{29,30}の固相抽出剤について詳述する。

1.2 固相抽出剤の合成方法

本研究で研究対象としている固相抽出剤は、多孔質のポリマー（マクロポーラスポリマー）粒子である。マクロポーラスポリマーという言葉は、マクロポア (>500 Å) を有するポリマーを指すのではない。マクロポーラスポリマーは、ポリマーサイエンスの分野で用いられる一般名であり、細孔径の大きさによらず、細孔形成剤の存在下で重合された材料を指す³⁰。

固相抽出剤は、一般に懸濁重合法によって合成される。まずは、水と懸濁安定剤から成る連続相（水相）とモノマーおよび細孔調節剤から成る分散相（油相）を攪拌モーターやホモキサー等により機械的に攪拌して水中油滴型エマルションを生成させる。その後、攪拌を継続しながら加熱することで懸濁重合を行い、固相抽出剤が合成される。このとき添加している細孔調節剤や懸濁安定剤の役割について簡単に述べる。

最初に、連続相に添加される懸濁安定剤の役割を述べる。懸濁安定剤は増粘剤とも呼ばれ、連続相の粘度を向上させ、分散相と連続相の粘度の差を調節するために添加される。懸濁安定剤の分子量や濃度（連続相全体での懸濁安定剤の濃度）によって連続相の粘度を調節する。懸濁安定剤を添加することで、エマルション同士が接近してから離れるまでの時間内にエマルション間の連続相が排除されるのを妨げられるため、エマルションの合一を防ぐことができる。ただし、分散相と連続相との粘度の差によって生じる抵抗が剪断力として働くため、粘度の差が大きくなるとエマルションの粒子直径が小さくなる³¹。そのため、添加する懸濁安定剤の分子量と濃度を適切に管理しなければならない。

次に、細孔調節剤の役割について述べる。ポリマー粒子に多孔性を付与するために、モノマー溶液に有機溶媒等を添加した状態で重合を行う。このような溶媒は細孔調節剤やポロゲン、希釈剤と呼ばれるが、本研究では細孔調節剤と呼ぶ。細孔調節剤とは、モノマー溶液に対して不活性かつ相溶性を有するものを指す。実際の多孔質ポリマー粒子における細孔形成の形態は非常に複雑であり、詳細な言及は困難であるが、その過程を簡潔に言えば、モノマーと細孔調節剤が相溶した液滴中で重合が開始され、モノマーがポリマー化する過程でポリマー相（骨格）と細孔調節剤相（細孔、重合後に有機溶媒による洗浄や乾燥により除去される）とに相分離することで細孔が形成される³²。そのため、モノマーと細孔調節剤との相溶性の差によって、重合される粒子の細孔物性は大きく異なる。

モノマーと細孔調節剤の相溶性は、一般に Hildebrand の溶解度パラメーター（solubility parameter, SP）等によって判断される。SP 値は分散力に基づく値であり、 δ (cal cm^{-3})^{1/2} で示される。SP 値の単位は、通常 SI 単位により (J cm^{-3})^{1/2} あるいは (MPa)^{1/2} のように表記されるべきであるが、慣用的に (cal cm^{-3})^{1/2} で表される。SP 値は溶媒の相溶性を示す指標であり、ある二成分を比較したときに、それぞれの SP 値の差が小さいと、二つの成分は混ざりやすいと判断される³¹。SP 値は実験あるいは構造からの推算（原子団寄与法）

によって求められる。近年は、Hildebrand の SP 値に極性や水素結合性の相互作用について追加した Hansen の溶解度パラメーター (Hansen solubility parameter, HSP) が用いられる例を見かけることが増えてきた。これらの値を参考にして、モノマーとの相溶性が高い細孔調節剤を良溶媒、相溶性が低い細孔調節剤を貧溶媒と呼ぶ^{30, 32, 34, 35}。良溶媒と貧溶媒とでは、ポリマー粒子に多孔性をもたらす機構が異なる。良溶媒を用いた合成は ν -induced syneresis, 貧溶媒を用いたものは χ -induced syneresis と呼ばれる。それぞれの機構で得られる多孔質ポリマーの細孔物性の特徴について簡単に述べると、 ν -induced syneresis によって形成される多孔質ポリマー粒子は、細孔径が小さく細孔径分布は狭く整然としている。一方、 χ -induced syneresis によって形成される多孔質ポリマー粒子の細孔物性は、細孔径が大きく細孔径分布は広くなだらかである。

多孔質ポリマー粒子を固相抽出に適用する場合、粒子直径は約 50 μm の粒子が好適とされている。固相抽出では粒子直径について高度な均一性は要求されないが、懸濁重合法によって合成されるポリマー粒子の粒子直径は非常に幅広く、合成したものをそのまま固相抽出に供することはできない。そのため、合成後に粒子直径毎の分級操作が必要となる。一般に、分級操作は乾燥状態のポリマー粒子を篩分けすることで行われる。篩分けによる分級操作は、粒子の飛散等が生じるため操作が非常に煩雑である。また、分級操作では分級精度を確保するために篩分けを繰り返し行う必要がある。そのため、例えば固相抽出剤を工業的に生産する場合などは、分級工程に 1 日以上時間を要する。ラボスケールの合成量 (約 100 g) であっても、分級工程には半日から 1 日の時間を要する。固相抽出剤の調製において工程毎にかかる期間は、概ね重合 (半日), 洗浄 (1 日), 分級 (1 日以上) である。以上のことから、分級工程は固相抽出剤合成における作業効率および調製期間のボトルネックとなっている。さらに、分級によって発生する目的径外粒子は廃棄されるため、粒子の廃棄や合成試薬の過剰消費等により環境への負担が生じてしまう。これらの問題を解決するためには、固相抽出に好適な粒子直径のみを有する多孔質ポリマー粒子を合成する手法が必要である。

1.3 固相抽出剤の形状

固相抽出剤の形状は粒子状が一般的である。ポリマー系固相抽出剤の形状はほとんどが球状であるが、シリカ系固相抽出剤では球状の他にも破砕状が使用されている。固相抽出においては、固相抽出剤粒子をカートリッジに充填したものが市販・汎用されている。粒子を充填するカートリッジの形状にはいくつか種類があり、シリンジバレル型やコマ型の他に 96 (マルチ) ウェルプレート⁶などが例として挙げられる。種々の形状の管体・容器およびマニホールド等の装置との接続によって、省試料・省溶媒化や大容量の試料処理、同時多検体処理および操作性の改善等が可能である^{20,32}。しかし、固相抽出剤粒子は管体に充填しての使用が前提となるため、アプリケーション展開が制限されてしまっている。また、固相抽出剤粒子の管体への充填や廃棄の際の抜き取り時に、粒子の飛散や静電気による吸着が生じるため、固相抽出剤粒子の取り扱い是非常に煩雑である³³。さらに、固相抽出剤粒子を管体に充填したのちも、振動や衝撃を受けることで充填された固相抽出剤粒子間に空隙が生じたり、膨潤・収縮による通液性の低下やチャネリング等が発生したりして固相抽出回収率が低下してしまうことがある³⁴。

上記の問題は固相抽出剤の形状が粒子状であるために生じている。この問題について、非粒子状の固相抽出剤の使用、あるいは何らかの接合材料で固相抽出剤粒子を固定・成形する技術によって解消が図られている。以下に例示する非粒子状の固相抽出剤粒子は、固相抽出剤粒子の問題を解消するためというものではないが、固相抽出剤粒子と同様の用途に使用される他、分離担体や抽出担体として通常の使用では固相抽出剤粒子の適用が困難な用途へ応用されている。

非粒子状固相抽出剤粒子の例として、ポリジメチルシロキサン (polydimethylsiloxane, PDMS) を素材とする材料が挙げられる。PDMS は広範な用途に使用されるシリコンであり、分析化学的な用途として、ガスクロマトグラフィーの固定相や、マイクロ固相抽出 (solid-phase microextraction, SPME) 法³⁵、スターバー抽出 (stir-bar sorptive extraction, SBSE) 法³⁶といった抽出技術における抽出担体、マイクロ流体デバイス^{37,38}の材料等に用いられている。

PDMS 担体の捕捉機構は分配であり、オクタノール/水分配係数 ($P_{O/W}$) との相関性が高い。そのため、オクタノール/水分配係数のオクタノール項は PDMS へ近似することが可能であり、捕捉対象の分配係数から理論回収率を導出できるとされている³⁶。これによると、理論回収率が 50% を上回るのは、捕捉対象となる化合物の $\text{Log } P_{O/W}$ の値がそれぞれ、SBSE 法の場合は 2 以上、SPME 法の場合は 4 以上のときである。本研究で捕捉対象としている核酸関連化合物の $\text{Log } P_{O/W}$ は -2~0 である。そのため、PDMS 担体による前処理は困難であるものと考えられ、捕捉対象ごとの使い分けが必要である。

もう一つの非粒子状固相抽出剤粒子の例として、モノリス³⁹⁻⁴³と呼ばれる多孔質体が挙

げられる。モノリスは骨格と空隙の二相から成る連続多孔質体であり、三次元の連通孔を有している。素材によって、無機系のシリカモノリスと有機系のポリマーモノリスの二つに大別される^{44,45}。シリカモノリス、ポリマーモノリスはどちらもカラムやキャピラリー等の管体内で *in situ* 重合によって調製される。微粒子をキャピラリースケールの細管に充填するためには高度な技術が要求されるが、モノリスはモノマーや細孔調節剤等の反応溶液を細管内で *in situ* 重合可能であるため、粒子の充填よりも容易にキャピラリーカラムを調製できる。また、モノリスの流路（空隙）は、粒子を充填したカラムの流路よりも広く、流動特性に優れており、低圧で溶離液を送液できる。そのため、一般的な HPLC だけでなく、キャピラリーHPLC やキャピラリー電気クロマトグラフィーの固定相に使用され、迅速かつ高度な分離が可能とされている⁴⁴⁻⁴⁸。従って、モノリスはクロマトグラフィーにおけるミニチュアライゼーションに好適な分離担体である。

しかし、機械的強度や細孔の制御については課題があり、モノリス全体の体積が大きなものは調製が困難とされている。また、約 500~800 m² g⁻¹ の比表面積を有する固相抽出剤粒子と比較すると、一般的なモノリスは約 100 m² g⁻¹ とその比表面積は低く、固相抽出剤粒子と比較すると吸着容量や吸着能は低い。そのため、モノリスは分離担体としての利用には優れるものの、抽出担体としての適用するためには課題が多く、より詳細な検討が必要であると考えられる。

一方、接合材料で固相抽出剤粒子を固定・成形する技術も利用されている。粒子成形技術は、ポリテトラフルオロエチレン（PTFE）膜で固相抽出剤粒子を固定したディスク状固相抽出剤⁴⁹⁻⁵¹や、低融点ポリエチレン（PE）粉体と固相抽出剤粒子とを混合後に焼結・成形したモノリス様の多孔質体^{33,52,53}、多孔質性のシリコン母材中に固相抽出剤粒子を内包させた固相抽出媒体⁵⁴等が報告されている。これ以降、接合材料を用いて固相抽出剤粒子をひとまとまりに固定・成形したものを吸着媒体と呼ぶ。

既存の成形技術によって吸着媒体に内包された固相抽出剤粒子は、確かに固相抽出剤粒子の固相抽出特性を発現する。そのため、適切な物性を有する固相抽出剤粒子を選択することで、試料前処理や有害成分の除去等に利用可能である。しかし、既存の成形技術およびその吸着媒体は、粒子含有率や接合材料の素材について課題を抱えている。既存の吸着媒体に含まれる固相抽出剤粒子の含有率は概ね 50%が上限とされており、吸着媒体の比表面積は 100 m² g⁻¹ 程度と低い。もう一方の接合材料の素材について、既存の成形技術では、PE、PTFE およびシリコンが接合材料として使用されている。PE および PTFE は、捕捉対象に対してほとんどあるいは全く吸着能を有していない。シリコンは疎水性を示すが、その吸着能は固相抽出剤粒子が発現する疎水性相互作用よりもはるかに低い。接合材料に吸着能がないということは、吸着媒体の吸着能および吸着容量が、粒子の含有量・含有率に依存することを意味する。しかし、前述したように既存成形技術は粒子の含有率が低い。

そのため、既存の吸着媒体を抽出担体として捉えると、比表面積が低く、十分な吸着能および吸着容量を有していないものと考えられる。従って、既存の吸着媒体について吸着能および吸着容量の低さの改善が喫緊の課題であり、高度な吸着能・吸着容量を有する吸着媒体あるいは成形技術が必要である。

また、既存の吸着媒体の調製方法は、*in situ* であつたり特殊な装置を必要としたりと、成形のための操作が簡便ではない。さらに、吸着媒体の形状は円柱型あるいは膜状のものがほとんどである。成形方法がユニークである、成形可能な形状が限定的であるといった要素は吸着媒体のアプリケーション展開の妨げとなる。そのため、調製の簡便さや形状多様性を兼ね備えた成形技術が要求される。

1.4 研究の目的

以上の背景を踏まえて、固相抽出剤と捕捉対象成分（核酸関連化合物を含む極性化合物）の間の化学的・物理的相関を明らかにすること、固相抽出剤の設計指針を獲得することを目的とした固相抽出剤に関する基礎的な研究に取り組んだ。物性が明白である固相抽出剤を試作・合成し、この固相抽出剤の固相抽出特性を評価することで相関の解明を目指した。また、基礎研究で得られた知見を基に、極性化合物の捕捉に好適な固相抽出剤の開発を目指した。ここで、本研究における極性化合物の定義について、水溶性を示すもの、つまり水溶性の極性化合物であることを改めて強調しておく。また本研究では、固相抽出剤の基礎的な研究だけでなく、基礎研究を加速的に推進させるための均一径固相抽出剤合成法の確立、固相抽出剤の使用用途を拡大するための粒子成形技術の開発を行ったので、これらについても詳述する。

第2章では、逆相分配系の HLB 型固相抽出剤について検討した。細孔調節剤や親水性モノマーの種類および配合比が異なる固相抽出剤を試作し、それぞれの細孔物性および固相抽出特性を評価した。これにより、固相抽出剤の細孔物性や官能基等と固相抽出特性の相関の解明を試みた。この過程で得られた知見を基に、極性化合物を効率的に捕捉可能な HLB 型固相抽出剤を開発した。固相抽出剤の物性と固相抽出特性との関係および本章で開発した固相抽出剤と市販固相抽出剤との固相抽出特性の比較について述べる。

第2章で開発した HLB 型固相抽出剤によって、逆相分配モードでも極性化合物を捕捉可能であることが明らかとなった。しかし、基礎的な研究に基づいて最適化した HLB 型固相抽出剤であっても、特に極性が高いシトシンやウラシル等の効率的な捕捉は困難であった。以上のことから、捕捉に疎水性相互作用を利用する逆相分配モードでは、極性化合物の捕捉について限界があることが明らかとなった。そこで、疎水性相互作用以外の相互作用を利用する捕捉機構として、HILIC モードに注目した。しかし、固相抽出における HILIC モードを想定すると、捕捉機構が水和層への分配を主とするため捕捉の選択性が不十分になることが推測された。そこで、水和層への分配を活用しながら、被検成分の捕捉に二次効果相互作用を積極的に利用する、新奇 HILIC 型固相抽出剤の開発に着手した。

HILIC モードでは、試料溶液の溶媒組成は極性溶媒であり、固相抽出剤と被検成分の間の水素結合が優位に作用する。そのため、捕捉に利用する二次効果相互作用として、水素結合に注目した。本研究の捕捉対象である核酸関連化合物は、核酸塩基対間に水素結合性を有している。そこで、固相抽出剤に核酸塩基を修飾することで、核酸塩基対間の水素結合性を利用した固相抽出特性の発現を期待した。修飾する核酸塩基については、発現する相互作用を考慮して、アデニンを選択した。以上の背景から、第3章にて、核酸塩基であるアデニンを修飾した固相抽出剤を試作し、その固相抽出特性を評価した。メタクリラート系の親水性樹脂に、エポキシ基を介してアデニンを修飾した Adenine 修飾固相抽出剤を

試作した。試作した固相抽出剤を逆相分配，HILIC，非水の 3 通りの条件下での固相抽出に供して，核酸塩基およびヌクレオシドに対する固相抽出特性を評価した結果について詳述する。

固相抽出剤の試作・評価を繰り返す中で，固相抽出剤の合成方法について，改善すべき課題を見出した。一般に，固相抽出剤は懸濁重合法により合成されたのち，篩分けによる粒子径毎の分級工程を経て，固相抽出に好適な粒子直径に収束した粒子のみが固相抽出に用いられる。微細な粒子の篩分けは，粒子の飛散や静電気による吸着が生じるため操作性が非常に煩雑である。さらに，分級精度を確保するためには篩分けを繰り返し行う必要がある。そのため，固相抽出剤を得るまでの作業効率および調製期間の両面において，分級工程が律速工程となっている。そこで，固相抽出剤を均一径で合成できれば，分級操作自体が不要となり，固相抽出剤に関する研究を加速的に推進できると考えた。

第 4 章では，SPG 膜乳化法と懸濁重合法の組み合わせにより，粒子直径約 50 μm の均一径多孔質ポリマー粒子を合成する手法を確立した。合成可能な粒子直径，合成される多孔質ポリマー粒子の細孔物性や合成にかかる時間，操作の簡便さから，均一径粒子合成法として SPG 膜乳化法を選択した。分散条件を実験的に検討し，固相抽出に好適な粒度分布を有する均一径多孔質ポリマー粒子合成法の確立を目指した。合成された多孔質ポリマー粒子について，粒子直径の均一さ，細孔物性および固相抽出特性を評価し，従来の合成方法によって合成した固相抽出剤との比較について述べる。

第 4 章の均一径粒子合成法の確立によって分級操作が不要となり，固相抽出剤を簡便かつ短期間で合成することが可能となった。しかし，1.3 でも述べたように，固相抽出剤が微細な“粒子”であるために生じる取り扱いの煩雑さ，アプリケーション展開の難しさは解消されていない。上記問題は粒子の成形によって解消が図られているが，既存成形技術は吸着能・吸着容量が低い，形状が限定的，成形方法がユニークといった種々の課題を抱えている。そのため，新たに粒子を成形する技術を確立する必要があると考えた。

第 5 章では，接合材料に市販接着剤を用いた固相抽出剤粒子の新奇な成形技術の開発を試みた。本研究では，固相抽出剤粒子の細孔物性や固相抽出特性を極力低減させずに成形することを目的とした。目的達成のためには，わずかな量の接合材料で，固相抽出剤粒子を多量に成形する必要がある，これを実現可能な接合材料として接着剤に注目した。本研究では，10 種類の市販汎用接着剤を用いて，第 2 章で開発した固相抽出剤粒子の成形について検討した。成形された吸着媒体について，細孔物性および極性化合物に対する固相抽出特性を評価することで，成形以前の固相抽出剤粒子との比較について述べる。

第 6 章では，本研究の結果について総括した。

参考文献

1. 外務省, パリ協定に基づく成長戦略としての長期戦略, <https://www.mofa.go.jp/mofaj/files/100039226.pdf>
2. 国連広報センター, 我々の世界を変革する: 持続可能な開発のための 2030 アジェンダ, <https://www.mofa.go.jp/mofaj/files/000101402.pdf>
3. 経済産業省, 2050 年カーボンニュートラルに伴うグリーン成長戦略, <https://www.meti.go.jp/press/2021/06/20210618005/20210618005-3.pdf>
4. R.E. Majors, *LC GC North Am.*, **26** (2008) 1074, The role of polymers in solid-phase extraction and sample preparation
5. A. Medina-Remón, A. Barrionuevo-González, R. Zamora-Ros, C. Andres-Lacueva, R. Estruch, M.Á. Martínez-González, J. Diez-Espino, R.M. Lamuela-Raventos, *Anal. Chim. Acta*, **634** (2009) 54, Rapid Folin-Ciocalteu method using microtiter 96-well plate cartridges for solid phase extraction to assess urinary total phenolic compounds, as a biomarker of total polyphenols intake
6. R.S. Plumb, R.D.M. Gray, C.M. Jones, *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.*, **694** (1997) 123, Use of reduced sorbent bed and disk membrane solid-phase extraction for the analysis of pharmaceutical compounds in biological fluids, with applications in the 96-well format
7. 手嶋 紀雄, 村上 博哉, 酒井 忠雄, 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **69** (2020) 257, 流れ分析法による水質試験方法の開発
8. G. Giakisikli, A. Ayala Quezada, J. Tanaka, A.N. Anthemidis, H. Murakami, N. Teshima, T. Sakai, *Anal. Sci.*, **31** (2015) 383, Automatic on-line solid-phase extraction-electrothermal atomic absorption spectrometry exploiting sequential injection analysis for trace vanadium, cadmium and lead determination in human urine samples
9. A. Andrade-Eiroa, M. Canle, V. Leroy-Cancellieri, V. Cerdà, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, **80** (2016) 641, Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review (Part I)
10. N. Fontanals, R.M. Marcé, F. Borrull, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, **24** (2005) 394, New hydrophilic materials for solid-phase extraction
11. C. Huang, B. Hu, *Spectrochim. Acta B*, **63** (2008) 437, Silica-coated magnetic nanoparticles modified with γ -mercaptopropyltrimethoxysilane for fast and selective solid phase extraction of trace amounts of Cd, Cu, Hg, and Pb in environmental and biological samples prior to their determination by inductively coupled plasma mass spectrometry
12. M.T. Muldoon, L.H. Stanker, *Anal. Chem.*, **69** (1997) 803, Molecularly imprinted solid phase extraction of atrazine from beef liver extracts
13. 古庄 義明, 小野 壮登, 山田 政行, 大橋 和夫, 北出 崇, 栗山 清治, 太田 誠一, 井上 嘉則, 本水 昌二, 分析化学 (*Bunseki Kagaku*) **57** (2008) 969, 無機分析のための固相抽出分離剤とその応用
14. 北見 秀明, 分析化学 (*Bunseki Kagaku*) **60** (2011) 427, カートリッジ型固相抽出法を用いる高速液体クロマトグラフィー/紫外分光光度検出による河川水中のオキシ銅,

チアメトキサム, クロチアニジンの同時定量

15. ジーエルサイエンス固相抽出ガイドブック編集委員会, 固相抽出ガイドブック, まむかいブックスギャラリー, 2012
16. N. Fontanals, R.M. Marcé, M. Galià, *J. Polym. Sci. A*, **42** (2004) 2019, Synthesis of hydrophilic sorbents from N-vinylimidazole/divinylbenzene and the evaluation of their sorption properties in the solid-phase extraction of polar compounds
17. A.W. Trochimeczuk, M. Streat, B.N. Kolarz, *React. Funct. Polym.*, **46** (2001) 259, Highly polar polymeric sorbents: Characterization and sorptive properties towards phenol and its derivatives
18. A.J. Alpert, *J. Chromatogr.*, **499** (1990) 177, hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds
19. J.C. Nadal, K.L. Anderson, S. Dargo, I. Joas, D. Salas, F. Borrull, P.A.G. Cormack, R.M. Marcé, N. Fontanals, *J. Chromatogr. A*, **1626** (2020) 461348, Microporous polymer microspheres with amphoteric character for the solid-phase extraction of acidic and basic analytes
20. V. Camel, *Spectrochim. Acta B*, **58** (2003) 1177, Solid phase extraction of trace elements
21. S. Kagaya, T. Kajiwara, M. Gemmei-Ide, W. Kamichatani, Y. Inoue, *Talanta*, **147** (2016) 342, Chelating resin immobilizing carboxymethylated polyethyleneimine for selective solid-phase extraction of trace elements: Effect of the molecular weight of polyethyleneimine and its carboxymethylation rate
22. 井上 嘉則, 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **64** (2015) 811, アミノカルボン酸を配位子とするキレート樹脂の高機能化設計
23. 大下 浩司, 本水 昌二, 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **57** (2008) 291, キレート樹脂の開発とその分離・濃縮性能
24. N. Fontanals, F. Borrull, R.M. Marcé, *J. Chromatogr. A*, **1609** (2020) 460531, Mixed-mode ion-exchange polymeric sorbents in environmental analysis
25. P. Ivanov Dobrev, M. Kamínek, *J. Chromatogr. A*, **950** (2002) 21, Fast and efficient separation of cytokinins from auxin and abscisic acid and their purification using mixed-mode solid-phase extraction
26. N. Fontanals, R.M. Marcé, Francesc Borrull, *J. Chromatogr. A*, **1152** (2007) 14, New materials in sorptive extraction techniques for polar compounds
27. C.W. Huck, G.K. Bonn, *J. Chromatogr. A*, **885** (2000) 51, Recent developments in polymer-based sorbents for solid-phase extraction
28. H. Murakami, T. Aoyanagi, Y. Miki, H. Tomita, Y. Esaka, Y. Inoue, N. Teshima, *Talanta*, **185** (2018) 427, Effects of hydrophilic monomers on sorptive properties of divinylbenzene-based reversed phase sorbents
29. H. Murakami, M. Omiya, Y. Miki, T. Umemura, Y. Esaka, Y. Inoue, N. Teshima, *Talanta*, **217** (2020) 121052, Evaluation of the adsorption properties of nucleobase-modified sorbents for a solid-phase extraction of water-soluble compounds

30. 三木 雄太, 村上 博哉, 尾宮 美保, 江坂 幸宏, 井上 嘉則, 手嶋紀雄, 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **67** (2018) 445, アデニンを修飾した新奇吸着分離剤の核酸関連化合物に対する固相抽出特性
31. D. W. van Krevelen, Properties of polymers : their correlation with chemical structure, their numerical estimation and prediction from additive group contributions., Elsevier, 1989
32. J. Płotka-Wasyłka, N. Szczepańska, M. de la Guardia, J. Namieśnik, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, **77** (2016) 23, Modern trends in solid phase extraction: New sorbent media
33. S. Kagaya, T. Katoh, M. Saito, M. Ohki, R. Shirota, Y. Saeki, T. Kajiwara, S. Nakada, H. Miyazaki, M. Gemmei-Ide, Y. Inoue, *Talanta*, **188** (2018) 665, A porous sintered material consisting of Presep PolyChelate as a chelating resin and particulate polyethylene as a thermoplastic binder for solid-phase extraction of trace elements
34. A. Namera, T. Saito, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, **45** (2013) 182, Advances in monolithic materials for sample preparation in drug and pharmaceutical analysis
35. C.L. Arthur, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.*, **62** (1990) 2145, Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers
36. E. Baltussen, P. Sandra, F. David, C. Cramers, *J. Microcolumn Sep.*, **11** (1999) 737, Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: theory and principles
37. 森岡 和夫, 中島 秀, 辺見 彰秀, 曾 湖烈, 内山 一美, 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **62** (2013) 65, コンパクトディスク型マイクロチップを用いる LED 誘起蛍光分析システムの開発と酵素免疫測定法への応用
38. K. Morioka, H. Sato, K. Morita, H. Akihida, H. Nakajima, A. Shoji, A. Yanagida, *RSC Adv.*, **10** (2020) 35848, Development of an on-chip sample injection system with a 6-port valve incorporated in a microchip
39. S. Hjertén, L. Jia-Li, Z. Rong, *J. Chromatogr. A*, **473** (1989) 273, High-performance liquid chromatography on continuous polymer beds
40. H. Kobayashi, T. Ikegami, H. Kimura, T. Hara, D. Tokuda, N. Tanaka, *Anal. Sci.*, **22** (2006) 491, Properties of monolithic silica columns for HPLC
41. T. Hara, H. Kobayashi, T. Ikegami, K. Nakanishi, N. Tanaka, *Anal. Chem.*, **78** (2006) 7632, Performance of monolithic silica capillary columns with increased phase ratios and small-sized domains
42. F. Svec, J.M.J. Fréchet, *Anal. Chem.*, **64** (1992) 820, Continuous rods of macroporous polymer as high-performance liquid chromatography separation media
43. S. Xie, F. Svec, J.M.J. Fréchet, *Chem. Mater.*, **10** (1998) 4072, Porous polymer monoliths: Preparation of sorbent materials with high-surface areas and controlled surface chemistry for high-throughput, online, solid-phase extraction of polar organic compounds
44. 梅村 知也, 小島 徳久, 植木 悠二, 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **57** (2008) 517, 有機ポリマーモノリスを用いる高速・高性能分離分析法の開発
45. 宇山 浩, 高分子論文集, **67** (2010) 489, 高分子モノリス—新しい作製技術と用途展開

46. M.R. Gama, F.R.P. Rocha, C.B.G. Bottoli, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, **115** (2019) 39, Monoliths: Synthetic routes, functionalization and innovative analytical applications
47. L. Xu, Z.G. Shi, Y.Q. Feng, *Anal. Bioanal. Chem.*, **399** (2011) 3345, Porous monoliths: Sorbents for miniaturized extraction in biological analysis
48. N. Ishizuka, H. Kobayashi, H. Minakuchi, K. Nakanishi, K. Hirao, K. Hosoya, T. Ikegami, N. Tanaka, *J. Chromatogr. A*, **960** (2002) 85, Monolithic silica columns for high-efficiency separations by high-performance liquid chromatography
49. D.F. Hagen, C.G. Markell, G.A. Schmitt, *Anal. Chim. Acta*, **236** (1990) 157, Membrane approach to solid-phase extractions
50. E.M. Thurman, K. Snavely, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, **19** (2000) 18, Advances in solid-phase extraction disks for environmental chemistry
51. D. Barceló, S. Chiron, S. Lacorte, E. Martinez, J.S. Salau, M. C. Hennion, *Trends Anal. Chem.*, **13** (1994) 352, Solid-phase sample preparation and stability of pesticides in water using Empore disks
52. 加藤 敏文, 井上 嘉則, 上茶谷 若, 齊藤 満, 加賀谷 重浩, 山本 敦, 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **61** (2012) 335, ポリエチレン粉体と焼結した逆相/陰イオン交換複合モード型モノリス様多孔質固相抽出剤
53. 日本フィルコン株式会社, 井上 嘉則, 齊藤 満, 加藤 敏文, 日本特許 JP2010256225A (2009), 固相抽出用焼結型吸着材およびカートリッジ
54. 前田硝子株式会社, 井上 嘉則, 佐藤 奨太郎, 日本特許 JP2018183747A (2018), 固相抽出媒体及びその製造方法, 並びに, 固相抽出カートリッジ

第 2 章 極性化合物に適用可能な逆相分配系固相抽出剤の開発

2.1 緒言

一般に、食品や生体試料および環境試料等を分析対象とする場合、試料中に含まれる複雑かつ過剰量の夾雑成分によって、分離や定量値に多大なる妨害を被る。そのため、微量成分を高精度・高感度に定量分析するためには、測定試料中の測定対象成分の選択的な抽出や測定を妨害する夾雑成分の高度な除去等、測定試料の前処理が重要となる。

前処理の代表的な手法として固相抽出法が挙げられる。固相抽出法は、HPLC や GC をはじめ多くの機器分析法の前処理に利用されている¹。しかし、1.1 でも述べたように、固相抽出剤の物性の詳細については開示がなく、固相抽出における固相抽出剤と被検成分との間の相関が不明瞭である。そのため、市販固相抽出剤では捕捉対象成分に対して最適な固相抽出条件を設定することができず、高度な前処理が困難となっている。この状況を打破するために、固相抽出剤の基礎的な研究によって、固相抽出剤と目的成分との間の化学的・物理的相関を明らかにすることが必要であると考えた。以上の理由から、固相抽出剤を自ら設計・合成して固相抽出特性を評価する基礎研究に着手した。固相抽出剤に関する研究の第一歩として、まずは最も汎用的である逆相分配系の固相抽出剤について検討した。

一般的な逆相分配モードのポリマー系固相抽出剤は、スチレン-ジビニルベンゼン共重合体である。逆相分配モード用のスチレン-ジビニルベンゼン共重合体は、疎水性化合物を強く捕捉可能である一方で、固相抽出剤自体の疎水性の高さから、親水性化合物に対する固相抽出特性は低い。そのため、親水性化合物に対する固相抽出特性の改善を目的として、スチレンやジビニルベンゼン等の疎水性モノマーに親水性モノマーを配合した共重合や、フリーデル・クラフツ反応を利用したスチレン-ジビニルベンゼン共重合体への官能基修飾等が報告されている^{2,3}。前者の共重合体は、親水性親油性バランス (hydrophilic lipophilic balance, HLB) 型の固相抽出剤と呼ばれている。HLB 型固相抽出剤についても市販されており、Waters Corporation の OASIS[®] HLB が汎用されている。

HLB 型固相抽出剤は、親水性モノマーを配合することで疎水性の固相抽出剤に“濡れ性”が付与される。これにより、親水性化合物の固相抽出剤への物質移動が補助されるため、HLB 型固相抽出剤は親水性化合物の捕捉が可能であるとされている^{2,4,5}。このことから、HLB 型固相抽出剤は、本研究の捕捉対象である極性化合物の捕捉にも好適であると考えられる。しかし、配合する親水性モノマーの構造や配合比等が、合成される共重合体の細孔物性や固相抽出特性にどのような影響を及ぼすのかは明らかになっていない。そこで本研究では、配合する親水性モノマーの構造や配合比等が異なる HLB 型固相抽出剤を試作し、

それぞれの固相抽出剤の極性化合物に対する固相抽出特性を評価した。これにより，固相抽出剤の物性と固相抽出特性との関係を明らかにすること，極性化合物の捕捉に好適な逆相分配系固相抽出剤の開発の二つを試みた。

2.2 実験

2.2.1 試薬

モノマーとして用いた純度 80 % のジビニルベンゼン (divinylbenzene, DVB, technical grade, 重合禁止剤として 1000 ppm *p*-tert-butylcatechol 含有) はシグマアルドリッチジャパン合同会社から, 純度 55 % の DVB (異性体混合物, 含量 50~60 %) は富士フィルム和光純薬株式会社から, エチレングリコールジメタクリレート (ethylene glycol dimethacrylate, EGDM, 重合禁止剤として hydroquinone 含有, 純度 >97.0 %), グリセロールジメタクリレート (glycerol dimethacrylate, GDMA, 1,2-, 1,3-体混合物, 重合禁止剤として hydroquinone monomethyl ether (MEHQ) 含有, 純度 >90.0 %) およびトリメチロールプロパントリメタクリレート (trimethylolpropane trimethacrylate, TMPT, 重合禁止剤として MEHQ 含有, 純度 >90.0 %) は東京化成工業株式会社から購入した。それぞれのモノマーの構造式を図 2.2.1-1 に示す。DVB 中に含まれる重合禁止剤 (*p*-tert-butylcatechol) の除去に用いた水酸化ナトリウム (sodium hydroxide, 試薬特級, 純度 >97.0 %), 細孔調節剤としてのトルエン (toluene, TOL, 試薬特級, 純度 >99.5 %), 酢酸ブチル (butyl acetate, BuOAc, 試薬特級, 純度 >99.0 %) および 3-メチル-1-ブタノール (isoamyl alcohol, IAA, 試薬特級, 純度 >98.0 %), 重合開始剤としての 2,2'-アゾビス (イソブチロニトリル) (2,2'-azobis (isobutyronitrile), AIBN, 和光特級, 含量 >98.0 %), 懸濁安定剤としてのメチルセルロース 50 (methyl cellulose, 化学用, 粘度 40~60 mPa·s, メトキシ基 20~33 %) は, 富士フィルム和光純薬株式会社から購入した。固相抽出剤の洗浄に用いたソルミックス AP-7 (エタノール 85.5±1.0 %, イソプロピルアルコール <5.0 %, ノルマルプロピルアルコール 9.6±0.5 %, 水分 <0.2 %) は日本アルコール販売株式会社から, 酢酸エチル (ethyl acetate, 特級, 純度 >99.5 %) およびメタノール (methanol, 高速液体クロマトグラフィー用, 純度 >99.8 %) は関東化学から購入した。固相抽出特性評価において, 被検成分として用いたシチジン (cytidine, C, 純度 >98.0 %), ウラシル (uracil, Ura, 純度 >98.0 %), ウリジン (uridine, U,

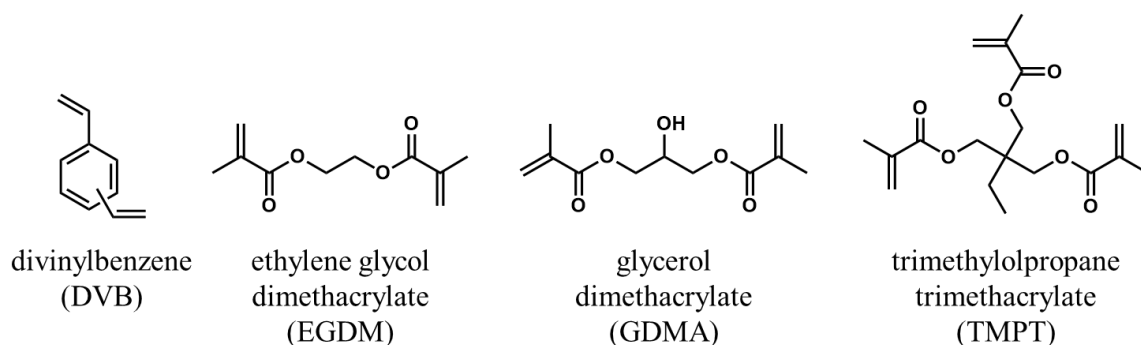


図 2.2.1-1 検討したモノマーの構造式

純度 >98.0 %), アデノシン (adenosine, A, 純度 >99.0 %), 2'-デオキシシチジン (2'-deoxycytidine, dC, 純度 >98.0 %), 2'-デオキシグアノシン水和物 (2'-deoxyguanosine hydrate, dG, 純度 >99.0 %), チミジン (thymidine, dT, 純度 >98.0 %) および 2'-デオキシアデノシン無水和物 (2'-deoxyadenosine anhydrate, dA, 純度 >99.0 %) は東京化成工業株式会社から, シトシン (cytosine, Cyt, 和光一級, 含量 >97.0 %), アデニン (adenine, Ade, 和光一級, 含量 >95.0 %) およびテオフィリン (theophylline, The, 和光一級, 含量 >99.0 %) は富士フィルム和光純薬株式会社からそれぞれ購入した。超純水は PURELAB flex-3 (ヴェオリア・ジェネッツ株式会社 エルガ・ラボウォーター事業部) で精製したものをを用いた。被検成分の構造式を図 2.2.1-2 に示す。

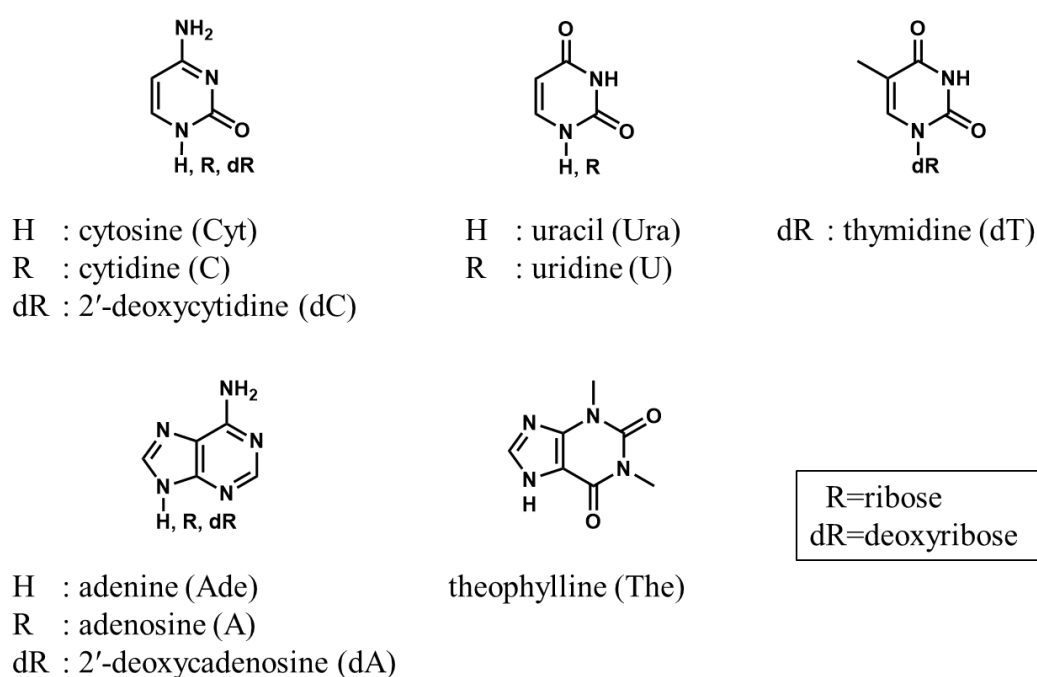


図 2.2.1-2 固相抽出特性評価に使用した被検成分の構造式

2.2.2 装置

固相抽出剤の固相抽出特性評価には、以下の HPLC システムを使用した。PU-2085 ポンプ, DG-2085-53 脱ガス装置, CO-965 カラムオーブン (いずれも日本分光株式会社), SPD-20A 紫外可視検出器 (株式会社島津製作所), CAPCELL PAK C18 AQ HPLC カラム (3 μm , 150 \times 2.0 mm i.d., 株式会社大阪ソーダ) を用いた。5 % (v/v) メタノール水溶液を移動相として、流速 0.2 mL min⁻¹ で送液し、試料注入量は 10 μL , カラム温度は 40 °C, 検出波長は 254 nm とした。固相抽出剤の比表面積を測定するために、TriStar Surface Area and Porosity Analyzer (Micromeritics Instruments Corporation) を用いた。

2.2.3 固相抽出剤の合成

固相抽出剤は、懸濁重合法によって合成した。疎水性モノマーである DVB と親水性モノマーである各メタクリラートをモル比で任意の組成比で混合したモノマー混合溶液に、細孔調節剤として、BuOAc と IAA の混合溶液（重量比で 1：4）あるいはトルエンをモノマー混合溶液の重量と等量あるいは 2 倍量添加した。これらのモノマーと細孔調節剤の混合溶液（分散相）に、分散相の重量の 1%（w/w）の AIBN を添加した。連続相である 0.2%（w/v）メチルセルロース水溶液に分散相を加えたのち、攪拌モーターを用いて 500 rpm で攪拌して水中油滴型（oil in water, O/W）エマルジョンを生成させた。その後、78 °C、250 rpm で 6 時間加熱攪拌することで、DVB/親水性モノマーの共重合体を得た。得られた共重合体は、過剰量の超純水、ソルミックス、メタノールおよび酢酸エチルで洗浄した後、風乾した。乾燥した固相抽出剤は、篩を用いて粒子直径 53~90 μm に分級した。

2.2.4 固相抽出特性の評価

各固相抽出剤（60 mg）を、容量 3 mL のシリンジバレル型エンプティーカートリッジ（Bond Elut® Empty SPE Cartridges, Agilent Technologies Japan）に乾式充填し、評価用の固相抽出カートリッジとした。固相抽出カートリッジにメタノール（3 mL）、超純水（50 mL）の順に通液してコンディショニングした。続いて各 100 mg L⁻¹ 試料水溶液（1.5 mL）を負荷した。その後、溶出液として 50%（v/v）メタノール水溶液（1.5 mL）を用いて固相抽出剤に保持された被検成分を溶出した。固相抽出剤を通過した溶出液を純水で 10 倍希釈したのち HPLC により測定した。被検成分の固相抽出回収率は、標準試料（固相抽出を行っていない固相抽出用の試料溶液）と溶出液とのクロマトグラムのピーク面積を比較することにより算出した。

2.3 結果および考察

2.3.1 DVB と共重合する親水性モノマーの影響

DVB に対して種類が異なるメタクリラートを配合した共重合体を試作し、それぞれの固相抽出特性を評価した。これにより、DVB を母骨格とする固相抽出剤において、配合したメタクリラートが固相抽出特性に及ぼす影響について検討した。

DVB との共重合によって、共重合体に親水性の付与が期待される親水性モノマーとして、図 2.2.1-1 に示した EGDM, GDMA および TMPT の 3 種類のメタクリラートを選定した。純度 55 % の DVB (55 %DVB) と各メタクリラートをそれぞれ 80 : 20 (モル比) で混合し、細孔調節剤として BuOAc と IAA の混合溶液 (BuOAc : IAA = 4 : 1 (w/w)) を、モノマー混合溶液の重量と等量加えて、ジビニルベンゼン-メタクリラート共重合体 (55 %DVB/EGDM, 55 %DVB/GDMA および 55 %DVB/TMPT) を合成した。試作した各共重合体を固相抽出に供して、それぞれの固相抽出特性を評価した。固相抽出により求めた各被検成分の固相抽出回収率を図 2.3.1-1 に示す。図 2.3.1-1 を含めて、これ以降で固相抽出回収率を示すときの被検成分の並びは、左から逆相分配モード HPLC における溶出順に、つまり極性が高い順とする。

いずれの共重合体も A と The を完全に捕捉したが、相対的に極性が高い Ura および U については十分な固相抽出回収率が得られなかった。捕捉の傾向に注目すると、被検成分は極性が低い順に各共重合体に捕捉されており、疎水性相互作用に基づく捕捉が確認された。配合したメタクリラートの違いによる固相抽出特性への顕著な影響は確認されなかったが、

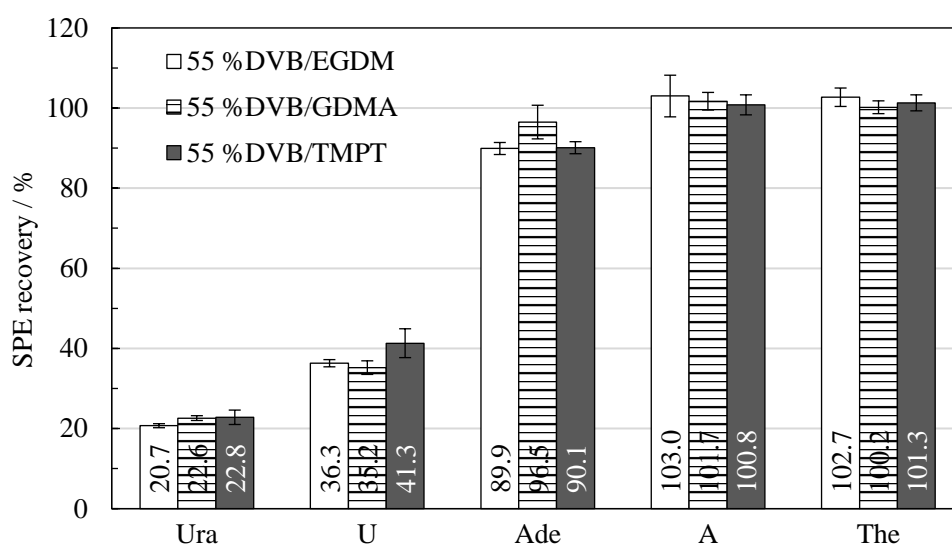


図 2.3.1-1 親水性モノマーの種類が異なる DVB 共重合体における各被検成分の固相抽出回収率

U に対しては 55 %DVB/TMPT が、Ade に対しては 55 %DVB/GDMA が比較的高い回収率を示した。そのため、共重合体の極性化合物に対する捕捉能向上のために適切なメタクリレートとして、GDMA と TMPT を選定し、他条件について検討を進めることとした。

2.3.2 DVB と親水性モノマーの配合比の影響

2.3.1 の検討から、DVB に親水性モノマーであるメタクリレートを配合した共重合体によって、Ade のような極性化合物の捕捉が可能であることが明らかとなった。この結果から、メタクリレートの配合比をさらに増やして、共重合体の濡れ性を向上させれば、極性化合物に対する捕捉率がさらに向上するものと考えた。そこで、55 %DVB/GDMA および 55 %DVB/TMPT について、DVB：メタクリレートの配合比が 80：20，70：30，60：40（モル比）の共重合体をそれぞれ試作して、固相抽出に供した。その結果を図 2.3.2-1 に示す。

55 %DVB/GDMA，55 %DVB/TMPT 共に、当初の予想に反して、DVB とメタクリレートの配合比が 80：20（モル比）の共重合体が最も良好な固相抽出回収率を示した。固相抽出剤の濡れ性が向上することで、極性化合物は固相抽出剤へ物質移動しやすくなるものと考えられる。しかし、メタクリレートの配合比を向上しても、極性化合物に対する固相抽出回収率は向上しなかった。この結果より、逆相分配モードにおける疎水性相互作用の重要性が示唆された。DVB：メタクリレートの配合比が 70：30，60：40 の固相抽出剤では、メタクリレートの配合量が過剰であるために捕捉の主相互作用である疎水性相互作用の発現が阻害されてしまったものと推測された。つまり、メタクリレートの配合による効果はあ

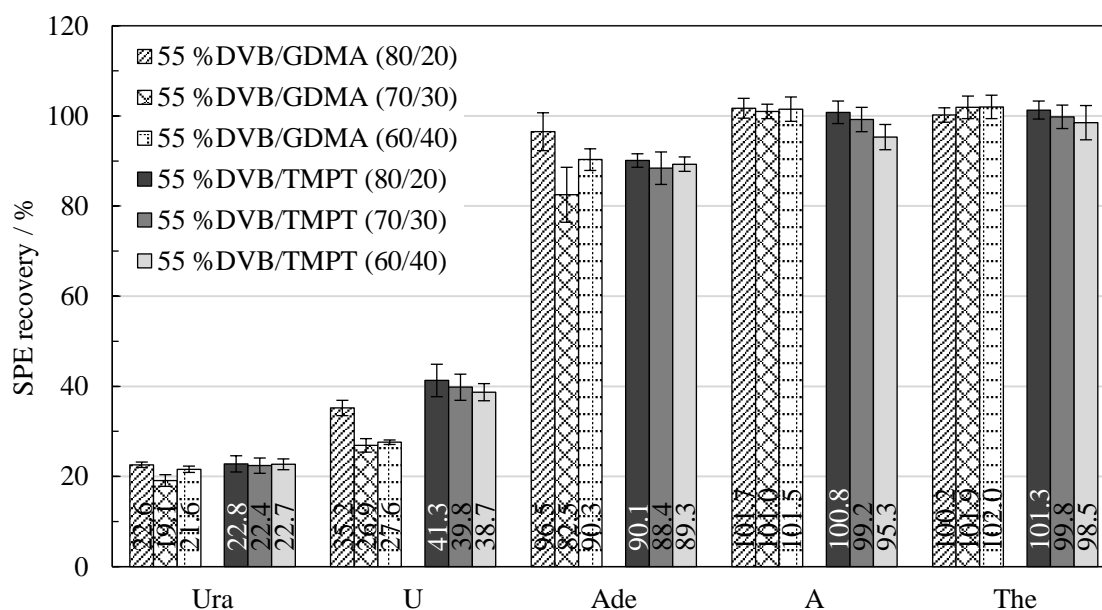


図 2.3.2-1 モノマー配合比が異なる 55 %DVB/GDMA および 55 %DVB/TMPT における各被検成分の固相抽出回収率

くまで物質移動の補助であり、極性化合物に対する固相抽出特性の改善には、固相抽出剤の親水性親油性バランスが重要な要素であることを示す。

DVB/GDMA と DVB/TMPT では、DVB とメタクリラートの配合比を変更したときの固相抽出回収率への影響の程度が異なっていた。DVB/GDMA でモノマー配合比を変化させたときに、U では 8.3 %、Ade では 14 %も固相抽出回収率が変化したのに対して、DVB/TMPT における固相抽出回収率の変化はわずかであった。この原因について、GDMA と TMPT の SP 値から推測を述べる。モノマーの SP 値は、文献値が得られなかったため Van Krevelen & Hoftyzer の原子団寄与法⁶によって推算した。SP 値 (δ (cal cm⁻³)^{1/2}) はそれぞれ DVB (8.4)、GDMA (10.5) および TMPT (9.1) であった。DVB に対する各メタクリラートの SP 値差は、 $|\delta_{\text{DVB-GDMA}}|=2.1$ 、 $|\delta_{\text{DVB-TMPT}}|=0.7$ であり、メタクリラートの DVB に対する相溶性は TMPT よりも GDMA の方が低かった。そのため、DVB/GDMA の方が、モノマー配合比の変更によって生じる固相抽出剤の HLB の変化の度合いが大きく、固相抽出特性にも大きく影響したものと推測される。ただし、55%DVB/GDMA (80:20) と 55%DVB/TMPT (80:20) との間で優位な差は確認されなかった。そのため、モノマーの絞り込みは行わず、以降の検討を進めるために DVB/GDMA および DVB/TMPT のモル比を 80:20 に設定した。

2.3.3 細孔調節剤の影響

固相抽出特性と固相抽出剤の比表面積との間には明確な関係があり、比表面積の向上によって、固相と被検成分とのが作用する機会が向上するため固相抽出剤の吸着能力は改善される^{2,7}。そこで本項では、細孔調節剤の種類と量比および母骨格である DVB の純度について検討を行い、固相抽出剤の比表面積を向上させることで、固相抽出特性の改善を目指した。

2.3.1 および 2.3.2 では、純度 55 %の DVB (55 %DVB) とメタクリラートの混合溶液に対して、細孔調節剤として酢酸ブチルとイソアミルアルコールの混合溶液 (BuOAc : IAA = 4 : 1 [w/w]) を、モノマーの混合溶液の重量と等量添加していた。モノマーと細孔調節剤の溶解度パラメーターはそれぞれ、DVB (8.4)、GDMA (10.5) および TMPT (9.1) と、BuOAc (8.5) および IAA (10.0) である。細孔調節剤である BuOAc および IAA の SP 値は、文献値⁸を引用した。DVB に対して BuOAc が、メタクリラートに対して IAA が良溶媒となるように設計していた。一方、DVB やメタクリラート類を母骨格とする多孔質ポリマー粒子の合成には、良溶媒の細孔調節剤としてトルエン (TOL, $\delta=8.9$)⁸が使用される場合^{3,9-15}が多い。そこで、細孔調節剤による固相抽出特性への影響を調査するために、細孔調節剤の種類を BuOAc/IAA から TOL に変更した固相抽出剤を試作し、固相抽出特性を評価した。その結果を図 2.3.3-1 に示す。

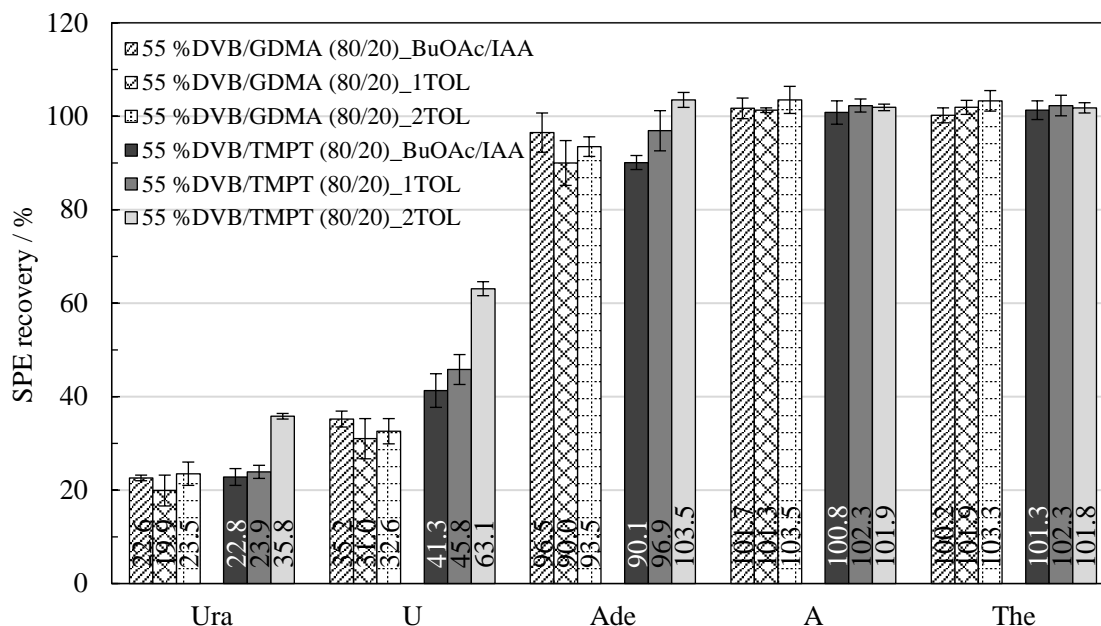


図 2.3.3-1 細孔調節剤の種類および添加量が異なる 55 %DVB/GDMA (80/20) および 55 %_DVB/TMPT (80/20) における各被検成分の固相抽出回収率

細孔調節剤 TOL の添加量が、モノマー混合溶液の重量に対して等量 (1 倍) であるため、この時の細孔調節剤の添加条件を 1TOL と表記した。細孔調節剤を BuOAc/IAA から 1TOL に変更したところ、被検成分全体で、55 %DVB/GDMA_1TOL は固相抽出回収率が低下した一方で、55 %DVB/TMPT_1TOL は固相抽出回収率が向上した。細孔調節剤の種類の変更による固相抽出回収率の変化は、固相抽出剤の比表面積に影響されているものと推測されたため、それぞれの固相抽出剤の比表面積を測定した (表 2.3.3-1)。固相抽出剤の比表面積は、55 %DVB/GDMA_1TOL では低下、55 %DVB/TMPT_1TOL では向上した。以上の結果より、水溶性の極性化合物に対する固相抽出においても、固相抽出剤の比表面積が影響することが明らかとなった。固相抽出剤の比表面積は固相抽出特性だけでなく吸着容量等にも影響する。そのため、相対的に高い比表面積を有する固相抽出剤を調製可能であったトルエンを細孔調節剤として選定した。

表 2.3.3-1 細孔調節剤の種類と添加量が異なる 55 %_DVB/GDMA (80/20) および 55 %_DVB/TMPT (80/20) の比表面積

Inert diluent	BET surface area / m ² g ⁻¹	
	55%DVB/GDMA (80/20)	55%DVB/TMPT (80/20)
BuOAc/IAA	536	625
1TOL	518	670
2TOL	528	728

続いて、細孔調節剤の量比について検討した。モノマーに対する細孔調節剤の量比を増やすことで、比表面積が向上し、細孔径や細孔容積および細孔分布等の細孔物性は変化する⁹⁾。そこで、DVB/TMPT において相対的に高い比表面積が得られたトルエンについて、モノマーの混合溶液の重量の 2 倍量添加した固相抽出剤 (2TOL) を試作し、その固相抽出回収率と比表面積を求めた (図 2.3.3-1 および表 2.3.3-1)。細孔調節剤であるトルエンの量比を増やすことで、55%DVB/GDMA (80/20), 55%DVB/TMPT (80/20) 共に、固相抽出回収率と比表面積の双方が向上した。特に 55%DVB/TMPT (80/20)_1TOL と 55%DVB/TMPT (80/20)_2TOL の間の固相抽出回収率は、Ura において 11.9%, U において 17.3%もの劇的な向上が確認された。比表面積が向上したことで、固相抽出剤と捕捉対象成分との接触効率向上し、疎水性相互作用や $\pi\pi$ スタッキング相互作用がより強く発現したことによって、固相抽出回収率が向上したと考えられる。

以上の結果より、モノマーの重量に対して 2 倍の重量のトルエン (2TOL) を細孔調節剤の最適条件とした。細孔調節剤の量比の更なる向上によって固相抽出剤の比表面積向上が期待されるが、細孔調節剤の量比が高くなるにつれて、固相抽出剤の膨潤度が高くなり、固相抽出時にフリットを押し上げたり、通液性が低下したり等、固相抽出操作における取り扱い性が大幅に低下したため、細孔調節剤の量比はモノマー混合溶液の 2 倍とした。

2.3.4 DVB の純度の影響

これまでの項では、全て純度 55%の DVB (55%DVB) を使用していた。純度に関して、DVB 以外の 45%は、概ねエチルビニルベンゼンが含有されている。エチルビニルベンゼンは、ビニル基を一つしか有しておらず、架橋剤として作用しないため、重合反応進行時に架橋性が妨げられる。そこで、より純度が高い DVB を使用することでより架橋度が高い共重合体が得られれば、共重合体の比表面積が向上し、固相抽出回収率をさらに改善できると期待した。純度が 80%の DVB (80%DVB) を用いて固相抽出剤を試作し、固相抽出回収率および比表面積を求めた。図 2.3.4.1 に示すように、55%DVB から 80%DVB への変更によって、DVB/GDMA, DVB/TMPT 共に固相抽出回収率が向上しており、比表面積についても向上が確認された (表 2.3.4.1)。比表面積は、2.3.3 の細孔調節剤の検討のときよりも劇的に変化しており、55%_DVB/GDMA_2TOL と 80%_DVB/GDMA_2TOL の間で 26.1%, 55%_DVB/TMPT_2TOL と 80%_DVB/TMPT_2TOL の間で 16.6%もの向上が確認された。

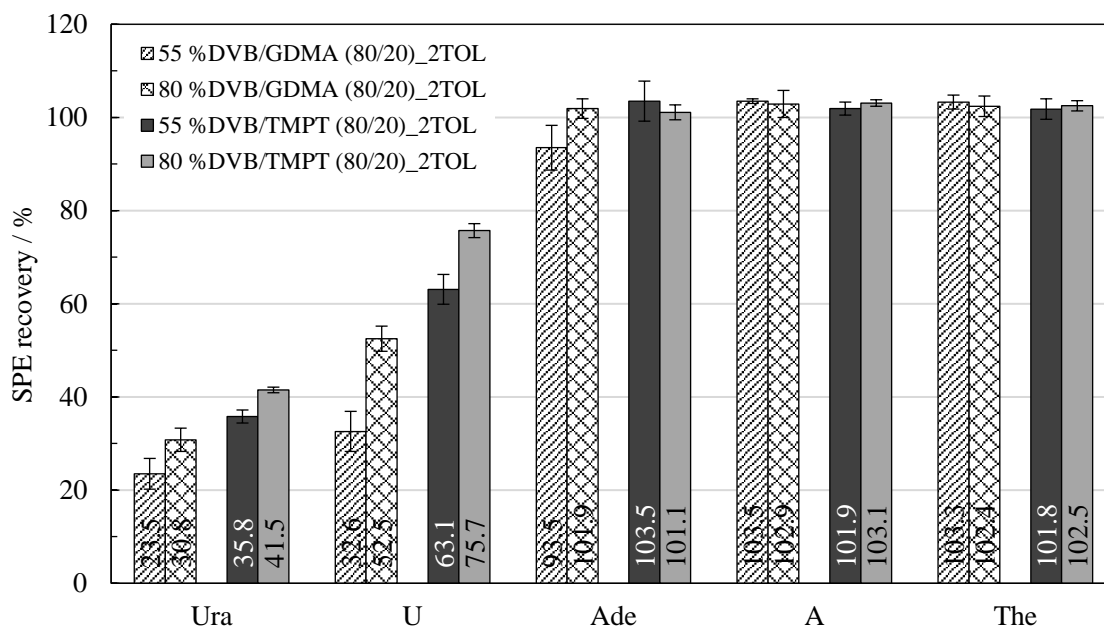


図 2.3.4-1 DVB の純度が異なる DVB/GDMA (80/20)_2TOL および DVB/TMPT (80/20)_2TOL における各被検成分の固相抽出回収率

表 2.3.4-1 DVB の純度が異なる DVB/GDMA (80/20)_2TOL および DVB/TMPT (80/20)_2TOL の比表面積

Sorbent	BET surface area /m ² g ⁻¹
55 %DVB/GDMA (80/20)_2TOL	528
80 %DVB/GDMA (80/20)_2TOL	666
55 %DVB/TMPT (80/20)_2TOL	728
80 %DVB/TMPT (80/20)_2TOL	849

2.3.5 市販 HLB 型固相抽出剤との比較

メタクリラートの種類および DVB/メタクリレート配合比，細孔調節剤の種類および量比，DVB の純度の検討によって，親水性親油性バランス（HLB）と細孔物性が最適化された。そこで，市販 HLB 型固相抽出剤である OASIS® HLB (Waters Corporation) および Supel™ Select HLB (シグマ アルドリッチ ジャパン合同会社) の 2 種類と本研究で開発した固相抽出剤を比較した。

被検成分を 6 種類（Cyt, C, dC, dG, dT および dA）に拡大し，これまでの評価方法と全く同様の条件下で固相抽出に供して，それぞれの固相抽出特性を評価した（図 2.3.5-1）。その結果，80 %_DVB/GDMA (80/20)_2TOL，80 %_DVB/TMPT (80/20)_2TOL および OASIS®

HLB は良好な固相抽出回収率を示した。中でも，Cyt から dC のように特に極性が高い被検成分に対して，本研究で最適化した固相抽出剤は OASIS® HLB よりも高い回収率を示した。以上の結果より，本研究で開発した固相抽出剤は，核酸塩基やヌクレオシド，デオキシヌクレオシド等の極性化合物に対する適用性を有していることが示唆された。

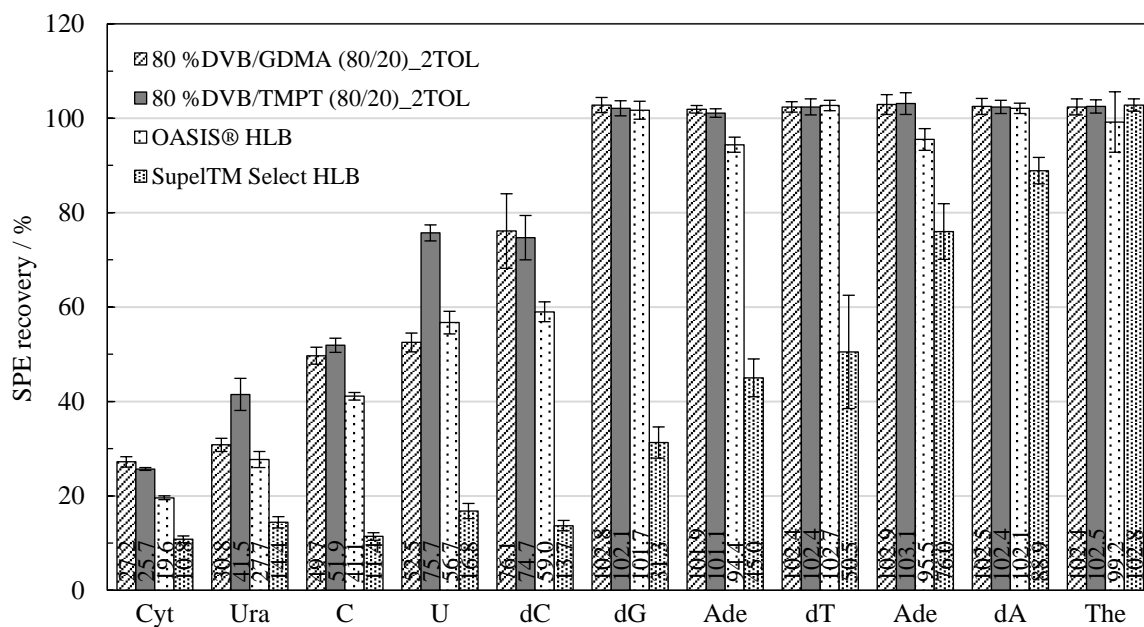


図 2.3.5-1 本研究で開発した固相抽出剤（80 %_DVB/GDMA (80/20)_2TOL , 80 %_DVB/TMPT (80/20)_2TOL）および市販 HLB 型固相抽出剤（OASIS® HLB, Supel™ Select HLB）における各被検成分の固相抽出回収率

2.4 結言

本研究では、固相抽出剤の各種物性が固相抽出特性に及ぼす影響を解明すること、極性化合物を効率的に捕捉可能な逆相分配系固相抽出剤を開発することの二点を目的として、固相抽出剤の試作とその固相抽出特性評価を行った。具体的には、親水性モノマー（メタクリラート）の種類、DVB/メタクリラート配合比、細孔調節剤の種類および量比、DVBの純度が異なる固相抽出剤を試作し、それぞれの固相抽出特性および比表面積を測定・比較した。その結果、極性化合物を捕捉するためには、固相抽出剤のHLBおよび比表面積が重要であることを明らかとした。固相抽出剤の物性と極性化合物に対する固相抽出特性の関係について簡潔にまとめると、メタクリラートの配合により極性化合物に対する固相抽出回収率が向上すること、捕捉に寄与するのはあくまで疎水性相互作用でありメタクリラートの配合による親水性相互作用は補助的であること、固相抽出剤の細孔物性が向上するにつれ固相抽出回収率も向上することの3点が明らかとなった。

これらの知見を基に、極性化合物の捕捉に最適な固相抽出剤を開発した。その組成を以下に示す。純度80%のDVBを用いて、DVB：TMPT=80：20（モル比）のモノマー混合溶液に、細孔調節剤としてモノマー混合溶液の重量の2倍の重量のトルエンを添加した条件で固相抽出剤を調製した。本研究で開発した逆相分配系固相抽出剤 80%DVB/TMPT (80/20)_2TOLは、市販HLB型固相抽出剤であるOASIS® HLBよりも高い固相抽出回収率を示した。

参考文献

1. A. Andrade-Eiroa, M. Canle, V. Leroy-Cancellieri, V. Cerdà, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, **80** (2016) 641, Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review (Part I)
2. N. Fontanals, R.M. Marcé, Francesc Borrull, *J. Chromatogr. A*, **1152** (2007) 14, New materials in sorptive extraction techniques for polar compounds
3. M.J. Bene, D. Horák, F. Svec, *J. Sep. Sci.*, **28** (2005) 1855, methacrylate-based chromatographic media
4. C.W. Huck, G.K. Bonn, *J. Chromatogr. A*, **885** (2000) 51, Recent developments in polymer-based sorbents for solid-phase extraction
5. N. Fontanals, R.M. Marcé, F. Borrull, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, **24** (2005) 394, New hydrophilic materials for solid-phase extraction
6. D.W. van Krevelen, *Properties of polymers : their correlation with chemical structure, their numerical estimation and prediction from additive group contributions.*, Elsevier, 1989
7. N. Fontanals, R.M. Marcé, P.A.G. Cormack, D.C. Sherrington, F. Borrull, *J. Chromatogr. A*, **1191** (2008) 118, Monodisperse, hypercrosslinked polymer microspheres as tailor-made sorbents for highly efficient solid-phase extractions of polar pollutants from water samples
8. J. Brandrup, E.H. Immergut, *Polymer Handbook*. 3rd edition, J. Wiley, 1989
9. Tao Qi, A. Sonoda, Y. Makita, H. Kanoh, K. Ooi, T. Hirotsu, *J. Appl. Polym. Sci.*, **83** (2002) 2374, Porous properties of poly (glycidyl methacrylate-co-trimethylolpropane trimethacrylate) resins synthesized by suspension polymerization
10. D. xia Hao, F. ling Gong, W. Wei, G. hua Hu, G. hui Ma, Z. guo Su, *J. Colloid Interface Sci.*, **323** (2008) 52, Porogen effects in synthesis of uniform micrometer-sized poly (divinylbenzene) microspheres with high surface areas
11. O. Okay, *Prog. Polym. Sci.*, **25** (2000) 711, Macroporous copolymer networks
12. M.T. Gokmen, F.E. Du Prez, *Prog. Polym. Sci.*, **37** (2012) 365, Porous polymer particles - A comprehensive guide to synthesis, characterization, functionalization and applications
13. I. Küçük, A. Kuyulu, O. Okay, *Polym. Bull.*, **35** (1995) 511, Effect of diluents on the porous structure of crosslinked poly(methyl methacrylate) beads
14. D.C. Sherrington, *Chem. Commun.*, (1998) 2275, Preparation, structure and morphology of polymer supports
15. N. Fontanals, R.M. Marcé, M. Galià, F. Borrull, *J. Polym. Sci. Part A*, **41** (2003) 1927, Preparation and characterization of highly polar polymeric sorbents from styrene-divinylbenzene and vinylpyridine-divinylbenzene for the solid-phase extraction of polar organic pollutants

第3章 アデニンを修飾した新奇 HILIC 型固相抽出剤の開発

3.1 緒言

第2章では、ジビニルベンゼンに親水性モノマーとしてグリセロールジメタクリラート (GDMA) やトリメチロールプロパントリメタクリラート (TMPT) を共重合させることで、固相抽出剤に濡れ性を付与し、極性化合物を捕捉可能な逆相分配系の固相抽出剤を開発した。本逆相分配系固相抽出剤は、極性化合物を捕捉可能であったものの、シトシンやウラシルなど特に極性が高い化合物は高回収率で捕捉できなかった。この結果より、疎水性相互作用を捕捉の主相互作用とする逆相分配モードでは、極性化合物に対して捕捉能の劇的な向上は困難であるものと推測された。そのため、水溶性の極性化合物を高度に捕捉するためには、逆相分配モードに代替する捕捉機構を利用した新奇固相抽出剤が必要であると考えられる。

近年、極性化合物の分離に親水性相互作用クロマトグラフィー (hydrophilic interaction chromatography, HILIC) が適用されている¹⁻⁵。HILIC は HPLC で使用される分離モードであり、順相クロマトグラフィーの一種である。移動相にはアセトニトリル等の極性が高い有機溶媒が、固定相には移動相よりも極性が高い分離担体を使用される。2.1 でも述べたように、通常の順相クロマトグラフィーや順相分配系固相抽出では移動相や試料溶液が非極性溶媒であるため、極性化合物を適用できない。しかし、HILIC モードでは、移動相として極性溶媒を使用するため、極性化合物の分離が可能である。HILIC モードの分離機構は、固定相表面に形成された水和層と移動相の間の順相分配であるとされている。固定相表面に水和層を形成させるために、シリカゲルやポリマー等の担体に極性官能基や両性イオン型官能基等が導入される。そのため、実際には移動相-水和層間の分配だけでなく、分離対象成分と固定相の基材や導入した官能基との間での水素結合、静電相互作用および双極子間相互作用等の二次効果相互作用が発現する。HILIC モードでは、それぞれの二次効果相互作用が分離に寄与するため、分離挙動は非常に複雑である。分離の特徴として、HILIC モードでは水溶性が高い溶質ほど固定相に強く保持される。そのため、上述した複雑な分離機構によって前後するものの、溶質の溶出順が逆相分配モードと逆転するとされている。

HILIC モードが有する利点として、エレクトロスプレーイオン化 (electrospray ionization, ESI) 法を用いる質量分析装置との相性の良さも挙げられる。ESI 法では、高度に帯電した液滴 (測定試料) を大気圧中に生成させ、液滴中の溶媒の揮発や電荷の反発による液滴の微細化を経て、大気圧化の気相でイオン化された試料が質量分析計へ導入される。HILIC モードの移動相は極性有機溶媒リッチな組成であり、移動相の揮発性が高く表面張力が低

い。このことから、水系を移動相とする逆相分配モードと比較して、測定試料のイオン化（微細化）が容易となるため、HILIC モードは LC-ESI-MS に広く利用される⁶⁻⁸。

上述した特徴を有する HILIC モードを利用すれば、極性化合物の捕捉に好適な固相抽出剤を開発できるものと推測される。ただし、水和層への分配が主の分離機構とされている HILIC モードの固相抽出への適用を想定すると、捕捉における選択性の乏しさが推測された。そこで本研究では、HILIC モードの固相抽出における捕捉選択性を獲得するために、固定相表面の水和層を形成するための親水性相互作用に注目した。親水性相互作用を強調することで、水和層の形成だけでなく、捕捉対象成分に対して特異的な固相抽出特性が発現することを期待した。

HILIC モードの固相抽出では、試料溶液の組成は有機溶媒が主成分であり、捕捉対象成分の捕捉時に水素結合が優位に働く。そこで、捕捉対象成分である核酸関連化合物に対する強い水素結合性の発現を期待して、核酸塩基対間の水素結合に注目した。核酸塩基の中でもアデニンについては金属に対する特異的な吸着⁹⁻¹¹が知られている。また、アデニンを導入した繊維による金属の選択的除去への利用¹²が報告されている。以上の理由から、本研究では核酸塩基であるアデニンを修飾した固相抽出剤について研究した。HILIC モード発現のために、固相抽出剤の極性が高いことが要求されるため、メタクリレート系の親水性基材樹脂を使用した。親水性基材樹脂にアデニンを修飾した Adenine 修飾固相抽出剤を試作し、その固相抽出特性を評価することで、捕捉機構の解明と核酸関連化合物の捕捉に好適な固相抽出剤の開発を目指した。

3.2 実験

3.2.1 試薬

基材樹脂のモノマーであるエチレングリコールジメタクリラート (ethylene glycol dimethacrylate, EGDM, 重合禁止剤として hydroquinone 含有, 純度 >97.0 %), グリセロールジメタクリラート (glycerol dimethacrylate, GDMA, 1,2-, 1,3-体混合物, 重合禁止剤として hydroquinone monomethyl ether (MEHQ) 含有, 純度 >90.0 %) およびグリシジルメタクリラート (glycidyl methacrylate, GMA, 重合禁止剤として MEHQ 含有, 純度 >95.0 %) は東京化成工業株式会社から購入した。細孔調節剤としての酢酸ブチル (butyl acetate, BuOAc, 試薬特級, 純度 >99.0 %), 重合開始剤としての 2,2'-アゾビス (イソブチロニトリル) (2,2'-azobis (isobutyronitrile), AIBN, 和光特級, 含量 >98.0 %), 懸濁安定剤としてのメチルセルロース 50 (methyl cellulose, 化学用, 粘度 40~60 mPa·s, メトキシ基 20~33 %) は, 富士フィルム和光純薬株式会社から購入した。固相抽出剤の洗浄に用いたソルミックス AP-7 (エタノール 85.5±1.0 %, イソプロピルアルコール <5.0 %, ノルマルプロピルアルコール 9.6±0.5 %, 水分 <0.2 %) は日本アルコール販売株式会社から, 酢酸エチル (ethyl acetate, 特級, 純度 >99.5 %) およびメタノール (methanol, 高速液体クロマトグラフィー用, 純度 >99.8 %) は関東化学から購入した。基材樹脂にアデニンを修飾する反応に使用した 2-プロパノール (2-propanol, 特級, 純度 >99.87%) および塩酸 (hydrochloric acid, 特級, 純度 35.0~37.0 %) は関東化学から購入した。固相抽出特性評価のために使用したアセトニトリル (acetonitrile, for HPLC, for UV, 純度 >99.9 %) はシグマアルドリッチジャパン合同会社から購入した。固相抽出特性評価において, 被検成分として用いたシチジン (cytidine, C, 純度 >98.0 %), ウラシル (uracil, Ura, 純度 >98.0 %), ウリジン (uridine, U, 純度 >98.0 %), アデノシン (adenosine, A, 純度 >99.0 %) は東京化成工業株式会社から, シトシン (cytosine, Cyt, 和光一級, 含量 >97.0 %) およびアデニン (adenine, Ade, 和光一級, 含量 >95.0 %) は富士フィルム和光純薬株式会社からそれぞれ購入した。超純水は PURELAB flex-3 (ヴェオリア・ジェネッツ株式会社 エルガ・ラボウォーター事業部) で精製したものを用了。

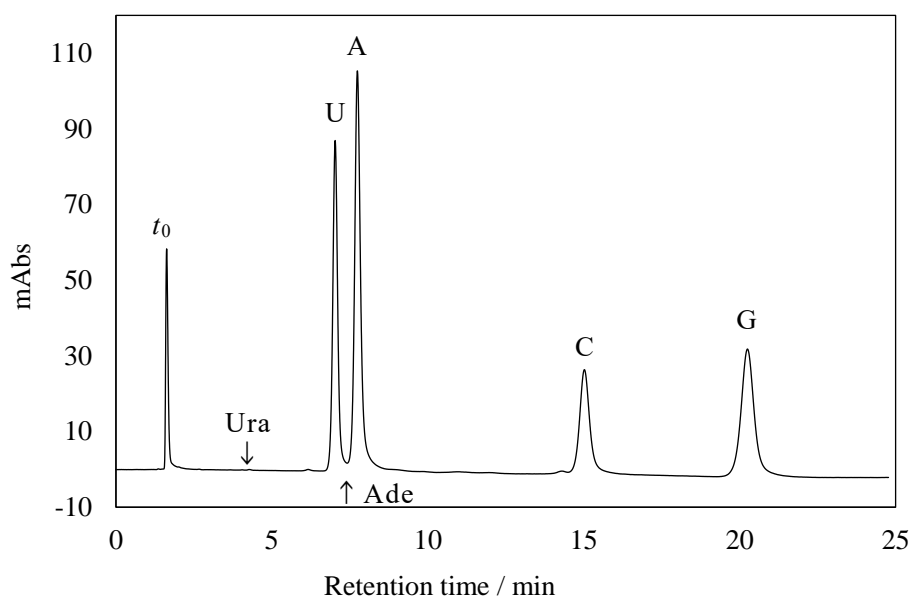
3.2.2 装置

第2章と同様の HPLC システムを用いて固相抽出剤の固相抽出特性を評価した。Ura, U および Ade に対する評価には, HPLC カラムとして CAPCELL PAK C18 AQ (3 μm, 150 × 2.0 mm i.d., 株式会社大阪ソーダ), 移動相として 5 % (v/v) メタノール水溶液を, C, G および A に対する評価には, HPLC カラムとして InertSustain AQ-C18 (3 μm, 150 × 2.1 mm i.d., ジーエルサイエンス株式会社), 移動相として 13 % (v/v) メタノール水溶液を, それ

ぞれ流速 0.2 mL min^{-1} で送液した。試料注入量は $5 \mu\text{L}$ 、カラム温度は室温、検出波長は 254 nm とした。固相抽出特性評価のためではなく、被検成分の物性を確認するために、HILIC モードを発現する HPLC カラムとして TSKgel Amide-80 ($3 \mu\text{m}$, $150 \times 2.1 \text{ mm i.d.}$, 東ソー株式会社) を用いて標準試料を HILIC 条件で分離した。この時のクロマトグラムを図 2.2.2-1 に示す。固相抽出剤の元素分析には、元素分析装置 JM11 (株式会社ジェイ・サイエンス・ラボ) を用いた。元素分析で得られた N 含有率 (%) より、以下の式によって官能基量 (アデニン導入量) を求めた。

$$\text{The content of functional group [mmol g}^{-1}] = \frac{\text{N}\%}{100} \times \frac{1}{M_N} \times \frac{1}{N_n} \times 1000 \quad (1)$$

ここで、N% は元素分析によって測定された窒素含有率、 M_N は N の原子量 (14)、 N_n は官能基 (アデニン) の構造に含まれる N の個数 (5 個) のことを指す。



column: TSKgel Amide-80 ($3 \mu\text{m}$, $150 \times 2.0 \text{ mm I.D.}$), mobile phase: $1 \text{ mmol L}^{-1} \text{ CH}_3\text{COONH}_4$ in water/ CH_3CN (10/90 (v/v)), flow rate: 0.2 mL min^{-1} , temperature: $40 \text{ }^\circ\text{C}$, wavelength: 254 nm , injection volume: $10 \mu\text{L}$

図 3.2.2-1 固相抽出評価に用いた各被検成分の標準試料を HILIC 条件下で分離したときのクロマトグラムと測定条件

3.2.3 Adenine 修飾固相抽出剤の調製

Adenine 修飾固相抽出剤は、以下に示す手順で、エポキシ基を有する親水性基材樹脂に、エポキシ基のクロロヒドリン化を介してアデニンを修飾することで調製した。親水性基材樹脂は、アデニンを修飾させるためのエポキシ基を有する GMA と、架橋性モノマーとして EGDM あるいは GDMA との共重合により調製した。GMA と架橋性モノマーを 80:20 (モル比) で混合したモノマー混合溶液に、細孔調節剤として酢酸ブチルをモノマー混合溶液の重量と等量した。これらのモノマー

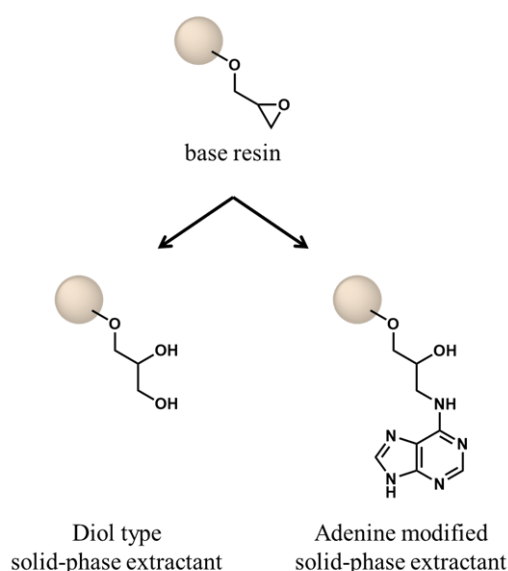


図 3.2.3-1 Diol 型固相抽出剤と Adenine 修飾固相抽出剤の構造式

と細孔調節剤の混合溶液 (分散相) に、分散相の重量の 0.5% (w/w) の AIBN を添加した。0.25% (w/v) メチルセルロース水溶液に分散相を加えたのち、攪拌モーターを用いて 500 rpm で攪拌して O/W エマルジョンを生成させた。その後、78 °C、250 rpm で 6 時間加熱攪拌することで、親水性基材樹脂 GMA/EGDM あるいは GMA/GDMA を得た。得られた共重合体を過剰量の超純水、ソルミックス、メタノールおよび酢酸エチルで洗浄後風乾し、乾燥した親水性基材樹脂は篩を用いて粒子直径 53~90 μm に分級した。

続いて、親水性基材樹脂 (10 g) を 2-プロパノール (45 mL) および 0.1 mol L⁻¹ 塩酸 (200 mL) に分散し、室温で 4 時間反応させてエポキシ基のクロロヒドリン化を行った。クロロヒドリン化した親水性基材樹脂 (5 g) を 2-プロパノール (10 mL) に加えてスラリー状としたのち、15 g L⁻¹ アデニン水溶液 (100 mL) に分散して 60 °C で 5 時間反応させた。反応終了後、超純水を用いてアデニンを修飾した親水性樹脂を洗浄した後、10 mmol L⁻¹ 硫酸に分散して 30 分間超音波洗浄することで、残存するエポキシ基をジオール基に変換した。その後、超純水およびアルコールを用いて樹脂を洗浄することで、Adenine 修飾固相抽出剤として Adenine-EGDM および Adenine-GDMA を得た。

また、比較のためにアデニンを修飾していないジオール型の固相抽出剤も調製した (図 3.2.3-1)。クロロヒドリン化した親水性基材樹脂を 10 mmol L⁻¹ 硫酸に分散し、40 °C で 4 時間反応させることで、エポキシ基をジオール基に変換した Diol 型固相抽出剤 Diol-EGDM および Diol-GDMA を得た。

3.2.4 固相抽出特性の評価

試作した固相抽出剤（50 mg）を，容量 1 mL のシリンジバレル型エンプティーカートリッジに乾式充填し，評価用の固相抽出カートリッジとした。各固相抽出剤は，逆相分配条件と HILIC 条件，非水条件の 3 種類の条件下での固相抽出特性を評価した。それぞれの条件毎での固相抽出操作を表 3.2.4-1 に示す。固相抽出における試料溶液は，Ura，U，Ade および C，G，A の 3 種類ずつの 2 組に分けた。逆相分配条件下の固相抽出では，溶出液（Passed）を捕集し，これを 10 倍希釈したのち逆相分配モード HPLC 測定に供することで固相抽出回収率を求めた。逆相分配モード HPLC おいて，固相抽出に使用した被検成分は，Ura，C，U，G，Ade および A の順に溶出した。一方，HILIC 条件下および非水条件下の固相抽出では，試料負荷通過液（Passed），洗浄液（Washed）および溶出液（Eluted）を捕集し，それぞれを脱溶媒後に超純水で再溶解させたものを測定試料として逆相分配モード HPLC 測定に供し，固相抽出回収率を求めた。被検成分の固相抽出回収率は，標準試料（固相抽出を行っていない固相抽出用の試料溶液）と各測定試料とのクロマトグラムのピーク面積を比較することにより算出した。

表 3.2.4-1 逆相分配条件下，HILIC 条件下および非水条件下における固相抽出操作

SPE condition					
Reversed-phase		HILIC		Non aqueous	
Conditioning					
methanol	3 mL	acetonitrile	10 mL	acetonitrile	10 mL
water	50 mL	water	10 mL	water	10 mL
		95 % acetonitrile	10 mL	acetonitrile	10 mL
Sample loading (Passed)					
each 100 ppm aqueous sample	0.5 mL	each 20 ppm 95% acetonitrile aqueous sample	0.5 mL	each 100 ppm acetonitrile sample	0.5 mL
Washing (Washed)					
—		acetonitrile	1 mL × 2	acetonitrile	1 mL × 2
Eluting (Eluted)					
50 % methanol	0.5 mL	water	0.5 mL	water	0.5 mL

3.3 結果および考察

3.3.1 Adenine 修飾固相抽出剤へ修飾されたアデニンの導入量の測定

アデニンが修飾される親水性基材樹脂には窒素 N が含まれていない。そのため、Adenine 修飾固相抽出剤 (Adenine-EGDM および Adenine-GDMA) を元素分析に供して、その窒素含有率から修飾されたアデニンの導入量を求めた。GMA/EGDM および GMA/GDMA にアデニンを修飾せずにエポキシ基を開環させた Diol 型固相抽出剤 (Diol-EGDM および Diol-GDMA) と Adenine 修飾固相抽出剤の元素分析結果およびこの結果より算出された各固相抽出剤へのアデニン導入量を表 3.3.1-1 に示す。Diol 型固相抽出剤の窒素含有率が 0% であったのに対して、Adenine 修飾固相抽出剤の窒素含有率は、Adenine-EGDM が 2.46%、Adenine-GDMA が 2.28% であった。このことから、アデニンの親水性基材樹脂への修飾を確認した。佐々木ら¹²は、ガンマ線照射とグラフト重合を用いてナイロン繊維にグリシジルメタクリラートを導入し、塩基性条件下でグラフト鎖中のエポキシ基を核酸塩基のアミノ基により開環させることで、核酸塩基を付加している。本研究でも塩基性条件下でエポキシ基を有する親水性樹脂にアデニンを付加しており、上記の報告と同様の修飾が推測される。また、元素分析結果より求められたアデニンの導入量は、基材樹脂ごとにそれぞれ Adenine-EGDM が 0.35 mmol g^{-1} 、Adenine-GDMA が 0.33 mmol g^{-1} であり、基材樹脂による差異は確認されなかった。

表 3.3.1-1 Diol 型固相抽出剤および Adenine 修飾固相抽出剤の元素分析結果および各固相抽出剤へのアデニン導入量

Sorbent	Element content			Functional group content
	H /%	C /%	N /%	/mmol g ⁻¹
Diol-EGDM	7.10	58.78	0.00	0
Adenine-EGDM	6.89	57.22	2.46	0.35
Diol-GDMA	7.04	57.94	0.00	0
Adenine-GDMA	6.89	56.35	2.28	0.33

3.3.2 HILIC 条件下での Adenine 修飾固相抽出剤の固相抽出特性

一般に、HPLC 分離において HILIC モードを発現させるためには、固定相表面に水和層を形成させる必要がある。そのため、移動相にはアセトニトリル等の有機溶媒を 60% 以上含む有機溶媒リッチな水溶液が使用される。本研究の固相抽出における HILIC 条件は、試

料負荷時に水素結合性を強く発現させるために、試料溶液の組成を 95%アセトニトリル水溶液とした。表 3.2.4-1 の HILIC に示す手順で、Diol 型固相抽出剤および Adenine 修飾固相抽出剤を固相抽出に供した。試料負荷 (95%アセトニトリル水溶液, 0.5 mL), 洗浄 (アセトニトリル, 1 mL×2) および溶出 (超純水, 0.5 mL) の固相抽出剤通過液をそれぞれ Passed, Washed および Eluted として回収し、それぞれの溶液に含まれる被検成分の割合を固相抽出回収率として求めた。Diol 型固相抽出剤および Adenine 修飾固相抽出剤の各被検成分に対する固相抽出回収率について、基材樹脂として EGDM/GMA を用いた結果を図 3.3.2-1 に、GDMA/GMA を用いた結果を図 3.3.2-2 に示す。Passed は、試料負荷時に固相抽出剤に捕捉されなかった比率, Washed は、洗浄液 (アセトニトリル, 2 mL) により固相抽出剤から洗浄された比率, Eluted は、固相抽出剤に捕捉されたのち溶出液中に回収された比率を示す。固相抽出回収率を示す各図表において、被検成分の並びは、図 3.2.2-1 に示した市販 HILIC モード HPLC カラム (TSKgel Amide-80 (3 μm, 150×2.0 mm I.D.), 東ソー) で分離したときの溶出順 (Ura, U, Ade, A, C および G) とした。一方、逆相分配モード HPLC で分離したときの溶出順は Ura, C, U, G, Ade および A であった。HILIC モード HPLC と逆相分配モード HPLC におけるそれぞれの溶出順を比較すると、逆相分配モードでは早々に溶出される C が、HILIC モードでは強く保持されていた。C については、第 2 章の逆相分配系固相抽出剤では高度な捕捉が困難であった。そのため、本研究の HILIC 型固相抽出剤による C の効率的な捕捉が期待された。

市販 HPLC カラムには、ジヒドロキシプロピル基を有するジオール型の HILIC モード HPLC カラムもラインナップされている。本研究の Diol 型固相抽出剤も同様の官能基を有しており、HILIC モードの分離における保持と類似した傾向の捕捉が期待された。しかし、

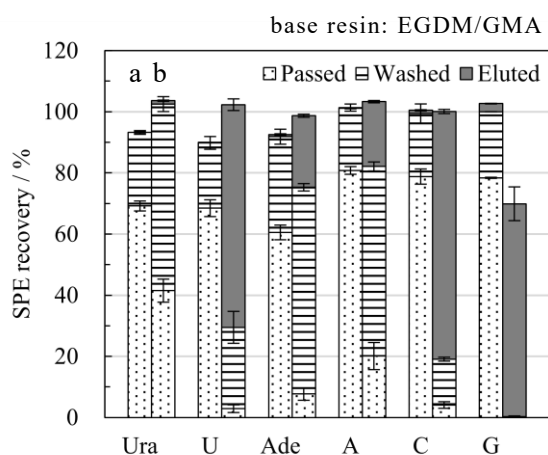


図 3.3.2-1 Diol-EGDM(a) および Adenine-EGDM (b) の HILIC 条件下における各被検成分の固相抽出回収率 (n=2)

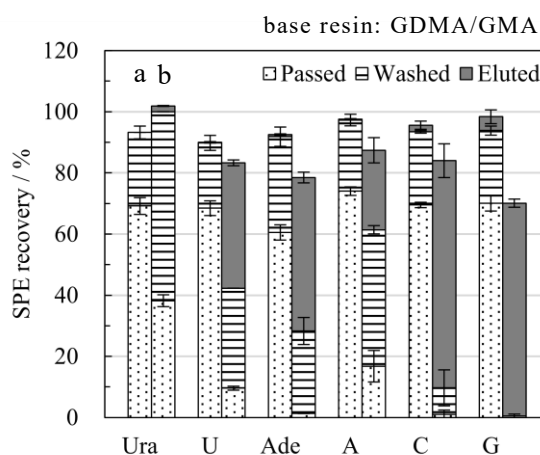


図 3.3.2-2 Diol-GDMA (a) および Adenine-GDMA (b) の HILIC 条件下における各被検成分の固相抽出回収率 (n=2)

負荷した被検成分のうち 60~80 %は Diol 型固相抽出剤に捕捉されることなく通過し、わずかに捕捉された残りの 20~40 %の被検成分についても、洗浄工程ですべて Diol 型固相抽出剤から脱離した。以上の結果より、Diol 型固相抽出剤は、HILIC 条件下の固相抽出において、核酸関連化合物を捕捉しないことが明らかとなった。一方、Adenine 修飾固相抽出剤では、Diol 型固相抽出剤と比較して、Passed と Washed の合算値が減少し、Eluted が向上しており固相抽出回収率が向上した。Adenine-EGDM, Adenine-GDMA 共に、HILIC モード HPLC において保持時間が長かった C および G を概ね捕捉した。また、Adenine-EGDM では G, Adenine-GDMA では U, Ade, A, C および G の固相抽出回収率の合算値が 70~90 % と完全に回収できず、溶出工程終了後も被検成分が Adenine 修飾固相抽出剤に残存した。この結果は、Adenine 修飾固相抽出剤が一部の核酸関連化合物に対して特異的な固相抽出特性を有することを示唆するものであり、その特異性は核酸塩基間の水素結合性によるものと推測された。その一方で、Ade および A の固相抽出回収率はそれほど高くなかったため、プリン間同士の構造類似性に基づく相互作用は、捕捉には大きく寄与しないものと判断した。

3.3.3 逆相分配条件下での Adenine 修飾固相抽出剤の固相抽出特性

前項では、Adenine 修飾固相抽出剤は HILIC 条件下で一部の核酸関連化合物を捕捉可能であることが明らかとなった。しかし、その固相抽出特性は HILIC モード HPLC で分離したときの溶出順とは一致していなかった。そのため、Adenine 修飾固相抽出剤は水和層への分配が被検成分の捕捉に寄与しているとは断言できなかった。つまり、Adenine 固相抽出の捕捉機構は、固相抽出剤に修飾したアデニンと被検成分との相互作用にのみ依存したものである可能性が考えられた。そこで、Adenine 修飾固相抽出剤の逆相分配条件下での固相抽出特性を評価することで、HILIC 条件下での固相抽出で発現した相互作用について考察した。

被検成分として、ヌクレオシドの U, A, C および G を選択した。逆相分配条件下での固相抽出では、水素結合を明確に切断するためにアセトニトリルではなくメタノールを選

表 3.3.3-1 Adenine 修飾固相抽出剤の逆相分配条件下と HILIC 条件下における各被検成分の固相抽出回収率

Sorbent	SPE condition	SPE recovery / %			
		U	A	C	G
Adenine-EGDM	Reversed-phase	22.4	45.2	22.9	57.4
	HILIC ^a	72.8	21.2	81.0	69.6
Adenine-GDMA	Reversed-phase	21.3	30.1	21.7	36.2
	HILIC ^a	41.0	26.0	74.3	69.6

a 図 2.3.2-1 および 2.3.2-2 と同様の値

扱った。Adenine 修飾固相抽出剤の HILIC 条件下における固相抽出特性を踏まえて考察する。Adenine 修飾固相抽出剤の HILIC 条件下での被検成分の捕捉が主に順相分配によるものであった場合、逆相分配条件下では C および G の特異吸着は確認されないものと考えられる。一方、HILIC 条件下における被検成分の捕捉が主に水素結合性によるものであった場合、逆相分配条件下では試料組成が 100 % の水であり捕捉のときに水素結合性が機能しないため、被検成分はほとんど捕捉されなくなると推測した。

Adenine 修飾固相抽出剤の逆相分配条件下での固相抽出回収率を表 3.3.3-1 に示す。被検成分は HILIC モード HPLC における溶出順に並べた。逆相分配条件下では全ての被検成分が Adenine 修飾固相抽出剤に残存することなく回収された。C および G は一定の捕捉が確認されたものの特異吸着は生じていなかった。また、逆相分配条件下における固相抽出回収率は HILIC 条件に対して低減した。以上の結果と前述の考察より、Adenine 修飾固相抽出剤の HILIC 条件下での捕捉機構には、順相分配と水素結合性のどちらも寄与しているものと推測された。

3.3.4 非水条件下での Adenine 修飾固相抽出剤の固相抽出特性

Adenine 修飾固相抽出剤における核酸関連化合物の捕捉に水素結合が寄与しているとすると、試料溶液に含まれる水は阻害剤として働くものと推定された。そこで、試料負荷時の条件を非水条件とすることで、固相抽出回収率の向上を期待した。表 3.2.4-1 の Non aqueous に示すように、HILIC 条件下の固相抽出操作の内、コンディショニングの最後の負荷溶液および試料溶液の組成を 95 %アセトニトリル水溶液から 100 %アセトニトリルに変更することで、Adenine 修飾固相抽出剤を非水条件下における固相抽出に供した。HILIC 条

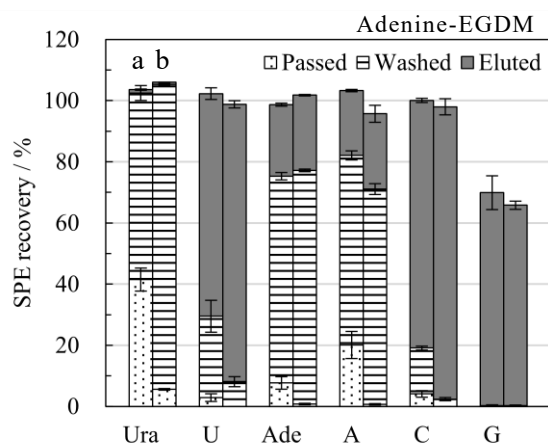


図 3.3.4-1 Adenine-EGDM の HILIC 条件下 (a) および非水条件下 (b) における各被検成分の固相抽出回収率

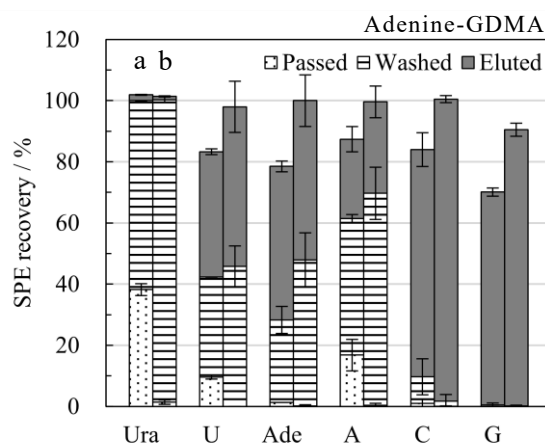


図 3.3.4-2 Adenine-GDMA の HILIC 条件下 (a) および非水条件下 (b) における各被検成分の固相抽出回収率

件下と非水条件下における Adenine 修飾固相抽出剤の固相抽出回収率を比較したものを、固相抽出剤毎にそれぞれ図 3.3.4-1 (Adenine-EGDM) および図 3.3.4-2 (Adenine-GDMA) に示す。非水条件とすることで、全ての被検成分について Passed が減少しており、試料負荷時の捕捉率が向上した。また、G 以外の被検成分において、Passed, Washed および Eluted の合算値が概ね 100 %となり、被検成分の Adenine 修飾固相抽出剤への固相抽出後の残存が解消された。さらに、U, C および G において Eluted の向上が確認された。中でも RNA においてアデニンと核酸塩基対を形成する U については、Adenine-EGDM において劇的な改善が見られた。この結果は、核酸関連化合物の捕捉における水素結合性の作用を示唆するものである。

固相抽出の条件を HILIC 条件から非水条件へ変更しても、各被検成分に対する捕捉の傾向には変化がなかった。このことから、非水条件下においても HILIC モードは発現しているものと推測された。非水条件の固相抽出では、コンディショニング時に水を負荷する工程がある。この時の水が順相分配のための水和層形成に寄与していたため、固相抽出特性について、非水条件下でも HILIC 条件下と変わらぬ傾向を示したものと考えられる。一方、Adenine-EGDM と Adenine-GDMA の間に生じた固相抽出回収率の差については、Adenine-GDMA のヒドロキシ基に水和した水が水素結合性を低下させ、捕捉を阻害することで差が生じたものと推定した。

3.4 結言

核酸関連化合物の選択的な捕捉を目的として、核酸塩基であるアデニンを親水性基材樹脂に修飾した Adenine 修飾固相抽出剤を開発した。Adenine 修飾固相抽出剤を逆相分配条件、HILIC 条件および非水条件の 3 種類の条件下で固相抽出に供し、核酸塩基およびヌクレオシドに対する固相抽出特性を評価した。その結果、Adenine 修飾固相抽出剤は、水和層への分配と基材樹脂に修飾したアデニンに由来する水素結合性に基づく捕捉が可能であることが明らかとなった。その一方で、アデニンが修飾される基材樹脂の架橋性モノマーの違いによって、Adenine 修飾固相抽出剤の固相抽出特性が異なっていた。このことから、固相抽出剤表面の水和層の形成および水素結合性に、基材樹脂の官能基も影響することが明らかとなった。また、Adenine 修飾固相抽出剤は、HILIC 条件下のときよりも非水条件下の方が、固相抽出回収率が向上した。この結果より、被検成分の捕捉に水素結合性が優位に働いているものと考えられる。Adenine-EGDM は、非水条件下において、逆相分配系固相抽出剤では効率的な捕捉が困難であったウリジン、シチジンおよびグアノシンに対して特異的な捕捉を示すことを見出した。

参考文献

1. A.J. Alpert, *J. Chromatogr.*, **499** (1990) 177, hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds
2. T. Ikegami, K. Tomomatsu, H. Takubo, K. Horie, N. Tanaka, *J. Chromatogr. A*, **1184** (2008) 474, Separation efficiencies in hydrophilic interaction chromatography
3. T. Zhang, D.J. Creek, M. P. Barrett, G. Blackburn, D.G. Watson, *Anal. Chem.*, **84** (2012) 1994, Evaluation of coupling reversed phase, aqueous normal phase, and hydrophilic interaction liquid chromatography with orbitrap mass spectrometry for metabolomic studies of human urine
4. L. Qiao, X. Shi, G. Xu, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, **81** (2016) 23, Recent advances in development and characterization of stationary phases for hydrophilic interaction chromatography
5. 出口 喜三郎, *Chromatography*, **29** (2008) 17, 糖鎖, ペプチドの HILIC 分離分析
6. H. Murakami, R. Horiba, T. Iwata, Y. Miki, B. Uno, T. Sakai, K. Kaneko, Y. Ishihama, N. Teshima, Y. Esaka, *Talanta*, **177** (2018) 12, Progress in a selective method for the determination of the acetaldehyde-derived DNA adducts by using HILIC-ESI-MS/MS
7. A. Periat, I. Kohler, A. Bugey, S. Bieri, F. Versace, C. Staub, D. Guillarme, *J. Chromatogr. A*, **1356** (2014) 211, Hydrophilic interaction chromatography versus reversed phase liquid chromatography coupled to mass spectrometry: Effect of electrospray ionization source geometry on sensitivity
8. A. Periat, I. Kohler, A. Thomas, R. Nicoli, J. Boccard, J.L. Veuthey, J. Schappler, D. Guillarme, *J. Chromatogr. A*, **1439** (2016) Systematic evaluation of matrix effects in hydrophilic interaction chromatography versus reversed phase liquid chromatography coupled to mass spectrometry
9. S. Verma, A. K. Mishra, J. Kumar, *Acc. Chem. Res.*, **43** (2010) 79, The many facets of adenine: coordination, crystal patterns, and catalysis
10. J. Álvarez-Malmagro, F. Prieto, M. Rueda, A. Rodes, *Electrochim. Acta*, **140** (2014) 476, In situ fourier transform infrared reflection absorption spectroscopy study of adenine adsorption on gold electrodes in basic media
11. R.B. Martin, *Acc. Chem. Res.*, **18** (1985) Nucleoside sites for transition metal ion binding
12. 佐々木 貴明, 藤原 邦夫, 須郷 高信, 河合 (野間) 繁子, 梅野 太輔, 斎藤 恭一, 日本海水学会誌, **69** (2015) 98, ルテニウムを水中から除去するための核酸塩基固定繊維の作製

第4章 SPG 膜乳化法を用いた懸濁重合法による固相抽出に好適な均一径多孔質ポリマー粒子合成法の確立と合成した固相抽出剤の固相抽出特性評価

4.1 緒言

固相抽出 (solid-phase extraction, SPE) に用いられるポリマー系固相抽出剤は、一般に、機械分散を用いる懸濁重合法 (機械分散法) により合成される¹⁻³。機械分散法とは、攪拌モーターやホモミキサー等の攪拌機を用いて攪拌羽根の剪断力によって油相 (分散相) を水相 (連続相) に分散した水中油滴 (oil in water, O/W) 型エマルジョンを生成する方法である。機械分散法は、合成されるポリマー粒子の粒度分布が非常に幅広くなるが⁴、低コストで操作が簡便かつ一度に多量のポリマー粒子が得られるため工業的に広く用いられている。

固相抽出用の吸着分離剤 (固相抽出剤) では、粒子直径に高度な均一性・単分散性は要求されないが、約 30~70 μm ⁵あるいは 40~60 μm ⁶の粒子直径が好適とされている。そのため、機械分散法によって多孔質ポリマー粒子を合成した場合、固相抽出に適した粒子直径となるように、合成後に粒子直径毎の分級操作が必要となる^{7,8}。粒子直径毎の分級は、一般に、粒子が乾燥した状態での篩分け操作により行われる。篩分けの他の分級操作として、粒子の沈降速度の差を利用した水簸や風簸等による分級が挙げられる。これらの分級手法は簡便かつ精度よく粒子を粒子直径毎に分級可能であるが、装置が非常に高価であるため、ラボスケールでの使用は難しい。篩分け操作は簡便であるが、粒子の飛散や篩への粒子の目詰まりの解消等によって分級にかかる操作は非常に煩雑となる。さらに、分級の精度を確保するためには篩分けを繰り返し行う必要がある。そのため分級操作は一日以上の時間を要する。以上のことから、固相抽出剤粒子を得るまでの作業効率および調製期間の両面において、分級操作は律速工程となっている。また、目的径に収束していない粒子直径の粒子は廃棄される。そのため、目的径外粒子の廃棄や合成試薬の過剰消費等による環境への負担も問題となる。

分級工程が存在することで発生する上記問題の解決策として、粒度分布が均一で整然とした、均一径多孔質ポリマー粒子の合成が挙げられる。均一径の粒子を合成できれば、分級工程そのものの省略が可能となる。これにより、煩雑な篩分け操作が不要となり、固相抽出剤の調製期間を一日以上短縮できる。さらに、目的径外の粒子が合成されなくなるため、環境への負担も軽減される。そのため、固相抽出剤を均一径で合成するための手法に注目した。

均一径ポリマー粒子合成法の例と、これらの手法により得られる粒子の粒子直径の大き

かな分布を括弧内に示す⁹。乳化重合（ $\sim 0.5 \mu\text{m}$ ），ソープフリー重合（ $0.1\sim 5 \mu\text{m}$ ），膜乳化法（ $1\sim 20 \mu\text{m}$ ），二段膨潤法（ $1 \mu\text{m}\sim$ ）。均一径ポリマー粒子を合成する手法は多数報告されている¹⁰⁻¹³が，既存の均一径粒子合成法で固相抽出に好適な多孔質ポリマー粒子（固相抽出剤）を合成するのは必ずしも容易ではない。合成される粒子の「粒子直径」と，合成された粒子の「固相抽出剤としての特性」の二つの点について検討が必要であるためである。

「粒子直径」について，均一径粒子合成法の多くが，粒子直径 $10 \mu\text{m}$ 以下の粒子の合成を目的としている。固相抽出では約 $50 \mu\text{m}$ の粒子直径が必要であるため，一般的な均一径粒子合成法のねらいよりも粒子直径が大きな均一径粒子合成法を確立する必要がある。上述した均一径粒子合成法の例では，目的とする粒子直径約 $50 \mu\text{m}$ の粒子も合成可能とされている。しかし，固相抽出に好適なモノマー組成や細孔物性を有する多孔質共重合体を，粒子直径約 $50 \mu\text{m}$ で合成したという報告は確認されなかった。

「固相抽出剤としての特性」について，既存の均一径粒子合成法に関する報告のほとんどが，均一径粒子の合成を目的・ゴールとしている。そのため，粒子の使用用途が言及されていたり，合成した均一径粒子の細孔物性や固相抽出特性を評価したりといった報告はごくわずかである。その一方で，クロマトグラフィー担体¹⁴⁻¹⁶や固相抽出への適用を想定した分離媒体¹⁷として均一径粒子を合成した報告がある。これらの報告では，均一径粒子の合成法を確立してその粒子径の均一性を評価しただけでなく，細孔物性や分離特性の評価までも検討している。それでもなお，報告された均一径粒子の平均粒子直径は $10 \mu\text{m}$ 以下であり，固相抽出特性については評価されていない。そのため，均一径粒子合成法と通常の懸濁重合法とで，合成された多孔質ポリマー粒子の間に，固相抽出特性についてどのような差異が生じているのかは不明である。以上のことから，分級工程の省略によって固相抽出剤に関する基礎研究を加速させるためには，粒子直径約 $50 \mu\text{m}$ の均一径多孔質ポリマー粒子合成を確立すること，合成された粒子が従来の合成法で合成した固相抽出剤と同等の細孔物性，固相抽出特性を有していることの二点について検討する必要がある。

粒子直径約 $50 \mu\text{m}$ の均一径多孔質ポリマー粒子を，特殊な装置を用いることなく合成可能な手法の例として，二段膨潤法¹⁸とシラスポーラスガラス（shirasu porous glass, SPG）膜乳化法¹⁹が挙げられる。まずはそれぞれの方法について概説する。

二段膨潤法は，シード粒子と呼ばれる微細な単分散粒子を連続相中（水相）に分散させたのちに，水難溶性低分子物質（膨潤補助剤）やモノマー等を連続相に添加して，これらをシード粒子に吸収・膨潤させることで均一径 O/W エマルジョンを得るという分散・合成手法である²⁰。ただし，二段膨潤法で粒子直径 $50 \mu\text{m}$ のエマルジョンを得るためには，膨潤工程で非常に多くの時間が要求される¹¹。SPG 膜乳化法は，単分散エマルジョンを生成させる手法であり，合成手法ではない。SPG とは，図 4.1-1 に示すように，均一な孔を無数に有する $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-SiO}_2$ ガラスである²¹。SPG 膜乳化法は，シリンジポンプや窒素ガス加圧

等を用いて、一定流速で分散相（分散相）を SPG に透過させることで連続相（水相）中に単分散 O/W エマルションを得るという分散手法である。SPG 膜乳化法を利用する均一径粒子の合成では、生成したエマルションを懸濁重合に供することで均一径粒子を得る。

二段膨潤法と SPG 膜乳化法の二種類の合成手法により合成した均一径多孔質ポリマー粒子について、粒子直径の均一性や細孔物性、高速液体クロマトグラフィー（high performance liquid chromatography, HPLC）およびキャピラリー電気クロマトグラフィー（capillary electrochromatography, CE）の特性を評価・比較した報告がある¹⁶。これによると、合成される多孔質ポリマー粒子の単分散性は二段膨潤法が優れている一方で、細孔径や細孔容積については SPG 膜乳化法の方が優れていた。

均一径粒子合成法で固相抽出剤を合成するために、合成される粒子の細孔物性、固相抽出特性および合成にかかる時間と合成の操作性を考慮した。第 2 章で明らかとなった様に、固相抽出剤の固相抽出特性と細孔物性の間には相関がある。そのため、均一径粒子合成法で合成した固相抽出剤についても、これまでに開発した固相抽出剤²²⁻²⁴と同様の細孔物性が要求される。また本研究では、時間がかかるうえに操作が煩雑である分級工程を省略することを目的としている。そのため、均一径粒子合成法が、分級を伴う従来の合成法よりも短期間かつ操作が簡便であることが必要である。

以上のことを踏まえて、本研究では SPG 膜乳化法を選択した。粒子直径が 30~70 μm に収束したうえで、一定の均一性を有する多孔質ポリマー粒子の合成を目標とした。これを達成するために、SPG 膜乳化法における種々の分散条件を検討した。その後、合成された多孔質ポリマー粒子の合成収率、粒子直径の均一性、細孔物性および固相抽出特性を評価して、これらの特性について機械分散法で合成した同組成の多孔質ポリマー粒子と比較した。

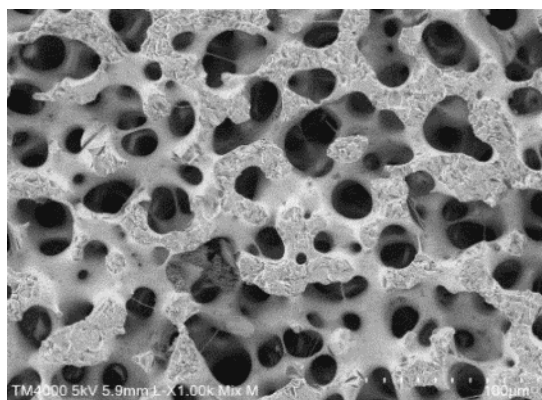


図 4.1-1 SPG 膜の SEM 撮影図。

4.2 実験

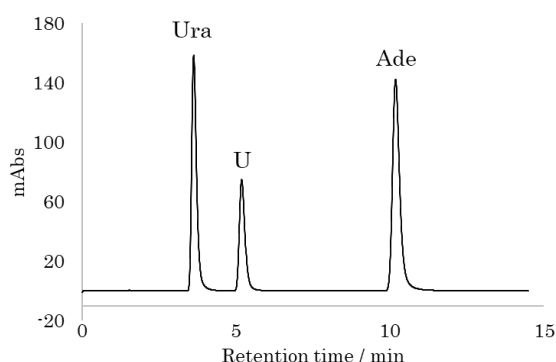
4.2.1 試薬

固相抽出剤の合成および洗浄，固相抽出剤の固相抽出特性評価のための被検成分および溶媒には第2章と同様の試薬を使用した。モノマーとして用いた純度80%のジビニルベンゼン (divinylbenzene, DVB, technical grade, 重合禁止剤として 1000 ppm *p*-tert-butylcatechol 含有) はシグマアルドリッチジャパン合同会社から，トリメチロールプロパントリメタクリレート (trimethylolpropane trimethacrylate, TMPT, 重合禁止剤として MEHQ 含有, 純度 >90.0%) は東京化成工業株式会社から購入した。DVB 中に含まれる重合禁止剤 (*p*-tert-butylcatechol) の除去に用いた水酸化ナトリウム (sodium hydroxide, 試薬特級, 純度 >97.0%), 細孔調節剤としてのトルエン (toluene, TOL, 試薬特級, 純度 >99.5%), 重合開始剤としての 2,2'-アゾビス (イソブチロニトリル) (2,2'-azobis (isobutyronitrile), AIBN, 和光特級, 含量 >98.0%), 懸濁安定剤としてのメチルセルロース 50 (methyl cellulose, 化学用, 粘度 40~60 mPa·s, メトキシ基 20~33%) は，富士フィルム和光純薬株式会社から購入した。SPG 膜乳化法にて使用した陰イオン界面活性剤であるドデシル硫酸ナトリウム (sodium dodecyl sulfate, SDS, 和光一級, 含量 >95.0%) は，富士フィルム和光純薬株式会社から，もう一種検討した陰イオン界面活性剤であるドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム (ハード型・混合物) (dodecylbenzene sodium sulfonate, DBS, 純度 >95.0%) は東京化成工業株式会社から購入した。固相抽出剤の洗浄に用いたソルミックス AP-7 (エタノール 85.5±1.0%, イソプロピルアルコール <5.0%, ノルマルプロピルアルコール 9.6±0.5%, 水分 <0.2%) は日本アルコール販売株式会社から，酢酸エチル (ethyl acetate, 特級, 純度 >99.5%) およびメタノール (methanol, 高速液体クロマトグラフィー用, 純度 >99.8%) は関東化学から購入した。固相抽出特性評価において，被検成分として用いたウラシル (uracil, Ura, 純度 >98.0%), ウリジン (uridine, U, 純度 >98.0%) およびアデノシン (adenosine, A, 純度 >99.0%) は東京化成工業株式会社から，アデニン (adenine, Ade, 和光一級, 含量 >95.0%) およびテオフィリン (theophylline, The, 和光一級, 含量 >99.0%) は富士フィルム和光純薬株式会社からそれぞれ購入した。超純水は PURELAB flex-3 (ヴェオリア・ジェネッツ株式会社 エルガ・ラボウォーター事業部) で精製したものをを用いた。

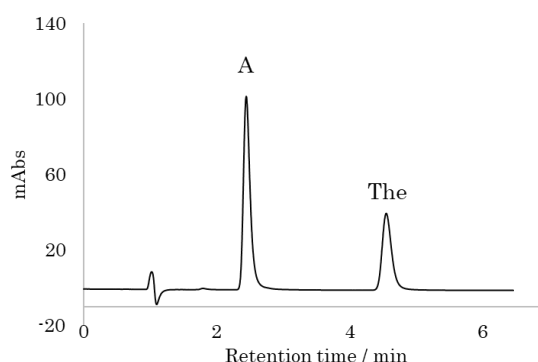
4.2.2 装置

膜乳化法に用いる膜としての SPG には，未処理 (親水性) の SPG を採用した。粒子直径 40~60 μm の多孔質ポリマー粒子を得るために，孔径 20 μm の SPG ダイレクトコネクター DC20N (エス・ピー・ジーテクノ株式会社) を使用した。合成した粒子の撮影および粒子直

径の測定には、光学顕微鏡 SwiftCam Imaging II (Swift Optical Instruments, Inc.) を用いた。固相抽出特性評価に用いた Ura, U および Ade の固相抽出回収率測定には、InertSustain® AQ-C18 (3 μm , 150 \times 2.0 mm I.D., ジーエルサイエンス株式会社) を用いた。HPLC には、いずれも日本分光製の AS-4050 オートサンプラー, PU-2085 ポンプ, DG-2085-53 脱ガス装置, CO-2065 Plus カラムオープンおよび UV-2070 紫外可視検出器を用いた。5% (v/v) メタノール水溶液を移動相として、流速 0.2 mL min⁻¹ で送液した。試料注入量は 10 μL , カラム温度は 40 °C, 検出波長は 254 nm とした。A および The の評価には CAPCELL PAK C18 AQ (3 μm , 150 \times 2.0 mm I.D., 株式会社大阪ソーダ) を用いた。HPLC には PU-1580 ポンプ, DG-980-50 脱ガス装置, UV-2075 紫外可視検出器 (いずれも日本分光株式会社), L-5025 カラムオープン (株式会社日立製作所) を用いた。15% (v/v) メタノール水溶液を移動相として、流速 0.2 mL min⁻¹ で送液した。試料注入量は 10 μL , カラム温度は 40 °C, 検出波長は 254 nm とした。それぞれのクロマトグラムを図 4.2.2-1 に示す。多孔質ポリマー粒子の比表面積を測定するために TriStar II surface area and porosity analyzer (Micromeritics Instrument Corporation) を用いた。



column: InertSustain® AQ-C18 (3 μm , 150 \times 2.0 mm I.D.), eluent: 5% (v/v) methanol, flow rate: 0.2 mL min⁻¹, column temperature: 35 °C, injection volume: 10 μL , wavelength: 254 nm.



column: CAPCELL PAK C18 AQ (3 μm , 150 \times 2.0 mm I.D.), eluent: 15% (v/v) methanol, flow rate: 0.2 mL min⁻¹, column temperature: 40 °C, injection volume: 10 μL , wavelength: 254 nm.

図 4.2.2-1 固相抽出評価に用いた各被検成分の標準試料を測定したときのクロマトグラムと HPLC 測定条件

Ura, uracil; U, uridine; Ade, adenine; A, adenosine; The, theophylline.

4.2.3 多孔質ポリマー粒子の合成: SPG 膜乳化

SPG 膜乳化の様子と装置を図 4.2.3-1 に示す。分散相の組成は第 2 章と同様である。モノマーである DVB と TMPT を 80 : 20 (モル比) で混合し、これらのモノマー混液と細孔調節剤である TOL を 1 : 2 (重量比) で混合した。モノマーと細孔調節剤の混合溶液の 1%

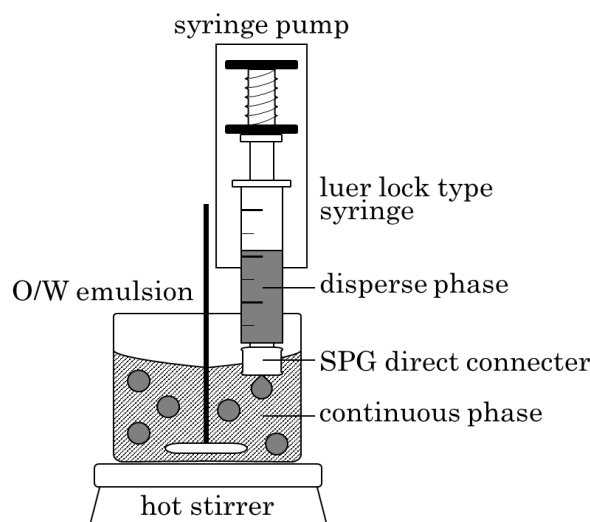


図 4.2.3-1 SPG 膜乳化の模式図

(w/w) に当たる AIBN を加え、完全に溶解させた。連続相は、超純水 (200 mL) に界面活性剤 (SDS あるいは DBS) を任意の濃度になるように添加した。ディスポーザブルのルーアロックシリンジに分散相 (3 mL) を吸引し、シリンジに SPG ダイレクトコネクターを取り付けた。これをシリンジポンプに設置して一定流速で分散相を SPG 膜に透過して、連続相中にエマルジョンを生成させた。

SPG を販売しているエス・ピー・ジーテクノ株式会社の取扱説明書²⁵において、水中に大豆油を分散させる際の好適な分散条件が示されている。これを参考に、膜透過速度：10 mL h⁻¹、連続相攪拌速度：300 rpm、界面活性剤：0.5 % (w/v) SDS を基本分散条件とした。

4.2.4 多孔質ポリマー粒子の合成：懸濁重合

SPG 膜乳化法によって生成したエマルジョンを懸濁重合することで、多孔質ポリマー粒子を得た。分散工程終了後、1 % (w/v) メチルセルロース水溶液 (50 mL) を加え、混合溶液を 300 rpm で攪拌しながら、内温 78 °C で 6 時間重合した。得られた多孔質ポリマー粒子は、過剰量の超純水およびアルコールを用いて洗浄した。洗浄した多孔質ポリマー粒子は、吸引ろ過後半日以上風乾したものを各特性評価に使用した。合成収率を求めるための多孔質ポリマー粒子の乾燥重量は、風乾した多孔質ポリマー粒子を 50 °C で 7 時間減圧乾燥したのちの重量を測定することで求めた。

4.2.5 粒度分布の測定

光学顕微鏡で合成した多孔質ポリマー粒子を撮影し、画面上の全ての粒子 (約 300 個) の直径を測定した。粒子直径の測定値を基に体積基準の粒度分布図を作製し、粒子直径の

変動係数 (coefficient of variation, CV), 中位径 (median diameter, D_{50}) を求めた。

4.2.6 固相抽出特性の評価

2.2.4 と同様の方法で固相抽出, HPLC 測定および固相抽出回収率の算出を行った。各固相抽出剤 (60 mg) を, 容量 3 mL のシリンジパレル型エンプティーカートリッジ (Bond Elut® Empty SPE Cartridges, Agilent Technologies Japan) に乾式充填し, 評価用の固相抽出カートリッジとした。固相抽出カートリッジにメタノール (3 mL), 超純水 (50 mL) の順に通液してコンディショニングした。続いて各 100 mg L^{-1} 試料水溶液 (1.5 mL) を負荷した。その後, 溶出液として 50% (v/v) メタノール水溶液 (1.5 mL) を用いて固相抽出剤に捕捉された被検成分を溶出した。固相抽出剤を通過した溶出液を純水で 10 倍希釈したのち HPLC により測定した。被検成分の固相抽出回収率は, 標準試料 (固相抽出を行っていない固相抽出用の試料溶液) と溶出液とのクロマトグラムのピーク面積を比較することにより算出した。固相抽出における被検成分として, Ura, U, Ade, A および The を使用した。

4.3 結果および考察

4.3.1 分散系の安定化

SPG 膜乳化法によって得られるエマルションの直径の単分散性は概ね $CV=10\sim 17\%$ ²¹とされている。エマルションの熱力学的な安定性は特別高いものではなく、保存中に油滴の合一が生じて分布が変化してしまうため、エマルション中の油滴径の分布を直接評価するのは難しい。しかし、懸濁重合後の多孔質ポリマー粒子の粒子直径はエマルションの油滴径と同程度に収束する¹。そのため、懸濁重合後の多孔質ポリマー粒子の粒子直径を計測することによって分散状態を評価することとした。

初めに、DVB と TMPT の単独ホモポリマーをそれぞれ合成した。膜透過速度 10 mL h^{-1} 、連続相の攪拌速度 300 rpm 、界面活性剤 0.5% (w/v) SDS の条件で分散を行い、この条件を基本分散条件 (Run No. 0) とした。この分散条件は、水中に大豆油を分散させる際に好適とされる分散条件²⁵を参考にした。その結果、図 4.3.1-1 に示すようにそれぞれのホモポリマー粒子の粒度分布は非常に広く、どちらも変動係数 $CV=50\%$ と多分散であった。poly DVB においては球状ではない不定形粒子が確認され、分散系は破壊されていた。このような現象は機械分散法では確認されていない。そのため、エマルションの安定性について、分散相が SPG を介することによる何らかの影響が推測された。分散系を安定化するために、膜透過速度や連続相攪拌速度および細孔調節剤の種類を検討したが、これらの検討では分散系の安定性を改善することはできなかった。そこで、連続相へ添加している界面活性剤や懸濁安定剤に注目した。

連続相に何も添加しないで、つまり超純水のみで SPG 膜乳化をしたところ、分散相は全て合一し、エマルションを生成できなかった。続いて界面活性剤だけを添加した場合と、懸濁安定剤だけを添加した場合とで SPG 膜乳化-懸濁重合した。界面活性剤のみを連続相

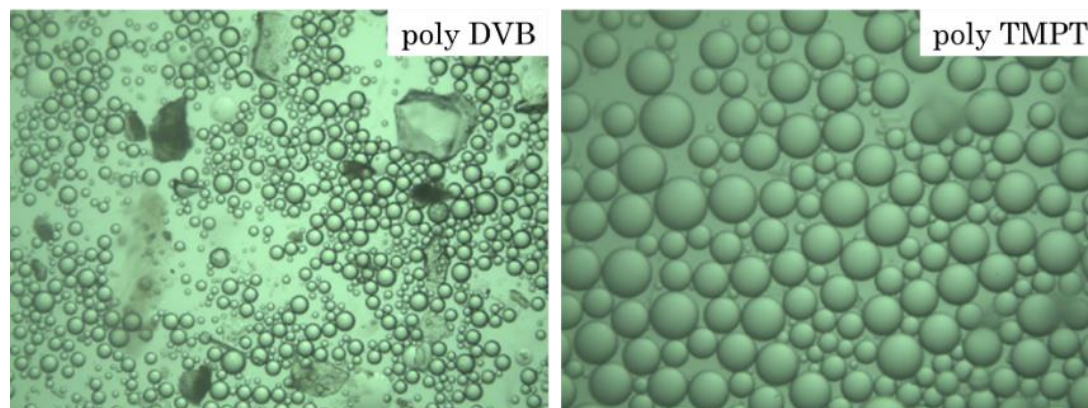


図 4.3.1-1 SPG 膜乳化法によって合成した poly DVB (左図) と poly TMPT (右図) の光学顕微鏡撮影図

へ添加した場合、分散時のエマルジョン生成は安定的であった。しかし、合一速度の律速時間とされている懸濁重合開始後 3 時間²⁶が経過した時に、エマルジョンがゲル化した状態で激しく凝集した。一方、懸濁安定剤のみを連続相へ添加した場合、生成されたエマルジョンの直径は多分散であったが、ポリマー粒子同士の凝集は確認されなかった。これらの結果から、分散系の破壊は分散時に懸濁安定剤が存在することによると推測した。そのため、界面活性剤のみを添加した連続相を用いてエマルジョンの分散を行った後に、懸濁安定剤を添加してから懸濁重合を開始した。その結果、変動係数 CV=15 %と、ある程度整然としたポリマー粒子が得られた。SPG 膜に懸濁安定剤であるメチルセルロースが吸着し、分散相の SPG 膜透過時にメチルセルロースや連続相がエマルジョンに内包されることでエマルジョンが不安定化し、多分散化および不定形粒子が生じたと考えられる。この結果から、懸濁安定剤は、分散時には添加せず、分散終了後に添加して、懸濁重合を行うこととした。

膜乳化法に用いる膜としての SPG には、疎水性化処理されたものと未処理（親水性）の二種類が存在する。SPG 膜乳化法に限らず、膜乳化法で均一径エマルジョンを生成させるためには、膜と分散相の親和性を考慮する必要がある。例えば、疎水性化処理された SPG 膜を使用して、2-ヒドロキシエチルメタクリラート（2-hydroxyethyl methacrylate, HEMA）とエチレングリコールジメタクリラート（ethylene glycol dimethacrylate, EGDM）の共重合体 HEMA-EGDM を合成した報告²⁷がある。この報告によると、親水性 SPG 膜に HEMA や EGDM の様な極性が高い分散相を透過させると、分散相と SPG 膜との親和性が高いため、SPG 膜が膜濡れ状態に陥り単分散エマルジョンの生成が困難であったとされている。同時に報告中では、膜乳化が可能であるかの目安として分散相の溶解度パラメーター（solubility parameter, SP）について言及している。Hildebrand が提唱した SP 値(δ (cal/cm³)^{1/2})について、分散相の SP 値が 9 以下であれば、分散相による親水性 SPG 膜の膜濡れは生じず、膜乳化が可能とされている。今回使用した分散相の SP 値はそれぞれ、DVB が 9.3、TMPT が 9.7、TOL が 8.9 であった。TOL の SP 値は文献²⁸から引用し、文献値が得られなかった DVB と TMPT の SP 値は、Van Krevelen & Hoftyzer 法²⁹を用いて推算した。分散相の SP 値がちょうど目安の 9 付近であったため、疎水性化処理された SPG と未処理（親水性）の SPG の両方を検討した。エマルジョンが生成される様子を観察したところ、疎水性 SPG を透過して生成したエマルジョンの粒子直径は多分散であった一方で、親水性 SPG により生成したエマルジョンの粒子は整然としていた。この結果から本研究では未処理（親水性）の SPG を採用した。

SPG 膜乳化法では、SPG 孔径の約三倍のエマルジョンが得られる³⁰とされている。粒子直径約 50 μ m の多孔質ポリマー粒子を得るために、孔径 20 μ m の SPG 膜を使用した。

4.3.2 膜透過速度と連続相の攪拌速度の影響

表 4.3.2-1 に示す基本分散条件 (Run No. 0) により得られた多孔質ポリマー粒子の光学顕微鏡写真および粒度分布を図 4.3.2-1 に示す。Run No. 0 の多孔質ポリマー粒子の粒子直径の変動係数 CV は 14.3 % で、粒子直径 30~60 μm に分布を持つ中位径 $D_{50}=43.2 \mu\text{m}$ の多孔質ポリマー粒子を合成可能であった。基本分散条件によって粒子直径に一定の均一性を有する多孔質ポリマー粒子を合成可能であったが、粒度分布は 30~40 μm の低粒子直径側に裾が広がる形状であった。相対的に粒子径が小さい粒子の存在は、固相抽出剤をカートリッジに充填する際に目詰まりを起し、流動特性の低下を招く。そのため、分散条件を検討することで、小粒子径側の裾野の解消を目指した。

分散条件を変更しながら合成した多孔質ポリマー粒子の粒子直径の変動係数 CV、中位径 D_{50} 、収率を表 4.3.2-1 に示す。まず、分散相が SPG 膜を透過するときの膜透過速度の影響を調べた (Run Nos. 1, 2)。Run Nos. 1, 2 で合成した粒子の粒度分布を図 4.3.2-2 に示す。膜透過速度が 5, 10 および 15 mL h^{-1} の 3 つの速度帯について検討した結果、膜透過速度

表 4.3.2-1 膜透過速度あるいは連続相の攪拌速度が異なる分散条件で合成した粒子の中位径 D_{50} 、粒子直径の変動係数 CV および合成収率

Run No.	Fig. No.	Membrane permeation rate / mL h^{-1}	Agitation speed / rpm	Surfactant	D_{50} / μm	CV / %	Yield / % (w/w)
0	4.3.2-1	10	300	0.5 % (w/v) SDS	43.2	14.3	95.5
1-1	4.3.2-2	5	300	0.5 % (w/v) SDS	49.0	9.7	96.1
1-2	4.3.2-2	15	300	0.5 % (w/v) SDS	57.6	15.3	106.0
2-1	4.3.2-3	10	250	0.5 % (w/v) SDS	52.8	18.3	98.5
2-2	4.3.2-3	10	350	0.5 % (w/v) SDS	48.0	13.1	93.2
2-3	4.3.2-3	10	400	0.5 % (w/v) SDS	52.0	27.2	89.7

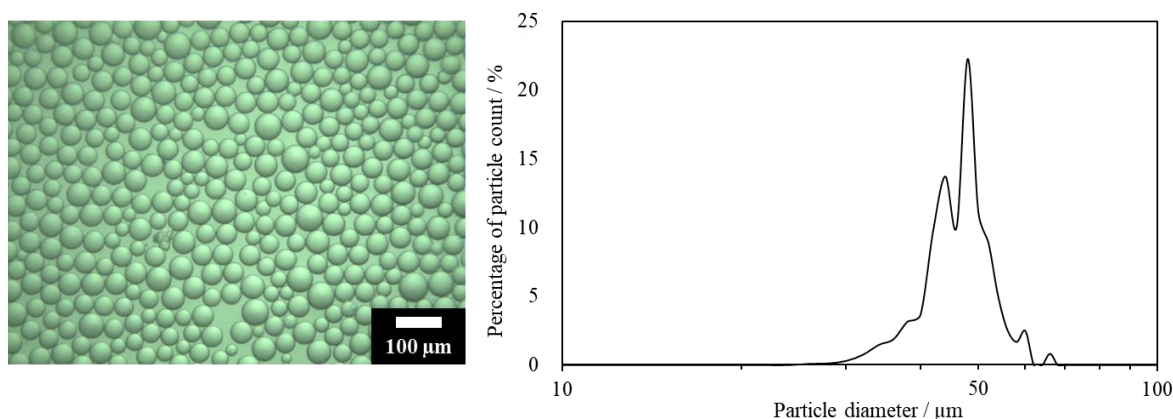


図 4.3.2-1 基本条件 (Run No. 0) で合成した粒子の光学顕微鏡撮影図と粒度分布

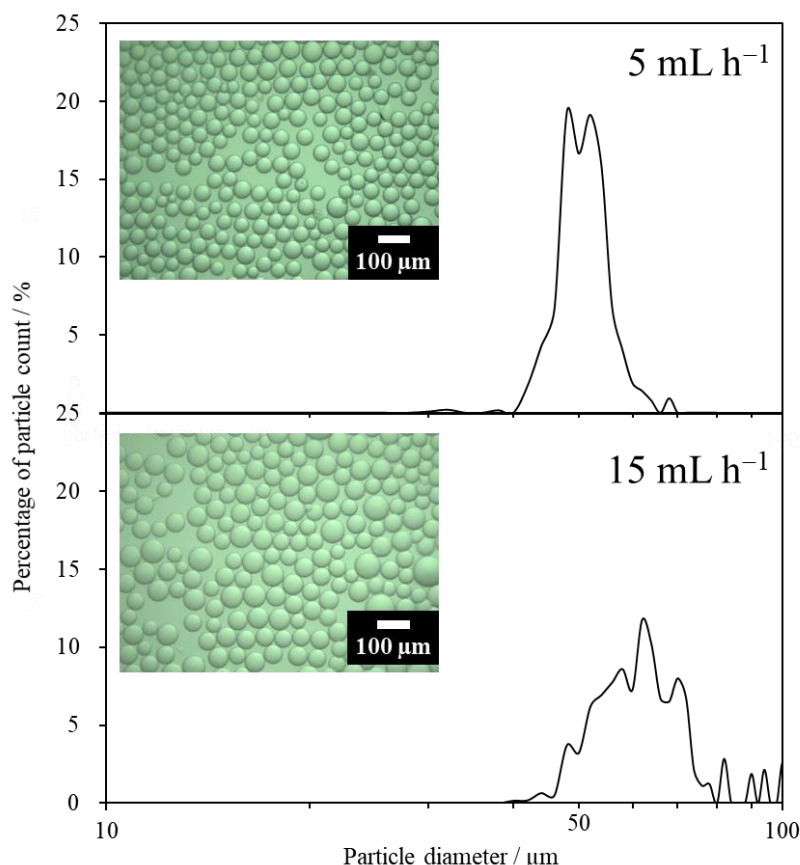


図 4.3.2-2 膜透過速度を変更して合成した粒子の光学顕微鏡撮影図と粒度分布 (Run Nos. 1-1, 1-2)

が遅いほど粒子直径の変動係数 CV が低下し、膜透過速度 5.0 mL h^{-1} (Run No. 1) で、中位径 D_{50} が $49.0 \text{ }\mu\text{m}$ 、粒子直径の変動係数 CV が 9.7% という好適な結果を示した。一般に膜乳化法では、一定の範囲内であれば膜透過速度が遅いほど、また連続相の攪拌速度が速いほど、粒度分布は整然となる傾向を示す³¹とされており、本検討における結果もこれに倣うものであった。膜透過速度をさらに遅くすることで、粒子径の均一性についてさらなる向上が期待されるが、膜透過速度をさらに遅くすると分散工程が長期間化してしまう。分散相中には重合開始剤 AIBN が含まれており、分散工程に 30 分以上要するのは好ましくないため、膜透過速度 5.0 mL h^{-1} を最適条件とした。

続いて、連続相の攪拌速度の影響について調べた。結果を図 4.3.2-3 に示す (Run Nos. 2-1~2-3)。この場合でも既報³¹と同様に連続相の攪拌速度を上昇させることにより粒子直径の変動係数 CV が改善した (Run No. 2-2)。しかし、連続相の攪拌速度 400 rpm (Run No. 2-3) では、異常に粒子直径の大きい多孔質ポリマー粒子が存在した。この条件下では連続相中に気泡の発生が観測されており、気泡を介したエマルション中の油滴の合一が原因であると判断した。一方、 250 rpm (Run No. 2-1) では粒子直径が全体に大きくなり、粒子直径

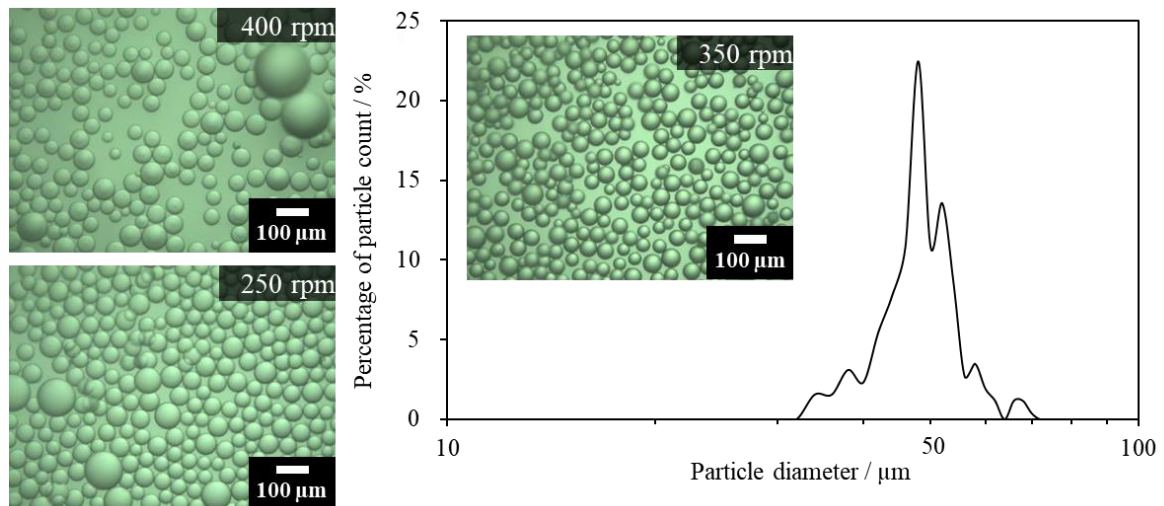


図 4.3.2-3 連続相の攪拌速度を変更して合成した粒子の光学顕微鏡撮影図と粒度分布 (Run Nos. 2-1~2-3)

が以上に大きい粒子が確認された。このことは、攪拌による剪断力の不足が原因であると推測された。つまり、攪拌不足によって分散相の SPG 膜表面から連続相への離脱性が低下し、SPG 膜表面で分散相が過剰に成長したものと考えられる。

これまでの検討によって、SPG 膜乳化における分散相の膜透過速度と連続相の攪拌速度の最適条件 (5.0 mL h^{-1} , 350 rpm) が設定されている。この膜透過速度と連続相の攪拌速度とを組み合わせる時に、合成される多孔質ポリマー粒子の粒子直径や均一性の傾向に変化が生じないかを検討した。膜透過速度と連続相の攪拌速度について、(5.0 mL h^{-1} , 250 rpm), (5.0 mL h^{-1} , 350 rpm), (15 mL h^{-1} , 250 rpm), (15 mL h^{-1} , 350 rpm) の 4 通りの分散条件で合成した多孔質ポリマー粒子の粒度分布を図 4.3.2-4 に示す。膜透過速度と連続相の攪拌速度を同時に変更しても、分散条件を単独で変更したときと同様に、膜透過速度が遅くなるほどに粒子径の均一性が向上し、連続相の攪拌速度が速くなるほどに粒子直径が小さくなった。以上の結果より、膜透過速度と連続相の攪拌速度との組み合わせによるそれぞれの傾向への顕著な影響はないものと判断し、それぞれの最適条件である (5.0 mL h^{-1} , 350 rpm) の組み合わせを最適条件とした。

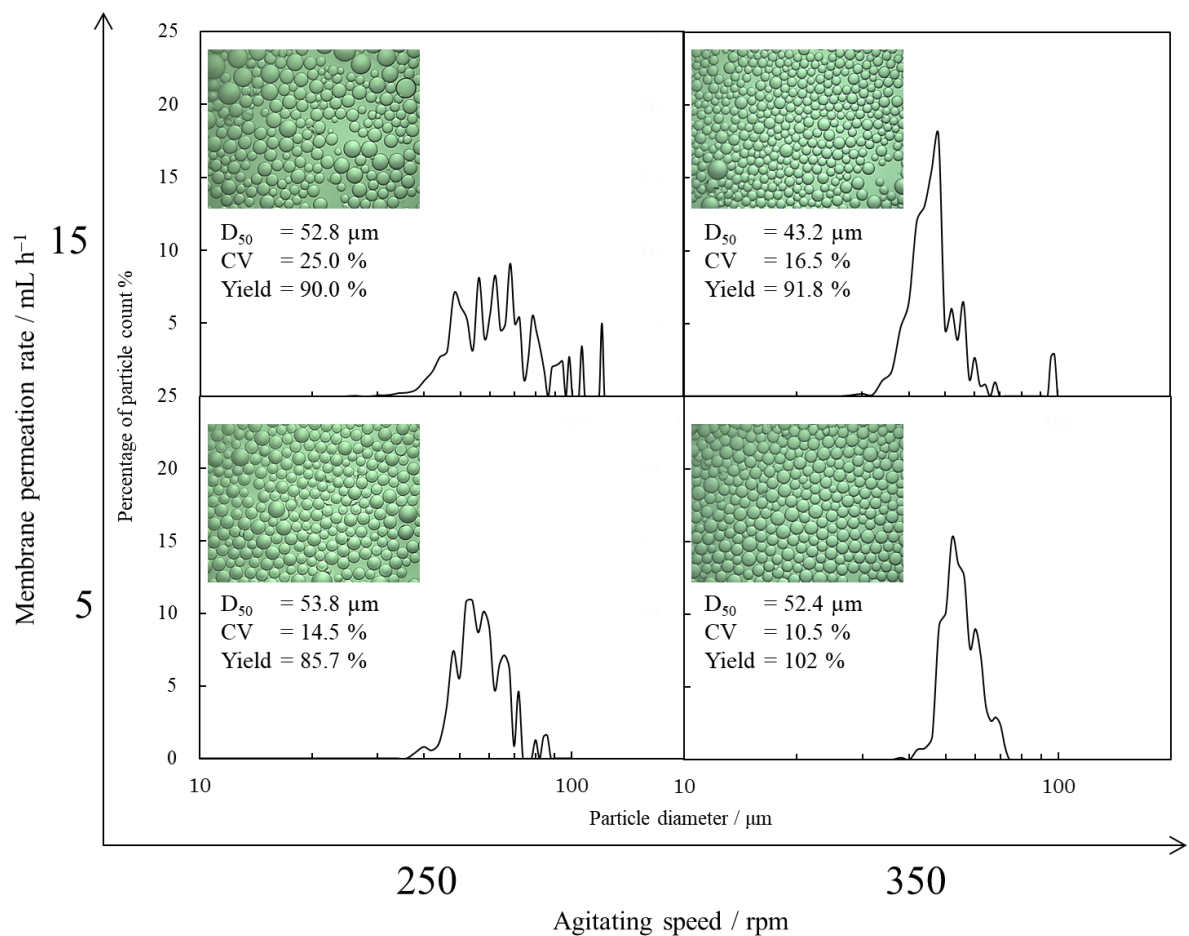


図 4.3.2-4 分散相の膜透過速度と連続相の攪拌速度を同時に変更して合成した粒子の光学顕微鏡撮影図と粒度分布

4.3.3 界面活性剤の種類と濃度の影響

連続相に添加する界面活性剤について検討した（表 4.3.3-1 Run Nos. 3.1~3.6）。界面活性剤としては、膜乳化法で汎用されている SDS と、懸濁重合で懸濁安定助剤として用いられる DBS³² の 2 種類を用いた。SDS と DBS の臨界ミセル濃度（critical micelle concentration, CMC）は、それぞれ約 2.3 %（w/v）および約 0.5 %（w/v）である。CMC 以上の濃度で界面活性剤を添加すると、エマルションのミセル化が生じ、目的径である約 50 μm に対して異常に小さな直径のエマルションが生成されることにより、ミセル化に伴う分散相の連続相への溶解が生じてしまう。そのため、それぞれ CMC 以下の濃度となるように、SDS は 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 %（w/v）の濃度で、DBS は 0.2, 0.3, 0.4 %（w/v）の濃度で検討した。

界面活性剤の種類と濃度を変更したときの分散条件と合成した多孔質ポリマー粒子の粒子直径の変動係数 CV，中位径 D_{50} ，収率を表 4.3.3-1 に示す。界面活性剤 SDS を添加し

表 4.3.3-1 界面活性剤の種類及び濃度が異なる分散条件で合成した粒子の中位径 D_{50} , 粒子直径の変動係数 CV および合成収率

Run No.	Fig. No.	Membrane permeation rate / mL h ⁻¹	Agitation speed / rpm	Surfactant	D_{50} / μm	CV / %	Yield / % (w/w)
0	4.3.2-1	10	300	0.5 % (w/v) SDS	43.2	14.3	95.5
3-1	4.3.3-1	10	300	1.0 % (w/v) SDS	–	–	42.5
3-2	4.3.3-1	10	300	1.5 % (w/v) SDS	–	–	24.6
3-3	4.3.3-1	10	300	2.0 % (w/v) SDS	–	–	13.8
3-4	4.3.3-2	10	300	0.2 % (w/v) DBS	53.0	24.5	95.2
3-5	4.3.3-2	10	300	0.3 % (w/v) DBS	51.0	10.6	96.5
3-6	4.3.3-2	10	300	0.4 % (w/v) DBS	51.0	9.0	94.2

た場合、0.5 % (w/v) の時は 95.5 % の合成収率で多孔質ポリマー粒子を合成可能であったが、1.0 % (w/v) 以上の濃度 (Run Nos. 3-1~3-3) では、SDS 濃度の向上に伴い合成収率が大幅に低下した。また、図 4.3.3-1 に示すように、粒子直径が著しく小さい粒子が確認された。合成収率の低下と粒子直径の異常な小サイズ化は、SDS によるエマルションのミセル化が原因であると推定される。SDS の濃度が CMC 以下であるにもかかわらずミセル化が生じたのは、温度が原因と考えられる。CMC は室温での物性値であり、多孔質ポリマー粒子の合成では、分散工程終了後に 78 °C に加温する。そのため、重合工程時の温度上昇によって SDS の界面活性が向上し、エマルションが多孔質ポリマー粒子へ重合を進行させるより以前にエマルションがミセル化したものと推測した。そこで、SDS 以外の界面活性剤として、懸濁重合で懸濁安定助剤として用いられる DBS について検討した。

DBS では、図 4.3.3-2 に示すように、0.2~0.4 % (w/v) (Run Nos. 3-4~3-6) で高い合成収率が得られた。粒子直径の変動係数 CV は DBS 濃度の増加につれて改善され、0.2 % (w/v) よりも高い濃度で DBS を添加することで、粒子直径が均一な多孔質ポリマー粒子を合成可能であった。0.4 % (w/v) DBS (Run No. 3-6) の時は、中位径 D_{50} が 51.0 μm , 粒子直径の

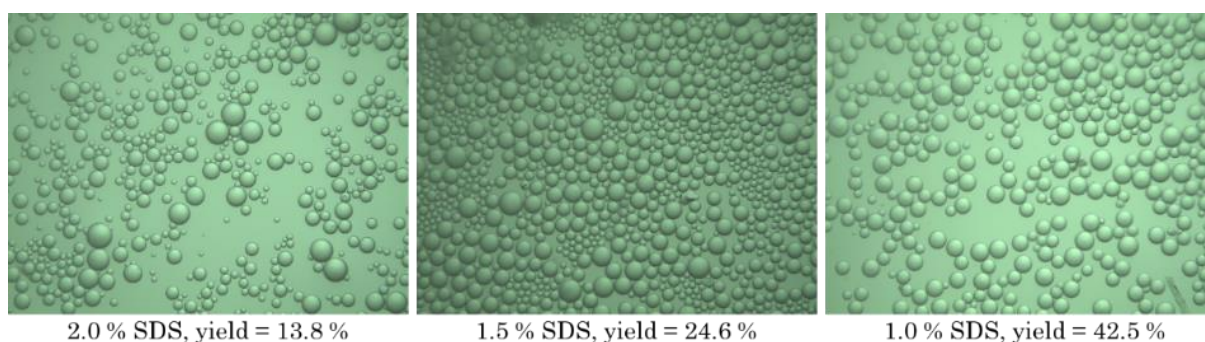


図 4.3.3-1 界面活性剤 SDS の濃度を変更して合成した粒子の光学顕微鏡撮影図 (Run Nos. 3-1~3-3)

変動係数 CV が 9.0 % という良好な結果を得ることができた。

DBS 濃度を 0.4 % (w/v) よりも高くすることで、粒子直径の変動係数 CV のさらなる低下が期待される。しかし、機械分散法で固相抽出剤を合成する場合、界面活性剤は非添加あるいは添加する場合でもその添加量はごくわずかであり、通常約 0.01 % (w/v) 程度未満である。そのため、高濃度の界面活性剤添加による、多孔質ポリマー粒子の組成比への影響が推察された。界面活性剤の添加によって分散相の連続相への溶解が促進されると、モノマーや細孔調節剤のそれぞれの溶解度の差によって、分散相中の主モノマーとコモノマーの存在比あるいはモノマーと細孔調節剤の存在比が分散初期から終盤にかけて変化する恐れがある。この傾向が顕著な場合、モノマー組成や細孔物性について、従来法に対する再現性が良好な粒子を合成するのは困難になる。そこで、細孔物性の安定性・再現性を優先することとし、粒子直径の変動係数 CV が 10.6 % と Run No. 3-6 よりも大きい値であったが、Run No. 3-5 の DBS 濃度 0.3 % (w/v) を選定して以降の検討を行った。

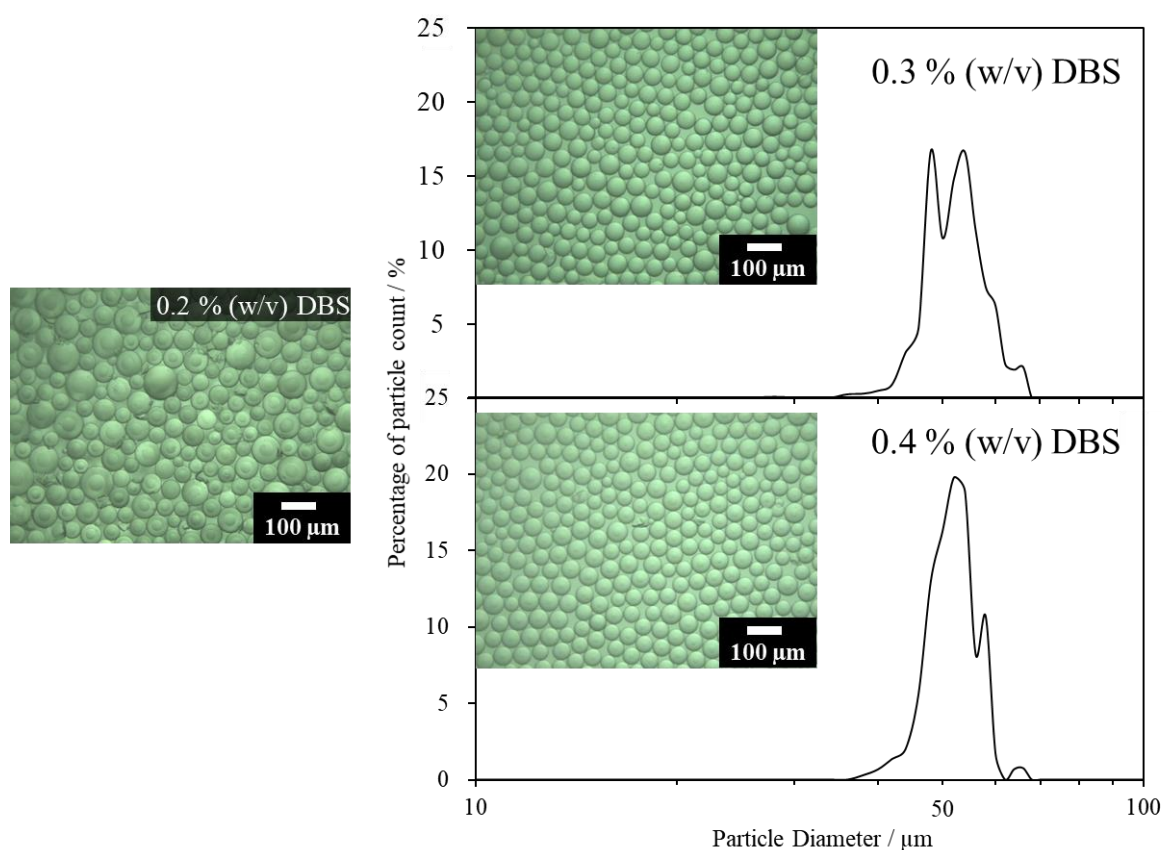


図 4.3.3-2 界面活性剤 DBS の濃度を変更して合成した粒子の光学顕微鏡撮影図と粒度分布 (Run Nos. 3-4~3-6)

4.3.4 連続相に対する分散相の容積比の影響

これまでに決定した分散条件を組み合わせ、さらに分散相と連続相との容積比の影響を調べた。一般に、懸濁重合法では分散相と連続相との容積比は1:10~5:10とされている¹⁾。これに対して、本検討における分散相と連続相の容積はそれぞれ3 mL, 250 mLであり、容積比は0.12:10と桁違いに低い値であった。連続相に対する分散相の容積比が低い場合、多孔質ポリマー粒子の細孔物性に悪影響を及ぼすとされる⁷⁾。そこで、分散相と連続相との容積比を通常の懸濁重合法の条件に収束するように、分散相を12 mL, 連続相を125 mLに設定し、多孔質ポリマー粒子を合成した。表4.3.4-1に示す分散条件 (Run No. 4) で、SPG膜乳化法によって合成した多孔質ポリマー粒子は、図4.3.4-1に示すように、中位径 D_{50} は56.0 μm , 粒子直径の変動係数CVは9.5%と均一性の高い多孔質ポリマー粒子を収率101%で合成可能であった。以上の結果から、この分散条件 (Run No. 4) を最適条件として採用した。

表 4.3.4-1 最適化された分散条件を適用し、連続相に対する分散相の体積比を変更して合成した粒子の中位径 D_{50} , 粒子直径の変動係数 CV 及び合成収率

Run No.	Fig. No.	Membrane permeation rate / mL h^{-1}	Agitation speed / rpm	Surfactant	D_{50} / μm	CV / %	Yield / % (w/w)
0	4.3.2-1	10	300	0.5 % (w/v) SDS	43.2	14.3	95.5
4	4.3.4-1	5	350	0.3 % (w/v) DBS	56.0	9.5	101.0

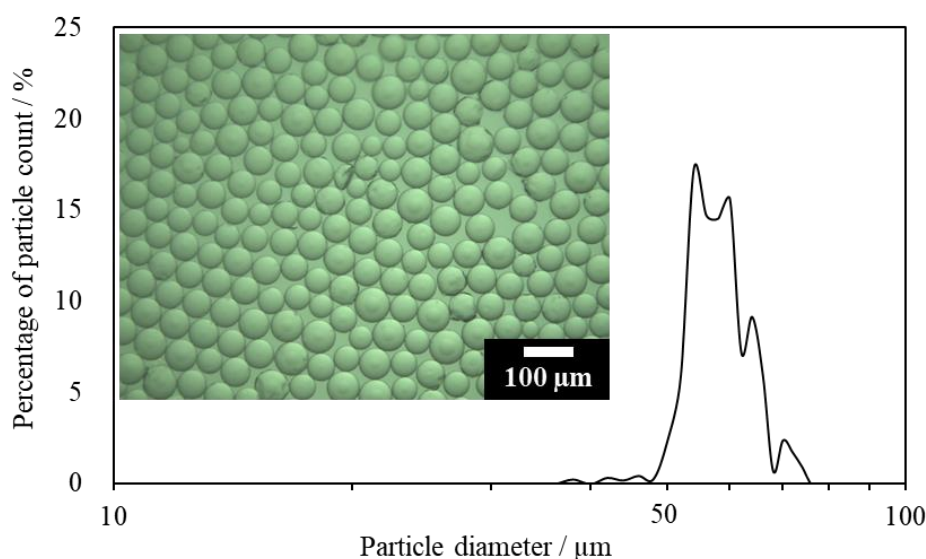


図 4.3.4-1 最適条件を適用して合成した粒子の光学顕微鏡撮影図と粒度分布 (Run No. 4)

4.3.5 SPG 膜乳化法を用いて合成した多孔質ポリマー粒子の細孔物性と固相抽出特性

これまでの検討で最適化した分散条件の基，SPG 膜乳化法を用いて合成した多孔質ポリマー粒子の細孔物性を測定した。SPG 膜乳化法あるいは機械分散法により合成した多孔質ポリマー粒子の細孔物性の比較を表 4.3.5-1 に示す。SPG 膜乳化法により合成した多孔質ポリマー粒子は，平均細孔径，細孔容積および比表面積のいずれもが相対的に低い値を示しており，機械分散法で合成したものと同様の細孔物性を有する多孔質ポリマー粒子は合成できなかった。しかし，比表面積に注目すると，SPG 膜乳化法で合成した多孔質ポリマー粒子の比表面積は $695 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ であった。一般的なポリマー系固相抽出剤の比表面積は $500\sim 800 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ である。そのため，SPG 膜乳化法により合成した多孔質ポリマー粒子は，固相抽出剤として十分有用な比表面積を有していると判断した。

SPG 膜乳化法により合成した多孔質ポリマー粒子の細孔物性が変化した原因は，連続相への界面活性剤の添加と連続相に対する分散相の容積比の低さの二点にある。SPG 膜乳化法では，粒子直径の均一性を担保するために 0.3% (w/v) 以上の濃度の DBS を添加する必要がある。そのため，界面活性剤の面で細孔物性の改善は容易ではない。一方，連続相に対する分散相の容積比については対応可能である。単純な分散相の増量では，一台のシリンジポンプで分散すると調製に時間がかかってしまう。そこで，本研究では検討していないが，複数台のシリンジポンプの同時使用や SPG テクノ社のマイクロモジュール，バブリングキット等の使用により，分散時間の長期化を伴うことなく，連続相に対する分散相の容積比を向上できると考えられる。そのため，これらの検討により連続相に対する分散相の容積比を向上させることで，細孔物性の変化は抑制できるものと考えられる。

第 2 章の研究より，DVB/TMPT 共重合体の固相抽出回収率は，DVB/TMPT 共重合体の比表面積に依存することが明らかとなっている²²。また，固相抽出効率と固相抽出剤の比表面積との間には明確な関係があり，比表面積の増加は固相抽出剤の捕捉能力を改善させる³³とされている。従って，固相抽出剤の比表面積の低下はすなわち固相抽出回収率の低下

表 4.3.5-1 機械分散法あるいは SPG 膜乳化法によって合成した多孔質ポリマー粒子の細孔物性とそれぞれの間で差異がある分散条件

Dispersion method	Run No.	Volume ratio ^a	DBS content / % (w/w)	Pore volume / $\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}$	Average pore diameter / nm	BET surface area / $\text{m}^2 \text{ g}^{-1}$
Machine dispersion	—	150 / 250	0	1.48	7.67	849 ^b
SPG membrane emulsification	4	12 / 125	0.3	0.79	4.76	695.0

a dispersion phase / continuous phase

b The same data as reference 22

につながる。そのため、後述する固相抽出回収率について、SPG 膜乳化法を用いて合成した多孔質ポリマー粒子は、比表面積を含む細孔物性が変化していたため、機械分散法によって合成したものと比較して、固相抽出回収率が低下・変化するものと推測された。

SPG 膜乳化法を用いて合成した多孔質ポリマー粒子を固相抽出特性評価に供して、極性化合物を被検成分としたときの固相抽出特性を評価した。固相抽出法により求めた各被検成分の固相抽出回収率を図 4.3.5-1 に示す。SPG 膜乳化法により合成した多孔質ポリマー粒子は、細孔物性に基づく予想に反して、機械分散法で合成した多孔質ポリマー粒子と概ね同等の固相抽出回収率を示した。

比表面積等の細孔物性の変化によって低減するものと推測された固相抽出回収率を補填した要因として、多孔質ポリマー粒子の粒度分布の単分散性が挙げられる。Fontanals ら³³によると、粒度分布が均一化することで固相抽出剤の管体への充填密度が向上し、固相と試料成分の相互作用が効率的になる。このことから、固相抽出剤の粒度分布が均一であったため、細孔物性が変化したにも関わらず、固相抽出回収率はほとんど変化しなかったものと推測した。以上の結果より、SPG 膜乳化法を用いて合成した多孔質ポリマー粒子は、細孔物性の変化が確認されたものの、固相抽出剤として十分に適用可能であると判断した。

SPG 膜乳化法を用いる多孔質ポリマー粒子合成法の確立によって、分級工程の省略が可能となった。分級工程は、固相抽出剤の調製における操作性と調製にかかる時間の律速工

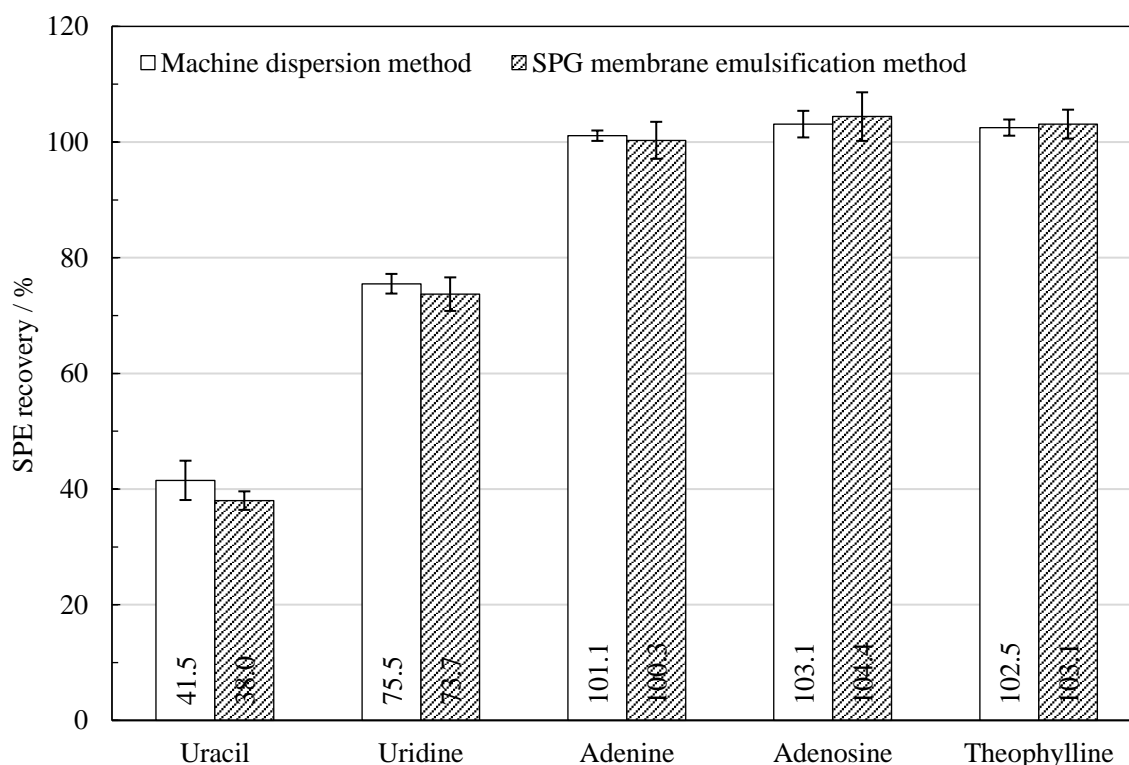


図 4.3.5-1 機械分散法あるいは SPG 膜乳化法によって合成した多孔質ポリマー粒子における各被検成分の固相抽出回収率

程であったため、本研究は調製にかかる操作性の改善と合成時間の大幅な短縮をもたらした。

SPG膜乳化法は多孔質ポリマー粒子を任意のスケールで合成可能であるところにも利点がある。例えば、固相抽出剤の固相抽出特性や細孔物性等の評価といった基礎研究では、評価のために必要な多孔質ポリマーの量は少量である。一度の合成で多量の収量を得られる機械分散法は工業的な用途には優れるものの、固相抽出剤の基礎研究等のためには合成収量が過剰である。これに対して本手法は、任意の収量を合成可能であり、合成収量の全量を固相抽出に供することができる。そのため、合成試薬の過剰消費による環境への負担を軽減することができる。

4.4 結言

固相抽出剤として好適な粒子直径、細孔物性および固相抽出特性を有する均一径多孔質ポリマー粒子を簡便に合成する手法を確立した。本法は SPG 膜乳化法によって均一径エマルションを作製したのち、懸濁重合法によって単分散性の高い多孔質ポリマー粒子を得る手法である。本法を用いて、これまでに開発した逆相分配系固相抽出剤と同一組成の多孔質ポリマー粒子を合成したところ、粒子直径 50~70 μm で、粒子直径の変動係数 CV が 10 % 以下の均一径多孔質ポリマー粒子を得た。本法により得られた均一径多孔質ポリマー粒子を固相抽出剤として固相抽出特性を評価したところ、従来の機械分散法により合成した固相抽出剤と同等の固相抽出特性を示した。また、均一径多孔質ポリマー粒子の比表面積は約 700 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ であり、固相抽出剤として適用可能な比表面積を有していると判断した。以上の結果より、本法で合成した多孔質ポリマー粒子は、固相抽出特性および細孔物性の両面で固相抽出剤として十分に適用可能であると判断した。

本研究で確立した均一径粒子合成法は、簡便な操作で、固相抽出に適用可能な粒子直径を有する粒子のみを、任意の収量で合成可能である。そのため、分級操作を伴うことなく固相抽出剤を合成することが可能であり、環境への負荷も抑制される。分級工程は、固相抽出剤の調製における操作性と調製期間の律速工程であったため、本法は固相抽出剤を効率的に合成する手法として有用であり、固相抽出剤に関する研究を加速的に推進させるために寄与するものと考えられる。

参考文献

1. P.J. Dowding, B. Vincent, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, **161** (2000) 259, Suspension polymerisation to form polymer beads
2. P.J. Dowding, J.W. Goodwin, B. Vincent, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, **145** (1998) 263, The characterization of porous styrene-glycidyl methacrylate copolymer beads prepared by suspension polymerization
3. I. Küçük, A. Kuyulu, O. Okay, *Polym. Bull.*, **35** (1995) 511, Effect of diluents on the porous structure of crosslinked poly(methyl methacrylate) beads
4. V. Chaudhary, S. Sharma, *J. Polym. Res.*, **26** (2019) Suspension polymerization technique: parameters affecting polymer properties and application in oxidation reactions
5. ジーエルサイエンス固相抽出ガイドブック編集委員会, 固相抽出ガイドブック, まむかいブックスギャラリー, 2012
6. M. C. Hennion, *J. Chromatogr. A*, **856** (1999) 3, Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography
7. M.T. Gokmen, F.E. Du Prez, *Prog. Polym. Sci.*, **37** (2012) 365, Porous polymer particles - A comprehensive guide to synthesis, characterization, functionalization and applications
8. O. Okay, *Prog. Polym. Sci.*, **25** (2000) 711, Macroporous copolymer networks
9. 笠井 澄, 高分子, **44** (1995) 290, 均一径ポリマー粒子の合成
10. M. Okubo, M. Shiozaki, M. Tsujihiro, Y. Tsukuda, *Colloid Polym. Sci.*, **269** (1991) 222, Preparation of micron-size monodisperse polymer particles by seeded polymerization utilizing the dynamic monomer swelling method
11. D. xia Hao, F. ling Gong, W. Wei, G. hua Hu, G. hui Ma, Z. guo Su, *J. Colloid Interface Sci.*, **323** (2008) 52, Porogen effects in synthesis of uniform micrometer-sized poly(divinylbenzene) microspheres with high surface areas
12. R. Wang, Y. Zhang, G. Ma, Z. Su, *J. Appl. Polym. Sci.*, **102** (2006) 5018, Preparation of uniform poly(glycidyl methacrylate) porous microspheres by membrane emulsification-polymerization technology
13. Q.C. Wang, F. Svec, J.M.J. Fréchet, *Polym. Bull.*, **28** (1992) 569, Monodisperse polymer beads as packing material for high-performance liquid chromatography
14. K. Hosoya, Y. Kishii, K. Kimata, T. Araki, N. Tanaka, F. Svec, J.M.J. Fréchet, *J. Chromatogr. A*, **690** (1995) 21, Uniform-size hydrophobic polymer-based separation media selectively modified with a hydrophilic external polymeric layer
15. K. Hosoya, J.M.J. Fréchet, *J. Liq. Chromatogr.*, **16** (1993) 353, Reversed-phase chromatographic properties of monodispersed macroporous particles of poly(styrene-divinylbenzene) prepared by a multi-step swelling and polymerization method
16. K. Hosoya, H. Ohta, K. Yoshizako, K. Kimata, T. Ikegami, N. Tanaka, *J. Chromatogr. A*, **853** (1999) 11, Preparation of uniformly sized polymeric separation media potentially suitable for

small-scale high-performance liquid chromatography and/or capillary electrochromatography

17. K. Hosoya, Y. Kageyama, K. Yoshizako, K. Kimata, T. Araki, N. Tanaka, *J. Chromatogr. A*, **711** (1995) 247, Uniform-sized polymer-based separation media prepared using vinyl methacrylate as a cross-linking agent Possible powerful adsorbent for solid-phase extraction of halogenated organic solvents in an aqueous environment
18. J. Ugelstad, K.H. Kaggerud, K.H. Finn, A. Berge, *Macromol. Chem. Phys.*, **180** (1979) 737, Absorption of low molecular weight compounds in aqueous dispersions of polymer-oligomer particles, 2. A two step swelling process of polymer particles giving an enormous increase in absorption capacity
19. T. Nakashima, M. Shimizu, M. Kukizaki, *Key Eng. Mater.*, **61–62** (1991) 513, Membrane emulsification by microporous glass
20. J. Ugelstad, P.C. Mørk, K. HerderKaggerud, T. Ellingsen, A. Berge, *Adv. Colloid Interface Sci.*, **13** (1980) 101, Swelling of oligomer-polymer particles. New methods of preparation
21. G.T. Vladislavljević, I. Kobayashi, M. Nakajima, R.A. Williams, M. Shimizu, T. Nakashima, *J. Memb. Sci.*, **302** (2007) 243, Shirasu Porous Glass membrane emulsification: Characterisation of membrane structure by high-resolution X-ray microtomography and microscopic observation of droplet formation in real time
22. H. Murakami, T. Aoyanagi, Y. Miki, H. Tomita, Y. Esaka, Y. Inoue, N. Teshima, *Talanta*, **185** (2018) 427, Effects of hydrophilic monomers on sorptive properties of divinylbenzene- based reversed phase sorbents
23. H. Murakami, H. Tomita, T. Aoyanagi, T. Sugita, Y. Miki, Y. Esaka, Y. Inoue, N. Teshima, *Anal. Chim. Acta*, **1075** (2019) 106, Effects of pendant-like hydrophilic monomers on the adsorption properties of reversed-phase-type sorbents for solid-phase extraction
24. 富田 博貴, 杉田 崇, 村上 博哉, 江坂 幸宏, 井上 嘉則, 手嶋 紀雄, 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **69** (2020) 25, 極性化合物捕集用メタクリレート系逆相型固相抽出剤の調製と特性評価
25. SPGダイレクトコネクター取扱説明書, <http://www.geocities.jp/spgsub/spg-manual/manual-spg-dc-130910.pdf>
26. 田中真人, 懸濁重合におけるポリマー粒子直径制御, アイピーシー, 1993
27. H. Qu, F. Gong, G. Ma, Z. Su, *J. Appl. Polym. Sci.*, **105** (2007) 1632, Preparation and characterization of large porous poly (HEMA-co-EDMA) microspheres with narrow size distribution by modified membrane emulsification method
28. J. Brandrup, E.H. Immergut, *Polymer Handbook*, J. Wiley, 1989
29. D.W. van Krevelen, *Properties of polymers: their correlation with chemical structure, their numerical estimation and prediction from additive group contributions.*, Elsevier, 1989
30. 南條 昌史, 中島 忠夫, 日本化粧品技術者会誌, **31** (1997) 149, SPG膜乳化法によるO/Wエマルジョンの安定化
31. 鈴木 寛一, 科学と工業, **72** (1998) 238, 多孔質膜を用いる乳化技術とその特性
32. 田中 真人, 田中 英世, 木村 勇雄, 斎藤 夏風, 細貝 和彦, 化学工学論文集, **21** (1995)

118, スチレンの懸濁重合における粒径分布に及ぼす攪拌速度の段階的および連続的低下の影響

33. N. Fontanals, R.M. Marcé, P.A.G. Cormack, D.C. Sherrington, F. Borrull, *J. Chromatogr. A*, **1191** (2008) 118, Monodisperse, hypercrosslinked polymer microspheres as tailor-made sorbents for highly efficient solid-phase extractions of polar pollutants from water samples

第5章 市販汎用接着剤を用いて固相抽出剤粒子を成形する技術の開発と成形した吸着媒体の固相抽出特性評価

5.1 緒言

一般に、固相抽出剤は粒子状であり、カートリッジ等の管体に充填された状態で市販されている。ユーザーは、固相抽出カートリッジに試料や溶媒を通液させるだけで固相抽出が可能である。しかし、固相抽出剤の利用方法は、ほとんどの場合管体へ充填しての利用に限定されている。すなわち、固相抽出剤はアプリケーション展開が制限されていると言える。それだけでなく、通常の管体充填による利用においても種々の問題が生じている。微細な固相抽出剤粒子を管体へ充填、あるいは廃棄のために抜き取りをするときに、粒子の飛散や静電気による吸着などが生じるため非常に煩雑な操作が要求される。さらに、管体へ充填されたのちも、管体に振動や衝撃受けたり粒子が溶媒を吸収した際に膨潤・収縮したりすると、充填された固相抽出剤粒子間に空隙が生じてしまう。空隙の発生は、流動特性の低減やチャネリングを引き起こし、固相抽出回収率の低下を招くことがある。

上記の問題は、固相抽出剤粒子を成形することで解消可能である。本研究では、接合材料を用いて粒子を成形したものを吸着媒体と呼ぶ。固相抽出剤粒子をモノリス様の吸着媒体へと成形することで、粒子を管体へ充填したり廃棄のために抜き取ったりという煩雑な操作がなくなるため、固相抽出剤粒子の取り扱い性が大幅に向上する。また、固相抽出剤粒子は吸着媒体中で固定されるため、溶媒和や乾燥による固相抽出剤粒子の膨潤・収縮が惹起する固相抽出回収率の低下を抑制可能である。さらに、吸着媒体は管体に充填せずとも使用可能であるため、槽内への投入・回収や流路への挿入等、固相抽出剤粒子の使用用途を大幅に拡大できる。

固相抽出剤粒子を成形する技術として、低融点ポリエチレンを用いた焼結体¹⁻³や連続気孔を有する多孔質性のシリコン母材中に固相抽出剤粒子を内包させた固相抽出媒体⁴が報告されている。しかしながら、1.2でも述べたように、既存の粒子成形技術によって成形された吸着媒体は、吸着能・吸着容量が低いいため抽出担体としては固相抽出特性が不十分である。そのうえ、調製が簡便でない、形状多様性が低いといった問題も抱えている。以上のように、既存の成形技術には種々課題が存在しているため、粒子を成形する技術を新たに開発する必要があると考えた。

既存の吸着媒体の吸着能・吸着容量の低さは、吸着媒体中に内包する固相抽出剤粒子の含有率・含有量が低い、接合材料が吸着能をほとんどあるいは全く有していないという二点に起因している。既存の成形技術は、接合材料の骨格中に固相抽出剤粒子を囲い閉じ込

めるといふ手法で成形しているため、接合材料を固相抽出剤粒子よりも少ない割合でかつ多分の量を成形するのが困難であったと推測される。そこで、粒子間を点と点との最小限の接合材料で接合できれば、固相抽出剤粒子に対する接合材料の割合を減らしながら、かつ成形する粒子の量に制限もなくなると考えた。これを実現するための接合材料として、材料そのものが接着能を有する接着剤に注目した。また、接着剤の主成分は変成シリコーンやエポキシ樹脂、ウレタンおよびスチレンブタジエンゴム等である。これらの成分は、固相抽出剤粒子のそれと比較すると明確に低いものの、疎水性相互作用を発現する。そのため、成形による吸着能の低減を抑制するものとして期待された。

市販接着剤を用いて固相抽出剤粒子を成形する技術⁵を確立し、本手法により成形した吸着媒体を成形型固相抽出媒体（molding-type solid-phase extraction media, M-SPEM）⁶と名付けた。M-SPEMは、固相抽出剤粒子と市販の接着剤を混練後、加熱硬化させるだけで簡便に調製できる。混練工程における操作はスパチュラを用いた練り合わせであり、加熱工程における条件は常圧下、開放系であるため、M-SPEMの調製には特殊な技術および装置を必要としない。さらに、成形用の金型を変更するだけで、固相抽出剤粒子を多様な形状、大きさのM-SPEMへと成形可能である。また本成形技術は、第2章で開発した約 $800\text{ m}^2\text{ g}^{-1}$ の比表面積を有する逆相分配系の固相抽出剤粒子を85%（w/w）も含有する吸着媒体を調製可能であった。このような特徴により、M-SPEMは、既存の吸着媒体に対して、調製方法の簡便さ、形状多様性および粒子状含有率に利点を有する。

本研究では、成形に使用する市販接着剤の種類や固相抽出剤粒子の含有率、含有させる固相抽出剤粒子の粒子直径を変更したM-SPEMを試作した。これらのM-SPEMについて、極性化合物を被検成分とした逆相分配条件下の固相抽出に供して固相抽出特性を評価した。また、比表面積および通液性についても評価を行い、M-SPEMの各種特性を成形していない固相抽出剤粒子と比較した。

5.2 実験

5.2.1 試薬

固相抽出剤の合成および洗浄，固相抽出剤の固相抽出特性評価のための被検成分および溶媒には第2章と同様の試薬を使用した。モノマーとして用いた純度80%のジビニルベンゼン (divinylbenzene, DVB, technical grade, 重合禁止剤として 1000 ppm *p*-tert-butylcatechol 含有) はシグマアルドリッチジャパン合同会社から，トリメチロールプロパントリメタクリラート (trimethylolpropane trimethacrylate, TMPT, 重合禁止剤として MEHQ 含有, 純度 >90.0%) は東京化成工業株式会社から購入した。DVB 中に含まれる重合禁止剤 (*p*-tert-butylcatechol) の除去に用いた水酸化ナトリウム (sodium hydroxide, 試薬特級, 純度 >97.0%), 細孔調節剤としてのトルエン (toluene, TOL, 試薬特級, 純度 >99.5%), 重合開始剤としての 2,2'-アゾビス (イソブチロニトリル) (2,2'-azobis (isobutyronitrile), AIBN, 和光特級, 含量 >98.0%), 懸濁安定剤としてのメチルセルロース 50 (methyl cellulose, 化学用, 粘度 40~60 mPa·s, メトキシ基 20~33%) は, 富士フイルム和光純薬株式会社から購入した。固相抽出剤の洗浄に用いたソルミックス AP-7 (エタノール 85.5±1.0%, イソプロピルアルコール <5.0%, ノルマルプロピルアルコール 9.6±0.5%, 水分 <0.2%) は日本アルコール販売株式会社から, 酢酸エチル (ethyl acetate, 特級, 純度 >99.5%) およびメタノール (methanol, 高速液体クロマトグラフィー用, 純度 >99.8%) は関東化学から購入した。固相抽出特性評価において, 被検成分として用いたウラシル (uracil, Ura, 純度 >98.0%), ウリジン (uridine, U, 純度 >98.0%) およびアデノシン (adenosine, A, 純度 >99.0%) は東京化成工業株式会社から, アデニン (adenine, Ade, 和光一級, 含量 >95.0%) およびテオフィリン (theophylline, The, 和光一級, 含量 >99.0%) は富士フイルム和光純薬株式会社からそれぞれ購入した。超純水は PURELAB flex-3 (ヴェオリア・ジェネッツ株式会社 エルガ・ラボウォーター事業部) で精製したものをを用いた。

M-SPEM を成形するために用いた接着剤の名称および製品番号を表 5.2.1-1 に示す。接着剤 Nos. 1~3, 10 はセメダイン株式会社, Nos. 4~9 はコニシ株式会社の製品であり, それぞれ以下のように略称を設定した。変成シリコーン系接着剤である Nos. 1~3 を Si-B, Si-C, Si-S; エポキシ樹脂と硬化剤から成る二液系接着剤である Nos. 4~6 を Epoxy-AA, Epoxy-A, Epoxy-T; 溶剤系接着剤である Nos. 7, 8 を SBR, PVC; ウレタン系樹脂を主成分とする接着剤である No. 9 を Urethane; 瞬間接着剤である No. 10 を Instant とした。

5.2.2 装置

固相抽出剤粒子および M-SPEM の固相抽出特性評価には, 以下に示す HPLC システムを

使用した。いずれも日本分光株式会社の AS-4050 オートサンプラー, PU-2085 ポンプ, DG-2085-53 脱気装置, CO-2065 Plus カラムオープンおよび UV-2070 紫外可視検出器を用いた。分離カラムとして, Ura, U および Ade の評価には InertSustain® AQ-C18 (3 μm , 150 \times 2.0 mm I.D., ジーエルサイエンス株式会社), A, The, Caf, MP および DMP の評価には InertSustain® AQ-C18 (5 μm , 150 \times 2.0 mm I.D., ジーエルサイエンス株式会社) を用いた。分離条件はそれぞれ, 流速, 0.2 mL min^{-1} ; 移動相, 5 % (v/v) メタノール (Ura, U, Ade), 15 % (v/v) メタノール (A, The), 50 % (v/v) メタノール (Caf, MP, DMP); カラム温度, 40 $^{\circ}\text{C}$; 注入体積, 10 μL とした。固相抽出剤粒子および M-SPEM の比表面積を測定するために TriStar II surface area and porosity analyzer (Micromeritics Instrument Corporation) を用いた。M-SPEM の表面を観察するために用いた電界放出形走査電子顕微鏡 (field emission scanning electron microscope, FE-SEM) は, JSM-6335F (日本電子株式会社) を用いた。

5.2.3 固相抽出剤粒子の調製

懸濁重合法を用いて, 第 2 章および既報⁷と同様の固相抽出剤粒子 (80 %DVB/TMPT (80/20)_2TOL) を調製した。固相抽出剤粒子の合成および洗浄の方法は第 2 章と同様である。DVB と TMPT を 80 : 20 (モル比) で混合した溶液に, 細孔調節剤としてトルエンをモノマー混合溶液の重量の 2 倍量添加した。これらのモノマーと細孔調節剤の混合溶液 (分散相) に, 分散相の重量の 1 % (w/w) の AIBN を添加した。0.2 % (w/v) メチルセルロース水溶液に分散相を加えたのち, 攪拌モーターを用いて 500 rpm で攪拌して O/W エマルションを生成させた。その後, 78 $^{\circ}\text{C}$, 250 rpm で 6 時間加熱攪拌することで, 共重合体 DVB/TMPT を得た。得られた共重合体は, 過剰量の超純水, ソルミックス, メタノールおよび酢酸エチルで洗浄した後, 風乾した。その後, 篩を用いて粒子直径 53~90, 90~150 μm に分級した。

表 5.2.1-1 各接着剤の製品名，略称及び構成成分と M-SPEM の成形性及び通液性

No.	製品名	製品番号	略称	接着剤の構成成分		M-SPEM の成形性及び通液性			
				主成分	添加剤もしくは硬化剤	粒子状含有率			
						15 %	50 %	67 %	85 %
1	スーパーXブラック	AX-035	Si-B	変成シリコーン	無機充填剤 パラフィン	△	○	○	○
2	スーパーXクリア	AX-041	Si-C	変成シリコーン	パラフィン	△	△	○	●
3	POS シールマルチ	SL-619	Si-S	変成シリコーン	無機充填剤 アクリル樹脂	△	×	×	×
4	Eセット	#16023	Epoxy-AA	エポキシ樹脂	ポリアミドアミン	△	○	○	○
5	MOS8	#04975	Epoxy-A	エポキシ樹脂	3級アミン 変成シリコーン	△	○	×	×
6	クイック 30	#16223	Epoxy-T	エポキシ樹脂	ポリチオール， 3級アミン	△	×	×	×
7	GP クリヤー	#14372	SBR	スチレンブタジエン	シクロヘキサン	△	○	×	×
8	ボンドビニル用	#11023	PVC	塩化ビニル	アセトン 酢酸ブチル	△	×	×	×
9	ウルトラ多用途 SU プレミアムソフトクリヤー	#05139	Urethane	シリル化ウレタン	詳細不明	△	△	○	●
10	3000KX 多用途	CA-061	Instant	2-シアノアクリル酸エチル	アクリル樹脂	×	×	×	×

○：成形可能かつ通液可能，△：成形可能だが通液不可，×：成形不可，●：成形可能かつ通液可能であるが固相抽出後に崩壊

5.2.4 M-SPEM の調製

固相抽出剤粒子(100 mg)と接着剤(17, 50, 100 mg)をそれぞれ秤量したのち、スパチュラでよく混練した。図 5.2.4-1 に示すように、混練物をポリエチレン製のフリットで挟み、内径 8.8 mm、高さ 10 mm の円柱状キャビティを有する PP 製

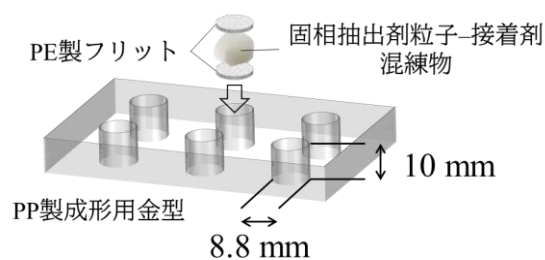


図 5.2.4-1 M-SPEM の採型の様子

の成形用金型に挿入した。金型ごと混練物を乾燥機に投入し、50 °C で 14 時間加熱した。加熱終了後、金型から媒体を取り出して M-SPEM を得た。上述した M-SPEM の径は、固相抽出評価に用いる 3 mL シリンジバレル型カートリッジの内径に合わせたものである。

5.2.5 細孔物性評価用の M-SPEM の調製

比表面積を測定するためのサンプルセルの内径は 5 mm であり、5.2.4 で調製した M-SPEM は直径 (8.8 mm) が大きく、サンプルセルに挿入できないため、比表面積測定用に小さなサイズの M-SPEM を調製した。M-SPEM 調製のための試薬や操作に関する条件は変更することなく、内径 4 mm、高さ 10 mm の円柱状キャビティを有する成形用金型ものに変更した。この成形用金型を用いて 6 個の M-SPEM を調製し、合計で約 200 mg の M-SPEM を 1 回の比表面積測定に供した。

5.2.6 固相抽出特性の評価

逆相分配条件下での固相抽出により、極性化合物を被検成分として、固相抽出特性を評価した。M-SPEM 1 ピース (約 100 mg) を 3 mL エンプティカートリッジに充填し、これを評価用の固相抽出カートリッジとした。併せて、固相抽出剤粒子 (100 mg) を充填した比較評価用の固相抽出カートリッジも調製した。各固相抽出カートリッジにメタノール (3 mL)、純水 (50 mL) の順に通液してコンディショニングした。この時、カートリッジに通液した純水の流量を測定し、通液性評価を行った。固相抽出の試料溶液は (Ura, U, Ade), (A), (Caf, MP, DMP) の 3 組に分けた。各 100 mg L⁻¹ 試料水溶液 (1.5 mL) を固相抽出カートリッジに負荷して、試料負荷通過液 (Passed) を採取した。続いて、メタノール (1.5 mL) を用いて固相抽出剤に捕捉された被検成分の溶出液 (Eluted) を採取した。Passed と Eluted を 10 倍希釈したのち、HPLC 測定に供して固相抽出回収率を求めた。

5.3 結果および考察

5.3.1 接着剤の構成成分の影響

接着剤の種類による M-SPEM 調製の能否や通液性、固相抽出特性への影響を調査した。接着剤 (100 mg) と粒子直径 90~150 μm の固相抽出剤粒子 (100 mg) を用いて、固相抽出剤粒子を 50% (w/w) 含有する 50%_M-SPEM の調製について検討した。その結果、表 5.2.1-1 に示すように、Si-B, Si-C, Epoxy-AA, Epoxy-A, SBR および Urethane (Nos. 1, 2, 4, 5, 7, 9) は通液性を有する 50%_M-SPEM を調製可能であった (表 5.2.1-1 にて○で示す)。

Si-C および Urethane (Nos. 2, 9) は 50%_M-SPEM を調製可能であったがこれらは通液性を有していなかった (表 5.2.1-1 にて△で示す)。そこで、通液できなかった 50%_M-SPEM_Si-C および 50%_M-SPEM_Urethane (Nos. 2, 9) の断面を観察した。図 5.3.1-1 に示すように、通液不可であった M-SPEM は、見かけ上、内包粒子間の空隙は接着剤によって密に充填され、連通孔は確認されなかった。

Si-S, Epoxy-T, PVC および Instant (Nos. 3, 6, 8, 10) は、50%_M-SPEM を調製できなかった (表 5.2.1-1 にて×で示す)。このうち、Si-S, Epoxy-T および PVC は、接着剤重量を 100 mg より増加させて、接着剤の量が固相抽出剤粒子よりも多い条件 (粒子含有率 15% (w/w)) であれば、通液性は有していなかったものの、15%_M-SPEM を調製できた。しかしながら、Instant だけは 15%_M-SPEM さえも調製できなかった。Instant は検討した接着剤の中で唯一液状であり、他接着剤は全てペースト状であった。接着剤が粘度の低い液状である場合、接着剤は固相抽出剤粒子表面に留まることなく固相抽出剤粒子の細孔内部にも浸透すると推定される。そのため、固相抽出剤粒子表面に留まりにくいと推測される

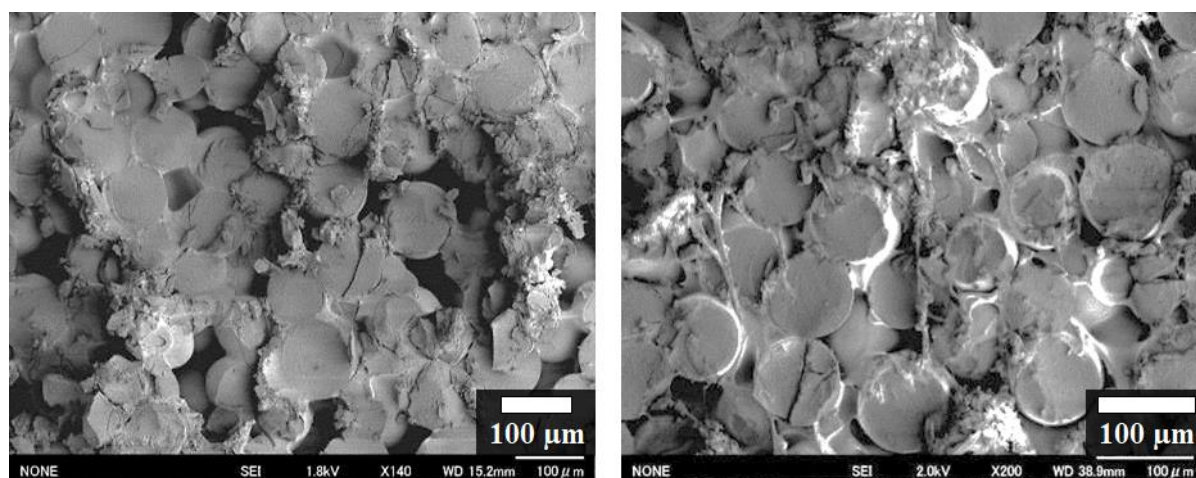


図 5.3.1-1 通液が困難であった 50%_M-SPEM_Si-C (左図) および 50%_M-SPEM_Urethane (右図) の断面の FE-SEM 撮影図

Instant は固相抽出剤粒子間を固定することができず，M-SPEM を調製できなかつたものと判断した。このことから，固相抽出剤粒子を固定するためには，ペースト様の粘度を有することが接着剤の要件のひとつであると推定した。

接着剤の主成分に注目すると，Si-B，Si-C および Si-S (Nos. 1~3) はいずれも主成分が変成シリコンであるにもかかわらず M-SPEM 調製の能否に差異が生じた。これらの接着剤の安全データシートを参照すると，変成シリコンの他に，無機質充填剤，パラフィン等などが配合されており，その配合比はそれぞれ異なっている。3 種の変成シリコン系接着剤のうち，M-SPEM を調製できた Si-B の構成成分は，変成シリコン（60~70 %），無機質充填材（30~40 %），パラフィン（1~10 %），Si-C の構成成分は，変成シリコン（80~90 %），パラフィン（1~10 %）であった。一方，M-SPEM を調製できなかつた Si-S の構成成分は，変成シリコン（20~30 %），無機質充填材（50~60 %），パラフィン（1~5 %）で，無機質充填材に対して変成シリコンの配合比が低かつた。本検討の結果から，変成シリコンが固相抽出剤粒子の固定能力を発現していると考えられるため，変成シリコンの配合比が低い Si-S では 50 %_M-SPEM を調製できなかつたと推測した。この結果から，M-SPEM 調製の能否は接着剤の主成分の種類と共に，添加剤の種類や配合量にも影響されるものと考えられる。

続いて，固相抽出によって 50 %_M-SPEM の固相抽出特性を評価した。その結果を図 5.3.1-2 に示す。なお比較のために，接着成形していない固相抽出剤粒子 DVB/TMPT の結果を追加した。Passed は固相抽出剤を通過した試料溶液を HPLC 測定に供したものであり，固相抽出剤に捕捉されずに通過した被検成分の割合を示す。Eluted は溶出液（メタノール）を HPLC 測定に供したものであり，固相抽出剤に抽出された後に溶出液中に回収された被検成分の割合を示す。成形していない固相抽出剤粒子は，3 種類の被検成分を完全に捕捉・溶出した。一方，この固相抽出剤粒子を成形した 50 %_M-SPEM は，一部を除き，Passed と Eluted の合算値が 80 %に満たず，固相抽出後に 20 %以上の被検成分が 50 %_M-SPEM へ残存した。また，50 %_M-SPEM_Epoxy-A においては，MP の Passed と Eluted の合算値が異常に低い傾向が観察され，特異的に吸着することがわかつた。以上の結果より，50 %_M-SPEM は内包する固相抽出剤粒子の固相抽出特性をほとんど引き出すことができず，接着剤が固相抽出特性に著しく影響することが明らかとなつた。

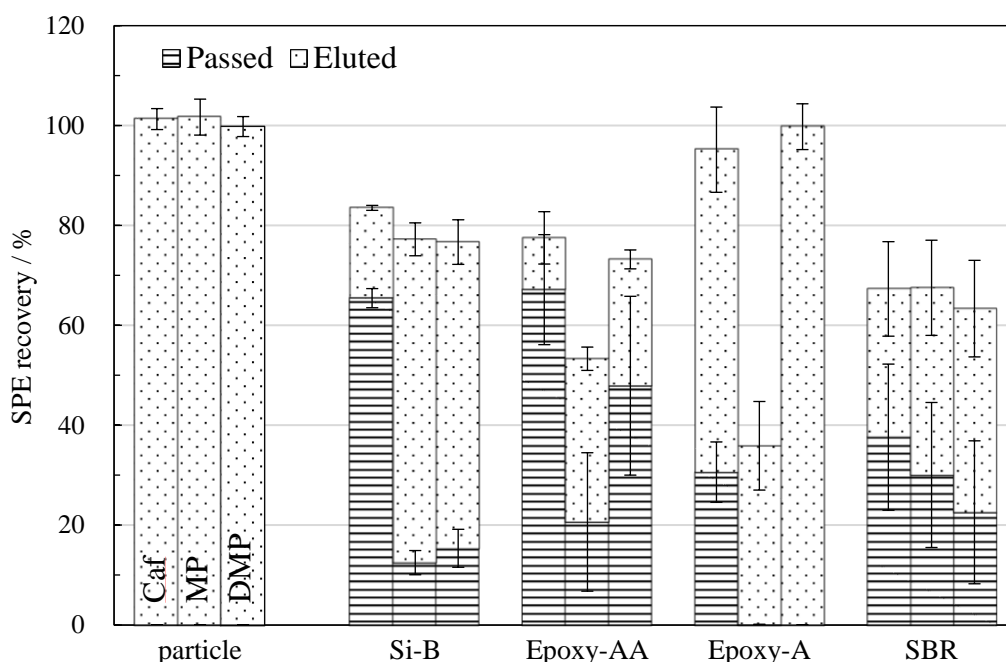


図 5.3.1-2 固相抽出剤粒子および接着剤の種類が異なる 50 %_M-SPEM における各被検成分の固相抽出回収率

5.3.2 固相抽出剤粒子含有率の影響

M-SPEM の固相抽出特性を改善するために、M-SPEM に内包する固相抽出剤粒子の含有率向上を検討した。混練する固相抽出剤粒子の重量を 100 mg に固定したまま、接着剤の重量を 100 mg から 50 mg および 17 mg に減らすことで、固相抽出剤粒子を 67 % (w/w) あるいは 85 % (w/w) 含有する M-SPEM、すなわち 67 %_M-SPEM および 85 %_M-SPEM を調製した。通液性を有する 50 %_M-SPEM を調製可能であった接着剤 Si-B, Epoxy-AA, Epoxy-A および SBR のうち、Si-B と Epoxy-AA は 67 % および 85 %_M-SPEM を調製可能であった。一方、Si-C および Urethane は通液性を有する 50 %_M-SPEM を調製できなかったが、67 % および 85 %_M-SPEM を調製可能であった。また、これらの M-SPEM は通液性を有していた。

粒子含有率が異なる M-SPEM の断面を FE-SEM によって観察した。50 % および 85 %_M-SPEM_Si-B の断面の FE-SEM 撮影図を図 5.3.2-1 に、50 % および 85 %_M-SPEM_Epoxy-AA の断面の FE-SEM 撮影図を図 5.3.2-2 に示す。M-SPEM_Si-B, _Epoxy-AA 共に、50 %_M-SPEM は接着剤が内包粒子間の空隙を密に充填して、ほとんど多孔性を有していない様子であり、固相抽出剤粒子は接着剤によって被膜状に厚く覆われていた。これに対して 85 %_M-SPEM は、接着剤による粒子間隙の充填が軽減され、見かけの多孔性が向上していた。

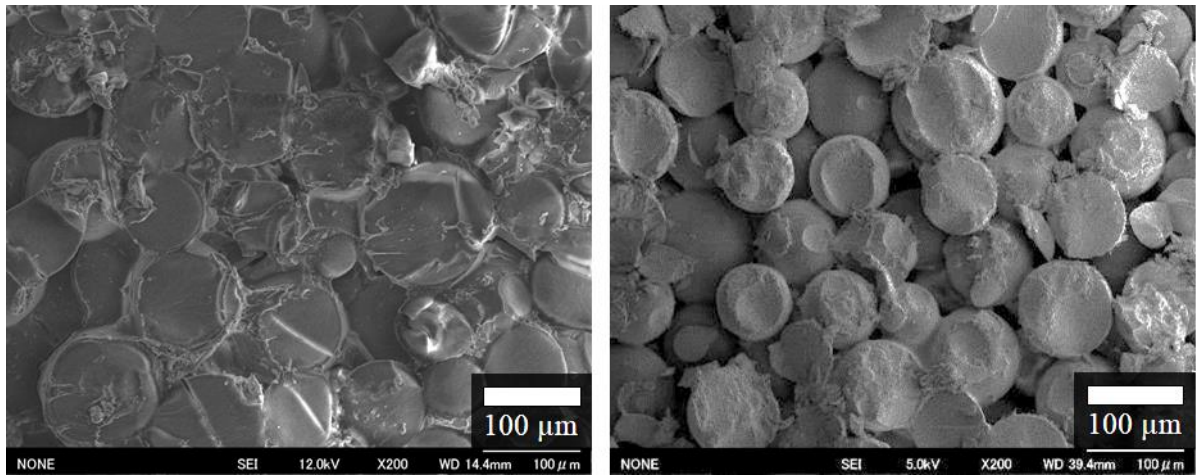


図 3.3.2-1 50 %_M-SPEM_Si-B (左図) と 85 %_M-SPEM_Si-B (右図) の断面の FE-SEM 撮影図

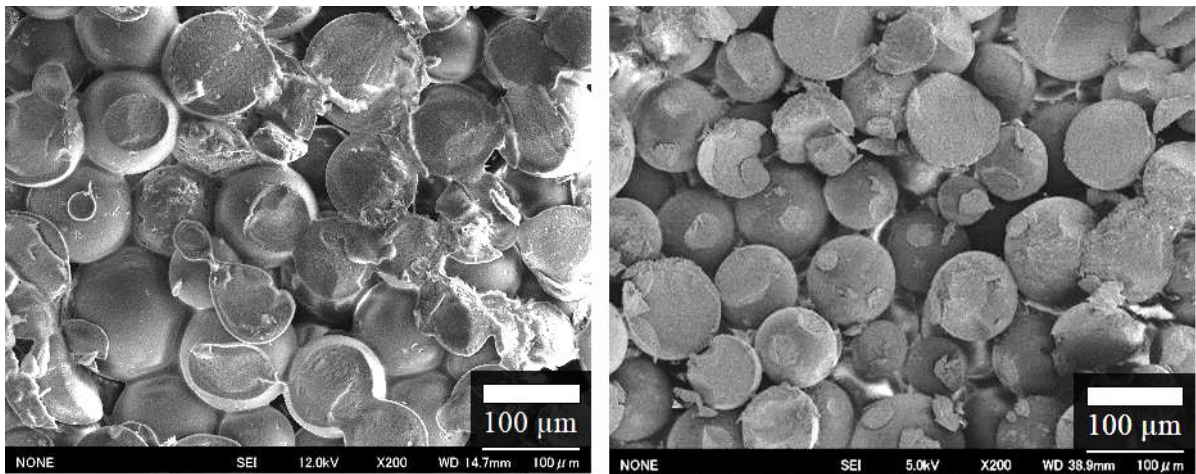
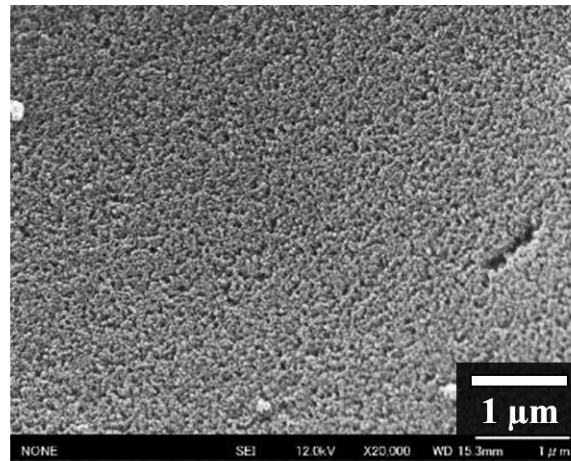
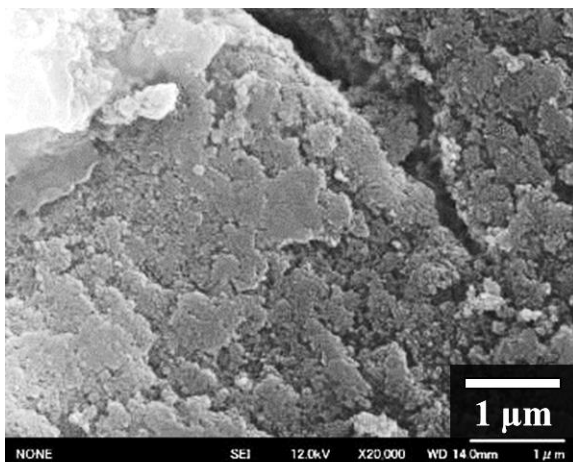


図 5.3.2-2 50 %_M-SPEM_Epoxy-AA (左図) と 85 %_M-SPEM_Epoxy-AA (右図) の断面の FE-SEM 撮影図

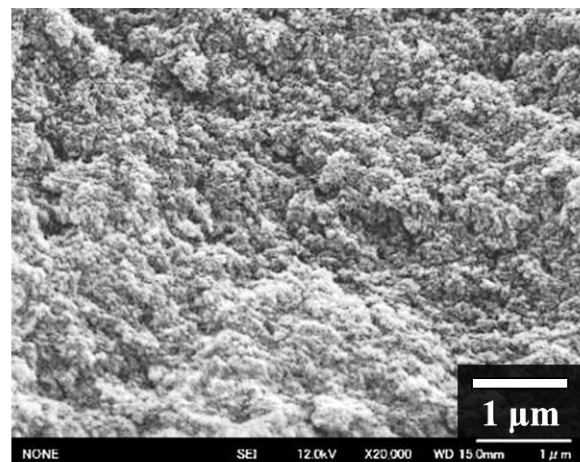
50%および85%_M-SPEM_Si-Bの断面を観察した図5.3.2-1(200倍)をさらに拡大して、M-SPEMに内包された粒子の表面を観察した(図5.3.2-3, 20,000倍)。成形をしていない固相抽出剤粒子(図5.3.2-3上図)と比較すると、M-SPEMに内包された固相抽出剤粒子表面の様子(図5.3.2-3下図)は明らかに異なっており、50%および85%_M-SPEM_Si-B共に、固相抽出剤粒子は接着剤によって被膜状に覆われていた。M-SPEMの粒子含有率について比較すると、見かけ上は、50%_M-SPEM_Si-Bの方が固相抽出剤粒子を接着剤が分厚く被膜した様子であり、85%_M-SPEM_Si-Bに内包された固相抽出剤粒子表面の方が多孔性に優れていた。



成形していない粒子状固相抽出剤



50%_M-SPEM_Si-B



85%_M-SPEM_Si-B

図 5.3.2-3 固相抽出剤と 50 %, 85 %_M-SPEM_Si-B 表面の FE-SEM 撮影図

Si-B, Si-C, Epoxy-AA および Urethane の 4 種の接着剤で成形した合計 8 種類の 67 % および 85 %_M-SPEM について固相抽出特性を評価した。ただし, 85 %_M-SPEM_Si-C, _Urethane (Nos. 2, 9) は, 固相抽出後に M-SPEM をカートリッジから取り出すと, M-SPEM が崩壊したため, これらは以降の検討から排除した (表 5.2.1-1 にて●で示す)。Caf, MP および DMP に対する固相抽出剤粒子と各 67 %_M-SPEM および 85 %_M-SPEM の固相抽出回収率を図 5.3.2-4 に示す。M-SPEM_Si-B, Epoxy-AA に注目すると, 粒子含有率が向上するにつれて固相抽出特性が大幅に向上し, 85 %_M-SPEM_Si-B, _Epoxy-AA は, Caf, MP および DMP に対して固相抽出剤粒子と同等の固相抽出特性を示した。また, 85 %_M-SPEM の固相抽出回収率の再現性も固相抽出剤粒子に近い値を示した。50 % および 67 %_M-SPEM_Epoxy-AA で確認された MP の特異吸着についても, 85 %_M-SPEM_Epoxy-AA では解消された。一方, 67 %_M-SPEM_Si-C, _Urethane は, 固相抽出特性の傾向が M-SPEM_Si-B と類似していたが, 溶出工程終了後に全ての被検成分が約 20 % ほど M-SPEM 中に残存

した。

粒子含有率の向上につれて、Passed と Eluted の合算値が 100 % に近づいたこと、接着剤が固相抽出剤粒子を被膜状に覆う様子が見かけ上軽減されたことの二点を考慮すると、M-SPEM の固相抽出特性を低減させている要因は、接着剤による被検成分—固相抽出剤粒子間の物質移動の阻害、すなわち被検成分と固相抽出剤粒子間の接触効率の低下であると推定された。50 % および 67%_M-SPEM のように、粒子含有率が低い（接着剤の割合が多い）場合、試料負荷時には固相抽出剤粒子への被検成分の移行が接着剤に阻害されて漏出し（Passed の向上）、溶出時には固相抽出剤粒子に捕捉された被検成分を速やかに溶出できなかった（Eluted の低下）ものと判断した。また、M-SPEM_Epoxy-AA で確認された被検成分 MP の特異的な吸着についても、粒子含有率の向上によって特異吸着が抑制されたことから、接着剤に含まれる成分によって特異吸着が生じていたものと考えられる。接着剤 Epoxy-AA はエポキシ樹脂とポリアミドアミンによって構成され、接着のための硬化反応では、エポキシ基とアミンとの反応部位はカチオン性を有するためイオン交換能を示す。この時、MP の pKa は 8.4 であるため、一部の解離した MP に対してイオン交換的吸着が寄与することで特異吸着が生じたのではないかと推測される。

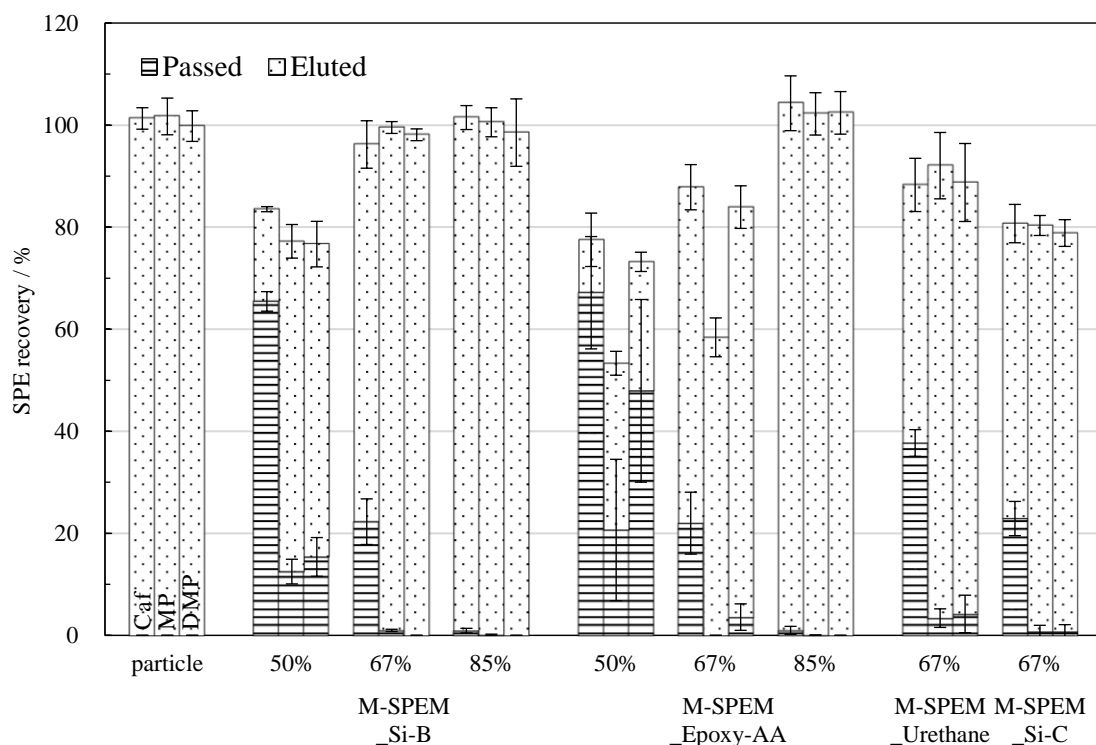


図 5.3.2-4 固相抽出剤粒子および粒子含有率が異なる M-SPEM における各被検成分の固相抽出回収率

5.3.3 固相抽出剤粒子の粒子直径の影響

これまで M-SPEM の調製に用いた固相抽出剤粒子の直径が 90~150 μm であるのに対して、一般に固相抽出で汎用される固相抽出剤の粒子直径は 30~70 μm である⁸。固相抽出剤粒子の粒子直径の違いによって、調製される M-SPEM の種々の特性に影響することが推測された。そこで、M-SPEM に含有される固相抽出剤粒子の粒子直径による影響を調査した。粒子直径 53~90 μm の固相抽出剤粒子を用いて 85 %_M-SPEM_Si-B および 85 %_Epoxy-AA を試作し、それぞれの固相抽出特性、細孔物性および通液速度を評価した。

M-SPEM の結果を示す前に、粒子直径が異なる固相抽出剤粒子による被検成分の固相抽出回収率を図 5.3.3-1 に示す。極性化合物に対する固相抽出特性を比較するために、これまで使用した被検成分 (Caf, MP および DMP) よりも極性が高い 5 種類の被検成分 (Ura, U, Ade および A) を追加した。図中の被検成分の並びは、逆相分配モード HPLC における溶出順、つまり左から極性の高い順とした。固相抽出剤粒子の固相抽出回収率は、粒子直径の違いによらず全ての被検成分に対して概ね同様であり、Ade から DMP の被検成分を完全に捕捉・溶出した。

続いて、粒子直径が異なる固相抽出剤粒子を成形した 85 %_M-SPEM_Si-B の固相抽出回収率を図 5.3.3-2 に、85 %_M-SPEM_Epoxy-AA の固相抽出回収率を図 5.3.3-3 に示す。粒子状固相抽出剤と比較すると、85 %_M-SPEM_Si-B/53~90 μm では極性化合物に対する固相抽出回収率の低減が確認されたものの、85 %_M-SPEM_Si-B/90~150 μm および 85 %_M-SPEM_Epoxy-AA/53~90 μm 、/90~150 μm は、全ての被検成分に対して固相抽出剤粒子と概

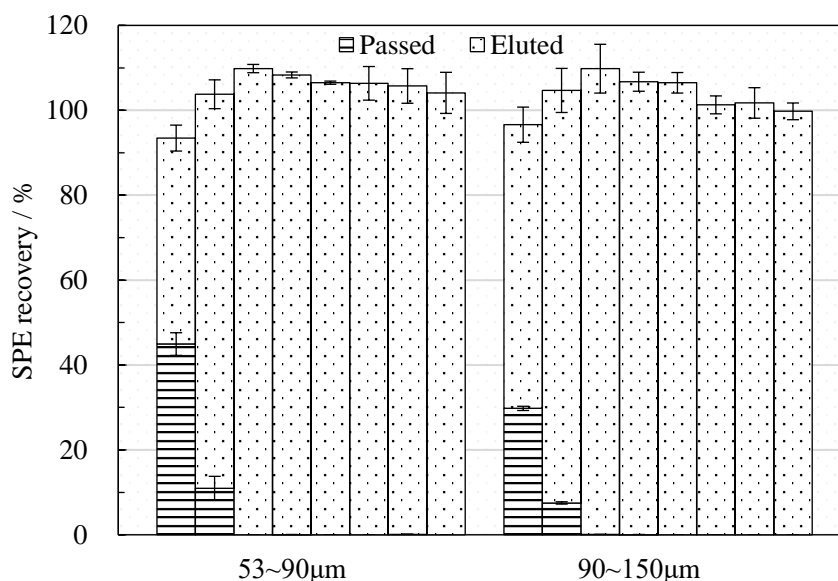


図 5.3.3-1 粒度分布が異なる固相抽出剤粒子における各被検成分の固相抽出回収率
被検成分：左から Ura, U, Ade, A, The, Caf, MP, DMP

ね同等の固相抽出回収率を示した。M-SPEM に内包した固相抽出剤粒子の粒子直径による固相抽出特性への影響について、85 %_M-SPEM_Si-B では、粒子直径が大きい 85 %_M-SPEM_Si-B/90~150 μm の方が高い固相抽出回収率を示した一方で、85 %_M-SPEM_Epoxy-AA では、固相抽出剤粒子の粒子直径の違いによる固相抽出回収率における有意な差は確認されなかった。

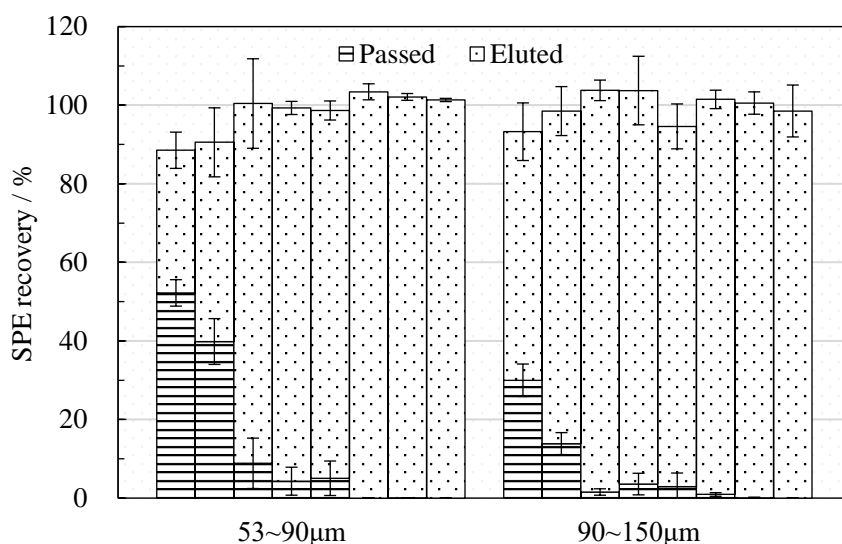


図 5.3.3-2 粒度分布が異なる固相抽出剤粒子を成形した 85 %_M-SPEM_Si-B における各被検成分の固相抽出回収率
被検成分：左から Ura, U, Ade, A, The, Caf, MP, DMP

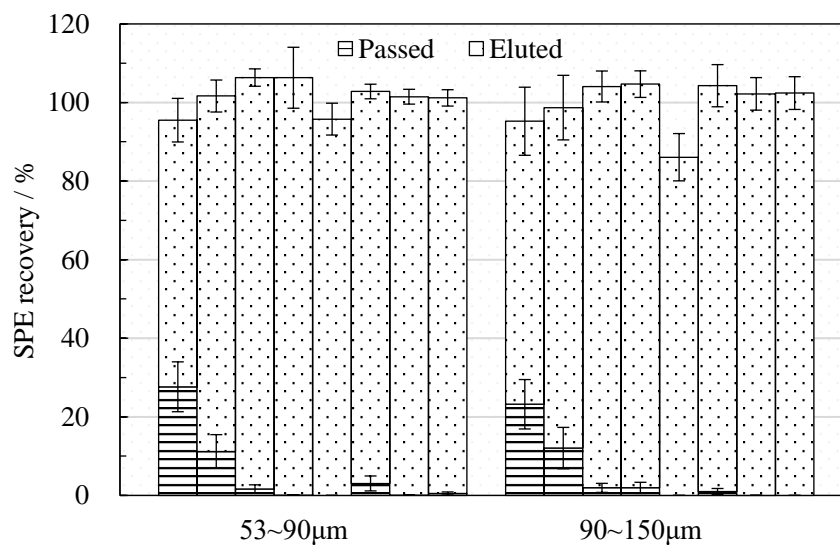


図 5.3.3-3 粒度分布が異なる固相抽出剤粒子を成形した 85 %_M-SPEM_Epoxy-AA における各被検成分の固相抽出回収率
被検成分：左から Ura, U, Ade, A, The, Caf, MP, DMP

固相抽出特性は固相抽出剤の化学的特性だけでなく比表面積にも影響されるため、粒子直径が異なる固相抽出剤粒子を用いて調製した M-SPEM および固相抽出剤粒子の比表面積、通液速度および各 M-SPEM の寸法を測定した結果を表 5.3.3-1 に示す。有効比表面積割合は、固相抽出剤含有率で補正された値であり、M-SPEM に内包された固相抽出剤粒子の比表面積の残存率の割合を示している。比表面積について、85 %_M-SPEM_Si-B は $571.6 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ 、85 %_M-SPEM_Epoxy-AA は $465.4 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ であり、固相抽出剤粒子を成形したことによる比表面積残存率を示す有効比表面積割合は、それぞれ 80 % および 65 % であった。成形によって比表面積が低減したことから、接着剤は固相抽出剤粒子の細孔を閉塞していることが明らかとなった。吸着媒体の細孔物性について公開している報告がほとんどないため詳細な比較は困難であるが、既存の吸着媒体の比表面積は概ね $100 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ であるため、M-SPEM は吸着媒体としては優れた細孔物性を示した。また、固相抽出では $500 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ が好適とされており、85 %_M-SPEM は固相抽出剤としても十分な比表面積を有している。粒子直径による影響に注目すると、85 %_M-SPEM/53~90 μm の比表面積は 85 %_M-SPEM/90~150 μm に対して 15~20 % 低下し、有効比表面積割合も 10 % 低下した。

通液性について、85 %_M-SPEM/90~150 μm は粒子直径 90~150 μm の固相抽出剤粒子と同等の流量を示した一方で、85 %_M-SPEM/53~90 μm は粒子直径 53~90 μm の固相抽出剤粒子よりも高い流量を示した。通液速度については、粒子直径が小さくなることで通液性は低下するものと推定されたが、85 %_M-SPEM/53~90 μm の通液速度は、85 %_M-SPEM/90~150 μm よりも低下したものの、同じ粒子直径分布の固相抽出剤粒子を充填した SPE カートリッジよりも高い流量を示した。以上の結果から、吸着特性、細孔物性および通液性のいずれも 85 %_M-SPEM/90~150 μm が最も固相抽出剤粒子に近い値を示した。

固相抽出剤粒子の固相抽出回収率と比表面積は、粒子直径の分布帯に依らず概ね一定であったにもかかわらず、85 %_M-SPEM では粒子直径によってこれらの物性値が変化した。M-SPEM では、粒子直径を小さくすることで、比表面積および固相抽出回収率の向上が期

表 5.3.3-1 粒子直径が異なる固相抽出剤粒子と粒子直径が異なる固相抽出剤粒子を成形した M-SPEM の細孔物性及び流速

Sorbent	Particle diameter / μm	BET surface area / $\text{m}^2 \text{ g}^{-1}$	Effective surface area ratio / %	Flow rate / mL min^{-1}
Particulate sorbent	53~90	852.5	—	0.51
	90~150	833.8	—	1.33
85 %_M-SPEM_Si-B	53~90	500.0	69	0.94
	90~150	571.6	80	1.28
85 %_M-SPEM_Epoxy-AA	53~90	382.4	53	1.02
	90~150	465.4	65	1.48

待されたが、期待に反する結果となった。そこで、85 %_M-SPEM の重量および形状寸法を計測した（表 5.3.3-2）。粒子直径が小さくなるにつれて 85 %_M-SPEM の重量が低下しており、M-SPEM 調製時に固相抽出剤粒子の損失が生じて、粒子含有率（M-SPEM の重量）が低下したと判断した。調製時というのは、固相抽出剤粒子と接着剤を混練するときの固相抽出剤粒子の飛散や、器具等への混練物の残存を指す。この固相抽出剤含有率の低下は、M-SPEM の比表面積および固相抽出回収率の低下の原因となる。M-SPEM 調製時の固相抽出剤粒子の損失は、固相抽出剤粒子の飛散や静電気による吸着が原因であると考えられ、操作環境の改善が必要である。

表 5.3.3-2 粒子直径が異なる粒子状固相抽出剤を成形した 85 %_M-SPEM_Si-B および 85 %_M-SPEM_Epoxy-AA の寸法

Sorbent	Particle diameter / μm	Weight / mg	Width / mm	Height / mm
85 %_M-SPEM_Si-B	53~90	87	8.8	4.2
	90~150	97	8.8	4.9
85 %_M-SPEM_Epoxy-AA	53~90	89	8.8	4.3
	90~150	108	8.8	5.5

5.4 結言

本研究では、固相抽出剤粒子の捕捉能や細孔物性、通液性等を極力損なうことなく、吸着媒体へと成形する技術を開発した。本成形技術によって固相抽出剤粒子を成形した成型型固相抽出媒体（molding-type solid-phase extraction medium, M-SPEM）は、固相抽出剤粒子と市販接着剤とを混練して加熱固化させるだけで簡便に調製できる。適切な成分と配合比を持つ変成シリコン系およびエポキシ系接着剤を用いることで、固相抽出剤粒子を 85 % (w/w) 含有し、固相抽出に適用可能な $400\sim 500\text{ m}^2\text{ g}^{-1}$ の比表面積を有する M-SPEM を調製可能であった。固相抽出により M-SPEM の逆相分配条件下における極性化合物に対する固相抽出特性を評価した結果、粒子直径 $90\sim 150\text{ }\mu\text{m}$ の固相抽出剤粒子を 85 % (w/w) 内包した M-SPEM は、固相抽出剤粒子と同等の固相抽出特性を示した。この結果より、M-SPEM は固相抽出剤として十分に有用な吸着能および吸着容量を有していると判断された。

M-SPEM は形態多様化が容易であり、固相抽出以外にも多種多彩な用途へ適用可能である。例えば、近年 PDMS-sol への被覆硬化⁹や接着剤¹⁰により固相抽出剤粒子 OASIS[®] HLB を bar に固定した stir-bar が報告されている。これらの技術を基に、M-SPEM を bar に固定できれば固相抽出剤粒子を多分に担持する stir-bar を調製可能となり、SBSE における吸着容量を向上できるものと考えられる。今後 M-SPEM の確立によって、これまで管体に充填しての利用に限られていた固相抽出剤粒子の多岐に亘る用途・場面への応用が期待される。

参考文献

1. S. Kagaya, T. Katoh, M. Saito, M. Ohki, R. Shirota, Y. Saeki, T. Kajiwara, S. Nakada, H. Miyazaki, M. Gemmei-Ide, Y. Inoue, *Talanta*, **188** (2018) 665, A porous sintered material consisting of Presep PolyChelate as a chelating resin and particulate polyethylene as a thermoplastic binder for solid-phase extraction of trace elements
2. 加藤 敏文, 井上 嘉則, 上茶谷 若, 齊藤 満, 加賀谷 重浩, 山本 敦, 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **61** (2012) 335, ポリエチレン粉体と焼結した逆相/陰イオン交換複合モード型モノリス様多孔質固相抽出剤
3. 日本ファイルコン株式会社, 井上 嘉則, 齊藤 満, 加藤 敏文, 梁井英之, 日本特許 JP2010256225A (2009), 固相抽出用焼結型吸着材およびカートリッジ
4. 前田硝子株式会社, 井上 嘉則, 佐藤 奨太郎, 日本特許 JP2018183747A (2018), 固相抽出媒体及びその製造方法, 並びに, 固相抽出カートリッジ
5. 学校法人名古屋電気学園, 手嶋 紀雄, 村上 博哉, 井上 嘉則, 三木 雄太, 日本特許 JP202130164A (2021), 多孔性吸着媒体, 多孔性吸着媒体を備えた固相抽出用カートリッジ及び多孔性吸着媒体の製造方法
6. Y. Miki, H. Murakami, K. Iida, T. Umemura, Y. Esaka, Y. Inoue, N. Teshima, *Anal. Sci.*, **36** (2020) 1153, Molding-type solid-phase extraction media glued with commercially available adhesives
7. H. Murakami, T. Aoyanagi, Y. Miki, H. Tomita, Y. Esaka, Y. Inoue, N. Teshima, *Talanta*, **185** (2018) 427, Effects of hydrophilic monomers on sorptive properties of divinylbenzene- based reversed phase sorbents
8. M.C. Hennion, *J. Chromatogr. A*, **856** (1999) 3, Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography
9. Y. Cui, S. Li, X. Yang, Y. Wang, Z. Dai, Q. Shen, *Food Anal. Methods*, **11** (2018) 1748, HLB/PDMS-coated stir bar sorptive extraction of microcystins in shellfish followed by high-performance liquid chromatography and mass spectrometry analysis
10. N.A. Teixeira, D.M.S. Miyazaki, M.T. Grassi, S.F. Zawadzki, G. Abate, *Anal. Methods*, **12** (2020) 5815, Application of a new adhesive elastomeric coating and hydrophilic-lipophilic-balanced sorbent for modified stir-bar sorptive extraction

第 6 章 結論

本研究では、固相抽出によって極性化合物を高度に精製するために、固相抽出剤－極性化合物間の化学的・物理的物性の相関を解明する必要があると考え、固相抽出剤の基礎的な研究に着手した。基礎研究では、物性が明白である固相抽出剤を設計・試作し、この固相抽出剤の評価試験を行った。基礎研究により相関を明らかとするだけでなく、得られた知見を固相抽出剤の設計指針として活用し、極性化合物を効率的に捕捉可能な逆相分配系固相抽出剤と HILIC 型固相抽出剤を開発した。また、基礎研究を加速的に推進させるために均一径固相抽出剤合成法を確立し、固相抽出剤の汎用性をさらに拡大するために固相抽出剤を成形する技術を開発した。

第 2 章では、極性化合物の捕捉に好適な逆相分配系固相抽出剤の開発に関する研究を行った。ジビニルベンゼン (DVB) に親水性モノマーを配合した共重合体 (親水性親油性バランス (HLB) 型固相抽出剤) について、配合する親水性モノマーの種類と配合比、DVB の純度および細孔調節剤の種類と添加量を変更した固相抽出剤を試作し、その固相抽出特性や比表面積を測定した。その結果、極性化合物の捕捉を目的とした固相抽出において、固相抽出剤の HLB や細孔物性が重要な要素であることが明らかとなった。HLB について補足すると、疎水性相互作用を阻害することなく固相抽出剤に濡れ性を付与することが重要であった。本研究で最も良好な固相抽出特性を示した固相抽出剤の組成は、純度 80% の DVB とトリメチロールプロパントリメタクリラート (TMPT) をモル比 80:20 で混合したモノマー混液に、その重量の 2 倍量のトルエン (TOL) を細孔調節剤として添加して共重合した 80%DVB/TMPT (80/20)_2TOL であった。80%DVB/TMPT (80/20)_2TOL は、逆相分配モード HPLC における溶出順がデオキシグアノシン以降の化合物を 100% 捕捉可能であり、極性が高いシトシンやシチジン、ウラシル、ウリジンおよびデオキシシチジン等に対して、市販固相抽出剤 OASIS® HLB よりも高い固相抽出特性を示した。固相抽出剤の基礎的な研究を行うことで、極性化合物を捕捉可能な逆相分配系固相抽出剤を開発可能であった。

第 3 章では、核酸塩基の水素結合性を積極的に利用した HILIC 型の固相抽出剤を開発した。第 2 章で開発した逆相分配系固相抽出剤ですら高度な捕捉が困難であったシトシン、ウラシルなどの極性化合物を捕捉するために、HPLC で極性化合物の分離に用いられている親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC) に注目した。本研究では、HILIC モードの固相抽出における捕捉のための相互作用として、固相抽出剤表面の水和層への分配だけでなく、水和層形成のための親水性相互作用を積極的に利用し、捕捉における選択性の獲得を試みた。メタクリラート系の親水性基材樹脂に核酸塩基であるアデニンを修飾した Adenine 修飾固相抽出剤を試作し、逆相分配、HILIC、非水の 3 種の条件下における固相抽

出特性を評価した。Adenine 修飾固相抽出剤は、HILIC 条件下および非水条件下の固相抽出において、核酸関連化合物に対して、固相抽出剤表面の水和層への分配および親水性基材樹脂に修飾したアデニンとの水素結合性によるとされる固相抽出特性を示した。Adenine 修飾固相抽出剤は、逆相分配系固相抽出剤では効率的な捕捉が困難であったウリジン、シチジンおよびグアノシンを捕捉可能であった。本研究により、核酸関連化合物に対して新奇的な固相抽出特性を示す固相抽出剤を開発可能であった。

第 4 章では、均一な粒子直径を有する固相抽出用の多孔質ポリマー粒子を合成するための手法の確立と、合成した粒子の固相抽出特性の評価を行った。SPG 膜乳化法による単分散エマルジョン生成と懸濁重合法の組み合わせによって多孔質ポリマー粒子を合成した。固相抽出に好適とされる直径約 30~70 μm の多孔質ポリマー粒子を得るために、エマルジョンの分散条件について検討した。その結果、粒子直径約 50~70 μm かつ粒子直径の変動係数 CV が 10 % 以下の均一さを有する多孔質ポリマー粒子を合成可能であった。本法で得た多孔質ポリマー粒子は、粒子直径毎の分級が不要で、全て固相抽出に供することが可能である。本法で合成した多孔質ポリマー粒子の比表面積は、従来の手法で合成したものと比較して約 20 % 低減したが、約 700 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ と固相抽出剤として十分に適用可能な比表面積を有していた。一方、固相抽出特性は従来法で合成した固相抽出剤と同等であった。均一径粒子合成法を確立することで、固相抽出剤の調製における調製期間および操作性の律速工程である分級工程を省略可能となった。本研究成果は調製期間の短縮、操作性の改善によって固相抽出剤の基礎研究を加速的に推進させるだけでなく、目的径外粒子の廃棄や試薬の過剰消費など、従来の合成手法が抱えていた環境負荷に関する問題の解消にも寄与する。

第 5 章では、固相抽出剤粒子を成形する技術を開発し、成形された吸着媒体：M-SPEM (molding-type solid-phase extraction medium) の細孔物性および固相抽出特性を評価した。種々の市販接着剤を検討した結果、変成シリコンあるいはエポキシ系樹脂を主成分とする 2 種類の接着剤により、第 2 章で開発した逆相分配系固相抽出剤を 85 % (w/w) も含有する M-SPEM (85 %_M-SPEM) を調製可能であった。内包する固相抽出剤粒子の粒子直径について検討した結果、粒子直径 90~150 μm の固相抽出剤粒子を成形した 85 %_M-SPEM が、細孔物性および固相抽出特性の両面において最も好適な結果を示した。85 %_M-SPEM の比表面積は 400~500 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ であり、固相抽出剤粒子 (約 850 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$) と比較すると低減したものの、固相抽出剤として十分に有用な比表面積を有していた。従来の吸着媒体の比表面積は約 100 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ とされているため、85 %_M-SPEM は吸着媒体としては非常に高い比表面積および吸着容量を有していると言える。85 %_M-SPEM を固相抽出に供した結果、固相抽出剤粒子と同等の固相抽出特性および通液性を示した。また、固相抽出後に 85 %_M-SPEM を固相抽出カートリッジから抜き取ると、85 %_M-SPEM は崩壊することなくその形

状を維持していた。M-SPEM は、接着剤による物理的な固定であるため、粒子に化学的な制限・要求がない。そのため、測定対象成分や試料組成、試料濃度、固相抽出剤粒子の特性等に応じて適切な物理特性を有する固相抽出剤を選択することで、種々の固相抽出剤粒子を様々な用途へ応用可能であると考えられる。

謝辞

本研究の遂行および学位論文の執筆にあたって、学部・修士・博士と計6年もの間終始懇切なるご指導ご鞭撻を賜りました愛知工業大学応用化学科の手嶋 紀雄 教授，村上 博哉 准教授，客員研究員の井上 嘉則 博士に心より感謝申し上げます。

本論文の作成にあたり，ご校閲とご指導をいただきました愛知工業大学応用化学科の大澤 善美 教授ならびに愛知工業大学土木工学科の鈴木 森晶 教授に深く感謝申し上げます。

筆者が所属する愛知工業大学 生命・環境分析化学研究室にて研究生生活を共にした皆様に感謝申し上げます。

最後に，本研究の遂行に暖かい理解と協力をいただいた両親に深甚なる謝意を申し上げます。

関連論文

1. Hiroya Murakami, Takuya Aoyanagi, **Yuta Miki**, Hiroki Tomita, Yukihiro Esaka, Yoshinori Inoue, Norio Teshima, *Talanta*, **185**, 427 (2018), Effects of hydrophilic monomers on sorptive properties of divinylbenzene based reversed phase sorbents
2. 三木 雄太, 村上 博哉, 尾宮 美保, 江坂 幸宏, 井上 嘉則, 手嶋 紀雄, 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **67** (2018) 445, アデニンを修飾した新奇吸着分離剤の核酸関連化合物に対する固相抽出特性
3. Hiroya Murakami, Miho Omiya, **Yuta Miki**, Tomonari Umemura, Yukihiro Esaka, Yoshinori Inoue, Norio Teshima, *Talanta*, **217** (2020) 121052, Evaluation of the adsorption properties of nucleobase-modified sorbents for a solid-phase extraction of water-soluble compounds
4. **Yuta Miki**, Hiroya Murakami, Keisuke Iida, Tomonari Umemura, Yukihiro Esaka, Yoshinori Inoue, Norio Teshima, *Analytical Sciences*, **36**, 1153 (2020). Molding-type solid-phase extraction media glued with commercially available adhesives
5. 三木 雄太, 村上 博哉, 井上 嘉則, 手嶋 紀雄, 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **70**, 435 (2021), 膜乳化-共重合法による数十 μm の単分散性ポリマー粒子の合成とその固相抽出特性評価
6. 村上 博哉, 三木 雄太, 井上 嘉則, 手嶋 紀雄, 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **70**, 19 (2021), 親水基含有固相抽出剤の開発と水溶性化合物に対する捕捉特性
7. **Yuta Miki**, Hiroya Murakami, Tmonari Umemura, Yukihiro Esaka, Yoshinori Inoue, Norio Teshima, *Analytical Sciences*, in press, Preparation and evaluation of molding-type solid-phase extraction media binding with commercially available adhesives

関連特許

1. 学校法人名古屋電気学園, 手嶋 紀雄, 村上 博哉, 井上 嘉則, 三木 雄太, 日本特許 (2021) JP202130164A, 多孔性吸着媒体, 多孔性吸着媒体を備えた固相抽出用カートリッジ及び多孔性吸着媒体の製造方法
2. 学校法人名古屋電気学園, 手嶋 紀雄, 村上 博哉, 井上 嘉則, 三木 雄太, 日本特許 (2021) JP202130165A, 多孔性吸着媒体, 多孔性吸着媒体を備えた固相抽出用カートリッジ及び多孔性吸着媒体の製造方法