

3D 固相濃縮を用いる PPCP 微量分析法の確立と 迅速・自動水質モニタリングへの展開

京都府立大学 細矢 憲

1. はじめに

親水性の高い生理活性化合物，たとえば，医薬品および生活関連ケア製品（Pharmaceuticals and Personal Care Products：PPCPs）による環境水汚染が進行しつつあり，抗うつ剤や，抗生物質，また，インフルエンザ薬が実際の河川からも検出され，生態系への重大な影響が懸念されている。分析現場の実際的问题に関しては，時間を要するこれらの化合物の水相からの捕捉が第1に挙げられる。¹⁾ これら PPCPs や糖類などの極めて親水性の高い化合物の分離・分析には，親水性相互作用クロマトグラフィー（HILIC）が有効であり，その使用頻度は増加しつつある。ここで用いられる充てん剤，特にポリマー充てん剤については，一義的に「親水性」を含むキーワードで設計されたものが多く，複雑な化合物群を対象とした充てん剤の開発はそれほど画期的ではない。

そこで本研究では，新規な親水性ポリマー固相（カラム）の開発を目指し，親水性多孔性ポリマー基材粒子を作製し，さらにその粒子表面に様々な親水性機能性モノマーをハイブリッド化修飾することで，多層型（3D型）の新規ハイブリッド親水性充てん剤の開発を目的とした。3D固相は，**図1**に模式図

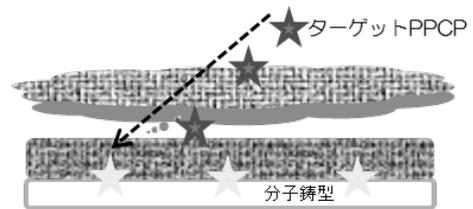


図1. 3D固相の模式図

を示すように，ポリマー基剤粒子に分子選択的捕捉を可能にする分子鑄型（1次元目）を創製し，基剤粒子の持つ親水性層（2次元目）を介して，表面に水相からイオン性の高い親水性化合物を定量的に捕捉する表面トラップ層（3次元目）を配して水中から PPCPs を有効に捕捉可能なハイブリッド型多層構造(3D)となっている。

本研究で開発する固相は我々が開発したポンプ濃縮を用いる微量成分の高感度分析システム（**図2**）における濃縮カラム（**図中8番**）に用いるものであり，極めて希薄な汚染物質を水中から効率的に捕捉することが目的となっている。^{2,3)}

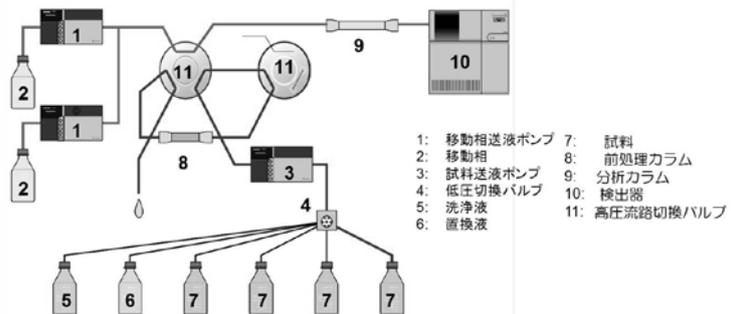


図2. ポンプ濃縮—微量成分分析システム

本年度は，昨年度の1次元目構築の成果に引き続き，2次元目（親水性層）および3次元目（トラップ層）導入の検討を行い，特にイオン交換能の発現制御と親水性付与について検討し，本研究の最大の目的の1つである3D固相のアセンブリの完成を目指した。

2. 方法

2.1 試薬および溶媒

用いた試薬及び溶媒は、特に記載しない限り市販品をそのまま使用した。実験に使用した精製水は、Millipore(メルク株式会社, 東京, 日本)製の Milli-Q 純水製造装置(Gradient-A10)を用いて準備した。

多孔性 GMDA ポリマー基材粒子の調製に用いた試薬および溶媒

試薬

スチレン(特級), 亜硫酸水素ナトリウム(一級), 水酸化ナトリウム(試薬特級), 塩化ナトリウム(試薬特級), 塩化カルシウム(試薬特級), ペルオキソ二硫酸カリウム(一級), フタル酸ジブチル(DBP)(特級)ラウリル硫酸ナトリウム(SDS)(一級), 2,2'-アゾビス(2,4-ジメチルバレロニトリル)(ADVN)(一級), ポリビニルアルコール(重合度約 2000, けん化度 98.0 mol%)(PVA)は, 和光純薬工業株式会社(大阪, 日本)から購入した。グリセリンジメタクリレート(GDMA)は, 新中村化学工業株式会社(和歌山, 日本)から提供していただいた。MPC は, 株式会社日油(東京, 日本)から提供していただいた。

溶媒

トルエン(特級), アセトニトリル(高速液体クロマトグラフ用), 2-プロパノール(一級), テトラヒドロフラン(一級), メタノール(一級), アセトン(一級), エタノール(99.5%)(一級)は, 和光純薬工業株式会社から購入した。

赤外吸収スペクトルの測定に用いた試薬

臭化カリウム(KBr)(IR 吸収測定用)は, 和光純薬工業株式会社から購入した。

液体クロマトグラフィーによる親和性評価に用いた試薬および溶媒

試薬

ウラシル(特級), フェノール(試薬特級), 安息香酸(試薬特級), ベンゼン(試薬特級), 安息香酸メチル(特級), ピリジン(試薬特級), トリフェニレン(一級), りん酸(試薬特級), りん酸二水素ナトリウム・2 水和物(試薬特級)は, 和光純薬工業株式会社から購入した。カフェインは, 石津製薬株式会社(大阪, 日本)から購入した。o-ターフェニルは, 東京化成工業株式会社(東京, 日本)から購入した。

溶媒

アセトニトリル(高速液体クロマトグラフ用)は, 和光純薬工業株式会社から購入した。

2.2 多孔性 GMDA ポリマー基材粒子の調製

多孔性 GMDA ポリマー基材粒子は, シード重合の一種である多段階膨潤重合法⁴⁾⁻⁶⁾を用いて行った。まず, シード粒子としてポリスチレンの微粒子を作製し, その後シード粒子を核として膨潤を行う事により, 粒子径の均一な多孔性 GMDA ポリマー基材粒子を作製した。

ポリスチレンシード粒子の調製

ポリスチレンシード粒子は, ソープフリー乳化重合^{7), 8)}により調製した。

スチレンの洗浄

100 mL の分液ろうとにスチレン 80 mL を入れ, 亜硫酸水素ナトリウム飽和水溶液 60 mL を用いて洗浄し, 次に 5% の水酸化ナトリウム水溶液 60 mL を用いて洗浄し, 最後に塩化ナトリウム飽和水溶液 60 mL を用いて洗浄した。その後, 塩化カルシウムを 1.0 g 加え, 15 分脱水を行った。

脱水後、オイルバス、ダイヤフラムポンプを用いて蒸留した(b.p. 62 °C, 49.5 mmHg)。

精製水の脱気

1000 mL の三角フラスコに精製水 500 mL とかくはん子を入れ、アルゴンガスをバブリングしながら、ホットスターラーを用いて精製水を沸騰させた。沸騰開始後、40 分間加熱し、その後アルゴンガスをバブリングしたまま放冷した。

ポリスチレンシード粒子の重合

500 mL のセパラブルフラスコに脱気した精製水 320 mL と、塩化ナトリウム 0.40 mg を入れ、かくはん羽を取り付け、70 °C のオイルバスにフラスコを浸し、アルゴンガスで装置内を置換した。その後、スチレンを 6.0 mL 加え、30 mL の精製水に溶解した重合開始剤のペルオキシ二硫酸ジカリウム 0.27 g を加えた。1 時間毎に 7 回スチレンを 6.0 mL 加え(計 42 mL)、その後 24 時間 70 °C で加熱重合した。

ポリスチレンシード粒子の回収および洗浄

放冷した後、キムワイプ 3 枚を用いてろ別し、ポリスチレン粒子分散液を 50 mL の遠沈管 8 本に入れ、3000 rpm, 30 min 遠心分離を行った。上澄みを除去し、水を加え、再分散した後に再び遠心分離を行い、上澄みが透き通るまで繰り返した。また、バイアル管にポリスチレン分散液を 1.0 ml 量り取り、ホットスターラーで水分を蒸発させ、揮発した水の量、乾燥重量からポリスチレン濃度を算出した。同様の操作を 5 回くり返し、その平均値を用いた。その結果、濃度 0.053 mg/ml, 収率 82.6%となった。

多孔性 GMDA ポリマー基材粒子の調製

1 次膨潤

20 mL のビーカーに SDS 0.025 g, DBP 0.41 mL, 精製水 10 mL を入れ、氷冷しながら超音波ホモジナイザー UD-200(株式会社トミー精工, 東京, 日本)を用いて分散した。分散液をポリスチレンシード粒子 0.27 mL に加え、マグネチックスターラーを用いて 125 rpm, 室温で一晩かくはんした。膨潤の完結は光学顕微鏡 BH2 BHS(オリンパス株式会社, 大阪, 日本)を用いて微分散液滴の消失により判断した。

2 次膨潤前半

50 mL のビーカーに ADVN 0.15 g, トルエン 5.0 mL を入れた。ADVN が溶解したら, SDS 0.025 g, 精製水 5.0 mL, 3% PVA 水溶液 20 mL を加え, 氷冷しながら超音波ホモジナイザーを用いて分散し, 1 次膨潤が終了した混合液に加え, マグネチックスターラーを用いて 125 rpm, 室温で一晩かくはんした。膨潤の完結は光学顕微鏡を用いて微分散液滴の消失により判断した。

2 次膨潤後半

50 mL のビーカーに SDS 0.025 g, 精製水 15 mL, 3% PVA 水溶液 20 mL, GDMA 5.0 mL を順に加え, 氷冷しながら超音波ホモジナイザーを用いて分散し, 2 次膨潤前半が終了した混合液に加え, マグネチックスターラーを用いて 125 rpm, 室温で一晩かくはんした。膨潤の完結は光学顕微鏡を用いて微分散液滴の消失により判断した。

重合

2 次膨潤後半が終了した分散液を、300 mL のなす型フラスコに入れ、アルゴン雰囲気下で、24 時間 75 °C で加熱重合した。かく拌は重合初期にのみ穏やかに行った。

洗浄

重合後の溶液を水に分散した後にデカンテーションを行い、これを 3 回繰り返すことで洗浄した。同様の方法でメタノール、テトラヒドロフランを用いて洗浄し乾燥させた後、収量を測定した。その結果、収率は 98.3%となった。

2.3 多孔性 GMDA ポリマー基材粒子の表面修飾

溶媒中での MPC の析出量に関する検討

100 mL のなす型フラスコに後述する溶媒 25 mL を入れ、MPC 0.75 g および開始剤 ADVN 0.03 g を分散し、MPC の溶解性を観察した。その後、混合液を 24 時間還流し、還流後の PMPC の析出の状態を観察し、乾燥した後に秤量し、析出量を測定した。溶媒は、アルコール系の溶媒としてメタノール、エタノール、2-プロパノール、HPLC の分析で多く用いられる有機溶媒であるアセトニトリル、ケトン系の溶媒としてアセトン、エーテル系の溶媒としてテトラヒドロフラン、以上の 6 種類の溶媒を用いた。

多孔性 GMDA ポリマー基材粒子への PMPC 修飾

100 mL のなす型フラスコに後述する溶媒 25 mL を入れ、MPC 0.75 g および開始剤 ADVN 0.03 g、多孔性 GMDA ポリマー基材粒子 2.5 g を分散し、24 時間還流を行った。溶媒はメタノール、エタノール、2-プロパノール、アセトニトリル、アセトン、テトラヒドロフランの 6 種類の溶媒を用いた。還流後の溶液を、水に分散した後にデカンテーションを行い、これを 3 回繰り返すことで洗浄した。同様の方法でメタノールを用いて洗浄を行った後、乾燥し、重量を測定した。回収率は以下の式より算出した。

回収率 (%) = 得られた PMPC 修飾粒子 (g) / (使用した MPC (g) + 使用した多孔性 GMDA ポリマー基材粒子 (g)) (式 2-1)

2.4 走査型電子顕微鏡を用いた観察

2.3 で作製した粒子をカーボンテープに付着させ、MSP-1S マグネトロンスパッタ装置(株式会社真空デバイス, 茨城, 日本)を用い、金・パラジウムを蒸着した後、走査型電子顕微鏡 (Scanning Electron Microscope, SEM) VE-8800(株式会社キーエンス, 大阪, 日本)を用いて粒子の画像を撮影した。得られた画像を用いて作製した粒子の粒子径を測定し、その RSD 値 (relative standard deviation: 相対標準偏差) を算出した。なお、RSD 値の標本数は 100 とし、以下の式を用いて算出した。加速電圧は図中に示す。

RSD (%) = (標準偏差 / 平均値) × 100 (式 2-2)

2.5 赤外吸収スペクトルの測定

フーリエ変換赤外分光光度計 (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FT-IR) FT/IR-4200(日本分光株式会社, 東京, 日本)を用い、KBr 錠剤法により、作製した粒子の透過スペクトルを測定した。積算回数は 16 回とした。

2.6 窒素吸着法による比表面積の測定

自動比表面積測定装置 Gemini 2360(マイクロメリティックス, アメリカ)を用いて, 作製した粒子の比表面積の測定を行った。

2.7 液体クロマトグラフィーによる親和性評価

作製した粒子のパッキング

作製した粒子 1.8 g を, スラリー溶媒(トルエン/2-プロパノール=1/1 (v/v)) 25 mL にホモジナイザーを用いて分散し, ケムコ自動昇圧プログラマー 124-PP 型(株式会社ケムコ, 大阪, 日本)を備えたケムコスラリー充てん機 124A 型(株式会社ケムコ)(**図. 2-1**)を用いて, 150 mm × 4.6 mm I.D.のステンレススチール製の HPLC 用カラム(株式会社ケムコプラス, 大阪, 日本)に充てんした。加圧液にはメタノールを用い, パージ液には 10% アセトニトリル水溶液を用い, 最高圧は 0.3 MPa に設定した。



図. 2-1 Pcking system

高速液体クロマトグラフを用いたカラムの評価

作製したカラムを用いて, HPLC による評価を行った。*o*-ターフェニル, トリフェニレン, ベンゼン, トルエン, フェノール, 安息香酸, プリジジン, MPC の保持時間を測定した⁹⁾⁻¹¹⁾。測定は3回行い, その平均値を用いた。流速, 移動相組成, 検出条件などの詳細は図表に付記した。

HPLC を用いた分析には, 以下の装置から構成した LC20A システム(株式会社島津製作所, 京都, 日本)を用いた。

- ・送液ポンプ LC-20AT
- ・カラムオープン CTO-20AC
- ・高圧流路切り替えバルブ FCV-13AL
- ・脱気装置 DGU-20A
- ・システムコントローラ CBM-20A および LC solution
- ・フォトダイオードアレイ検出器 SPD-M20A

保持係数; k , 分離係数; α は以下の式を用いて算出した。

Retention factor $k = (t_R - t_0) / t_0$ (式 2-3)

t_R : 試料の検出時間, t_0 : 非保持の試料の検出時間 ($t_R > t_0$)

Separation factor $\alpha = k_1 / k_2$ (式 2-4)

k_1 : 試料 1 の保持係数, k_2 : 試料 2 の保持係数 ($k_1 > k_2$)

評価に用いた溶質の構造を図. 2-2 に示す。

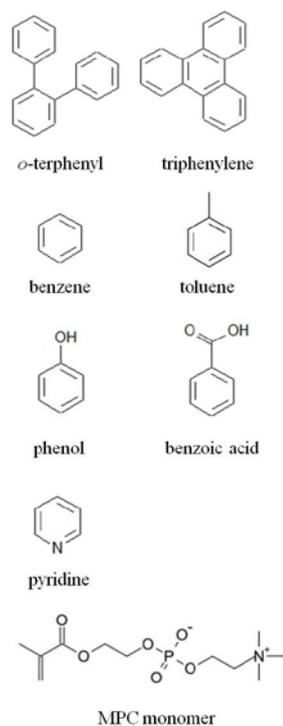


図. 2-2 The structures of solutes

3. 結果

3.1 粒子の修飾に関する検討の結果

6種類の溶媒（メタノール、エタノール、2-プロパノール、アセトニトリル、アセトン、テトラヒドロフラン）に対する、MPC と PMPC の溶解性を調べた。その結果を次頁図 (Figure) 3-1に示す。また、重合後に析出した PMPC と溶媒に溶解した PMPC の割合を表 3-1に示す。

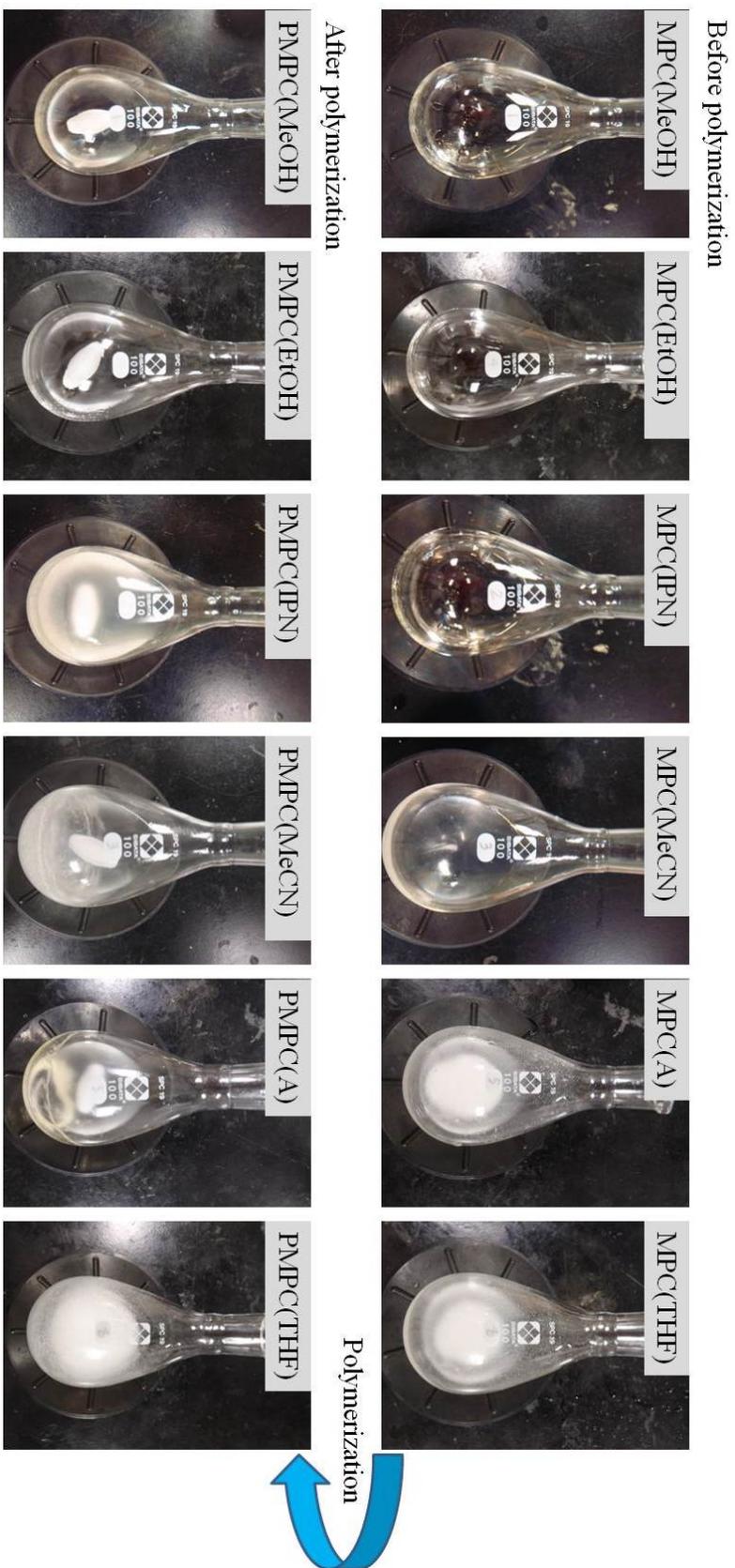


Figure. 3-1 Images of MPCs and PMPs

表. 3-1 Precipitation of PMPC

Solvent	methanol	ethanol	2-propanol	acetonitrile	acetone	tetrahydrofuran
Precipitated PMPC (%)	1.6	2.78	40.5	99.2	108.6	96.9
PMPC in solvent (%)	98.4	97.2	59.5	0.8	0	3.1

メタノールとエタノールは、MPC も PMPC も溶解し、ほぼ析出せず、この2種類の溶媒中では、MPC は重合前も重合後も溶媒中に溶解していることが明らかとなった。2-プロパノール中では、重合前の MPC は溶解したが、重合後の溶液は薄く白濁しており、フラスコに透明の付着物が微量残った。析出率は 40.49%であり、重合後の半分以上の PMPC は2-プロパノールに溶解することが明らかとなった。アセトニトリル中の MPC は、モノマーは溶解したが、重合後の PMPC は白い固体としてフラスコに付着していた。析出率は 99.2%であり、ほぼ全ての MPC が、重合後に白い固体の PMPC として析出したと判断できる。アセトンとテトラヒドロフラン中では、MPC は完全に溶解せず、一部が溶媒中に沈殿した。重合後は、アセトン中の PMPC はフラスコの底に白い固体として付着しており、テトラヒドロフラン中の PMPC は溶媒中に分散しており、白濁溶液となった。この2種類の溶媒中では、重合前の MPC も重合後の PMPC も溶媒中に存在しにくいことが推察できる。

多孔性 GMDA ポリマー基材粒子表面に、6種類の溶媒（メタノール、エタノール、2-プロパノール、アセトニトリル、アセトン、テトラヒドロフラン）を用いて、PMPC を修飾した。表. 3-2 に PMPC を修飾した多孔性 GMDA ポリマー基材粒子の回収率を示す。アセトンとテトラヒドロフランを溶媒に用いた条件で、高い回収率が得られたが、それ以外の溶媒では約 70%の回収率に留まっ。回収率が高かったアセトンとテトラヒドロフランを溶媒に用いた条件では、修飾後の粒子は凝集した。

表. 3-2 Recovery of PMPC modified GDMA polymer particle

Solvent	methanol	ethanol	2-propanol	acetonitrile	acetone	tetrahydrofuran
Recovery (%)	68.3	69.3	70.5	69.5	83.7	84.6

3.2 走査型電子顕微鏡を用いた観察

未修飾の多孔性 GMDA ポリマー基材粒子と、6種類の溶媒（メタノール、エタノール、2-プロパノール、アセトニトリル、アセトン、テトラヒドロフラン）を用いて PMPC の修飾を行った粒子の SEM 画像を図. (Figure) 3-2 に示す。

以下、溶媒にメタノールを用いて PMPC を修飾した粒子を PMPC(MeOH)、溶媒にエタノールを用いて PMPC を修飾した粒子を PMPC(EtOH)、溶媒に2-プロパノールを用いて PMPC を修飾した粒子を PMPC(IPN)、溶媒にアセトニトリルを用いて PMPC を修飾した粒子を PMPC(MeCN)、溶媒にアセトンを用いて PMPC を修飾した粒子を PMPC(A)、溶媒にテトラ

ヒドロフランを用いて PMPC を修飾した粒子を PMPC(THF)と示す。

PMPC(A)の SEM 画像より、粒子同士が凝集していることが観察された。また、粒子の表面が覆われたような状態であり、覆う物質同士が繋がることで粒子の凝集が起きていることが観察された。また、PMPC(THF)も凝集している状態であることがわかる。

粒子表面が覆われ、未修飾の状態のときに観察された表面の孔を確認することができない粒子も存在していることが明らかとなった。

PMPC(A)と PMPC(THF)は凝集したが、その他の条件で PMPC 修飾を行った粒子は凝集せず、分散した状態であることがわかった。一方で、凝集した PMPC(A)と PMPC(THF)は 50 °C の 1 mg/mL の塩化ナトリウム水溶液中でも分散しなかった。

一方、PMPC(MeOH), PMPC(EtOH), PMPC(IPN), PMPC(MeCN)は、修飾前の多孔性 GMDA ポリマー基材粒子と比較して、表面の状態に顕著な変化は見られなかった。

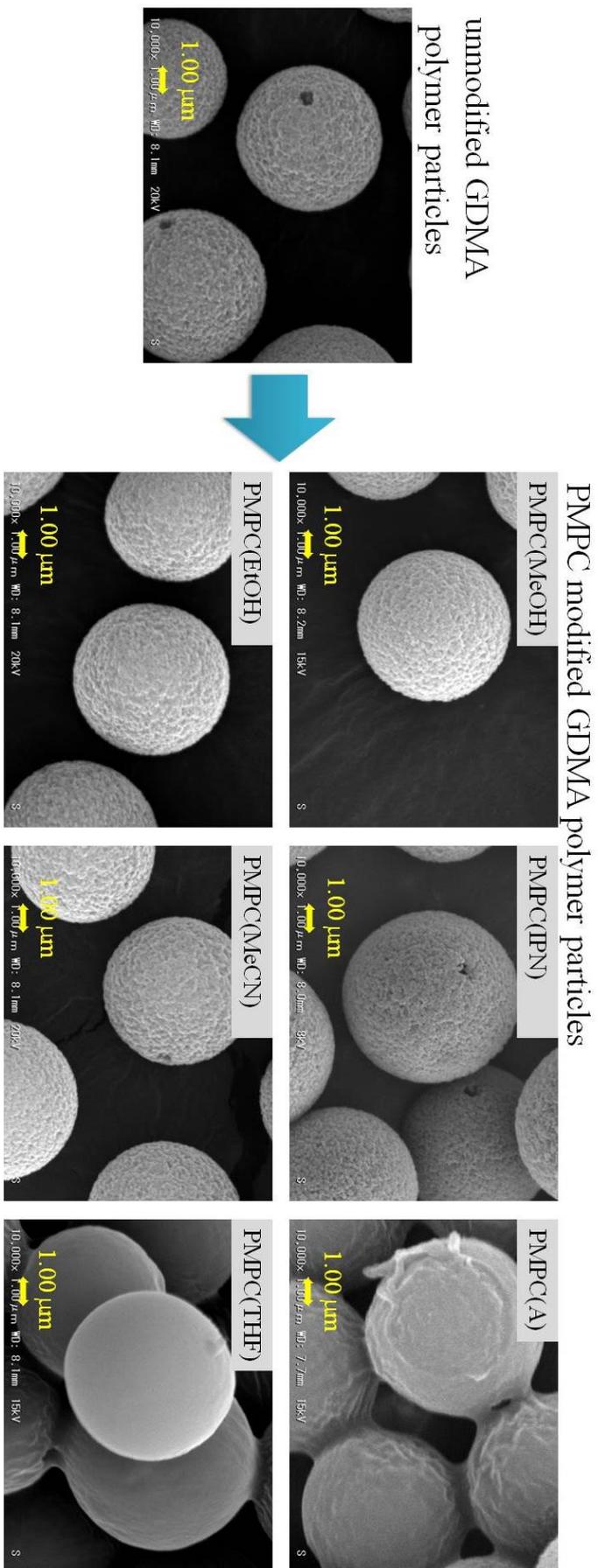


Figure 3-2 SEM images of prepared polymer particles

3.3 赤外吸収スペクトルの測定結果

作製した粒子の赤外吸収スペクトルの測定を行った。未修飾の多孔性 GMDA ポリマー基材粒子と、6 種類の溶媒（メタノール、エタノール、2-プロパノール、アセトニトリル、アセトン、テトラヒドロフラン）を用いて PMPC を修飾した粒子（PMPC(MeOH), PMPC(EtOH), PMPC(IPN), PMPC(MeCN), PMPC(A), PMPC(THF)）の各々の吸収スペクトルを図.(Figure) 3-3 に示す。また、修飾後のスペクトルから修飾前の未修飾の多孔性 GMDA ポリマー基材粒子のスペクトルを差し引いた差スペクトルを図.(Figure) 3-4 に示す。

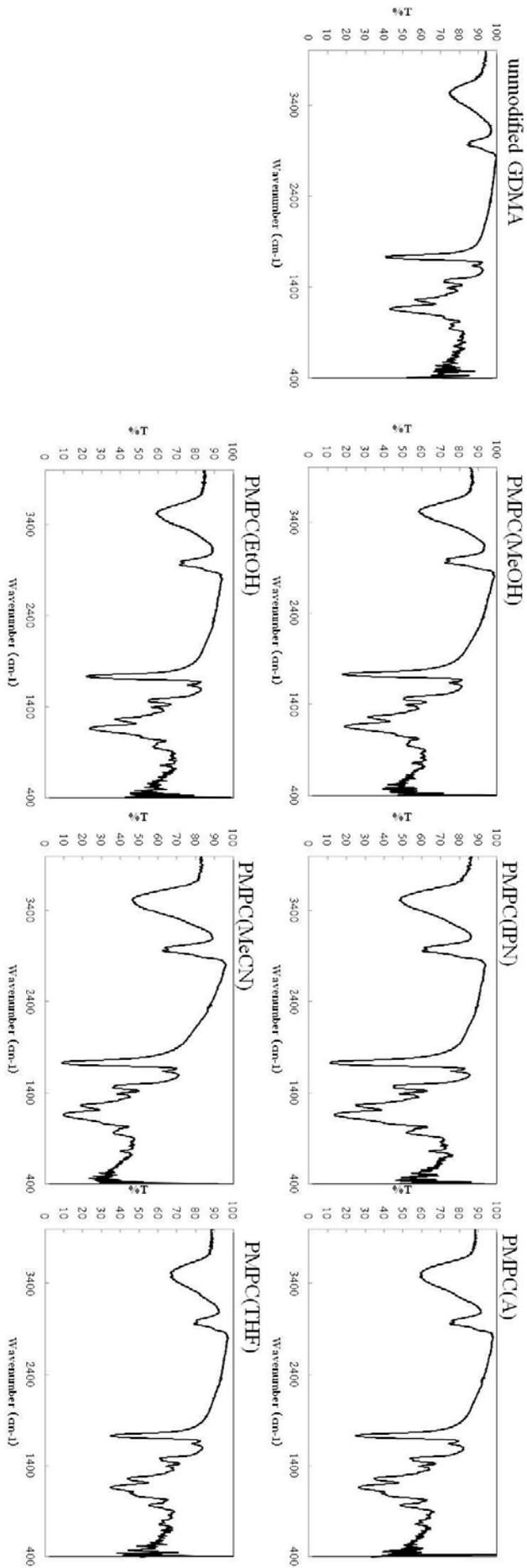


Figure 3-3 FT-IR spectra of unmodified GDMA polymer particles and PMPC modified GDMA polymer particles

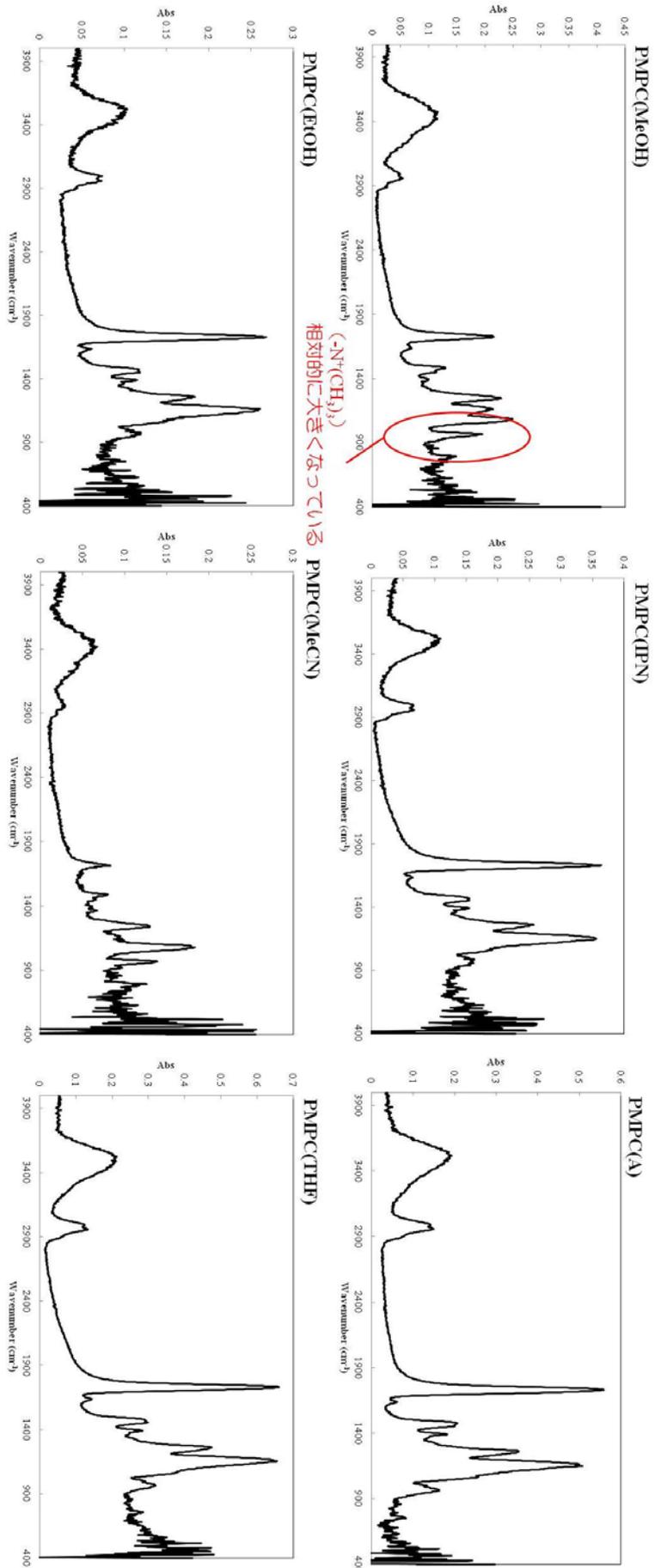


Figure 3-4 FT-IR difference spectra of PMPC modified GDMA particles

3600-3200 cm^{-1} の吸収は OH 伸縮振動, 2960 cm^{-1} , 2870 cm^{-1} の吸収は CH_3 伸縮振動, 2930 cm^{-1} , 2850 cm^{-1} の吸収は CH_2 伸縮振動, 1750-1735 cm^{-1} の吸収は C=O (エステル) 伸縮振動, 1680-1620 cm^{-1} の吸収は C=C 伸縮振動, 1470-1430 cm^{-1} の吸収は CH_2 , CH_3 変角振動, 1390-1370 cm^{-1} の吸収は CH_3 変角振動, 1300-1050 cm^{-1} の 2 つの吸収帯はエステルの C-O 伸縮振動, 1100-1000 cm^{-1} の吸収は C-OH 伸縮振動, 960 cm^{-1} の吸収は ($-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$) に帰属できる。

960 cm^{-1} の吸収は修飾した MPC の構造中の ($-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$) によるものではないかと考えられる¹²⁾。その他の粒子と比較して, PMPC(MeOH)の 960 cm^{-1} の吸収が相対的に大きくなっていることが確認された。

3.4 窒素吸着法による比表面積の測定結果

自動比表面積測定装置を用いて, 作製した粒子の Brunauer, Emmett and Teller (BET) 比表面積と細孔容量の測定を行った。表. 3-3 に作製した粒子の BET 比表面積と全細孔容積を示す。

得られた結果より, 修飾前後を比較すると, 修飾後の粒子において, 比表面積の値が減少していることが明らかとなった。特に, 粒子凝集が起こった PMPC(A)と PMPC(THF)の比表面積の値が大きく減少していることが特徴である。

また, PMPC(IPN)と PMPC(MeCN)の比表面積の値も, 修飾前と比較して約 30%減少していることが分かった。SEM 画像の結果からは明瞭な変化を観察することはできなかったが, これらの粒子に関しても孔中で修飾が進行したと予想できる結果となった。

表. 3-3 BET surface area and total pore volume of prepared particles

sample	BET surface area (m^2/g)	total pore volume (cm^3/g)
unmodified GDMA	111.57	0.054
PMPC (MeOH)	100.46	0.049
PMPC (EtOH)	97.73	0.048
PMPC (IPN)	68.24	0.033
PMPC (MeCN)	77.83	0.038
PMPC (A)	4.55	0.002
PMPC (THF)	8.89	0.005

回収率に顕著な差は見られなかったが, 比表面積と細孔容量の結果からは, PMPC(MeOH), PMPC(EtOH)と PMPC(IPN), PMPC(MeCN)の間に差が生じた。回収率は変わらず, 比表面積に差が生じたという結果より, PMPC の修飾形態に何らかの差異が生じていることが示唆される。

モノマーおよびポリマーの溶解性考察からも, PMPC(IPN)と PMPC(MeCN)は, PMPC(MeOH)と PMPC(EtOH)より比表面積が小さいので, PMPC(IPN)と PMPC(MeCN)の表面上の PMPC は分子鎖が長い状態で存在しており, PMPC(MeOH)と PMPC(EtOH)の表面上の PMPC は分子鎖が短い状態で存在しているのではないかと考えられる。

3.5 親水性化合物との親和性の評価と比較

PMPC(A)と PMPC(THF)は凝集したが、PMPC(MeOH)、PMPC(EtOH)、PMPC(IPN)、PMPC(MeCN)は凝集せず、分散した状態であった。この粒子の凝集が起こらなかった4種類のPMPCを修飾した粒子と、未修飾の多孔性GMDAポリマー基材粒子を、HPLC用のステンレスカラムに充てんし、親和性の評価を行った。

最初に、各カラムの平面認識能を評価するために、 $\alpha(\text{triphenylene}/o\text{-terphenyl})$ を算出した。*o*-ターフェニルとトリフェニレンは疎水性はほぼ同程度であるが、その立体性が大きく異なる。*o*-ターフェニルは立体的にかさ高い構造をしており、トリフェニレンは平面的な構造をしている。トリフェニレンなどの平面的な化合物は、固定相上の官能基の分子鎖が長く密な状態で存在するほど高い保持を示す。よって、この2つの化合物の分離係数 $\alpha(\text{triphenylene}/o\text{-terphenyl})$ が大きいほど、平面認識能が高い固定相であると言える^{13) - 17)}。この評価は、疎水性相互作用が働く条件(移動相に水が含まれる条件)で行った。

平面認識性を評価した結果を図. 3-5に示す。多孔性GMDAポリマー基材粒子にPMPC修飾を施すことで、平面認識能が若干向上することが分かった。特に、PMPC(IPN)を充てんしたカラムにおいて、高い値が観察された。平面認識能が向上したため、PMPC(IPN)の表面上のPMPCは分子鎖が長い状態で存在するのではないかという前項の推論を肯定する結果となった。それとは対照的に、PMPC(MeOH)を充てんしたカラムにおいて、平面認識能は低い結果となった。よって、PMPC(MeOH)の表面上のPMPCは分子鎖が短い状態で存在するのではないかと考えられる。

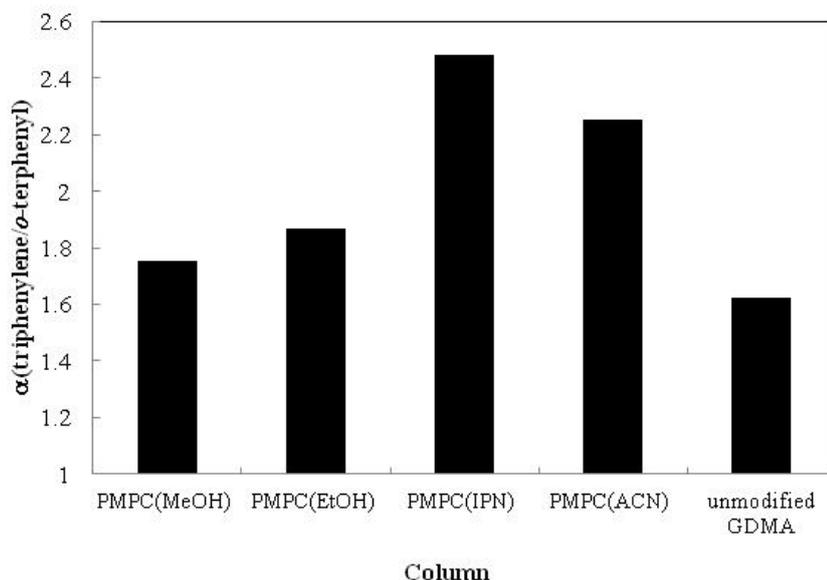


図. 3-5 $\alpha(\text{triphenylene}/o\text{-terphenyl})$ of prepared columns

HPLC condition

Column size: 150 mm×4.6 mm I.D.,

Mobile phase; 10 mmol phosphate buffer (pH=2.6) / acetonitrile=40/60,

Flow rate: 0.8 mL/min,

Column temperature: 35 °C

環境中に存在するイオン性を含む親水性化合物を捕捉する際、親水性相互作用が保持に働き、疎水性相互作用が働かない条件で分析を行うことにより、疎水性の高い化合物は保持されないので、結果的に排除することができる^{18) - 20)}。よって、移動相にアセトニトリルを用いた条件で作製した各カラムの親水性化合物に対する親和性を評価した。

溶質には、メチル基が保持に及ぼす影響を調べるために、ベンゼンとトルエンの保持を、また、親水基を持つ化合物としてフェノールと安息香酸を用い、酸性の化合物である安息香酸の対照試料として塩基性の化合物であるピリジンの保持の大きさを測定した。

その結果を図. 3-6 に示す。PMPC(IPN)とPMPC(MeCN)を充てんしたカラムにおいて、安息香酸の保持が大きくなっている。一方、PMPC(MeOH)を充てんしたカラムにおいて、安息香酸とフェノールの保持係数は、最も小さい結果が得られた。しかし、PMPC(MeOH)を充てんしたカラムは、塩基性化合物であるピリジンの保持においては、最も高い数値を示した。

また、モノマーであるMPCの保持は全てのカラムにおいて、顕著な差は見られなかった。よって、これらの結果より、酸性化合物はPMPC(IPN)とPMPC(MeCN)を充てんしたカラムにおいて相対的に保持が大きく、塩基性化合物はPMPC(MeOH)を充てんしたカラムにおいて相対的に保持が大きくなるという興味ある結果を得た。このように、有機溶媒中においても選択的な保持が働くことが示された。

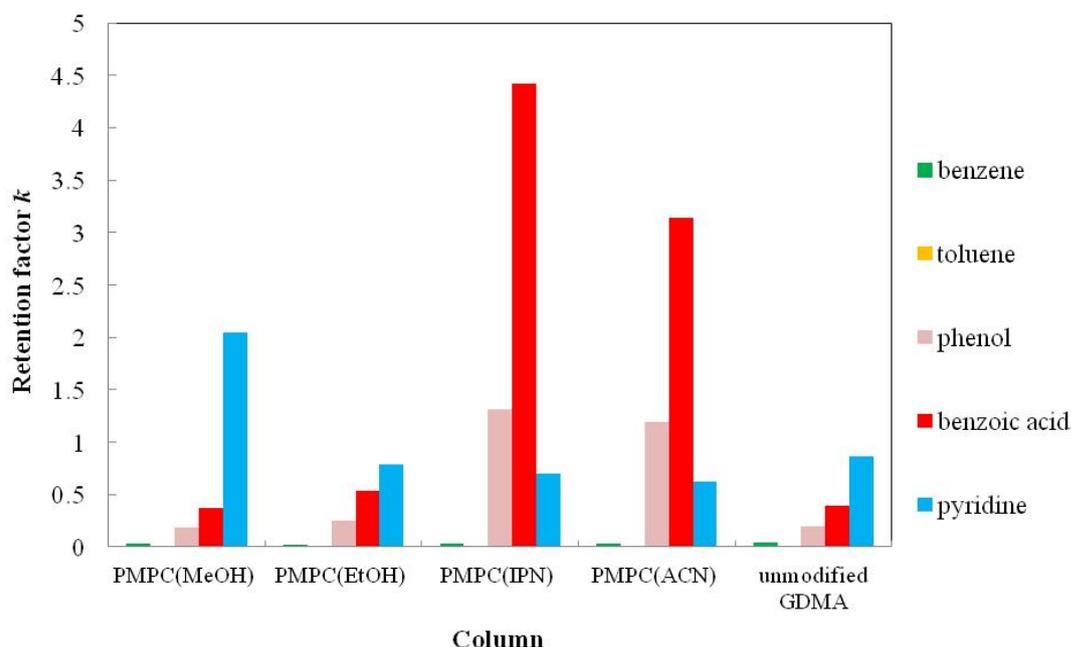


図. 3-6 Retention factor k of prepared columns

HPLC condition

Column size; 150 mm×4.6 mm I.D.,

Flow rate; 0.8 mL/min,

Column temperature; 35 °C,

Mobile phase; acetonitrile

以上の結果より、PMPC(MeOH)を充てんしたカラムは、低い平面認識能を示したため、粒子表面上にPMPCの分子鎖は長く伸びていないと考えられる。また、塩基性化合物に対する保持に関しては、相対的に大きい値を示した。しかし、粒子作製時の回収率は高い値を示していない。よって、これらの理由より、PMPC(MeOH)表面上のPMPCは、分子鎖が短い状態で存在しているのではないかと考えられる。

対照的に、PMPC(IPN)はPMPC(MeOH)と回収率に大きな差は生じなかったにも関わらず、比表面積は大きく減少し、高い平面認識能を示し、酸性化合物に対する大きい保持を示した。よって、PMPC(IPN)表面上のPMPCは、分子鎖が長い状態で、存在しているのではないかと考えられる。そのイメージ図を図. 3-8に示す。

PMPC(MeOH)表面上のPMPCは、分子鎖が短く、孤立性が高い状態で表面上に存在しているため、PMPC(IPN)表面上の、分子鎖が長く密度が高い状態のPMPCよりも、P=O部分が表面に露出している状態であり、それが高い塩基性化合物の保持につながったのではないかと考えられる。

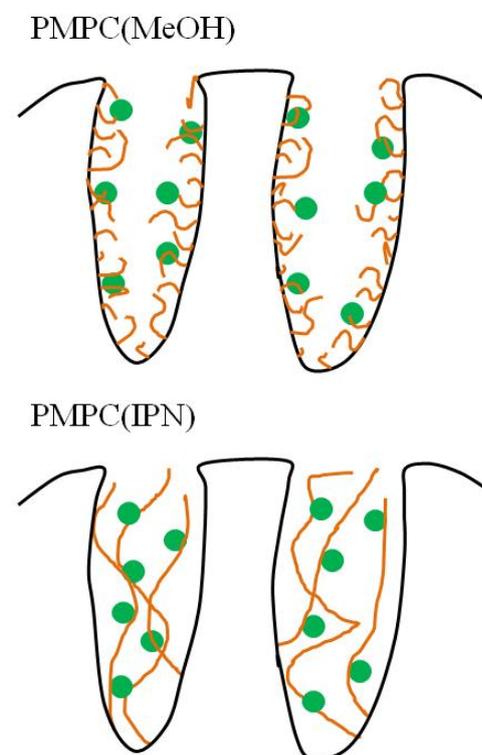


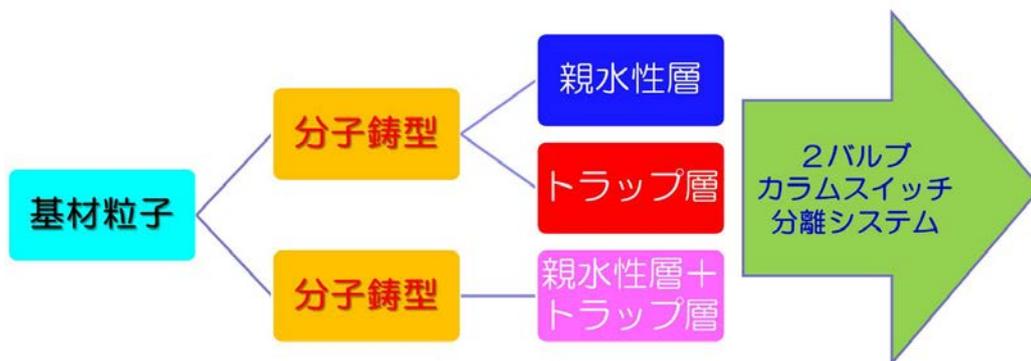
図. 3-8 Images of PMPC on particle surface

4. 現時点でのまとめと今後の課題

昨年度の分子鋳型作製成果に加えて、本年度は、親水性層の構築とトラップ層の構築を行った。モノマーとして両性の MPC を用い、修飾に用いる溶媒を変化させ、その溶解度を利用することで、酸性物質に対しても、塩基性物質に対してもトラップ可能な表面修飾層（トラップ層）が形成できることが明らかとなった。また、同様の手法により、MPC を短鎖として導入すれば、親水性も同時に担保できることが明らかとなり、下図に示すように、溶媒にメタノールを用いた場合には（ピンク）親水性層とトラップ層を同時に導入でき塩基性物質の捕捉を、また、メタノールで修飾し（赤）さらに 2-プロパノール中で修飾することで（青）酸性物質を捕捉し、親水性層を有する固相の作製が可能であることが示された。

分子鋳型の形成（官能基間距離固定）と併せて、目的の 3D 固相の構築に成功し、さらに我々が開発した 2 バルブ カラムスイッチ 分離システムの濃縮層として利用することで、様々な難捕捉、親水性環境汚染物質に対応可能であると考えられる。

今後は、これらの知見を生かして、実際の簡易分析例を増加させたいと考えている。



5. 参考文献

- 1) N. Nakada, K. Komori, Y. Suzuki, C. Konishi, I. Houwa, H. Tanaka, Occurrence of 70 pharmaceutical and personal care products in Tone River basin in Japan, *Water Sci. Technol.* 56 (2007) 133–140.
- 2) Y. Watabe, T. Kubo, T. Nishikawa, T. Fujita, K. Kaya, K. Hosoya, Fully automated liquid chromatography-mass spectrometry determination of 17 beta-estradiol in river water, *J. Chromatogr. A* 1120 (2006) 252–259.
- 3) Y. Watabe, T. Kubo, T. Tanigawa, Y. Hayakawa, K. Otsuka, K. Hosoya, Trace level determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in river water with automated pretreatment HPLC, *J. Sep. Sci.* 36 (2013) 1128–1134.
- 4) K. Hosoya, J.M.J. Frechet, *J. Polym. Sci. A. Polym. chem.*, 31, 2129–2141, 1993
- 5) Q.C. Wang, K. Hosoya, F. Svec, J.M.J. Frechet, *Anal. Chem.*, 64, 1232–1238, 1992
- 6) V. Smigol, F. Svec, K. Hosoya, Q.C. Wang, J.M.J. Frechet, *Angew. Makromol. Chem.*, 195, 151–164, 1992.
- 7) D. Horák, *Acta Polym*, 47, 20–28, 1996
- 8) Y. Tominaga, graduation thesis, Tohoku University, 2008.
- 9) I. Matsushita, N. Ishii, Korenawakaruekitaikuromatogurafi sonoshikumitotsukaikata, Kagaku-Dojin Publishing Company, INC.
- 10) T. Nakagawa, K. Makino, Raihusaiensu no tameno kousoku ekitai kuromatogurafi, Hirokawa-Shoten Ltd.
- 11) L.R. Snyder, J.L. Glajch, J.J. Kirkland, A. Takahashi, S. Araki, PRACTICAL HPLC METHOD DEVELOPMENT, Kagaku-Dojin Publishing Company, INC.
- 12) M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, M. Nomura, A. Baba, M. Miura, Spectroscopic Methods in Organic Chemistry, Kagaku-Dojin Publishing Company, INC.
- 13) K. Hosoya, M. Teramachi, N. Tanaka, A. Kobayashi, T. Kanda, Y. Ohtsu, *Anal. Chem.*, 73, 5852–5857, 2001, DOI: 10.1021/ac0105991
- 14) N. Tanaka, K. Hashizume, M. Araki, *J. Chromatogr.*, 400, 33–45, 1987.
- 15) T. Mori, T. Kubo, K. Hosoya, *Anal. Sci.*, 26, 311–316, 2010.
- 16) T. Tanigawa, T. Kubo, K. Hosoya, *Chem. Lett.*, 41, 1265–1266, 2012, DOI: 10.1246/cl.2012.126
- 17) T. Tanigawa, doctoral thesis, Tohoku University, 2013.

6. 参考資料・自動濃縮システム

<http://www.an.shimadzu.co.jp/hplc/aplsys/auto-c/auto1.htm>



高速液体クロマトグラフ
High Performance Liquid Chromatograph Auto-Concentration System
自動濃縮システム



謝辞：最後になりましたが、琵琶湖・淀川水質保全機構からの平成25年度、および26年度のご支援に感謝すると同時に、本成果を今後の水管理に繋げたいと考えて下ります。ありがとうございます。

成果等)

- 1) T. Kubo, K. Kuroda, Y. Tominaga, T. Naito, K. Sueyoshi, **K. Hosoya**, and Koji Otsuka, Effective determination of a pharmaceutical, sulpiride, in river water by online SPE-LC-MS using a molecularly imprinted polymer as a preconcentration medium. *J. Pharm. and Biomed. Anal.*, 89, 111 – 117 (2014).
- 2) **K. Hosoya**, Simple LC using New Macroporous Polymers *Chromatography*, 34, No. 1, 1 – 22 (2013).
- 3) 細矢 憲
環境汚染の認識と改善に寄与する高分子多孔体の開発（展望）
高分子 8月号（特集：環境浄化材料）Vol. 62, 434 – 436 (2013).

細矢 他 特許出願 2 件

- 1) 出願番号：特願 2015-015659
発明の名称：陰イオン交換能を発現する両性イオン導入樹脂
- 2) 出願番号：特願 2015-015660
発明の名称：陽イオン交換能を発現する両性イオン導入樹脂