

博士学位論文

(内容の要旨及び論文審査の結果の要旨)

	MIKI Yuta
氏名	三木 雄太
学位の種類	博士 (工学)
学位記番号	博 甲 第 62 号
学位授与	令和 4 年 3 月 23 日
学位授与条件	学位規程第 3 条第 3 項該当
論文題目	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
論文審査委員	(主査) 教授 手嶋 紀雄 ¹ (審査委員) 教授 大澤 善美 ¹ 教授 鈴木 森晶 ² 教授 村上 博哉 ¹ 客員研究員 井上 嘉則 ¹

論文内容の要旨

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

機器分析において、試料中の測定対象成分の濃縮および分離・検出を妨害する夾雑成分の除去を目的として行う前処理は、高精度・高感度な定量分析における重要な工程である。その前処理には固相抽出法が汎用されており、本研究では有機ポリマー系の固相抽出剤の高性能化について研究を行った。それに加えて、固相抽出剤粒子を効率的に合成するための均一径粒子合成法の確立、および固相抽出剤粒子の使用用途を拡大するための粒子成形技術の開発についても研究を行った。これらの研究成果は、固相抽出剤に関する基礎研究を大きく推進させたものであり、また応用面では固相抽出剤の形状を改善することにより使用用途を拡大させている。以下、章ごとの内容について順を追って記述する。

第 1 章は序論である。機器分析における前処理の役割と重要性について言及したのち、前処理に汎用される固相抽出法の特徴について述べた。また、固相抽出に使用される固相抽出剤 (吸着分離剤) の合成手法、固相抽出剤の細孔の設計、固相抽出剤の形状と形状毎の使用用途について言及し、第 2 章以降の内容を概説した。

第 2 章では、高極性な物性を有する核酸塩基やヌクレオシドの効率的な抽出を目的として、固相抽出において最も汎用的である逆相系の固相抽出剤について基礎的な検討

を行った。逆相条件における主相互作用である疎水性相互作用を発現させるためのジビニルベンゼンと、メタクリレート系の親水性モノマーとの共重合体について、モノマー及び細孔調節剤の種類や組成比を変更したものを試作し、それぞれの固相抽出特性及び細孔特性を評価した。その結果、ジビニルベンゼンによる疎水性相互作用と親水性モノマーにより固相抽出剤表面に付与される濡れ性とのバランスや固相抽出剤の細孔物性等が捕捉能向上に寄与することが明らかとなった。種々の条件最適化により、本研究で開発された逆相系固相抽出剤は、核酸関連化合物に対して、世界で最も汎用されている逆相系固相抽出剤 OASIS® HLB よりも優れた固相抽出特性を示した。

第 3 章では、親水性相互作用クロマトグラフィー (hydrophilic interaction chromatography, HILIC) モードを発現する固相抽出剤の開発について検討した。第 2 章の検討により、市販品を大きく上回る性能の逆相系固相抽出剤を開発したが、ウラシルなどの特に極性が高い化合物の抽出効率の更なる改善は難しく、逆相系固相抽出剤での改善による極性化合物の捕捉には限界があるものと思われた。そこで、疎水性相互作用を主相互作用とする逆相条件以外の分離モードとして、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) において高極性化合物の分離に適用されている HILIC モードに注目した。HILIC では、極性の固定相表面に形成した水和層—移動相 (90%以上のアセトニトリル水溶液) 間の順相分配あるいは固定相への吸着が分離の機構とされている。その水和層を形成させるための役割を担う

¹ 愛知工業大学 工学部 応用化学科 (豊田市)

² 愛知工業大学 工学部 土木工学科 (豊田市)

化合物として、本研究では固定相表面への修飾剤として核酸塩基であるアデニンを選定した。グリシジルメタクリレートと親水性を示すメタクリレート共重合体にエポキシ基を介してアデニンを修飾し、HILICモードが発現するとされる条件下での固相抽出に供して捕捉特性を評価した。その結果、固相抽出においてもHILICモードが発現していることが示唆され、さらに、逆相系固相抽出剤では抽出が困難であったシチジンやグアノシン、ウリジンに対して、修飾したアデニンに由来する水素結合性によるとされる特異的な捕捉を確認した。

一般に、ポリマー系固相抽出剤は懸濁重合法により合成されるが、従来の懸濁重合法では幅広い粒子径をもつ粒子が同時に合成されてしまい、合成後に篩による粒子径毎の分級操作が必要であり、かつ固相抽出に不適な粒子径の粒子は廃棄されてしまう。そこで第4章では、固相抽出剤(多孔質ポリマー粒子)を均一径で、かつ簡便に合成するための手法を確立し、合成した均一径粒子の細孔特性及び固相抽出特性を評価した。固相抽出に好適とされる“粒子径50 μm ”の“多孔質”ポリマー粒子を“均一径”で合成したという報告はわずかであり、また合成された粒子の細孔特性や固相抽出特性を詳細に評価したという報告はほぼ存在しない。そのため、粒子径約50 μm の均一径で多孔質ポリマー粒子を合成するための手法を確立し、その固相抽出特性等の評価を行った。本研究では、シラスポーラスガラス(shirasu porous glass, SPG)と呼ばれる多孔質ガラス膜を用いた膜乳化法によって均一径エマルションを生成させ、懸濁重合法によって多孔質ポリマー粒子を合成した。エマルションの生成及び分散を安定化させるために、連続相の攪拌速度や添加する界面活性剤の種類や濃度等を検討した結果、粒子径50~60 μm の多孔質ポリマー粒子を、変動係数9.5%の均一さで合成可能であった。本法で合成された多孔質ポリマー粒子は、695 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ と、固相抽出剤として十分に高い比表面積を有しており、固相抽出特性については、極性有機化合物に対して、従来の手法で合成された固相抽出剤と同等の固相抽出回収率を示した。

第5章では、粒子状固相抽出剤をモノリス様の媒体へ成形する技術を開発した。粒子を成形することで、管体への充填が不要になるため使用用途の拡大が期待される。また、粒子の飛散や静電気による吸着といった取り扱いに関する問題が解消されるため、ハンドリングの大幅な向上が期待された。接合材料として市販接着剤を使用する成形技術を開発し、この成形技術によって粒子状固相抽出剤を成形した吸着媒体を、M-SPEM (molding-type solid-phase extraction media) と名付けた。接合材料である市販接着剤の種類、固相抽出剤の粒子径及びM-SPEMに含有される固相抽出剤の含有率について検討した。その結果、変成シリコーンあるいはエポキシ樹脂を主成分とする2種類いずれかの市販接着剤を用いることにより、粒子含有率85

wt%のM-SPEMを調製可能であった。M-SPEMの比表面積は、400~500 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ であり、固相抽出剤として有用な比表面積を有していた。M-SPEMを固相抽出に供して捕捉特性を評価したところ、極性有機化合物に対して、成形以前の固相抽出剤と同等の固相抽出特性を示した。

第6章では、結論として博士論文の全体を総括した。本研究で獲得された固相抽出剤に関する知見や固相抽出のための均一径粒子合成法、固相抽出剤の成形技術は、今後、固相抽出剤の研究開発を加速的に推進させ、高精度かつ高感度な分析の実現に貢献し、さらには安心・安全な水の提供というかたちで、持続可能な社会の実現にも貢献するものとする。

論文審査の結果の要旨

三木雄太君の研究は、水溶性の極性化合物を高度に濃縮・精製するために、固相抽出剤と被検成分との間の化学的・物理的相関を解明し、新奇な固相抽出剤を開発したものである。また、固相抽出剤に関する基礎的な研究のみならず、固相抽出剤の合成手法の改良および固相抽出剤の形状多様性の提案についても研究されている。

固相抽出とは、液性試料中に含まれる目的成分の抽出・濃縮や夾雑成分の除去に使用される試料の前処理手法の1つである。種々の相互作用を発現する固相抽出剤(吸着分離剤)をカートリッジ等の管体に充填し、試料溶液や有機溶媒を負荷することで、固相抽出剤と溶質との相互作用を利用して被検成分の捕捉と捕捉された被検成分の溶出を行うものである。

分析装置の高機能化に伴い、測定試料についてもより高度な精製が要求されるようになった。しかし、市販の固相抽出剤は、組成や化学的特性・物理的特性について詳細な開示がされていないため、適切な抽出条件を設定できず、高度な精製を実現するのが困難である。このため、市販の固相抽出剤に依存している限り、今後ますます複雑化していく測定試料に対して対応できなくなるという考えから、固相抽出剤の自主開発に着手した。このような背景から本研究では、固相抽出剤を自ら設計、試作および評価する基礎的な研究によって、物性が明白である固相抽出剤を試作し、固相抽出剤と被検成分との間の相関を解明した。その結果、固相抽出剤の設計指針を獲得することができた。また、固相抽出剤の合成およびアプリケーション展開における問題点を指摘し、その問題を解決するための検討が行われた。これらの研究成果は以下の通りである。

第1章は序論として研究背景が記述された。機器分析における前処理の重要性と前処理における固相抽出法の有用性と課題について述べたのち、固相抽出に使用される固相抽出剤の合成方法、固相抽出剤の形状および使用用途に

ついて解説し、第2章以降の内容が概説されている。

第2章では、逆相分配系固相抽出剤の開発について記述されている。固相抽出において最も汎用的である逆相分配モードの固相抽出剤について基礎的な検討を行い、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し、極性化合物を捕捉するためには、固相抽出剤の親水性親油性バランスおよび比表面積が重要であることを明らかにした。獲得した知見を基に開発した固相抽出剤は、極性化合物を捕捉可能であり、世界で最も汎用される固相抽出剤 OASIS® HLB よりも優れた固相抽出特性を示した。この成果は、Elsevier 発刊の Talanta 誌に掲載されている。

第3章では、親水性相互作用クロマトグラフィー (hydrophilic interaction chromatography, HILIC) モードを発現する新奇な固相抽出剤を開発した。第2章で開発した固相抽出剤の捕捉機構は疎水性相互作用であり、特に極性が高い化合物を効率よく捕捉できなかった。一方 HILIC では、極性の固定相表面に形成された水和層—移動相間の順相分配および固定相への吸着が分離の機構とされている。そこで本研究では、親水性樹脂にアデニンを修飾したアデニン修飾 HILIC 型固相抽出剤が設計された。この固相抽出剤は、順相分配と修飾したアデニン由来の水素結合性によるとされる特異的な固相抽出特性を示し、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した。この成果は、日本分析化学会が発刊する分析化学誌に掲載されている。

第4章では、固相抽出剤を均一径で合成するための手法が確立された。従来の固相抽出剤の合成過程では、粒子径毎の分級が必要である。しかし、この分級工程が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となっている。そのため、分級工程を省略することで、固相抽出剤の調製期間を短縮し、固相抽出剤に関する基礎研究を加速的に推進させることができる。また従来は分級によって残った目的径以外の粒子を廃棄する必要があったが、本研究では目的径の粒子だけを得ることができるため、環境負荷低減にもつながる。具体的には、シラスポーラスガラス (Shirasu Porous Glass, SPG) と呼ばれる多孔質ガラス膜を用いた SPG 膜乳化法によって均一径エマルションを生成させたのち、懸濁重合法によって多孔質ポリマー粒子を合成した。エマルションの分散条件について最適化を行ったところ、合成された粒子の粒子径は 50~60 μm となり、その変動係数は十分に低値である 9.5% に収束した。合成された固相抽出剤の比表面積は、従来法で合成された固相抽出剤 (849 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$) に対して約 18% 低減したものの、695 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ となり、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。SPG 膜乳化法で合成した固相抽出剤の極性化合物に対する固相抽出特性は、従来法で合成した固相抽出剤と同等であった。この成果は、日本分析化学会が発刊する分析化学誌に掲載されている。

第5章では、固相抽出剤粒子を成形する技術を開発した。一般に、固相抽出剤の形状は粒子であるため、取り扱いが非常に煩雑である。また、使用にあたって管体への充填が必須であるため使用用途が制限され、アプリケーション展開を阻害している。これらの問題を解消するための粒子を成形する既存の技術があるが、その成形技術は、調製が簡便でない、形状が限定的である、吸着能・吸着容量が低いという課題を残している。そのため、新奇な成形手法の開発が必要であると考え、本研究では粒子を接合するために接着剤に着目した。本成形技術によって成形された吸着媒体は、成形型固相抽出媒体 (molding-type solid-phase extraction media, M-SPEM) と名付けられた。既存の吸着媒体では、粒子含有率は約 50%、比表面積は約 100 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ 程度であるのに対して、本 M-SPEM の粒子含有率は 85% (w/w)、比表面積は 400~500 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ であった。また M-SPEM の極性化合物に対する固相抽出特性は、成形以前の固相抽出剤粒子と同等であったことから、取り扱いが容易な固相抽出操作を確立できたと判断できる。また形状も円筒形だけでなく、薄膜シートにも成形できることが示された。これらの成果は、日本分析化学会が発刊する Analytical Sciences 誌に掲載されている。

第6章では、結論として博士論文の全体を総括されている。本研究で解明された固相抽出剤と被検成分間の化学的・物理的相関の知見およびそれに基づいて開発された固相抽出剤は、今後ますます機器分析などで要求される測定試料の高度な濃縮・精製のために重要となる。また、均一径固相抽出剤合成法の確立、固相抽出剤粒子の成形技術の開発といった技術革新は、固相抽出剤の研究開発を加速的に推進させると共に、固相抽出剤の可能性をさらに開拓するものと期待される。申請者が成果の一部を学会発表したところ、全国的な学会 (日本分析化学会第 68 年会) において若手ポスター賞を受賞したことからわかるように、研究の推進や発信の能力は十分に備わっている。よって三木雄太君の博士論文は、博士 (工学) の学位のレベルを十分に満たしているものであると判定された。