

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05107

研究課題名(和文) 単一微粒子計測法による細孔内物質移動とクロマトグラフィーによる分離過程の解明

研究課題名(英文) Analysis of mass transfer in pores related to chromatographic separation processes by single microparticle measurement method

研究代表者

中谷 清治 (NAKATANI, Kiyoharu)

筑波大学・数理物質系・教授

研究者番号：00250415

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：単一粒子捕捉法と顕微分析法を組み合わせた手法等を用いて、クロマトグラフィーの分離に係る有機溶媒-水混合溶媒系での低分子のODSシリカゲル内細孔内拡散、高分子のシリカゲル細孔内拡散過程を明らかにした。アセトニトリル-水混合溶媒系でのクマリン102では、細孔内拡散は表面拡散が、1-ブタノール-水混合溶媒系では、ポア拡散と表面拡散の両方が重要であることを明らかにした。生体高分子ミオグロビンが単一シリカゲル粒子内物質移動する過程では細孔壁での吸脱着速度は非常に遅く、これを考慮したポア-表面拡散モデルでシミュレーションできることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

微粒子細孔内物質移動は、クロマトグラフィーやドラッグデリバリーシステム、触媒などに関係し、その速度論的機構解明はこれらシステム・材料開発に不可欠である。本研究では、特にクロマトグラフィーで用いられる粒子、測定条件での細孔内物質移動を直接測定できるようになり、低分子と高分子の物質移動の違いについて明らかにした。本結果と研究手法は、分析化学、界面化学、材料化学の分野の研究に有用な知見を与えたものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Diffusion in pores of a small solute in an ODS silica gel/organic solvent-water system and a polymer in a silica gel/water system, related to chromatographic separation processes, has been analyzed by single microparticle manipulation and microspectroscopy techniques. Intraparticle diffusion of coumarin 102 in acetonitrile-water was limited by surface diffusion while that in 1-butanol-water was governed by both pore and surface diffusions. Adsorption/desorption rates of myoglobin on pore walls in silica gel were extremely slow. Therefore, intraparticle mass transfer of the biopolymer was simulated on the basis of the pore and surface diffusion model as the slow adsorption/desorption rates.

研究分野：分析化学

キーワード：細孔内拡散 吸脱着 シリカゲル ODSシリカゲル 顕微分光法 クロマトグラフィー

1. 研究開始当初の背景

多孔質粒子系における物質移動や化学反応等の解明・制御は、クロマトグラフィーや固相抽出、触媒反応、ドラッグデリバリーシステム等に関連し重要な研究課題である。多孔質粒子/溶液系の化学プロセスは、粒子外溶液-粒子表面間の物質移動(粒子外物質移動)、粒子表面で細孔から出入りする過程、粒子内での細孔内拡散、細孔壁での吸着・脱着や化学反応等が含まれている。多孔質粒子を用いる分離、反応系の解明には、速度論的研究が不可欠であるが、多粒子系での測定は、上記の素過程を分離して観測することが困難であり、研究例も限られている。研究代表者らは、溶液中に単一微粒子が存在する系で計測を行うと、粒子外物質移動が定常的球拡散となり単純化され細孔内プロセスの解析が容易となることから、マイクロキャピラリーマニピュレーション法により数10マイクロメートルの単一多孔質微粒子を溶液中に添加し、単一粒子の顕微吸光法、(共焦点)顕微蛍光法、または共焦点光退色後蛍光回復法で計測してきた。また、粒径が数マイクロメートルの単一多孔質微粒子をレーザー捕捉し光退色後蛍光回復法で顕微蛍光計測し、粒子内物質速度を解析してきた。これらの結果より、シリカゲル中のシラノール基の解離サイトに吸着したカチオン性低分子色素の細孔内拡散は、細孔内溶液を拡散するポア拡散に支配されること、ODSシリカゲル中のODS相に吸着した色素の細孔内拡散は、ODS相に吸着したまま拡散する表面拡散に支配される可能性を示した[1]。

実際のクロマトグラフィーでの分離過程と細孔内物質移動速度を対応させた研究を展開していくことは重要であると考えられるが、従来の単一微粒子計測法では、揮発性溶媒での測定が困難であり、クロマトグラフィーでよく用いられるアセトニトリル-水混合溶媒系等では検討できなかった。また、細孔内拡散や吸脱着について、様々な部位で吸着できる高分子は低分子と大きく異なることも予想されるが、詳細な研究は行われていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、単一微粒子マニピュレーション法と顕微分析法を組み合わせた手法を用いて、溶液中に単一多孔質粒子が存在する系で粒子外物質移動を単純化し、アセトニトリル-水混合溶媒等で低分子のODSシリカゲル系における物質移動過程を、また、多点吸脱着を伴う高分子の細孔内拡散過程や高分子/細孔サイズ比の効果を明らかにし、クロマトグラフィーの分離過程と細孔内物質移動との関係を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、クロマトグラフィーでよく用いられるアセトニトリル-水混合溶媒系等において、高速液体クロマトグラフィーで用いられる粒径が数マイクロメートルのODSシリカゲル系で、アセトニトリル等が揮発しない条件下で、単一微粒子計測できるシステムの作製を行い、性能評価した。このシステムを用いて、有機溶媒-水混合溶媒/ODSシリカゲル系における低分子の分離・物質移動の解明を行った。また、共焦点顕微分光法により、高分子の細孔内拡散の解明を、高分子/細孔サイズ比の観点から行った。

4. 研究成果

(1) 数マイクロメートル粒子の細孔内物質移動が揮発性溶媒系で測定できるシステム

アセトニトリル-水混合溶媒系で、クマリン102が分配平衡に達した直径3マイクロメートル、細孔直径12ナノメートルのODSシリカゲル粒子を、マイクロ流路セル(幅及び高さ200マイクロメートル、長さ87ミリメートル)に入れ密封できるようにした。フローはさせないが、このマイクロ流路セルを用いることで密閉し揮発性溶媒での実験が可能となり、実際に逆相クロマトグラフィーでよく用いられるアセトニトリル-水混合溶媒系での検討が可能となった。マルチチャンネル光検出器

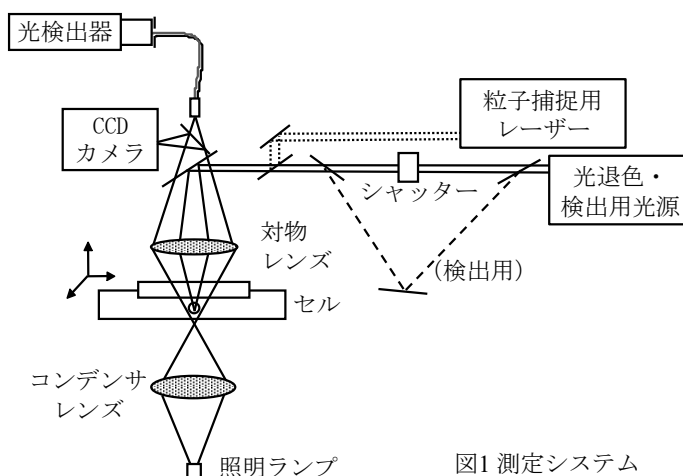


図1 測定システム

(PMA12 C14631, Hamamatsu

Photonics)を光学顕微鏡(BX60, Olympus)に導入し、マイクロ流路セル中のODSシリカゲル粒子を、フローさせない状態で1064 nmレーザー光(Nd:YVO₄, Millennia IR, Spectra-Physics)で捕捉し、高強度の408 nmレーザー光(TCSQ040503-4.5, NeoArk)を用いてクマリン102を高速度シャッター(76992, Spectra-Physics)で0.1 s間照射し光退色させた。周囲の

溶液から単一 ODS シリカゲル粒子にクマリン 102 が再分配する過程を、低強度の蛍光検出用 408 nm レーザー光を用いて高感度に顕微蛍光分析できるようにした (図 1)。クマリン 102 の再分配速度測定から、粒子内拡散のアセトニトリル混合比率依存性が測定できるようになった。また、マイクロ流路セルを自作の温度コントロールできる金属ブロックに固定し、アセトニトリル-水混合溶媒系で、クマリン 102 が分配平衡に達した直径 3 マイクロメートル、細孔直径 12 ナノメートルの ODS シリカゲル粒子をセルに入れ、クマリン 102 の再分配速度の温度依存性を測定可能とした。セルを密封できているので、揮発性溶媒での粒子内拡散について、活性化エネルギーの観点からも解析できるようになった。さらに粒子外拡散と粒子内拡散を考慮した解析プログラムを作成し、粒子内拡散係数を決定できるようにした (10^{-8} cm²/s)。

(2) 有機溶媒-水混合溶媒/ODS シリカゲル系における低分子の物質移動

(1) のシステムを用いて、有機溶媒-水混合溶媒/ODS シリカゲル系における、電荷を持たない低分子色素であるクマリン 102 について、粒子内拡散係数 D を決定した。 D をポア-表面拡散モデル $D = D_w H / (\tau_w (1+R)) + D_s R / (\tau_s (1+R))$ (D_w : バルク溶液相中の色素の拡散係数, H : 細孔障壁のパラメータ, R : 細孔内における色素の分配係数, τ_w と τ_s : ポア拡散と表面拡散における屈曲率) を用いて解析した[1]。この式の右辺第 1 項はポア拡散項で、第 2 項は表面拡散項であり、 D の $1/(1+R)$ に対する依存性から細孔内拡散を議論した。アセトニトリル-水混合溶媒系では、細孔内拡散は表面拡散が支配的になり、1-ブタノール-水混合溶媒系では、ポア拡散と表面拡散の両方が重要であることが示唆され、有機溶媒依存性を見出した。また、イオン性色素であるローダミン 6G を用いたところ、(1) の光退色後蛍光回復法で測定できる細孔内拡散速度よりも速くなったので、共焦点顕微システムによる蛍光相関分光法を検討し、粒子内拡散係数の計測を試みた。直径数 10 マイクロメートルの単一 ODS シリカゲル粒子を用い、アセトニトリル-水混合溶媒系で、一成分の拡散として解析できると仮定して細孔内拡散係数を測定すると拡散係数は 10^{-7} cm²/s 程度であり、ポア拡散と表面拡散の両方が重要であることが明らかとなった。ローダミン 6G 系では、アセトニトリル混合比率が増加すると、表面拡散が速くなることを示唆する結果が得られた[2]。粒子内物質移動速度はクロマトグラムにおけるピークの形状、拡がりに関係する。アセトニトリル-水混合溶媒/ODS シリカゲル系は逆相クロマトグラフィーでよく用いられる系であり、粒子内物質移動速度の直接測定と有機溶媒とその混合比率依存性の解明ができたことは意義深いと考えられる。

(3) 高分子の細孔内物質移動

多点吸脱着を伴う高分子の細孔内拡散の検討を行うため、シリカゲル粒子に亜鉛ミオグロビン

(ヘムの鉄を亜鉛に置換することで蛍光性となる) が分配・放出する過程の計測を試みた。(1) のシステムを用いて、直径 3 マイクロメートルの粒子で蛍光計測できる検出感度・レーザー光強度では、亜鉛ミオグロビンが光退色(蛍光測定時)し、定量的なデータ取得が困難であった。そこで、数 10 マイクロメートルのシリカゲル粒子について共焦点顕微蛍光法を用いて測定を行った。マイクロキャピラリーマニピュレーション法を用いて、pH6.5 の亜鉛ミオグロビン溶液中に単一シリカゲル粒子を添加し、亜鉛ミオグロビンが分配する過程及び放出する過程を測定した[1]。この方法では、粒子の中心軸に沿った蛍光強度分布の時間依存性から粒子内拡散を観測できる。粒子外拡散と粒子内拡散を考慮した解析プログラムで粒子内拡散係数 D を求めたところ、分配過程と放出過程で観測された D の $1/(1+R)$ 依存性が異なった。亜鉛ミオグロビン系では細孔壁での吸脱着速度は遅く、吸脱着が速く局所的に吸脱着平衡が成り立つとするポア-表面拡散モデルでは解析できなかった。細孔内物質移動は、遅い吸脱着速度を考慮したポア-表面拡散モデル(図 2) で説明できることを、解析プログラムを作成しシミュレーションから明らかにした。細孔径が大きくなるほどポア拡散が速くなり、遅い吸脱着速度の影響を受けることを明らかにした[3]。また、水溶液の pH によりミオグロビンの表面電荷が異なるので、粒子内拡散の pH 依存性を測定した。様々な pH における亜鉛ミオグロビンの共焦点顕微蛍光分析は、計測できる検出感度・レーザー光強度では退色の影響が確認されたため、発光はしないが安定であるミオグロビンを用いて顕微吸光分析した。単一粒子の吸光度の経時変化から、粒子内拡散係数を算出しポア-表面拡散モデルで解析した。pH = 6.0 では表面拡散のみ観測されたが、pH = 6.5, 6.8, 7.1 ではポア拡散と表面拡散の両方が関係し、ミオグロビンの表面電荷に大きく依存することを明らかにした[4]。低分子と異なる高分子の細孔内拡散と吸脱着速度の関係の解明は、クロマトグラフィーの分離機構を考えていく上で、重要な情報になるものと考えられる。

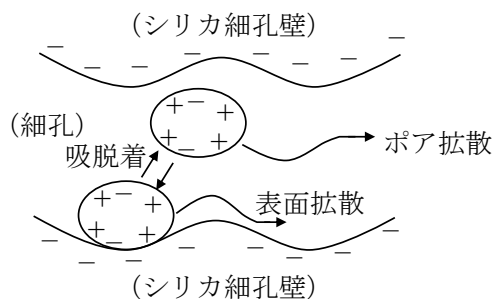


図2 細孔内物質移動

<引用文献>

1. A. Miyagawa, K. Nakatani, Evaluation of Intraparticle Diffusion Behavior in Porous

- Particle by Confocal Fluorescence Microspectroscopy, *Bunseki Kagaku*, 1-11, 72, 2023.
2. A. Miyagawa, T. Nohira, S. Nagatomo, K. Nakatani, Diffusion Behavior of Rhodamine 6G in Single Octadecyl-functionalized Silica Particle Revealed by Fluorescence Correlation Spectroscopy, *Anal. Sci.*, 2024, in press.
 3. A. Miyagawa, S. Nagatomo, H. Kuno, T. Terada, K. Nakatani, Pore Size Dependence of Mass Transfer of Zinc Myoglobin in a Single Mesoporous Silica Particle, *Langmuir*, 39, 11329-11336, 2023.
 4. A. Miyagawa, H. Kuno, S. Nagatomo, K. Nakatani, Evolution of Myoglobin Diffusion Mechanisms: Exploring Pore and Surface Diffusion in a Single Silica Particle, *Anal. Sci.*, 2024, in press.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Miyagawa Akihisa, Nagatomo Shigenori, Kuno Hatsuhi, Terada Takuto, Nakatani Kiyoharu	4. 巻 39
2. 論文標題 Pore Size Dependence of Mass Transfer of Zinc Myoglobin in a Single Mesoporous Silica Particle	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Langmuir	6. 最初と最後の頁 11329 ~ 11336
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.langmuir.3c01017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 MIYAGAWA Akihisa, NAKATANI Kiyoharu	4. 巻 72
2. 論文標題 Evaluation of Intraparticle Diffusion Behavior in Porous Particle by Confocal Fluorescence Microspectroscopy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 BUNSEKI KAGAKU	6. 最初と最後の頁 1 ~ 11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2116/bunsekikagaku.72.1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miyagawa Akihisa, Nohira Terumasa, Nagatomo Shigenori, Nakatani Kiyoharu	4. 巻 40
2. 論文標題 Diffusion behavior of rhodamine 6G in single octadecylsilyl-functionalized silica particle revealed by fluorescence correlation spectroscopy	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Analytical Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s44211-024-00583-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miyagawa Akihisa, Kuno Hatsuhi, Nagatomo Shigenori, Nakatani Kiyoharu	4. 巻 40
2. 論文標題 Evolution of myoglobin diffusion mechanisms: exploring pore and surface diffusion in a single silica particle	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Analytical Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s44211-024-00575-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 野平耀正、宮川晃尚、長友重紀、中谷清治
2. 発表標題 蛍光相関分光法によるODSシリカゲル/アセトニトリル-水系におけるローダミン6Gの細孔内移動過程の解析
3. 学会等名 第36回日本イオン交換研究発表会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 渡邊紗捺、山田一輝、宮川晃尚、長友重紀、中谷清治
2. 発表標題 単一ODSシリカゲル粒子/アセトニトリル-水系におけるカチオン性・中性・アニオン性色素の物質移動過程の解析
3. 学会等名 第84回分析化学討論会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 中谷 清治
2. 発表標題 単一多孔質粒子/溶液及び単一液滴/溶液系における分配・放出過程の速度論的解析
3. 学会等名 化学工学会 第53回秋季大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山田 一輝，長友 重紀，宮川 晃尚，中谷 清治
2. 発表標題 単一ODSシリカゲル/有機溶媒-水系における細孔内拡散の混合溶媒依存性
3. 学会等名 日本分析化学会 第83回分析化学討論会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山田 一輝、長友 重紀、宮川 晃尚、中谷 清治
2. 発表標題 レーザー捕捉・顕微分光法による ODSシリカゲル/アセトニトリル-水混合溶媒系における物質移動過程の解析
3. 学会等名 日本分析化学会 第82回分析化学討論会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

筑波大学数理物質系化学域中谷研究室 https://www.chem.tsukuba.ac.jp/nakatani/
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関