

# ゲルパーミエーションクロマトグラフィー用ゲル充填剤としての 単分散親水性高分子マイクロスフィアの開発

吉澤秀和\* 池田 智\*\* 北村吉郎\* 長谷川正積\*\*\*  
森山弘之\*\*\* 河野恵宣\*\*\*\* 幡手泰雄\*\*

## Preparation of Monodispersed Hydrophilic Polymer Microspheres in Gel Permeation Chromatography

Hidekazu YOSHIZAWA\*, Satoshi IKEDA\*\*, Yoshiro KITAMURA\*,  
Masadumi HASEGAWA\*\*\*, Hiroyuki MORIYAMA\*\*\*\*,  
Yoshinobu KAWANO\*\*\*\* and Yasuo HATATE\*\*

(Received January 5, 2000)

Monodispersed porous polymer microspheres having diameter of ca. 50  $\mu\text{m}$  were successfully prepared by suspension polymerization of styrene, polyoxyethylene methacrylate and ethyleneglycol dimethacrylate. Monodispersed O/W emulsion was firstly made by SPG membrane emulsification technique, following droplets-swelling method of monodispersed seed emulsion by the addition of secondary emulsion. The effect of solvent used in suspension polymerization on porous structure of prepared polymer microspheres was investigated in this paper by identification with scanning electron microscopy, porosimeter and the performance in gel permeation chromatography. It was found that benzene, 1-butanol and butyl acetate worked as poor solvent for polymer prepared in this study and that polymer microspheres prepared with these solvents had larger pores. Gel permeation chromatography measurements indicates that polystyrene having molecular weight smaller than 50,000-100,000 can be clearly separated by using gel columns packed with polymer microspheres prepared with poor solvents.

**Key words:** polymer microsphere, monodispersed emulsion, swelling method, hydrophilic polymer, gel permeation chromatography, size-exclusive separation

## 1 緒言

近年、様々な機能が付与されたミクロンサイズの単分散高分子マイクロスフィアは、クロマトグラフィー用カラム充填剤、プリンター・複写機・FAX等のトナー、固定化生体触媒用担体、医療用診断剤など工業用、医療用など様々な分野で利用されている。しかしながら、この様なミクロンサイズの高分子マイクロスフィアは、乳化重合法及び懸濁重合法により得られる粒子径の狭間に位置し、その調製は容易でない(Hatate and Yoshizawa, 1996)。

単分散な高分子マイクロスフィアの調製法の一つに、SPG

(Shirasu Porous Glass)膜を利用したSPG膜乳化法がある(中島ら, 1993)。SPGとは、シラスを原料とし、均一に制御された細孔を持つ一種のガラス管である。筆者らの研究グループでは、このSPG膜乳化法によりエマルションの調製を行った後、懸濁重合法により約30 $\mu\text{m}$ の比較的単分散な高分子マイクロスフィアの調製を行ってきた。

(Hatate et al., 1996; Omi et al., 1995; Yoshizawa et al. 1996; 吉澤ら, 1997)

現在、タンパク質、ペプチド分離のためのGPC用充填剤として、50 $\mu\text{m}$ ~100 $\mu\text{m}$ の単分散な高分子マイクロスフィアが利用されている。この様な単分散高分子マイクロスフィアを調製するには、通常の懸濁重合+篩い分け、二段階膨潤法、動的膨潤法、液滴膨潤法などが考えられる。当研究室では、これまでに液滴膨潤法により、約50 $\mu\text{m}$ の単分散高分子マイクロスフィアの調製に成功した。

\* 岡山大学環境理工学部環境物質工学科

\*\* 鹿児島大学工学部応用化学工学科

\*\*\* 東ソー株式会社

\*\*\*\* 宮崎大学工学部物質環境化学科

Table 1 ミクロスフィア調製条件

	一次粒子		二次粒子	
	連続相	分散相	連続相	分散相
サンプル A		Bz 5.0g t-BPP 1.35g		Bz 25.0g プレナム 17.8g EGDMA 7.60g
サンプル B		Bz 5.0g t-BPP 1.35g		BuOH 22.9g AcOBu 7.62g プレナム 17.8g EGDMA 7.60g
サンプル C	水 150g PVA 1.0wt% SDS 0.2wt%	Bz 4.92g t-BPP 1.89g St 12.3g	水 500g PVA 1.0wt% SDS 0.1wt%	Bz 25.0g プレナム 17.8g EGDMA 7.60g
サンプル D		Bz 15.0g t-BPP 1.35g St 37.5g		Bz 25.0g プレナム 17.8g EGDMA 7.60g
サンプル E		Bz 5.0g t-BPP 1.35g		AcOEt 25.0g プレナム 17.8g EGDMA 7.60g

本研究では、タンパク質、ペプチドの分離・精製・分析を目指した、細孔径の精密制御を可能とする 50~100  $\mu\text{m}$  の単分散大粒径高分子ミクロスフィアの調整法を確立する事を目的とし、一次粒子として SPG 膜乳化法により調製したエマルジョンを、二次粒子として親水性モノマーを用いた改良型液滴膨潤法によりエマルジョンを膨潤させ、懸濁重合する事により得られる高分子ミクロスフィアを検討する。また、特に調製時に用いる溶媒種の影響及びスチレン添加による影響を調べるためにそれぞれ条件を変化させ検討する。

## 2 実験

### 2.1 試薬

モノマーであるスチレン (St) とエチレングリコールジメタクリレート (EGDMA) は、市販特級試薬を減圧蒸留したものを使用した。親水性モノマーであるプレナム PE-200 (プレナム) は、日本油脂(株)製のものそのままを使用した。重合開始剤である tert-ブチルパーバレート (t-BPP) は、化薬アクゾ(株)製からの提供品をそのままを使用した。他の試薬は、市販のものをそのままを使用した。

### 2.2 単分散高分子ミクロスフィアの調製

Table1 に調製条件を示す。まず、シードとなるエマルジョンを SPG 膜乳化法により調製し (一次粒子)、次に、ホモジナイザーにより親水性モノマーを溶解させたベンゼン (Bz) のエマルジョンを調製した (二次粒子)。これらを混合し、改良型膨潤法によりエマルジョンを膨潤させ、重合を行うことによりミクロスフィアの調製を行った。

#### 2.2.1 SPG 膜乳化法による一次エマルジョン粒子の調製

SPG 膜乳化法によりシード粒子となるエマルジョン

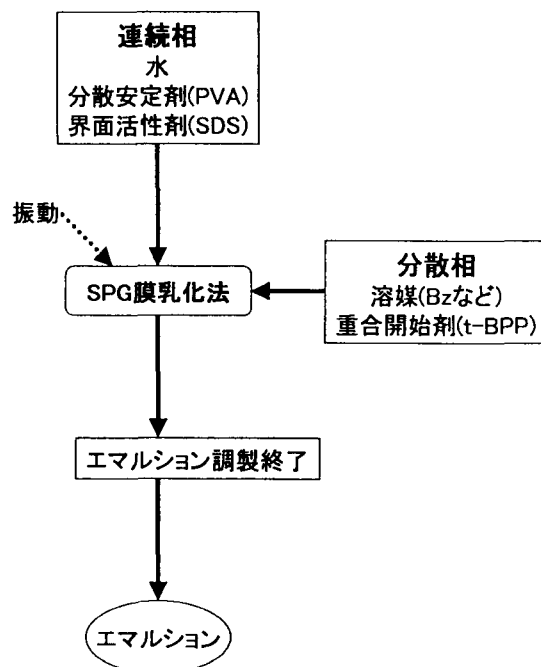


Fig. 1 SPG 膜乳化法による一次粒子の調製手順

(一次粒子)の調製を行った。調製手順を Fig. 1 に示す。分散安定剤としてポリビニルアルコール (PVA)、界面活性剤としてドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を水に溶解させた水溶液を連続相とした。重合開始剤として t-BPP を溶媒であるベンゼンに溶解させたものを分散相とした。

最初に試験管内に分散相を入れ、その試験管を分散相供給槽内に仕込んだ後密閉した。次に SPG 膜を SPG モジュール内に取り付け、窒素ガスにより分散相供給槽内を加圧することで、SPG モジュール内に分散相を注入した。SPG モジュールを振動部に取り付け、連続相供給槽内に連続相を仕込んだ後、振動部を振動させることで、SPG モジュール内に連続相を循環させた。さらに窒素ガスにより分散相供給槽内を加圧することで、SPG 膜を介して分散相が分散相側から連続相側へ圧入されエマルジョンを調製した。この操作を連続的にを行い、分散相供給槽内の分散相がなくなるまでに行い、分散相がなくなった時点でエマルジョン調製を終了した。この調製したエマルジョンを一次粒子とした。

#### 2.2.2 ホモジナイザーによる二次エマルジョン粒子の調製

ホモジナイザーによりエマルジョン (二次粒子) の調製を行った。調製手順を Fig. 2 に示す。分散安定剤として PVA、界面活性剤として SDS を水に溶解させた水溶液を連続相とした。モノマーとしてプレナム PE-200 (プレナム)、架橋剤として EGDMA を溶媒に溶かしたものを分散相とした。溶媒はベンゼン、ブタノール (BuOH) と酢酸ブチル (AcOBu) の混合溶液、酢酸エチル (AcOEt) を用いた。

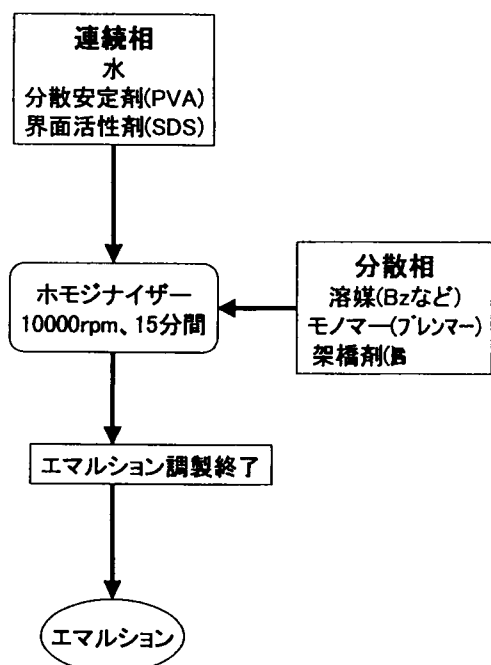


Fig. 2 ホモジナイザーによる二次粒子の調製手順

1000ml ビーカーに連続相 200g と分散相を入れ、ホモジナイザーを用いて回転速度 10000 rpm で 15 分間エマルジョン調製を行った。エマルジョン調製後、残りの連続相をビーカーにゆっくりと注ぎ、エマルジョン調製を終了した。

### 2.2.3 膨潤法によるマイクロファイアの調製

膨潤法によるマイクロファイアの調製手順を Fig. 3 に示す。

SPG 膜乳化法により調製した一次粒子のうち 150ml をメスシリンダーで測り取り、ホモジナイザーにより調製攪拌し、12 時間の一定条件でエマルジョンを膨潤させた。その膨潤の過程を光学顕微鏡により観察した。

12 時間後、膨潤したエマルジョンを懸濁重合法により重合した。重合反応装置の概略図を Fig. 4 に示す。反応器には容積 800ml の恒温ジャケット付きセパラブルフラスコを使用し、攪拌には、スクリー型 2 枚羽根を用いた。反応温度まで昇温してあるセパラブルフラスコ内に膨潤したエマルジョンを入れ、反応器内を窒素で置換した直後を重合開始時間とし、攪拌速度 120rpm、反応温度 343K、反応時間 16 時間の一定条件で重合を行った。重合終了後、メタノール洗浄を 2 回、約 60℃ の湯洗浄を 1 回行い、濾過、自然乾燥を行い、乾燥後のマイクロファイアを回収した。

### 2.3 エマルジョン、マイクロファイアの観察および測定

調製した一次粒子、二次粒子の状態および膨潤過程を観察するため、調製直後のエマルジョン、膨潤途中のエマルジョンを光学顕微鏡により観察した。また、調製し

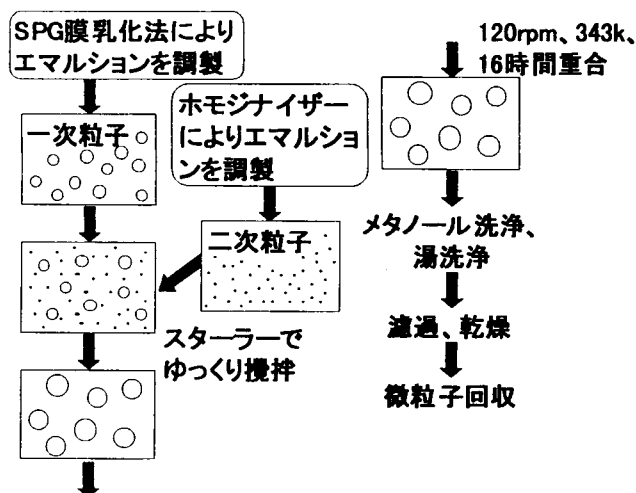


Fig. 3 膨潤法によるマイクロファイアの調製手順

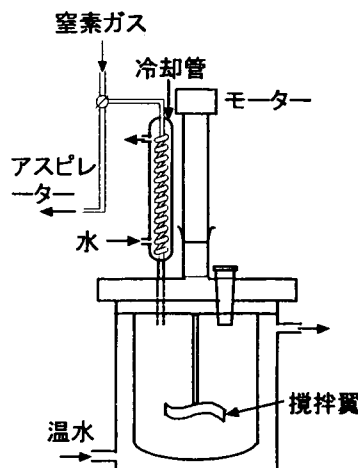


Fig. 4 重合反応装置概略図

たマイクロファイアについては電子顕微鏡 (SEM) 観察、平均粒径および粒径分布測定、BET 法によるマイクロファイアの平均細孔径および細孔径分布測定、溶媒にテトラヒドロフラン、サンプルとして標準ポリスチレンを用いたの排除限界分子量測定を行った。

## 3. 結果および考察

### 3.1 光学顕微鏡写真

調製した一次粒子、二次粒子を混合し、二次粒子を一次粒子中に取り込ませることで一次粒子を膨潤させた。膨潤過程のエマルジョンの光学顕微鏡写真を Fig. 5 に示す。膨潤後のエマルジョンの平均径は最大で 60.8nm であり、比較的単分散であった。

一次粒子と二次粒子を混合しスターラーでゆっくりと攪拌を行うと、時間経過とともに二次粒子が一次粒子に吸収されるため二次粒子の数が減り、一次粒子は膨潤して大きくなった。最終的に二次粒子はほぼ消滅した。

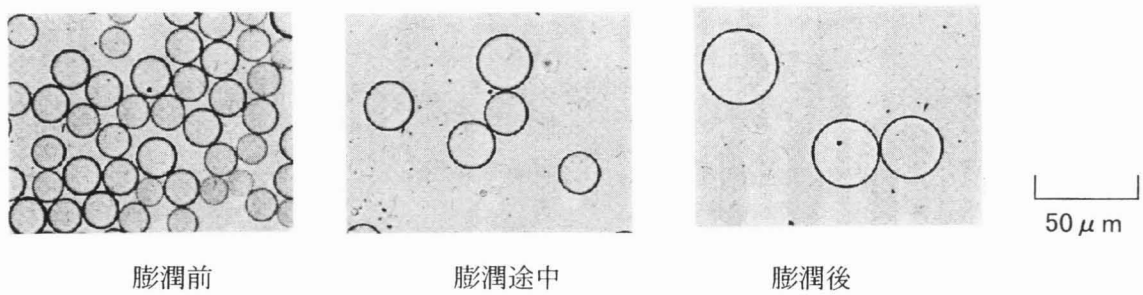


Fig. 5 膨潤過程の光学顕微鏡写真 (400 倍)

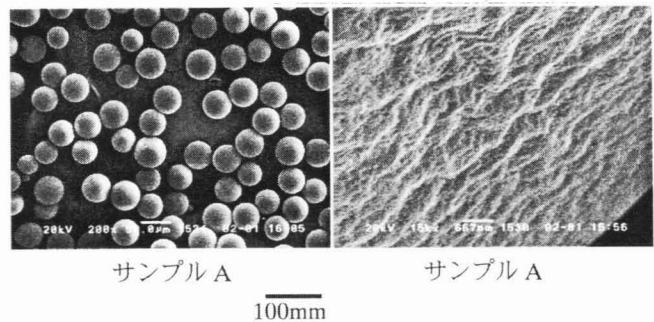
Table 2 BET 法によるミクロスフィア表面の測定結果

	サンプル A	サンプル B	サンプル C	サンプル D	サンプル E
累積細孔容積[cc/g]	0.2506	0.1884	0.0191	0.0483	0.1283
累積比表面積 [m <sup>2</sup> /g]	39.92	33.10	14.84	30.50	48.85
平均細孔径[μm]	0.0251	0.0228	0.0051	0.0063	0.0105
極大細孔直径[μm]	0.0428	0.0352	0.0041	0.0041	0.012

3.2 電子顕微鏡観察

調製したミクロスフィアを SEM により観察した。SEM 写真を Fig. 6 に示す。SEM 写真より調製したミクロスフィアはどれも真球状であった。またその粒径分布は比較的単分散であり、平均径は最大で 50.0μm であった。

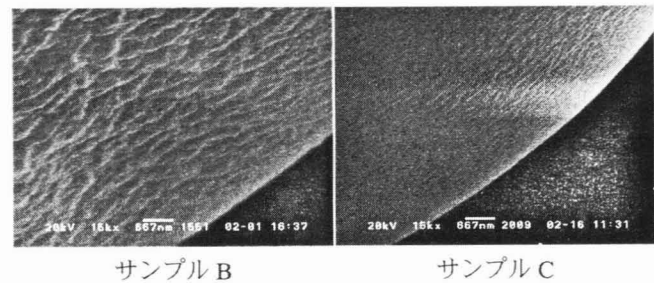
すべてのサンプルのミクロスフィアにおいて、その表面に凹凸が確認された。しかし、一次粒子調製時に用いた溶媒種の影響およびスチレン添加による影響は SEM 写真からは比較できなかった。



3.3 BET 法によるミクロスフィアの表面測定

調製後のミクロスフィア表面を BET 法により測定した。測定結果を Table 2 に示す。

この結果より、ミクロスフィア表面の平均細孔径および極大細孔直径がそれぞれのサンプルで異なっている事が確認できる。



3.4 GPC 充填材に用いての検量線測定

調製したミクロスフィアを GPC 用充填剤に用いるため、溶媒にテトラヒドロフラン、サンプルとしてポリスチレンを用いての排除限界分子量測定を行った。その検量線測定結果を Figs. 7, 8 に示す。これらの結果から、それぞれのサンプルの排除限界分子量は、サンプル A 約 10 万、サンプル B 約 5 万、サンプル C 約 600、サンプル D 約 1000、サンプル E 約 600 であった。

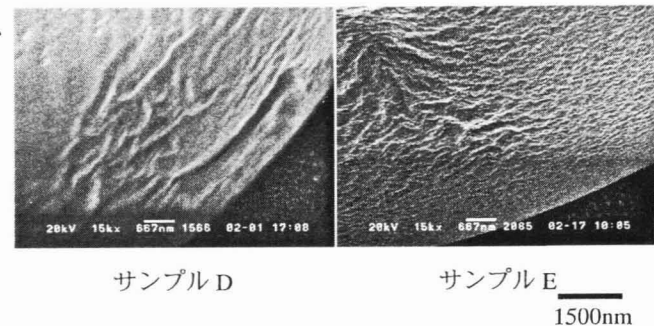


Fig. 8 から一次粒子調製に用いた溶媒の種類を調製したミクロスフィアの表面細孔径を変化させることで排除限界分子量がサンプル A の約 10 万からサンプル E の約

Fig. 6 調製したマイクロカプセルの SEM 写真

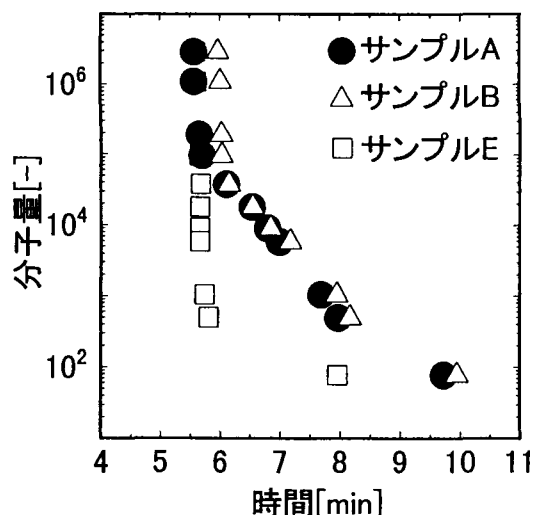


Fig. 8 GPC 検量線(溶媒の影響)

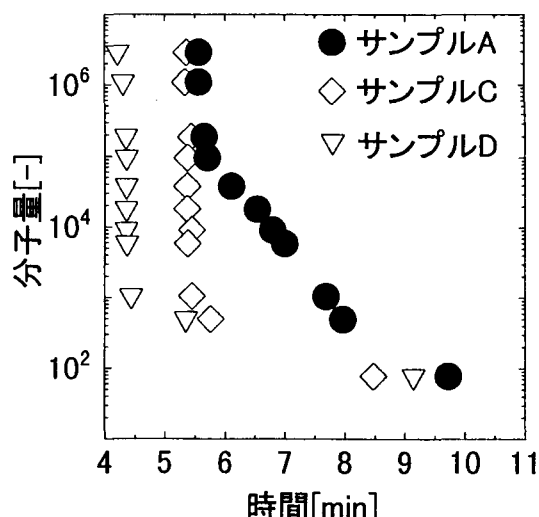


Fig. 9 GPC 検量線(St添加の効果)

600 まで変化することが確認できた。これは、モノマーであるブレンマーに対してサンプル A の調製に使用した溶媒のベンゼンが、サンプル B およびサンプル E の調製に使用した溶媒のブタノール酢酸ブチル混合溶液、酢酸エチルと比較して良溶媒であると考えられる。

Fig. 9 から一次粒子調製時に St を用いることで、調製後のマイクロスフィア表面の細孔径が変化し、排除限界分子量が変化していることが確認できる。このことより、スチレンを添加すると細孔径が小さくなることがわかった。しかしながら、スチレンの添加量を変化させたにもかかわらず細孔径の大きさはあまり変化がなかった。

#### 4. 結 言

シード粒子となる一次粒子として、SPG 膜乳化法により均一な O/W エマルジョンを調製し、二次粒子として、ホモジナイザーにより親水性モノマーを含有する O/W エマルジョンを調製した。これらを用いて、改良型膨潤法により、二次粒子を一次粒子中に取り込むことで一次粒子を膨潤させ、その後懸濁重合を行うことにより最大平均粒径 50 $\mu$ m の比較的単分散な親水性モノマー重合体微粒子を調製することができた。

溶媒種を選択や St の添加量を調整することによって微粒子表面の細孔径が変化することが確認できた。

調製したマイクロスフィアを GPC 用充填剤に用いるため、溶媒にテトラヒドロフラン、サンプルとしてポリスチレンを用いての排除限界分子量測定を行った。その結果、最大で約 10 万の分子量を持つポリスチレンを排除することができた。

#### 参考文献

- Hatate Y. and Yoshizawa H. (1996): Encapsulated Particles, *The Polymeric Materials Encyclopedia : Synthesis, Properties and Applications*, J. C. Salamone Ed., vol. 6, pp.4341-4350, CRC Press, USA
- Hatate Y., Ohta H., Uemura Y., Ijichi K. and Yoshizawa H. (1997): Preparation of Mono-dispersed Polymeric Microspheres for Toner Particles by SPG Membrane Emulsification Technique, *J. Applied Polym. Sci.*, **64**, pp.1107-1113
- 中島忠夫、清水正高 (1993): 多孔質ガラス膜による単分散 O/W エマルジョンの調製, *化学工学論文集*, **19**, pp.984-990
- Omi S., Katami K., Taguchi T., Kaneko K and Iso M. (1995): Synthesis of Uniform PMMA Microspheres Employing Modified SPG Emulsification Technique, *J. Applied. Polym. Sci.*, **63**, 1013-1024
- Yoshizawa H., Ohta H., Maruta M., Uemura Y., Ijichi K. and Hatate Y. (1996): Noble Procedure for Monodispersed Polymeric Microspheres with High Electrifying Additive Content by Particle-shrinking Method via SPG Membrane Emulsification, *J. Chem. Eng. Japan*, **29**(6), pp.1027-1029
- 吉澤秀和、丸田正晃、太田英樹、上村芳三、幡手泰雄 (1997): SPG 膜乳化法による着色剤含有単分散重合法トナーの調製, *化学工学シンポジウムシリーズ* 56, pp.111-116