

技術論文

イオン交換型シリカモノリススピンカラムを用いる 生体試料中イオン性化合物測定のための迅速前処理法

宮崎 将太^{®1}, 山田 智子¹, 太田 茂徳¹, 斉藤 剛², 奈女良 昭³, 大平 真義¹

分析技術の進歩に伴い、医薬、臨床など多くの分野で微量分析が行われている。微量分析を可能にするには、分析機器の高感度化、分析方法の最適化、試料の前処理における濃縮は重要で、更なる効率的で確かな方法が求められている。著者らは、シリカモノリスへ強カチオン交換基と強アニオン交換基を化学結合させたモノリススピンカラムを開発し、生体試料中からのイオン性薬物の固相抽出法へ応用した。シリカモノリスは支持体と抽出相が一体型のため、スピンカラムに成形する際、固相抽出カラムのようにフィルターで挟み込む必要が無く、厚さもわずか数 mm と極めて薄い。更に、遠心機で抽出を行うため同時に多数の検体処理が可能となったほか、抽出溶媒も少量で行え濃縮操作も省略可能となり固相抽出より抽出操作の簡略化が可能となった。イオン交換型シリカモノリススピンカラムを用いた固相抽出法は、生体試料中のイオン性化合物の抽出に有効であることが示された。

1 緒 言

新しい分離媒体としてシリカモノリスは、分析化学の分野、特にクロマトグラフィーにおける利用が図られている¹⁾。シリカモノリスは、相分離を伴うゾル-ゲル法によって調整された一体型のシリカ素材であり、三次元網目構造をとっており、 μm サイズのマクロ孔と nm サイズのメソ孔を有している。多孔性に基づく大きな表面積と高い液体の浸透率により、高効率な物質移動を可能にしている。

著者らは、これまでにオクタデシル基を結合させたシリカモノリスをスピンカラムに固定化した MonoSpin[®] C18 を用いて、遠心分離機によって容易に短時間に尿中の覚せい剤²⁾、血清中の麻酔薬や血管収縮剤³⁾、血清中の農薬とその代謝物の抽出⁴⁾に応用してきた。また、二酸化チタンをシリカゲル表面にコートした MonoSpin[®] TiO⁵⁾ を用いて、尿中のリン酸含有アミノ酸除草剤（含リンアミノ酸系除草剤）の抽出なども報告している⁶⁾。粒子シリカゲルをカートリッジに充填した従来の固相抽出では、溶出時にベットのボリュームの 3~4 倍量の液量が必要になり、目的成分の希釈が生じるため固相抽出後に、濃縮などの工程が必要になることが多い。一方、シリカモノリスは支持体と抽出相が一体型のため、スピンカラムに成形する際、従来の固相

抽出カラムのようにフィルターで挟み込む必要がなく、厚さもわずか数 mm と極めて薄い。更に、遠心機で抽出を行うため同時に多数の検体処理が可能となったほか、抽出溶媒も少量で行え、濃縮操作も省略可能となり従来の固相抽出より抽出操作の簡略化が可能となった。

本論文では、シリカモノリスへ強カチオン交換基と強アニオン交換基を化学結合させたモノリススピンカラムを用いたイオン性薬物の固相抽出法について報告する。

2 実 験

2.1 試料、試薬及び溶媒

試料、試薬及び溶媒は、いずれも市販（東京化成工業製、関東化学製、キシダ化学製、林純薬製及びナカライテスク製）の HPLC グレード、特級又は一般試薬を用い、水はイオン交換水を用いた。

2.2 シリカモノリスの調製

シリカモノリスは、テトラエトキシシランを原料として既報に準じ⁷⁾、ゾル-ゲル法により直径 4.3 mm、厚さ 1.5 mm 厚のシリカモノリスを調製した。モノリスゲルの物性値は、表面積 $340 \text{ m}^2/\text{g}$ スルーポアサイズ、2~5 μm 、メソポアサイズ 9 nm であった。（測定は、日立製走査型電子顕微鏡 S-3000N による方法、micromeritics 製 TriStar 3000 窒素吸着装置による⁸⁾）。

2.3 化学処理

SCX 結合型シリカモノリスは、10% 2-(4-クロロスルフ

¹ ジーエルサイエンス株式会社技術開発部：359-1161 埼玉県入間市狭山ヶ原 237-2

² 東海大学医学部専門診療学系救命救急医学：259-1193 神奈川県伊勢原市下糟屋 143

³ 広島大学大学院医歯薬学総合研究科法医学：734-8553 広島県広島市南区霞 1-2-3

オニルフェニル)エチルクロロシランをゲルに加え、トルエン中にて12時間還流を行った。乾燥後に100 mM 酢酸ナトリウム水溶液を加え、10時間静置し、加水分解処理を行った。アセトンで洗浄後、70度で減圧乾燥させ、プロピルベンゼンスルホン酸基結合型シリカモノリスゲルを調製した。

SAX 結合型シリカモノリスは、*N*-トリメトキシシリルプロピル-*N,N,N*-トリメチルアンモニウムクロライドを用い、トルエン中にて12時間還流を行った。メタノールで洗浄後、70度で減圧乾燥し、トリメチルアミノプロピル基結合型シリカモノリスゲルを調製した。

2.4 実験

化学処理によって得られたモノリスゲルを、スピнкаラムへ固定化した。遠心操作はすべて日立製遠心分離機CF-16RXを用いた。

SCX 結合型スピнкаラム (MonoSpin® SCX) を使用した固相抽出法は、以下の手順により行った。

I. 平衡化: MonoSpin® SCX に20 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) を100 μ L 添加し、1分間遠心後、 μ 液を捨てた。

II. ロード: 平衡化した MonoSpin® SCX に試料100 μ L を入れた。1分間遠心後、 μ 液は残したまま、次の工程を続けた。

III. 洗浄: 20 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) 300 μ L を入れ1分間遠心し、前工程の μ 液と合わせた。

IV. 溶出-1: 5% アンモニアメタノール溶液300 μ L を入れ1分間遠心し、 μ 液を回収した。

V. 溶出-2: 0.1 M 水酸化ナトリウムメタノール溶液300 μ L を入れ1分間遠心し、 μ 液を回収した。

下記条件で各回収液をLC-UVにより分析し、面積値から回収率を算出した。

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は、カラム: Inertsil ODS-3 5 μ m, 150 mm \times 4.6 mm I.D. (ジーエルサイエンス製); 移動相: 48% アセトニトリル (0.7% KH_2PO_4 + 0.17% SDS, pH 4.5); 流量: 1.0 mL/min, 検出: 230 nm; オープン: 40度; 注入量: 5 μ L の条件で行った。

HPLC 分析は、ジーエルサイエンス製 GL-7400 ポンプ, GL-7450 UV/VIS 検出器, GL-7420 オートサンプラー, GL-7430 カラムオープンを用いた。データ処理は、アジレントテクノロジー製 Ezchrom Elite chromatography Data System ver.3.1.7J を用いた。

SAX 結合型スピнкаラム (MonoSpin® SAX) を用いた固相抽出法は、以下の手順により行った。

I. 平衡化: MonoSpin® SAX に20 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) 400 μ L を入れ1分間遠心後、 μ 液を捨てた。

II. ロード: 平衡化した MonoSpin® SAX に試料100 μ L

を入れた。1分間遠心後、 μ 液は残したまま、次の工程を続けた。

III. 洗浄: 20 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) 200 μ L を入れ1分間遠心し、前工程の μ 液と合わせた。

IV. 溶出-1: 5% NaCl 水溶液300 μ L を入れ1分間遠心し、 μ 液を回収した。

V. 溶出-2: 5% NaCl 水溶液: メタノール = 1:1, 300 μ L を入れ1分間遠心し、 μ 液を回収した。

下記条件で各回収液を分析し、面積値から回収率を算出した。

カラム: Inertsil ODS-3 5 μ m; 150 mm \times 4.6 mm I.D., 移動相: 40% アセトニトリル (0.1% リン酸); 流量: 1.0 mL/min; 検出: 215 nm; オープン: 40°C; 注入量: 10 μ L.

3 結果と考察

3.1 化学処理の再現性

実験方法に記載した SCX 型, SAX 型シリカモノリスは、化学処理をそれぞれ3回行い、それぞれのゲルについて、TG-DTA 測定 (MAC Science 製) によりカーボン量の測定を行った。SCX 結合型ゲルは、平均カーボン量 9.53%, 相対標準偏差 (RSD) 値 0.69%, SAX 結合型ゲルは、平均カーボン量 23.8% RSD 値 0.62% であった。再現性も高いことから、適切な化学処理であることが確認された。

3.2 遠心加速度の影響 (SCX)

MonoSpin® SCX は、塩基性薬物を含む8成分 (アセトアミノフェン, ピリジン, フェノール, ヘキサバルビタール, プロプラノロール, ベルベリン, ドキセピン, アミトリプチリン) を各 0.125 mg/mL になるように混合し、サンプルとした。抽出手順は、上記の方法に従い、II, III の回収液を合わせた画分, IV の画分, V の画分をそれぞれ分析し、回収率を求めた (Table 1)。10000 $\times g$ では塩基性を示すプロプラノロール, ベルベリン, ドキセピン, アミトリプチリンで高い回収率が得られたが、4000 $\times g$ では全体の回収率が落ち、また溶出も全体に広がることから、カラムの性能を十分に発揮できなかった。10000 $\times g$ では、1分間の遠心時間で操作時間の短縮が可能であることが分かった。一方、弱酸性化合物であるフェノール, ヘキサバルビタール, 弱塩基性化合物であるピリジンは、保持されなかった。ベルベリンについては、0.1 M 水酸化ナトリウムメタノール画分で回収が多かった。

SCX はプロピルベンゼンスルホン酸基結合型であることから、疎水性が高いため、水に溶解したサンプルでは、コンディショニングでアセトニトリルやメタノールなどの有機溶媒を流す必要がある。遠心加速度が低い場合にはシリカモノリスのメソ孔を十分に使用できないために II, III の回収液でロスがでていると考えられる。一度水で満たさ

Table 1 Effect of centrifugal acceleration on the recovery of 7 medicines on MonoSpin® SCX

4000×g, 5 min	Pyridine	Phenol	Hexobarbital	Propranolol	Berberine	Doxepin	Amytriptyline
II,III	30	43	39	19	18	18	18
IV	3	0	2	24	5	30	32
V	4	0	2	7	13	6	6
total	37	43	43	50	36	54	56
10000×g, 1 min							
II, III	96	102	103	0	0	0	0
IV	8	0	1	94	0	100	99
V	5	0	0	18	66	16	16
total	109	102	104	112	66	116	115

Table 2 Effect of the eluate on the recovery of 7 medicines on MonoSpin® SCX

		Pyridine	Phenol	Hexobarbital	Propranolol	Berberine	Doxepin	Amytriptyline
II, III		96	102	102	9	6	7	6
IV	25 μL	4	0	1	39	0	50	50
V		4	0	0	19	6	23	23
total		104	102	103	68	12	80	79
II, III		96	101	102	0	0	0	0
IV	50 μL	3	0	1	76	0	81	79
V		4	0	0	18	31	20	21
total		103	101	103	95	31	101	100
II, III		96	102	103	0	0	0	0
IV	100 μL	8	0	1	94	0	100	99
V		5	0	0	0	66	16	16
total		109	102	104	94	66	116	115
II, III		96	104	105	0	0	0	0
IV	150 μL	10	0	1	111	0	111	110
V		5	0	0	6	84	7	8
total		111	104	106	117	84	118	118

れたメソ孔を溶出液で置換する場合にも、十分な遠心加速度が必要となるため、4000×gで全体の回収率が100%に満たなかったと考えられる。

3・3 溶出液量の影響 (SCX)

手順IV, Vで用いる溶出液量をそれぞれ25, 50, 100, 150 μLで行い、回収に必要な溶出液量を検討した (Table 2)。遠心速度は、10000×g, 1分間とした。

溶出液25 μL, 50 μLでは、プロプラノロール、ベルベリン、ドキシセピン、アミトリプチリンが5%アンモニアメタノール溶液のみで、回収しきれていなかった。100 μL溶出液では、5%アンモニア/メタノール溶液でプロプラノロール、ドキシセピン、アミトリプチリンがほぼ100%回収でき、また、ベルベリンが0.1 M水酸化ナトリウムメタノール溶液で50%以上回収できることから、100 μL以上の溶出液量が必要であることが示された。

3・4 血清中の塩基性薬物の抽出

プロプラノロールを15 μg/mLとなるように調製し、プロプラノロール: 20 mMリン酸カリウムバッファー (pH 7.0): 血清 = 1:1:1となるように混合し、サンプルとした。

MonoSpin® SCXによって、実験方法に記載の手順に従い、塩基性薬物 (プロプラノロール) を含む血清サンプルからの抽出結果を Fig. 1 に示す。プロプラノロールは、保持時間 8.99 分に検出された。抽出前のクロマトグラム (A) には、血清由来のタンパク質が見られたが、抽出後クロマトグラム (B) には血清由来のタンパク質が含まれておらず、効率的にタンパク質が除去できていることが示された。また、抽出による回収率は、113%、RSD 値 4.60% (n = 6) であったため、塩基性化合物の抽出には MonoSpin® SCX の使用が有効である。

3・5 遠心加速度の影響 (SAX)

7成分 (ウラシル, ベンジルホスホン酸, サリチル酸, エ

チル安息香酸, イブプロフェン, 4-トルエンスルホン酸, ヘキシルフェノール) を各 0.143 mg/mL になるように混合し, サンプルとした. $2000 \times g$ 4分, $10000 \times g$ 1分 で各化合物の回収率に大きな差はなかった. (Table 3) このことは, 遠心回転数にかかわらず, イオン交換能を発揮できることを示しており, 短時間での処理を可能にする. SAX

は, SCX に比べ疎水性が低いいため, コンディショニング時に有機溶媒が必要ないと考えられる.

$pK_a = 9.4$ 付近のウラシルは, カラムに保持されなかった. また, SAX は, Cl 型であるため, 相対的選択性の低いリン酸イオンを構造内に有しているベンジルスルホン酸もまた保持されなかった. リン酸イオンなど相対的選択性の低い官能基を有する化合物を保持させるためには, Cl 型から OH 型への変換を検討する必要がある.

イブプロフェン, ヘキシルフェノールは, 5% アンモニウム水溶液で溶出しにくいことから, トリメチルアミノプロピル基のイオン交換能だけではなく, 疎水性相互作用も関与していると考えられる.

3.6 溶出液量の影響 (SAX)

手順 IV, V で用いる溶出液量をそれぞれ 50, 100, 150 μL で行い, 回収に必要な溶出液量を検討した (Table 4). 溶出液量 50 μL では, サリチル酸, イブプロフェン, ヘキシルフェノールの回収率が, 低い傾向となった. それぞれの化合物で良好な回収率を得るには, 100 μL 以上の溶出液量が必要であることが示された.

3.7 尿中の酸性薬物の抽出

MonoSpin[®] SAX によって, 酸性薬物 (イブプロフェン) を含む尿サンプルの抽出を行った.

尿中の酸性薬物の抽出試験は, イブプロフェンを 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ になるように調製し, イブプロフェン溶液:20 mM リン酸カリウムバッファー (pH 7.0):尿 = 1:1:1 で混合した. 前処理手順は, 実験方法に従い, 溶出液は, 5% NaCl:メタノール溶液のみを用いた. MonoSpin[®] SAX を用いた尿からのイブプロフェンの回収結果を Fig. 2 に示す. 抽出前の尿サンプル分析したクロマトグラム (B) には, 多くの尿中化合物が検出されている. イブプロフェンは, 保持時間 9.12 分に検出された. MonoSpin[®] SAX による抽出後のサンプル分析結果を B に示す. 抽出後もイブ

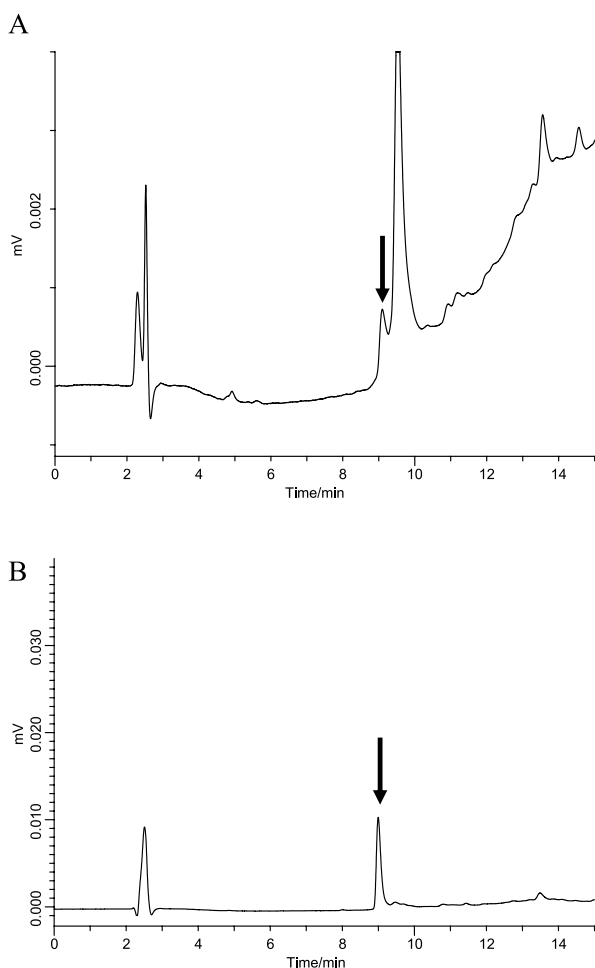


Fig. 1 Chromatograms of propranolol extracted from the serum on MonoSpin[®] SCX

Table 3 Effect of centrifugal acceleration on the recovery of 7 medicines on MonoSpin[®] SAX

$2000 \times g$	Uracil	Benzylphosphonicacid	Salicylic acid	4-Ethylbenzoic acid	Ibuprofen	<i>p</i> -Toluenesulfonic acid	4-Hexylphenol
II, III	114	81	0	0	0	0	0
IV	0	30	48	94	0	100	0
V	0	0	51	8	98	0	72
total	114	111	99	102	98	100	72
$10000 \times g$							
II, III	115	84	0	0	0	0	0
IV	0	1	68	102	0	103	0
V	0	0	37	6	104	5	98
total	115	85	105	108	104	108	98

Table 4 Effect of the eluate on the recovery of 7 medicines on MonoSpin® SAX

	Uracil	Benzylphosphonicacid	Salicylic acid	4-Ethylbenzoic acid	Ibuprofen	p-Toluenesulfonic acid	4-Hexylphenol
II, III	102	78	0	0	0	0	0
IV	50 μL	0	3	29	0	53	0
V	0	0	52	60	54	43	7
	102	78	55	89	54	96	7
II, III	105	68	0	0	0	0	0
IV	100 μL	0	0	53	0	70	0
V	0	0	64	45	97	29	110
	105	68	64	98	97	99	110
II, III	103	82	0	0	0	0	0
IV	150 μL	0	9	63	0	88	0
V	0	0	121	58	115	18	98
	103	82	130	121	115	106	98

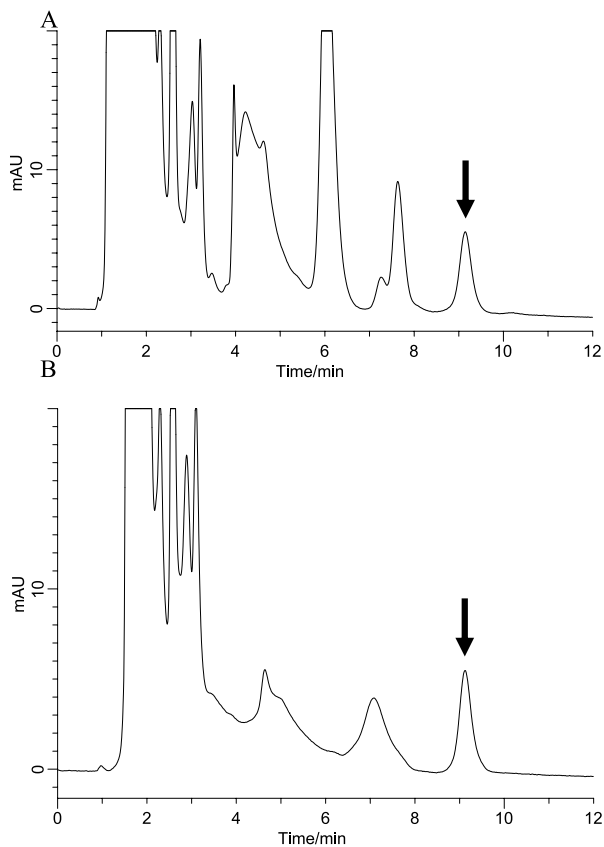


Fig. 2 Chromatograms of ibuprofen extracted from the serum on MonoSpin® SAX

プロフェン以外の尿中化合物が検出された。尿中からのイブプロフェンの回収率は106%, RSD値6.51% (n=6)であり, MonoSpin® SAXを使った酸性化合物の抽出に有効であることが示された。

今回, 洗浄液に20 mM リン酸カリウムを用いた, 5% NaCl水溶液で洗浄すると尿由来の夾雑物の除去が可能で

あったが, イブプロフェンの回収率がやや低下する傾向にあった。洗浄工程の更なる検討が必要であろう。

4 結 言

イオン交換型シリカモノリスピンカラムを用いたサンプル前処理法は, 生体試料中のイオン性化合物の抽出に有効であることが示された。各工程は10000×g, 1分間の遠心操作で行え10分以内に前処理が完了した。スピнкаラムによる抽出は, 簡便な操作法に加え一度に多検体の処理, 少量の溶媒で吸着薬物の溶出が可能であることから, 分析のハイスループット化が可能になると期待される。

文 献

- 1) K. Morisato, S. Miyazaki, M. Ohira, M. Furuno, M. Nyudo, H. Terashima, K. Nakanishi : *J. Chromatogr. A*, **1216**, 44 (2009).
- 2) A. Namera, A. Nakamoto, M. Nishida, T. Saito, I. Kishiyama, S. Miyazaki, M. Yahata, M. Yashiki, M. Nagao : *J. Chromatogr. A*, **1208**, 71 (2008).
- 3) T. Saito, S. Morita, I. Kishiyama, S. Miyazaki, A. Nakamoto, M. Nishida, A. Namera, M. Nagao, S. Inoguchi : *J. Chromatogr. B*, **872**, 186 (2008).
- 4) T. Saito, R. Yamamoto, S. Inoue, I. Kishiyama, S. Miyazaki, A. Nakamoto, M. Nishida, A. Namera : *J. Chromatogr. B*, **867**, 99 (2008).
- 5) S. Miyazaki, M. Y. Miah, K. Morisato, Y. Shintani, T. Kuroha, K. Nakanishi : *J. Sep. Sci.*, **28**, 39 (2005).
- 6) 太田彦人, 渡邊大助, 数井優子, 大津留修, 宮崎将太, 大平真義 : Abstract of 14th Annual Meeting of Japanese Association of Forensic Sci. Tech., 37 (2008).
- 7) S. Miyazaki, K. Morisato, N. N. Ishizuka, H. Minakuchi, Y. Shintani, M. Furuno, K. Nakanishi : *J. Chromatogr. A*, **1043**, 19 (2004).
- 8) H. Minakuchi, K. Nakanishi, N. Soga, N. Ishizuka, N. Tanaka : *J. Chromatogr.*, **797**, 121 (1998).

Rapid Preparation Methods of Biological Samples for Ionic Compounds Using Ion Exchange Type Monolithic Silica Spin Column

Shota MIYAZAKI¹, Tomoko YAMADA¹, Shigenori OHTA¹, Takeshi SAITO²,
Akira NAMERA³ and Masayoshi OHIRA¹

¹ GL Sciences Inc., 237-2, Sayamagahara, Iruma-shi, Saitama 358-0032

² Department of Emergency and Critical Care Medicine, Tokai University School of Medicine, 143, Shimokasuya, Isehara-shi, Kanagawa 259-1143

³ Department of Forensic Medicine, Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University, 1-2-3, Kasumi, Minami-ku, Hiroshima-shi, Hiroshima 732-8551

(Received 16 October 2009, Accepted 28 December 2009)

We developed a device comprising a spin column packed with ion exchange type (SCX and SAX) monolithic silica for extracting ionic compounds from biological samples. The methods involving the use of these spin column are not useful for the extraction of ionic analytes, but are highly reproducible for the analysis in serum and urine. This spin column enabled sample preparation in less than 10 min. Handling such as sample loading, washing, and elution of analytes, was exhibited by the centrifugation of a spin column. In addition, many samples could be processed at the same time. This method has many advantages : easy operation, low volume of the extraction solvent, and without evaporation. This spin column has potential as a new tool for the routine extraction of ionic compounds in biological materials.

Keywords : monolithic silica ; spin column ; SAX ; SCX ; sample preparation.