

逆相系固相抽出用吸着分離剤における親水性モノマーの影響に関する研究

[研究代表者] 手嶋紀雄 (工学部応用化学科)
[共同研究者] 村上博哉 (工学部応用化学科)

研究成果の概要

近年、質量分析装置などの分析機器の高精度・高感度化が急速に進み、微量成分の検出・定量が可能となってきている。高度に発達した機器装置の性能を十分に発揮させるには、適切な試料前処理が重要であり、その前処理手法として固相抽出法が多用されている。現在、様々な化合物への適用可能な種々の固相抽出用吸着分離剤が市販されているが、多様化している測定対象成分への対応が十分できているとは言い難い。本研究では、生体試料中親水性/水溶性化合物の前処理手法の確立を目指し、逆相型固相抽出剤における親水性/水溶性化合物への特異性の向上に関して検討を行った。親水性モノマーとして3種類のモノマーを選択し、種々の合成条件下での逆相系の吸着分離剤を合成し、その捕捉特性を評価した。最適化を施すことにより、現在市販されている吸着分離剤より高性能化を達成した。本吸着分離剤は、機器分析において重要な役割を担うものである。

研究分野：分離分析，質量分析，前処理

キーワード：固相抽出，吸着分離剤，逆相，HLB

1. 研究開始当初の背景

環境試料や生体成分中の目的成分の分析には、精度よく測定を行うために、適切な前処理が必要不可欠である。特に液体クロマトグラフー質量分析装置(LC-MS)を利用した定量分析などでは、非常に高感度であるため、様々な化合物へ対応可能な前処理技術の確立が必要不可欠となっている。その前処理手法の一つとして、固相抽出法が現在広く用いられている。固相抽出法は、主に液体試料と固相との間での相互作用の度合いの差で、前処理を行う手法である。逆相系や順相系、イオン交換や吸着等、様々な相互作用を有する固相抽出用の吸着分離剤が市販され、使用されている。そのなかでも逆相系の吸着分離剤は、医薬品や農薬などの分析の前処理手法として汎用的に用いられている。

逆相系の固相抽出用の固定相としては、シリカゲルを基材樹脂としたものや有機ポリマー樹脂のものが主に用いられている。シリカゲルを基材樹脂としてもものでは、シリカゲルにC18やC8などを修飾されたものが挙げられ、また有機ポリマーのものとしては、スチレンージビ

ニルベンセン共重合体のものが主に用いられている。さらに、有機ポリマー樹脂では、ジビニルベンセンを基本骨格として、親水性モノマーを有するモノマーを混合した hydrophilic-lipophilic balance (HLB) 型の吸着分離剤が、様々な分野で汎用されている。この HLB 型の代表的な市販の固相抽出用吸着分離剤としては、Oasis HLB が挙げられ、N-vinylpyrrolidone / divinylbenzene (DVB) の copolymer である。その他にも Varian の XAD-7 や XAD-8 では、methacrylate/DVB の copolymer などもある。また in-house で開発された吸着分離剤としては、acrylonitrile/DVB や methacrylonitrile/DVB , 4-vinylimidazole/DVB の copolymer などが報告されている。

2. 研究の目的

HLB 型の吸着分離剤は、hydrophilic monomer を導入することによって、極性を改善させ、極性化合物の吸着特性が改善されているのが特徴である。その理由としては、styrene-DVB などとは異なり、ベースとなる疎水性

場に対して、濡れ性の付与や極性基の導入による極性化合物の呼び込み作用や極性基との相互作用の増加などを発現することが可能であるからである。そのような HLB 型吸着分離剤における親水性モノマーには、上述のような N-vinylpyrrolidone などのような単官能基型の monomer を利用したものが、市販品やなどでは一般的に用いられている。しかし有機ポリマー系の monolith column など用いられている ethylene glycol dimethacrylate のような dimethacrylate 系の架橋剤を、親水性モノマーとして利用している報告は、特許情報に記載があるものの、種々の dimethacrylate 系の架橋剤について比較検討を行った報告は、我々が知る限り存在しない。

そこで本研究では、親水性場として機能が期待できる dimethacrylate 系の monomer を三種類選定し、それぞれの構造の違いによる極性化合物の吸着特性について検討を行った。さらに、疎水性モノマーと親水性モノマーの量比が影響する HLB についても検討し、極性化合物の捕捉特性に関して種々検討を行った。

3. 研究の方法

疎水性場構築のために divinylbenzene (DVB) を主成分とし、極性基に対する親和性を示すと親水性モノマーを 3 種 (trimethylolpropane trimethacrylate (TMPTMA), EGDM (ethylene glycol dimethacrylate) および GDMA (glycerol dimethacrylate)) 選定し、組み合わせや組成を逐次変えて共重合させることにより HLB 型吸着分離剤を網羅的に合成した。合成は、DVB と任意の割合にて混合後、懸濁重合法により多孔質粒子を調製した。得られた HLB 型共重合粒子をシリンジ型エンブティーカートリッジに充填し、核酸塩基、ヌクレオシド等を被検成分として捕捉特性を評価した。

4. 研究成果

(1) 親水性モノマーの比較

親水性の機能を発揮させることが期待される市販のジメタクリレート系 monomer として EGDM, GDMA および TMPTMA の 3 種類をそれぞれ選択し、55% DVB とこれら親水性モノマーとのモル比を 8 : 2 の割合で混合した吸着分離剤を合成し、それぞれの吸着剤への極性

化合物の吸着特性を回収率により評価した。極性化合物としては、極性の高い核酸関連化合物として、uracil, uridine, adenine, adenosine および theophylline を用いた。溶離液として 5% methanol 水溶液を用いて場合でも、uracil, uridine, adenine は保持が困難な化合物であるため、極性化合物の捕捉特性を評価するには好適な化合物である。

試料を固相抽出し、その回収率について検討を行った。評価化合物のうち、比較的極性の低い adenine, adenosine および theophylline の回収率は 90% 以上の高い回収率を示した。一方で、uracil および uridine に関しては、monomer により回収率の違いがあることが明らかとなった。以上の結果より、uracil, uridine および adenine において相対的に高い回収率を得ることができた GDMA および TMPTMA を親水性モノマーとして選択し、最適化を行うことにした。

(2) 細孔調節剤に関する検討

一般的に、吸着剤の回収率は、前セクションで検討した親水性モノマーに由来する極性基による影響に加え、比表面積の増加が、回収率改善に重要であることが知られている。そこで GDMA と TMPTMA を利用した吸着剤の性能を行うために、細孔調節剤を変更することにより、比表面積の改善を行った。これまでの検討においては、イソアミルアルコール / 酢酸ブチル = 1/4 (w/w) の混液を使用してきた。このイソアミルアルコール / 酢酸ブチル混液を用いた時には、モノマー総量の体積とイソアミルアルコール / 酢酸ブチル混液の体積割合を同一にて合成をおこなった。そこでまずモノマーと細孔調節剤の体積比を同様に、細孔調節剤としてトルエンを用いたものを合成した。その結果、イソアミルアルコール / 酢酸ブチル混液を使用した時と比較して、トルエンの使用により、わずかながら uridine と adenine の回収率の改善が確認された。そこで、さらなる比表面積の改善を目指し、モノマー総量の体積に対するトルエンの体積割合を 2 倍に変更したものを合成し、回収率の比較を行った。その結果、TMPTMA を含有している吸着分離剤において、uracil および uridine の回収率の劇的な変化が確認された。同様の検討を、GDMA を含有する吸着分離剤についても検討を行った。その結果、TMPTMA を用

いた時と異なり、トルエンへの変更およびその量比の変更によって、uracil, uridine および adenine の回収率の低下が確認された。これらの回収率の改善は、細孔調節剤変更による比表面積変化に由来しているものであると考へ、それぞれの吸着分離剤の比表面積測定を行った。測定の結果、トルエンへの変更および量比の増加により、比表面積の増加に伴って、回収率が増加していることが明らかとなった。以上の結果より細孔調節剤としてトルエンを用いた吸着剤が非常によい回収率を示すことが明らかとなった。そこで、TMPTMA を親水性モノマー、細孔調節剤としてトルエンを用いて最適化を行うことにした。

(3) DVB 純度の影響

これまでの検討では、市販の純度 55% の DVB を用いて検討を行ってきた。その一方で、80% DVB の使用では、55% DVB で含まれている ethylstyrene 等の存在比が少ないことから、架橋度が向上し、吸着分離剤の性能が向上すると言われている。そこでさらなる性能の向上を目指し、80% DVB を用い、GDMA および TMPTMA を混合した吸着剤の合成を行った。55% DVB を用いた場合と比較して、すべての極性化合物の吸着特性の大幅な改善が明らかとなった。しかし、GDMA に関しては、55% DVB よりは改善したものの、TMPTMA ほどの高極性化合物への対応可能な改善は達成することが出来なかった。この合成した 80% DVB/TMPTMA ついて市販品との性能評価を行ったところ、市販品よりも極性化合物に対する高い捕捉特性を確認した。

以上の結果より、本研究の成果は、今後の極性化合物の吸着分離剤による前処理において重要な役割を担うものである。