

3D 固相濃縮を用いる PPCP 微量分析法の確立と 迅速・自動水質モニタリングへの展開

京都府立大学 細矢 憲

1. はじめに

親水性の高い生理活性化合物、たとえば、医薬品および生活関連ケア製品（Pharmaceuticals and Personal Care Products：PPCPs）による環境水汚染が進行しつつあり、抗うつ剤や、抗生物質、また、インフルエンザ薬が実際の河川からも検出され、生態系への重大な影響が懸念されている。分析現場の実際的问题に関しては、時間を要するこれらの化合物の水相からの捕捉が第1に挙げられる。¹⁾ これら PPCPs や糖類などの極めて親水性の高い化合物の分離・分析には、親水性相互作用クロマトグラフィー（HILIC）が有効であり、その使用頻度は増加しつつある。ここで用いられる充てん剤、特にポリマー充てん剤については、一義的に「親水性」というキーワードで作成されたものが多く、複雑な化合物群を対象とした充てん剤の開発はそれほど画期的ではない。

そこで本研究では、新規な親水性ポリマー固相（カラム）の開発を目指し、親水性多孔性ポリマー基材粒子を作製し、さらにその粒子表面に様々な親水性機能性モノマーをハイブリッド化修飾することで、多層型（3D 型）の新規ハイブリッド親水性充てん剤の開発を目的とした。3D 固相は、図1に模式図

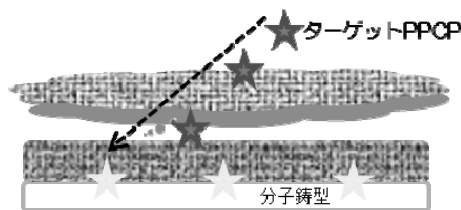


図1. 3D 固相の模式図

を示すように、ポリマー基剤粒子に分子選択的捕捉を可能にする分子鑄型（1次元目）を創製し、基剤粒子の持つ親水性層（2次元目）を介して、表面に水相からイオン性の高い親水性化合物を定量的に捕捉する表面トラップ層（3次元目）を配して水中から PPCPs を有効に捕捉可能なハイブリッド型多層構造(3D)となっている。

本研究で開発する固相は我々が開発したポンプ濃縮を用いる微量成分の高感度分析システム（図2）における濃縮カラム（図中8番）に用いるものであり、極めて希薄な汚染物質を水中から効率的に捕捉することが目的となっている。^{2,3)}

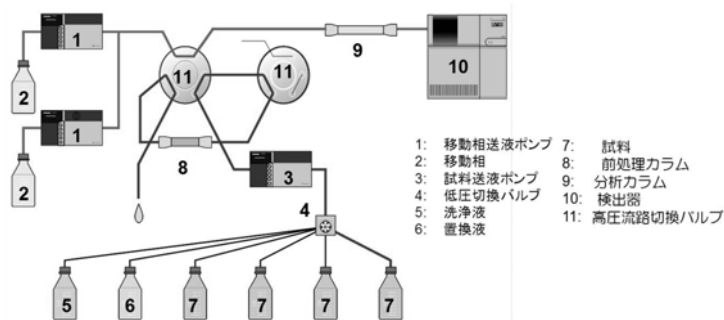


図2. ポンプ濃縮—微量成分分析システム

本年度は、特に PPCPs を分子選択的に、有効に捕捉する分子の目（分子鑄型）を持った充てん剤の完成と微量成分の捕捉・定量に関する検討、および3次元目となる粒子表面への親水性層の導入に関する基礎的な検討を行った。

2. 方法

2.1 分子鋳型ポリマー粒子の作成とその性能評価

様々な PPCPs が懸念されるが、試薬ベースで使用可能な抗うつ剤の一つである「スルピリド」(図3)をターゲットとして利用することとした。スルピリドは塩基性の官能基を有し、親水性の高い化合物であり、河川からも検出されている薬物である。¹⁾

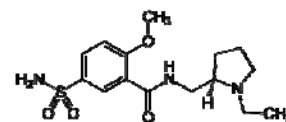


図3. スルピリド

我々はこのような化合物に対する分子の目「分子鋳型」の作成に関して、京都大学の久保らと共同で距離認識型の分子鋳型作成の概念を確立している。^{4,5)}

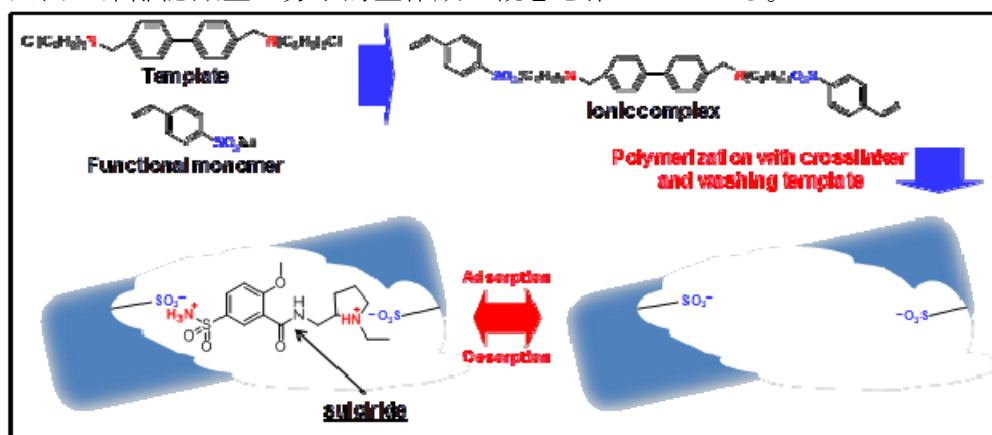


図4. スルピリドに対する距離認識型分子鋳型の概念図

今回のスルピリド(sulpiride)に対する分子鋳型作成の概念図を図4に示した。ここでは、スルピリドの塩基性官能基の距離を擬似的分子(図中では Template と記載した)で置き換え、それに相互作用する機能性モノマー(図中では、Functional monomer と記載した)を相互作用させ、イオン性の複合体(図中では Ionic complex と記載した)を基材粒子表面で重合することにより、官能基の距離を固定した分子鋳型を作成した。図中の二つのスルホン酸の距離はスルピリドの二つの官能基距離にほぼ合致しているため、選択的捕捉が可能となる。

以下、ポリマー粒子の合成についての詳細を記載する。

従来の分子インプリント法を用いる手法では、架橋剤に ethyleneglycol dimethacrylate (EDMA)、鋳型分子に sulpiride、機能性モノマーに methacrylic acid (MAA)、開始剤には 2,2'-azobis (2,4-dimethyl) valeronitrile (ADVN)、多孔質化溶媒に toluene を用い、多段階膨潤重合法によって均一径ポリマー粒子を合成した。⁶⁾ 組成を表1に示す。得られたポリマー粒子を液体クロマトグラフィー(LC)用カラムに充てんし、ギ酸緩衝液を含む移動相を流すことで、鋳型分子を除去した。

表1. 分子インプリント法により合成したポリマー粒子の組成

	Crosslinker 26.5 mmol	Template 0.56 mmol	Monomer 4.48 mmol
NIP	EDMA	-----	MAA
sulpiride-MIP	EDMA	sulpiride	MAA

ここで NIP とはインプリントをしていない粒子を指す。

次に、官能基間距離固定化法を用いる手法では、まず、基材ポリマーとして、EDMA のみをモノマーとして用いたポリマー粒子を合成した。EDMA 粒子 5.25 g に対して、tetra-*n*-butylammonium chloride (TBA, 1 mmol)もしくは 4,4'-bis-(tributylammonium-methyl chloride) biphenyl (BTAB, 2mmol)と *p*-styrenesulfonic acid (SSA)のイオン結合型錯体を用いて反応した。合成手順は次の通りである。

- 1)EDMA ポリマー粒子を少量のメタノール中に分散
- 2)イオン結合型錯体を少量のメタノールに溶解し、1)と混合
- 3)水を加え、全体が水 rich になるように調整
- 4)105 °C のオイルバスで加熱、昇温後、水に溶解した K₂S₂O₈ を混合
- 5)窒素雰囲気下 105 °C で 24 時間還流
- 6)還流後、methanol で洗浄し、減圧乾燥
- 7)LC 用カラムに充てん後、含 NaCl 移動相で脱鋳型

これにより、距離固定型の分子鋳型、MIP-I および NIP-I（鋳型分子無く作成）を得た。

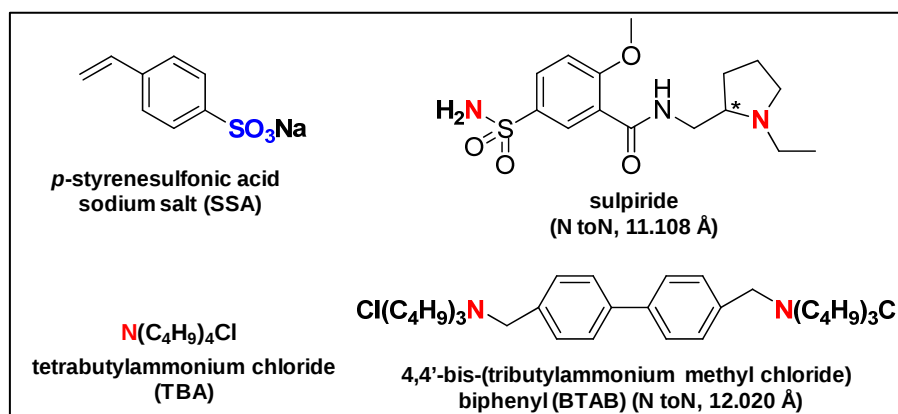


図 5. 距離固定化法での分子鋳型合成に用いた試薬

上記で得られたカラムについて（高速液体クロマトグラフ）HPLC を用いて保持選択性を評価した。移動相には、acetonitrile (MeCN)および種々の pH の緩衝液を用いた。また、各ポリマー粒子を固相抽出（SPE）用ポリプロピレン製カートリッジに充てんし、スルピリド水溶液の吸着挙動を評価し、さらに、オンラインカラムスイッチングシステム（図 2 に掲載）の前処理カラム（図 2 中では 8 番）としての可能性を評価した。なお、HPLC における保持係数は次式を用いた。

Retention factor, $k = (t_R - t_0) / t_0$, t_R : 試料の検出時間, t_0 : acetone の検出時間

2.2 表面トラップ層形成に関する基礎的検討

表面トラップ層とは、基材固相の表面にポリマー層を表面修飾で導入し、分析ターゲット分子が存在する水相から、効率的に親水性化合物を固相に誘導するためのトラップである。本研究では、両イオン性モノマーとして、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン（2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine, MPC）を用いることとした。MPC モノマーの構造を図 6 に示す。

この MPC モノマーを溶解性の異なる溶媒中で重合させて、用いた溶媒に対するモノマーの溶解性、さらに

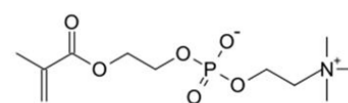


図 6. MPC モノマー

は重合によって生成するポリマーの溶解性について検討した。具体的には、100 mL のなす型フラスコに後述する溶媒 25 mL を入れ、MPC 0.75 g および開始剤 ADVN 0.03 g を分散し、MPC の溶解性を観察した。混合液を 24 時間還流し、還流後の MPC ポリマー (PMPC) の析出の状態を観察し、乾燥した後に秤量し、析出量を測定した。溶媒は、アルコール系の溶媒としてメタノール、エタノール、2-プロパノール、HPLC の分析で多く用いられる有機溶媒であるアセトニトリル、ケトン系の溶媒としてアセトン、エーテル系の溶媒としてテトラヒドロフラン、以上の 6 種類を用いた。

3. 結果

3.1 分子鋳型ポリマー粒子の作成とその評価

3.1.1 HPLC 評価によるスルピリドに対する保持選択性

従来の分子インプリント法で合成した分子鋳型

図 7 (a)~(c)に sulpiride-MIP および NIP の LC 評価結果を示す。また、表 2 にはスルピリドおよびその他の溶質の pK_a をまとめた。図 7 に示すとおり、移動相に緩衝液を含む場合には、pH にかかわらずスルピリドに対する保持選択性は見られなかった。表 2 から、(a)、(b)の条件ではスルピリドが解離状態であるが、塩基性の移動相を用いた場合にも、スルピリドに対する保持選択性は確認されなかった。このことは、従来の分子鋳型作成方法 (分子インプリント法) ではスルピリドのような高親水性化合物に対する選択性が得られないことを示している。

しかし、ここで移動相に MeCN のみを用いた場合には、sulpiride-MIP において高い保持選択性が得られた。これらのことから、従来法で合成した MIP では、水素結合による保持が支配的であり、水系の分析前処理剤としては不適であることが示唆された。

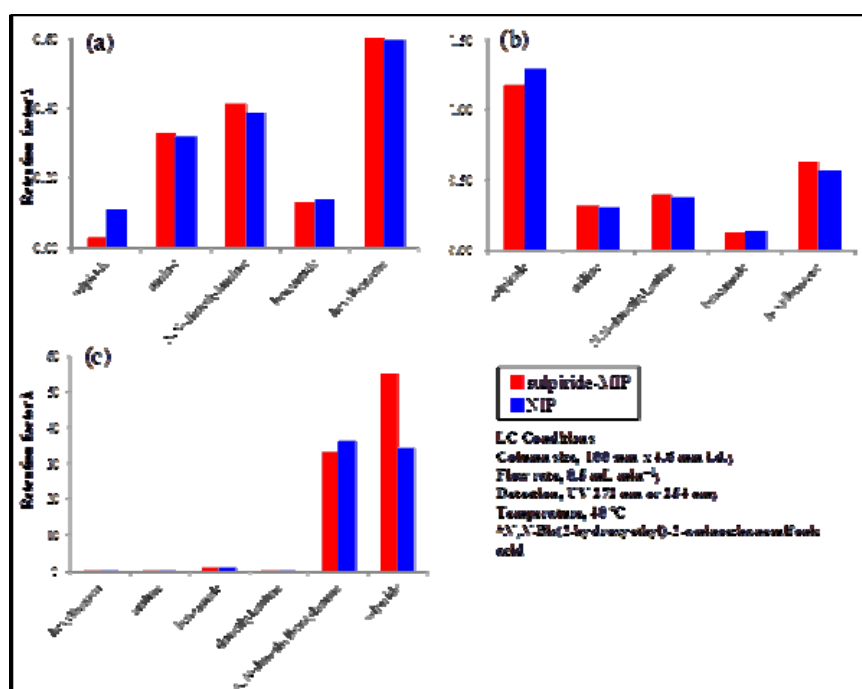


図 7. sulpiride-MIP および NIP における各溶質の保持係数比

(a) MeCN/50 mM formate buffer (pH 3.0) = 8/2, (b) MeCN/50 mM BES*-NaOH buffer (pH 7.0) = 8/2, (c) MeCN

表 2. スルピリドおよび塩基性溶質の pKa と log P 値

	sulpiride	aniline	<i>N,N</i> -dimethylaniline
pK_{a1}	10.2	4.67	5.39
pK_{a2}	9.00		
$\log P$	1.34	0.90	2.38

官能基間距離固定化法で合成した分子鑄型

図8にギ酸緩衝液を含む移動相を用いた場合の各カラムでのスルピリドに対する分離係数, およびクロマトグラムを示す。ここで, 選択性の指標として用いた分離係数は次式を用いた。

$$\text{Separation factor, } \alpha_{nm} = k_n / k_m$$

k_n : 試料 n の Retention factor, k_m : 試料 m の Retention factor

これらの結果から明らかなとおり, MIP-I では官能基間距離認識に基づく高い選択的保持が見られた。さらに, 非緩衝液, 非水系溶媒中ではスルピリドの保持が大きく, 溶出しないことから, 潜在的には極めて高いスルピリドに対する保持能を有することが示唆された。

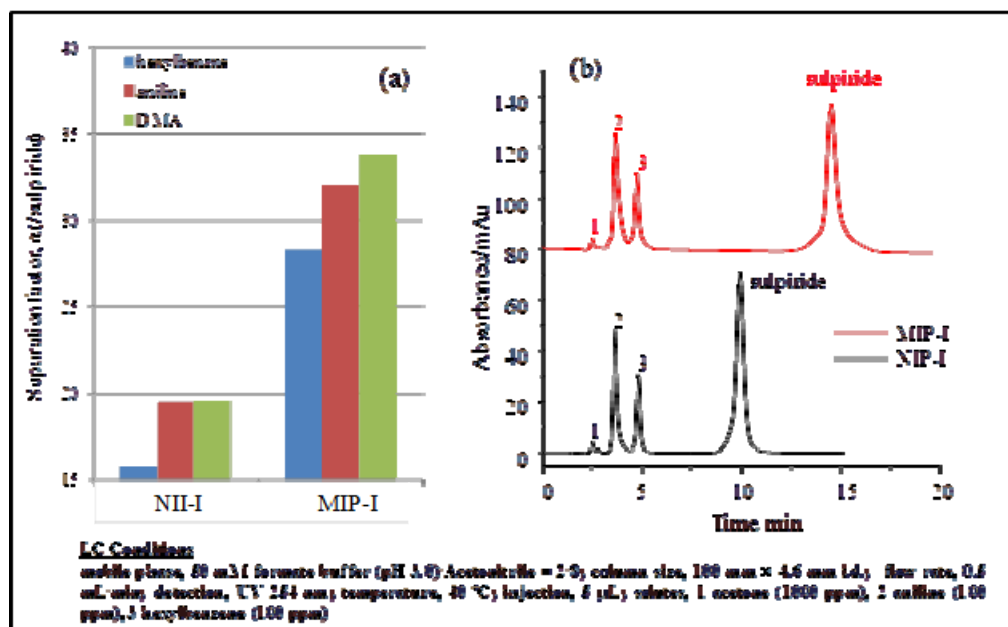


図 8. MIP-I および NIP-I における分離係数とクロマトグラム

(a) スルピリドに対する分離係数, (b) 各カラムにおけるクロマトグラム

3.1.2 水溶液中スルピリドに対する吸着性評価

上記で評価した 4 種のポリマー粒子 (100 mg) を SPE 用カートリッジに充てんし, 水溶液中のスルピリドに対する吸脱着性能を評価した。試料として, 100 ppm スルピリド水溶液を流し, 溶出液を LC で分析した結果, sulpiride-MIP, NIP, NIP-I では, はじめの 3 mL までにスルピリドが溶出することが観察され, 吸着性能が低いことがわかった。一方, MIP-I については, 30 mL 以上でもスルピリドの吸着が確認され, 高い保持能を有することが明らかとなった。

さらに, MIP-I に吸着したスルピリドは, MeCN や MeOH 等の有機溶媒のみの洗浄では脱着せず, 高濃度の塩溶媒を含む有機溶媒でのみ回収できることがわかった。これは, 従来の SPE を用いる場合と比較すると, 有機溶媒による洗浄過程を組み込めることか

ら、疎水性物質を除去し、より選択的にターゲット物質を濃縮できる点で、効果的な分析前処理が可能になると予想される。そこで、このプロセスを試行するために、オンラインカラムスイッチングシステムによる濃縮を試みた。

3.1.3 オンラインカラムスイッチングシステムによるスルピリドの分析前処理と定量分析⁷⁾

図9に示すオンラインカラムスイッチングシステムにおいて、前処理カラム部に MIP-I 充てんカラムを用いてスルピリド水溶液の濃縮を行った。検出器に質量分析計(MS)を導入することで、ppt レベルの濃縮・定量を試みた。本検討では、スルピリド標準品を用いて、前処理段階における MeCN による洗浄工程を含む前処理を施し、定量性を検証した。その結果、図9 (b) に示すとおり、オンライン SPE-LC-MS においてスルピリドの濃縮が達成され、10 ppt スルピリド水溶液を用いた場合の回収率は 89%となった。これらの結果から、官能基間距離固定化法により合成した MIP-I がスルピリドの分析前処理と定量分析に寄与することが明らかとなった。(参考資料参照)

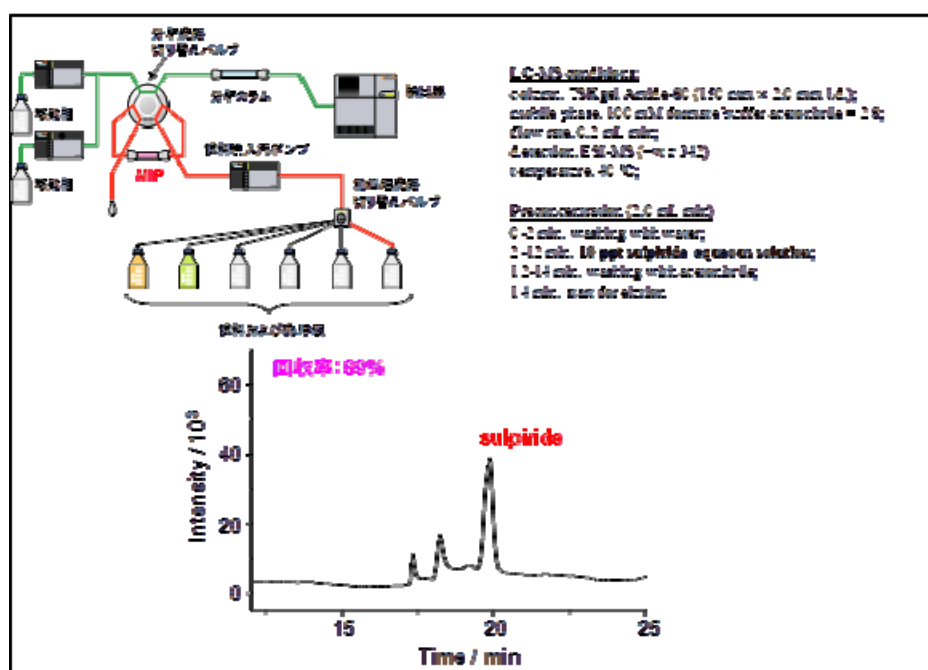


図9. オンライン SPE-LC-MS 分析の流路図と MS クロマトグラム

(a) オンライン SPE-LC-MS 流路図と分析条件, (b) 10 ppt スルピリド濃縮後の MS クロマトグラム

上記のオンラインカラムスイッチングシステムにおいて、低濃度のスルピリドの定量分析が可能となった。そこで、次に実試料を用いる同手法での定量分析を試みた。試料には、年間を通してスルピリドが高濃度で検出されている京都市内の河川水(西高瀬川)を選定した。(参考資料参照)

採水した試料を 0.22 µm のメンブランフィルターを用いてろ過し、不溶物を除去した後、直接前処理試料として用いた。図9と同手法を用いて得られた MS クロマトグラムを図10に示す。図に示すとおり、夾雑成分の影響がほとんど見られない、良好なクロマトグラムが得られた。さらに、得られたクロマトグラムと標準品の直接注入から得られた検量線からスルピリドの濃度を算出した結果、87.6 ng/L であることが明らかとなった。この結果は、既報の濃度と比べると若干低い値である。

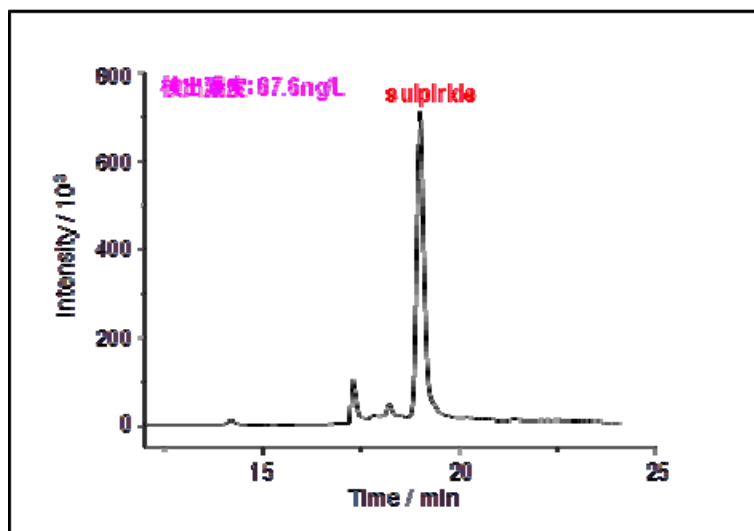


図 10. 実河川試料を用いたオンラインカラムスイッチングシステム分析
分析条件：図 9 と同様

3.2 表面トラップ層形成に関する基礎的検討

上記のように、モデルターゲット分子としたスルピリドに対する分子鋳型作成に一定の成果を得た。一方で、実環境試料からの濃縮においては、回収率が若干低下するという欠点を残している。表面トラップ層は水からのターゲット試料の捕捉をより効率的、高回収率にするための第 3 の仕組みである。

図 1 1 上段に、用いた 6 種類の溶媒への MPC モノマーの溶解状態を示す。略号は、MPC (○○○) の括弧内が用いた溶媒の略号である。ここでメタノールは MeOH, エタノールは EtOH, 2-プロパノールは IPN, アセトニトリルは MeCN, アセトンには A, テトラヒドロフランは THF で表している。



図 1 1. MPC モノマーおよび同ポリマーの溶媒に対する溶解状態

図の上段のように、MPC はアルコール系の 3 種類の溶媒には可溶である一方で、アセトンやテトラヒドロフランには難溶であることが分かった。また、図 1 1 下段には、それぞれの溶媒中でラジカル重合を行った際の MPC ポリマー (PMPC) の溶解状態を示している。これによると、メタノール、エタノール中では MPC ポリマーは溶解しているが、2-プロパノール、アセトニトリル、以右では析出が見られる。

この相分配の状況を表 3 にまとめる。

表 3. MPC ポリマー (PMPC) の相分配状態

Solvent	methanol	ethanol	2-propanol	acetonitrile	acetone	THF
Precipitated PMPC (%)	1.6	2.78	40.5	99.2	108.6	96.9
PMPC in solvent (%)	98.4	97.2	59.5	0.8	0	3.1

表から明らかなように、メタノール、エタノールを溶媒として用いた場合には、MPC が重合しても溶媒中に存在するため、溶媒中に分散している分子鑄型粒子との接触頻度は低く、モノマー自体の分配に基づく、比較的短い鎖での粒子表面への修飾が予想される。一方で、モノマーは溶解するが、ポリマーは溶解しない（あるいは一部溶解しない）2-プロパノールやアセトニトリルの場合には、重合の進行に伴い、ポリマーが溶媒から析出、粒子表面に移動し、そこで重合することにより、比較的長鎖での導入が期待できる。これらの状態を模式的に表すと図 1 2 に示すようになる。

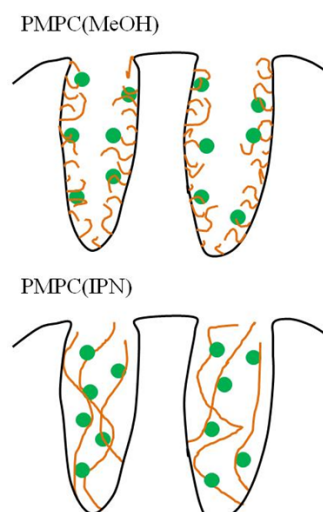


図 1 2. メタノール中および
2-プロパノール中での
MPC ポリマー (PMPC) による
表面修飾状態模式図

4. 現時点でのまとめと今後の課題

本年度の研究において、本研究の目的である 3D 固相の中でターゲット分子の選択的捕捉に関わる分子鑄型部分の作成について一定の見通しができた。問題点として、やはり高親水性化合物を水相（環境水）から効率的、定量的に捕捉する第 3 の層、トラップ層の導入があげられ、これにより現段階では問題のある回収率の改善に繋がってくるものと考えている。

このトラップ層の導入には、両イオン性モノマーである MPC を用いることとし、表面修飾の方法に関する基礎的、事前的検討を行った結果、同じ MPC を用いる場合においても、修飾に用いる溶媒を選択することで、粒子表面への導入形態に変化を与えることが可能であることが示唆された。

今後（次年度）表面修飾を実際に実施し、その特性を評価する、と同時に、分子鑄型との組み合わせによる 3D 固相の開発と、実際の水分析の迅速化への応用についてさらに検討を進めて行く予定である。

5. 参考文献

1. N. Nakada, K. Komori, Y. Suzuki, C. Konishi, I. Houwa, H. Tanaka, Occurrence of 70 pharmaceutical and personal care products in Tone River basin in Japan, *Water Sci. Technol.* 56 (2007) 133- 140.
2. Y. Watabe, T. Kubo, T. Nishikawa, T. Fujita, K. Kaya, K. Hosoya, Fully automated liquid chromatography-mass spectrometry determination of 17 beta-estradiol in river water, *J. Chromatogr. A* 1120 (2006) 252- 259.
3. Y. Watabe, T. Kubo, T. Tanigawa, Y. Hayakawa, K. Otsuka, K. Hosoya, Trace level determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in river water with automated pretreatment HPLC, *J. Sep. Sci.* 36 (2013) 1128- 1134.
4. T. Kubo, N. Tanaka, K. Hosoya, Target-selective ion-exchange media for highly hydrophilic compounds: a possible solution by use of the “interval immobilization technique”, *Anal. Bioanal. Chem.* 378 (2004) 84- 8.
5. Y. Tominaga, T. Kubo, K. Kaya, K. Hosoya, Effective recognition on the surface of a polymer prepared by molecular imprinting using ionic complex, *Macro-molecules* 42 (2009) 2911- 291.
6. Q.C. Wang, K. Hosoya, F. Svec, J.M.J. Frechet, Polymeric porogens used in the preparation of novel monodispersed macroporous polymeric separation media for high-performance liquid chromatography, *Anal. Chem.* 64 (1992) 1232- 1238.
7. T. Kubo, K. Kuroda, Y. Tominaga, T. Naito, K. Sueyoshi, K. Hosoya, K. Osuka, Effective determination of a pharmaceutical, sulpiride, in river water by online SPE-LC-MS using a molecularly imprinted polymer as a preconcentration medium, *J. Pharm. And Biomed. Anal.*, 89 (2014) 111 - 117.

6. 参考（サンプリング場所）





高速液体クロマトグラフ
High Performance Liquid Chromatograph Auto-Concentration System

自動濃縮システム



<http://www.an.shimadzu.co.jp/hplc/aplsys/auto-c/auto1.htm>