

# マイクロ抽出デバイスの開発

——バイアル抽出法——

川 口 研

## 1 はじめに

近年、様々な分析装置が開発され、環境・食品・生体試料中の微量な有機化合物の高感度測定が可能になりつつある。しかし、実際の試料を測定する上では、試料前処理が必要になる場合が多い。試料前処理は、試料から分析対象物質を抽出・濃縮・精製することを目的として行われるため、分析法全体としての感度および精度に大きな影響を与える。したがって、試料前処理の研究開発は、重要な検討課題である。取り分け、生体や環境試料などの希少な試料の測定において、極微量（100  $\mu\text{L}$  程度以上）な試料から効率よく分析対象物質を抽出・濃縮・精製するためのマイクロ抽出デバイスの開発が求められている。本稿では、筆者らが開発した抽出バイアル（図1）を用いたバイアル抽出法<sup>1)</sup>に関して、開発の経緯や実際の適用例などを紹介する。

## 2 既存法の問題点と解決策

現在、有機化合物の試料前処理として、固相抽出（SPE）法が広く用いられている<sup>2)</sup>。しかし、SPE法は、抽出剤表面の微細構造に分析対象物質を吸着させる必要があり、夾雑成分<sup>きょうざつ</sup>の比較的多い試料の分析においては、夾雑成分が抽出剤の表面に吸着・占有し、分析対象物質の抽出率を低下させることや、SPEカートリッジの目詰まりなどが問題であった。そこで、抽出剤としてガムベースのポリマーであるポリジメチルシロキサン（PDMS）などを用い、分析対象物質をポリマー内部に取り込む収着を利用した sorptive extraction が開発され、注目を集めている<sup>3)</sup>。吸着と収着の違いを図2に示す。

Sorptive extraction を利用した手法として、これまでファイバーにPDMS（約0.5  $\mu\text{L}$  程度）などがコーティングされたデバイスを用いる固相マイクロ抽出（SPME）法やガラス製攪拌子にPDMS（24  $\mu\text{L}$  程度）がコーティングされたデバイスを用いるスターバー抽

Development of Micro Extraction Device: Vial Sorptive Extraction.

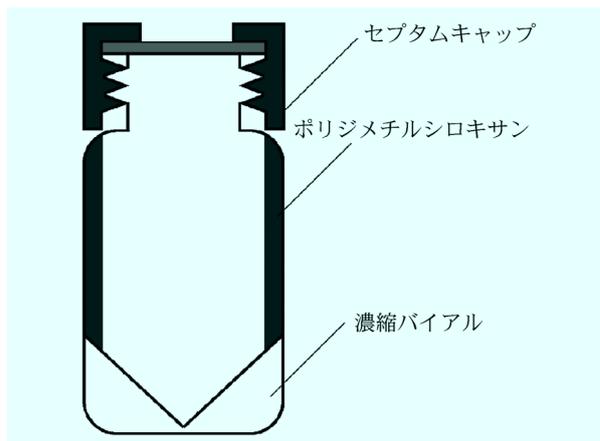


図1 バイアル抽出デバイス

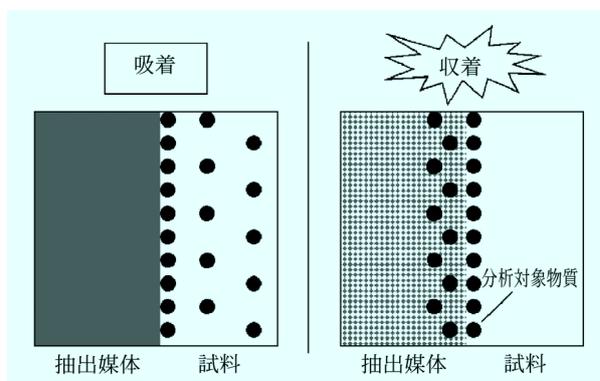


図2 吸着と収着の違い

出（SBSE）法などが開発されている。筆者らは、これまでにSBSE法を用いて、環境及び生体試料中の微量成分の高感度な測定法を開発した<sup>4)5)</sup>。しかし、SBSE法にはいくつかの問題点も見つかった。

- 攪拌子<sup>かくはん</sup>にコーティングできるPDMS量に制限がある。
- 極微量な試料に適用する場合、試料を希釈する必要がある。
- 疎水性化合物などはバイアル内面に吸着される。
- 自動化が困難である。

これらの問題点を克服すべく、新規の試料前処理の開発を試みた。筆者らは、SBSE法の欠点であるバイア

ル内面に分析対象物質が吸着されることに着目し、この欠点を利点に変える逆転の発想を考え出した。つまり、バイアル内面にPDMSなどの抽出剤をコーティングし、積極的に分析対象物質をバイアル内面に抽出・濃縮する新規の試料前処理であるバイアル抽出法を考案した。本法は、バイアル内面に大量の抽出剤(200~3000  $\mu\text{L}$ )をコーティングすることが可能であり、試料ごとにバイアルサイズを変えることで、微量な試料にも適用可能であると考えられた。表1に主な sorptive extraction の特徴を示す。

バイアル抽出法の概要を図3に示す。抽出バイアルに試料を添加し、振とうするだけで、分析対象物質を効率良く抽出・濃縮できる。その後、試料を取り除き、少量の脱着溶媒(アセトニトリルまたはメタノール)を添加し、分析対象物質を脱着させ、各種機器分析(大容量注入-GC/MS, LC-MS/MSなど)で測定する。本法を用いることで、高い回収率が得られ、高感度な測定が可能であると期待された。また、本法は、簡便で、自動化も容易であり、優れた試料前処理であると考えられた。

### 3 デバイスの最適化

Sorptive extraction において、大量の抽出剤を用いると高い回収率が得られるが膜厚が厚くなりすぎると、比較的長い抽出時間が必要になる。従って、迅速な試料前処理を実現するためには、抽出剤の膜厚やバイアル形状を最適化する必要がある。未重合PDMSを添加し、スピンコート法や鋳型を用いた成型加工により、2 mLバイアルの内面にコーティングし、抽出バイアルを

表1 主な sorptive extraction の特徴

試料前処理の種類	抽出剤の量 (抽出効率)	試料と抽出剤の接触面積 (抽出時間)	自動化	微量試料への適用
固相マイクロ抽出法	$\Delta$	$\Delta$	$\odot$	$\odot$
スターバール抽出法	$\circ$	$\circ$	$\Delta$	$\circ$
バイアル抽出法	$\odot$	$\odot$	$\circ$	$\odot$

$\odot$ 非常に優れている,  $\circ$ 優れている,  $\Delta$ やや劣る(筆者の主観による相対的評価)

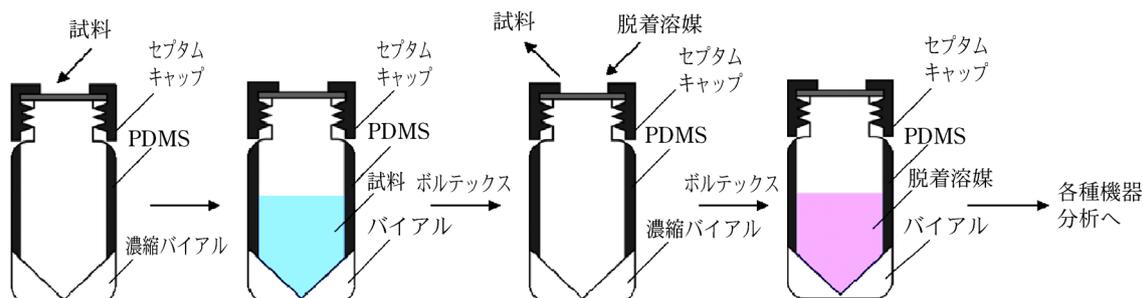
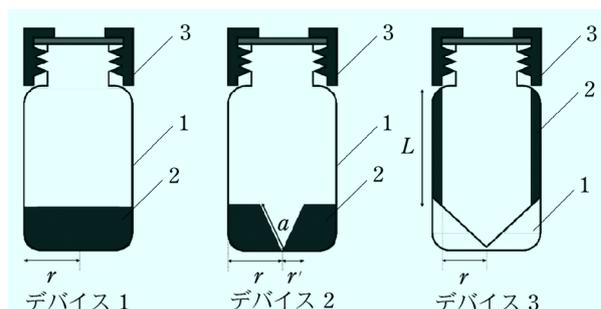


図3 バイアル抽出法の概要

試作した(図4)。

これら試作品をヒトの女性ホルモンの一種であるプロゲステロンの抽出時間及び回収率を指標として、評価した。結果を図5に示す。デバイス3が最も高い回収率を示した。デバイス1, 2及び3において、試料と抽出剤(PDMS)との接触面積は、理論値として0.8, 0.9及び5.2  $\text{cm}^2$ であり、より広い接触面積を持つデバイス形状が、より高い回収率を示す結果となった。また、抽出時間もデバイス3が最も短時間で分配平衡に達した。これらの結果は、吸着による化学物質の抽出が初期状態においては、試料と抽出剤との接触部分で



1: バイアル, 2: PDMS, 3: セプタムキャップ。デバイス1: 底面のみPDMSをコーティングしたデバイス, デバイス2: 鋳型を用いた成型加工より, PDMSの濃縮構造を形成させたデバイス, デバイス3: スピンコート法により濃縮バイアルの内壁をPDMSでコーティングしたデバイス。

図4 試作した抽出デバイス

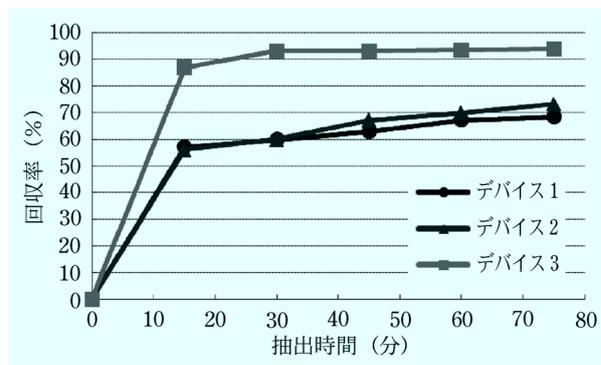


図5 試作した抽出デバイスを用いたプロゲステロンの抽出時間及び回収率の比較

表 2 血清中プロゲステロン測定におけるバイアル抽出法及び SBSE 法の比較

方法	条 件				最適化された分析条件		分析バリデーション		
	試料量 <sup>a</sup> (mL)	PDMS 量 ( $\mu$ L)	脱着溶媒量 ( $\mu$ L)	接触面積 ( $\text{cm}^2$ )	抽出時間 (分)	脱着時間 (分)	回収率 (%)	検出下限 (ng/mL)	定量下限 (ng/mL)
バイアル抽出法	0.5	200	50	5.2	30	10	94	0.1	0.5
SBSE 法	2	24	150	0.942	60	15	70	0.5	2.0

<sup>a</sup>: SBSE 法の場合、PDMS 攪拌子を試料で完全に浸らすため、血清試料 (0.5 mL) を精製水で希釈し、2 mL とした。

分析対象物質が吸着され、その後、吸着された分子がポリマー内部に取り込まれるため、広い接触面積を持つ形状のデバイスが良好な結果をもたらしたと考えられた。

#### 4 本法による実際の測定例及び従来法との比較

バイアル抽出法をヒト血清中プロゲステロンの測定に適用させた<sup>6)</sup>。安定同位体標識化合物 (プロゲステロン- $^{13}\text{C}_2$ ) を添加したヒト血清 (0.5 mL) を抽出デバイス (2 mL バイアル) に加え、ボルテックスミキサーで 30 分間攪拌した後、試料を取り除いた。次に、精製水 (1 mL) で 3 回洗浄した後、メタノール (50  $\mu$ L) を加え 10 分間攪拌し、分析対象物質を脱着させた。抽出バイアルをオートサンプラーにセットし、LC-MS/MS で測定した。また、従来法として SBSE 法と比較した。SBSE 法では、0.5 mL の試料をそのまま適用させることが困難であり、精製水を添加して、全量 2 mL とした。バイアル抽出法及び SBSE 法との比較を表 2 に示す。

バイアル抽出法及び SBSE 法の抽出時間は 30 分及び 60 分であり、バイアル抽出法は抽出時間を約半分にすることができた。また、バイアル抽出法の検出感度は、SBSE 法と比べて 4~5 倍程度改善された。本法を用いて、プロゲステロンの濃度が認証されたヒト血清標準物質である ERM-DA347 を測定した。ERM-DA347 を測定した際のクロマトグラムを図 6 に示す。本法による定量値 (3.2 ng/mL) は、ERM-DA347 の認証値 ( $3.19 \pm 0.07$  ng/mL) と非常によく一致しており、本法の有用性が確認できた。

#### 5 まとめ

新規の試料前処理であるバイアル抽出法を開発した。バイアルの内面に抽出剤をコーティングした抽出バイアルを用いることで、従来法の欠点を利点に変えることに成功した。さらに、試料と抽出剤の接触面積を広くすることで、短時間の抽出で高い回収率を得ることができた。

今後の課題として、脱着した成分を大量に機器に導入する手法などと組み合わせ、さらなる高感度な測定法の開発が期待される。また、オートサンプラー用の

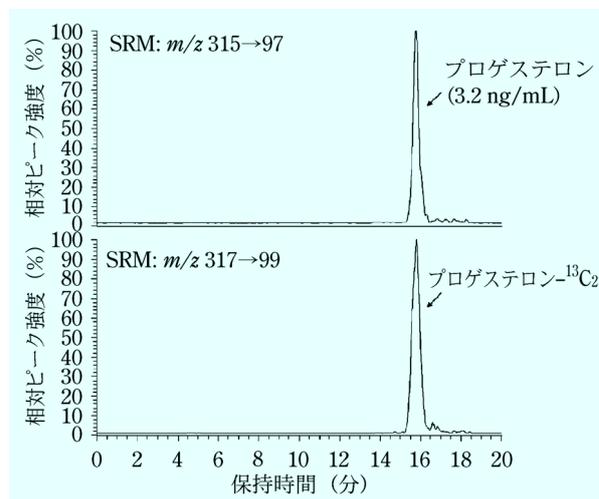


図 6 バイアル抽出法及び LC-MS/MS を用いて血清中プロゲステロン (ERM-DA 347) を測定した際の抽出イオンクロマトグラム

バイアルを使用することで、自動化も容易であると考えられ、完全自動化を視野に入れた装置開発などが期待される。

#### 文 献

- 1) 特許第 5142276 号 “試料採取容器および容器抽出・分析方法”。
- 2) 古庄義明: ふんせき, **2013**, 122.
- 3) E. Baltussen, C. A. Cramers, P. J. F. Sandra: *Anal. Bioanal. Chem.*, **373**, 1266 (2002).
- 4) M. Kawaguchi, R. Ito, K. Saito, H. Nakazawa: *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **40**, 500 (2006).
- 5) M. Kawaguchi, R. Ito, H. Nakazawa, A. Takatsu: *Trends Anal. Chem.*, **45**, 280 (2013).
- 6) M. Kawaguchi, S. Fujii, N. Itoh, R. Ito, H. Nakazawa, A. Takatsu: *J. Chromatogr. A*, **1216**, 7553 (2009).



川口 研 (Migaku KAWAGUCHI)  
産業技術総合研究所計測標準研究部門有機分析科バイオメディカル標準研究室 (〒305-8563 茨城県つくば市梅園 1-1-1)。星薬科大学大学院修了。博士 (薬学)。<現在の研究テーマ>クロマトグラフィー用試料前処理法の開発、認証標準物質の開発。<主な著書>“Comprehensive Sampling and Sample Preparation” (Elsevier)。<趣味>自転車 (電動アシスト付き)、子育て。