



# 固相抽出の基礎と選び方

The Measure of Confidence

固相抽出はサンプル前処理の基本的な手法の一つです。本冊子では固相抽出法を効果的に行うための基礎と、手法の開発／改善のための考え方、固相の選び方について説明します。

## 目次

### 第一部：固相抽出の基礎

はじめに	2
1. 固相抽出とは	3
2. 固相の保持メカニズム	4
3. 固相抽出の原材料	5
4. 固相抽出の手順	7
5. 固相抽出に使用する溶媒	8
6. 固相抽出カラムの形状	10
7. 固相抽出の流速調整方法	11

### 第二部：固相抽出の選び方

はじめに	12
1. 最適な固相を選ぶ前に	13
2. 試料について知る	13
3. 固相を選ぶ	15
4. 固相を試す	16
5. トラブルシューティング	18
6. まとめ①	19
7. まとめ②	20



Agilent Technologies

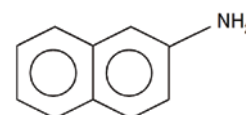
# 第一部：固相抽出の基礎

## はじめに

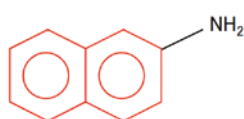
固相抽出法によってサンプル前処理を効果的に行うためには、「目的物質の化学的性質」と「現在の系に使用されている溶媒」の、2つの情報を把握することが必要です。

以下に例を挙げて、固相抽出法における前処理メソッドを確立させる過程の概念を示します。

例えば、目的物質が右図のような化学構造であるとして、この物質の化学的性質として、溶媒によって2種類の状態が存在します。

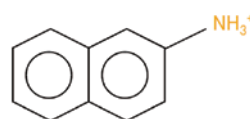


状態1



溶媒が低極性溶媒のとき  
溶媒のpHがpKaより2以上高いとき  
溶媒の塩濃度が高いとき

状態2



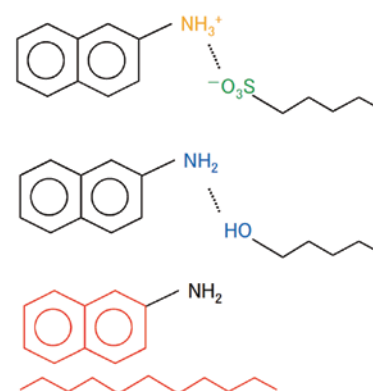
溶媒が水のとき  
溶媒のpHがpKaより2以上低いとき  
溶媒の塩濃度が低いとき

状態2の場合は $-NH_3^+$ 基を利用したイオン交換によって固相抽出を行います（このような系はイオン交換系と呼ばれます）。

しかし状態1の場合は、溶媒の特性によって手法が変わります。

状態1で、溶媒が低極性溶媒の場合は、 $-NH_2$ 基を利用した固相抽出を行います（このような系は順相系と呼ばれます）。

一方、状態1で、その他の溶媒の場合は、ベンゼン環を利用した固相抽出を行います（このような系は逆相系と呼ばれます）。



なぜ、このように物質の状態によって手法が変わるのか、なぜ、同じ物質でも溶媒の種類によって手法が変わるのか、第一部では固相抽出法を効果的に行うための基礎を説明します。

また、固相抽出法を開発 / 改善するための手法の考え方、固相の選び方については、本資料後半の第二部「固相抽出の選び方」をご覧ください。

# 1

## 固相抽出とは

あるサンプルに含まれている目的物質を分析する際には、以下の4つの段階を経る必要があります。

①サンプル前処理 → ②分離 → ③検出 → ④データ処理

これらの段階のうち、『①サンプル前処理』を行う目的は、以後の『②分離』と『③検出』で使用するGCやHPLCなどの機器分析を行う前に、サンプルに含まれている夾雑物を排除して、機器分析での感度向上、および『④データ処理』でのデータ精度向上を図るためです。

サンプル前処理にはいくつかの手法がありますが、最も用いられている手法の1つとして、分液漏斗を使用する液液抽出法があります。

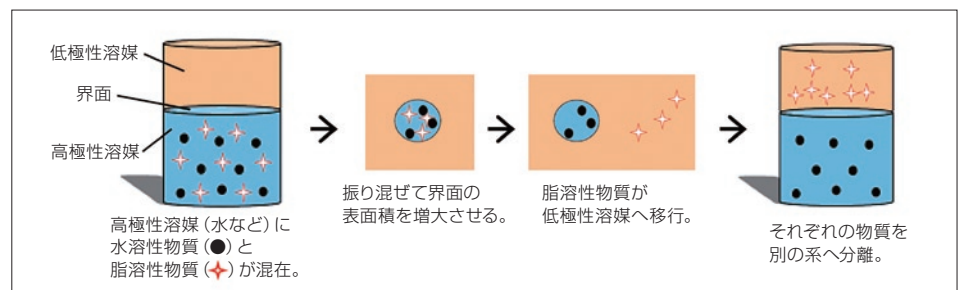


図1 液液抽出

液液抽出法とは、相互に混ざり合わない(界面が形成される)組み合わせの溶媒を使用し、振とうさせた後、目的物質と不要物質とを分離させる手法です。この手法では、2種類の溶媒が界面を形成することが必須の条件となります。

しかし、この手法では目的物質と不要物質とが分離できない場合もあります。このような場合に役立つ手法として、固相抽出法があります。

固相抽出法に使用する器具は、充填剤(固相)が詰まっているミニカラムです。カラムに試料溶液を通すことにより、目的物質と不要物質とを分離します。

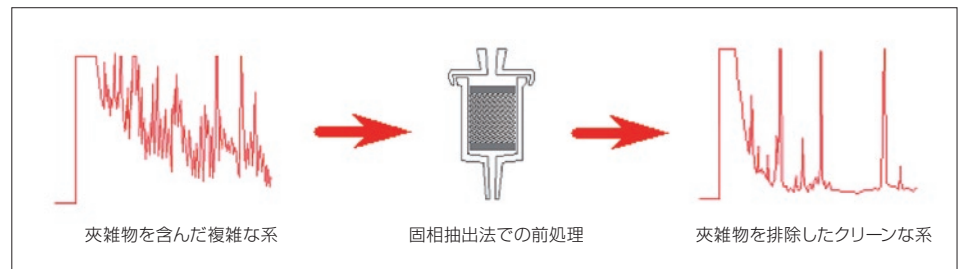


図2 固相抽出法の概念図

## 2

# 固相の保持メカニズム

固相が試料中の物質を保持するメカニズムには以下の3通りがあります。固相抽出カラムの充填剤は、そのいずれかのメカニズムで作用します。

### ①疎水性相互作用（逆相系）

固相に疎水性の官能基（C18、C8、ベンゼン環など）が結合し、試料中の成分を疎水性相互作用で保持するものです。特にベンゼン環を有する固相は、試料中のベンゼン環を持った物質と $\pi$ 電子相互作用を行い、特異的に保持する特徴があります。

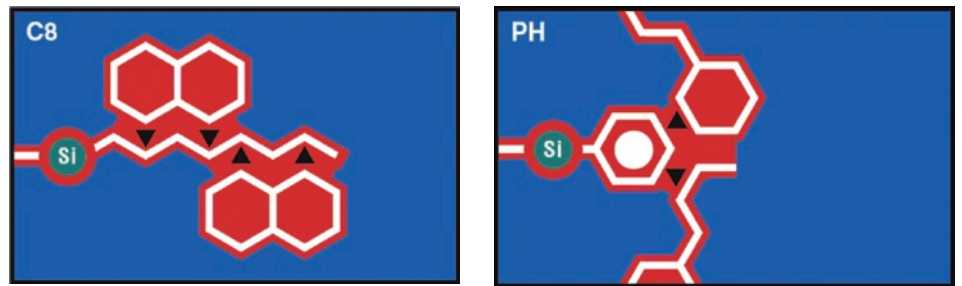


図3 疎水性相互作用の例 C8 (左)とPH (右)

疎水性相互作用を用いた固相抽出は、一般的に極性の溶媒（水、水系の緩衝液、メタノール、アセトニトリル等、およびこれらの混合系）に溶解している試料から、疎水性の成分を分離する際に使用します。このように固相が極性で、試料溶媒が極性の組み合わせの場合を『逆相系』とも言います。これは、次に述べる極性相互作用（固相が極性で、試料溶媒が疎水性）の手法が先に開発されたため、その逆の組み合わせである系が逆相系と呼ばれています。

逆相系において使用される固相の種類としては、C18、C8、C2、C1、PH、CH、CN-E、グラファイトカーボンなどがあります。

### ②極性相互作用（順相系）

固相に極性の官能基（OH など）が結合しているか、または固相そのものが極性であり、試料中の成分を水素結合のような極性官能基同士の相互作用で保持するものです。一般に、疎水性の溶媒（ヘキサン、イソオクタン、トルエン、クロロホルム、ジクロロメタンなど）に溶解している試料から、極性の成分を分離する際に使用します。前項の疎水性相互作用による分離メカニズムを逆相系と呼ぶのに対し、『順相系』と呼ばれます。

順相系において使用される固相の種類としては、Silica (SI)、Diol、Alumina、Florisil (FL)、CN-U などがあります。

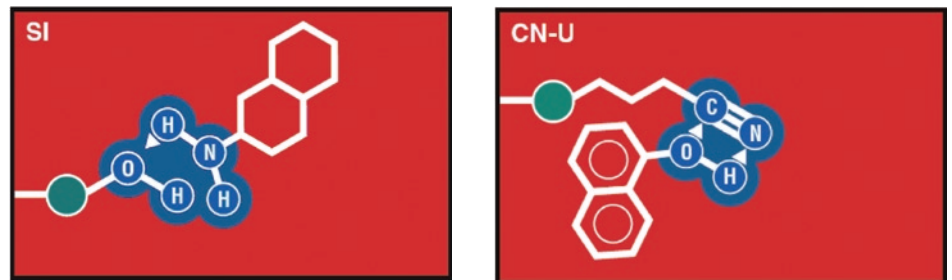


図4 極性相互作用の例 Silica (左)とCN-U (右)

### ③イオン交換

固相にイオン性の官能基が結合し、試料中のイオン性成分をイオン結合によって保持するものです。陽イオン交換（カチオン交換）と陰イオン交換（アニオン交換）の2種類があり、以下のような組み合わせになっています。

	固相側	保持される試料中成分
陽イオン交換（カチオン交換）	-イオン	+イオン
陰イオン交換（アニオン交換）	+イオン	-イオン

また、固相に結合しているイオン交換基の pKa により、強イオン交換と弱イオン交換の2種類に分類されます。

- ・強イオン交換：固相の使用可能 pH 範囲外に pKa があり、使用時は常時解離している。
- ・弱イオン交換：固相の使用可能 pH 範囲内に pKa があり、溶媒の pH により解離調整ができる。

イオン交換において使用される固相の種類としては、以下の種類があります。

強カチオン交換：SCX、PRS      強アニオン交換：SAX  
弱カチオン交換：CBA          弱アニオン交換：DEA、PSA、NH<sub>2</sub>

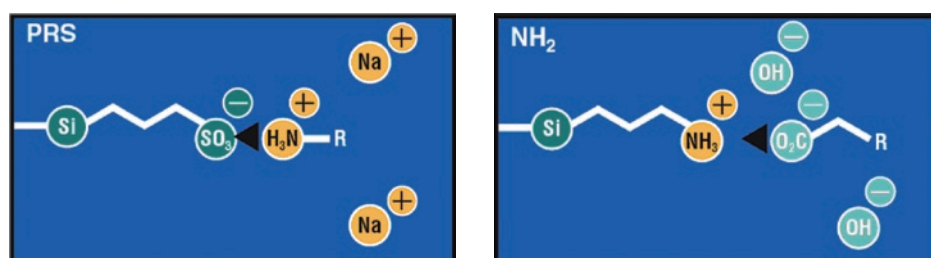


図5 イオン交換の例 PRS [陽イオン交換] (左)とNH<sub>2</sub> [陰イオン交換] (右)

## 3 固相の原材料

### ①シリカゲル

固相の原材料としては最も一般的なもので、シリカゲル表面のシラノール基（-Si-OH 基）に各種官能基を脱水縮合で結合させたものです。シリカゲルは機械的強度が高く、耐圧性に優れているほか、多様な官能基の充填剤が作成できる利点があります。しかし、強酸性下では結合させた官能基が加水分解により脱離してしまい、また強塩基性下では基材のシリカゲルが溶解してしまうため、使用可能 pH 範囲が限定されてしまう難点があります。

シラノール基は極めて極性が高いため、官能基を結合させないシリカゲル自体も極性相互作用の固相として使用されます。

シラノール基の全てに官能基を結合させることは不可能であるため、合成後の固相には遊離のシラノール基が残存しています。疎水性相互作用で使用する場合には、この極性の高いシラノール基が分離の障害となることが多いので、残存シラノール基をメチル基で封鎖することがあります。これをエンドキャッピングといいます。

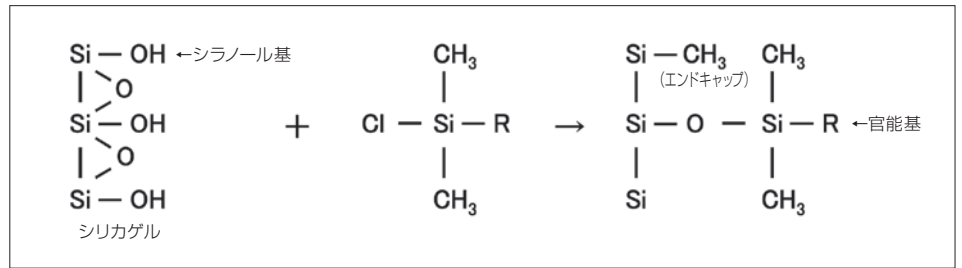


図6 シリカ系充填剤の構造

### ②モノリスタイプシリカゲル

シリカゲルをスポンジ様に固めたタイプがモノリスタイプです。紛体のシリカゲルよりも固相の厚みを薄くできるので、ボイドボリュームが小さくなり、固相抽出法の迅速化と溶出溶媒の削減が可能です。また、保持された成分を少量の溶媒で溶出できるため、紛体のシリカゲルよりも高度な濃縮が可能です。紛体のシリカゲルと同様に、モノリスタイプシリカゲルも多様な官能基を結合させることができます。

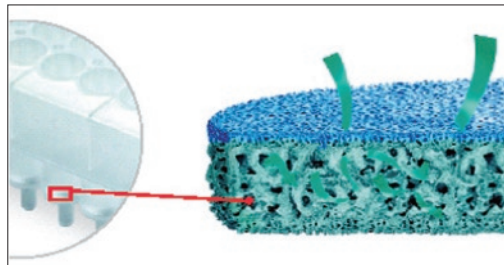


図7 モノリスタイプシリカゲルの構造

### ③ポリマー

ポリスチレンジビニルベンゼンなどの合成ポリマーを基材とした固相です。基材自体が疎水性相互作用を有します。シリカ基材の固相に比べてシラノール基の影響がない、pH 耐久性の範囲が広いといった長所があります。逆に、基材が溶媒で膨潤・収縮しやすく、耐圧性が低いのが欠点です。ポリマーにイオン性の官能基を結合したポリマー系イオン交換の固相もあり、イオン交換と基材自体が有する疎水性相互作用の両方の機能を兼ね備えたミックスモードになっています。

現在市販されているポリマー系固相抽出カラムは、各社とも独自の製品名で販売しています。

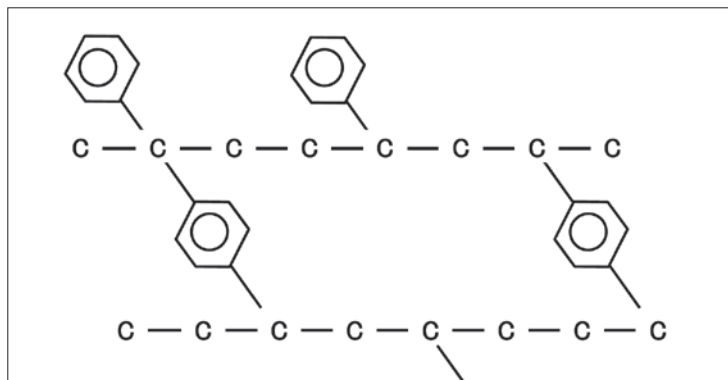


図8 ポリスチレンジビニルベンゼンの構造

### ④その他

アルミナ (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)、フロリジル (MgO<sub>3</sub>Si)、セルロースなども高極性の物質であり、極性相互作用の固相として使用されます。

固相抽出法で行う目的物質のクリーンアップには、以下の2つの手法があります。

- (1) 目的物質 (■) を保持させず、夾雑物 (●と●) を保持させる (通過型、図 9)。
- (2) 目的物質 (■) を保持させ、夾雑物 (●と●) を洗い流してから目的物質を溶出させる (保持型、図 10)。

通過型の場合、固相抽出での濃縮はできず、固相抽出の前後で目的物質の濃度は変化しません。保持型の場合では、元の試料よりも溶出溶媒の量を少なくすることができれば、濃縮を行うことができます。

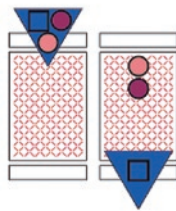


図9 目的物質を通過させ、  
夾雑物を保持 (通過型)

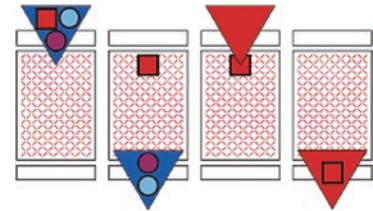


図10 目的物質を保持、  
夾雑物を洗浄の後、溶出 (保持型)

### (1) 通過型の手法

#### ①コンディショニング (活性化)

固相抽出法では、最初にコンディショニングを行います。これは固相を濡らし、官能基を活性化するためです。固相抽出カラムは充填剤が乾燥した (不活性化した) 状態で出荷されているため、この操作は必須です。特にシリカゲル基材の固相の場合、無数に存在する細孔の内部にも官能基が結合しているため、細孔の最深部まで濡らす必要があります。この際、特に逆相系では最初に水を流すと細孔の入り口で水がはじかれてしまい、十分なコンディショニングを行うことができません。これを避けるためには、メタノールやアセトニトリルなどの有機溶媒を充填剤体積 (mL\*) の5倍量 (mL) 流すことが必要です。また、コンディショニング後は液を切らしてカラム内を乾燥させないように注意を払う必要があります。ただし、たとえ乾燥させてしまったとしても、試料を添加する前であれば、コンディショニングをもう一度最初から行えば使用できます。有機溶媒で濡らした後、試料溶媒と同じ組成の溶媒に置換します。試料が生体試料の場合では水に置換します。なお、コンディショニングの溶媒と試料溶媒が混ざり合わない場合には、両方の溶媒に混合可能な溶媒を間に挟み、段階的に置換します。

\* 充填剤体積 (mL) は充填剤重量 (g) の約2.4倍です。

一部のポリマー系充填剤では、乾燥しても使用可能なものや、コンディショニングなしで使用できるタイプもあります。

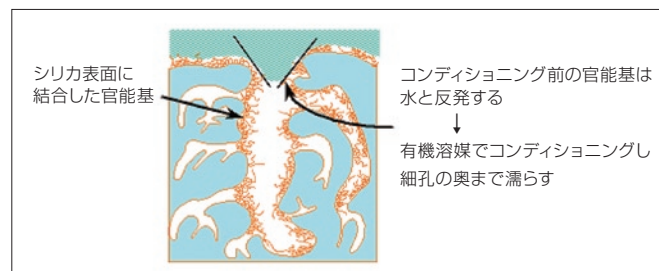


図11 シリカ細孔のコンディショニング

#### ②試料添加

試料は、使用する固相に対してできるだけ溶出力の少ない組成の溶媒\*に溶解させ、固相に添加します。目的物質は固相に保持されないため、カラムから落下してくる液を最初から回収します。

\* 例えば、逆相系なら水、順相系ならヘキサン、イオン交換系なら塩濃度 0.01 M 以下の緩衝液。

### ③溶出

試料溶媒と同じ組成の溶媒を充填剤の体積以上流し、試料添加後に固相内に残っている目的物質を回収します。通常、この液は②の回収液と合わせ、機器分析用の試料とします。夾雑物が保持されているカラムはそのまま処分します。

## (2) 保持型の手法

### ①コンディショニング (活性化)

(1) の手法の場合と同じです。

### ②試料添加

(1) の手法の場合と同じですが、目的物質は保持されているので、カラムから溶出する液は回収しません。

### ③洗浄

夾雑物は溶出させるが、目的物質は溶出させない溶媒で固相中の夾雑物を洗い流します。充填剤体積 (mL) の 20 倍量 (mL) 流しても目的物質が溶出しない、というのが洗浄溶媒選定の基準になります。方法設定時に標準物質で検討することが必要です。

### ④溶出

目的物質を溶出させます。できるだけ少量の溶媒で溶出させると、同時に濃縮も行うことができます。回収率を充分にとるためには、充填剤体積 (mL) の 5 倍程度 (mL) は溶出溶媒を流す必要があります。夾雑物の中には目的物質よりも固相に強固に保持される物質もあるので、目的物質を溶出させるのに充分であれば、それ以上溶出力の強い溶媒は使用しないほうが良い場合があります。

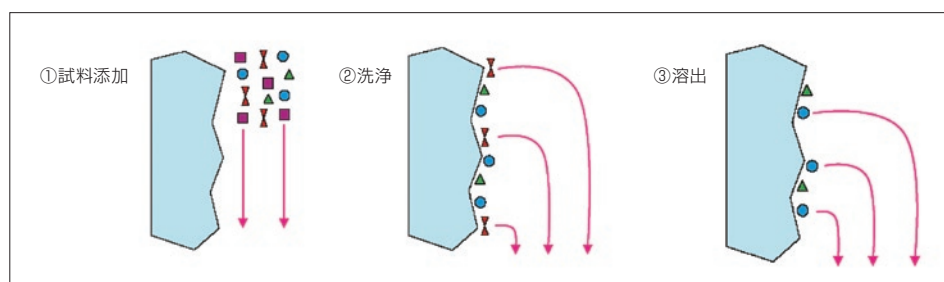


図12 固相抽出法の流れ

# 5

## 固相抽出に使用する溶媒

### (1) 疎水性相互作用 (逆相)

#### ①コンディショニング

メタノールまたはアセトニトリル 100 % の溶媒を流した後、試料溶媒と同じ組成の溶媒で置換します。

#### ②試料溶媒

試料が溶解する限り有機溶媒含量を少なく、かつ水の比率を多くします。できれば水 100 % が理想的です。目的物質がイオン性物質の場合は、緩衝液に溶解し、その物質の pKa から解離抑制するほうに pH を 2 以上離し、非解離の状態にします。

#### ③洗浄溶媒

試料溶媒よりも有機溶媒比率を高くします。ただし、目的物質が溶出しない程度の比率にします。



#### ④溶出溶媒

洗浄溶媒よりも有機溶媒比率を高めて、目的物質が溶出する比率にします。

例)

試料溶媒：蒸留水

洗浄溶媒：メタノール 10 %

溶出溶媒：メタノール 60 %

### (2) 極性相互作用 (順相)

#### ①コンディショニング

溶出溶媒かそれより溶出力の高い溶媒を最初に流し、続いて試料溶媒と同じ組成の溶媒に置換します。

#### ②試料溶媒

できるだけ極性の低い溶媒に溶解します。ヘキサン、イソオクタンなどの炭化水素 100 % の溶媒が理想的ですが、溶解しない場合には極性の高い溶媒を最小限であれば加えることもできます。

#### ③洗浄溶媒

試料溶媒よりも高極性の溶媒を使用するか、試料溶媒と高極性溶媒の混合溶媒を使用します。このとき、目的物質が溶出しない程度の溶媒もしくは溶媒比率にします。

#### ④溶出溶媒

洗浄溶媒よりも極性の高い溶媒を使用するか、洗浄溶媒で使用した混合溶媒よりも極性が高くなるような混合溶媒を使用します。このとき、目的物質が溶出する溶媒もしくは溶媒比率にします。

例)

試料溶媒：ヘキサン

洗浄溶媒：ヘキサン / アセトン = 90/10

溶出溶媒：ヘキサン / アセトン = 50/50

### (3) イオン交換

#### ①コンディショニング

メタノールまたはアセトニトリル 100 % の溶媒を流した後、試料溶媒と同じ組成の溶媒で置換します。ただし、試料溶媒が緩衝液など塩類を含む場合には、塩類が不溶化・析出することがあります。このようなときには蒸留水に置換してから、緩衝液に置換してください。

#### ②試料溶媒

目的物質が電離した状態になるように pH を調整した緩衝液で、塩濃度はできるだけ低くします (例えば塩濃度 0.01 M 以下など)。

#### ③洗浄溶媒

イオン交換の場合には以下のような洗浄溶媒を使い分けます。

- a. 目的物質が溶出しない程度に塩濃度を上げた緩衝液  
→ pH は試料溶媒と同じ
- b. 有機溶媒もしくは水 / 有機溶媒の混合液  
→ 目的物質はイオン結合で保持されているので有機溶媒では溶出しない。  
特に脂溶性の夾雑物が多いときに有機溶媒での洗浄は効果的です。

#### ④溶出溶媒

イオン交換の場合には多様な溶出方法があります。

- a. 塩濃度を高くした緩衝液
- b. 目的物質が電離しない pH に調整した緩衝液、酸性・塩基性溶液
- c. 固相の官能基が電離しない pH に調整した緩衝液、酸性・塩基性溶液  
(弱イオン交換カラムの場合)

d. 上記 a、b、c の溶媒に有機溶媒を補助的に添加した混合溶媒  
(目的物質の疎水性が高い場合)

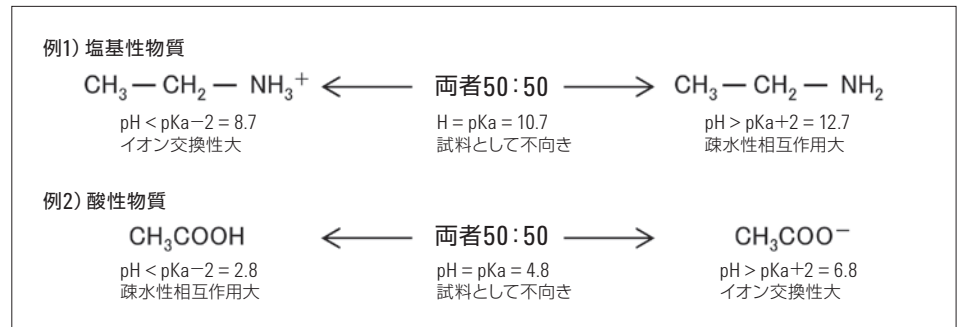


図13 溶液のpHと物質のイオン解離との関係

## 6 固相抽出カラムの形状

### ① シリンジバレル型

注射塔型の容器に充填剤を詰めただけのものです。固相抽出カラムとしては最も一般的な形状です。容量のバリエーションが広く、少量用から分取用まであります。

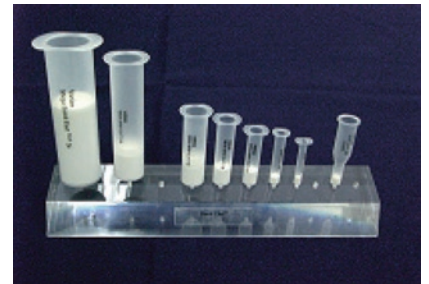


図14 シリンジバレル型固相抽出カラム

### ② ルアーデバイス型

入口側にシリンジを接続できる形状になっています。シリンジで試料や溶媒を加圧しながら注入して使用します。シリンジバレル型の出口側に取り付けて、2種類の充填剤を組み合わせる方法にも使用できます。容量の範囲が限られてしまうのが欠点です。



図15 ルアーデバイス型固相抽出カラム

### ③ 96 ウェルプレート型

96 検体を同時に処理するために、プレート状になっています。このプレート型には固定式と差し替え式の2種類があります。固定式は、通常96か所すべてに同じ種類と量の充填剤が詰められていて、一度使用したら使い捨てです。差し替え式は、プレートは半永久的に使用可能で、使用したウェル部分(小型カラム)を交換して使用します。差し替え式では、異なる種類または量の小型カラムを組み合わせることもできます。



図16 96ウェルプレート型  
固定式(上) 差し替え式(下)

固相抽出法は、溶媒の自然落下（重力による落下）でも行うことができますが、効率化を図るためにいくつかの方法で流速を上げることもできます。ただし、流速は液滴が見える範囲で制御する必要があります。水道水が蛇口から流れ出るような連続した流れになってしまうと、回収率の低下や夾雑物の残留等が生じやすくなります。

### ①加圧法

試料や溶媒をシリンジで加圧することにより、流速を上げる方法です。1本ずつ手で加圧するほか、多数のカラムを並べて同時に加圧する自動化装置もあります。

### ②吸引法

カラムの出口側を減圧・吸引して、流速を上げる方法です。1本ずつ吸引瓶で行う方法もありますが、多検体を同時に吸引するバキュームマニホールドと呼ばれる装置も一般的によく使用されています。

### ③遠心分離法

固相抽出カラムと、溶液を回収する容器とを組み合わせ、遠心機にかけて処理する方法です。1本ずつ処理を行うほか、96 ウェルプレート処理できるタイプの遠心機ローターもあります。

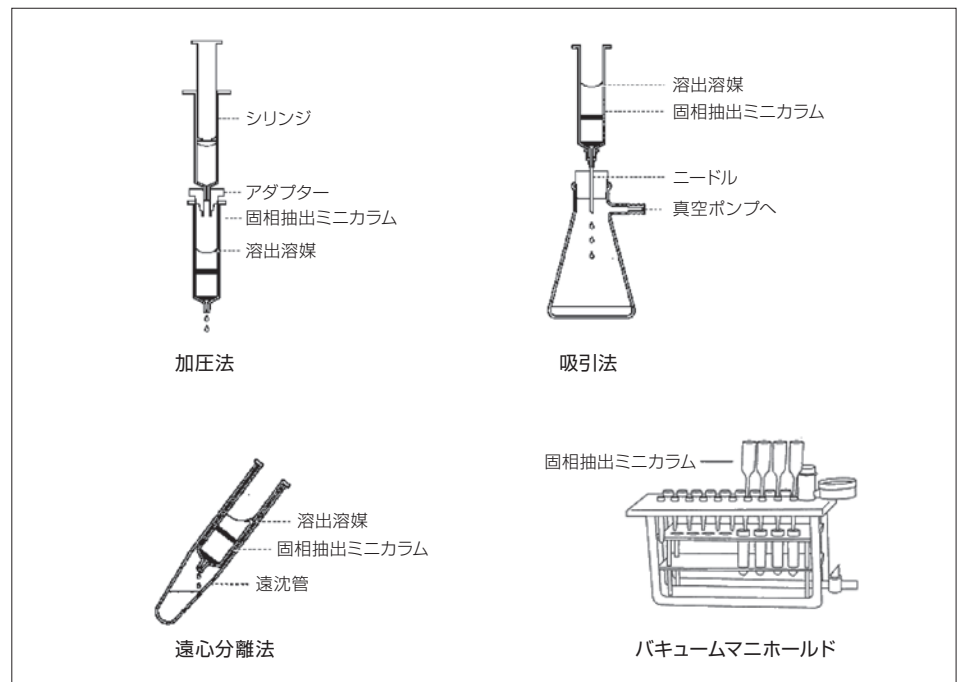


図17 固相抽出カラムの流速調整法

# 第二部：固相抽出の選び方

## はじめに

第二部では、固相抽出法の開発／改善手法や、固相の選び方について説明します。

固相抽出によるサンプル前処理において確実に目的物質を回収するためには、どの固相抽出を選ぶかが大きな課題となります。

固相抽出法では、目的物質、固相、マトリックスの3要素が密接にかかわっています。そのため、各要素の関連について検討し、どのような試料に含まれている目的物質を抽出するのかを考えることが適切な選択につながります。

### 1. 目的物質と固相の相互作用

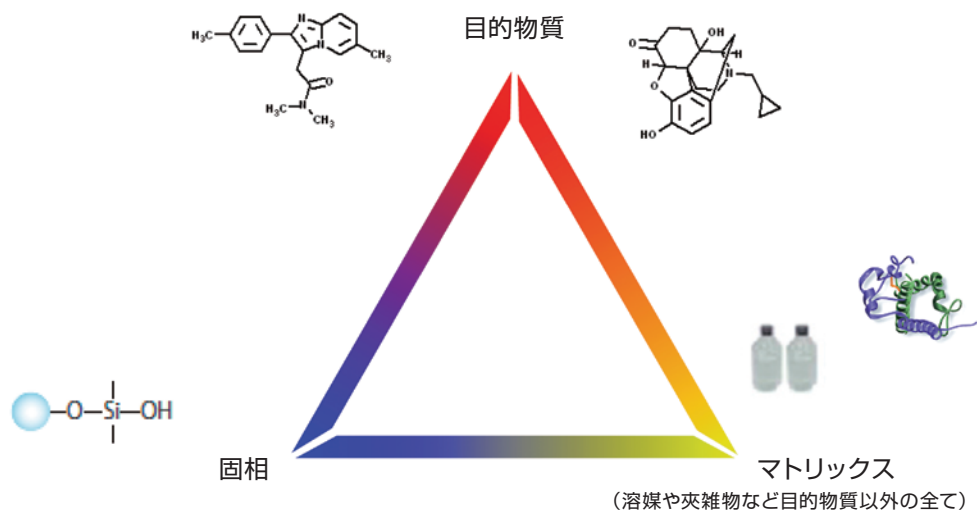
この相互作用は、目的物質の抽出・回収を促進します。

### 2. 目的物質とマトリックスの相互作用

この相互作用は、目的物質の抽出・回収を促進したり妨害したりします。

### 3. 固相とマトリックスの相互作用

この相互作用は、目的物質の抽出・回収を妨害します。



# 1

## 最適な固相を選ぶ前に

固相抽出法で行う目的物質のクリーンアップには、通過型と保持型の2つの手法があります。(7ページ参照)

これら2つの手法には、それぞれにメリットとデメリットがあります。

通過型		保持型
簡単	操作性	煩雑
不可能	濃縮	可能
多めに必要	固相の量	少なめで十分
多量の溶媒が必要	溶出溶媒の量	少量の溶媒で十分

どちらの手法を適用させるかで選ぶ固相の種類は変わります。通過型を適用する場合には、目的物質を保持せず、夾雑物を保持するものになります。保持型を適用する場合には、目的物質を保持し、夾雑物を保持しない種類のものになります。

最適な固相の選択を含めた固相抽出法の開発には、以下のステップがあります。

### 1. 試料について知る

目的物質やマトリックスに関する情報をできるだけ集め、目的を明確にします。

### 2. 固相を選ぶ

目的に応じた固相を選びます。

### 3. 固相を試す

標準物質(無い場合には実試料)を用いて保持・溶出・容量・選択性を試験します。

### 4. 結果を確認する

実試料に適用可能な方法かどうかを確認します。

# 2

## 試料について知る

### 2-1. 固相抽出の目的

固相抽出によって目的物質を得ようとする場合に、抽出後の試料はどのような状態が良いのかを考えます。

#### I. 目的物質の純度(精製度)をどの程度まで高めるか?

最終試料の純度(精製度)は高めれば高いほど良いですが、抽出方法は難しく煩雑になります。この時には、機器分析で使用する検出器が1つの指標になります。質量分析計(MS)のような選択性が極めて高い検出器を使用する場合には、マトリックス中の主要な夾雑物を「ざっと」取り除く程度でよいでしょう。逆に、水素炎イオン化検出器(FID)や示差屈折計(RI)のような選択性の低い検出器を使用する場合には、選択性の高い抽出法が必要になります。

#### II. 最終溶媒を何にするか?

第一に、目的物質が溶ける溶媒であることが必要です。そのうえで、使用する分析機器に合わせた溶媒を選択します。最後に、その溶媒で目的物質を抽出することができる固相を選びます。

## 2-2. 目的物質を知る

固相抽出を行う場合、目的物質の構造や性質を把握することは非常に重要です。これにより、固相抽出の手法や選ぶ固相の種類を絞り込むことができます。

### I . 目的物質の基本骨格構造

アルキル鎖を含むか、芳香族か、酸素、窒素、硫黄、リンなどを含むか確認します。

### II . 極性基の有無

分子全体に広がって存在しているか、または一箇所に局在しているか確かめます。

### III . イオン化する官能基の有無

ある場合には、その pKa の値はどれぐらいか調べます。

### IV . イオン化する官能基の特徴

陽イオン、陰イオン、両性イオンのうちどれかを確認します。

### V . 目的物質の溶媒に対する溶解度

どの溶媒に溶けて、どの溶媒には溶けない(溶けにくい)か調べます。logPow も指標になります。

### VI . 溶媒が目的物質に与える影響

溶媒が目的物質の酸化・還元・分解などを引き起こす可能性を検討します。

### VII . pH による目的物質の安定性

不安定になる場合には、その pH の溶媒を避けます。

### VIII . 目的物質の材質に対する吸着

ポリプロピレンやポリエチレンなどに吸着するか確認します。吸着する場合は防止策を検討します。

### IX . 目的物質のクロマトグラム

クロマトグラムが指標になることがあります。GC、LC、TLC の情報は非常に有用です。

## 2-3. マトリックスを知る

マトリックスを把握することは、目的物質を把握することと同じぐらい重要です。これも、固相抽出の手法や固相の種類、および事前に行うべき前処理を決定する要因になります。

### I . マトリックスの状態

固体、液体、気体のどれに存在するかを確認します。

### II . 溶媒の種類

水、緩衝液、高極性溶媒、低極性溶媒のどれに溶けているかを確認します。

### III . 固相抽出法の前に行われる処理

液液抽出やろ過、希釈などが必要かどうかを確認します。

### IV . マトリックス中における脂質・塩・タンパク質・多糖類の有無

これらが大量に含まれているかを確認します。どれを取り除くか、また、事前に取り除けるか検討します。

### V . マトリックスに含まれる夾雑物質の性質

目的物質と化学構造が似ているかを確認します。極性が非常に近いのか、目的物質とはどこが違うかを調べます。

# 3

## 固相を選ぶ

### 3-1. 目的物質から固相を選ぶ

『2-2. 目的物質を知る』の中にある質問I～IVにより、目的物質を保持させる相互作用の形が見えてきます。例えば、目的物質が炭素と水素のみで構成されている場合には、疎水性相互作用（逆相系）の固相抽出（C18、C8、PH、ポリマー系など）を選ぶことができます。極性基を有している場合には、極性相互作用（順相系）の固相抽出（SI、FL、20H など）で保持される可能性があります。また、イオン化する官能基がある場合には、イオン交換系の固相抽出カラム（SAX、SCX、PSA、CBA、ポリマー系のイオン交換など）で保持することができます。

質問VIから、固相抽出法で使用する溶媒が決まります。目的物質が溶けない（溶けにくい）溶媒を使用することにより、目的物質を固相に保持させたまま夾雑物を排除することができます。また、目的物質が溶ける溶媒は、溶出溶媒として使用することができます。ここでの注意点は、目的物質の極性が非常に高く、溶解可能な溶媒が水系のみ（メタノールなどには溶けない）の場合、疎水性相互作用（逆相系）では保持されません。このような場合には、マトリックスの状態にも依存しますが、イオン交換系を適用するか、もしくは通過型の手法で逆相系を適用します。逆に、目的物質の極性が極端に低く、ヘキサンのような無極性溶媒にしか溶けない場合には、通過型の手法で順相系を適用します。

質問VI～VIIIより、適用可能な固相抽出法が限定されます。これらの質問に該当する場合、目的物質の回収率が低下するため、その溶媒や素材の使用を避けます。避けられない場合には、誘導体化や添加材の使用により、目的物質の回収率低下を防ぎます。

質問IXは、固相抽出法を確立する手助けになります。GC、HPLC、TLCなどのクロマトグラムや、その時に使用した固定相と移動相、リテンションタイムや  $R_f$  値、分離度などから固相抽出を行った場合の挙動を推測することができます。

以上を考慮したうえで、次の4つを決定します。

#### 1. 適用する相互作用

逆相系（C18、ポリマー系など）、順相系（SI、FL など）、イオン交換系（SAX、SCX など）から選択します。

#### 2. 洗浄溶媒

夾雑物を排除することができる、目的物質が溶けない（溶けにくい）溶媒を使用します。

#### 3. 溶出溶媒

目的物質が溶ける溶媒を使用します。

#### 4. 起こりうる問題とその回避法

事前にもろ過や脱塩などの処理を行うか、または手法を限定するか検討します。

### 3-2. マトリックスから手法を考える

『2-3. マトリックスを知る』の質問IとIIにより、固相抽出の前に行う処理が決定されます。マトリックスが気体の場合、適切な濃度の溶液にすること以外は何も処理する必要はないでしょう。液体や固体の場合は、適切な処理を行う必要があります。

1. 無極性物質を保持するためには、試料をできるだけ高極性溶媒に溶かします。
2. 極性物質を保持するためには、試料をできるだけ低極性溶媒に溶かします。
3. イオン交換の場合には、試料溶媒のイオン強度をできるだけ低くし、適切な pH に保ちます。

試料の濃度が高い場合、マトリックスが目的物質の抽出を妨害する可能性があります。特に注意する物質として次のようなものがあります。

### 1. 逆相系における脂質

固相の広い範囲に吸着し、目的物質の保持容量を減少させます。

- 目的物質の極性が高い時は、低極性溶媒で脂質を除去します（液液抽出）。
- 目的物質の極性が高い時は、順相系で脂質を洗い流してから目的物質を回収します。
- 目的物質の極性が低い時は、脂質を固相に保持させ、目的物質を通過させます。

### 2. イオン交換系における塩類

目的物質の固相への保持を妨害します。

- 事前に逆相系が順相系の固相を用いて、塩類を取り除きます。
- 希釈して、固相の量を多くします。

### 3. 順相系における炭化水素および多糖類

目的物質の固相への保持を妨げます。

- 有機溶媒でゴム状にし、ろ過で取り除きます。

### 4. 界面活性剤

目的物質の固相への保持を妨害します。

- イオン交換系でイオン性界面活性剤を保持し、非イオン性目的物質を通過させます。
- Diol の固相に非イオン性界面活性剤を保持し、イオン性目的物質を通過させます。

### 5. タンパク質

目的物質の固相への保持を妨げます。

- 逆相系において、洗浄をしっかり行います。
- 事前に有機溶媒でタンパク質を沈殿させ、ろ過や遠心分離で除タンパクを行います。
- サイズ排除の機能を持つ固相を使用します。

## 4

## 固相を試す

使用する固相が決定したら、以下の4ステップで固相が適しているかを試験します。

- I. 標準物質を用いて固相へ保持されるかどうかを確認する
- II. 標準物質を用いて洗浄と溶出の条件を決定する
- III. ブランクマトリックスを用いて試験する
- IV. マトリックスに標準物質を添加して試験する

選んだ固相が適しているかどうかを評価するには、固相抽出を行う間に溶出する画分に目的物質やマトリックス成分があるかないかをチェックする必要があります。

### I. 標準物質を用いて固相へ保持されるかどうかを確認する

使用する溶液は、実試料と同じであることが必要です。例えば、実試料がヘキサン抽出で得られるものであれば、ここで使用する溶媒はヘキサンにします。また、pHが4.5の緩衝液で希釈した実試料を使用するのであれば、同じ緩衝液、同じpH、同じ濃度で試験します。

固相カラムのコンディショニングを行い、標準溶液を固相カラムに通した後、流出液を回収します。続いて洗浄を行い、この時に流出した溶液も回収します。

- ①回収した溶液に目的物質が含まれていなければ、目的物質は十分に保持されています。
- ②回収した溶液に目的物質が含まれていれば、目的物質は保持されていないこととなります。

通過型の手法を適用するのであれば、①は悪い結果、②は良い結果になります。保持の手法を適用するのであれば、①は良い結果、②は悪い結果になります。



悪い結果の場合には、固相の種類を変えて再び試験します。

## II. 標準物質を用いて洗浄と溶出の条件を決定する

固相抽出法の操作手順としては洗浄→溶出の順に行いますが、これらに使用する溶媒を決定する際には、溶出溶媒を決めてから洗浄溶媒を決めるほうが簡単です。

溶出溶媒の決定は非常に簡単です。目的物質を良く溶解する溶媒を、目的物質を保持している固相に流し、その流出液を回収します。回収率が 90 % 以上であれば、溶出溶媒として十分使用できます。このとき、できる限り最小の量で溶出できる溶媒が好ましいです。

洗浄溶媒は、目的物質を溶出しない溶媒で、溶出溶媒よりも溶出力の弱い組成の溶媒になります。例えば逆相系であって、溶出溶媒が 100 % メタノールのときは、水とメタノールの混合液となるでしょう。候補に挙げた溶媒を、目的物質を保持している固相に流し、その流出液を回収します。マトリックス成分が含まれていて、目的物質が含まれていない場合には、良好な洗浄溶媒といえるでしょう。共に含まれている場合には、さらに溶出力の弱い溶媒に変更して再度試験を行います。共に含まれていない場合には、さらに溶出力の強い溶媒に変更して再度試験を行います。

(通過型の手法を適用する場合には、洗浄溶媒を使用しないので、溶出溶媒の検討は不要です。)

## III. ブランクマトリックスを用いて試験する

固相、洗浄溶媒、溶出溶媒が決定したら、ブランクマトリックスを用いて試験します。コンディショニングした固相カラムにブランクマトリックスを通し、洗浄溶媒で洗浄した後、溶出溶媒を流します。各段階で得られた流出液を回収し、どの画分にどの程度マトリックス成分が含まれているかを確認します。

通過型の手法を適用する場合には、どの画分にもマトリックス成分が含まれていないことが理想です。これが極端に満たされない場合には、使用する試料溶媒を、目的物質は溶解するが溶出力のさらに弱い溶媒に変更します。

保持型の手法を適用する場合には、溶出溶媒で得られた画分にマトリックス成分が含まれていないことが理想です。これが極端に満たされない場合には、使用する洗浄溶媒を目的物質は溶解しないが溶出力のさらに強い溶媒に変更するか、または使用する溶出溶媒を目的物質は溶解するが溶出力のさらに弱い溶媒に変更します。

## IV. マトリックスに標準物質を添加して試験する

I～IIIの試験で十分満足のできる結果が得られたら、マトリックスに標準物質を添加して試験します。大抵の場合、目的物質の回収率はIIの溶出溶媒の決定で得られた回収率と同じになります。著しく異なる場合には、目的物質とマトリックスの相互作用や固相とマトリックスの相互作用が大きく関与していると考えられます。(これに関する解決策は次で説明します。)

固相抽出による目的物質の回収がおもわしくない場合、主に考えられる原因は以下の4つです。

- I . 目的物質の固相への保持が不十分
- II . 目的物質の溶出が不十分
- III . マトリックス成分（夾雑物）の除去が不十分
- IV . 目的物質 / マトリックス相互作用や固相 / マトリックス相互作用の関与

ここでは、それぞれの原因に対する対処法を示します。

#### I . 目的物質の固相への保持が不十分

##### (i) 逆相系（固相が C18、C8、PH、ポリマー系など）の場合

試料溶媒をできる限り高極性にします。水や緩衝液が理想ですが、目的物質が溶解しない場合には、有機溶媒の組成比をできる限り低くします。目的物質がイオン化している場合には、イオン化を抑制する pH に調整するか、イオン交換系を適用するほうが良いでしょう。

##### (ii) 順相系（固相が SI、FL、20H など）の場合

試料溶媒をできる限り低極性にします（ヘキサンなど）。元の試料が非常に極性が高い時は、逆相系かイオン交換系を適用するほうが良いでしょう。

##### (iii) イオン交換系（固相が SAX、SCX、PSA、CBA、ポリマー系のイオン交換など）の場合

この場合には、試料溶媒が目的物質と固相の官能基がイオン化する pH であること、塩濃度が低いこと（0.01 M 以下）、固相上の対イオンをコンディショニングの時に選択性の低いものに変えること、が必要です。それでも十分に保持されない場合には、逆相系か順相系を適用するほうが良いでしょう。マトリックスの状況にもよりますが、夾雑物のほうが固相の官能基に強く保持され、目的物質が保持されないことがあります。その場合には、通過型的手法を適用するほうが良いでしょう。

#### II . 目的物質の溶出が不十分な場合

この場合には、適切な溶出溶媒を選択することで解決できます。逆相系や順相系の場合には、溶出力の強い溶媒を選択します。イオン交換系の場合、目的物質が強イオン性の時は弱イオン性の固相（DEA、NH<sub>2</sub>、CBA など）を使用したり、固相の官能基や目的物質がイオン化しない pH の溶媒を使用したり、溶出溶媒の塩濃度を高くしたりすることで解決できます。

その他によく起こる現象として、二次的な相互作用が起こっている場合があります。これは、固相と目的物質の双方が2つの相互作用を同時に起こす場合です（右図）。この場合には、両方の相互作用を同時に分断することができる溶媒を選択する必要があります。一般的に採用される方法としては、有機溶媒中に少量の酸や塩基を加えた溶液を溶出溶媒として使用することです。それでも固相から目的物質から溶出しない場合には、他の固相を適用するほうが良いでしょう。



#### III . マトリックス成分（夾雑物）の除去が不十分な場合

これは、試料中の目的物質に比べて夾雑物があまりにも多く存在している時によく起こります。この場合、洗浄溶媒を変更するか、固相の種類を変更するか、選択性の高い検出器を有する分析機器を使用するほうが良いでしょう。

IV. 目的物質 / マトリックス相互作用や固相 / マトリックス相互作用が関与している場合  
 これらの相互作用は、目的物質と固相との相互作用に影響を及ぼします。マトリックスや夾雑物が、目的物質と同じ性質を持つ場合には、次の3つの処理を行います。

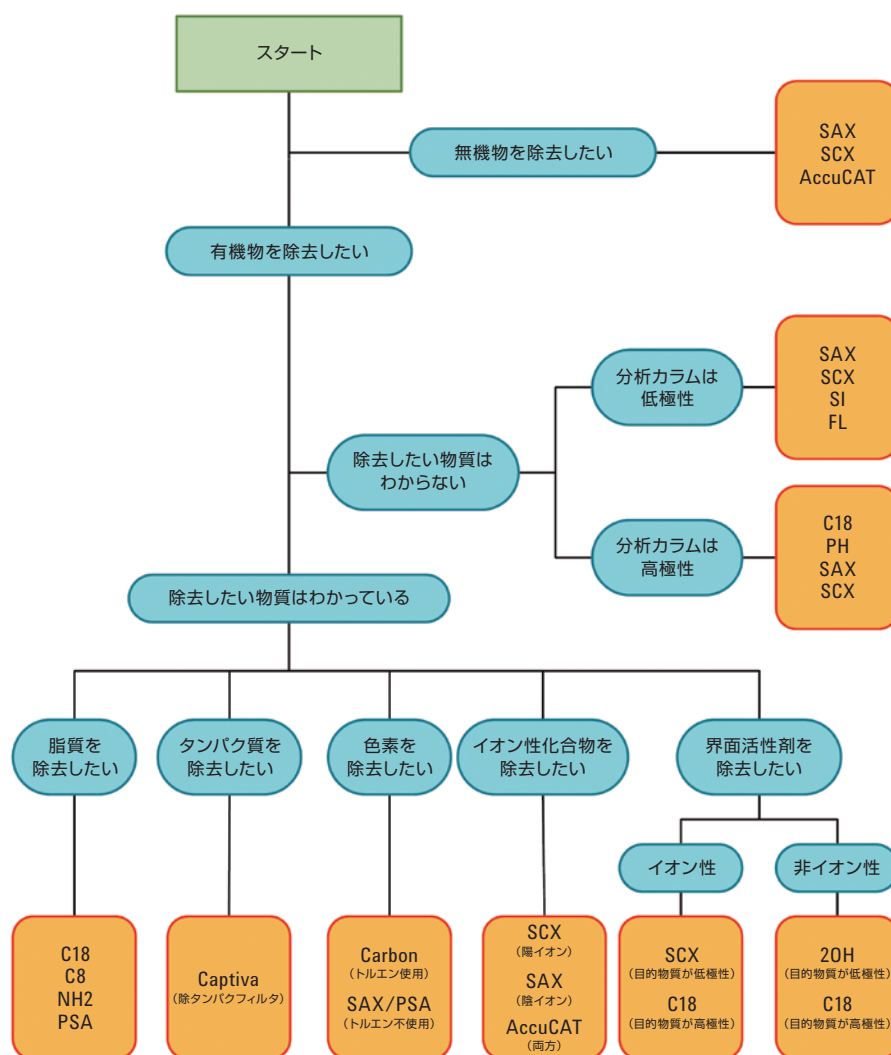
- ・目的物質と夾雑物の双方を保持できるような大きめの固相を使用する
- ・目的物質に対してさらに選択性の高い固相を選ぶ
- ・試料を固相に流す前に夾雑物を排除する

単一の固相を使用する方法で、目的物質の抽出や精製が十分に行えない場合に、複数の固相を使用する方法もあります。

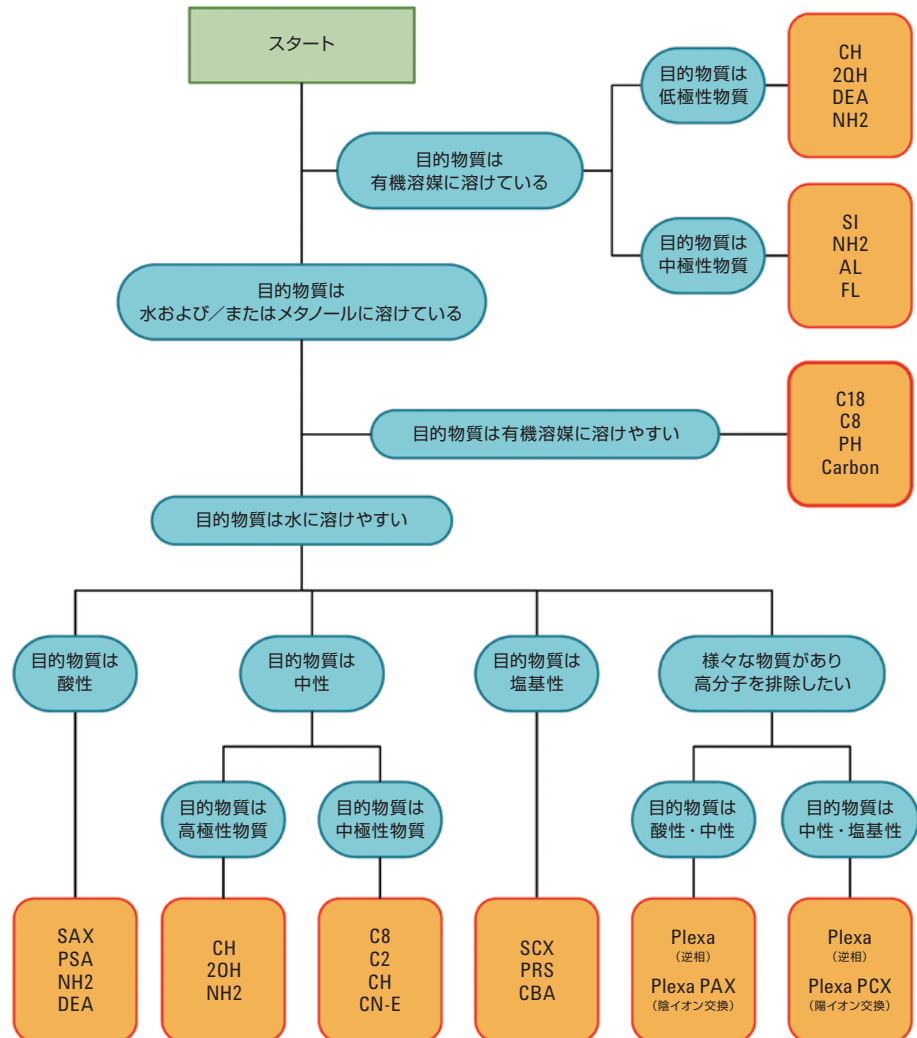
## 6

### まとめ①

ここでは、夾雑物を保持させ、通過型の手法を用いた場合の、固相を選ぶ目安を示します。



ここでは、保持型の手法を用いた場合の、固相を選ぶ目安を示します。



#### 詳細情報:

アジレントの固相抽出製品および消耗品の全製品に関する最新情報は、ホームページをご覧ください。カスタムコンタクトセンターまでお問い合わせください。

- ・ホームページ: [www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)
- ・カスタムコンタクトセンター: 0120-477-111

本文記載の情報は予告なく変更されることがあります。著作権法で許可されている場合を除き、書面による事前の許可なく、本資料を複製、翻案、翻訳することは禁じられています。

#### アジレント・テクノロジー株式会社

本社 〒192-8510 東京都八王子市高倉町9-1  
 カスタムコンタクトセンター ☎0120-477-111  
 email\_japan@agilent.com  
 www.agilent.com/chem/jp

©アジレント・テクノロジー 2015  
 Printed in Japan, January 30, 2015  
 5991-5543JAJP

