

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月22日現在

機関番号：	37111
研究種目：	基盤研究（C）
研究期間：	2009～2011
課題番号：	21590053
研究課題名（和文）	分離指向性誘導体化HPLC法の確立と生体試料分析への適用に関する研究
研究課題名（英文）	Development of New Liquid Chromatography with Separation-oriented Derivatization of Biological Compounds and Its Application to Biomedical Analysis
研究代表者	山口 政俊（YAMAGUCHI MASATOSHI） 福岡大学 ・ 薬学部 ・ 教授 研究者番号： 50117280

## 研究成果の概要（和文）：

本研究では、生体成分の計測に極めて有効で、実用性の高い「分離指向性」の誘導体化分析法を確立し、分析化学領域に新しい分析手法を提供することを目指した。特に、パーフルオロアルキル化合物同士が持つ特異的な親和性（フルオラス）に注目し、測定対象物と夾雑成分との完全分離を達成する「フルオラス誘導体化法」を開発した。本法を用いることで、実試料中の夾雑成分による妨害を回避でき、簡便な実試料測定が可能となった。

## 研究成果の概要（英文）：

Liquid chromatography (LC) with separation-oriented derivatization of biological compounds has been developed as a new and simple analysis methodology. Experimental results indicate that the fluorous-phase LC column can selectively retain fluorous compounds including fluorous-labeled analytes on the basis of fluorous-fluorous interaction. We believe that separation-oriented derivatization presented here is the first step toward the introduction of fluorous derivatization in quantitative LC analysis.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野： 分析化学

科研費の分科・細目： 薬学 ・ 物理系薬学

キーワード： 分析化学 ・ クロマトグラフィー ・ 誘導体化分析 ・ 生体計測 ・ フルオラス化学 ・ 分離分析 ・ 蛍光分析 ・ 質量分析

## 1. 研究開始当初の背景

生理活性物質や医薬品、環境負荷化学物質等の分離分析手法の一つに、測定対象物質を計測に都合の良い化学構造に導く「誘導体化」と高い分離能と簡便な操作性を備えた「LC」とを組み合わせた「誘導体化 LC 法」が広く普及している。しかし、それらのほとんどは蛍光（あるいは発光）誘導体化に代表されるように、測定対象物質に検出部位を導入することで検出器に対する応答性を高めて、「検出」における高感度化を目的としたものである。その一方で、「分離」に重きをおいた LC 誘導体化分析法はほとんど報告されていない。このような背景から、各種実試料を対象とした分析化学領域に有効な新しい方法論を提供すべく、最高の分離パフォーマンスを示す「分離指向性」の誘導体化分析法の確立を目指した。

## 2. 研究の目的

一般に、実試料（生体や環境、食品等に由来する試料）中には、測定対象物以外に多種多量の類似化合物が共存しているため、LC 分析において、それら夾雑成分による検出の妨害を受けることが実試料計測における問題点とされる。そのため、これら除去するための煩雑な前処理操作が必要となり、分析の長時間化、コストパフォーマンス及び簡便性の低下を招く結果となる。このような現状を鑑み、私は、パーフルオロアルキル化合物同士が示す特異的な親和性（フルオラス）に注目し、測定対象物と夾雑成分との分離を目的とする「フルオラス誘導体化法」の開発を行った。

本法は、測定対象物にパーフルオロアルキル化合物を導入（フルオラス誘導体化）し、同じくパーフルオロアルキル構造の充填剤を含む LC カラム（フルオラス LC カラム）を通すことで、フルオラス誘導体化された測定対象物質のみを特異的にカラム中に保持させ、それぞれの保持時間後に溶出されたところを分析対象物が持つ物理的性質（自然蛍光・UV 吸収、質量 (MS) など）を検出する分析法である（図 1）。本法を用いることで、実試料中の夾雑成分による妨害を受けないため、煩雑な前処理操作を必要とせず、簡便に実試料測定が可能となる。

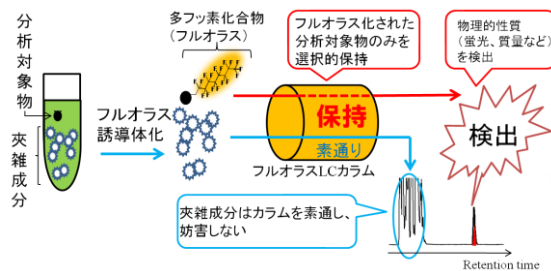


図 1 フルオラス誘導体化法の原理

## 3. 研究の方法

これまでに、フルオラス誘導体化する対象官能基としてカルボキシル基、アミノ基及び 5-ヒドロキシインドール構造について、検出法として蛍光検出及び質量分析へと応用した。その結果として、次項以降に示すように、本法の有用性を実証することができた。

## 4. 研究成果

(1) まず初めに、自然蛍光性を持つカルボン酸である医薬品の NSAIDs や、カテコールアミン及びインドールアミンの代謝物をモデル化合物として用い、生体試料測定へと応用した。有機溶媒除タンパクによる簡便な前処理及び市販の縮合剤を用いる誘導体化のみで、生体試料中の夾雑成分による妨害を受けることなく、測定対象物を高感度・高選択的に分析することができた。さらに、経口投与及び腰に貼付した NSAIDs の血中濃度測定や、尿中のカテコールアミン関連化合物計測を可能とした。

(2) 次に本法を、ヒト尿中に含まれる自然蛍光性アミンの分析へと応用した。モデル化合物としてカテコールアミン、インドールアミン及びそれらの関連化合物を選択し、健康人尿試料の分析を行った。こちらも(1)と同じように、簡便な前処理及び誘導体化のみで、尿中の夾雑成分に妨害されることなく、生理活性アミン類を高選択的に分析することができた。

(3) フルオラス誘導体化法を LC-MS/MS 分析へと応用し、無蛍光性かつ高極性化合物であるシアル酸関連化合物の分析を行った（図 2）。フルオラス誘導体化と LC-MS/MS を組み合わせることで、①フルオラス LC カラムによる保持・分離の改善。②適度な疎水性の導入のため、高有機溶媒移動相条件下における保持によるイオン化効率の向上。③超選択的に夾雑物質との分離が可能であり、LC-MS/MS 分析で問題となる試料夾雑物質によるイオン化干渉（いわゆるマトリックス効果）を抑制。などの効果が期待でき、フルオラスの高い選択性に加え、高感度化も達成とした。生体試料（乳汁及び尿）に適用したところ、簡便な前処理及び誘導体化のみでシアル酸類の高感度かつ高選択的な分析が可能となった。

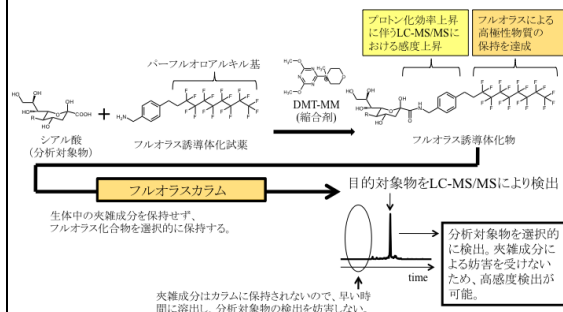


図 2 フルオラス誘導体化 LC-MS/MS 法の原理

(4) フルオラス誘導体化と発蛍光誘導体化を組み合わせることで、更なる高感度かつ高選択的な分析を可能とするフルオラス発蛍光誘導体化法の開発を行った(図3)。測定対象物を5-ヒドロキシインドール類とし、ヒト血漿試料に適用したところ、簡便な前処理及び誘導体化のみで高感度かつ高選択的な分析が可能となった。

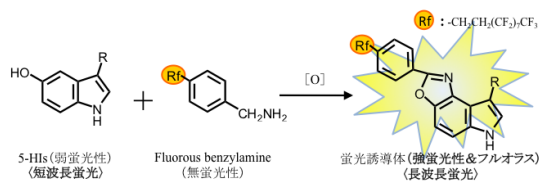


図3 5-ヒドロキシインドール類に対する発蛍光型フルオラス誘導体化

(5) 感度不足及び測定対象物相互の分離不足を解消するため、フルオラスの特異的保持力を利用し、フルオラス LC カラムを濃縮カラムとするカラムスイッチング LC システムの構築を行った(図4)。その結果、一般の ODS カラムと組み合わせることで、生体試料分析においても、感度の向上及び測定対象物相互の分離を改善することができた。

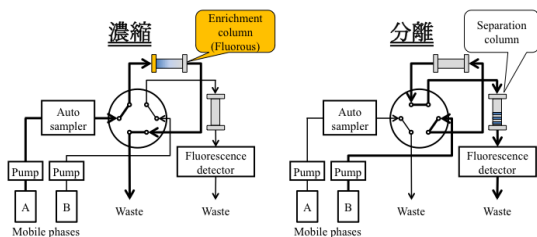


図4 フルオラス誘導体化-オンライン濃縮システム

(6) 移動相にフルオラスの性質を持つイオン対試薬を添加し、測定対象物とイオン対を形成させることでフルオラス LC カラムへの選択的保持を可能とする LC-MS/MS 分析法を考案した。メチル化アルギニンを測定対象としたとき、誘導体化を行わずとも測定対象物をフルオラス分離することができ、試料中夾雑成分との分離を容易に達成した。

今回、簡便な前処理及び誘導体化操作のみで、実試料中の夾雑成分による妨害を受けることなく測定対象物の分析を可能とすることを目的とし、分離指向性誘導体化法の研究を行った。また、この概念を様々な物質の計測に適用することで、本法の有用性を実証した。本分離指向性誘導体化法は、夾雑成分との分離だけでなく、高感度化やオンライン濃縮を可能とし、更なる可能性を模索することができた。今後、適用範囲の拡大及び付加価値化を進め、更なる有用性の向上に努める。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 20 件)

- (1) Y. Sakaguchi, H. Yoshida, T. Hayama, M. Itoyama, K. Todoroki, M. Yamaguchi, H. Nohta; Selective Liquid-Chromatographic Determination of Native Fluorescent Biogenic Amines in Human Urine Based on Fluorous Derivatization; *Journal of Chromatography A* (査読有), **1218** (2011) 5581-5586.
- (2) Y. Sakaguchi, H. Yoshida, T. Hayama, M. Yoshitake, M. Itoyama, K. Todoroki, M. Yamaguchi, H. Nohta; Fluorous Derivatization and Fluorous-phase Separation for Fluorometric Determination of Naproxen and Felbinac in Human Plasma; *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (査読有), **55** (2011) 176-180.
- (3) T. Hayama, Y. Sakaguchi, H. Yoshida, M. Itoyama, K. Todoroki, M. Yamaguchi, H. Nohta; Fluorous Derivatization Combined with LC-MS/MS: A Method for the Selective and Sensitive Determination of Sialic Acids in Biological Samples; *Rapid Communication in Mass Spectrometry* (査読有), **24** (2010) 2868-2874.
- (4) K. Todoroki, H. Hashimoto, T. Mikawa, M. Itoyama, T. Hayama, E. Kojima, H. Yoshida, H. Nohta, M. Yamaguchi; Reagent Peak-free Liquid Chromatography-Fluorescence Analysis of Carboxylic Acids Using Fluorous Scavenging-Derivatization Method; *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (査読有), **397** (2010) 2409-2416.
- (5) Y. Sakaguchi, H. Yoshida, K. Todoroki, H. Nohta, M. Yamaguchi; Separation-oriented Derivatization of Native Fluorescent Compounds through Fluorous Labeling Followed by LC with Fluorous-phase; *Analytical Chemistry* (査読有), **81** (2009) 5039-5045.
- (6) T. Inoue, M. Sudo, H. Yoshida, K. Todoroki, H. Nohta, M. Yamaguchi; Liquid Chromatographic Determination of Polythiols Based on Pre-column Excimer Fluorescence Derivatization and Its Application to  $\alpha$ -Lipoic Acid Analysis; *Journal of Chromatography A* (査読有), **1216** (2009) 7564-7569.
- (7) H. Yoshida, M. Sudo, K. Todoroki, H.

Nohta, M. Yamaguchi; Highly Selective and Simple Method for Determination of Polythiols Based on Liquid Chromatography with Post-column Excimer Fluorescence Derivatization; *Analytical Sciences* (査読有), **25** (2009) 829-832.

[学会発表] (計 83 件)

- (1) 坂口洋平, 巴山忠, 吉田秀幸, 糸山美紀, 能田均, 山口政俊; イオンペーフルオラス分離技術によるメチル化アルギニンの LC-MS/MS 分析; 第 22 回クロマトグラフィー科学会議 (2011 年 10 月 21 日), 東北大学 (仙台市)
- (2) 後藤しおり, 巴山忠, 糸山美紀, 吉田秀幸, 能田均, 山口政俊; フルオラス及び蛍光誘導体化を利用したポリアミン類の選択的 LC 分析; 第 4 回フルオラス科学研究会シンポジウム (2011 年 10 月 7 日), 大阪府立大学 (堺市)
- (3) 池永純, 吉田秀幸, 坂口洋平, 糸山美紀, 巴山忠, 能田均, 山口政俊; フルオラス蛍光誘導体化による 5-ヒドロキシインドール類の高選択的分析; 第 4 回フルオラス科学研究会シンポジウム (2011 年 10 月 7 日), 大阪府立大学 (堺市)
- (4) 坂口洋平, 巴山忠, 吉田秀幸, 糸山美紀, 能田均, 山口政俊; フルオラス誘導体化-LC-MS/MS 法によるシアリルオリゴ糖の高感度かつ高選択的分析; 第 4 回フルオラス科学研究会シンポジウム (2011 年 10 月 7 日), 大阪府立大学 (堺市)
- (5) 轟木堅一郎, 橋本裕輝, 森俊訓, 町田和之, 糸山美紀, 巴山忠, 吉田秀幸, 能田均, 中島学, 山口政俊; Fluorous Scavenging Derivatization 法による高極性有機酸の高感度 HPLC 分析法の開発と病態モデルマウス尿試料分析への適用; 第 9 回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム (2011 年 9 月 12 日), ホテル箱根アカデミー (足柄下郡箱根町)
- (6) 坂口洋平, 巴山忠, 吉田秀幸, 糸山美紀, 轟木堅一郎, 能田均, 山口政俊; フルオラス誘導体化-LC-MS/MS 法によるシアル酸関連化合物の高感度かつ高選択的分析 (4) 糖鎖性腫瘍マーカーへの適用; 第 48 回化学関連支部合同九州大会 (2011 年 7 月 9 日), 北九州国際会議場 (北九州市)
- (7) 山下大貴, 坂口洋平, 池永純, 吉田

秀幸, 糸山美紀, 巴山忠, 轟木堅一郎, 能田均, 山口政俊; フルオラス誘導体化-オンライン濃縮-蛍光検出法による自然蛍光性カルボン酸の高選択的 LC 分析; 第 48 回化学関連支部合同九州大会 (2011 年 7 月 9 日), 北九州国際会議場 (北九州市)

- (8) 川見祐介, 坂口洋平, 吉田秀幸, 巴山忠, 糸山美紀, 轟木堅一郎, 能田均, 山口政俊; ペンタフルオロフェニル構造を用いる分離指向性誘導体化法の開発; 第 18 回クロマトグラフィーシンポジウム (2011 年 6 月 4 日), 福岡大学 (福岡市)
- (9) 轟木堅一郎; 分析化学トピックス 3 点盛り『招待講演』; 第 24 回九州分析化学若手の会春の講演会 (2011 年 5 月 28 日), 九州大学 (福岡市)
- (10) Y. Sakaguchi, T. Hayama, H. Yoshida, M. Itoyama, K. Todoroki, H. Nohta, M. Yamaguchi; Analysis of Sialo-Sugar Chains Using Fluorous Derivatization Followed by Tandem Mass Spectrometry; *IUPAC International Congress on Analytical Sciences 2011* (2011 年 5 月 23 日), Kyoto International Conference Center (Kyoto)
- (11) T. Hayama, R. Abe, R. Kuroki, M. Itoyama, K. Todoroki, H. Yoshida, H. Nohta, M. Yamaguchi; Fluorous Derivatization Combined with LC-MS/MS: Matrix Effect-Free Method for the determination of Biogenic Amines; *IUPAC International Congress on Analytical Sciences 2011* (2011 年 5 月 23 日), Kyoto International Conference Center (Kyoto)
- (12) 池永純, 山下大貴, 坂口洋平, 吉田秀幸, 糸山美紀, 巴山忠, 轟木堅一郎, 能田均, 山口政俊; フルオラス蛍光誘導体化法による 5-ヒドロキシインドール類の LC 分析; 第 27 回日本薬学会九州支部大会 (2010 年 12 月 11 日), 長崎大学 (長崎市)
- (13) 池永純, 山下大貴, 坂口洋平, 吉田秀幸, 糸山美紀, 巴山忠, 轟木堅一郎, 能田均, 山口政俊; フルオラス誘導体化-オンライン濃縮-蛍光検出法による 5-ヒドロキシインドール類の高選択的 LC 分析; 第 21 回クロマトグラフィー科学会議 (2010 年 10 月 22 日), 武庫川女子大学 (西宮市)
- (14) 坂口洋平, 巴山忠, 吉田秀幸, 糸

- 山美紀, 轟木堅一郎, 能田均, 山口政俊; フルオラス誘導体化-LC-MS/MS 法によるシアル酸関連化合物の高感度かつ高選択的分析(3) オリゴシアル酸分析への適用; 第 21 回クロマトグラフィー科学会議 (2010 年 10 月 22 日), 武庫川女子大学 (西宮市)
- (15) 坂口洋平, 巴山忠, 吉田秀幸, 糸山美紀, 轟木堅一郎, 能田均, 山口政俊; フルオラス誘導体化法によるシアロ糖鎖の LC-MS/MS 解析; 日本分析化学会第 59 年会 (2010 年 9 月 15 日), 東北大学 (仙台市)
- (16) 巴山忠, 阿部諒子, 黒木理可, 糸山美紀, 轟木堅一郎, 吉田秀幸, 能田均, 山口政俊; 生体内アミンを対象とした新規オミクス解析ツールの開発: フルオラス及び同位体標識化アミンの LC-MS/MS 分析; 第 23 回バイオメディカル分析科学シンポジウム (2010 年 7 月 22 日), ホテル松島大観荘 (宮城郡松島町)
- (17) K. Todoroki, H. Hashimoto, T. Mikawa, M. Itoyama, T. Hayama, H. Yoshida, H. Nohta, M. Yamaguchi; Reagent Peak-free Liquid Chromatography-Fluorescence Analysis of Carboxylic Acids Using Fluorous Scavenging Derivatization Method; *The 35th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques* (2010 年 6 月 22 日), The Hynes Convention Center & Sheraton Boston Hotel (Boston, MA, USA)
- (18) 池永純, 坂口洋平, 吉田秀幸, 糸山美紀, 巴山忠, 轟木堅一郎, 能田均, 山口政俊; フルオラス誘導体化-HPLC-蛍光検出法による 5-ヒドロキシインドール類の高選択的定量; 第 17 回クロマトグラフィーシンポジウム (2010 年 6 月 4 日), 広島県情報プラザ (広島市)
- (19) 吉田秀幸; 蛍光分子間相互作用を利用する生体成分の高選択的分析『招待講演』; 第 23 回九州分析化学若手の会春の講演会 (2010 年 5 月 22 日), 福岡女子大学 (福岡市)
- (20) 坂口洋平, 巴山忠, 吉田秀幸, 糸山美紀, 轟木堅一郎, 能田均, 山口政俊; フルオラス誘導体化-LC-MS/MS 法によるシアル酸関連化合物の高感度かつ高選択的分析; 日本薬学会第 130 年会 (2010 年 3 月 28 日), 桃太郎アリーナ (岡山市)
- (21) 巴山忠, 糸山美紀, 轟木堅一郎, 吉田秀幸, 能田均, 山口政俊; フルオラス及び同位体標識化を利用した生体内アミン類の超選択的 LC-MS/MS 分析法の開発; フィジカルファーマフォーラム 2010 (2010 年 3 月 28 日), 岡山大学 (岡山市)
- (22) 坂口洋平, 吉田秀幸, 巴山忠, 糸山美紀, 轟木堅一郎, 能田均, 山口政俊; フルオラス化学を基盤とする分離指向性誘導体化 LC 法の開発; 第 26 回日本薬学会九州支部大会 (2009 年 12 月 12 日), 九州大学 (福岡市)
- (23) 轟木堅一郎; フルオラス分離技術を利用する微量生体成分の高感度・高選択的 HPLC 分析法の開発『招待講演』; 第 2 回フルオラス科学研究会シンポジウム (2009 年 11 月 27 日), IT ビジネスプラザ武蔵 (金沢市)
- (24) 坂口洋平, 巴山忠, 吉田秀幸, 糸山美紀, 轟木堅一郎, 能田均, 山口政俊; フルオラス誘導体化-LC-MS/MS 法によるシアル酸の高感度かつ高選択的分析; 第 20 回クロマトグラフィー科学会議 (2009 年 11 月 24 日), ヤクルトホール (東京都港区)
- (25) 坂口洋平, 吉田秀幸, 轟木堅一郎, 能田均, 山口政俊; フルオラス誘導体化による自然蛍光性カルボン酸の高選択的分析(3) 尿中腫瘍マーカー計測への適用; 第 46 回化学関連支部合同九州大会 (2009 年 7 月 11 日), 北九州国際会議場 (北九州市)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称: フルオラス化シアル酸誘導体およびその分析方法  
 発明者: 巴山忠, 山口政俊, 能田均, 吉田秀幸, 轟木堅一郎, 糸山美紀, 坂口洋平  
 権利者: 学校法人 福岡大学  
 種類: 特許  
 番号: 特開 2011-107033  
 出願年月日: 2009 年 11 月 19 日  
 取得年月日: 出願中  
 国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pha.fukuoka-u.ac.jp/user/bunseki/web/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山口 政俊 (YAMAGUCHI MASATOSHI)  
福岡大学 ・ 薬学部 ・ 教授  
研究者番号： 5 0 1 1 7 2 8 0

### (2) 研究分担者

吉田 秀幸 (YOSHIDA HIDEYUKI)  
福岡大学 ・ 薬学部 ・ 准教授  
研究者番号： 2 0 3 0 1 6 9 0

轟木 堅一郎 (TODOROKI KENICHIRO)  
静岡県立大学 ・ 薬学部 ・ 准教授  
研究者番号： 7 0 3 4 1 4 5 1

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

坂口 洋平 (SAKAGUCHI YOHEI)  
福岡大学 ・ 大学院薬学研究科 ・  
博士課程（後期）  
『日本学術振興会特別研究員 DC』

池永 純 (IKENAGA JUN)  
福岡大学 ・ 大学院薬学研究科 ・  
博士課程（前期）