

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 1 日現在

機関番号：33910

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24612003

研究課題名(和文) 化学アフィニティーを利用した分子構造認識型固相抽出剤の開発と残留農薬分析への応用

研究課題名(英文) Development of adsorbents which recognized molecular structure based on chemical affinity and its application to pesticide residue analysis

研究代表者

山本 敦 (Yamamoto, Atsushi)

中部大学・応用生物学部・教授

研究者番号：60360806

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：吸着剤として用いられる相互作用は、強い相互作用だけではなく、弱い相互作用も十分機能することを明らかにした。距離依存性の小さな強い相互作用が、溶質を官能基まで引き付け、距離依存性の大きな弱い相互作用で溶質と官能基間の距離が最短となることで、捕捉に必要な十分のポテンシャルエネルギーが得られる。一旦、弱い相互作用で捕捉されてしまえば、溶質の脱着は容易ではなくなる。この性質を利用し、吸着剤表面に捕捉された溶質を脱着することなく、固相蛍光法で定量する「オンレジン測定法」を開発した。この方法による蜂蜜中の抗菌剤、テトラサイクリン類の簡易スクリーニング法を確立した。

研究成果の概要(英文)：We made clear that not only strong intermolecular interactions but also weak interactions play an important role in the adsorbents. A solute is drawn to the adsorbent by long-range strong intermolecular interactions and comes closest to a functional group by short-range weak intermolecular interactions. Desorption of a solute which was firmly immobilized on the functional group by mixed intermolecular interactions once becomes difficult. The development of highly selective adsorbents requires no additional separation procedures. We constructed a new device named "on-resin fluorescence analysis", and established the simple method to measure trace amounts of tetracycline antibiotics in honey samples by this device.

研究分野：衛生分析化学

キーワード：選択的吸着剤 食品危害因子 簡易スクリーニング

1. 研究開始当初の背景

固相抽出法 (SPE) の基礎技術は 1960 年代に確立された。1980 年以降急速に進歩し、今や液-液抽出に代わる前処理法として機器分析において必要不可欠なものとなっている。SPE では多彩な保持機構が利用されているが、中でも疎水性相互作用は広範囲な疎水性化合物の抽出に有効であり、高い感度と選択性を兼ね備えた質量分析計 (MS) との組み合わせは、微量多成分の一斉分析法の主流となっている。ところが、疎水性相互作用は選択性に乏しく、環境、食品、生体試料等の複雑なマトリクス中の微量被検成分の抽出を行う場合には、高濃度に存在するマトリクスも同時に捕捉されてしまうため、マトリクスに感受性の高い MS にとっては不都合な場合が多い。

溶質の抽出剤への保持は、強く可逆的な相互作用に負うところが大きい。その代表的なものが上述の疎水性相互作用の他に静電相互作用 (イオン交換や水素結合に代表される極性相互作用) である。近年では、官能基を組み合わせた副次相互作用を利用した抽出剤も使われている。我々も、異なる相互作用を発現する複数の官能基を導入した多足型固相抽出剤では、複合作用により捕捉選択性及び夾雑成分との分離選択性が飛躍的に高まることを見出している [T. Tsukamoto, A. Yamamoto, et al., Chromatographia, 70, 1525-1530, 2009]。また、両性イオン型官能基を導入した親水性相互作用型固相抽出剤では、特有の物性を持った親水性化合物のみが選択的に捕捉されることを明らかにした [T. Tsukamoto, M. Yasuma, A. Yamamoto, et al., J. Sep. Sci., 32, 3591-3595, 2009]。

目的成分を高度に抽出・分離するためには、類似構造化合物との微妙な構造あるいは官能基の差を認識しなければならない。残念ながら上述の副次効果では、この微妙な構造認識を行うことができなかった。現在のところ、構造認識性を持っていることが確認されている抽出剤は、分子鑄型樹脂 (MIP) [J. Haginaka, Trends Anal. Chem., 24, 407-415, 2005] やキラルセクター [M. Lämmerhofer, J. Chromatogr. A, 1217, 814-856, 2010]、アプタマー [A.B. Iliuk, et al., Anal. Chem., 83, 4440-4452, 2011] といった化学的あるいは生物学的親和力を利用したもののみである。

2. 研究の目的

化学的親和力で捕捉選択性を発現するためには、目的化合物を捕捉するための非結合性分子間力として、弱い分子間相互作用の可能性が考えられる。強い分子間相互作用と併用することで選択性を改善する。あるいは、強い相互作用を持つ溶媒によって目的化合物のそれを打ち消し、弱い相互作用の発現を促進する。例えば疎水性化合物を逆相系吸着剤に低極性溶媒で負荷させたり、イオン性化

合物をイオン交換吸着剤に電解質溶媒で負荷させることで新たな選択性の発現を期待した。もう一つは、MIP や生化学的な受容体を模した官能基の位置固定化である (以上、図 1 参照)。本研究ではまず、ハロゲン原子のような重原子の持つロンドン分散力を利用した新たなポリマー系固相抽出剤を合成し、有機ハロゲン化合物に対する選択的の評価から始める。

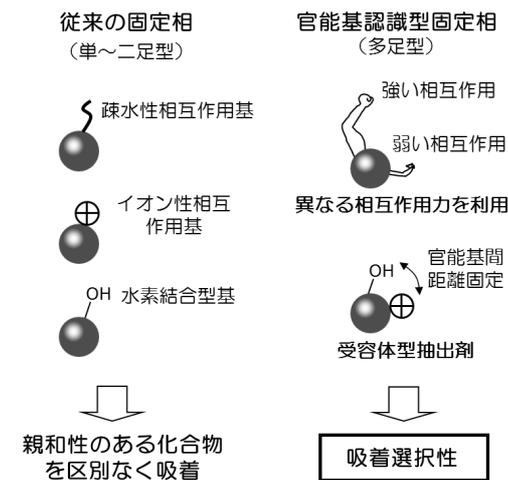


図1. 目的成分の構造を認識する抽出剤の開発

次いで、ここで得られた抽出剤の危害因子分析への適用を行う。固相抽出剤の目的成分選択性が高まれば高まるほど、目的種の溶出が困難となり、精製効果が高まる。逆に溶出工程を省いた固相上での検出も視野に入れる。MIP では固相化学発光による高感度で高選択な流れ分析 (FIA) が報告されている [D. He, Z. Zhang, H. Zhou, Y. Huang, Talanta, 69, 1215-1220, 2006]。固相発光の最大の利点は、溶液での発光に比べて目的種の密度が高いため、強い発光が得られることである。本研究では、選択的吸着剤上での固相発光を利用した簡易スクリーニング装置の開発も試みる。

3. 研究の方法

メタクリレート系の親水性のベースゲルに、トリフェニルホスフィンに触媒として各種ハロゲン化フェノール類を導入した吸着剤を合成する。この吸着剤を注射筒型のカートリッジに充てんし、ハロゲン化合物の保持特性を評価する。同様に、ハロゲン化フェノール以外の配向双極子を有するフェノール類を導入した吸着剤を合成して同じように

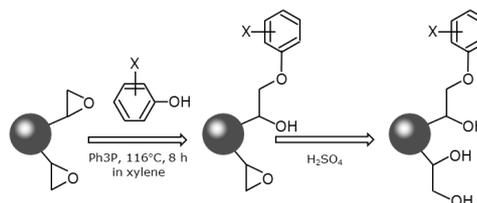


図2. フェノキシ型官能基導入抽出剤の合成スキーム

評価する(図2参照)。

評価を終えた吸着剤より、食品実試料への応用を開始する。選択的吸着剤の特長を最大限活用した簡易・迅速な前処理法を確立する。また、従来の精製法に比べてマトリクス除去効率が高いため、測定装置としては汎用性の高いHPLC-UVを使用する。

一方、吸着剤からの脱着を行わずに、固相蛍光による有害因子スクリーニング法の開発も試みる。有害因子としては、多成分一斉を旨とする農薬と異なり単成分での測定意義のあるカビ毒や抗菌剤の中から、発蛍光性を有するテトラサイクリン類(TCs)を選定する。その最大の理由は、TCsが双極子型の吸着剤に選択的に捕捉されることを既に明らかにしているからである。

4. 研究成果

重原子効果を発現するハロゲン化フェノキシ基としては、2,4-ジクロロ(DCP)、4-ブロモ(BP)、2,4-ジブロモ(DBP)、2,4,6-トリブロモ(TBP)、ペンタブロモフェノール(PBP)の5種類と、対照としてフェノール(Phe)を導入した計6種の吸着剤を評価した。吸着評価化合物としては、ハロゲン化ベンゼン類とハロゲン化フェノール類を用いた。官能基導入量は、ハロゲン化フェノールで0.23-0.56 meq/gとほぼ一定であり、フェノールだけが1.22 meq/gと多めに導入されていた。

表1. フェノール類の双極子モーメント

Phenols	Dipole moment / D
2,4-dichlorophenol	3.019
2,4-dibromophenol	2.64-2.99
4-bromophenol	2.15-2.78
2,4,6-tribromophenol	1.44-2.15
Pentabromophenol	1.73
Phenol	1.22-1.86

まず、ベンゼン類の固相抽出実験では、水のような極性溶媒中からは全て定量的に捕捉されたが、これは市販のC18やHLBカートリッジと同じ結果であり、単純に疎水的相互作用が発現されただけのことである。溶媒をアセトニトリルやアルコールといった中極性溶媒に変えると全て素通りであったが、これも市販のカートリッジと同じ結果であった。

一方ハロゲン化フェノール類では大きく捕捉特性に差が表れた。ベンゼン類が素通りした中極性溶媒中でもフェノール類は捕捉されるようになった。ハロゲン化フェノール類に対する親和性の順序は、DCP樹脂 > BP樹脂 ≅ DBP樹脂 > TBP樹脂 ≅ Phe樹脂 > PBP樹脂であった。一方、一番強い親和性を発揮したDCP吸着剤に対する溶質の捕捉されやすさ順は、2,4,6-トリブロモ > 2,4,6-トリクロロ > 2,6-ジクロロ > 2,4-ジクロロ > 2,4-ジブロモ > 3-ブロモ > 4-ブロモ > 4-メチル > H(非置

換フェノール)であった。まず、官能基親和性であるが、表1に導入したフェノール類の双極子をまとめた。これより、官能基親和力はハロゲン原子の数ではなく、官能基の持つ双極子モーメントに依存していることが分かる。同様に、溶質フェノール類の双極子モーメントモル屈折率を表2にまとめた。捕捉されやすさは双極子モーメントではなく、モル屈折率に依存していることが分かる。

表2. フェノール類の双極子モーメントとモル屈折率

Phenols	Dipole moment / D	Molar refraction / cm ³ mol ⁻¹
2,4,6-tribromophenol	1.44-2.15	50.1
2,4,6-trichlorophenol	1.38-2.00	40.3
2,6-dichlorophenol	1.77-2.15	36.1
2,4-dichlorophenol	0.846-3.019	40.0
2,4-dibromophenol	0.37-2.99	44.0
3-bromophenol	0.90-3.10	36.2
4-bromophenol	2.15-2.78	35.3
4-cresol	1.44-1.83	33.1
phenol	1.22-1.86	27.7

以上の結果を考察すると、官能基フェノール類は酸素原子を介してベースゲルに固定されているため、酸素-フェノール結合を軸とした回転運動しか許されない。この回転軸は双極子モーメントの方向と一致するため、官能基固有の配向双極子は強く働く。一方、溶質は自由回転しているため双極子性を喪失している。距離依存性の小さな(遠距離まで働く)静電相互作用(ここでは水素結合性)で官能基まで呼び寄せられた溶質には誘起双極子が発生する。この大きさは分極率体積に依存するが、実測できない。しかし、屈折率と相関を持っているので表2のモル屈折率と比較すると、双極子モーメントよりは保持力との間の相関が認められる。すなわち、双極子-誘起双極子の力によってハロゲン化フェノールに対する吸着特異性が発現されているものと結論される。但し、この相互作用の距離依存性は大きく、最終的には官能基-溶質間の距離は最接状態にまで達するので、溶質の持つ双極子モーメントも無視できなくなる。補足ながら、親和性が認められなかったハロゲン化フェノール類であるが、DBP樹脂をHPLC用のカラムに充てんして保持特性を評価したところ、非ハロゲン化ベンゼン類に比べて大きな保持が認められたことも追記する。

ハロゲン化フェノキシ基導入吸着剤による固相抽出評価の結果、捕捉選択性に関与しているのはハロゲン原子による重原子効果でなく、官能基としての双極子モーメントであることが判明した。そこで次に、より双極子モーメントの大きな分子として4-シアノと4-ニトロフェノールを導入した吸着剤(CNPとPNP)を合成評価した。官能基導入量は、それぞれ0.73と0.91 meq/gと分子が小さい分、

ハロゲン化フェノールよりも多めであった。これら吸着剤は、ハロゲン化フェノキシ基導入吸着剤と同様の捕捉特性を示したが、中でもニトロフェノール、ニトロ安息香酸類など双極子能の高い溶質に対して強い吸着能を示した。

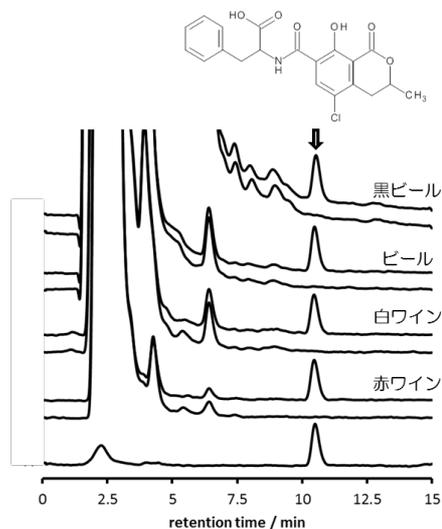


図3. PNP処理で得られたアルコール飲料のクロマトグラム

これら双極子能の高い吸着剤による食品試料中の危害因子分析への応用を展開した。カビ毒であるオクラトキシン A (OTA) は、図 3 に示すようにアミド基や塩素を持つなど分極性に優れ、モル屈折率も $100.5 \text{ cm}^3/\text{mol}$ と大きく、明確な双極子モーメントを有する。PNP 吸着剤は、この OTA をあらゆる有機溶媒中から定量的に捕捉し、脱着には高いイオン強度の有機溶媒を用いないと不可能であった。水-アセトニトリル混液 (9+1) で希釈しただけのアルコール飲料を直接 PNP カートリッジに負荷し、5 mM リン酸-アセトニトリル (1+1) で洗浄後、50 mM リン酸-アセトニトリル (4+6) で溶出した液を HPLC-FL 検出した結果を図 3 に示す。2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の OTA 添加時の回収率はいずれも 80%以上であった。

このように、吸着剤自身の捕捉選択性が高まると脱着が困難になる。そこで敢えて脱着せずに固相表面での発光による直接検出法の開発を試みた。目的成分としては、蜂蜜中の抗菌剤 TCs を選定した。TCs は、図 4 に示すように中性～アルカリ領域では両性イオンとして存在し、大きな双極子モーメントを有する。PNP のような双極子認識型吸着剤上での固相蛍光検出の可能性が示唆される。しかし、芳香族系の官能基は自然蛍光を有するため、バックグラウンド蛍光による S/N 比の低下が懸念された。そこで PNP と同様に大きな双極子モーメントを有するスルホベタイン型の吸着剤を使用した。TCs アルカリ溶液は、Ex. 365 nm, Em. 500 nm の強い蛍光を発するが、スルホベタインに捕捉された TCs も同様の蛍光を発した。スルホベタイン官能基には対イオンとしてナトリウムイオンが存在

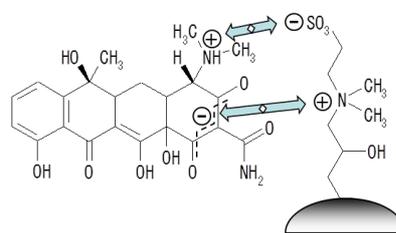


図4. TCsとスルホベタイン吸着剤との双極子相互作用

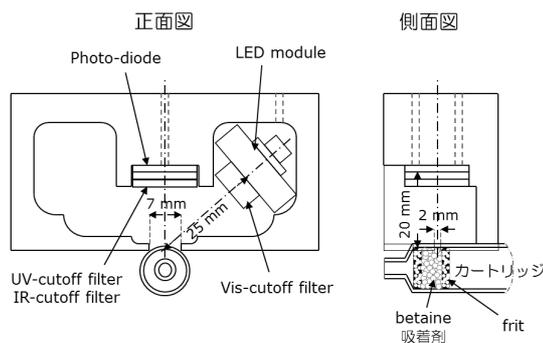


図5. オンレジン蛍光検出装置

しており、表面がアルカリ雰囲気になっているためであろう。近紫外で励起できるため、LED とフォトダイオードを使った簡易検出装置を設計・構築した (図 5)。この検出器で 0.5 μg TCs 吸着量が確認でき、我国の基準値 0.3 mg TCs/kg を識別するには数 g の蜂蜜をカートリッジに負荷させればよい。5 g の蜂蜜をアセトニトリルで抽出し、その上清をカートリッジ処理したところ、色の薄い蜂蜜には対応可能であったが、濃い蜂蜜ではブランク値が高くなった。そこで、図 6 に示すような前処理を施した後にベタインカートリッジに負荷することで、どのような蜂蜜に対しても本装置は適用可能となった。本法を「オンレジン蛍光分析法」と命名した。

以上より、双極子という弱い分子間相互作用を利用することで、従来には無かった溶質

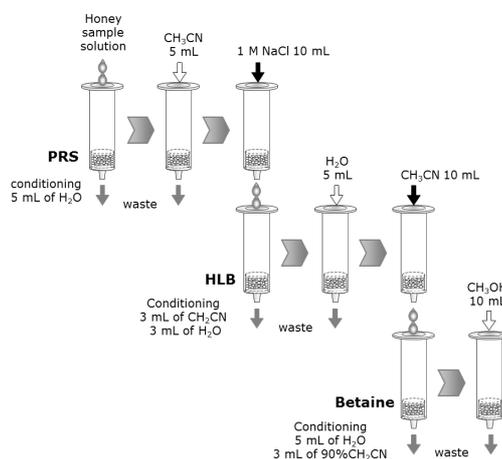


図6. 蜂蜜中のTCsをオンレジン検出するための前処理操作

選択性を持った吸着剤を作り出すことができた。この吸着剤の選択性を使うことで、食品中の危害因子分析が簡易化できることを証明した。

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 9 件)

Toshio Miwa, Shiho Suzuki, Rina Takai, Ryohei Yamamoto, Yoshinori Inoue, Atsushi Yamamoto, Retention behavior of halogenated benzenes on a stationary phase having 2,4-dibromophenoxy group as the halogen recognition functional group. Anal. Sci., in press

Atsushi Yamamoto, Sayaka Hioki, Chihiro Tanada, Toshio Miwa, Yoshinori Inoue, Ryohei Yamamoto, Miyoko Matsushima, Tsutomu Kawabe, Design and development of a suitable adsorbent to capture theophylline for non-invasive therapeutic drug monitoring with exhaled breath. Anal. Methods, 7, 423-427, 2015

Waka Kamichatani, Yoshinori Inoue, Atsushi Yamamoto, Separation properties of saccharides on a hydrophilic stationary phase having hydration layer formed zwitterionic copolymer. Anal. Chim. Acta, 853, 602-607, 2014

Mami Akabane, Atsushi Yamamoto, Sen-ichi Aizawa, Atsushi Taga, Shuji Kodama, Simultaneous enantioseparation of monosaccharides derivatized with L-tryptophan by reversed phase HPLC. Anal. Sci., 30, 739-743, 2014

小玉修嗣、赤羽麻美、會澤宣一、多賀 淳、山本 敦、早川和一、新規な配位子交換 - キャピラリー電気泳動法による有機酸および単糖の光学異性体分析。分析化学, 63, 371-382, 2014

Toshio Miwa, Atsushi Yamamoto, Mitsuru Saito, Yoshinori Inoue, Retention of halogenated solutes on stationary phases containing heavy atoms. Molecules, 18, 5167-5171, 2013

Tomoko Kemmei, Shuji Kodama, Atsushi Yamamoto, Yoshinori Inoue, Kazuichi Hayakawa, Determination of ethylenediaminetetraacetic acid in foods by reversed-phase high-performance liquid chromatography, Food Chem., 138, 866-869, 2013

Atsushi Yamamoto, Saori Yoshii, Chika Suematsu, Michiya Tatematsu, Hidenori Shoji, Yuji Kato, Mitsuru Saito, Yoshinori Inoue, An optosensing device for detecting tetracycline antibiotics in honey. Anal. Methods, 5, 773-777, 2013

Waka Kamichatani, Yoshinori Inoue, Mitsuru Saito, Yasuyuki Kobayashi, Atsushi Yamamoto,

Retention characteristics of water-soluble compounds on water-holding adsorbents with immobilized zwitterionic copolymers having different ionicities. J. Sep. Sci., 21, 2834-3839, 2012

[学会発表](計 10 件)

山本 敦、他、配位子交換作用を付加した両性イオン型高分子結合分離剤によるカビ毒の抽出。2015年3月26-28日、日本薬学会第135年会(神戸)

山本 敦、他、分散力を効果的に認識する分離場の構築 チオアミド型吸着剤の合成と評価。2014年11月20-21日、第31回イオンクロマトグラフィー討論会(千代田区)

山本 敦、静電相互作用から双極子相互作用へ 選択性発現に向けて。2014年9月17-19日、日本分析化学会第63年会(東広島)

山本 敦、他、双極子を利用した新規固相抽出剤の開発とアルコール飲料中のオクラトキシンA分析への応用。2014年9月5日、日本マイコトキシン学会第75回学術講演会(岐阜)

山本 敦、他、エアロゾル用吸着剤の開発と呼気中薬物分析への適用。2014年6月5-6日、第21回クロマトグラフィーシンポジウム(名古屋)

山本 敦、他、ニトロ化芳香環を有する新規分離剤の開発と農作物中のネオニコチノイド系殺虫剤分析への応用。2014年5月24-25日、第74回分析化学討論会(郡山)

山本 敦、他、非浸襲的治療薬物モニタリングのための呼気用新規吸着剤の開発。2014年3月28-30日、日本薬学会第134年会(熊本)

山本 敦、他、両性イオン型高分子結合分離剤における糖類の保持挙動。2013年9月10-12日、日本分析化学会第62年会(東大阪)

山本 敦、他、新規液体クロマトグラフィー用固定相の開発とQSARパラメータを用いた溶質選択性の評価。2013年5月18-19日、第73回分析化学討論会(函館)

山本 敦、他、オンレジン蛍光分析法-オクラトキシン選択性固相抽出剤の開発とその応用。2012年5月19-20日、第72回分析化学討論会(鹿児島)。

[その他]

ホームページ等

山本 敦、三輪俊夫、残留農薬分析に適した高選択性吸着剤開発の可能性。(財)食品分析開発センターSUNATEC メールマガジン、<http://www.mac.or.jp/mail/131201/02.shtml>

6. 研究組織

(1)研究代表者

山本 敦 (YAMAMOTO, Atsushi)

中部大学・応用生物学部・教授

研究者番号：60360806

(2)研究分担者

小玉 修嗣 (KODAMA, Shuji)

東海大学・理学部・教授

研究者番号：70360807