

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：83201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450505

研究課題名(和文) 金属イオンとの配位を利用した新規分析法の開発 - 親水性化合物の水環境中での動態解析

研究課題名(英文) Development of novel analyses of hydrophilic compounds utilizing coordination with metal ions

研究代表者

健名 智子 (KEMMEI, TOMOKO)

富山県衛生研究所・化学部・副主幹研究員

研究者番号：60416089

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、金属イオンと錯体を形成する親水性化合物を移動相に添加した金属イオンと配位させ、この錯体を種々のHPLC分離モードにより分離し紫外外部吸収により検出する新規な分析法の開発を行った。親水性化合物を金属イオンと配位させた場合、その錯体は立体的にまた電荷的に元の化合物とは異なる性質をもつことから、元の化合物とは異なる分離パターンで分析すること、また紫外吸収度が増大することにより汎用性の高いUV検出器により高感度に検出することが可能であった。親水性化合物として有機酸及び糖アルコールを対象に、金属イオンとしてそれぞれ銅イオン、モリブデン酸イオンを用い、開発した分析法を主に食品分析に応用した。

研究成果の概要(英文)：We developed simple and sensitive reversed phase liquid chromatographic methods for the analyses of hydrophilic compounds (HCs) using on-line complexation with metal ions. When metal ions are added to the mobile phase, they coordinate with HCs and therefore may influence the retention of HCs. Moreover, the absorption bands of HCs may shift to longer wavelengths and their extinction coefficients may increase. In this study, we developed reversed-phase liquid chromatographic methods with UV detection to determine organic acids as their copper complexes and alditols as their molybdate complexes. The developed methods were used for quantitative determination of organic acids and alditols in food samples.

研究分野：衛生化学

キーワード：有機酸 糖アルコール 金属イオン HPLC-UV法

1. 研究開始当初の背景

申請者らはそれまでに平成 18~20 年度の科学研究費補助金・基盤研究(C)「大量に排出される金属キレート剤が重金属の環境動態をどう変化させるか?」および平成 22~24 年度の科学研究費補助金・基盤研究(C)「難分解性金属キレート剤を指標とした水環境汚染実態の解明」において、Fe( )イオンを含む移動相を用い、高親水性化合物であるアミノポリカルボン酸系金属キレート剤を鉄錯体として分離・定量する方法を確立していた。高親水性化合物が金属イオンと配位すると、その金属錯体が立体的に、また電荷的に元の化合物とは異なる性質をもつことを利用したもので、もとの化合物とは異なる分離パターンで分離すること、紫外吸収度が増大することにより汎用性の高い UV 検出器により高感度に検出することが可能であった。

近年、新たな水環境汚染物質として医薬品や身体ケア用品等(以下、医薬品類)が問題となっており、水環境中におけるこれら医薬品類の動態を把握することが必要とされている。中でも水溶性が高く紫外/可視領域に特異的な吸収を持たない医薬品類に対してはこれまでに良好な分析法がなく、その選択的かつ高感度な分析法が求められている。金属キレート剤分析に利用した金属イオンとの配位を利用した高速液体クロマトグラフ-紫外外部吸収法(HPLC-UV法)を、これら医薬品類分析に応用できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究は、金属イオンと錯体を形成しうる医薬品類を金属イオンと配位させ、この錯体を種々の HPLC 分離モードにより分離し紫外外部吸収により検出する新規な分析法を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

医薬品類が金属錯体を形成する際に重要な役割を果たすのがカルボキシル基・ヒドロキシル基といった官能基である。医薬品類の分離モデルとして、これら官能基をもつ有機酸と糖類を用い、移動相に金属イオンを添加することで金属イオンと配位させ、その金属錯体のイオン交換・逆相カラムでの挙動を検討し、分析法を開発した。

4. 研究成果

(1)有機酸を用い、その鉄錯体の逆相カラムでの挙動を検討した。移動相に鉄イオンを加えない場合との分離挙動の違いを調べた結果、ほとんど分離挙動に差が見られなかった。(学会発表)

(2)一価の有機酸を用い、その銅錯体のイオ

ン交換カラムでの挙動を検討した。移動相に銅イオンを加えた場合、一価の有機酸のピーク保持時間が早くなり、水酸基を持たない、または二価に水酸基を持つ有機酸は、ピーク保持時間に変化を示さなかった。このことから、移動相に銅イオンを添加した場合、有機酸は銅イオンと配位した形で陰イオン交換により分離・検出されるものと考えられた。また、カルボキシル基に基づく 220 nm 以下での吸収しか持たない有機酸の吸収スペクトルは、銅イオンと配位することにより長波長側へシフト(240 nm)すると共に吸光係数が増加した。これらの結果より、移動相に銅イオンを添加し一価の有機酸を陰イオン交換モードで精度良く分析する方法を開発した。この開発した方法を、雨水中の一価の有機酸測定及び食品添加物であるプロピオン酸の測定に応用した。

(雑誌論文, 学会発表)

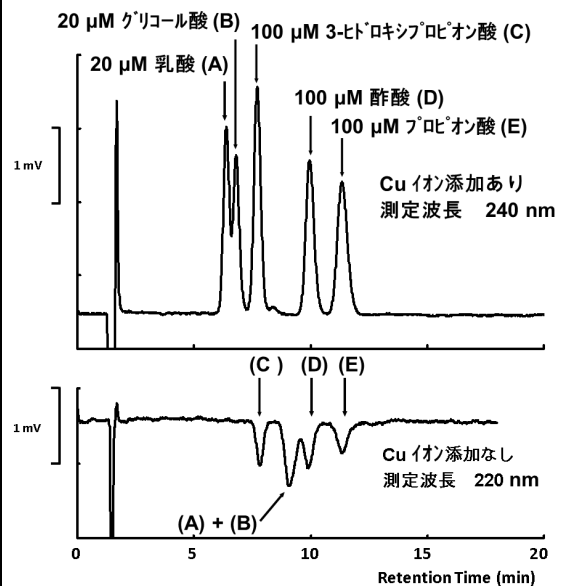


図1. 移動相への銅添加の有無による有機酸のイオンクロマトグラフ法によるクロマトグラムの違い

(3) 陰イオン交換モードでは測定できなかった、リンゴ酸、クエン酸等の二価及び三価の有機酸を用い、その銅錯体の逆相カラムでの挙動を検討した。移動相中への銅イオン添加濃度を 1~15 mM と変化させたところ、銅イオンとの安定度定数が高い有機酸のピーク保持時間が早くなり、銅イオンとの安定度定数が低い有機酸はピーク保持時間に変化を示さなかった。有機酸は銅イオンと配位した形で逆相カラムにより分離されるものと考えられ、銅イオンを 10 mM を添加した場合に最もよい分離および S/N 比が得られた。この結果より、9 種の一~三価の有機酸を逆相モードで精度良く一斉分析する方法を開発した。この開発した方法を、食品サンプル(ジュース, 食酢)中の有機酸分析へ応用した。

(雑誌論文, 学会発表 - )

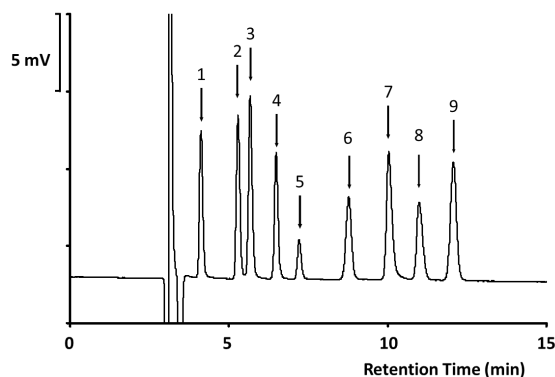


図2. 銅添加移動相を用いた場合の有機酸の逆相HPLC法によるクロマトグラム  
1: 酒石酸, 2: リンゴ酸, 3: マロン酸, 4: 乳酸, 5: 酢酸  
6: クエン酸, 7: マレイン酸, 8: コハク酸, 9: フマル酸

(4) 糖類を用い, そのモリブデン錯体の逆相カラムでの挙動を検討した。あらかじめ0.1mM 糖類溶液にモリブデン酸イオンを添加して吸収スペクトルの変化を調べたところ, 酸性条件下 (pH3.1) において, C6 糖アルコール類 (ヘキシトール) のみ, 吸収極大の長波長側 (255 nm) へのシフトと吸光係数の増加が見られることわかった。このことから金属イオンとしてモリブデン酸イオンを用い, 移動相として用いる酸の種類・濃度, また移動相に加えるモリブデン酸イオンの添加濃度を変化させて, ヘキシトールの逆相モードでの分離・検出挙動を調べ, 3種のヘキシトール (ソルビトール, マンニトール, ズルシトール) の最適分離条件を見出し, これらの分析方法を開発した。この開発した方法を, 食品サンプル (キャンディ) 中のヘキシトール分析へ応用した。  
(投稿準備中, 学会発表 - )

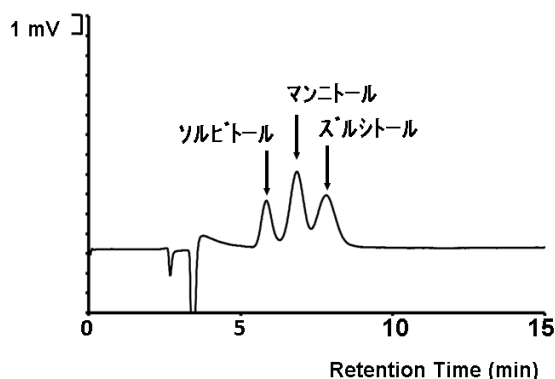


図3. モリブデン酸添加移動相を用いた場合の糖アルコールの逆相HPLC法によるクロマトグラム

このように, 有機酸と糖類を分離モデルとして, 親水性化合物を移動相に添加した金属イオンと配位させ, この錯体を HPL-UV 法により分離・検出する方法を開発してきた。今

後はこれまでに得られた知識を活用し, 医薬品類を対象に金属イオンとの配位による新規な分析法を開発したいと考える。

#### 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 2件)

Tomoko Kemmei, Shuji Kodama, Atsushi Yamamoto, Yoshinori Inoue, Kazuichi Hayakawa, Reversed-phase liquid chromatographic determination of organic acids using on-line complexation with copper(II) ion, *Analytica Chimica Acta*, 査読有, 886, 2015, 194-199, DOI:10.1016/j.aca.2015.07.002

Tomoko Kemmei, Shuji Kodama, Atsushi Yamamoto, Yoshinori Inoue, Kazuichi Hayakawa, Simultaneous and sensitive analysis of aliphatic carboxylic acids by ion-chromatography using on-line complexation with copper(II) ion, *Journal of Chromatography A*, 査読有, 1375, 2015, 49-53, DOI:10.1016/j.chroma.2014.11.071

(学会発表)(計 8件)

健名 智子, 小玉 修嗣, 山本 敦, 井上 嘉則, 早川 和一, モリブデン酸添加移動相を用いる糖アルコール分析, 日本薬学会第 136 年会, 2016.3.28, パシフィコ横浜

健名 智子, 小玉 修嗣, 山本 敦, 井上 嘉則, 早川 和一, モリブデン酸添加移動相を用いた糖アルコール分析, 日本分析化学会第 64 年会, 2015.9.9, 九州大学伊都キャンパス

健名 智子, 小玉 修嗣, 山本 敦, 井上 嘉則, 早川 和一, 銅添加移動相を用いた有機酸の逆相液体クロマトグラフィーによる分析, 第 75 回分析化学討論会, 2015.5.24, 山梨大学甲府キャンパス

健名 智子, 小玉 修嗣, 山本 敦, 井上 嘉則, 早川 和一, 銅添加移動相を用いる有機酸類の一斉分析, 日本薬学会第 135 年会, 2015.3.27, 神戸学院大学・神戸サンボーホール他

健名 智子, 小玉 修嗣, 山本 敦, 井上 嘉則, 早川 和一, 銅添加移動相を用いた有機酸のイオン交換クロマトグラフィーによる分析, 日本分析化学会第 63 年会, 2014.9.19, 広島大学東広島キャン

## パス

健名 智子, 小玉 修嗣, 山本 敦, 井上 嘉則, 早川 和一, 銅添加移動相を用いるモノカルボン酸類の一斉分析, 日本薬学会第 134 年会, 2014.3.29, 熊本大学黒髪キャンパス

健名 智子, 小玉 修嗣, 山本 敦, 井上 嘉則, 早川 和一, 銅添加移動相を用いる有機酸の一斉分析, 第 30 回 IC 討論会, 2013.11.29, 豊田中央研究所

健名 智子, 小玉 修嗣, 山本 敦, 井上 嘉則, 早川 和一, 鉄添加移動相を用いる有機酸の一斉分析, 日本分析化学会第 62 年会, 2013.9.12, 近畿大学東大阪キャンパス

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

健名 智子 (KEMMEI Tomoko)  
富山県衛生研究所・化学部・副主幹研究員  
研究者番号：60416089

### (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

山本 敦 (YAMAMOTO Atsushi)  
中部大学・応用生物学部・教授  
研究者番号：60360806