

平成 30 年 5 月 22 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26460182

研究課題名(和文) パーフルオロ化合物を対象とした超特異的フルオラス LC 計測法の開発と応用研究

研究課題名(英文) Development of Specific Determination Methods for Perfluorinated-alkyl Compounds Based on Fluorous LC

研究代表者

吉田 秀幸 (YOSHIDA, Hideyuki)

福岡大学・薬学部・准教授

研究者番号：20301690

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：

パーフルオロオクタン酸 (PFOA) などのパーフルオロアルキル化合物 (PFC) を対象としたプレカラム蛍光・MS 誘導体化 LC 分析法を開発した。この方法は、ピレン試薬や DMEQ 試薬で PFC を誘導体化後、別の PFC が担持された LC カラムで分離し、高感度な蛍光法や高選択的な MS で検出するというものである。用いた LC カラムは、「フルオラス」と呼ばれる親フルオロアルキル性の親和性を有するので、PFC 構造を持つ化合物のみを特異的に保持することができ、過剰な試薬やマトリクス成分との良好な分離を達成した。フルオラス分離に基づくこの方法は、様々な実試料中 PFC の高感度・高選択的分析に有用であると思われる。

研究成果の概要(英文)：

Liquid chromatography (LC) with pre-column fluorescence/MS derivatization methods have been developed to determine the perfluorinated-alkyl compounds (PFCs), such as perfluorooctanoic acid (PFOA) and fluorotelomer alcohols (FTOHs). These methods are based on the derivatization with some pyrene and DMEQ reagents, the LC separation on PFC-modified reversed-phase column, and the sensitive detection by fluorimetry and/or the selective detection by MS/MS. Examined LC column can retain specifically PFCs by means of fluorophilic or "fluorous" interaction. Therefore, by using this technique, effective separation of the derivatized-PFCs from excess reagents and some matrix components could be achieved, and highly specific analysis was enabled by the fluorescence or MS detection. The proposed methods based on fluorous interaction will enable sufficiently sensitive and selective analysis of PFCs in many different types of real samples.

研究分野：薬品分析学

キーワード：フルオラス化学 環境分析 パーフルオロアルキル化合物 誘導体化分析 前処理 分離分析 蛍光分析 MS分析

## 1. 研究開始当初の背景

パーフルオロオクタン酸 (PFOA) とその類縁化合物はフッ素樹脂の原料として、パーフルオロオクタンスルホン酸 (PFOS) とその類縁化合物は紙や繊維の撥水・撥油成分として、我々の日常で一般的に利用されている。また、食品の包み紙等に使用されているフッ素テロマー (低鎖重合体) は、分解してフルオロテロマーアルコール (FTOHs) となり、その後パーフルオロアルキル化合物となることが知られている。これらパーフルオロアルキル化合物は安定性が高い (分解されにくい) ため、環境水中や野生生物中の広範囲に存在している。国内のパーフルオロアルキル化合物に関する最近の法的規制では、PFOS は化審法の第一種特定化学物質として製造・輸入が事実上禁止されており、PFOA も製造・輸入数量の届出が必要となっている。また、残留性有機汚染物質に関するストックホルム条約の対象となっている PFOS は、PRTR 法で第一種指定化学物質とされている。

これまで、PFOA や PFOS は誘導体化されることなく、その構造のまま LC-MS (あるいは MS/MS) 法で定量分析されている報告が多いが、その LC 分離には逆相や HILIC 等の一般的な分離モードが用いられている。そのため、マトリクス効果を回避させるためには、試料夾雑成分を除去するための複雑な前処理が必要だったり、かなり洗煉された LC 分離を要求されたり、といった不具合が存在していた。

一方我々は、様々な生理活性化合物や医薬品を対象とした超特異的な LC 分析法として、パーフルオロアルキル化合物を標識試薬とする「フルオラス誘導体化法」を開発している。フルオラスとは、有機化学領域で用いられている「親フルオロカーボン性」という意味の造語であり、パーフルオロアルキル化合物同志のみが示す超特異的な親和性のことである。フルオラス誘導体化法の原理は、(1)分析対象物質にパーフルオロアルキル化合物を標識する、(2)反応混合液をパーフルオロアルキル基が担持された LC カラムに通液すると、パーフルオロアルキル化合物で標識されたフルオラス誘導体のみカラムに保持され、他成分は全く保持されない、(3)分析に無関係な成分の溶出 (素通り) 後、親フッ素性溶媒を通液するとフルオラス誘導体が段階的に溶離される、(4)溶出液を適当な手段で検出することで、目的物質の特異的計測が可能となり、クロマトグラムのシンプル化に伴う高感度化も期待できる、というものである。

## 2. 研究の目的

本研究において、上述の「フルオラス誘導体化法 (分析対象物にパーフルオロアルキル化合物を標識)」とは逆の発想に基づき、PFOA 及び FTOHs 類の新規誘導体化分析法を開発する。即ち、フルオラスな性質を持つ測定対象

物質であるパーフルオロアルキル化合物に検出指向性部位 (蛍光性及び MS 検出性) を標識するという、PFOA 及び FTOHs の高感度・高選択的誘導体化分析法の開発を企図した。更に、実試料計測への適用実験を通して、生体計測や環境モニタリングにおける実用性を検証する。

これらの検討により、試料夾雑成分の影響を受けない、マトリクス効果を回避した LC 分析が可能となることが予想される。本研究についてパーフルオロアルキル化合物を対象とした LC 計測法という観点から捉えと、フルオラス分離技術を用いた世界で初めての定量分析となる。更に測定対象物質に検出指向性部位を導入することで、蛍光検出でも MS 検出でも、パーフルオロアルキル化合物自身を直接計測するよりもはるかに高感度な分析が可能となる。つまり既存法の概念を打破した、PFOA や FTOHs 等のパーフルオロアルキル化合物の新しい計測技術を構築することができる。

## 3. 研究の方法

### (1) PFOA 及び FTOHs の誘導体化 LC-蛍光分析法の開発

PFOA に対してカルボキシル基選択的な、FTOHs に対してアルコール性水酸基選択的な蛍光誘導体化試薬をそれぞれ常法に従って標識し、各々に対してのフルオラス LC 分析を行った。

### (2) PFOA 及び FTOHs の誘導体化 LC-MS/MS 分析法の開発

前項 (1) 同様、PFOA 及び FTOHs の両官能基に選択的な誘導体化試薬を標識し、それぞれに対してのフルオラス LC 分離と MS/MS 検出を行った。

### (3) 分析法バリデーション (室内) に関する研究

上記 (1) 及び (2) で開発した誘導体化 LC 法について、それぞれに対する誘導体化試薬の選択を含めた各種分析条件の最適化を行った。感度や選択性だけでなく、操作性や再現性 (室内再現精度) もバリデーションの一環として比較検討した。

### (4) 分析法バリデーション (室間) に関する研究

上記 (3) までに開発・バリデートした分析法について、方法論の頑健性を確認するとともに有用性を検証するため、連携研究者の元での精度検証を行い、室間再現精度のデータを取得した。

### (5) 生体試料分析に関する研究

十分にバリデートした分析法について、生体試料 (ヒト血液) への適用実験を行った。可能な限り簡便な前処理法と組み合わせることで、実試料中パーフルオロアルキル化合物の計測における本当の意味での有用性を検証した。

#### 4. 研究成果

(1) 市販の蛍光誘導体化試薬を用いて常法に従って検討を行ったところ、特にピレン誘導体と DMEQ 誘導体が良い結果を示した。蛍光試薬に由来する高い検出性と、測定対象物のフルオラス性に基づく高い分離性を共存させることができ、本法の概念が PFOA 及び FTOHs 分析における感度と選択性の向上に寄与することが確認された。

(2) 蛍光誘導体化試薬を含む市販の標識試薬を用いて常法に従って検討を行ったが、LC-MS 及び LC-MS/MS 分析では感度の面で良好な結果を示す試薬の発見には至らなかった。しかし、パーフルオロアルキル基担持 LC カラムを用いるフルオラス分離では、従来の MS や MS/MS 分析では不可避とされるマトリクス効果を良好に回避することができ、ハイスループットで実用的な方法論となることが確認された。

(3) 蛍光及び MS での誘導体化 LC 法について、それぞれに対する誘導体化試薬の選択を含めた各種分析(誘導体化反応,分離,検出)条件の最適化を行った。LC での保持時間は長くなったが、検出感度,選択性,再現性など、蛍光分析でも十分なバリデーションデータを示した。

(4) 方法論の頑健性を確認するとともに有用性を検証するため、連携研究者を交えての室間再現精度のデータを取得した。異なる実験施設においても十分な精度と良好なバリデーションデータを示し、実用性の高い方法論であることが確認された。

(5) 方法論の有用性を実証するため、(4)までの検証で操作性等に優れていた蛍光誘導体化法について生体試料(ヒト血液)への適用実験を行った。有機溶媒除タンパクによる前処理操作を組み合わせることで、添加回収試験で十分な結果を示しただけでなく、健康人ヒト血漿中に存在する極微量の PFOA を高精度に分析することができた。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 20 件)

Fluorous-assisted Metal Chelate Affinity Extraction for Nucleotides Followed by HILIC-MS Analysis; Ena Kiyokawa, Tadashi Hayama, Hideyuki Yoshida, Masatoshi Yamaguchi, Hitoshi Nohta; *Journal of Chromatography B*, **1074-1075** (1), 86-90 (2018). [DOI: 10.1016/j.jchromb.2017.12.036](査読有)

Multi-perfluoroalkyl Derivatization of Polyamines for Selective Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometric Analysis Utilizing Fluorous Affinity; Tadashi Hayama, Erina Tamashima, Hideyuki Yoshida, Masatoshi Yamaguchi, Hitoshi Nohta;

*Chromatography*, **38** (3), 107-113 (2017). [DOI: 10.15583/jpchrom.2017.012] (査読有)

Fluorous-assisted Metal Chelate Affinity Extraction Technique for Analysis of Protein Kinase Activity; Tadashi Hayama, Ena Kiyokawa, Hideyuki Yoshida, Osamu Imakyure, Masatoshi Yamaguchi, Hitoshi Nohta; *Talanta*, **156-157** (1), 1-5 (2016). [DOI: 10.1016/j.talanta.2016.04.058] (査読有)

Direct Tandem Mass Spectrometric Analysis of Amino Acids in Plasma Using Fluorous Derivatization and Monolithic Solid-phase Purification; Erina Tamashima, Tadashi Hayama, Hideyuki Yoshida, Osamu Imakyure, Masatoshi Yamaguchi, Hitoshi Nohta; *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **115** (1), 201-207 (2015). [DOI: 10.1016/j.jpba.2015.07.008] (査読有)

Selective Liquid Chromatographic Determination Method of 5-Hydroxyindoles with Fluorous and Fluorogenic Derivatization; Yohei Sakaguchi, Jun Ikenaga, Hideyuki Yoshida, Tadashi Hayama, Miki Itoyama, Kenichiro Todoroki, Osamu Imakyure, Masatoshi Yamaguchi, Hitoshi Nohta; *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **114** (1), 348-354 (2015). [DOI: 10.1016/j.jpba.2015.06.003] (査読有)

Selective Extraction of Nucleotides with Fluorous Biphasic System Utilizing Perfluoroalkylamine as an Ion-pair Reagent; Tadashi Hayama, Ena Kiyokawa, Hideyuki Yoshida, Osamu Imakyure, Masatoshi Yamaguchi, Hitoshi Nohta; *Chromatography*, **36** (1), 13-18 (2015). [DOI: 10.15583/jpchrom.2015.001] (査読有)

Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry with Fluorous Derivatization Method for Selective Analysis of Sialyl Oligosaccharides; Yohei Sakaguchi, Tadashi Hayama, Hideyuki Yoshida, Miki Itoyama, Kenichiro Todoroki, Masatoshi Yamaguchi, Hitoshi Nohta; *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, **28** (23), 2481-2489 (2014). [DOI: 10.1002/rcm.7042] (査読有)

Fluorous Affinity-based Separation Techniques for the Analysis of Biogenic and Related Molecules; Tadashi Hayama, Hideyuki Yoshida, Masatoshi Yamaguchi, Hitoshi Nohta;

*Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **101** (1), 151-160 (2014). [DOI: 10.1016/j.jpba.2014.04.035]( 査読有 )

[学会発表](計 50 件)

パーフルオロポリエーテルカルボン酸を用いたリン脂質のフルオラス金属キレートアフィニティー抽出; 清川恵奈, 田坂友里恵, 巴山忠, 古賀鈴依子, 吉田秀幸, 山口政俊, 能田均; 第 28 回クロマトグラフィー科学会議「京都大学吉田キャンパス(京都市)」(2017 年 11 月 17 日)

オンライン-フルオラス誘導体化によるクルクミンの高感度 LC-MS/MS 分析; 清川恵奈, 竹下阿紗子, 巴山忠, 古賀鈴依子, 吉田秀幸, 山口政俊, 能田均; 日本分析化学会第 66 年会「龍谷大学深草学舎(京都市)」(2017 年 9 月 10 日)  
生理活性ペプチドのフルオラス誘導体化 LC-MS/MS 分析; 梶山彩乃, 清川恵奈, 巴山忠, 吉田秀幸, 山口政俊, 能田均; 第 54 回化学関連支部合同九州大会「北九州国際会議場(北九州市)」(2017 年 7 月 1 日)

LC-MS/MS Analysis of Peptides in Brain with Fluorous Derivatization; Ena Kiyokawa, Reiko Koga, Tadashi Hayama, Hideyuki Yoshida, Masatoshi Yamaguchi, Hitoshi Nohta; HPLC 2017/ The 45th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques「プラハ(チェコ共和国)」(2017 年 6 月 21 日)

金属固定化フルオラス試薬を用いたリン脂質の選択的抽出法の開発; 清川恵奈, 巴山忠, 川見祐介, 吉田秀幸, 山口政俊, 能田均; 日本薬学会第 137 年会「仙台国際センター(仙台市)」(2017 年 3 月 27 日)

脳内ペプチド類の選択的 LC-MS/MS 分析法の開発とマウス脳組織への応用; 清川恵奈, 久保田桃子, 巴山忠, 川見祐介, 吉田秀幸, 山口政俊, 能田均; 第 33 回日本薬学会九州支部大会「鹿児島大学郡元キャンパス(鹿児島市)」(2016 年 12 月 3 日)

Analysis of Protein Kinase Activity with Fluorous-assisted Metal Chelate Affinity Extraction of Phosphopeptide Followed by Fluorescence Detection; Ena Kiyokawa, Tadashi Hayama, Hideyuki Yoshida, Osamu Imakyure, Masatoshi Yamaguchi, Hitoshi Nohta; ISLS 2016/ The 17<sup>th</sup> International Symposium on Luminescence Spectrometry「台北(台湾)」(2016 年 11 月 24 日)

Analysis of Biogenic-related

Compounds with HPLC-fluorescence Detection; Tadashi Hayama, Hideyuki Yoshida, Yohei Sakaguchi, Jun Ikenaga, Kenichiro Todoroki, Masatoshi Yamaguchi, Hitoshi Nohta; ISLS 2016/ The 17<sup>th</sup> International Symposium on Luminescence Spectrometry「台北(台湾)」(2016 年 11 月 23 日)

アポトーシス誘導 Jurkat 細胞中モノヌクレオチド類の選択的抽出とその定量的解析; 清川恵奈, 巴山忠, 相川晃慶, 川見祐介, 糸山美紀, 小迫知弘, 吉田秀幸, 添田泰司, 山口政俊, 能田均; 日本薬学会第 136 年会「パシフィコ横浜(横浜市)」(2016 年 3 月 28 日)

細胞試料中ヌクレオチド類の選択的抽出と HILIC-MS/MS 分析; 清川恵奈, 巴山忠, 川見祐介, 糸山美紀, 吉田秀幸, 能田均, 山口政俊; 第 26 回クロマトグラフィー科学会議「九州大学馬出キャンパス(福岡市)」(2015 年 11 月 11 日)  
Ion-pair fluoruous biphasic extraction 及び HILIC によるヌクレオチド類の選択的分析法開発; 清川恵奈, 巴山忠, 川見祐介, 糸山美紀, 吉田秀幸, 能田均, 山口政俊; 第 13 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「長崎ホテル清風(長崎市)」(2015 年 8 月 20 日)

フルオラス相互作用を利用したアミノ酸のタンデムマス分析と病態モデルマウス試料への適用; 玉嶋江莉奈, 巴山忠, 川見祐介, 糸山美紀, 吉田秀幸, 能田均, 山口政俊; 第 13 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「長崎ホテル清風(長崎市)」(2015 年 8 月 20 日)

フルオラスイオンペア抽出法によるヌクレオチド類の選択的分析と白血病由来細胞試料への適用; 清川恵奈, 巴山忠, 川見祐介, 糸山美紀, 吉田秀幸, 能田均, 山口政俊; 第 22 回クロマトグラフィーシンポジウム「近畿大学東大阪キャンパス(東大阪市)」(2015 年 5 月 29 日)

フルオラス誘導体化法によるポリアミン類の選択的 LC-MS/MS 分析; 巴山忠, 久芳未果, 玉嶋江莉奈, 川見祐介, 糸山美紀, 吉田秀幸, 能田均, 山口政俊; 第 22 回クロマトグラフィーシンポジウム「近畿大学東大阪キャンパス(東大阪市)」(2015 年 5 月 29 日)

フルオラス誘導体化法を利用したオキシトシンの高選択的 LC-MS<sup>3</sup> 分析; 玉嶋江莉奈, 巴山忠, 川見祐介, 糸山美紀, 吉田秀幸, 能田均, 山口政俊; 第 75 回分析化学討論会「山梨大学甲府キャンパス(甲府市)」(2015 年 5 月 23 日)

フルオラスの選択性を利用した細胞試

料中ヌクレオチド類の金属キレートアフィニティー抽出; 巴山忠, 薬師寺寿世, 川見祐介, 糸山美紀, 吉田秀幸, 能田均, 山口政俊; 第 25 回クロマトグラフィー科学会議「京都大学桂キャンパス(京都市)」(2014 年 12 月 12 日)

亜鉛固定化 Krytox を利用したテトラサイクリン系薬剤の選択的フルオラス二相系抽出; 古森貴子, 清川恵奈, 巴山忠, 川見祐介, 糸山美紀, 吉田秀幸, 能田均, 山口政俊; 第 31 回日本薬学会九州支部大会「第一薬科大学(福岡市)」(2014 年 12 月 12 日)

金属固定化フルオラス試薬を利用したテトラサイクリン系抗生物質の選択的抽出法の開発; 清川恵奈, 古森貴子, 巴山忠, 川見祐介, 糸山美紀, 吉田秀幸, 能田均, 山口政俊; 第 27 回バイオメディカル分析科学シンポジウム「帝京大学板橋キャンパス(東京都板橋区)」(2014 年 8 月 20 日)

フルオラス-金属キレートアフィニティー試薬を用いたリン酸基含有化合物の選択的抽出法の開発; 巴山忠, 井上裕也, 川見祐介, 糸山美紀, 吉田秀幸, 能田均, 山口政俊; 第 21 回クロマトグラフィーシンポジウム「名古屋市工業研究所(名古屋市)」(2014 年 6 月 6 日)

モノリス型フルオラス固相カラムを用いたパーフルオロアルキル化アミノ酸の選択的抽出と LC-MS/MS 分析; 玉嶋江莉奈, 巴山忠, 川見祐介, 糸山美紀, 吉田秀幸, 能田均, 山口政俊; 第 21 回クロマトグラフィーシンポジウム「名古屋市工業研究所(名古屋市)」(2014 年 6 月 5 日)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

吉田 秀幸 (YOSHIDA, Hideyuki)

福岡大学・薬学部・准教授

研究者番号: 20301690

### (2) 連携研究者

巴山 忠 (HAYAMA, Tadashi)

福岡大学・薬学部・准教授

研究者番号: 90549693