

令和元年9月6日現在

機関番号：83201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08122

研究課題名(和文) 金属イオンとの配位に基づく親水性抗生物質の新規な分析法の開発と水環境分析への応用

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)：これまで、水溶性が高く吸光係数の低い化合物を移動相に添加した金属イオンとのオンライン錯形成反応を活用し簡便かつ高感度にHPLC-UV検出法で分離・検出する方法の開発を進めてきた。本研究課題では親水性抗生物質にこの新規な分離モードを適用することを目的に、親水性抗生物質が分子内にヒドロキシル基を多数持つことから、アルコール類をモデル化合物として分析法の開発を行った。炭素数が1-3のアルコールは銅イオンと、炭素数が4以上の糖アルコールはモリブデン酸イオンとの錯体を形成させ、HPLC-UV検出する新規な分析法を開発し、医薬品、食品および家庭用品の分析に応用した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アルコール類は親水性が非常に高くまた特異的な吸収をほとんど持たないことから、これまでは親水性HILICモードまたは配位子交換モードで分離、示差屈折検出器や蒸発型光散乱検出器で分析されてきたが、これら検出器に特異性はなく、十分な感度が得られていなかった。今回アルコール類について、移動相に添加した金属イオンとのオンライン錯形成反応を活用し簡便かつ高感度にHPLC-UV検出法で分離・検出する方法を開発し、食品、家庭用品等の分析に応用することができた。今後この方法を、水溶性が高く吸光係数の低い抗生物質の分析に適用することができると思われる。

研究成果の概要(英文)：We have developed simple and sensitive HPLC-UV detection methods for the analyses of hydrophilic compounds using on-line complexation with metal ions. In this study, we developed novel HPLC-UV methods to determine C1-C3 alcohols as their copper complexes and C4-C6 sugar alcohols as their molybdate complexes. The developed methods were used for quantitative determination of these alcohols in common commodities and food samples.

研究分野：分析化学

キーワード：親水性化合物 HPLC-UV法 金属イオン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

申請者はこれまでに平成 25~27 年度の科学研究費基金・基盤研究(C)「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」において、銅イオンを含む移動相を用い、高親水性化合物であるカルボン酸類を銅錯体として分離・定量する方法を確立した。これは高親水性化合物であるカルボン酸類が銅イオンと配位することにより、その銅錯体が立体的に、また電荷的にもとのカルボン酸とは異なる性質をもつことを利用したもので、このカルボン酸類の銅錯体をイオンクロマトグラフ法や逆相液体クロマトグラフ法により、もとのカルボン酸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紫外外部吸光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抗生物質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。カルボン酸類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-紫外外部吸光検出法(HPLC-UV 検出法)を、これら抗生物質の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、親水性抗生物質を金属イオンに配位させることにより、HPLC 法の既存の分離モードに配位能をプラスした新規な分離モードで分離分析する方法を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

抗生物質が金属錯体を形成する際に重要な役割を果たすのが親水性官能基である。親水性抗生物質は分子内にヒドロキシル基を多数持っていることから、抗生物質の分離モデルとして、アルコール類を対象として分析法の開発を試みた。

4. 研究成果

(1) 低級アルコール類は自然界に広く存在しているとともに、種々の化合物の合成原料や洗浄剤、溶剤、燃料などとして工業的に広く使われている。HPLC によるアルコールの分離は、スルホン化ポリスチレン系分離剤を用いて分離し、示差屈折検出により検出するという方法が主に用いられているが、この方法は、アルコールに特異な分離法ではなく、また示差屈折検出であるためマトリックスの影響を受けやすいという問題がある。アルコールも、カルボン酸と同様に金属イオンと錯体を形成するが、その錯体の安定度は決して高くはない。しかし、錯体を形成させることにより、吸収帯の高波長側へのシフトおよび吸収度の増強が期待される。そこで、移動相への添加金属イオンとして銅イオンを選択し、5 種の C1-C3 アルコール(メタノール、エタノール、1,2-プロパンジオール、1,3-プロパンジオールおよびグリセロール) のオンカラム錯形成を利用した HPLC-UV 検出による分析法の開発を試みた。

まずこれらのアルコールの水溶液に硫酸銅を添加して、紫外吸収スペクトルを測定し、すべてのアルコールで 250 nm における吸収極大を観察した。次いで、逆相 InertSustain AQ-C18 カラムを用い、硫酸銅添加硫酸水素ナトリウム移動相の組成やカラム温度を変化させ、5 種の C1-C3 アルコールの分離・検出挙動を調べた。これらアルコールの保持時間は移動相の組成やカラム温度の影響を受けなかったが、ピーク面積は移動相への添加硫酸銅濃度の増加に伴い増加した。このことは、C1-C3 アルコールと銅イオンとの錯体の安定度が低いため、保持時間は各アルコールの疎水性に依存するが、銅イオン濃度の増加により配位型へと平衡が傾き、ピーク面積が大きくなるものと考えられた。これらの結果より、5 種の C1-C3 アルコールを精度良く分析する方法を開発し、蒸留酒、マウスウォッシュ、電子タバコリキッド、除光液中の C1-C3 アルコールの測定に応用した(図 1)。

(雑誌論文 学会発表)

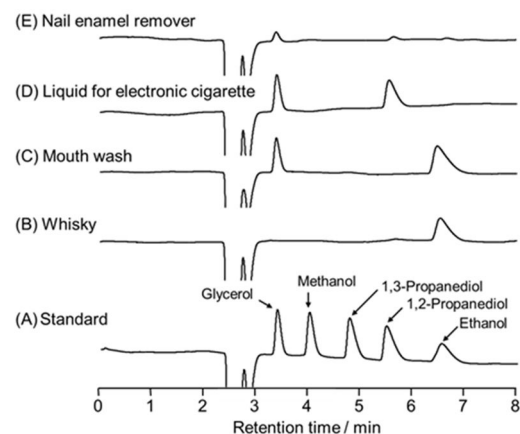


図1. 銅添加移動相を用いたC1-C3アルコールの逆相HPLC-UV 検出法によるクロマトグラム
(A) 1% v/v 標準液、(B) ウイスキー40倍希釈液
(C) マウスウォッシュ10倍希釈液
(D) 電子タバコリキッド50倍希釈液
(E) 除光液10倍希釈液

(2) 糖アルコールは糖分子内のカルボニル基を還元して得られる多価アルコールの総称で、低カロリー甘味料として食品や飲料に用いられるばかりでなく、その熱安定性や吸湿性を利用して、湿潤剤・増粘剤・品質保持剤などの目的で広くヘルスケア製品・化粧品・医薬品などにも用いられている。これらは構造が類似しているだけでなく、紫外可視領域に吸収を持たないため、通常の HPLC-UV 検出による測定は困難である。モリブデン酸イオンは多価ヒドロキシ化

合物と錯体を形成することが知られており、炭素数 4 以上の炭水化物とも酸性水溶液中でマイナス二価のモリブデン酸錯体を形成する。そこで、モリブデン酸イオンをオンカラム錯形成反応の試薬として用いることで、糖アルコールを直接検出できるのではと考え、紫外吸収スペクトルを測定したところ、糖アルコールが酸性条件下でモリブデン酸イオンと 247 nm に吸収をもつ錯体を形成することが判明した。そこで、移動相への添加金属イオンとしてモリブデン酸イオンを選択し、糖アルコール類のオンカラム錯形成を利用した HPLC-UV 検出による分析法の開発を試みた。

逆相 C18 カラムである InertSustain C18 および C30 カラムである Develosil RPAQUEOUS カラムを用い、モリブデン酸ナトリウム添加酸移動相の酸の種類や濃度、モリブデン酸ナトリウム添加濃度、カラム温度を変化させ、糖アルコールの分離・検出挙動を調べた。糖アルコールは InertSustain C18 にはほとんど保持されなかったが、Develosil RPAQUEOUS には明確にヘキシトールが保持され、ソルビトール、マンニトール、ダルシトールの順に溶出した。酸としてリン酸を用いた場合のみ、負のシステムピークの妨害を受けることなく 3 種のヘキシトールが良好に分離可能であった。これらの結果より、3 種のヘキシトールの最適分離条件を見出し、精度良く分析する方法を開発し、食品サンプル（キャンディ）中のヘキシトール分析に応用した（図 2）。（雑誌論文，学会発表）

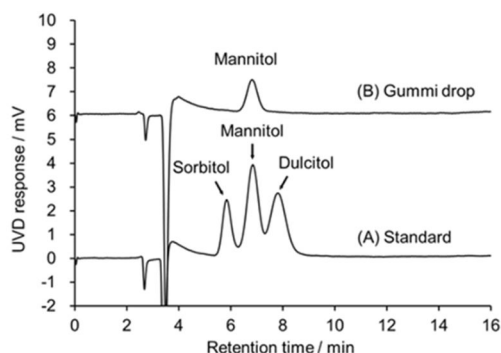


図2. モリブデン酸添加移動相を用いたヘキシトールの逆相HPLC-UV 検出法によるクロマトグラム
(A) 0.1 mmol/L 標準液
(B) グミキャンディ溶解希釈液

(3) (2)において開発したモリブデン酸添加移動相を用いた逆相 HPLC-UV 検出法では、錯体の安定度の高い 3 種のヘキシトールの分離が可能であったが、安定度の低い C4-C5 糖アルコールは保持されなかった。逆相分配モードにおいて、両親媒性イオン、いわゆるイオンペア試薬の移動相への添加によりイオン性化合物の保持の増強が可能である。モリブデン酸-糖アルコール錯体は負電荷を持つため、イオンペア試薬の移動相への添加により、錯体の安定性の低い C4-C6 糖アルコールの保持・分離が達成可能であるものと考えられる。そこで、6 種の C4-C6 糖アルコール（エリスリトール、キシリトール、アラビトール、マンニトール、ソルビトール、ダルシトール）について、移動相にモリブデン酸イオンとともにイオンペア試薬を加え、オンカラム錯形成反応により形成させたモリブデン酸-糖アルコール錯体を HPLC-UV 検出により一斉分析する方法を試みた。

逆相カラムとして InertSustain C18 を用い、0.1 mmol/L モリブデン酸ナトリウム添加 1 mM 塩酸移動相に加えるイオンペア試薬の種類や濃度、また加えるメタノール濃度を適宜調整し、糖アルコールの分離・検出挙動を調べた（図 3）。添加した第四級アンモニウム塩イオンペア試薬のうち、塩化テトラブチルアンモニウム (TBACl) を用いた場合に最も良い分離が得られ、TBACl 濃度を濃くするほど保持は強くなり、メタノール濃度を増やすと保持は弱くなった。モリブデン酸-糖アルコール錯体の逆相分配イオンペア HPLC による保持は、既存のイオンペアモードと同様、イオンペア試薬の疎水性、濃度、併用する溶媒の濃度により、カラム固定相と移動相の間に行われる静電電位の大きさに依存するものと推定された。これらの結果より、6 種の C4-C6 アルコールを精度良く分析する方法を開発し、市販の健康飲料、目薬、コンタクトレンズ装着液、マウスウォッシュ中の C4-C6 糖アルコールの定量に応用した。（雑誌論文，学会発表）

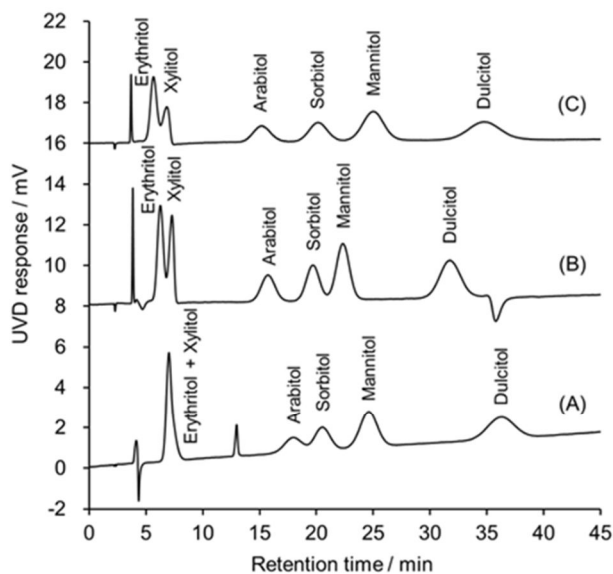


図3. モリブデン酸添加移動相を用いた糖アルコールの逆相イオンペアHPLC-UV 検出法によるクロマトグラム
1 mmol/L: エリスリトール、キシリトール
0.1 mmol/L: アラビトール、マンニトール、ソルビトール、ダルシトール
(A) 4 mmol/L 塩化テトラブチルアンモニウム + 1% v/v メタノール
(B) 0.4 mmol/L 塩化テトラブチルアンモニウム + 10% v/v メタノール
(C) 0.1 mmol/L 塩化テトラペンチルアンモニウム + 20% v/v メタノール

(4) (2)において、糖アルコールのモリブデン酸ナトリウム添加リン酸移動相を用いた逆相 HPLC-UV 検出法を開発した際、キャンディやグミ等お菓子類をこの分析法に適用するための前処理法を検討した。この際、フルーツキャンディによく含まれるビタミン C の影響を除くため (マンニトールピークと被る)、キャンディの溶解・希釈液を強陰イオン交換 (SAX) カートリッジに通したところ、ビタミン C のピークが消え、今まで見られなかったシャープなピークがクロマトグラム上に現れた。このピークは SAX カートリッジに通した液をさらに銀型陽イオン交換カートリッジに通したところ消えたことから、SAX 固相の対イオンである塩化物イオンであることがわかった。このような逆相 C30 カラム Develosil RPAQUEOUS による無機陰イオン分析について、そのイオンの保持並びに検出特性について精査した。(学会発表,)

また、C30 カラム以外の官能基およびその導入方法の異なる逆相カラムについて、無機陰イオン分析の可能性を探るため、それらカラムでの 4 種の無機イオン (塩化物イオン, 臭化物イオン, 硝酸イオン, 硫酸イオン) について保持挙動を調べた。その結果、保持・分離する逆相カラムがある一方、ほとんど保持しないカラムもあった。逆相 C18 カラムである Inertsil ODS-3 を用いた場合のクロマトグラムを図 4 に示す。これら 4 種以外の陰イオンについても保持挙動を調べ、その分離の傾向を探った。(学会発表,)

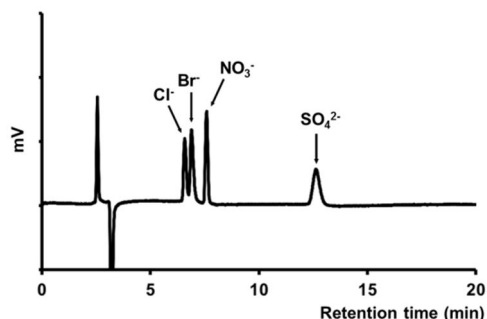


図4. 0.05 mM モリブデン酸ナトリウム添加
4 mM リン酸移動相を用いた
無機陰イオン標準試料のクロマトグラム
1 mM; NaCl, KBr, NaNO₃, 0.1 mM; Na₂SO₄

このように本研究課題では、アルコール類を移動相に添加した金属イオンと配位させ、その錯体を HPLC-UV 検出法により分離・検出する方法を開発した。これらの結果をまとめて、国際学会において発表を行った(学会発表)。今後は親水性抗生物質の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。

また、金属イオンを含む移動相を用いた逆相カラムでの無機陰イオン分析についても、いくつかの知見を得、学会で発表してきた。今後もその分離機構の解明とより高選択的な分離条件の開発を進めていく(基盤研究(C)19K06348 逆相カラムでできる無機陰イオン分析 分離機構の解明と水環境分析への応用)。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

Tomoko Kemmei, Shuji Kodama, Atsushi Yamamoto, Yoshinori Inoue, Kazuichi Hayakawa, Reversed phase ion-pair chromatographic separation of sugar alcohols by complexation with molybdate ion, Journal of Chromatography A, 査読有, 1547, 2018, 71-76, DOI:10.1016/j.chroma.2018.03.016

Sohei Tanaka, Takumi Dohi, Sen-ichi Aizawa, Tomoko Kemmei, Hiroyuki Terashima, Atsushi Taga, Atsushi Yamamoto, Shuji Kodama, Simultaneous determination of alcohols including diols and triols by HPLC with ultraviolet detection based on the formation of a copper(II) complex, Journal of Separation Science, 査読有, 40, 2017, 4168-4175, DOI:10.1002/jssc.201700635

Tomoko Kemmei, Shuji Kodama, Atsushi Yamamoto, Yoshinori Inoue, Kazuichi Hayakawa, Determination of hexitols by reversed phase liquid chromatography using on-line complexation with molybdate ion, Analytica Chimica Acta, 査読有, 958, 2017, 71-76, DOI:10.1016/j.aca.2016.12.014

[学会発表](計 10 件)

健名 智子, 小玉 修嗣, 山本 敦, 井上 嘉則, 早川 和一, 逆相カラムを用いる無機陰イオン分析, 日本薬学会第 139 年会, 2019.3.23, 幕張メッセ

健名 智子, 小玉 修嗣, 山本 敦, 井上 嘉則, 早川 和一, 逆相 HPLC-UV 法による無機陰イオン分析, 日本分析化学会第 67 年会, 2018.9.14, 東北大学川内北キャンパス

健名 智子, 小玉 修嗣, 山本 敦, 井上 嘉則, 早川 和一, C30 カラムを用いた無機陰イオン分析, 第 78 回分析化学討論会, 2018.5.27, 山口大学常盤キャンパス

Tomoko Kemmei, Shuji Kodama, Atsushi Yamamoto, Yoshinori Inoue, Kazuichi Hayakawa, Determination of sugar alcohols by high performance liquid chromatography with

ultraviolet detection using on-line complexation with molybdate ion, The 14th Asian Conference on Analytical Sciences (ASIANALYSIS XIV), 2018.4.5, Jakarta Convention Center (Indonesia)

健名 智子, 小玉 修嗣, 山本 敦, 井上 嘉則, 早川 和一, 逆相イオンペア HPLC-UV 法による糖アルコール類の一斉分析 - モリブデン酸錯体形成を利用して -, 日本薬学会第 138 年会, 2018.3.27, 金沢市もてなしドーム

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無機陰イオン分析, 日本分析化学会第 66 年会, 2017.9.11, 東京理科大学葛飾キャンパス

健名 智子, 小玉 修嗣, 山本 敦, 井上 嘉則, 早川 和一, モリブデン酸錯体形成を利用した糖アルコール分析 - イオンペア HPLC 法の検討 -, 第 77 回分析化学討論会, 2017.5.28, 龍谷大学深草学舎

田中 壮平, 土肥 巧, 曾澤 宣一, 山本 敦, 多賀 淳, 寺島 弘之, 小玉 修嗣, 銅錯体形成を利用したアルコール類の HPLC 分析, 第 77 回分析化学討論会, 2017.5.27, 龍谷大学深草学舎

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イオンペア HPLC-UV 法による糖アルコール分析, 日本薬学会第 137 年会, 2017.3.27, 東北大学川内地区

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 HPLC-UV 法による糖アルコール分析, 日本分析化学会第 65 年会, 2016.9.16, 北海道大学工学部

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：小玉 修嗣

ローマ字氏名：KODAMA Shuji

所属研究機関名：東海大学

部局名：理学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：70360807

研究分担者氏名：山本 敦

ローマ字氏名：YAMAMOTO Atsushi

所属研究機関名：中部大学

部局名：応用生物学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：60360806

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。