

機関番号：32425

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2006～2010

課題番号：19790108

研究課題名(和文) 包括的二次元高速液体クロマトグラフィーによる環境汚染物質の高精度分析法の開発

研究課題名(英文) Development of precise method for determining environment pollutants using comprehensive high-performance liquid chromatography

研究代表者

村橋 毅(MURAHASHI TSUYOSHI)

日本薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：70340445

研究成果の概要(和文): 本研究課題では、開発した包括的二次元 HPLC がディーゼル排出粒子中の成分の分析以外にも幅広く使用できることを確かめるため、近年に話題となっている化合物の分析に適用した。(1)平成 19 年度は大気中の発がん性/変異原性多環芳香族化合物の分析法を開発した。(2)平成 20 年度は内分泌かく乱物質の代謝生成物の分析法を開発した。(3)平成 21 年度は生薬中の残留農薬分析法を開発した。(4)平成 22 年度は魚介類中の内分泌かく乱物質の分析法を開発した。

研究成果の概要(英文): In this study, we developed comprehensive two-dimensional high-performance liquid chromatographic method for the determination of carcinogenic and/or mutagenic polycyclic aromatic compounds in the atmosphere in 2007FY, metabolites from endocrine disrupters in 2008FY, residual pesticides in herbal medicines in 2009FY, endocrine disrupters in seafood in 2010FY.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	0	1,500,000
2008年度	600,000	180,000	780,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
総計	3,300,000	540,000	3,840,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：環境分析、環境技術

1. 研究開始当初の背景

環境中には有害な物質が多種類存在する。例えば発癌性を有する多環芳香族炭化水素などが挙げられるが、環境試料は構成成分が多い(夾雑物が多い)ために、微量物質の分析には通常手間がかかる精製操作が必要で、場合によっては夾雑成分のために測定できない、あるいは測定値の信頼性に問題がある

ものもあった。高速液体クロマトグラフィー(high performance liquid chromatography, HPLC)は環境分析に汎用されているが、その分離能力はキャピラリーガスクロマトグラフィーなどと比べると低い。一つの分析で完全分離することができる最大のピーク数をピークキャパシティというが、通常の HPLC の場合、一時間あたり 100~200 程度

である。複数のクロマトグラフィーを組み合わせた包括的二次元 HPLC の場合、全体のピークキャパシティは各クロマトグラフィー系のピークキャパシティの積で表される。プロテオーム解析の分野では、イオン交換系と逆相系を組み合わせた包括的二次元 HPLC でピークキャパシティが一時間あたり 1900 を実現させた報告がある。一方、本研究代表者は環境汚染物質（多環芳香族炭化水素など）の高性能分離のため移動電荷形成カラムとモノリス型の C₁₈ カラムを組み合わせた包括的二次元 HPLC でピークキャパシティが一時間あたり 2400 を実現させた (Tsuyoshi Murahashi, *Analyst*, 2003)。

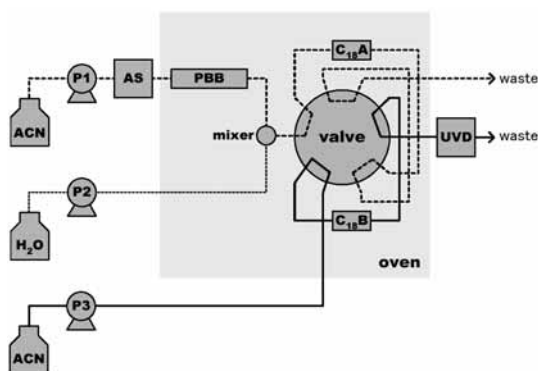


図 1 包括的二次元 HPLC システム

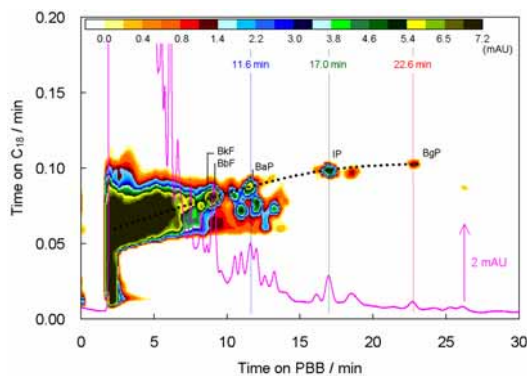


図 2 包括的二次元クロマトグラム

2. 研究の目的

前述した背景を踏まえて、本研究では、開発した包括的二次元 HPLC がディーゼル排出粒子中の成分の分析以外にも幅広く使用できることを確かめるため、近年に話題となっている化合物の分析に適用した。

(1) 大気中の発がん性 / 変異原性多環芳香族化合物の分析

ディーゼル排出粒子中には発がん性あるいは変異原性を有する多環芳香族炭化水素

(PAH) やニトロアレーンが含まれている。PAH の分析には蛍光検出 HPLC を用いることが多い。ディーゼル排出粒子には多くの蛍光を有する成分が存在するために、蛍光検出 HPLC を用いる方法ではきょう雑成分が目的成分の定量精度に影響を与えることが多い。本研究では PAH の中でも、特にきょう雑成分のため分析が困難な benz[a]anthracene と chrysene に最適な条件で分析を試みた。

(2) 内分泌かく乱物質の代謝生成物の分析

私たちの周りには、様々な人工化合物があるが、そのなかには内分泌かく乱化学物質（環境ホルモン）と呼ばれる人体や野生生物の生殖に悪影響を及ぼす化合物がある。例えば、芳香族炭化水素の一つであるベンゾフェノンは紫外線による日焼け防止剤に含まれているが、近年、ベンゾフェノンがごく低濃度でもサンゴに共生する「藍藻」に悪影響を及ぼし、サンゴの白化の一因になっているとの報告がなされた。このような内分泌かく乱化学物質から野生生物を守るためには、汚染物質の環境動態を把握することが必要であるが、そのためには環境中に存在する何百万にものぼる化合物の中から目的対象物を正確に測定しなければならない。そこで本研究では、このような芳香族化合物を、できるだけ高精度で分析できる方法について検討した。

(3) 生薬中の残留農薬分析

生薬は日本において古くから用いられ、西洋医学が主流となった現代においても、使われ続けている。生薬は日本で作られるものもあるが、中国から輸入されるものも多い。近年、中国では農作物の残留農薬が問題となっており、日本への輸入野菜についても農薬の残留が懸念されている。生薬についても農薬が残留している可能性があるため、農薬の分析方法の確立が重要である。このためには生薬中に存在する何百万にものぼる化合物の中から目的対象物を正確に測定しなければならない。そこで本研究では、このような農薬をできるだけ高精度で分析できる方法について検討した。

(4) 魚介類中の内分泌かく乱物質の分析

内分泌かく乱物質とは、環境汚染物質のうち野生生物や人の内分泌を攪乱するもので、野生生物や人が将来的に子孫を残すことが難しくなる懸念があるために近年注目されている。われわれ人類が作りだした多種類で大量の化学物質は、最終的には大気などを經由して水環境に移行する。水環境では、植物プランクトン、動物プランクトン、小魚、中型魚類、大型魚類あるいは鳥類、哺乳類の順

に食物連鎖があり、化学物質に難分解性と脂溶性があれば生物濃縮され、内分泌かく乱物質の場合には有害な作用が発現することが考えられる。そこで本研究では、内分泌かく乱物質の環境動態を明らかにするために、魚介類中に含まれる内分泌かく乱物質を包括的二次元 HPLC の分離条件を検討した。

3. 研究の方法

・分析条件の検討

一次元目の HPLC と二次元目の HPLC の分離条件を検討した。二次元目の HPLC の固定相として、粒径が 2~5 μ m のパッキドカラム(C₁₈ が結合したシリカゲル粒子を高圧で充填した分析カラム)と内径が 4.6mm、3mm、2mm のモノリスカラムで検討をした。他の分離条件として、移動相組成、移動相流量、カラムオープン温度を検討した。また、一次元目の HPLC は固定相として、ポリメリックタイプの C₁₈、C₈、C₃₀、フェニル基、ニトロフェニル基、ペンタプロモベンジル基、ピレニルエチル基などについて検討した。他の分離条件として、移動相組成、移動相流量、カラムオープン温度を検討した。

・大気試料の分析

大気は、埼玉県内の大学においてハイボリウムエアサンプラーを用いて粉塵を採取した。採取した粉塵はエタノールを抽出溶媒とした超音波抽出法で有機成分を抽出した。抽出液は溶媒を減圧留去し、少量のエタノールに再溶解し、試料を作成した。

・代謝生成物試料の作成

内分泌かく乱物質のひとつであるベンゾフェノンの溶液に 3-メチルコラントレンで酵素誘導したラットの肝臓から調整したミクロソームを加えて 20 分間反応させた。反応液に酢酸エチルを加えて攪拌後、遠心機により 2 層に分離させた。有機層を取り出して溶媒を減圧留去し、少量のエタノールに再溶解し、試料を作成した。

4. 研究成果

以前の方法 (Tsuyoshi Murahashi, *Analyst*, 2003)では二次元の分離を高速で行うため、移動相の流量を 16 ml/min に設定していた。この流量では、多検体の分析にはランニングコストなどの点で問題があるので、まず、移動相の消費量を節約するために、系全体をセミマイクロ化した。

一次元と二次元のうち、移動相を浪費するのは二次元であるため、まず、二次元のカラ

ムについてセミマイクロ化した。検討したセミマイクロカラムは、(1) 内径が 2 mm、粒子径が 5 μ m、長さが 2 ~ 25 cm のパッキドカラム、(2) 内径が 2 mm、粒子径が 3 μ m、長さが 3 . 3 ~ 15 cm のパッキドカラム、(3) 内径が 2 ~ 4.6mm、長さが 5 ~ 10cm のモノリスカラムである。カラム長が短いほど移動相を高速で流せるという利点があるが、分解能は長いカラムの方が高かった。そこで各カラムについて、カラム圧が 140 ~ 150kgf / cm² の範囲になるように移動相の流速を調整し、標準化合物として選んだ 16 種の PAHs(ナフタレン、アセナフテン、アセナフチレン、フルオレン、フェナントレン、アントラセン、ピレン、フルオランテン、ベンゾ[a]アントラセン、クリセン、ベンゾ[b]フルオランテン、ベンゾ[k]フルオランテン、ベンゾ[a]ピレン、ジベンゾ[a,h]アントラセン、ベンゾ[ghi]ペリレンとインデノ[1,2,3-cd]ピレン)が 1 分以内のできるだけ遅い時間に溶出するように移動相のアセトニトリル/水比を変化させた。その結果、粒子径が 5 μ m と 3 μ m のいずれのカラムについても長いカラムのほうが分解能は高かった。ところが、粒子径が 5 μ m では 25 cm 長のカラムと、粒子径が 3 μ m では 15 cm 長のカラムでは移動相に 100%アセトニトリルを用いても 1 分以内の溶出はできなかった。また、粒子径による分離の大きな違いはなかった。

以上のように、パッキドカラムで種々の条件検討を行ったが、短いカラムでは、カラムのデッドボリュームが小さくピーク先端が早いために、最も早く溶出するナフタレンの保持時間は早い。このために各化合物間の間隔は大きいとピーク幅は大きいために分離が不十分である。一方、カラムの長さを長くするほどピーク幅は小さくなり分離はよくなるが、カラムのデッドボリュームが大きくなりピーク先端が遅くなるために、最も早く溶出するナフタレンの保持時間は遅くなる。このため、各化合物ピークの間隔は集中し、混雑した。パッキドカラムを用いる限りこのような問題点があるために、二次元のカラムとしては適切ではないことが分かった。

一方モノリスカラムの場合は、カラムのデッドボリュームはパッキドカラムと同様ではあるが、同じカラム圧で比較した場合に 5 倍程度の大きな流速で移動相を流せるので、ピーク先端の時間は 1/5 となり、各化合物のピーク間隔は改善され、ピークの分離も良好であった。このため、二次元のカラムとしてモノリスカラムを用いることにした。研究当初は、内径が 4.6mm のモノリスカラム(メルク、Chromolith Performance)しか市販されていなかったが、3mm、2mm と市販されたのでこれらを用いることにした。

次に一時限の検討を行った。一次元のカラ

ムは二次元のカラムと分離特性が異なることが必要である。大気中の発がん性/変異原性多環芳香族化合物、内分泌かく乱物質の代謝生成物、生薬中の残留農薬、魚介類中の内分泌かく乱物質の個々について種々のカラムを検討した。二次元のカラムの固定相はモノメリックタイプの C_{18} であるために一次元のカラムとして同じ種類の固定相を用いた場合は予想通り分離は悪かった。次に平面性認識能があるポリメリックタイプのカラム (GLサイエンス、Inertsil ODS-P) を用いた。多環芳香族炭化水素の benz[a]anthracene と chrysene の分離はよかったが、他の分析では分離が十分ではなかった。また、 C_8 と C_{30} では分離特性が C_{18} と似ているために分離は悪く、フェニル基とニトロフェニル基は保持が弱いために分離が悪かった。ピレニルエチル基では逆に保持が強すぎて、しかもピレニルエチル基が少しずつ離脱するために、蛍光検出器を使用した場合には、ベースラインが安定しなかった。一方、ペンタプロモベンジル基ではカラム長が 15cm のもの(特注品)を用いると保持が適度で、分離もよかった。個々の分析系について個別に条件を検討したが、大気中の発がん性/変異原性多環芳香族化合物の分析以外の内分泌かく乱物質の代謝生成物の分析、生薬中の残留農薬の分析、魚介類中の内分泌かく乱物質の分析についてはペンタプロモベンジル基が最適であった。

次に、大気中の発がん性/変異原性多環芳香族化合物の分析について検討した。多環芳香族炭化水素であり、特にきょう雑成分のため分析が困難な benz[a]anthracene と chrysene に最適な条件で分析を試みた。通常の HPLC では夾雑物質のために分析が困難であった benz[a]anthracene と chrysene が、包括的二次元 HPLC の条件を最適化することにより分析可能となった。

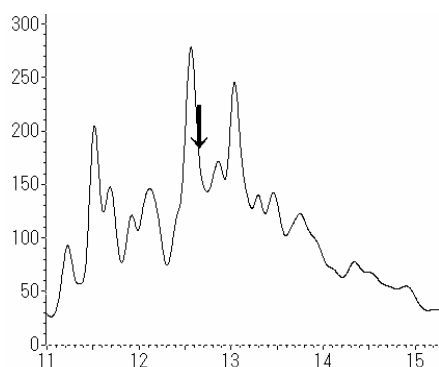


図3 通常の HPLC による分析(分析不可能) (↓ は benz[a]anthracene の溶出位置を示す)

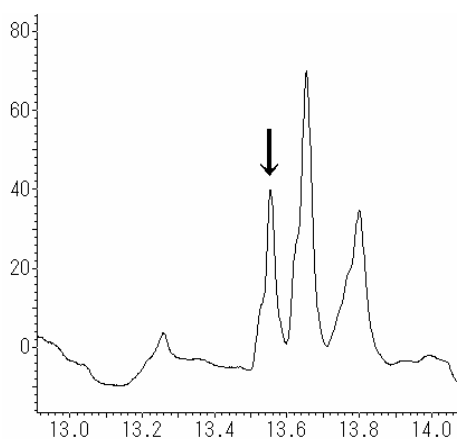


図4 包括的二次元 HPLC による分析(分析可能) (↓ は benz[a]anthracene の溶出位置を示す)

次に、内分泌かく乱物質の代謝生成物の分析について検討した。一次元としてペンタプロモベンジル基結合シリカゲルカラム、二次元としてモノリスカラムを用いると、基質のベンゾフェノンとその代謝物が完全分離できた。

生薬中の残留農薬分析と魚介類中の内分泌かく乱物質の分析については、最適分析条件は決定したが、マトリックスが複雑であるために、きょう雑物質との分離が十分ではなく、簡単なクリーンアップが必要であることがわかった。

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 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

村橋毅、北村繁幸、Precise determination of 4-ring polycyclic aromatic hydrocarbons by comprehensive 2-D HPLC、The 15th Asian Symposium on Ecotechnology、2008 年 10 月 19 日、石川県金沢市

村橋毅、北村繁幸、包括的二次元 HPLC による四環芳香族炭化水素の高精度分析、日本薬学会第 128 年会、2008 年 3 月 26 ~ 28 日、神奈川県横浜市

村橋毅、北村繁幸、包括的二次元 HPLC によるディーゼル排出粒子中の多環芳香族炭化水素の高精度分析、フォーラム 2007 衛生薬学・環境トキシコロジー、2007 年 11 月 1 ~ 2 日、大阪府大阪市

6 . 研究組織

(1)研究代表者

村橋 毅 (MURAHASHI TSUYOSHI)

日本薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：70340445

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし