

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 1 日現在

機関番号：37111

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23750092

研究課題名（和文） 正確且つ高精度 LCMS 測定のための新技術開発と基盤整備：分離指向誘導体化法の導入

研究課題名（英文） Development of a novel method for highly accurate and precise LC-MS analysis: introduction of separation-oriented derivatization method

研究代表者

巴山 忠 (HAYAMA TADASHI)

福岡大学・薬学部・助教

研究者番号：90549693

研究成果の概要（和文）：本研究では、フルオラスと呼ばれるパーフルオロアルキル基同士がもつ特異な親和性を利用した分離指向性誘導体化法を駆使し、測定対象物質の正確かつ高精度な LC-MS/MS 分析法の開発を行った。本法により、パーフルオロアルキル化された測定対象物質は、パーフルオロアルキル基修飾 LC カラムで極めて選択的に保持され、MS 検出において非フルオラス実試料マトリックスの影響を受けることなく、その測定を行うことが可能であった。

研究成果の概要（英文）：A separation-oriented derivatization method for highly accurate and precise LC-MS/MS analysis of target analytes has been developed utilizing affinity of perfluoroalkyl group and one another, namely fluorous. In this method, the matrix-induced effects during LC-MS analysis could be eliminated because the perfluoroalkylated analytes could be retained specifically on a perfluoroalkyl-modified LC column, whereas non-fluorous endogenous matrix components were poorly retained under the separation conditions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合科学・分析化学

キーワード：クロマトグラフィー，質量分析

1. 研究開始当初の背景

液体クロマトグラフィー-質量分析 (LC-MS) 法は、大気圧化学イオン化法の開発に伴って爆発的に普及し、今や創薬・バイオ研究をはじめとする多くの分野に欠かせない装置となっている。しかしながら、LC-MS 法も万能という訳ではなく、その性能が十分に発揮されない場合も少なくはない。とくに、生体成分や食品などといった夾雑成分を多く含む試料の分析の際に見られるレスポンスの変化（マトリックス効果）は、微量成分の正確な定量の妨げとなる。このマトリックス効果の原因は、MS 側ではなく、LC 側における試料夾雑成分（マトリックス）との不十分な分離に起因したものであり、その

分離を改善させることで、理論上は解決可能である。近年、超高速液体クロマトグラフィーやモノリスタイプのカラムなどが開発され、LC の分離性能の向上に貢献している。しかしながら、それらの性能も必ずしも十分であるとは言えず、マトリックス効果を回避し得る有用な新技術開発への要求は強まるばかりである。

2. 研究の目的

今回、LC-MS 分析におけるマトリックス効果を回避し得る画期的な方法を開発すべく、「分離指向性誘導体化法」を LC-MS 分析法に採り入れることとした。「誘導体化」と「LC-MS」とを組合せた手法は、従来より利

用されているが、それらは測定対象物質の安定したイオン化（MS における高感度化）に焦点を当てたものがほとんどである。一方、本研究にて開発する誘導体化法は、測定対象物質のみを LC カラムに選択的に保持させることに焦点を当てたものであり、従来までの方法とは一線を画す。すなわち本研究では、試料由来マトリックスと、分離指向性誘導体化を施した測定対象物質とを明確に分離させることで、マトリックス効果を回避させる方法を開発する。

3. 研究の方法

本研究では、分離指向性誘導体化法の開発を実現すべく、「フルオラス分離技術」の概念を導入する。フルオラスとは、「親フッ素性の」を意味する造語であり、パーフルオロアルキル基同士がもつ極性に関係のない特異な親和性のことを指す。本性質を利用し、測定対象物質にパーフルオロアルキル基を付加させることで、その誘導体をパーフルオロアルキル基が修飾された LC カラムに選択的・特異的に保持させることができる。一方、パーフルオロアルキル基が付加されない試料マトリックスは、カラムに保持されることなく溶出される。上述のとおり、LC-MS 分析におけるマトリックス効果とは、LC 部における試料マトリックスとの不十分な分離に起因するものであるため、フルオラス分離技術を用いて測定対象物質と試料マトリックスとを完全に分離させる本法は、マトリックス効果回避法として極めて有用な方法となり得る。今回、種々の生体関連物質を対象に、それぞれの化学的性状に応じた誘導体化反応を行なってフルオラス化した後、LC-MS/MS 分析に供して本法の有用性を検証した。

4. 研究成果

(1) フルオラス誘導体化法による生理活性アミン類の LC-MS/MS 分析

フルオラス誘導体化法を生理活性アミン類（dopamine, norepinephrine, 3-methoxytyramine, normetanephrine, tyramine, serotonin, tryptamine, 5-methoxytryptamine 及び histamine）の LC-MS/MS 分析へ適用した。誘導体化試薬には、2*H*, 2*H*, 3*H*, 3*H*-perfluoroundecan-1-ol (PFUA) を用い、還元剤 2-picoline borane (2-PB) の存在下、還元のアミノ化反応により、対象アミン類をフルオラス化した（図 1-1）。今回、対象としたアミン類は全て一級アミン類であり、本反応によって、1 分子当たり 2 つのフルオラス基を導入（バイナリーフルオラス化）できる。当初目的のとおり、得られた誘導体はフルオラス LC カラムに強力に保持され、非フルオラス体と明確に分離することが可能であった

（図 1-2）。さらに、本法をヒト血漿試料中生理活性アミン類の分析に適用したところ、試料夾雑物（リン脂質など）によるマトリックス効果の影響を受けることなく、極微量な対象アミン類を正確かつ高精度に測定することに成功した。

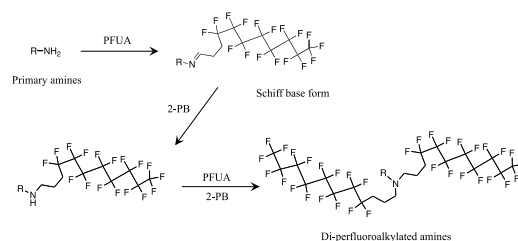


図 1-1 生理活性アミン類のフルオラス誘導体化反応

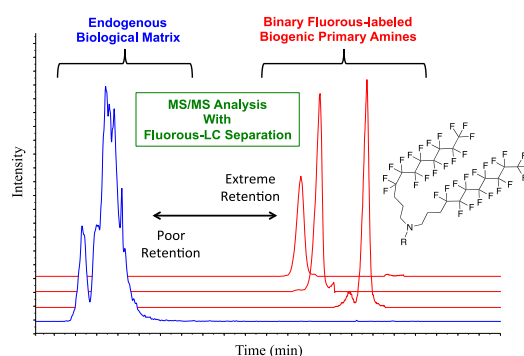


図 1-2 フルオラス LC カラムによる分離

(2) フルオラス誘導体化法によるシアリルオリゴ糖の LC-MS/MS 分析

フルオラス誘導体化法をシアリルオリゴ糖 {3'-sialyllactose (3'-SL), 6'-sialyllactose (6'-SL), sialyllacto-*N*-tetraose a (LSTa), sialyllacto-*N*-tetraose b (LSTb), sialyllacto-*N*-tetraose c (LSTc) 及び disialyllacto-*N*-tetraose (DSLNT)} の LC-MS/MS 分析に適用した。誘導体化試薬には、4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11,11-heptafluoroundecylamine (HFUA) を用い、縮合剤 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloride (DMT-MM) の存在下、アミド化反応により、対象シアリルオリゴ糖をフルオラス化した（図 2-1）。本法によってフルオラス化されたシアリルオリゴ糖は、フルオラス LC カラムによって強力に保持され、試料夾雑物との分離が良好であるばかりか、各シアリルオリゴ糖の分岐異性体同士の分離を行うことも可能であった。本法をヒト尿及びヒト母乳中における遊離シアリルオリゴ糖分析に適用したところ、いずれもマトリックス効果を受けることなく、それらの測定を行うことが可能であった（図 2-2）。以上の結果から、極めて極性の高い糖鎖の測定にも本フルオラス誘導体化法は有用であり、広範

圈の物質へ適用できる可能性が見出せた。

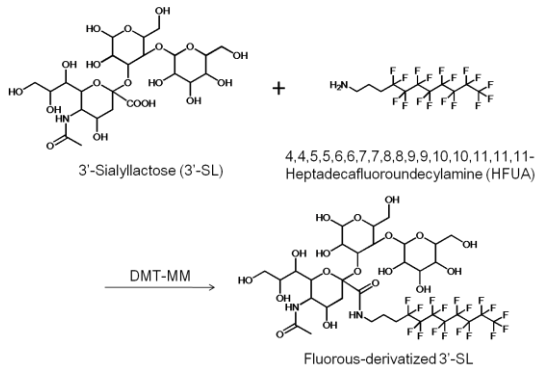


図 2-1 シアリオリゴ糖のフルオラス誘導体化反応

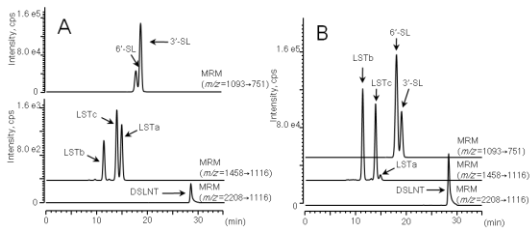


図 2-1 ヒト尿 (A) 及びヒト母乳 (B) 中におけるシアリオリゴ糖の分析

(3) フルオラス誘導体化法によるアミノ酸類のダイレクト MS/MS 分析

フルオラス誘導体化法をアミノ酸分析に適用した。上述までの方法は、測定対象物質をフルオラス化した後、フルオラス LC カラムにより選択的分離を行っていた。しかしながら、カラム分離法は、多検体試料の処理に適しているとは必ずしも言えない。そこで、フルオラス化した測定対象物質 (アミノ酸) を、フルオラス固相カラムで前処理し、その溶出液を直接 MS/MS 分析する方法を考案した。フルオラス誘導体化反応は、上記 (1) と同様、PFUA による還元的アミノ化を採用し、アミノ酸構造上の一級アミンをバイナリーフルオラス化した。次いで、市販のフルオラス固相カラムを用い、バイナリーフルオラス化体のみを選択的に保持させる条件の最適化を行った。その結果、バイナリーフルオラス体を、非フルオラス体、フルオラス試薬自身及び 2 級アミン類 (プロリン) などと明確に分離できる固相抽出条件の確立に成功した。また、得られた溶出液を直接 MS/MS 分析に供したところ、十分な再現性をもってアミノ酸類を測定することができた (図 3-1)。現在、多検体試料の高速処理化に向けて、本フルオラス固相抽出処理の自動化を検討中であり、実試料分析への有用性の検証と併せて本法の確立を行なっていく予定である。

Compound	R.S.D. ^{a)} (n=3, %)	Detection limit ^{b)} (fmol)	Linearity ^{c)} , R ²
1. Ala	2.8	0.14	0.9978
2. Arg	5.6	0.32	0.9994
3. Asn	1.5	0.22	0.9997
4. Asp	0.7	0.46	0.9998
5. Cit	5	0.56	0.9982
6. Glu	2.4	0.99	0.9976
7. Gly	1.2	0.15	0.9982
8. His	2.6	0.31	0.9994
9. Ile	2.6	0.29	0.9995
10. Met	2.1	0.54	0.9981
11. Phe	1.2	0.52	0.9988
12. Ser	2.1	0.82	0.9993
13. Thr	2.9	0.22	0.9949
14. Tyr	4	0.22	0.9963
15. Val	0.8	0.26	0.9998
16. Trp	3.5	0.55	0.9967
17. Lys	8.7	0.48	0.996

a) Relative standard deviation of peak area for 10 μM amino acids.
b) Defined as the amount in 5 μL injection giving a signal-to-noise ratio of 3.
c) Calibration curve in range of 2.5 fmol – 250 fmol per 5 μL injection.

図 3-1 フルオラス固相抽出-ダイレクト MS/MS 分析によるアミノ酸類のバリデーション結果

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 5 件)

(1) K. Todoroki, H. Hashimoto, K. Machida, M. Itoyama, T. Hayama, H. Yoshida, H. Nohta, M. Nakashima, M. Yamaguchi, Fully Automated Reagent Peak-Free Liquid Chromatography Fluorescence Analysis of Highly Polar Carboxylic Acids Using A Column-Switching System And Fluorous Scavenging-Derivatization, *J. Sep. Sci.* (査読有), **36** (2013) 232-238.

(2) T. Hayama, K. Kato, T. Aoki, M. Itoyama, K. Todoroki, H. Yoshida, M. Yamaguchi, H. Nohta, Liquid Chromatographic Determination of Microcystins in Water Samples Following Pre-Column Excimer Fluorescence Derivatization with 4-(1-Pyrene)butanoic Acid Hydrazide, *Anal. Chim. Acta* (査読有), **755** (2012) 93-99.

(3) T. Hayama, Y. Sakaguchi, H. Yoshida, M. Itoyama, K. Todoroki, M. Yamaguchi, H. Nohta, Binary Fluorous Alkylation of Biogenic Primary Amines with Perfluorinated Aldehyde Followed by Fluorous Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Analysis, *Anal. Chem.* (査読有), **84** (2012) 8407-8414.

(4) Y. Sakaguchi, H. Yoshida, T. Hayama, M. Itoyama, K. Todoroki, M. Yamaguchi, H. Nohta, Selective Liquid-Chromatographic Determination of Native Fluorescent Biogenic Amines in Human Urine Based on Fluorous Derivatization, *J. Chromatogr. A* (査読有), **1218** (2011) 5581-5586.

(5) Y. Sakaguchi, H. Yoshida, T. Hayama, M. Yoshitake, M. Itoyama, K. Todoroki, M. Yamaguchi, H. Nohta, Fluorous Derivatization and Fluorous-phase Separation for Fluorometric Determination of Naproxen And Felbinac in Human Plasma, *J. Pharm. Biomed. Anal.* (査読

有) 55 (2011) 176-180.

[学会発表] (計 30 件)

(1) 田尾智美, 巴山忠, 部谷本知佐子, 川見祐介, 糸山美紀, 吉田秀幸, 能田均, 山口政俊, フルオラスイオンペア剤を利用したリン酸基含有化合物の選択的抽出法の開発, *日本薬学会第133年会* (横浜), 2013年3月28日

(2) 川見祐介, 檜崎弘毅, 坂口洋平, 糸山美紀, 巴山忠, 吉田秀幸, 能田均, 山口政俊, リン酸基の特異的親和性を利用した分離指向性誘導体化-HPLC 分析法の開発, *第29回日本薬学会九州支部大会* (熊本), 2012年12月8日

(3) 山崎見全, 巴山忠, 吉武誠, 川見祐介, 糸山美紀, 吉田秀幸, 能田均, 山口政俊, オンラインプレカラム誘導体化によるアミノ酸の HPLC 蛍光分析, *第29回日本薬学会九州支部大会* (熊本), 2012年12月8日

(4) 清川恵奈, 福本麻美, 糸山美紀, 川見祐介, 巴山忠, 吉田秀幸, 能田均, 山口政俊, Schotten-Baumann 反応を利用した含水試料中アルコール類の蛍光誘導体化 HPLC 分析, *第29回日本薬学会九州支部大会* (熊本), 2012年12月8日

(5) 玉嶋江莉奈, 巴山忠, 坂口洋平, 川見祐介, 糸山美紀, 吉田秀幸, 能田均, 山口政俊, バイナリーフルオラス誘導体化法によるアミノ酸のタンデムマス分析, *第23回クロマトグラフィー科学会議* (岐阜), 2012年11月16日

(6) 井上貴文, 吉田秀幸, 佐々木知美, 坂口洋平, 川見祐介, 糸山美紀, 巴山忠, 能田均, 山口政俊, エキシマー蛍光誘導体化によるアルコール類の LC 分析, *第23回クロマトグラフィー科学会議* (岐阜), 2012年11月16日

(7) 巴山忠, 岩松知美, 坂口洋平, 川見祐介, 糸山美紀, 吉田秀幸, 能田均, 山口政俊, 5-ヒドロキシインドール類の高感度 HPLC-蛍光分析: 分散液液マイクロ抽出による誘導体化と試料濃縮, *第10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 (PPF2012)* (京都) 2012年8月6日

(8) 坂口洋平, 松竹紀子, 巴山忠, 吉田秀幸, 川見祐介, 糸山美紀, 能田均, 山口政俊, フルオラス-蛍光誘導体化によるアミン類の選択的 HPLC 分析, *第10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 (PPF2012)* (京都) 2012年8月6日

(9) 松竹紀子, 中村郁勝, 坂口洋平, 吉田秀幸, 川見祐介, 糸山美紀, 巴山忠, 能田均, 山口政俊, フルオラス分離技術を用いたアミン類の蛍光誘導体化-LC 分析, *第30回九州分析化学若手の会夏季セミナー* (指宿) 2012年7月27日

(10) 清川恵奈, 福本麻美, 糸山美紀, 川見祐介, 巴山忠, 吉田秀幸, 能田均, 山口政俊, 含水試料中アルコール類の蛍光誘導体化 HPLC 分析, *第30回九州分析化学若手の会夏季セミナー* (指宿) 2012年7月27日

(11) 岩松知美, 蕨内由里香, 坂口洋平, 巴山忠, 川見祐介, 糸山美紀, 吉田秀幸, 能田均, 山口政俊, 分散液液マイクロ抽出-誘導体化による 5-ヒドロキシインドール類の高感度 HPLC-蛍光分析, *第30回九州分析化学若手の会夏季セミナー* (指宿) 2012年7月27日

(12) 玉嶋江莉奈, 巴山忠, 坂口洋平, 川見祐介, 糸山美紀, 吉田秀幸, 能田均, 山口政俊, フルオラス分離技術を利用したフォーカシング分析法のための基礎検討, *第30回九州分析化学若手の会夏季セミナー* (指宿) 2012年7月27日

(13) 坂口洋平, 蕨内由里香, 巴山忠, 吉田秀幸, 糸山美紀, 能田均, 山口政俊, 還元的ジフルオラスアルキル化による生理活性アミン類の高選択的 LC-MS/MS 分析, *第72回分析化学討論会* (鹿児島) 2012年5月19日

(14) 井上貴文, 坂口洋平, 佐々木知美, 吉田秀幸, 糸山美紀, 巴山忠, 能田均, 山口政俊, エキシマー蛍光誘導体化によるジオール類の HPLC 分析, *第28回日本薬学会九州支部大会* (福岡) 2011年12月10日

(15) 坂口洋平, 巴山忠, 吉田秀幸, 糸山美紀, 能田均, 山口政俊, イオンペア-フルオラス分離技術によるメチル化アルギニンの LC-MS/MS 分析, *第22回クロマトグラフィー科学会議* (仙台) 2011年10月21日

(16) 巴山忠, 有元麻美, 竹下龍次, 糸山美紀, 吉田秀幸, 能田均, 山口政俊, 常時荷電化による生理活性アミン類の高感度 LC-MS/MS 分析, *第22回クロマトグラフィー科学会議* (仙台) 2011年10月21日

(17) 後藤しおり, 巴山忠, 糸山美紀, 吉田秀幸, 能田均, 山口政俊, フルオラス及び蛍光誘導体化を利用したポリアミン類の選択的 LC 分析, *第4回フルオラス科学研究会シンポジウム* (大阪) 2011年10月7日

(18) 池永純, 吉田秀幸, 坂口洋平, 糸山美紀, 巴山忠, 能田均, 山口政俊, フルオラス蛍光誘導体化による 5-ヒドロキシインドール類の高選択的分析, *第4回フルオラス科学研究会シンポジウム* (大阪) 2011年10月7日

(19) 坂口洋平, 巴山忠, 吉田秀幸, 糸山美紀, 能田均, 山口政俊, フルオラス誘導体化-LC-MS/MS 法によるシアリルオリゴ糖の高感度かつ高選択的分析, *第4回フルオラス科学研究会シンポジウム* (大阪) 2011年10月7日

(20) 轟木堅一郎, 橋本裕輝, 森俊訓, 町

田和之, 糸山美紀, 巴山忠, 吉田秀幸, 能田均, 中島学, 山口政俊, Fluorous Scavenging Derivatization 法による高極性有機酸の高感度 HPLC 分析法の開発と病態モデルマウス尿試料分析への適用, 第9 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 (PPF2011) (箱根) 2011 年 9 月 12 日

(21) 中村優佑, 榑崎弘毅, 吹上勇真, 高橋えりか, 糸山美紀, 巴山忠, 吉田秀幸, 能田均, 山口政俊, Click reaction を基盤とするエチニルエストラジオールおよびノルエチステロンの分析法の開発, 第29 回九州分析化学若手の会夏季セミナー (北九州) 2011 年 7 月 28 日

(22) 後藤しおり, 大石千尋, 北畑和寛, 巴山忠, 糸山美紀, 吉田秀幸, 能田均, 山口政俊, 選択的分離を指向した誘導体化によるポリアミン類の LC 蛍光分析, 第29 回九州分析化学若手の会夏季セミナー (北九州) 2011 年 7 月 28 日

(23) 池田成見, 岩松知美, 坂口洋平, 巴山忠, 吉田秀幸, 糸山美紀, 能田均, 山口政俊, フルオラス分離技術を用いたパーフルオロ関連化合物の蛍光誘導体化-LC 分析, 第29 回九州分析化学若手の会夏季セミナー (北九州) 2011 年 7 月 28 日

(24) 山崎見全, 磯浜優香里, 巴山忠, 吉武誠, 糸山美紀, 吉田秀幸, 能田均, 山口政俊, オンラインプレカラム蛍光誘導体化によるアミン類の HPLC 分析, 第29 回九州分析化学若手の会夏季セミナー (北九州) 2011 年 7 月 28 日

(25) 坂口洋平, 巴山忠, 吉田秀幸, 糸山美紀, 轟木堅一郎, 能田均, 山口政俊, フルオラス誘導体化-LC-MS/MS 法によるシアル酸関連化合物の高感度かつ高選択的分析 (4) 糖鎖性腫瘍マーカーへの適用, 第48 回化学関連支部合同九州大会 (北九州) 2011 年 7 月 9 日

(26) 森俊訓, 橋本裕輝, 轟木堅一郎, 町田和之, 糸山美紀, 巴山忠, 吉田秀幸, 能田均, 中島学, 山口政俊, Fluorous Scavenging Derivatization (FSD) 法による病態モデルマウス尿中有機酸の蛍光誘導体化-HPLC 分析, 第48 回化学関連支部合同九州大会 (北九州) 2011 年 7 月 9 日

(27) 山下大貴, 坂口洋平, 池永純, 吉田秀幸, 糸山美紀, 巴山忠, 轟木堅一郎, 能田均, 山口政俊, フルオラス誘導体化-オンライン濃縮-蛍光検出法による自然蛍光性カルボン酸の高選択的 LC 分析, 第48 回化学関連支部合同九州大会 (北九州) 2011 年 7 月 9 日

(28) 川見祐介, 坂口洋平, 吉田秀幸, 巴山忠, 糸山美紀, 轟木堅一郎, 能田均, 山口政俊, ペンタフルオロフェニル構造を用いる分離指向性誘導体化法の開発, 第18 回クロマトグラフィーシンポジウム (福岡) 2011 年

6 月 4 日

(29) Y. Sakaguchi, T. Hayama, H. Yoshida, M. Itoyama, K. Todoroki, H. Nohta, M. Yamaguchi, Analysis of Sialo-Sugar Chains Using Fluorous Derivatization Followed by Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry, IUPAC International Congress on Analytical Sciences 2011 (京都) 2011 年 5 月 23 日

(30) T. Hayama, R. Abe, R. Kuroki, M. Itoyama, K. Todoroki, H. Yoshida, H. Nohta, M. Yamaguchi, Fluorous Derivatization Combined with LC-MS/MS: Matrix Effect-Free Method for The Determination of Biogenic Amines, IUPAC International Congress on Analytical Sciences 2011 (京都) 2011 年 5 月 23 日

[その他]

ホームページ等

<http://www.pha.fukuoka-u.ac.jp/user/bunseki/web/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

巴山 忠 (HAYAMA TADASHI)

福岡大学・薬学部・助教

研究者番号: 90549693