

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25288064

研究課題名(和文)生物環境試料中の超微量有機および金属化学種の新規な絶対定量法

研究課題名(英文) Absolute determination methods for trace organic and inorganic species in biological and environmental samples

研究代表者

井村 久則 (Imura, Hisanori)

金沢大学・物質化学系・教授

研究者番号：60142923

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：安定同位体およびキラリティーを利用した絶対定量法は、比較標準を必要とせず、試料からの目的成分の定量的な回収も必要なく、精確な定量が可能である。生物環境試料中の超微量の無機および有機化学種に対し、新規な分離法と計測法に基づく絶対定量法の開発を目指し、主に1)ミクロシチンの酸化分解化合物3-メトキシ-2-メチル-4-フェニル酪酸のキラリキャピラリー電気泳動分析、2)水溶性ポルフィリンの液液界面吸着化学種の偏光変調全内部反射蛍光分光法の開発、3)アミノ酸類の不足当量同位体希釈NMR分析法の開発、4)同位体交換反応を用いる微量銅(I,II)化学種の同位体希釈質量分析などの成果を得た。

研究成果の概要(英文)：Absolute determination methods based on the isotope dilution principle using radio or stable isotopes or enantiomeric isomers are accurate and precise analytical methods in which any comparison standards and the quantitative recovery of the chemical species in question are not necessary. In this study, the following works are pursued. 1) capillary electrophoresis for the enantiomeric isomer dilution of 3-methoxy-2-methyl-4-phenylbutyric acid which is the common product derived from microcystins, 2) development of the polarization-modulation total internal reflection fluorescence spectroscopy (PM-TIRF) for adsorbed species of water-soluble porphyrins at liquid/liquid interfaces, 3) development of the substoichiometric isotope dilution NMR analysis for trace amino acids, 4) fundamental study of the species-selective isotope dilution analysis of copper(I,II).

研究分野：分析化学

キーワード：環境分析 絶対定量 キラル分離 同位体 微量化学種

1. 研究開始当初の背景

近年、食品や医薬品を含む製品の安全性から地球規模での環境問題にいたるまで、化学分析の重要性が社会的に広く認識され、使用される分析法の信頼性を、国境を超えていかに保証するかが重要な課題となっている。今日まで、様々な分析機器および機器分析法が開発されてきているが、そのほとんどの定量原理は、目的物質の標準を用いて試料と標準から得られる目的物質のシグナル強度を比較するだけの比較法や検量線法(標準添加法や内標準法も含まれる)であり、その点においては特段の進歩は見られない。一方、重量分析や容量分析を始めとする絶対定量法はいかなる検量線も比較標準も必要とせず、分析試料を計測することによって得られる数値と基本物理定数のみから目的成分の物質質量(モル)を決定する正確さの優れた定量法であり、分析の信頼性を保証するSIトレーサビリティの最上位に位置する。特に、同位体希釈の原理の基づく絶対定量法は、試料からの目的成分の定量的な回収や回収率の補正の必要がなく、複雑なマトリックスからなる環境試料や生物体試料中の超微量成分の定量に最も適した方法である。例えば、同位体希釈質量分析(IDMS)は、環境標準物質の値付けには不可欠の定量法であり、各国の主要研究機関で用いられている。しかし、IDMSにも質量分析計における質量差別効果や分子イオンの重なり、さらに、有機化合物のフラグメンテーション、同位体分別などの問題がある。

光学活性な有機化合物は、生体関連物質、医薬品、農薬などに数多く存在する。光学異性体は、一般にアキラルな場において同一の物理化学的挙動をとり、キラルな場においてのみ異性体(エナンチオマー)の物理化学的挙動に差を生じる。従って、光学異性体は、元素における同位体と類似の関係にあり、同位体希釈の原理が光学活性な物質の定量に適用できるはずである。すなわち、あるエナンチオマー比の目的物質を含む試料に、それとは異なるエナンチオマー比をもつ既知量の目的物質をスパイクし、エナンチオマー比の変化を測定すれば、試料からの定量的な回収も、回収率の補正も必要なく定量ができる。これにより、一般の検量線法に比べて、実試料の前分離、前濃縮等の分析操作は極めて容易になり、且つ正確な定量が可能になる。エナンチオマー比やエナンチオマー過剰率の測定は従来から行われているが、絶対定量法に結びつける発想はなかった。

研究代表者らは、除草剤として広く用いられている含リンアミノ酸のL-グル

ホシネートの分析において、このキラリティー利用絶対定量法(EIDA)を適用し、また、トリペプチドであるピアラフォスについても、酸加水分解を組み合わせることで正確に定量できることを実証した(H. Imura et al., Anal. Sci., **21**, 31 (2005))。さらに、河川水中の環境基準レベルの超微量D,L-グルホシネートの定量にも成功している(H. Imura et al., Anal. Sci., **22**, 1489 (2006))。

一方、同位体希釈分析法においては、放射性同位体を用いる方法と安定同位体を用いる方法とがある。前者については、目的成分に対し不足当量の反応試薬を用いて目的成分の一部を分離し、そこに含まれる放射能を測定するだけで定量できる優れた方法があり不足当量分析法として知られている。研究代表者らは、安定同位体を利用する定量法として、不足当量分離とIDMSを組み合わせた不足当量同位体希釈質量分析法(SIDMS)を開発し、その有用性を明らかにした(H. Imura, Hitachi Scientific Instrument News, **43**, 3991, 2001など)。その定量原理から、質量分析のほかにも同位体の識別が可能ならゆる検出法が利用できるはずであり、実際に⁷Li NMRを用いてリチウムの同位体希釈分析が可能なることを報告している(H. Imura et al., International Symposium on Metallomics 2007, Nagoya)。

2. 研究の目的

安定同位体およびキラリティーを利用した絶対定量法は、その原理が一般の検量線法とは異なり、比較標準を必要とせず、試料からの目的成分の定量的な回収や回収率の補正も必要なく、簡便・迅速な操作で正確な定量が可能である。本研究では複雑なマトリックス中の微量の無機および有機化学種に対し、新規な分離法と計測法に基づく絶対定量法を開発を目的とする。新しい概念であるキラリティーを利用した絶対定量法EIDAの、環境有害ペプチドなどのより複雑で微量の有機物質の定量への適用を目指し、新規な高感度キラル分離法および測定法を研究した。一方、安定同位体を利用した絶対定量法として、不足当量分離と¹H NMRを組み合わせたアミノ酸類の同位体希釈NMR分析法、多価金属の化学種選択的同位体希釈質量分析法を研究した。

3. 研究の方法

(1) キャピラリー電気泳動による光学異性体分離法

泳動液として、硫酸ナトリウムでイオ

ン強度を調整した pH 緩衝液に、キラルセクターとして各種のシクロデキストリンを所定量溶解して用いた。試料は中性マーカーとしてのジメチルホルムアミドとともに、泳動液と同じ組成の溶液に溶解した。キャピラリー電気泳動装置は P/ACE system MDQ (Beckman-Coulter) であり、キャピラリーとして、内径 50–51 μm 、全長 60 cm、有効長 50 cm の溶融石英キャピラリー (Polymicro Technologies)、および COSMO(+) キャピラリー (Nacalai Tesque) を用いた。試料注入は 0.5 psi (圧力)、5 s で行い、印加電圧 ± 20 kV、泳動温度 25 $^{\circ}\text{C}$ 、測定波長 190–300 nm とした。

(2) 液液界面吸着化学種の高感度測定法

水相と 1,2-ジクロロエタン相の界面を四電極式ポテンシオスタットで分極し、水溶性ポルフィリンの相間移動および吸着挙動を制御した。液液界面に励起光を全内部反射条件で入射して界面近傍の化学種を励起し、電位変調蛍光分光法 (PMF) と本研究で開発した偏光変調全内部反射蛍光分光法 (PM-TIRF) により、水溶性ポルフィリンの界面反応挙動を解析した。PM-TIRF 測定では、励起光は液晶移相子を用いて p 偏光から s 偏光に一定の周波数で変調し、界面直下の垂直方向から得られる蛍光強度の交流成分をロックインアンプにより検出した。

(3) NMR を用いる不足当量同位体希釈分析法

種々のアミノ酸および疎水性有機アニオンを含む水相と、18-クラウン-6 (18C6) を含むジクロロメタンあるいはクロロホルムを 30 分間振とうした。抽出の基礎検討では、ニンヒドリンによる吸光度法によりアミノ酸を定量し、抽出率を算出した。 ^1H NMR 測定には ECS-400 (日本電子) を用い、内標準として 0.1% (w/w) CH_2Cl_2 を含む重水素化溶媒に目的アミノ酸を不足当量抽出し、測定溶液とした。

(4) 金属化学種の同位体交換法

5.0×10^{-5} – 3.0×10^{-4} M Cu^{II} (濃縮同位体: ^{63}Cu , ^{65}Cu の存在比 $A_{63}/A_{65} = 908$) と 1.0×10^{-1} M NaClO_4 を含む水相に、有機相として、あらかじめ調製した 5.0×10^{-4} M Cu^{I} 錯体 (天然存在比: $A_{63}/A_{65} = 2.24$) を含むクロロホルムを加え、1–60 分間振とうした。 Cu^{I} 錯体溶液の調製には、水相に還元剤として 1.0×10^{-4} – 5.0×10^{-4} M グルタチオン (GSH) を添加した。有機相の Cu^{I} を 1 M HNO_3 で逆抽出し、両相の ^{63}Cu , ^{65}Cu を ICP-MS で測定し、同位体比 (A_{63}/A_{65}) を求めた。

4. 研究成果

(1) キャピラリー電気泳動によるマイクロシスチン酸化分解化合物のキラル分離・定量

マイクロシスチン (MC) は、富栄養化の進んだ湖沼に発生するシアノバクテリアが産生する強毒性の環状ペプチドである。MC は 7 個のアミノ酸が環状に連なった構造をとっており、種々の同族体が存在することから、MC 全量の定量は一般に困難である。そこで、共通アミノ酸部から得られる酸化分解化合物 3-メトキシ-2-メチル-4-フェニル酪酸 (MMPB) を定量することにより、MC 同族体の全量を求める方法が開発されている。MMPB の定量には、一般にクロマトグラフィー/質量分析 (GC/MS や LC/MS) が用いられているが、MMPB は不斉炭素を 2 つ持つことから、MMPB のキラリティーを利用した EIDA の適用が期待される。

本研究では、erythro-MMPB のキラル分離・定量を目指し、シクロデキストリン (CD) をキラルセクターとするキャピラリーゾーン電気泳動 (CZE) を用いて研究した。MMPB と種々の CD の包接錯体生成定数を求め、キラル分離の最適条件を明らかにした。

MMPB の移動度 (μ_e) に対する pH と CD 濃度の影響について、pH 2–10, $[\text{CD}] = 0$ –30 mM の範囲で検討した。MMPB の移動度に対する CD の効果は $\alpha\text{-CD} \ll \beta\text{-CD} \gg \gamma\text{-CD}$ となり、この順番に包接しやすくなるものと考えられる。3 次元非線形最少二乗フィッティングにより $\beta\text{-CD}$ との包接錯体の生成定数を求めたところ、酸型 (HA) および解離型 (A^-) の MMPB で、それぞれ $\log K_{\text{HA-CD}} = 3.24$ (3.21), $\log K_{\text{A-CD}} = 2.86$ という大きな生成定数を得た。また、酸型の MMPB でのみエナンチオマー間で生成定数に差が見られたことから、MMPB の pK_a と電気泳動移動度 (μ_{A^-})、包接錯体の生成定数と移動度 ($\mu_{\text{A-CD}}$) などを用いて最適のキラル分離条件を算出し、pH 4.3, $[\beta\text{-CD}] = 8$ mM において、分離度 1.5 を達成した。

MMPB 存在下で MC の酸化分解を含む前処理および CZE 分析を試みた。内標準を用いた検量線法によって酸化分解を含む前処理における MMPB の回収率を求めたところ、回収率 91% が得られた。CD-CZE 測定では、MMPB のキラル分離も確認でき、絶対定量への適用が期待される。

(2) 液液界面吸着化学種の高感度測定法の開発と水溶性ポルフィリンの電位依存吸着現象の解明

二種の混じり合わない溶液の境界領域である液液界面は、イオン種の相間移動や吸着反応などが生じる二次元特異反応場である。また、リン脂質などの界面活性分子が吸着した液液界面は生体膜のモデル反応場としても機能することから、生体関連物質の膜透過反応や薬物動態評価などの研究に用いられている。界面で生じる吸着化学種の分子配向や会合、組織化は、二相間で生じる不均一反応の機構に大きな影響を与えることが知られている。界面領域の電荷移動反応の研究に用いられる電位変調蛍光分光法 (PMF) は、界面における蛍光分子のイオン移動や吸着過程などの動的挙動を選択的に検出でき、多くの反応系に応用されてきた。しかし、界面化学種の吸着状態や分子配向などのキャラクタリゼーションは容易でなく、より簡便かつ高感度な測定法の開発が望まれている。赤外分光法などで多用される偏光変調分光法は、配向特性を有する吸着化学種のみを高感度、高選択的に測定できるが、液液界面に適用された例は報告されていなかった。

本研究では、液液界面の研究に広く用いられてきた全内部反射蛍光分光法を進展させ、偏光変調法を組み合わせた偏光変調全内部反射蛍光分光法 (PM-TIRF) を開発した。ポルフィリンはその環内に2つの直行する双極子モーメントを持つため、界面で観測される蛍光強度の偏光入射光に対する依存性から、吸着化学種の配向性が分かるはずであり、電気化学的に分極された液液界面において吸着した水溶性ポルフィリンの吸着・配向特性および界面特異的に生成する会合体について、PM-TIRFを用いた分光学的解析を実施した。

PM-TIRF測定では、原理的にバルク相化学種に起因する分光応答の影響を受けず、界面に吸着配向した分子のみが検出できる。meso位にカチオン性のメチルピリジル基を有するポルフィリン H_2TMPyP^{4+} とアニオン性のスルホナトフェニル基を持つポルフィリン H_2TPPS^{4-} では、PMFにおいて吸着応答が示された電位領域において強いPM-TIRF応答が得られた。PM-TIRF応答の信号位相と強度変化からポルフィリン環の配向角を解析し、 H_2TMPyP^{4+} と H_2TPPS^{4-} の配向角は界面法線に対してそれぞれ $61 \pm 1^\circ$ および $65 \pm 1^\circ$ と決定された。配向角は電位に対して依存せず、ほぼ一定であった。信号強度はイオン移動電位付近で極大値を示し、界面濃度がイオン移動電位近傍で最大となることが確認された。また、PM-TIRF応答の波長依存性から界面吸着状態のキャラクタリゼーションを行うことに成功し、界面の水相側に吸着し

たポルフィリンが部分的に脱水和された状態で吸着配向していることを明らかにした。さらに、 H_2TPPS^{4-} のプロトン付加体である H_4TPPS^{2-} は様々な溶液界面においてJ会合体を形成することが知られているため、 H_4TPPS^{2-} の界面会合挙動についてPM-TIRFによる解析を行った。バルク相で会合が生じない低濃度条件においても、界面領域でJ会合体が形成されることを見いだした。生体内において重要な機能を有するプロトポルフィリンIX (H_2PP^{2-}) についても同様に研究した結果、強い界面吸着性と単量体の直立に近い配向特性、および界面特異的なJ会合体形成に起因する分光特性の変化が確認された。また、リン脂質を吸着させた生体膜模倣液液界面では、 H_2PP^{2-} の吸着反応が阻害され、会合体形成が抑制されることが明らかになった。本研究で開発したPM-TIRFは、分子が特定の配向を示さないイオン移動過程や溶液内共存種の影響を受けないため、界面化学種の吸着状態について高選択的な分光解析を行うことが可能である。界面のイオン移動反応の研究に利用できるPMFと併用することにより、イオン種の界面反応における動的過程と吸着配向特性の電位依存性について多面的な検討を行うことが可能となった。今後、界面でのポルフィリン会合体のキラリティ発現を利用したキララ分析法への展開が期待される。

(3) アミノ酸の不足当量同位体希釈NMR分析法

同位体希釈分析法は、目的成分の定量的な回収を必要としない絶対定量法であり、質量分析と結合した方法で、基準分析法として様々な元素や化合物の定量に用いられている。一方、目的成分の不足当量分離を組み合わせた不足当量同位体希釈分析法は、使用する同位体及び同位体検出法に制約がなく、これまでに質量分析や多核NMRを用いた定量法を開発してきた。本研究では、重要な生体物質であるアミノ酸の絶対定量法として、 1H NMRを用いた不足当量同位体希釈NMR分析法 (SIDNMR) を開発した。

フェニルアラニン (Phe) は18-クラウン-6 (18C6) とペルフルオロオクタンスルホン酸リチウム ($LiPF_6OS$) によって、酸性水溶液から $HPhe(18C6) \cdot PF_6OS$ としてイオン対抽出されることを確認した。不足当量 ($5.0 \times 10^{-4} M$) の $LiPF_6OS$ と過剰量 ($2.5 \times 10^{-2} M$) の18C6を用いて、pH 1.5-3.0において、一定量のPheが再現性よくジクロロメタンに不足当量抽出することができた。SIDNMRの定量式は次のように表される。 $Q_x = Q_s (I_s / I_{IS} - I_m / I_{IS}) / (I_m / I_{IS} - I_x / I_{IS})$ 。こ

ここで、 Q_x は試料中の目的アミノ酸量 (mol), Q_s は重水素化アミノ酸のスパイク量 (mol), I_x , I_s , I_m は、それぞれ試料, スパイク, 混合物から不足当量抽出によって得られた目的アミノ酸の当該 ^1H シグナル積分値, I_{1s} は内標準 (CH_2Cl_2) の ^1H シグナル積分値を示す。本法の精度と正確さを評価するために、10 倍量の Na^+ のほか、 K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} を含む合成試料中の Phe を定量した。試料溶液に既知量のフェニルアラニン- d_2 をスパイク後、塩基性とし、塩化トリオクチルメチルアンモニウム (TOMAC) を用いて金属イオンから Phe を前分離した。酸性水溶液に逆抽出後、Phe を過剰量の 18C6 と不足当量の LiPFOS によって CD_2Cl_2 に不足当量抽出し、上式を用いて定量した。定量値 (2.52 mg) は含有量とよく一致し、相対標準偏差 0.95%, 相対誤差 1.7% の精確さで定量できた。前分離法を併用することにより様々なアミノ酸の SIDNMR 定量が期待される。

(4) 同位体交換に基づく化学種選択的同位体希釈質量分析の基礎検討

種々のクプロイン系試薬を用いて、銅 (I, II) の抽出性を調べた。銅 (I) は過塩素酸イオンによって 2, 2'-ビキノリン (bq) を含むクロロホルム相に $\text{Cu}^{\text{I}}(\text{bq})_2\text{ClO}_4$ として抽出され、一方銅 (II) は全く抽出されず、bq は Cu^{I} と Cu^{II} の抽出分離に最も適していることが分かった。また、bq を用いた不足当量抽出により、一定濃度の Cu^{I} 溶液 (スパイク) を容易に調整することができ、この溶液を同位体交換に用いた。 Cu^{I} では pH 2.67-4.94 において振とう時間の増加に伴い、同位体交換によって有機相中の $\text{Cu}^{\text{I}}(\text{bq})_2^+$ の同位体比が変化した。一方、 Cu^{II} の場合には、錯形成剤としてジエチレントリアミン五酢酸を加えることで、60 分間の振とう後も同位体比は変化しなかった。以上の結果より、 Cu^{I} の同位体交換反応を利用した選択的化学種分析が期待される。

このほか、バナジウム (III, IV, V) 化学種の調製法に関して、カラム電極を用いて研究し、溶液の pH や共存錯形成剤の選択等について有用な知見を得た。

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 16 件)

① Hiroyuki Okamura, Noboru Aoyagi, Kojiro Shimojo, Hirochika Naganawa and Hisanori Imura, Role of Tf_2N^- Anions in the Ionic Liquid-Water Distribution of Europium(III)

Chelates, RSC Adv., **7**, 7610-7618 (2017). 査読あり, DOI:10.1039/c6ra27208h

② Sho Yamamoto, Hirohisa Nagatani, Kotaro Morita, and Hisanori Imura, Potential-Dependent Adsorption and Orientation of meso-Substituted Porphyrins at Liquid/Liquid Interfaces Studied by Polarization-Modulation Total Internal Reflection Fluorescence Spectroscopy, J. Phys. Chem. C, **120**, 7248-7255 (2016). 査読あり, DOI: 10.1021/acs.jpcc.6b02178

③ 池端浩紀, 平山直紀, 井村久則, 非イオン界面活性剤水溶液の相分離に及ぼす多価フェノールの効果とアンチモン(V)の曇り点抽出への応用, 分析化学, **65**, 65-70 (2016). 査読あり

④ Kotaro Morita, Kazuki Nakano and Hisanori Imura, The Extraction of the Copper(I) Ion with Heterocyclic Bidentate Amines in the Presence of Glutathione, Solv. Extr. Res. Devel., Jpn, **21**, 1-7 (2014). 査読あり

[学会発表] (計 52 件)

① Mizuki Hatakeyama, Hiroyuki Okamura, Hirohisa Nagatani, Yoshio Nishiyama, Kojiro Shimojo, Hirochika Naganawa, Hisanori Imura, Extraction Equilibrium of Lanthanoid(III) Ions with β -Diketones and Hydrophobic Oxygen Donors in an Ionic Liquid, International Symposium on Lanthanide Coordination Chemistry (ISLCC2016), Aoyama Gakuin University, Sagamihara, Kanagawa, 2016. 6. 4.

② Sho Yamamoto, Hirohisa Nagatani, Kotaro Morita, Hisanori Imura, Potential-Dependent Adsorption of Water-Soluble Porphyrins at Liquid/Liquid Interfaces Studied by Polarization-Modulation Total Internal Reflection Fluorescence Spectroscopy, Pittcon2016, Atlanta, GA USA, 2016. 3. 8.

③ 山田尚希, 鳥屋子やまと, 森田耕太郎, 永谷広久, 井村久則, シクロデキストリン修飾キャピラリー電気泳動によるマイクロシステン由来光学活性カルボン酸のキラル分離, 第 76 回分析化学討論会, 岐阜薬科大学, 岐阜県岐阜市, 2016. 5. 28.

④ 井村久則, 松本一貴, 森田耕太郎, 永谷広久, 不足当量同位体希釈 NMR 分析法によるアミノ酸の絶対定量, 日本分析化学会

第 62 年会, 近畿大学, 大阪府東大阪市,
2013. 9. 10.

[図書] (計 2 件)

① 井村久則, 永谷広久 ほか 8 名, 基礎から
学ぶ機器分析化学, 井村・樋上編, 化学同
人, 2016 年, pp. 249 (1-249) .

② 井村久則, 永谷広久 ほか 4 名, 基礎から
学ぶ分析化学, 井村・樋上 編, 化学同人,
2015 年, pp. 231 (1-231) .

[その他]

ホームページ等

<http://chem.s.kanazawa-u.ac.jp/anal/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井村 久則 (IMURA, Hisanori)

金沢大学・物質化学系・教授

研究者番号 : 60142923

(2) 研究分担者

永谷 広久 (NAGATANI, Hirohisa)

金沢大学・物質化学系・准教授

研究者番号 : 90346297

(3) 研究分担者

西山 嘉男 (NISHIYAMA, Yoshio)

金沢大学・物質化学系・助教

研究者番号 : 40617487

(4) 研究分担者

森田 耕太郎 (MORITA, Kotaro)

東邦大学・理学部・講師

研究者番号 : 70396430