Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-02-24

Tris(2.2’-bipyridine)ruthenium(III)錯体の化学発光反応に関する基礎的研究および高感度検出法としての応用

児玉谷，仁

(Degree)
博士（学術）
(Date of Degree)
2006-03-25
(Date of Publication)
2008-11-07
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲3619
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1003619

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

博 士 論 文

Tris(2,2’-bipyridine)ruthenium(Ⅲ)錯体の化学発光反応に関する基礎的研究および高感度検出法としての応用

平成 17 年 12 月

神戸大学大学院総合人間科学研究科

児玉谷 仁

目次

1 序論 5

1.1 はじめに 5

1.2 ルテニウム錯体の化学発光反応 6

2 ルテニウム錯体と共役二重結合化合物の化学発光反応 9

2.1 序 9

2.2 実験 11

2.2.1 試薬 11

2.2.2 装置 11

2.3 結果と考察 12

2.3.1 発光確認 12

2.3.2 反応部位の確認 12

2.3.3 発光反応条件の検討 14

2.3.4 検出法としての評価 18

2.4 まとめ 20

3 ルテニウム錯体とヘテロ芳香環化合物の化学発光反応 21

3.1 序 21

3.2 実験 23

3.2.1 試薬 23

3.2.2 装置 23

3.2.3 電気化学・電気化学発光測定法 24

3.2.4 3 価 Ru 錯体調整法 24

3.2.5 反応生成物の同定法 25

3.2.6 発光反応比決定法 25

3.3 結果と考察 26

3.3.1 モノヘテロ芳香環化合物との化学発光 26

3.3.2 ジヘテロ，トリヘテロ芳香環化合物との化学発光 28

3.3.3 発光反応機構の解明 30

3.4 まとめ 38

4 **アミン構造における電子吸引基の効果**
〜イミノ酸の高感度同時検出法の開発〜 39
4.1 序 39
4.2 実験 41
4.2.1 試薬 41
4.2.2 装置 41
4.2.3 試料消費量の測定法 42
4.2.4 血清試料の調整法 42
4.3 結果と考察 43
4.3.1 第二アミン構造におけるカルボキシル基の効果 43
4.3.2 電子吸引基の効果 46
4.3.3 血中イミノ酸の高感度同時定量 53
4.4 まとめ 57

5 **グリコアルカロイドの高感度検出法の開発** 58
5.1 序 58
5.2 実験 59
5.2.1 試薬 59
5.2.2 装置 59
5.2.3 実試料調整法 60
5.3 結果と考察 61
5.3.1 発光反応の最適条件の検討 61
5.3.2 分離条件の検討と検出感度 63
5.3.3 実試料測定 65
5.4 まとめ 68

6 **アミトロールの化学発光検出法の開発** 69
6.1 序 69
6.2 実験 70
6.2.1 試薬 70
6.2.2 装置 70
6.2.3 実試料調整法 70
6.3 結果と考察 72

6.3.1　最適条件の検討 72
6.3.2　分離条件の検討と検出感度 75
6.3.3　実試料測定 77
6.4　まとめ 79

7　ドウモイ酸の高感度検出法の開発　80

7.1　序 80
7.2　実験 82
7.2.1　試薬 82
7.2.2　装置 82
7.2.3　実試料調整法 83
7.3　結果と考察 84
7.3.1　発光反応条件の決定 84
7.3.2　標準試料による検量線および他法との比較 86
7.3.3　実試料測定 87
7.4　まとめ 89

8　ピペコリン酸の高感度検出法の開発　90

8.1　序 90
8.2　実験 91
8.2.1　試薬 91
8.2.2　装置 91
8.2.3　実試料調整法 92
8.3　結果と考察 93
8.3.1　検出条件の検討 93
8.3.2　他アミノ酸の発光と分離条件の検討 95
8.3.3　実試料の測定 100
8.4　まとめ 102

9　チオフェン部位を持つ新規発光誘導体化試薬の開発　103

9.1　序 103
9.2　実験 106
9.2.1　試薬 106
9.2.2　装置 106

9.2.3 TTA および TTA-OP の合成法 107
9.2.4 誘導体化法の検討 108
9.3 結果と考察 109
9.3.1 誘導体化条件の決定 109
9.3.2 検出条件の決定 109
9.3.3 分離条件の決定 111
9.3.4 試薬の評価 115
9.4 まとめ 117

10 光化学反応を用いたベンゼン誘導体の検出法の開発 118
10.1 序 118
10.2 実験 119
10.2.1 試薬 119
10.2.2 装置 119
10.2.3 光化学反応器の作成と光照射法 120
10.2.4 カテキン類の分析法 120
10.3 結果と考察 121
10.3.1 反応部位の確認 121
10.3.2 反応生成物の同定 121
10.3.3 置換基種の効果 125
10.3.4 茶中カテキン分析法の開発 128
10.4 まとめ 131

11 結論 132

謝辞 133

A 電気化学セルの評価 134

参考文献 138

研究業績 146

1　序論

1.1　はじめに

この論文は 9 つの研究からなっており，すべて Tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(Ⅲ) 錯体（Ru 錯体*†，$Ru(bpy)_3{}^{3+}$，Fig. 1）の化学発光反応に関するものである．第 2 章から第 4 章は，この化学発光反応に関する基礎的研究，第 5 章から第 10 章は，この発光反応を利用した物質の検出法の開発に関する応用的研究である．

第 2 章，第 3 章では新に見出した Ru 錯体と共役二重結合化合物，ヘテロ芳香環化合物との発光反応について，第 4 章では Ru 錯体と脂肪族アミンとの発光反応における電子吸引基の効果について得られた基礎的な知見をそれぞれ述べている．第 5 章ではジャガイモに含まれる食中毒物質グリコアルカロイド，第 6 章では環境ホルモンと疑われている農薬アミトロール，第 7 章では記憶喪失性貝毒の原因物質ドウモイ酸，第 8 章では疾病マーカーとして利用されているピペコリン酸の分析法の開発についてそれぞれ述べている．第 9 章，第 10 章では更なる応用として，チオフェン部位を持つプレカラム誘導体化試薬の開発およびアルキルフェノール類分析への応用，ポストカラム光化学反応を利用したベンゼン誘導体分析法の開発についてそれぞれ述べている．

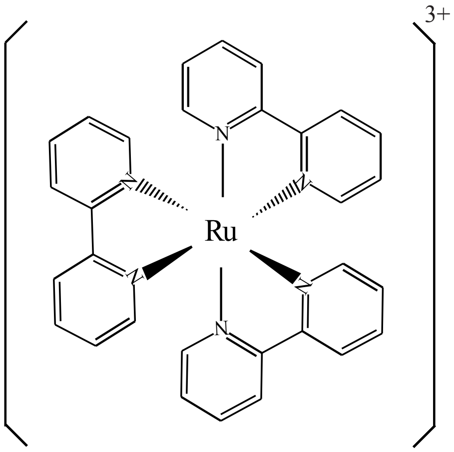

Fig. 1: Structure of tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(Ⅲ).

*† この錯体には 1 価，2 価，3 価の状態が存在するが，本論文において Ru 錯体と表記した場合，基本的に 3 価錯体を示している．区別が必要なときのみ価数を表記している．

1.2 ルテニウム錯体の化学発光反応

1966 年に Hercules および Lytle が Ru 錯体とヒドラジン，水酸化物イオンとの反応による化学発光（Chemiluminescence: CL）について報告 [1] して以来，様々な分野でこの発光反応を用いた研究が行われてきている [2]．Ru 錯体の発光反応機構は，Bard らにより詳しく検討されてきており，一般的に Fig. 2 のように報告されている．通常 2 価の状態で安定に存在する Ru 錯体は，化学的，電気化学的酸化により 3 価錯体となる．この 3 価 Ru 錯体は特定の物質を酸化し，その物質のラジカル中間体を生成させる．生成したラジカル中間体と 3 価錯体の反応（もしくはラジカル中間体と 2 価錯体の反応により 1 価錯体が生成し 1 価錯体と 3 価錯体の反応）により励起 2 価錯体が生成する．この励起 2 価錯体が基底 2 価錯体に戻るときに 610 nm 付近のオレンジ色の光を放出する．

$$Ru(bpy)_3^{2+} \xrightarrow{-e^-} Ru(bpy)_3^{3+}$$

$$Ru(bpy)_3^{3+} + \text{reductant} \longrightarrow Ru(bpy)_3^{2+} + \text{intermediate}$$

$$Ru(bpy)_3^{3+} + \text{intermediate} \longrightarrow Ru(bpy)_3^{2+*} + \text{product}$$

$$Ru(bpy)_3^{2+*} \longrightarrow Ru(bpy)_3^{2+} + h\nu \text{ (610 nm)}$$

Fig. 2: The mechanism of chemiluminescent reaction of tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(Ⅲ).

1981 年に Noffsinger と Danielson により Ru 錯体と脂肪族アミンの発光反応が見出された [3]．脂肪族アミンとりわけ脂肪族第三アミン構造は，薬物など生理活性物質に含まれることの多い重要な構造であるが，光吸収をほとんど持たず，また反応性が低いなどの諸性質から高感度検出が非常に難しい．Ru 錯体はこの脂肪族第三アミンと特に強い発光反応を起こしたことから，脂肪族第三アミン構造を持つ薬物等の発光検出試薬として，高速液体クロマトグラフィー（HPLC），フローインジェクションアナリシス（FIA），キャピラリー電気泳動等の分析機器と組み合わせ利用されるようになった．さらに，シュウ酸 [4] やアミノ酸 [5–7]，ジケトン構造 [8] を有する物質とも発光反応を起こすことが見出され，これらの構造を有する化合物の発光検出試薬として，また，近年ではイムノアッセイや DNA プローブアッセイにおける発光標識として Ru 錯体を用いるなど様々な分析化学的応用がなされている [9–11]．

本研究は，この Ru 錯体の化学発光反応に関する新たな知見を得ること，および高感度検出法としての応用を目的に行った．基礎研究では，Ru 錯体がどのような分子構造を有する物質と発光反応を起こすのか解明するため，分子構造と発光反応の関係について検討した．また応用研究では，これまでに Ru 錯体を発光させせることが報告されているアミンやジケトン構造，また基礎研究の過程で新たに発光反応を起こすことを見出した分子構造を有し，簡便で高感度な測定法が求められている物質の HPLC–CL 検出法の開発を行った．

最初に述べたように 3 価 Ru 錯体は水酸化物イオンと反応を起こすため水溶液中では安定的に保存できない．酸性溶液中では比較的安定であるが，それでも数時間しか 3 価の状態を保てない [12]．そのため Ru 錯体を発光検出試薬として用いる場合，水溶液中で安定に存在する 2 価錯体を保存液とし，使用直前に 3 価に変換する必要がある．酸化鉛（Ⅳ），硫酸セリウム（Ⅳ）などの酸化剤を用いた酸化法，過硫酸カリウムと光化学反応を組み合わせた酸化法 [13]，電気化学的酸化法などが報告されている．なかでも電気化学的酸化を用いた方法が，酸化反応をコントロールしやすく，試薬由来の汚染，時間経過による試薬の変化がないなどの理由，また後述する Ru 錯体の特徴の一つである “ 発光試薬として再生する ” という性質を最も効果的に利用できるなどの理由から多くの研究がなされている．特に電気化学的酸化を用いた方法は次の 2 種類に大別される．（i）試料と 2 価 Ru 錯体を混合した後，光電子増倍管の前に設置された電極を組み込んだ検出セルにおいて，試料とともに 2 価錯体を酸化する方法と（ii）2 価 Ru 錯体を 3 価に酸化した後，試料溶液と混合する方法である．（i）の方法では，Ru 錯体の酸化と同時に試料の酸化を起こすことも可能であるため，高い電位を印加し Ru 錯体だけではなく試料の酸化も同時に起こすことで（ii）の方法では検出できない物質も検出できることが報告されている [14]．また，Fig. 2 の発光機構に示したように発光反応を起こした後の 3 価錯体は再び 2 価錯体に戻るため，発光試薬として繰り返し利用できる．そこで（i）の方法の発展型として，電極表面に Ru 錯体を固定化することで Ru 錯体を繰り返し利用する研究も多く報告されている．特に（i）の方法を用いたとき，電極表面上で起こる化学発光反応であるため電気化学発光（Electrogenerated chemiluminescence: ECL）と称される．一方，（ii）の方法では大量の 3 価 Ru 錯体を供給できるため（i）の方法に比べ強い発光が得られるとされている [15]．

本研究は分子構造と発光反応の関係を解明することを目的とするため，試料の電極酸化が起こり分子構造が変化しうる（i）の方法は適さない．また，より高感度な検出法を目指

していることから（ii）の方法を採用した．本研究で主に使用した HPLC–CL 検出装置の概略図を Fig. 3 に示す．（a）2-Pump HPLC 装置では，インジェクターから注入された試料は，ポンプにより連続送液されている溶離液によって運ばれ，カラムにおいて各成分ごとに分離される．一方，2 価 Ru 錯体溶液はポンプにより電気化学セルに連続的に送液され，定電流電解により 2 価から 3 価に酸化され，この 2 つの液が発光検出器内部で混合される．試料と Ru 錯体の反応により発生した光が，光電子増倍管によって検出され，データープロセッサーに出力される．これに加え（b）3-Pump HPLC 装置では，カラムの後に発光反応時の pH を調整するための緩衝液を流すポンプを備えている．また，それぞれカラムを取り外した状態を 2-Pump FIA 装置，3-Pump FIA 装置として使用した．

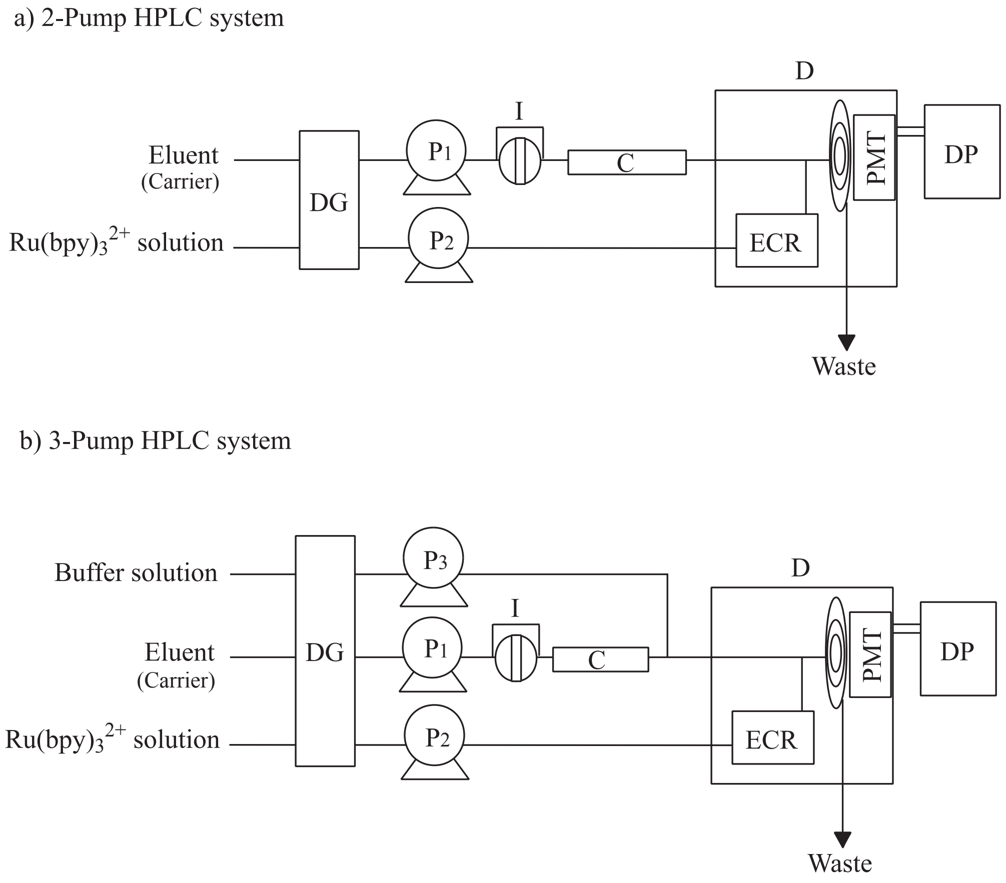

Fig. 3: Schematic diagrams of HPLC–CL system. P, pump; DG, degasser; I, injector; C, column; D, chemiluminescence detector; ECR, electrochemical reactor; PMT, photomultiplier tube; DP, data processor.

2　ルテニウム錯体と共役二重結合化合物の化学発光反応

2.1　序

第 1 章で述べたように，Ru 錯体と化学発光反応を起こす分子構造の報告は，脂肪族アミン，ジケトン構造などに限られてきた．しかし，Ru 錯体がどのような物質と発光反応を起こすのか，未だ完全には明らかになっていない．発光をもたらす新しい物質の発見は，Ru 錯体の発光反応の全容を解明する手がかりとなると同時に，発光検出試薬としての適用範囲を広げることにもなる．

Ru 錯体は 3 価から 2 価への還元反応により発光を起こすことから，還元剤となりうる様々な物質と Ru 錯体の発光反応を調べた結果，新たに炭素鎖共役二重結合を有する化合物が Ru 錯体と発光反応を起こすことを見出した．現在，これら共役二重結合を有する物質は，共役二重結合部位が紫外部に強い光吸収を持つことから，主に UV 検出法によって分析されている．しかし，UV 検出法は選択性に欠けており，環境水や生体試料等の実試料分析においては，他の共存物質を除くため前処理の必要性がでてくる．前処理が複雑になればなるほど分析に時間がかかり，時間・コストがかかる原因となる．一方，CL 検出法は選択性が高く前処理を軽減できる可能性がある．よって，Ru 錯体による共役二重結合化合物の検出法の開発も有用であると考え，発光反応に関する基礎的研究，及び検出法としての予備的な研究を行った．

Fig.　4 に本研究で用いた試料を示す．共役二重結合を有する試料として，2,4-Hexadiene，2,5-Dimethyl-2,4-hexadiene，Sorbic alcohol，Sorbic acid，α-Terpinene，α-Phellandren，Abietic acid，ヘテロ芳香環化合物であるが共役二重結合性が強い 2,5-Dimethylfuran，炭素鎖以外の共役二重結合である Cycrohexene-1-one を用いた．共役二重結合を構成する炭素原子に直接結合する官能基の影響や，分子構造の影響を調べるためにこれらの試料を選んだ．また，比較のため非共役二重結合を有する 1,5-Hexadiene，1,4-Hexadiene，γ-Terpinene，二重結合を一つだけ有する 3-Hexene も試料とした．

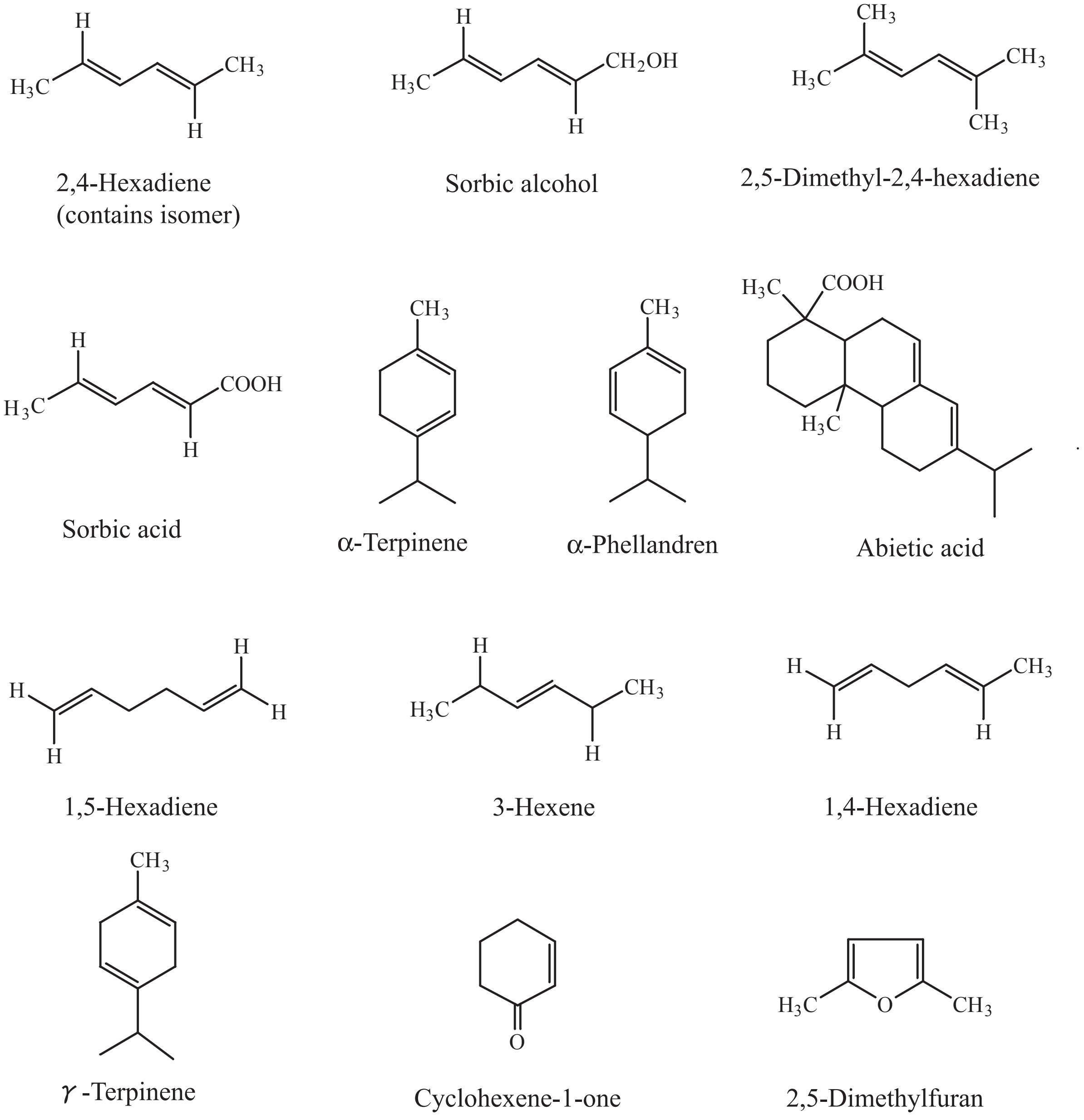

Fig. 4: Structure of samples.

2.2 実験

2.2.1 試薬

Tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(Ⅱ) chloride hexahydrate は Palmer の方法 [16] により，Ruthenium(Ⅲ) chloride n-hydrate（試薬特級，和光純薬工業株式会社），2,2'-Bipyridine（試薬特級，和光純薬工業株式会社）を用い合成した．他の試薬は，試薬グレードまたは特級グレードを用い精製などを行わずそのまま使用した．すべての試料はアセトニトリルまたは水およびそれらの混合溶液で 10 mM または 100 mM に調整し，保存溶液として冷蔵庫内（4 ℃）で保存した．これら保存液を実験直前に溶離液で薄めて試料として使用した．2 価 Ru 錯体溶液は，$[Ru(bpy)_3]Cl_2 \cdot 6H_2O$ を 1 mM 硫酸を含む 100 mM 硫酸ナトリウム溶液，または 10 mM 硫酸溶液に溶かし，0.5 mM となるように調整して用いた．また，水溶液の調整には水道水を Advantec AQUARIUS GS-200（Advantec）により脱イオン，蒸留後，MILLI-QⅡ システム（日本ミリポア）で超純水としたものを利用した．

2.2.2 装置

本研究で用いた装置を以下に示す．下記の装置を必要に応じ，内径 0.5 mm（外径 1/16）のテフロンチューブで接続して HPLC（FIA）装置とした．

- Pump：GL Sciences PU611C（ジーエルサイエンス株式会社）
- Degasser：Shodex Degaseer（昭和電工株式会社）
- Injector：Rheodyne 7125（20 μL; RHEODYNE）
- CL Detector：Comet 3000（有限会社コメット）
- UV-VIS Detector：L-4200（株式会社日立製作所）
- Data procescer：Hitachi D-2500 Chromato-Integrator（株式会社日立製作所）
- Column：Chromolith Performance RP-18e（100 x 4.6 mm I.D.; Merck）
- Column：ChemcoPak Nucleosil 5C-18（150 x 4.6 mm I.D.; ケムコ）

2.3 結果と考察

2.3.1 発光確認

2-Pump FIA 装置を用い，Fig. 4 に示したすべての試料について Ru 錯体の発光が得られるか確認を行った．2,4-Hexadiene について得られた発光強度を 100 とした場合の他試料の相対発光強度（Relative luminescence intensity: R. L. I.）を Table 1 に示す．共役二重結合を有する 2,4-Hexadiene，α-Terpinene，α-Phellandren，Sorbic alcohol，2,5-Dimethyl-2,4-hexadiene を試料としたとき Ru 錯体の発光が認められた．しかし，共役二重結合部位を有しているにも関わらず Sorbic acid については発光が認められなかった．

共役二重結合を持っているにも関わらず発光しなかった Sorbic acid は，共役二重結合を構成する炭素原子に電子吸引性の官能基であるカルボキシル基が結合している．このことから，共役二重結合を構成する炭素原子へ直接結合している官能基が発光反応に大きく影響すると考えられる．すなわち，逆に電子供与性の官能基が存在するほど強く発光すると考えられ，これは電子供与基であるメチル基が最も多くある 2,5-Dimethyl-2,4-hexadiene が最大の発光を示す実験結果と一致する．この傾向と同じことがアミンにおいて報告されており，窒素原子上の電子密度が高くなる構造，つまり電子供与性のアルキル基が増える第一＜第二＜第三アミンの順に強い発光が得られることがよく知られている [3, 17]．同様に考えると，共役二重結合化合物では共役系を構成するπ電子密度が発光反応に関係していると考えられる．

2.3.2 反応部位の確認

本研究で対象とした試料は非常に単純な構造をしており，すべての試料に共通して発光反応に関与できる部位は，共役二重結合部位のみである．しかし，CL 検出法は試料によっては非常に高感度なため，試料中の不純物等を測定している可能性もある．そこで，共役二重結合部位が強い UV 吸収を持つことに着目し，UV 検出器を用いて反応部位の確認を行った．2-Pump HPLC 装置のカラムと発光検出器の間に UV 検出器を接続した装置を用いた．この装置では，試料はカラムにより分離され，まず UV 検出器に送られる．そこで UV 検出された後，発光検出器に導かれ Ru 錯体と混合され CL 検出される．

Table 1: Relative chemiluminescence intensity of all samples. Sample: 10 μM. FIA conditions: carrier, water–methanol (3:7, v/v); $Ru(bpy)_3{}^{2+}$ solution, 0.5 mM $Ru(bpy)_3{}^{2+}$ in 10 mM sulfuric acid; carrier flow rate, 0.8 ml/min; $Ru(bpy)_3{}^{2+}$ solution flow rate, 0.3 ml/min; ECR, 150 μA; PMT biased at −700 V.

Compound	R. L. I.
2,4-Hexadiene	100
2,5-Dimethyl-2,4-hexadiene	514
Sorbic alcohol	114
Sorbic acid	0
α-Terpinene	83
α-Phellandren	42
Abietic acid	40
1,5-Hexadiene	0
1,4-Hexadiene	0
γ-Terpinene	9
2,5-Dimethylfuran	217
Cyclohexene-1-one	0
3-Hexene	0

試料として 2,4-Hexadiene を用い次の 3 つの異なる試料を調整した．試料（a）は 2,4-Hexadiene を溶離液に溶かした溶液，試料（b）は 2,4-Hexadiene に大過剰の 2 価 Ru 錯体溶液を添加したもの，試料（c）は 2,4-Hexadiene に大過剰の 3 価 Ru 錯体を添加した後，2 価 Ru 錯体に戻るまで放置したものである．各試料の測定結果を Fig. 5 に示す．UV 検出波長は，2,4-Hexadiene の共役二重結合由来の極大吸収波長（λ_{max}）である 218 nm で行った．試料（a）は UV 検出，CL 検出とも同様のピークが見られる．2,4-Hexadiene は幾何異性体を有するためピークが 2 つに分裂している．直列接続のため UV 検出と CL 検出ではリテンションタイムが異なるが，ピーク間の距離から CL 検出で得られたピークと UV 検出で得られたピークが同一のものであると確認できる．試料（b）では，CL 検出，UV 検出とも試料 (a) と同じ結果が得られた．この結果から 2 価 Ru 錯体は 2,4-Hexadiene と反応せず，そのまま共役二重結合部位が保たれたことがわかる．試料（c）では，（a），（b）と異なり CL 検出，UV 検出ともクロマトグラムに大きな変化が現れた．UV 検出では 20 分付近に現れていた 2,4-Hexadiene のピークが消え，代わりに 8

分付近に新たなピークが現れた．このピークは，3 価 Ru 錯体と 2,4-Hexadiene との反応により生成した反応生成物と考えられる．これに対し，CL 検出では 20 分にも 8 分にもピークは得られなかった．つまり，先に添加された 3 価 Ru 錯体と試料の共役二重結合部位が反応し，Ru 錯体と発光反応を起こす部位が変化していたため検出されないといえる．

以上の結果から，3 価 Ru 錯体は共役二重結合部位と発光反応を起こすことが確認された．また，発光反応後の生成物は元物質である 2,4-Hexadiene より速い時間で ODS カラムより溶出した．この結果は，反応生成物は 2,4-Hexadiene より水に溶けやすい性質となったことを示している．さらに反応生成物が 2,4-Hexadiene と同程度の UV 吸収を持っていることも確認された．反応生成物を同定することで発光反応機構はある程度予測できると考えられるが，これについては第 3 章で合わせて述べる．

2.3.3　発光反応条件の検討

Ru 錯体の化学発光反応において，発光反応時の pH，使用有機溶媒種、流速等が発光強度に大きく影響することが報告されている．発光反応条件の最適化は検出法としての高感度化のみならず，発光反応機構の解明の手がかりとなる．そこで，反応条件を変化させ発光反応への影響を調べた．

まず，発光反応時の pH の影響について調べた．この実験では発光反応時の pH をコントロールするため 3-Pump FIA 装置を使用した．P_3 のポンプから高濃度の緩衝液を低流量で送液することにより発光反応時の pH を変化させた．（廃液の pH を発光反応時の pH とした．）結果を Fig. 6 に示す．各試料とも酸性側で最大の発光を示し，中性から塩基性になると発光は起こらないか，もしくはマイナスピークとなった．pH により化学種が変化しない共役二重結合化合物において発光反応に pH 依存性がみられたことは，反応機構を推測する上で重用な知見といえる．また，本章（2.3.1）で発光が認めれなかった試料では，pH の変化に関わらず発光は得られなかった．

次に有機溶媒による発光強度への影響を調べた．共役二重結合を有する化合物のほとんどが疎水性であり，HPLC などでこれら化合物を扱う際には，有機溶媒の添加が必要になる．そこで HPLC で用いられる代表的な有機溶媒であるメタノール，アセトニトリルを用いて発光強度の比較を行った．結果を Fig. 7 に示す．すべての試料でメタノールの方が発光が大きく，特に Sorbic alcohol と α-Terpinene に大きな差が見られた．溶液状態による Ru 錯体自身の蛍光量子収率等の変化であれば，試料による差は起こらないはずであるので，有機溶媒が反応速度等に影響を及ぼしているものと考えられる．

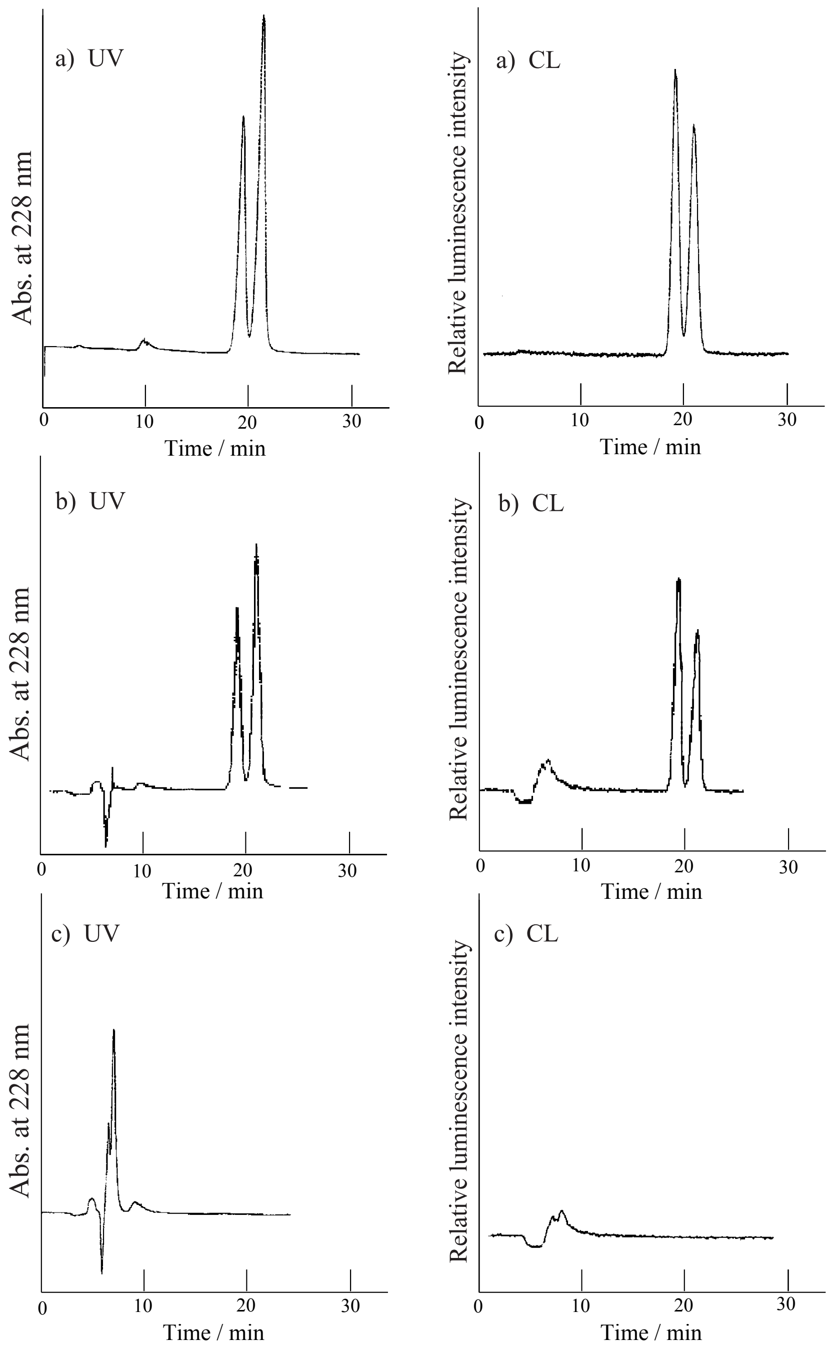

Fig. 5: Chromatograms of sample(a), sample(b), and sample(c) with UV and CL detection. HPLC conditions: eluent, water–methanol (7:3, v/v); $Ru(bpy)_3{}^{2+}$ solution, 0.25 mM $Ru(bpy)_3{}^{2+}$ in 10 mM sulfuric acid; eluent flow rate, 0.5 ml/min; $Ru(bpy)_3{}^{2+}$ solution flow rate, 0.3 ml/min; column, ChemcoPak Nucleosil 5C-18.

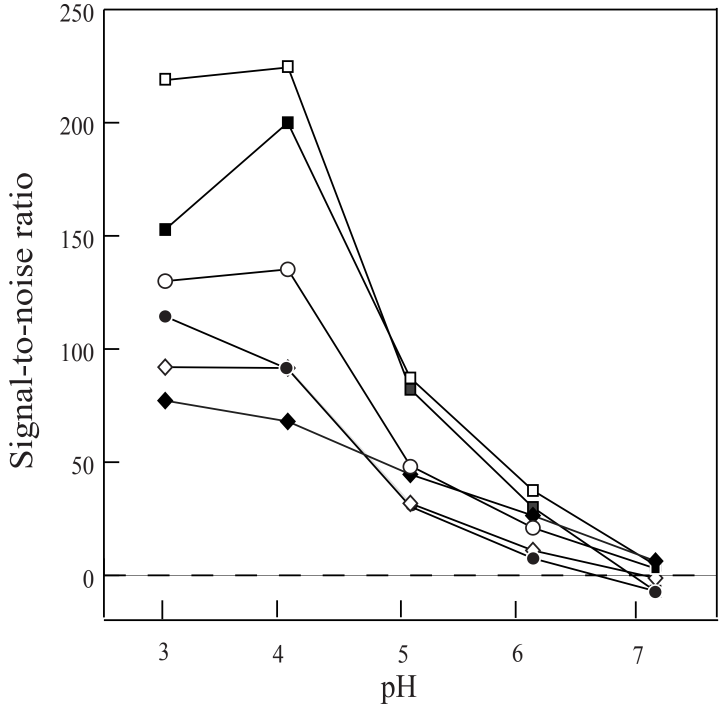

Fig. 6: Effect of the pH on the chemiluminescence intensity for aliphatic conjugated dienes obtained by FIA. Sample: 2,4-Hexadiene (■), 2 nmol; 2,5-dimethyl-2.4-hexadiene (◇), 0.2 nmol; sorbic alcohol (□), 2 nmol; α-terpinene (○), 2 nmol; α-phellandrene (●), 2 nmol; abietic acid (◆), 2 nmol. FIA conditions: $Ru(bpy)_3{}^{2+}$ solution, 0.5 mM $Ru(bpy)_3{}^{2+}$ in 100 mM sodium sulfate containing 1 mM sulfuric acid; buffer solution, 100 mM phosphate buffer; buffer solution flow rate, 0.1ml/min; other conditions are same as in Table 1.

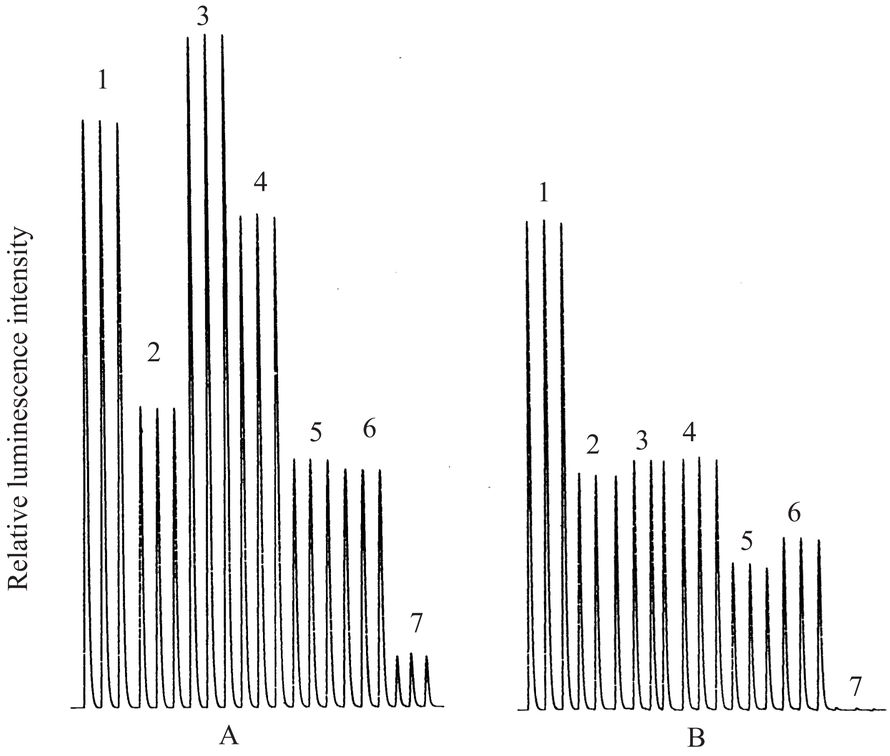

Fig. 7: Effect of the organic solvent, (A)methanol and (B)acetonitrile, on the chemiluminescence intensity for aliphatic dienes obtained by FIA. Sample: 1, 2,4-Hexadiene, 2 nmol; 2, 2,5-dimethyl-2.4-hexadiene, 0.2 nmol; 3, sorbic alcohol, 2 nmol; 4, α-terpinene, 2 nmol; 5, α-phellandren, 2 nmol; 6, abietic acid, 2 nmol; 7, γ-terpinene, 2 nmol. FIA conditions: carrier, organic solvent–water (7:3, v/v); other conditions are same as in Table 1.

2.3.4 検出法としての評価

これまでの実験結果から，発光反応の最適条件で Ru 錯体による共役二重結合化合物の検出限界（Detection limit: D. L.）と再現性（Relative standard deviation: R. S. D.）を求めた．結果を Table 2 に示す．発光が確認された共役二重結合系試料において，検出限界は pmol レベルであった．また，再現性は，Abietic acid の 6.1 %を最低の再現性として，ほとんどが 2 %以内に収まる良好な結果が得られた．

共役二重結合部位は紫外部に強い吸収を持つため，共役二重結合を有する化合物の測定には UV 検出法が多用される．そこで 5 種類の共役二重結合化合物を混合した溶液を試料とし，UV 検出法と CL 検出法を比較した．218 nm，238 nm，254 nm における UV 検出によるクロマトグラムと，CL 検出によるクロマトグラムを Fig. 8 に示す．CL 検出では 2,5-Dimethyl-2,4-hexadiene を除けばほぼ同程度の検出感度が得られている．UV 検出では感度が波長に大きく依存し，波長によっては検出不可能な化合物が存在する．また，短波長における UV 検出では不純物のピークも出現している．Table 2 からもわかるように CL 検出感度とモル吸光係数（ε）の間に相関は無い．そのためモル吸光係数が小さく高感度検出が難しい共役二重結合物質でも本法なら高感度検出できる可能性がある．

Table 2: Detection limits and relative standard deviations obtained from the standard solutions by HPLC. HPLC conditions: eluent, methanol–water (8:2, v/v); other conditions are same as in Table 1.

Compound	D. L. / pmol[a]	R. S. D. / %[b]	ε_{max} (λ_{max})
2,4-Hexadiene	1	1.4	23000 (227 nm)
2,5-Dimethyl-2,4-hexadiene	0.6	1.0	23000 (241 nm)
Sorbic alcohol	1	1.8	23950 (228 nm)
α-Terpinene	2	1.2	3600 (262 nm)
α-Phellandren	1	2.3	2500 (263 nm)
Abietic acid	6	6.1	- (-)

[a]Detection limit (S/N = 3).
[b]Six determination at 100 pmol.

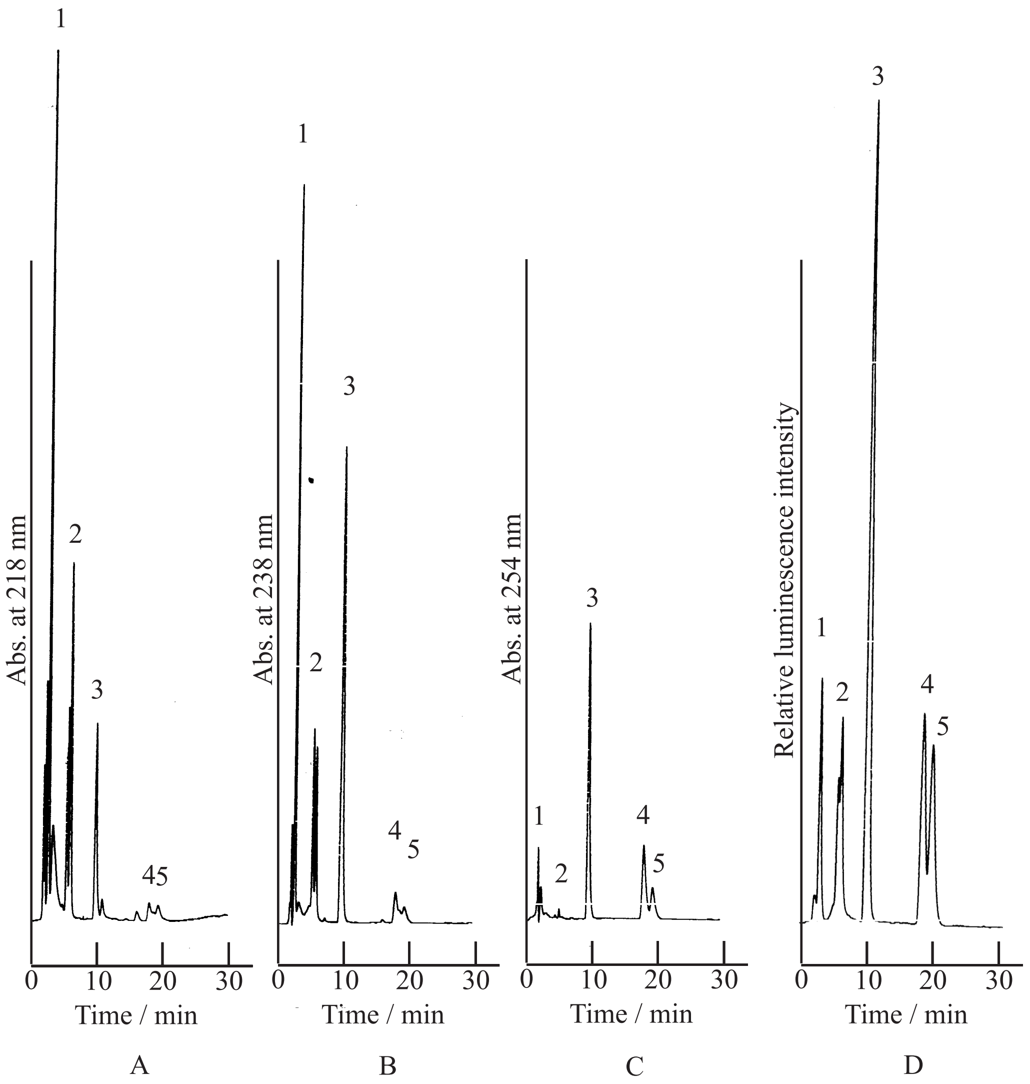

Fig. 8: Comparison of detectable compounds between UV detection at A) 218 nm, B) 238 nm and C) 254 nm, and D) CL detection. Sample: 5 μM. Peak identification: 1, sorbic alcohol; 2, 2,4-hexadiene; 3, 2,5-dimethyl-2,4-hexadiene; 4, α-terpinene; 5, α-phellandrene. HPLC conditions are same as in Table 1.

2.4　まとめ

Ru 錯体と共役二重結合構造を持つ化合物が発光反応を起こすことを新たに見出した．発光の強さはπ電子密度及び，反応時の pH，有機溶媒種に依存した．

また，本研究で提案した Ru 錯体による共役二重結合化合物の化学発光検出感度は pmol レベルであり，特に大きな光吸収を持つ共役二重結合化合物においては，UV 検出法より感度的に劣るものと考えられる．しかし，Ru 錯体と共役二重結合の発光反応は pH 3 付近で最も強いため，中性以降で発光反応を起こすアミンなどの妨害は小さくなる．よって，選択性の高い Ru 錯体による化学発光検出法の中でも，より選択的な検出が可能であり生体中の共役二重結合化合物，例えばビタミン D や共役脂肪酸などの検出などに有効であると考えられる．

3　ルテニウム錯体とヘテロ芳香環化合物の化学発光反応

3.1　序

第 2 章において共役二重結合性の強いヘテロ芳香環である 2,5-Dimethylfuran（DMF）を試料として検討したところ Ru 錯体と発光反応を起こすことが確認された．そこでヘテロ原子のみが異なる構造を持つ 2,5-Dimethylpyrrole（DMP），2,5-Dimethylthiophene（DMT）についても検討した．ヘテロ原子の電気陰性度から，芳香族性が強くなり共役二重結合性が弱くなる DMF ＞ DMP ＞ DMT の順に発光は弱くなると思われたが，予想に反し，DMF ＜ DMP ＜ DMT の順に強い発光を示した．現在，Ru 錯体を最も効率よく発光させる物質は脂肪族第三アミンとされていることから，含窒素化合物と Ru 錯体との化学発光反応については多くの研究報告がある．一般に脂肪族アミンと Ru 錯体の発光反応は，アミン窒素原子上の孤立電子対により起こるとされており，孤立電子対がπ電子系に関わりやすいピリジンなどの芳香族置換アミン，アニリンなどの芳香族アミンでは発光反応が起こらないことが確認されている．そのため含窒素化合物である DMP に関して言えば，孤立電子対が芳香環形成に関与し非局在化しているためアミンとしての発光であるとは考えにくい．

本研究で発光が確認された DMF，DMP，DMT は，すべてヘテロ五員芳香環である．ヘテロ五員芳香環は，4 つの sp^2 混成軌道の炭素原子とヘテロ原子（O，N，S）の有する孤立電子対により 6 π電子系を形成する．5 原子上に 6 電子が非局在化するため通常の芳香族よりπ電子密度が高く，そのためπ過剰ヘテロ芳香環と呼ばれている．これに対し，発光反応を起こさないことが確認されているピリジン等のヘテロ六員芳香環は，通常のベンゼンと同じように，sp^2 混成軌道の 5 つの炭素原子と一つの窒素原子により 6 π電子系を形成している．そのため，孤立電子対は芳香環形成に参加しない．この孤立電子対は電子吸引効果をもち，芳香環全体としてのπ電子密度が小さくなる．したがってπ欠如ヘテロ芳香環と言われている．

第 2 章において，Ru 錯体と共役二重結合の発光反応は，π電子が発光反応に関与し，さらにπ電子密度が高い構造ほど発光反応が強くなるという結果が得られた．ヘテロ芳香環においても共役二重結合と同様に発光反応に関与できる部位はπ電子のみであり，同じ発光反応機構を通る可能性が高い．しかも，共役二重結合と異なりヘテロ芳香環は様々な構造をとりうるため，構造上の違いが発光反応に及ぼす影響をより細かく検討できる．そ

こで本研究では，ヘテロ芳香環化合物の構造と発光強度の関係解明および発光反応機構の解明を目指した．Fig. 9 に示されるように，芳香環のπ電子密度は環の構造と置換基の種類・数によって決まる [18]．環の構造，置換基の種類，置換位置，置換基数の異なる物質を試料として実験を行った．

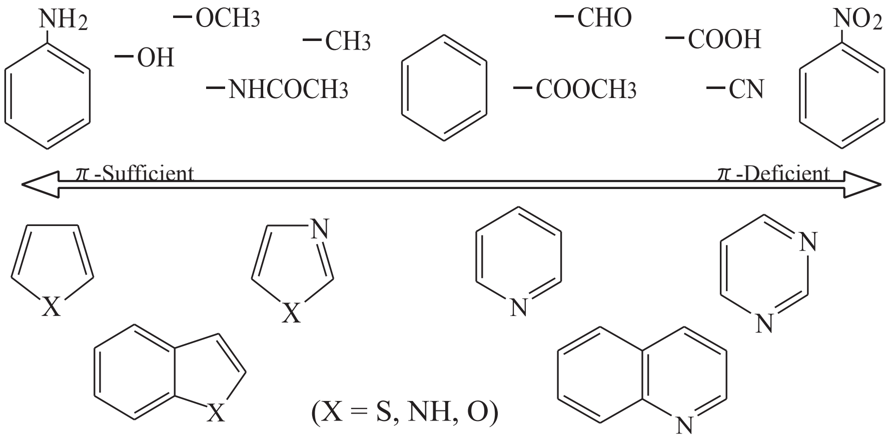

Fig. 9: Relationship between structure and π-electron density.

3.2 実験

3.2.1 試薬

Tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(Ⅱ) chloride hexahydrate は Palmer の方法 [16] により，Ruthenium(Ⅲ) chloride n-hydrate（試薬特級，和光純薬工業株式会社），2,2'-Bipyridine（試薬特級，和光純薬工業株式会社）を用い合成した．他の試薬は，試薬グレードまたは特級グレードを用い精製などを行わずそのまま使用した．すべての試料はアセトニトリル，水，またはこれらの混合液で 100 mM か 10 mM に調整し，保存溶液として冷蔵庫内（4 ℃）で保管した．保存溶液を実験直前に溶離液で薄めて使用した．水溶液の調整には水道水を Advantec AQUARIUS GS-200（Advantec）により脱イオン，蒸留後，MILLI-QⅡ システム（日本ミリポア）で超純水としたものを利用した．2 価 Ru 錯体溶液は，$[Ru(bpy)_3]Cl_2 \cdot 6H_2O$ を 10 mM 硫酸もしくは 1 mM 硫酸を含む 100 mM 硫酸ナトリウム溶液に溶かし，0.5 mM となるように調整して用いた.

3.2.2 装置

本研究で用いた装置を以下に示す．下記の装置を必要に応じ，内径 0.5 mm（外径 1/16）のテフロンチューブで接続して HPLC（FIA）装置とした.

- Pump：GL Sciences PU611C（ジーエルサイエンス株式会社）
- Degasser：Shodex Degaseer（昭和電工株式会社）
- Injector：Rheodyne 7125（20 μL; RHEODYNE）
- CL Detector：Comet3000（有限会社コメット）
- UV-VIS Detector：L-4200（株式会社日立製作所）
- Data procescer：Hitachi D-2500 Chromato-Integrator（株式会社日立製作所）

また電気化学および電気化学発光（ECL）について検討するため，以下の装置を用い Fig. 10 の装置構成で実験を行った.

- PA：Polarographic Analyzer P-1100（Yanaco）
- D：Detector, Comet2501（PMT, −500 V; 有限会社コメット）
- WE：Working electrode, グラッシーカーボン電極（OD: 6 mm ID: 3 mm, BAS）

- WE：Working electrode, 金電極（OD: 6 mm ID: 3 mm, BAS）
- WE：Working electrode, 白金メッシュ電極（5 x 12.2 cm, 61 cm^2)
- RE：Reference electrode, Ag/AgCl （Saturated NaCl, 212mV/NHE, BAS）
- CE：Counter electrode, 白金線（1 mm diameter x 120 mm length)
- DP：Technicorder Type 3078（Yokogawa）

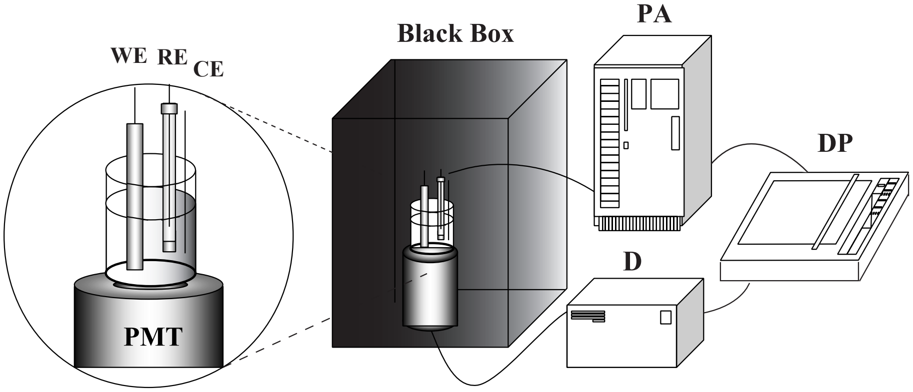

Fig. 10: Scheme of the electrogenerated chemiluminescence detection apparatus.

3.2.3 電気化学・電気化学発光測定法

作用電極は測定毎にメタノール，蒸留水で洗浄した後，1 μm 研磨用ダイヤモンド，0.05 μm 研磨用アルミナで鏡面になるまで研磨し，水，アセトニトリル，水で洗浄したものを用いた．また試料調整溶液として，100 mM NaH_2PO_4 水溶液とアセトニトリルの混合溶液（1:1, v/v）を 6 M NaOH と 6 M HCl で pH 5.0 に調整して用いた．

3.2.4 3 価 Ru 錯体調整法

作用電極に白金メッシュ電極，参照電極に Ag/AgCl，支持電極に白金線を用い，10 mM 硫酸水溶液で調整した 0.5 mM の 2 価 Ru 錯体溶液を 100 ml ビーカー中でスターラーにより攪拌しながら 5 mA の定電流で酸化した．Ru 錯体溶液がオレンジ色から緑色に変化することを目視で確認し 3 価 Ru 錯体溶液を得た．（約 30 分電解酸化を行った．）

3.2.5　反応生成物の同定法

5 本の 10 mL メスフラスコにアセトニトリルで調整した 1 mM の DMT を 1 mL ずつそれぞれ加えた．電解酸化して得た 3 価 Ru 錯体溶液を 5 本のメスフラスコにそれぞれ 0, 2，3，4，5 mL ずつそれぞれ添加し混合した．数時間放置後，Ru 錯体と DMT 以外の組成が同じになるようにそれぞれメスアップしたものを試料として HPLC–UV 検出装置で測定した．同様の溶液組成で，DMT と，DMT と Ru 錯体の発光反応生成物と同定された 5-Methyl-2-thiophenecarboxaldehyde の標準溶液を調整して，検量線（1 – 100 μM）を作成し，試料中の残存 DMT および生成した 5-Methyl-2-thophenecarboxaldehyde を定量した．DMT の HPLC–UV 検出には，40 %アセトニトリル水溶液を溶離液として，302 nm を検出波長として用いた．また 5-Methyl-2-thophenecarboxaldehyde の HPLC–UV 検出には 20 %アセトニトリル水溶液を溶離液として，250 nm を検出波長として用いた．

3.2.6　発光反応比決定法

Ru 錯体と DMT の発光反応比の決定は以下のようにして行った．7 本の 10 mL メスフラスコにキャリアー液（50 %アセトニトリル水溶液）を 3 mL と 100 μM の DMT を 1 mL ずつそれぞれ加えた．本章（3.2.4）の方法により得た 3 価 Ru 錯体溶液を 7 本のメスフラスコにそれぞれ 0，100，200，300，400，500，600 μL 添加し混合した．数時間放置し，キャリアー液でメスアップしたものを試料として 2-Pump FIA–CL 装置で測定した．また，標準試料を用い検量線（0.5 – 10 μM）を作成し，上記試料に残存する試料を FIA–CL 検出法でそれぞれ定量した.（正確な濃度の 3 価 Ru 錯体溶液が調整できないため，対照実験としてシュウ酸についても同様の実験を行っている.）

3.3 結果と考察

3.3.1 モノヘテロ芳香環化合物との化学発光

はじめにヘテロ原子を一つだけ持つ芳香環について検討した．反応時の pH などを変化させるために 3-Pump FIA 装置を用い発光強度を測定した．結果を Table 3 に示す．化合物間の発光強度の違いだけではなく，同一化合物の pH 変化による感度の変化を表すためにノイズ幅を 1 mm としたときのピーク高さ（Nomalized luminescence intensity: N. L. I.）で示している．π電子密度の高いヘテロ芳香環である Thiophene，Pyrrole にさらに電子供与性の官能基であるメチル基が 2 つ結合した DMT，DMP に強い発光がみられ，π電子密度の低いヘテロ六員芳香環の Pyridine については，メチル基が 2 つ結合した 2,6-Dimethylpyridine でも発光が確認されなかった．このことから芳香環を形成するπ電子密度が発光反応に関与していると考えられる．

電子供与性の官能基の存在で Ru 錯体の発光が強くなるという傾向は脂肪族アミンにおいても確認されており，また第 2 章で述べた共役二重結合化合物においても同様の傾向が見られた．アミンと Ru 錯体の発光反応を最初に報告した Noffsinger らは，Ru 錯体と脂肪族アミンの発光が第一＜第二＜第三アミンの順に強くなることから，窒素原子の孤立電子対密度をイオン化ポテンシャル（I. P.）で数値化し，I. P. と発光強度の間に相関関係が成り立つことを報告している [3]．そこで同様にヘテロ芳香環化合物の I. P. を文献調査したところ，発光反応を起こした物質の I. P. はすべて 8 eV 前後であり，この値はアミンの中で最も強く発光する脂肪族第三アミンの I. P.（例えば, トリプロピルアミン, 7.92 eV）と同程度であることが明らかになった．さらに第 2 章で発光反応が見られた共役二重結合化合物も同程度の I. P. を持っていることがわかった．（例えば 2,4-Hexadiene, 8.09 eV; 2,5-Dimethyl-2,4-hexadiene, 7.65 eV）しかしながら，8 eV 付近の I. P. を持っていても Dibenzothiophene や Thianaphthene では発光は見られなかった．Noffsinger らの報告においても発光反応を十分起こしうる I. P. を持つトリフェニルアミン（6.99 eV），ジフェニルアミン（7.35 eV）が発光反応を起こさないことが報告されている．彼らはこの理由として，これら物質の I. P. はπ電子によるものであり，π電子は n 電子に比べアミンから Ru 錯体への電子移動反応が起こりにくいためとしている．また，Knight らはトリフェニルアミン等が発光反応を起こさないのは，Ru 錯体により酸化され生成したラジカル中間体の正電荷もしくはラジカルが，芳香環により非局在化し過度に安定化され反応

性が落ちるためとしている [17]．Dibenzothiophene，Thianaphthene もチオフェン環にベンゼン環が縮合した構造をしている．よって，アミンと同様に Ru 錯体への電子移動反応が起こりにくいためか，Ru 錯体により酸化され生成したラジカル中間体が過度に安定化するため発光反応が起こらないものと考えられる．いずれにせよ，I. P. のみからは Ru 錯体と発光反応を起こすかどうかの判断はできないが，Ru 錯体を発光させる新たな物質の探索に一つの指標として用いることはできると考えられる．

Table 3: Normalized luminescence intensity of monoheteroaromatic compounds. Sample: 10 μM. FIA conditions: carrier, water–acetonitrile (3:7, v/v); $Ru(bpy)_3{}^{2+}$ solution, 0.5 mM $Ru(bpy)_3{}^{2+}$ in 100 mM sodium sulfate containing 1 mM sulfuric acid; buffer solution, 100 mM phosphate buffer; carrier flow rate, 0.8 ml/min; $Ru(bpy)_3{}^{2+}$ solution flow rate, 0.3 ml/min; buffer flow rate, 0.1 ml/min.

Compound	N. L. I.		I. P. / eV [a]
	pH 2.8	pH 7.1	
Pyrrole	29	36	8.23
2,5-Dimethylpyrrole	1090	8	7.69
Thiophene	0	−8	8.85
2-Methylthiophene	0	−8	8.59
2,5-Dimethylthiophene	2950	476	8.1[b]
2,5-Thiophenedicarboxylic acid	0	0	-
2,5-Dimethylfuran	99	16	-
L-Tryptophan	240	112	7.5[b]
3-(Thianaphthene-3-yl)-L-alanine	686	3200	-
Pyridine	−4	−16	9.26
2,6-Dimethylpyridine	−4	−8	8.9
Thianaphthene	0	0	8.2
Dibenzothiophene	0	0	7.93

[a]The first ionization potential as measured by photoelectron spectroscopy or electron impact[b] for each compound as reported in the literature [19].

3.3.2 ジヘテロ，トリヘテロ芳香環化合物との化学発光

次に環内にヘテロ原子を 2 つ以上持つヘテロ芳香環についてもモノヘテロ環と同様に発光強度を求めた．結果を Table 4 に示す．すべての化合物において微弱ながら発光が見られた．モノヘテロ環では，pH の上昇とともに発光強度が減少する化合物がほとんどであったが，ジヘテロ環では中性以降で発光が増大するものが多く確認された．これは，検討したヘテロ原子を 2 つ以上持つヘテロ芳香環では必ず孤立電子対を持つ窒素原子が存在し，pH の増大とともに孤立電子対がプロトンから開放されるため，この孤立電子対が発光に関与していると考えられる．ただし，同様に孤立電子対を有しているπ欠如系（ヘテロ六員）芳香環の Pyridine では pH を上昇させても発光反応を起こさなかったため，（ピリジン環を持つ物質は，励起 2 価 Ru 錯体の quencer となることが報告されている [20]．このことも考慮に入れなければならないが,）芳香環全体のπ電子密度も発光反応に関わる要素であると考えられる．

ヘテロ原子を 3 つ持つ 1,2,4-Triazole と，その誘導体で芳香環を強く活性化するアミノ基を持った 3-Amino-1,2,4-triazole においても発光強度に差が見られた．こちらも置換基であるアミノ基の発光とも考えられるが，本章（3.3.1）でも述べたように Aniline などの芳香環に置換したアミンは通常発光反応を示さないことから，これも芳香環も含めた発光反応であると考えられる．（Cimetidine の pH 9.4 での強い発光は，ヘテロ芳香環部位ではなく別に有する 3 つの窒素原子由来であると考えられる．）

また，Table 3，4 に見られるように今回検討したヘテロ芳香環化合物の中でアミノ酸はすべて例外的に強い発光を示した．Thianaphthene では発光反応は起こらないが，3 位にアミノ酸部位が導入された 3-(Thianaphthene-3-yl)-L-alanine では強い発光を示した．また，Table 4 の L-Histidine と 4-Methylimidazole を比べると置換基のイミダゾール環への電子供与に大きな差があるとは考えられないが，pH 7.1 における発光強度に約 30 倍もの差が見られた．これらアミノ酸類の強い発光は，アミノ酸のアミノ基による発光ではないかと考え L-Histidine の構造からカルボキシル基が外れた構造をもつ Histamine を用いて発光強度を測定したが，他のイミダゾール環と同程度の発光しか得られなかった．また，L-Histidine のアミノ基がアミド化したβ-Alanyl-L-histidine についても検討したが，これも他のイミダゾール環と同程度の発光となった．これらの結果はイミダゾール環との発光反応は間違いなく起こっているが，これに加えアミノ酸構造を持つときに限り，強い発光反応を起こすことが示唆された．これについては第 4 章で考察する．

Table 4: Normalized luminescence intensity of di-,tri-heteroaromatic compounds. Sample: 10 μM. FIA conditions: carrier, water–acetonitrile (8:2, v/v); other conditions are same as in Table 3.

Compound	N. L. I.		
	pH 2.4	pH 7.1	pH 9.4
Imidazole	36	53	188
Pyrazole	40	42	16
Thiazole	24	14	6
N-Methylimidazole	24	34	18
2-Ethylimidazole	24	34	80
4-Methylimidazole	16	114	200
L-Histidine	0	3520	628
Histamine	8	168	64
Cimetidine	48	117	1030
β-Alanyl-L-histidine	16	120	196
4-Hydroxymethyl-5-methylimidazole	0	68	120
1,2,4-Triazole	20	12	0
3-Amino-1,2,4-triazole	0	242	24

3.3.3 発光反応機構の解明

ここまでモノヘテロ，ジヘテロ，トリヘテロ環を扱ってきたが，モノヘテロ系以外の試料は孤立電子対を有する窒素原子を持つため発光機構の解明を非常に難しくすることが考えられる．そこでモノヘテロ環に絞り，またモノヘテロ環の中でも最も強い発光反応がみられたチオフェン類を試料して発光機構の解明を試みた．

まず，より詳しく官能基の種類，数を変化させ Ru 錯体との発光を測定した．結果を Table 5 に示す．強い発光が確認されたものはすべて 2，5 位両方にアルキル基を持つものであった．しかしながら，2，5 位にアルキル基を有していても 3 位にアセチル基を持った 3-Acetyl-2,5-dimethylthiophene では発光は起こらなかった．この結果は，電子吸引基であるアセチル基の存在でチオフェン環の電子密度が低下し，Ru 錯体による酸化が起こらなくなるためと考えられる．

そこでチオフェン類の酸化がどの程度の電位で起こるのか，サイクリックボルタンメトリーを用い調査した．結果，すべてのチオフェン類は，Ru 錯体より高い酸化電位を持っていた．つまり Ru 錯体は触媒的にチオフェン類を酸化していることが確認された．Fig. 11A（a）に Ru 錯体のボルタモグラム，（b）に Ru 錯体と DMT 混合溶液のボルタモグラムを示す．DMT の添加により，2 価 Ru 錯体の酸化電流ピークが増大し，逆に 3 価 Ru 錯体の還元電流ピークが消滅した．この結果は，電極酸化によって生じた 3 価錯体が溶液中に混在している DMT により還元され 2 価錯体になるため，見掛けの 2 価錯体濃度が高くなり酸化電流ピークの増大，また生成した 3 価 Ru 錯体が DMT により還元されるため，3 価 Ru 錯体還元電流ピークの消滅となったことを示している．またこのとき，Ru 錯体と DMT の ECL が Ru 錯体の酸化電位である 1.2 V 付近から確認された（Fig. 11B（d））．一方，3-Acetyl-2,5-dimethylthiophene と 2 価錯体の混合液では，1.2 V 付近で Ru 錯体の酸化，1.5 V 付近で 3-Acetyl-2,5-dimethylthiophene の酸化が確認されたが，Ru 錯体の還元電流ピークの消滅は見られず，また ECL も確認されなかった．DMT と同程度の酸化電位を持つ Dibenzothiophene についても同様の実験を行ったが，3-Acetyl-2,5-dimethylthiophene と同じ結果となった．

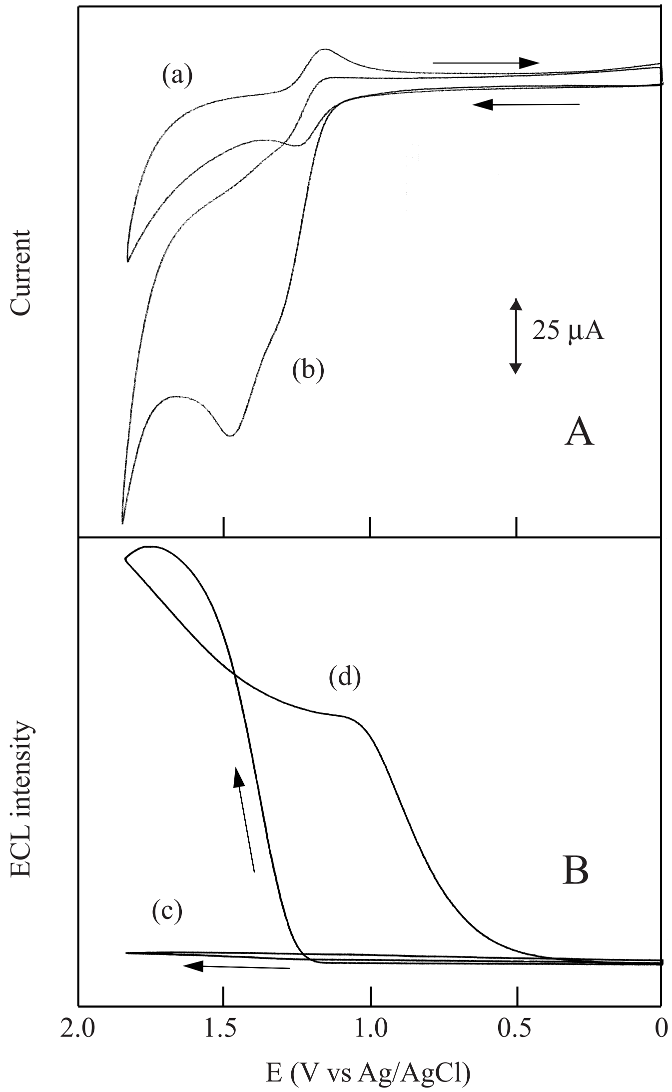

Fig. 11: Cyclic voltammograms (A) and electrogenerated chemiluminescence intensity–potential profile curves (B) obtained at a glassy carbon electrode at a scan rate 100 mV/s (reference electrode Ag/AgCl). (A) (a) 1 mM $Ru(bpy)_3{}^{2+}$; (b) 1 mM $Ru(bpy)_3{}^{2+}$ + 2 mM DMT. (B) (c) 1 mM $Ru(bpy)_3{}^{2+}$; (d) 1 mM $Ru(bpy)_3{}^{2+}$ + 2 mM DMT. All samples were prepared with 100 mM NaH_2PO_3–Acetonitrile (1:1, v/v), pH 5.0.

Table 5: Chemluminescence intensity of thiophene derivatives and related compounds. Sample: 10 μM. FIA conditions: carrier, water–acetonitrile (3:7, v/v); $Ru(bpy)_3{}^{2+}$ solution, 0.5 mM $Ru(bpy)_3{}^{2+}$ in 10 mM sulfuric acid; carrier flow rate, 0.8 ml/min; $Ru(bpy)_3{}^{2+}$ solution flow rate, 0.3 ml/min; PMT biased at −500 V; ECR, 50 μA; effluent pH value, 2.2.

Compound	CL intensity / mV	I. P. / eV[a]	Epa / V[b]
Thiophene	0	8.85	-
2-Methylthiophene	0	8.59	1.57
3-Methylthiophene	0	8.70	1.59
2,5-Dimethylthiophene	116	8.10[c]	1.45
2,5-Dimethylpyrrole	17	7.69	0.67
2,5-Dimethylfuran	10	-	1.20
2-n-Butyl-5-ethylthiophene	154	-	1.43
5-Methyl-2-thiophenecarboxaldehyde	0	-	-
2,3,5-Trimethylthiophene	140	-	-
3-Acetyl-2,5-dimethylthiophene	0	-	1.59
3-(Cyanomethyl)-2,4,5-trimethylthiophene	181	-	1.41
Dibenzothiophene	0	7.93	1.43
n-Butyl Sulfide	0	8.22	-
$Ru(bpy)_3{}^{2+}$	-	-	1.21

[a]The first ionization potential as measured by photoelectron spectroscopy or electron impact[c] for each compound as reported in the literature [19].

[b]Anodic peak potential.

次に Ru 錯体と DMT の発光反応後に生じる反応生成物の同定を行った．チオフェン類は導電性高分子として用いられるため，酸化や還元に対する反応については多くの報告がある．文献調査の結果，DMT が水中で酸化反応を受けた場合，2-Methy-5-thiophenecarboxaldhyde (MTA) の生成が予測された [21]．そこで HPLC–UV 検出法により確認を行った．DMT に電解酸化で得た 3 価 Ru 錯体を大過剰に加え発光反応を起こさせたものを試料として HPLC–UV 検出法で測定した．MTA と 2 価 Ru 錯体混合溶液のクロマトグラムと DMT と 3 価 Ru 錯体混合溶液のクロマトグラムを Fig. 12A に示す．MTA の保持時間と反応生成物の保持時間の一致がみられ，また吸収波長の一致も見られた．そこで一定量の DMT に電解酸化で得た 3 価 Ru 錯体を任意量加え発光反応させた後，残った DMT および生成した MTA をプロットした結果を Fig. 12B に示す．DMT の減少に伴い MTA の増加が確認され，最終的に約 70 %の DMT が MTA に変換された (100 %とならない理由としてはチオフェン同士の重合等が考えられる [21])．Table 5 で確認したように Ru 錯体と MTA の発光反応は起こらず，また，Ru 錯体と MTA の混合溶液におけるボルタモグラムにおいて，Ru 錯体の還元電流の減少，ECL は確認されなかった．これらの結果から，Ru 錯体と DMT における発光反応の最終生成物は MTA であることが明らかになった．

最後に Ru 錯体と DMT の発光反応のモル比を求めた．Fig. 12B において DMT に対しモル比で約 2 倍の 3 価 Ru 錯体を添加したとき DMT のピークが消滅した。そこで重合等の影響を除くためより薄い濃度で，また 2 価 Ru 錯体が電解酸化で 3 価に 100 %変換されているかは確認できないため，Ru 錯体と 2:1 で反応することが報告されているシュウ酸 [4] について対照実験を行うことで DMT と Ru 錯体の発光反応比の決定を試みた．10 μM の試料に任意量の 3 価 Ru 錯体を添加し，3 価 Ru 錯体と反応せず残存した試料を FIA–CL 検出法で測定した．結果を Fig. 13 に示す．DMT に対し 2 倍量の 3 価 Ru 錯体を加えたとき DMT のピークが消滅した．この結果より，3 価 Ru 錯体と DMT は 2:1 の割合で反応を起こしているといえる．

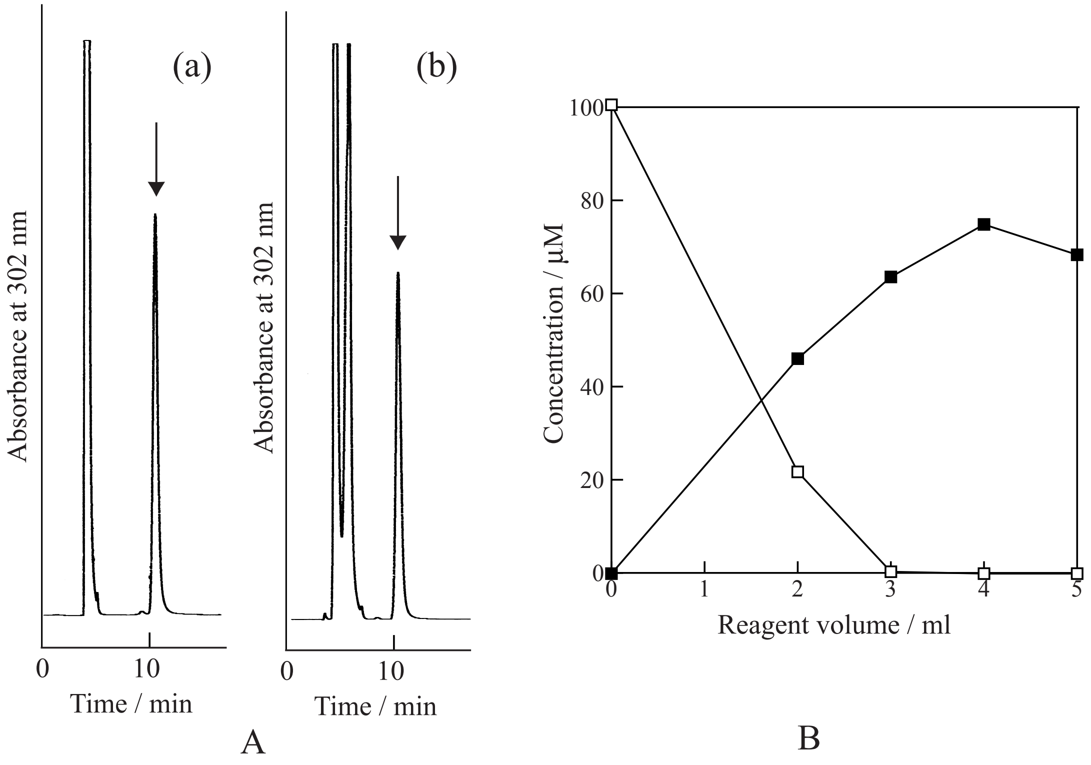

Fig. 12: (A) Chromatograms obtained with HPLC–UV detection. Sample: (a) The mixed solution of 100 μM Ru(bpy)$_3{}^{2+}$ and 50 μM MTA; (b) The mixed solution of 100 μM Ru(bpy)$_3{}^{3+}$ and 100 μM DMT. (B) The relationship between decreased DMT (□) and generated MTA (■).

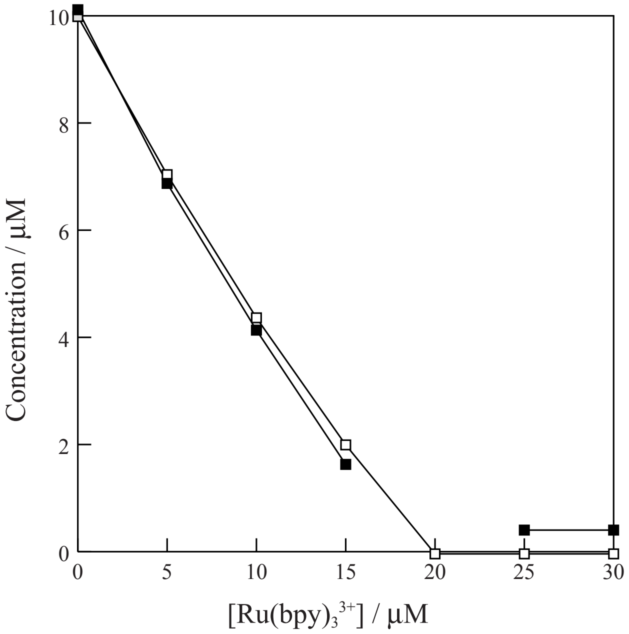

Fig. 13: Stoichiometric study of the reaction of DMT with $Ru(bpy)_3{}^{3+}$. Sample: DMT(■); oxalic acid(□). FIA conditions: carrier, water–acetonitrile (1:1, v/v); $Ru(bpy)_3{}^{2+}$ solution, 0.5 mM $Ru(bpy)_3{}^{2+}$ in 10 mM sulfuric acid; carrier flow rate, 0.5 ml/min; $Ru(bpy)_3{}^{2+}$ solution flow rate, 0.3 ml/min; ECR, 50 μA; PMT biased at −400 V.

これらの実験結果および先に報告されているチオフェン誘導体の水中での酸化反応の報告 [21] から，Fig. 14 に示す発光機構が推測される．ヘテロ芳香環の酸化により生じたカチオンラジカルは，反応性の高いα位（2, 5 位）置換アルキル基よりプロトンを放出し，ラジカルを形成する．そのため発光反応を起こすには，2，5 位にアルキル基を持たねばならない．しかしながら，2，5 位にアルキル基を持っていても電子吸引基がヘテロ環に置換していると，単純にチオフェン環の電子密度が低下し，1 式で示される Ru 錯体による酸化反応が進まなくなるだけではなく，2，3 式で示される反応も阻害していると考えられる．これは，3-Acetyl-2,5-dimethylthiophene の電気化学的検討において，電極酸化で 3-Acetyl-2,5-dimethylthiophene の酸化反応を進行させても，発光反応が起こらなかったことから確認される．Dibenzothiophene が DMT と同程度の酸化電位を持つにも関わらず発光反応を起こさないのは，触媒的に起こる 1 式の反応にπ電子系が広がる構造が適していない．また，電極反応で 1 式を進めても発光を起こさなかったことから，生成したカチオンラジカルもしくはラジカルが大きく広がるπ電子により非局在化され反応性が落ち，2 式もしくは 3 式で示される反応を起こせないためと考えられる．本章（3.3.1）で pH によって化学種が変化しない DMT においても発光強度の pH 依存性がみられた．この結果も 2，3 式でプロトンが関わる反応経路が存在していることから，これらの反応によって生じる pH 依存性であると考えられる．さらに DMT ＞ DMP ＞ DMF の順に強い発光をあたえるのも芳香族性が強い方が，Ru 錯体による酸化により 6 π電子系が崩壊しても芳香環を保ちやすく，2 式の反応を進めやすいためと考えることができる．

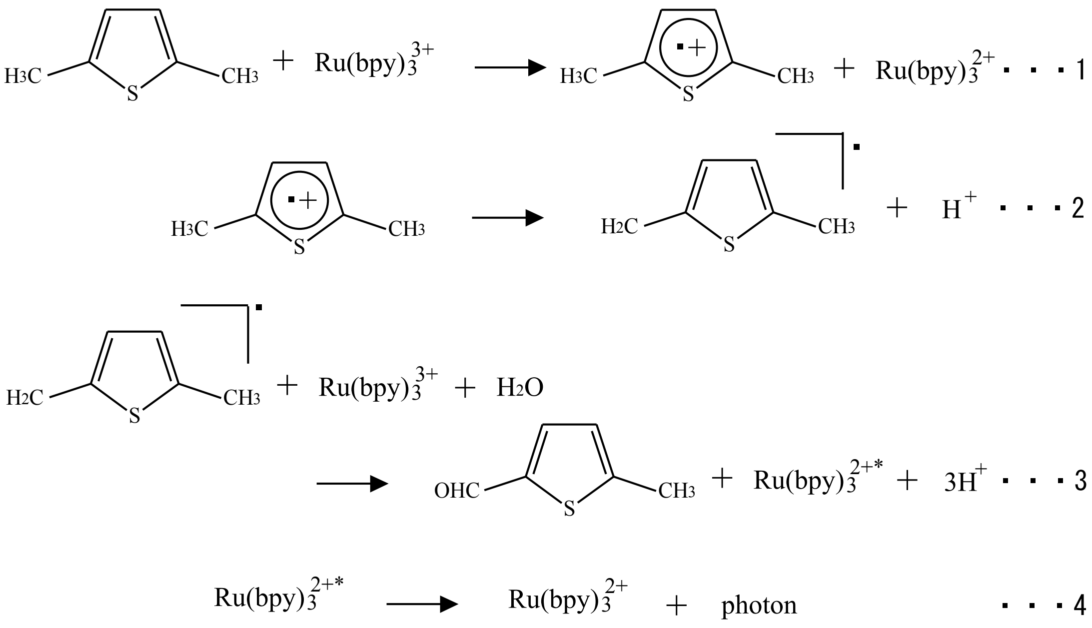

Fig. 14: The proposed mechanism of the CL reaction of $Ru(bpy)_3^{3+}$ with DMT.

3.4 まとめ

本章においてヘテロ五員芳香環化合物と Ru 錯体の発光反応が新たに見出され，また DMT と Ru 錯体の発光反応機構が推定された．得られた反応機構は提案されている脂肪族アミンと Ru 錯体の反応機構（Fig. 15）と類似していた．また，同程度の I. P. を有する，置換アルキル鎖が長いほど強い発光を起こす，芳香環が置換すると発光を起こさないなど，脂肪族アミンと同じ挙動が確認された．この結果は，脂肪族アミンとヘテロ芳香環が同じ発光反応機構を通る可能性が非常に高いことを示している．これまで脂肪族アミンと同じ発光反応機構を持つ物質の報告はなく，この成果は，どのような物質が Ru 錯体と強い発光反応を起こすのか解明するうえで非常に重要な手がかりになると考えられる．

また推定した発光機構では，プロトンが脱離しやすい塩基性側で強い発光を起こすと考えられるが，酸性側で高い感度が得られるという矛盾した結果となった．Ru 錯体化学発光法における検出感度は，水酸化物イオンによるバックグランドの上昇，それに伴うノイズの増大，試料の発光反応の pH 依存性の兼ね合いから決まる．特に本研究ではフロースルー型の検出セルを用いているため，発光反応全体を捉えていない．また，第 9 章においてチオフェン類に関しては発光反応速度が非常に速いことが確認された．これらのことから反応を抑制する酸性側であるほうが高い感度を示しているのかもしれない．

4　アミン構造における電子吸引基の効果 ～イミノ酸の高感度同時検出法の開発～

4.1　序

1981 年の Noffsinger らによる報告 [3] 以来，Ru 錯体の化学発光反応はアミン構造を持つ様々な物質の検出法として利用されてきた．一般に脂肪族第三アミンが最も効率よく Ru 錯体を発光させるといわれているが，脂肪族第三アミンであっても発光の強さは物質ごとに大きく異なる．そのため，どのような構造が Ru 錯体と強い発光を起こすのか予測できるようにすることは，新たな分析法を効率よく開発する上で重要である．また，Ru 錯体をラベル剤として用いる電気化学発光イムノアッセイ等の高感度化のため，より高効率で Ru 錯体を発光させる物質の発見・開発が望まれている．これらの理由から，アミン構造と Ru 錯体の発光反応機構（Fig. 15）の解明および分子構造と発光強度の関係について多くの研究が行われてきた [17].

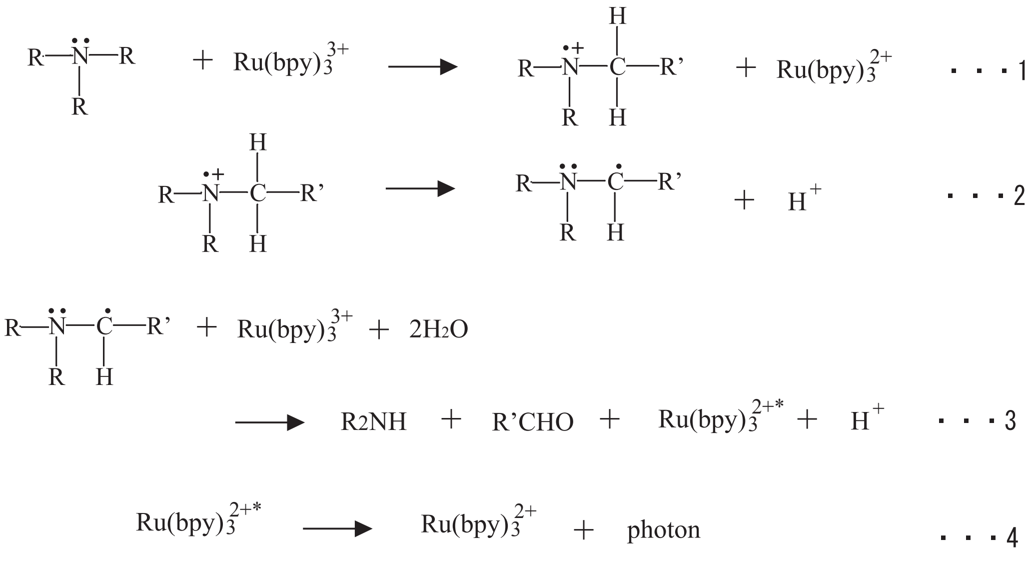

Fig. 15: General mechanism of the CL reaction of $Ru(bpy)_3^{3+}$ with tertiary amines [17].

これまでに報告されているアミン構造と Ru 錯体の発光反応の傾向をまとめると以下の三点に集約される．

1. アルキル基の増える第一＜第二＜第三アミンの順に発光は強くなる [3].
2. Ru 錯体との反応部位とされる窒素孤立電子対は水溶液中ではプロトン化しているため，プロトンから開放される溶液条件を用いることで発光は強くなる [7].
3. 窒素原子もしくはα位（窒素原子の隣）の炭素原子に電子吸引性の官能基が置換した場合，アミンの孤立電子対を引き寄せるため反応性が下がる，もしくは生成するラジカルが不安定化し発光は減少する．逆に電子供与性の官能基が置換した場合，ラジカルを安定化させ発光は増大する．また，芳香族アミン，芳香環置換アミン，二重結合を持つアミンなどはラジカルが非局在化し過度に安定化するため反応性が下がり発光は減少する [7,17].

このような傾向は確かに存在するが，これらの傾向からは説明のつかない報告も多い．アミノ酸の Proline は，第二アミンでありながら Ru 錯体を強く発光させる代表物質のひとつである [15]．Proline は，脂環式第二アミンであるピロリジン環のα位炭素にカルボキシル基が置換した構造を持つ．この構造に着目し，これまでドウモイ酸（第 7 章），ピペコリン酸（第 8 章）の高感度分析法を開発してきた．しかしながら，なぜこの構造が Ru 錯体と強い発光を起こすのかは不明であった．Lee らによると，Proline，Pro-Gly，Gly-Pro の同一条件による発光強度は，それぞれ 49600, 2800, 72 と報告されている [15]. Gly-Pro のように Proline の第二アミン部位がアミド化した場合，孤立電子対がカルボニル基による電子吸引により引き寄せられるため，反応性が落ち発光強度が低下すると考えることができる．しかし，Proline のカルボキシル基がアミド化した Pro-Gly において発光強度が Proline の 1/20 程度になることは説明がつかない．本来であれば，カルボキシル基の電子吸引効果がアミド化して弱まる Pro-Gly の方が強い発光を示すはずであり，少なくとも発光強度が減少する理由はない．しかしながら，この報告以外にもアミン構造を有する物質のα位炭素のカルボキシル基が発光を強くしている可能性が多数の文献から確認された [6,22–24]．また第 3 章（3.3.2）において，Histamine と Histidine の発光強度を比べたところ，分子構造の差はアミノ基のα位炭素にカルボキシル基が存在するか否かであるが同一条件において発光強度に 20 倍の差が見られた．

これらの報告・結果は，電子吸引基であるカルボキシル基の存在が発光強度に大きく影響していることを示唆している．そこで本研究では，アミン構造における電子吸引基の効果について検討を行った．

4.2　実験

4.2.1　試薬

Tris(2,2’-bipyridine)ruthenium(Ⅱ) chloride hexahydrate は Palmer の方法 [16] により，Ruthenium(Ⅲ) chloride n-hydrate（試薬特級, 和光純薬工業株式会社），2,2’-Bipyridine（試薬特級, 和光純薬工業株式会社）を用い合成した．イミノ酸 5 種の標準溶液として L-Hyroxyproline（99.0 %，　和光純薬工業株式会社），L(-)-Proline（99.0 %, 和光純薬工業株式会社），N-Methylglycine（東京化成），N-Methyl-DL-alanine・1/2H_2O（東京化成），Pipecolic acid（98 %, Aldrich）を用いて超純水で 10 mM にそれぞれ調整し，冷蔵庫内（4 ℃）に保存した．他の試薬は，試薬グレードまたは特級グレードを用い精製などを行わずそのまま使用した．すべての試料はアセトニトリル，水，またはこれらの混合液で 100 mM か 10 mM に調整し，保存溶液として冷蔵庫内（4 ℃）で保管した．この保存溶液を実験直前に溶離液で薄めて使用した．水溶液の調整には水道水を Advantec AQUARIUS GS-200（Advantec）により脱イオン，蒸留後，MILLI-QⅡ システム（日本ミリポア）で超純水としたものを利用した．2 価 Ru 錯体溶液は，$[Ru(bpy)_3]Cl_2$・$6H_2O$ を 1 mM 硫酸を含む 100 mM 硫酸ナトリウム溶液に溶かし，0.5 mM となるように調整して用いた．また緩衝溶液として Britton-Robinson（BR）広域緩衝液を用いた．0.4 M BR 緩衝液は，酸溶液として 27.1 mL のリン酸（85 %, 試薬特級, 和光純薬工業株式会社），22.8 mL の氷酢酸（99.7 %, 試薬特級，和光純薬工業株式会社），24.7 g のホウ酸（99.5 %, 試薬特級，和光純薬工業株式会社）を超純水で 1 L にメスアップして調整したものを用い，2 M 水酸化ナトリウム溶液で pH を調整して用いた.

4.2.2　装置

本研究で用いた装置を以下に示す．下記の装置を必要に応じ，内径 0.5 mm（外径 1/16）のテフロンチューブで接続して HPLC（FIA）装置とした.

- Pump：GL Sciences PU611C（ジーエルサイエンス株式会社）
- Degasser：Shodex Degaseer（昭和電工株式会社）
- Injector：Rheodyne 7125（20 μL; RHEODYNE）
- CL Detector：Comet3000（有限会社コメット）

- UV-VIS Detector：L-4200（株式会社日立製作所）
- Data procescer：Hitachi D-2500 Chromato-Integrator（株式会社日立製作所）
- Column：CAPCELL PAK C18 120 A （150 x 4.6 I.D. mm; 資生堂）

4.2.3 試料消費量の測定法

第 3 章（3.2.6）で用いた発光反応比決定法と同様の操作を行った．方法としては同じであるが，50 %アセトニトリル水溶液と 0.4 M BR 緩衝液（pH 7.5）を 5:1 の割合で混合したキャリアー溶液（pH 8.3）を用いており，3 価 Ru 錯体の水酸化物イオンとの反応が無視できないレベルで起こるため発光反応比とはならない．また，この実験では 1 mM 硫酸と 100 mM 硫酸ナトリウム混合溶液で調整した 0.5 mM Ru 錯体溶液を用いた．

4.2.4 血清試料の調整法

200 μL の人血清（精度管理用血清液状ネスコール-N，正常域，オリエンタル酵母工業株式会社）にアセトニトリル 200 μL を加え攪拌し，3500 rpm で 10 分 遠心分離してタンパク質を沈殿させた．上澄み 200 μL に 30 mM リン酸水溶液を 800 μL 加え，C18 固相抽出カートリッジ（Strata C18-E, 50 mg / 1 ml, phenomenex）に通し，得られた溶液を試料として 20 μL を HPLC に注入した．（固相抽出操作は必要なくメンブランフィルターろ過のみでも測定可能であるが，カラム保護のため疎水性物質を除くガードカラムの代りとして使用した．固相抽出カートリッジは，水，アセトニトリル，30 mM リン酸水溶液をそれぞれ 1 mL 通過させることでコンディショニングして用いた．）

4.3　結果と考察

4.3.1　第二アミン構造におけるカルボキシル基の効果

カルボキシル基の効果を調査するため代表試料として，脂環式第二アミンであるPiperidine，このピペリジン環のα，β，γ位炭素にそれぞれカルボキシル基を持つPipecolic acid，Nipecotic acid，Isonipecotic acidを用いた．3-Pump FIA–CL装置を用い同一条件での発光強度を測定したところ，Fig. 16に見られるようにカルボキシル基が窒素原子から離れるに従い発光は弱くなった．PiperidineとPipecolic acidを比較すると電子吸引基であるカルボキシル基をα位に持つPipecolic acidが，Piperidineと比べ10倍以上強い発光を示した．

そこでカルボキシル基以外の電子吸引基の効果，環構造の効果，カルボキシル基単独での発光反応の可能性等を検討するため，関連する様々な物質とRu錯体の発光を調査した．結果をTable 6に示す．ProlineやPipecolic acidの開環した構造といえるN-Methylalanineにおいても強い発光がみられたが，カルボキシル基のみのCyclohexanecarboxylic acidでは発光は確認されなかった．また，Pipecolic acidのカルボキシル基がメチル化したMethyl pipecolinateにおいては，発光強度が大きく減少しPiperidineと同程度となった．これらの結果からは，カルボキシル基の電子吸引効果により強い発光が起こっていると考えられた．そこで，ベンジル基やシアノ基などの電子吸引基をα位に持つN-MethylbenzylamineやN-Methylaminoacetonitrileの発光を測定したが，発光強度と電子吸引効果との間に相関関係は見出せなかった．カルボキシル基をα位に持つ第二アミン類はすべて強い発光を示したため，カルボキシル基に絞り発光を増大させる原因を検討することとした．

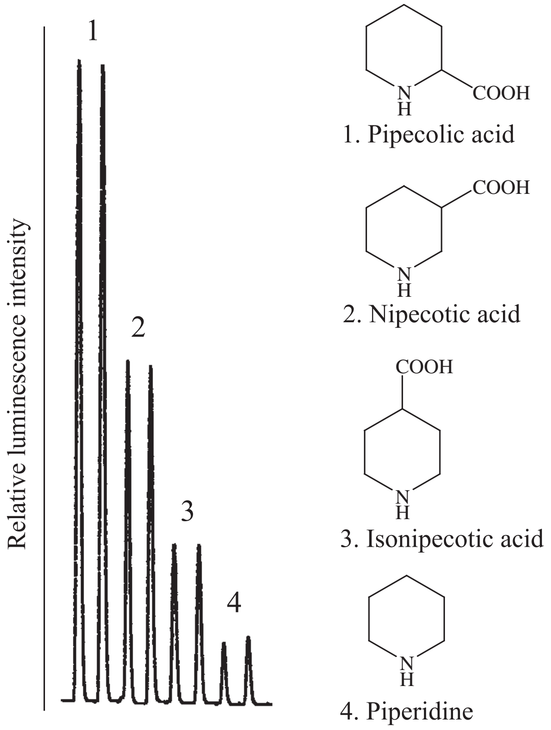

Fig. 16: The relationship between chemiluminescence intensity and position of carboxylic group. Sample: 10 μM. FIA conditions: carrier, water–acetonitrile (1:1, v/v); $Ru(bpy)_3{}^{2+}$ solution, 0.5 mM $Ru(bpy)_3{}^{2+}$ in 100 mM sodium sulfate containing 1 mM sulfuric acid; buffer solution, 0.4 M BR buffer (pH 7.5); carrier flow rate, 0.5 ml/min; $Ru(bpy)_3{}^{2+}$ solution flow rate, 0.3 ml/min; buffer flow rate, 0.1 ml/min; ECR, 50 μA; PMT biased at -400 V.

Table 6: Relative luminescence intensity of all samples. Sample: 10 μM. FIA conditions are same as in Fig. 16.

Compound	R. L. I.
Pipecolic acid	182
Nipecotic acid	108
Isonipecotic acid	50
Piperidine	16
Cyclyhexanecarboxylic acid	0
Methyl pipecolinate	10
2-Methylpiperidine	13
Proline	135
Diethylamine	23
N-Methylalanine	195
N-Methylglycine (Sarcosine)	76
N-Methylaminoacetonitrile	1
N-Methylbenzylamine	46

4.3.2 電子吸引基の効果

カルボキシル基の存在が発光を強くする理由として，当初，１）プロリンは発光持続時間が長い [25]．2）アミンと Ru 錯体の反応によりα炭素がアルデヒド化した物質が生成する [26]．という二つの報告から，連続的な発光反応の可能性を考えた．つまり第二アミンとして Ru 錯体と発光反応を起こした後，カルボキシル基を含む反応生成物と生成したアルデヒド基によりジケトン構造が形成され再び Ru 錯体と発光反応を起こしているのではないかと考えた*‡.

連続的な発光反応が起こるのであれば，Pipecolic acid と Pipelidine の 3 価 Ru 錯体消費量を比較することで確認できる．つまり，Pipecolic acid が 1 分子で 2 回発光反応を起こすなら Piperidine に比べ 3 価 Ru 錯体を二倍消費する．言い換えれば，一定量の Ru 錯体を加えたとき Pipecolic acid の消費量は，Piperidine の半分となる．そこで，一定量の試料に任意量の 3 価 Ru 錯体をそれぞれ添加し，試料の減少量を追うことで証明を試みた．試料の減少量を FIA–CL 法で測定した結果を Fig. 17 に示す．Pipecolic acid の消費量が最も少ないと予測していたが，全く逆の結果が得られた．Piperidine $<$ Isonipecotic acid $<$ Nipecotic acid $<$ Pipecolic acid の順に消費量は増大し，発光強度の順と一致した．

この結果は，同一条件においてカルボキシル基が近くに存在しているほど Ru 錯体と発光反応を起こしやすくなると解釈することができる．確かに電子吸引基であるカルボキシル基の存在は，アミンの pKa 値を引き下げる．例えば，Proline と Pyrrolidine のアミン部位の pKa は，それぞれ 10.4，11.2 と報告されている．最初に述べた Ru 錯体と発光を起こす条件である孤立電子対のプロトンからの開放は，カルボキシル基を持つことにより，持たないものと比べ低い pH で起こる．その結果，発光反応が促進され発光が増大したと考えられる．そこで Piperidine 誘導体の発光反応の pH 依存性を調べた．結果を Fig. 18 に示す．Pipecolic acid，Nipecotic acid，Isonipecotic acid，Piperidine の順に低い pH で発光が起こり始めた．

*‡ 実際に提案されているアミノ酸と Ru 錯体の発光反応機構ではジケトン部位を持つ物質が生成している [7].

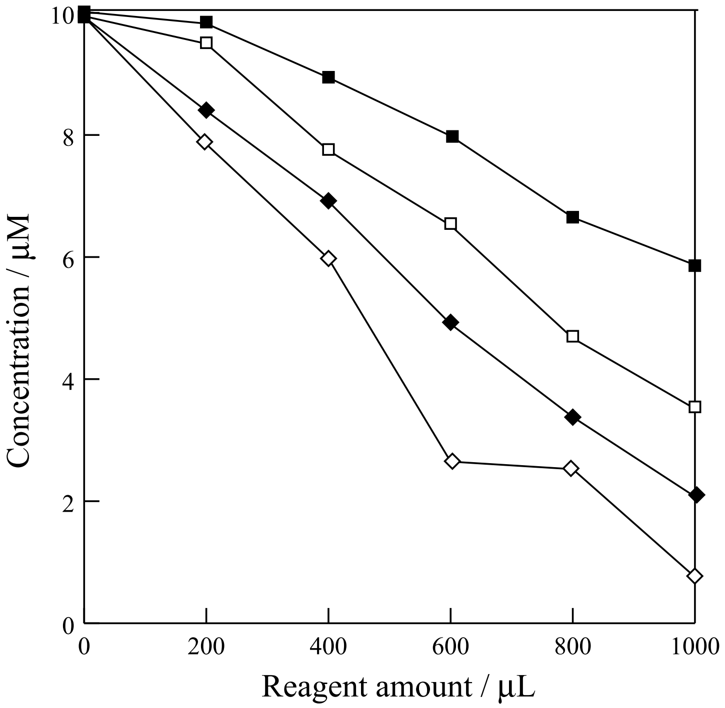

Fig. 17: The relationship between reagent consumption and position of carboxylic group. Sample: pipecolic acid (◇); nipecotic acid (◆); isonipecotic acid (□); piperidine (■). FIA conditions: carrier, 50 % acetonitrile–0.4 M BR buffer (5:1, v/v; pH 8.3); $Ru(bpy)_3{}^{2+}$ solution, 0.5 mM $Ru(bpy)_3{}^{2+}$ in 100 mM sodium sulfate containing 1 mM sulfuric acid; carrier flow rate, 0.6 ml/min; $Ru(bpy)_3{}^{2+}$ solution flow rate, 0.3 ml/min; ECR, 50 μA; PMT biased at -350 V.

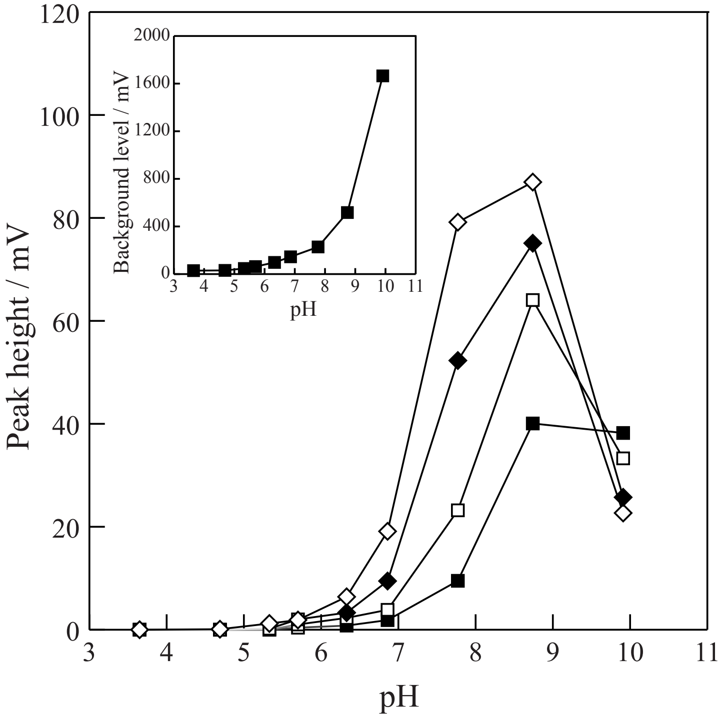

Fig. 18: Effect of the pH on the chemiluminescence intensity for piperidine derivatives. Sample: 1 μM, pipecolic acid (◊); 1 μM, nipecotic acid (♦); 1 μM, isonipecotic acid (□); 1 μM, piperidine (■). FIA conditions are same as in Fig. 16 except for pH of BR buffer. Inset: background level as a function of pH.

この結果は，強い電子吸引基であれば，より pKa を引き下げ，さらに低い pH で強い発光を起こすと考えられる．そこで，Fig. 19 に示す物質の pH 依存性を調べた．これらの試料は，α位の置換基効果を考慮して選択した．結果を Fig. 20 に示す．アルキル基を置換基とみなす第二アミン試料 N-Methylisobutylamine が最大発光を示すのが pH 9.5 付近であるのに対し，フェニル基やカルボキシシル基を置換基とみなす同様の構造を持った第二アミンは pH 8 付近で最大発光を示した．しかし，発光の強さは同じレベルではなく化合物により大きく異なった．特に強い電子吸引基であるシアノ基を持つ Methylaminoacetonitrile では，pH に関わらずほとんど発光を起こさなかった．また，矛盾しているようであるがα位にメチル基を持つ N-Methylalanine，N, α-Dimethylbenzylamine と持たない N-Methylglycine，N-Methylbenzylamine の発光強度をそれぞれ比べると，どちらにおいても電子供与基であるメチル基を持つものの方が強い発光を示した．

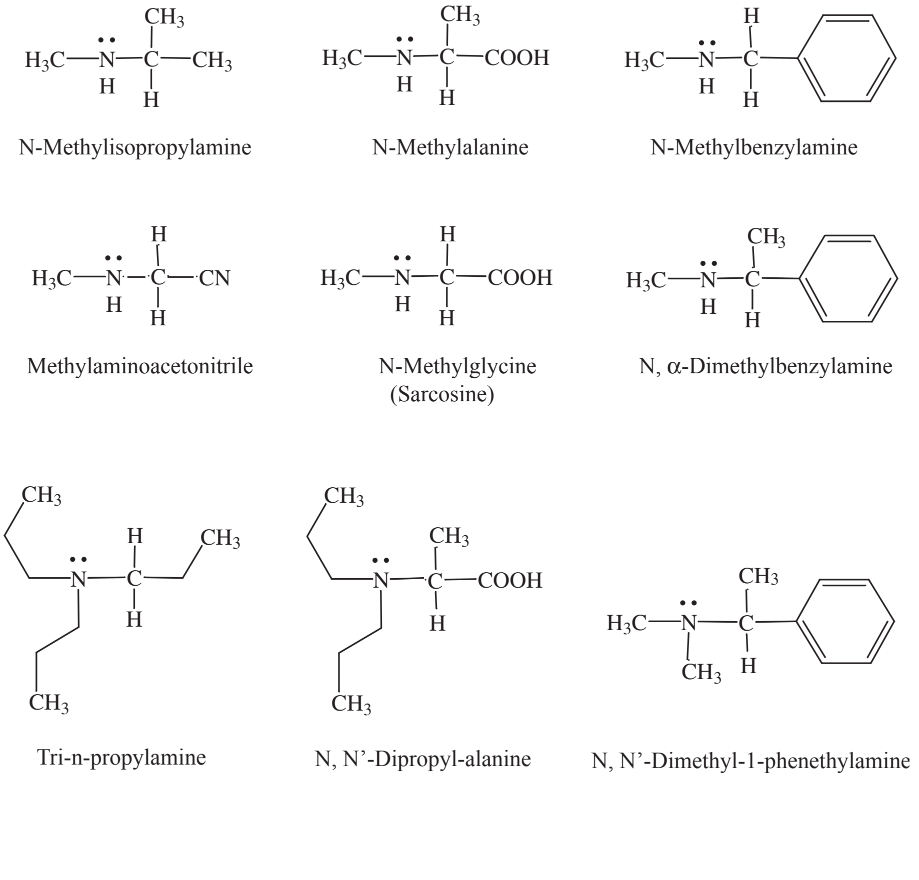

Fig. 19: Structure of selected aliphatic amine compounds.

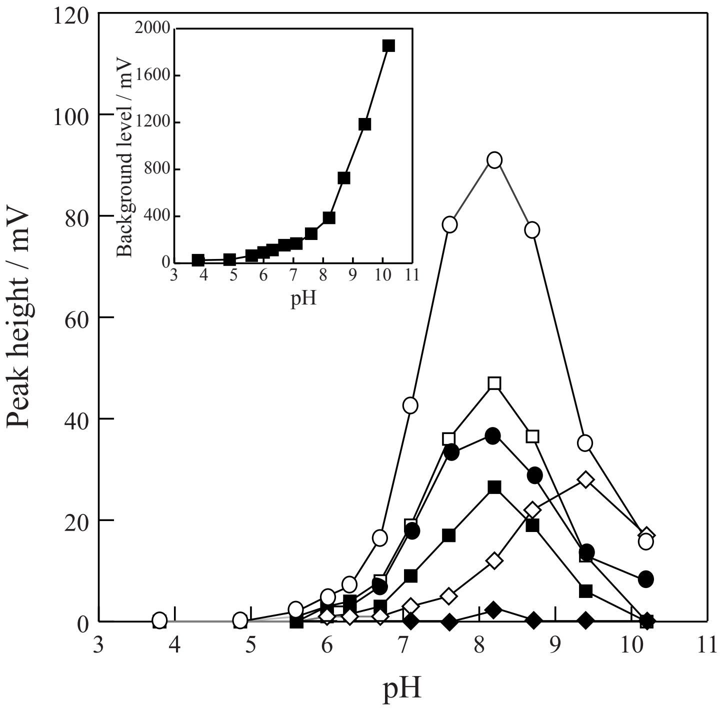

Fig. 20: Effect of the pH on the chemiluminescence intensity for selected secondary amine compouds. Sample: 1 μM, N-methylisopropylamine (◊); 1 μM, N-methylalanine (○); 1 μM, N, α-dimethylamine (□); 1 μM, N-methylglycine (●); 1 μM, N-methylbenzylamine (■); 1 μM, methylaminoacetonitrile (♦). FIA conditions are same as in Fig. 18. Inset: background level as a function of pH.

これらの結果は，単純に pKa を引き下げるだけなら強い電子吸引基が置換するほうがよいが，シアノ基のような強い電子吸引基では，報告されているように孤立電子対密度を引き下げ反応を抑制する，またはラジカルを不安定化させ発光反応を弱めていると考えられる．逆にフェニル基のような弱い電子吸引基で，さらに電子供与性のアルキル基が置換した物質においては，孤立電子対がプロトンから開放されやすくさらに生成したラジカルも比較的安定であるため強い発光反応を示すものと考えられる．

このような考え方が第二アミン類以外にも成り立つかどうか，モデル化合物として第三アミンの Tri-n-propylamine（TPA）と N,N'-Dipropyl-L-alanine（Fig. 19）の pH 依存性を調べた．その結果，Fig. 21 のように TPA と比べてカルボキシルを持つ N,N'-Dipropyl-L-alanine の最大発光を示す pH は酸性側にシフトし，発光強度は同程度であった．より低い pH で発光反応が起こるということは，水酸化物イオンによるバックグランドの上昇，それに伴うノイズの上昇，発光試薬である Ru 錯体の減少という検出の妨げとなる要素を低減することとなる．そのためより高い感度での検出が可能となる．

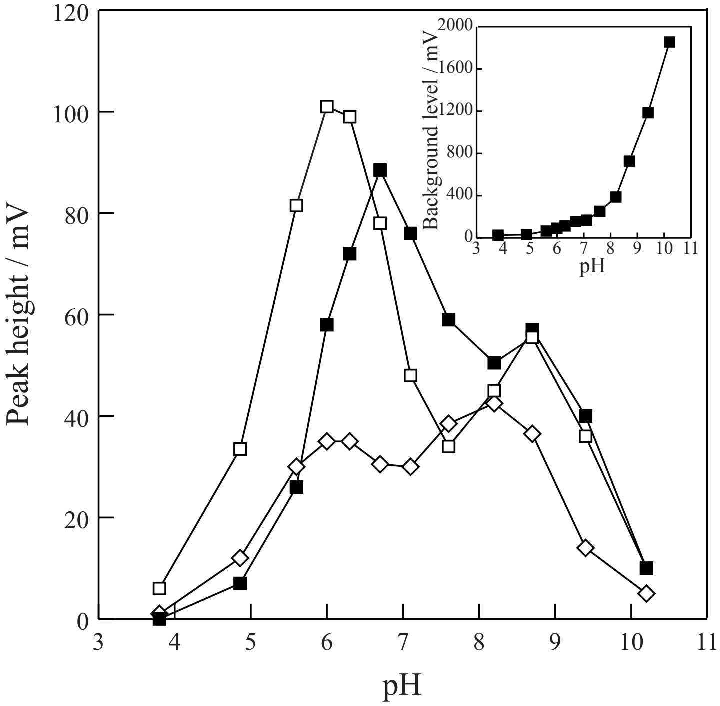

Fig. 21: Effect of the pH on the chemiluminescence intensity for selected tertiary amine compouds. Sample: 1 μM, TPA (■); 1 μM, N,N'-dipropyl-L-alanine (□); 1 μM, N,N'-dimethyl-1-phenethylamine (◇). FIA conditions are same as in Fig. 18. Inset: background level as a function of pH.

この研究で得られた知見を基に，これまで報告されてきた第三アミンと Ru 錯体の pH 依存性を文献調査したところ，低い pH で最大発光が得られるアミン化合物は，アミン構造の α または β 炭素にフェニル基が置換したものがほとんどであった．例えば，Emetine [27]，Codeine [28] は pH 4 付近で最大発光を示している．また，Morita らは Sparteine や Dihydrocodeine が pH 3 付近で最大発光を示すことに着目し，低い pH で発光を起こす条件としてキノリジジン環のような柔軟性のない（Rigid な）アミン構造であること，フェニル基もしくはモノ，ジメトキシフェニル基を持つものを挙げ，この条件を満たす物質として pH 1 付近で最大発光を示す誘導体化試薬 [29] を開発している．この報告において Morita らは Rigid な第三アミン構造を持つ様々な物質について検討して，アルコキシフェニル基を持つものが低い pH で発光を起こすこと，フェニル基がアミン部位から離れると低い pH で発光反応を起こさなくなることを報告している．しかし，第 5 章（5.2.3）において Rigid な第三アミン構造を持つ α-Solanine，α-Chaconine の pH 依存性を検討したところ最大発光を示す pH は 6.5 付近であった．また他の報告においても“ Rigid な構造＝低い pH で発光 ”は成り立たなかった．これらの結果・報告は Rigid な構造が重要なのではなくフェニル基の電子吸引効果が低い pH で発光を起こす要因であるといえる．またアミノ酸類と Ru 錯体の発光反応において，芳香環を有するアミノ酸類は比較的強い発光を起こすことが報告されており [5,6]，第 3 章（3.3.1 及び 3.3.2），また第 8 章（8.3.2）でも確認された．これらアミノ酸は α 炭素にカルボキシル基を β 炭素に芳香環を持つ第一アミンと考えることができ，これら官能基の電子吸引効果により他のアミノ酸より低い pH で反応し，強い発光を起こしていると考えられる．

以上のように第一，第二，第三アミンすべてのアミン構造に対して，近くに存在する電子吸引基により低い pH で発光反応が起こり強い発光（高い感度）を示す可能性が高くなった．しかしながら，フェニル基やカルボキシル基などの電子吸引基が置換しても脂肪族アミンの pKa が大きく低下することはない．また，先ほど検討した TPA においても pKa が 10.7 であるのに対し，最大発光は pH 6.5 付近で起こっている．このようにアミン部位がプロトンから開放されていない状態でも発光反応が起こっていることから，アミン窒素上の孤立電子対がプロトンから開放されやすくなるという理由ではなく，カチオンラジカルからプロトンが脱離する反応（Fig. 15 の 2 式）を電子吸引基が促進しているのではないかと考えられる．Fig. 21 ですべての第三アミンの発光強度の pH 依存性が 2 段階に依存した理由は，低い pH で起こる最初の依存がカチオンラジカルからのプロトン脱離反応の pH 依存で，pH 9 付近での依存が，アミン孤立電子対のプロトンからの開放および Ru 錯体との反応に依存しているためかも知れない．

4.3.3 血中イミノ酸の高感度同時定量

これまでの結果より，報告されている Proline，Hydroxyproline また第 8 章で報告している Pipecolic acid 以外にも Sarcosine など様々なイミノ酸（N-メチルアミノ酸）が高感度検出できることが明らかになった．血中イミノ酸類は，それぞれ先天性代謝異常症の診断マーカーとして用いられているが，Proline 以外は存在量が微量であり，実試料中から同時分析された報告はない．そこで化学発光検出法の広いダイナミックレンジと，Ru 錯体による高選択的イミノ酸検出を利用し，血中イミノ酸の同時分析を目的として実験を行った．

第 8 章における Pipecolic acid 分離検出のための諸検討から，分離・検出条件を決定した．3-Pump HPLC–CL 装置を用い，イオンペアクロマトグラフィーによる分離を行った．標準溶液におけるクロマトグラムを Fig. 22 に示す．Hydoxyproline，Sarcosine，N-Methylalanine，Proline，Pipecolic acid の順に溶出し，約 60 分で分離が達成された．標準溶液における検量線データを Table 7 に示す．

Table 7: Parameters of calibration graphs and precision values obtained from standard imino acids solution with HPLC–CL. HPLC conditions are same as in Fig. 22.

Compound	Linear range / μM	D. L. / nM	R. S. D. / %^{a}	r^2
Hydoxyproline	0.01 – 20	3.0	0.3	1.000
Sarcosine	0.02 – 20	12	2.6	1.000
N-Methylalanine	0.01 – 20	2.7	0.8	1.000
Proline	0.01 – 20	4.6	1.1	0.9998
Pipecolic acid	0.02 – 20	10	1.9	1.000

r^2: Determination coefficient.

[a]Six determinations at 50 nM.

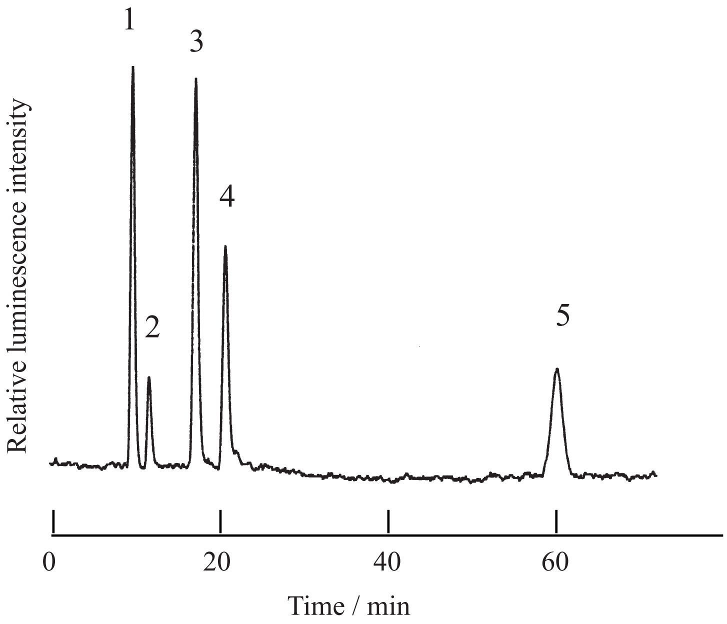

Fig. 22: Chromatogram of the mixed solution of five imino acids. Sample: 50 nM. Peak identification: 1, hydoxyproline; 2, Sarcosine; 3, N-methylalanine; 4, Proline; 5, Pipecolic acid. HPLC conditions: eluent, 5 mM sodium octanesulfonate prepared with 10 mM phospharic acid–acetonitrile (98:2, v/v); $Ru(bpy)_3{}^{2+}$ solution, 0.5 mM $Ru(bpy)_3{}^{2+}$ in 100 mM sodium sulfate containing 1 mM sulfuric acid; buffer solution, 0.4 M BR buffer (pH 9.1); eluent flow rate, 0.5 ml/min; $Ru(bpy)_3{}^{2+}$ solution flow rate, 0.3 ml/min; buffer flow rate, 0.1 ml/min; ECR, 150 μA; PMT biased at -300 V; effluent pH value 8.1.

この検出感度は，血中イミノ酸の測定に十分なレベルであったので血清試料に適用を試みた．得られたクロマトグラムを Fig. 23 に示す．代謝異常症のマーカー物質となる 4 種のイミノ酸において測定が可能であった．N-Methylalanine は他成分（少なくとも一つはアミノ酸のアラニン）のピークと被ってしまい確認できなかった．（血液中 N-Methylalanine が検出された報告はない．）測定結果を Table 8 に示す．添加回収率も 90 – 110 %前後と十分な値が得られた．

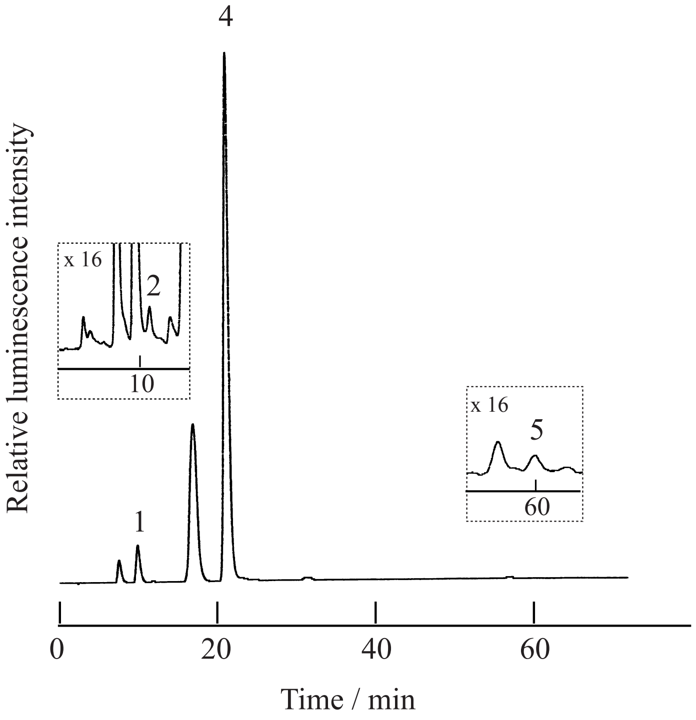

Fig. 23: Chromatogram obtained with HPLC–CL detection for a 10 times diluted human serum sample. Peak identification: 1, hydoxyproline; 2, sarcosine; 4, proline; 5, pipecolic acid. HPLC conditions are same as in Fig. 22.

Table 8: Contents of imino acids in human serum.

Compound	Found / μM[a]	Recovery / %[b]
Hydoxyproline	3.65 ± 0.14	94.2 ± 3.7[c]
Sarcosine	0.60 ± 0.01	112.6 ± 2.5[d]
N-Methylalanine	-	- [d]
Proline	95.10 ± 3.29	110.7 ± 4.0[e]
Pipecolic acid	0.33 ± 0.05	92.0 ± 5.4[d]

[a]Values are means for four determination ± standard deviation.

[b]Values are means for four operation ± standard deviation.

[c]Added 5 μM.

[d]Added 2 μM.

[e]Added 50 μM.

4.4 まとめ

Ru 錯体とアミン構造を有する物質の発光反応において，近くに存在する電子吸引基が重要な役割を担っていることを新たに見出した．Proline が第二アミンでありながら強い発光（高い感度）を示すのは，電子吸引性のカルボキシル基（正確にはカルボキシラートイオン，$-COO^-$）の存在により，より低い pH で発光反応を起こすためである．しかしながら，シアノ基などの強い電子吸引基では報告されてきたように発光強度を減少させた．電子吸引基が，反応の促進と中間体の安定性の両方に寄与する可能性が高いため，はっきりとした条件を示すことは現時点では難しい．本研究では，少なくともカルボキシル基およびフェニル基を α 位に持つアミン構造は，持たないアミン構造より低い pH で最大発光を示し，より高い感度で検出が可能であることを確認した．今後，^{1}H NMR により α 炭素プロトンの状態を数値化することで，どの程度の電子吸引が良いか確認していく必要がある．

この研究成果より，イミノ酸類の同時高感度測定が可能となった．本研究で発光を確認したイミノ酸（N-メチルアミノ酸）以外にも，高感度検出法が求められているイミノ酸，例えば，NMDA（N-メチル-D-アスパラギン酸）等の高感度検出にも利用できるだろう．また，現在アミノ酸分析装置において主に用いられるポストカラム検出法は，第一，第二アミンに対応したニンヒドリン反応を利用する HPLC–UV 検出法，または，第一アミンのみに対応した OPA 蛍光誘導体化 HPLC–蛍光（Fluorescence: FL）検出法の二種類である．OPA 法では第二アミンであるイミノ酸類は測定できず，ニンヒドリン法では感度不足である．開発したイミノ酸測定法は，選択的にイミノ酸類を測定することができ感度的にも十分である．本研究ではイオンペアクロマトグラフィーを用いたが，クエン酸緩衝液を用いた陽イオン交換クロマトグラフィーの適用も可能であり，（第 8 章においてクエン酸は発光反応を抑制しないことを確認した．）OPA 法と同時に用いることで互いの欠点を克服した高感度なポストカラムアミノ酸分析システムが構築できるものと期待される．

5 グリコアルカロイドの高感度検出法の開発

5.1 序

ジャガイモの芽や皮に多く含まれるグリコアルカロイド（Potato glycoalkaloids: PGA）は，食中毒成分としてよく知られている物質である．致死量は 3–6 mg/kg と毒性は低いが，劣悪な環境などストレス状態下で栽培されたジャガイモは，高い PGA 含有量を持つことがあり [30]，人や家畜の中毒例が多数報告されている [31]．

ジャガイモ中に含まれる PGA の 95 %はα-Solanine とα-Chaconine（Fig. 24）であるため，これら物質の分析法が多数開発されてきた．ガスクロマトグラフィー [32]，薄層クロマトグラフィー [33]，ELISA 法などを用いた様々な分析法が報告されているが，精度がよく簡便な分析機器である HPLC と UV 検出器を組み合わせた HPLC–UV 検出法の利用が最も多い [34, 35]．しかし，α-Solanine，α-Chaconine は強い発色団を持たないため UV 検出法では感度不足であり，感度を補うため大量のサンプルと濃縮操作を必要としている．ジャガイモ中の PGA 量が規制されている国（アメリカではジャガイモ 100 g 中 20 mg 以下とされている）もあり，より迅速で簡便な分析法の開発が必要であるといえる．

α-Solanine，α-Chaconine は，ともに脂環式第三アミン構造を有するため Ru 錯体により高感度検出できると考え HPLC–CL 検出法の開発を試みた．また実試料測定の応用として，ジャガイモの保存状態による PGA 含有量が変化するとの報告，及び芽や皮部分に PGA が多く含まれているとの報告の確認実験を行った．

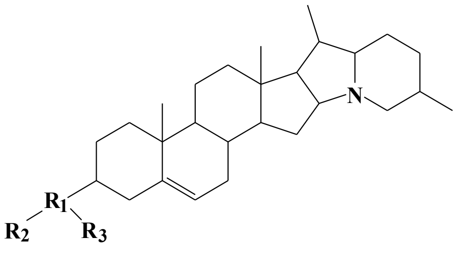

Fig. 24: The structure of α-solanine and α-chaconine. The suger group for α-solanine consists of R_1 = β-D-galactose, R_2 = β-D-glucose and R_3 = α-L-rhamnose, and R_1 = β-D-glucose and R_2 = R_3 = α-L-rhamnose for α-chaconine.

5.2 実験

5.2.1 試薬

Tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(Ⅱ) chloride hexahydrate は Palmer の方法 [16] により，Ruthenium(Ⅲ) chloride n-hydrate（試薬特級，和光純薬工業株式会社），2,2'-Bipyridine（試薬特級，和光純薬工業株式会社）を用い合成した．α-Solanine（95% From Potato sprouts, Sigma），α-Chaconine（95% From Potato sprouts, Sigma）は，精製せずそのまま用いた．α-Solanine，α-Chaconine の標準溶液は，メタノールで 0.2 mg/ml に調整し，冷蔵庫内（4 ℃）で保存し，実験直前に溶離液で薄めて使用した．他の試薬は，試薬グレードまたは特級グレードを用い精製などを行わずそのまま使用した．すべての水溶液は水道水を Advantec AQUARIUS GS-200（Advantec）により脱イオン，蒸留後，MILLI-QⅡ システム（日本ミリポア）で超純水としたものを利用した．2 価 Ru 錯体溶液は，$[Ru(bpy)_3]Cl_2 \cdot 6H_2O$ を 1 mM 硫酸を含む 100 mM 硫酸ナトリウム溶液または 10 mM 硫酸水溶液に溶かし，0.5 mM となるように調整して用いた．

5.2.2 装置

本研究で用いた装置を以下に示す．下記の装置を必要に応じ，内径 0.5 mm（外径 1/16）のテフロンチューブで接続して HPLC（FIA）装置とした．

- Pump：GL Sciences PU611C（ジーエルサイエンス株式会社）
- Degasser：Shodex Degaseer（昭和電工株式会社）
- Injector：Rheodyne 7125（20 μL; RHEODYNE）
- CL Detector：Comet3000（PMT, −450 V; 有限会社コメット）
- Data procescer：Hitachi D-2500 Chromato-Integrator（株式会社日立製作所）
- Column：Chromolith Performance RP-18e（100 x 4.6 mm I.D.; Merck）

5.2.3 実試料調整法

実試料としては，同一収穫で得られた 2 つのジャガイモ（Tuber）を用いた．Tuber A は暗闇で，Tuber B は日光の当たる場所で 3 週間保存した．皮（peel）は約 1 mm の厚みで切り出し，髄（pith）は中心部のみを用いた．

実試料からのα-Solanine，α-Chaconine の抽出溶液として，5 %酢酸水溶液を用いた．0.1 g の試料と抽出液 10 ml をブレンダーで 3 分間撹拌抽出を行った．得られた抽出液を 3500 rpm で 10 分間遠心分離し，上澄み液を 0.45 μm のシリンジフィルターでろ過した．得られたろ液を髄部分は 2 倍，皮や芽は 20 倍に溶離液で希釈，同時に 5 M NaOH で pH 7 付近に調整を行った後，20 μL を HPLC 分析した．

添加回収実験は，均一化した試料を 0.1 g ずつ 7 本取り，6 本にジャガイモ 100 g 当りα-Solanine，α-Chaconine が 1 mg ずつ含まれるように高濃度の標準溶液を加え，1 本をブランク試料とした．これを実試料調整法に従い処理して回収率を求めた．

5.3 結果と考察

5.3.1 発光反応の最適条件の検討

高感度検出のため Ru 錯体と α-Solanine, α-Chaconine の発光反応の最適条件を求めた．まず，3-Pump FIA 装置を用い発光反応の pH 依存性を調べた．結果を Fig. 25 に示す．α-Solanine, α-Chaconine ともに pH 6.5 付近で最大の S/N 比が得られた．よって以降の実験では発光反応時の pH が 6.5 付近になるように溶液を調整した．

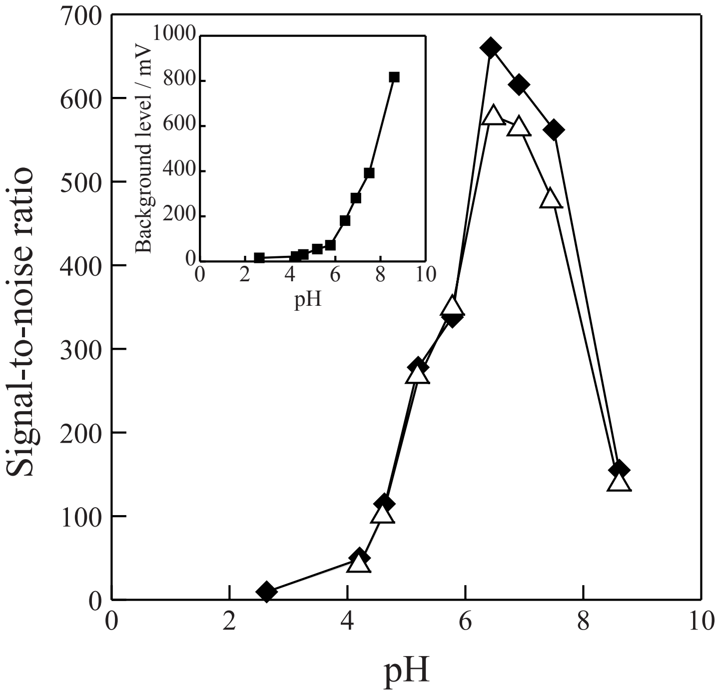

Fig. 25: Effect of the pH on the chemiluminescence intensity obtained by FIA. Inset: background level as a function of pH. Sample: 100 ng/ml, α-solanine (♦); 100 ng/ml, α-chaconine(△). FIA conditions: carrier, water–acetonitrile (6:4, v/v); $Ru(bpy)_3{}^{2+}$ solution, 0.5 mM $Ru(bpy)_3{}^{2+}$ in 100 mM sodium sulfate containing 1 mM sulfuric acid; buffer solution, 100 mM phosphate buffer, carrier flow rate, 0.5 ml/min; $Ru(bpy)_3{}^{2+}$ solution flow rate, 0.3 ml/min; buffer solution flow rate, 0.1 ml/min.

次にキャリアー流量の最適条件を検討した．2-Pump FIA 装置を用い 2 価 Ru 錯体溶液を 10 mM 硫酸ではなく，1 mM 硫酸を含む 100 mM 硫酸ナトリウムで調整し，キャリアーを 20 mM リン酸緩衝液で発光反応時の pH が先に求めた 6.5 付近になるように調整し実験を行った．また，Ru 錯体溶液側の流量は，3 価錯体の生成量が変化するため固定した．結果を Fig. 26 に示す．0.5 – 0.8 ml/min の間で一定のピーク高さが得られたため，この範囲で反応時の pH の調整をかねて流速をコントロールした．

最後に電解セルの電解電流を変化させることで 3 価錯体の量を変化させ，発光試薬量と発光強度との関係を検討した．電解電流値を上げるに従い 3 価錯体の量は比例的に増加する（付録 A 参照）．結果，電流値の上昇とともにピーク高さは高くなった．しかしながらバックグランドも上昇し，これにともないノイズも大きくなったため検出感度的にはほとんど変化がなかった．そこで以降の実験では電解電流値は 50 μA とした．

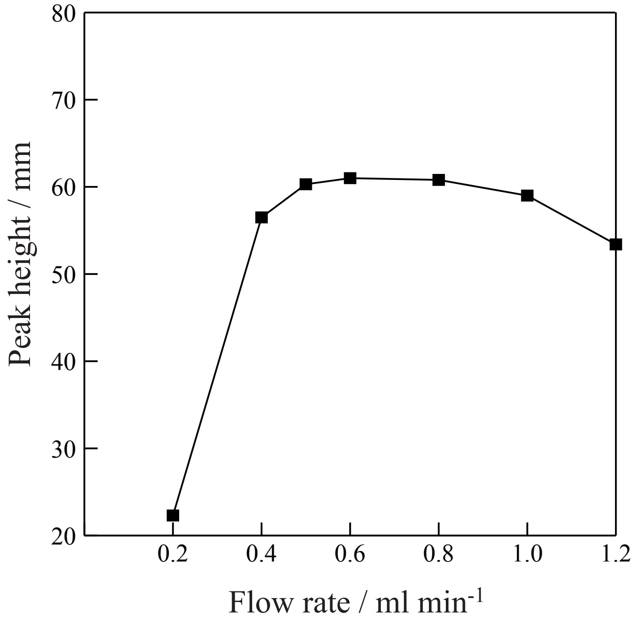

Fig. 26: Effect of the carrier flow rate on the chemiluminescence intensity. Sample: 100 ng/ml α-solanine. FIA conditions: carrier, 20 mM phosphate buffer (pH 6.0)–acetonitrile (65:35, v/v); $Ru(bpy)_3{}^{2+}$solution, 0.5 mM $Ru(bpy)_3{}^{2+}$ in a 100 mM sodium sulfate containing 1 mM sulfuric acid; $Ru(bpy)_3{}^{2+}$ solution flow rate, 0.3 ml/min.

5.3.2 分離条件の検討と検出感度

α-Solanine，α-Chaconine の HPLC 分離には，ODS カラムが多用されている．分離条件としては，溶離液を酸性にして第三アミン部位をイオン化し少量の有機溶媒で溶出する方法と，逆に溶離液の pH を塩基性にして第三アミンのイオン化を抑え有機溶媒の量を増やし溶出する方法が報告されている．先の実験結果から，発光反応時の最適 pH は 6.5 付近であった．また 3 価 Ru 錯体は酸性側で安定であることから，溶離液の pH を高くして，酸性に調整した Ru 錯体溶液と混合後，最適検出 pH になる溶液条件が都合がよい．よって後者の分離条件を用いた．

2-Pump HPLC 装置を用い最適条件を検討したところ，20 mM リン酸緩衝液（pH 7.8）とアセトニトリルを 65：35 の割合で混合した溶離液と 10 mM 硫酸で調整した 2 価 Ru 錯体溶液を用い，流量をそれぞれ 0.6 ml/min，0.3 ml/min としたとき pH は最適条件の 6.5 付近となり，Fig. 27 のように 15 分以内の分離も達成できた．（特に分離が温度に大きく依存し，温度が低い条件（8 ℃前後）において迅速で高分離が可能であった．）この条件を用い標準試料による検量線を作成したところ Table 9 の結果が得られた．Table 10 に他の測定法との比較を示す．現在最も多く利用されている HPLC–UV 検出法に比べて 200 倍高感度な結果が得られた．また，他の方法と比べても最も高感度であった．

Table 9: Parameters of calibration graphs and precision values obtained with HPLC–CL. HPLC conditions are same as in Fig. 27.

Compound	Linear range / μg ml^{-1}	r^2	D. L./ ng ml^{-1a}	R. S. D. / %^{b}
α-Solanine	0.005 – 10	0.9999	1.2	2.6
α-Chaconine	0.005 – 10	0.9999	1.3	2.4

^{a}Detection limit (S/N = 3).

^{b}Six determinations at 10 ng/ml.

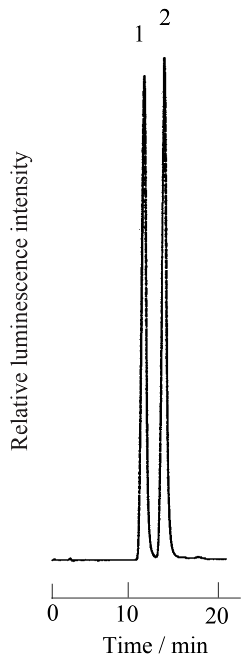

Fig. 27: Chromatogram obtained with HPLC–CL detection for a standard α-solanine and α-chaconine solution. Peak identification: 1, α-solanine; 2, α-chaconine. Sample: 1 μg/ml α-solanine and α-chaconine. HPLC conditions: eluent, 20 mM phosphate buffer (pH 7.8)–acetonitrile (65:35, v/v); $Ru(bpy)_3{}^{2+}$ solution, 0.5 mM $Ru(bpy)_3{}^{2+}$ in 10 mM sulfuric acid; eluent flow rate, 0.6 ml/min; $Ru(bpy)_3{}^{2+}$ solution flow rate, 0.3 ml/min.

Table 10: Camparison of detection limit and linear range obtained for α-solanine using the present method with those of some previous reported techniques.

Method	D. L.	Linear range	Reference
GC-FID	3 ng	-	[32]
HPTLC-FL	10 ng	-	[33]
Enzyme biosensor	0.5 μM	0.5 – 100 μM	[36]
HPLC-UV	-	1.0 – 50.0 μg/ml	[35]
Capillary ITP	-	0.5 – 100 μM	[37]
Present method	1.2 ng/ml (1.4 nM, 24 pg)	0.005 – 10 μg/ml	

5.3.3 実試料測定

これまで報告されている分析法では，感度不足を補うため大量の試料を調整し，濃縮する必要があった．そのため抽出液に対し試料の割合が多く，試料からの溶出水分による抽出液の体積変化が無視できなかった．よって抽出後の抽出液量の測定操作や，また体積変化を防ぐため試料の凍結乾燥処理操作を必要とし，非常に手間がかかる試料調整法となっていた．

Table 10 に示したように Ru 錯体を用いたα-Solanine，α-Chaconine の検出感度は非常に高いものであった．そこで実試料による体積変化が無視できるように抽出液 10 ml に対し試料を 0.1 g とする試料調整法を検討した．これは試料から溶出するであろう水分に対し，抽出液を大過剰にすることで，仮に試料が 100 %水分であったとしても全量は 10.1 ml となり，1 %の体積変化しかないので誤差範囲として扱える．また，採取する試料が 0.1 g と微量であるので，ひとつのジャガイモで様々な部位の測定が可能となる．Fig. 28 に Tuber B の皮試料から得られたクロマトグラムを示す．（A）CL 検出法においては，ろ過後の抽出液を 20 倍に希釈しただけの処理で，妨害ピークもない良好なクロマトグラムが得られた．（B）UV 検出法では，抽出液の 20 倍希釈では測定不能であったため，2 倍希釈で測定した．UV 検出法と比べ本法が高感度で高選択的であることが確認された．Tuber A の髄部分を用い添加回収実験を行ったところα-Solanine，α-Chaconine の添加回収率（n = 6, mean ± standard deviation %）はそれぞれ 101.0 ± 4.4 %，103.6 ± 7.1 %と良好な値が得られた．

次に抽出溶液の再検討を行った．一般的に抽出溶液にはメタノール，希酢酸水溶液などが用いられる．特に固相抽出操作を必要とする分析法の場合，より迅速な抽出を可能とするため酢酸水溶液にイオンペア剤が添加されたものが多く用いられている．本研究では，固相抽出操作は必要としないため酢酸水溶液およびメタノールを抽出溶液として実験を行った．結果を Fig. 29 に示す．メタノールを抽出溶液に用いたとき最も高い値が得られた．しかしながら，濃縮を必要としない本測定法においてメタノールを抽出溶液に用いた場合，メタノールの揮発による濃縮効果，水溶液との混合による体積変化が起こるため正確な測定値とは言えない．そこで水溶液系での抽出溶液の中で最も高い値が得られた 5 %酢酸水溶液を抽出溶液として採用した．

Table 11 に Tuber A，B の測定結果を示す．日光に当てた Tuber B は，目に見える変化として皮や髄部分まで緑化していた．Tuber B はすべての部位において Tuber A よりα-Solanine，α-Chaconine の含有量が多く，光が当るなどの保存状態の違いが PGA

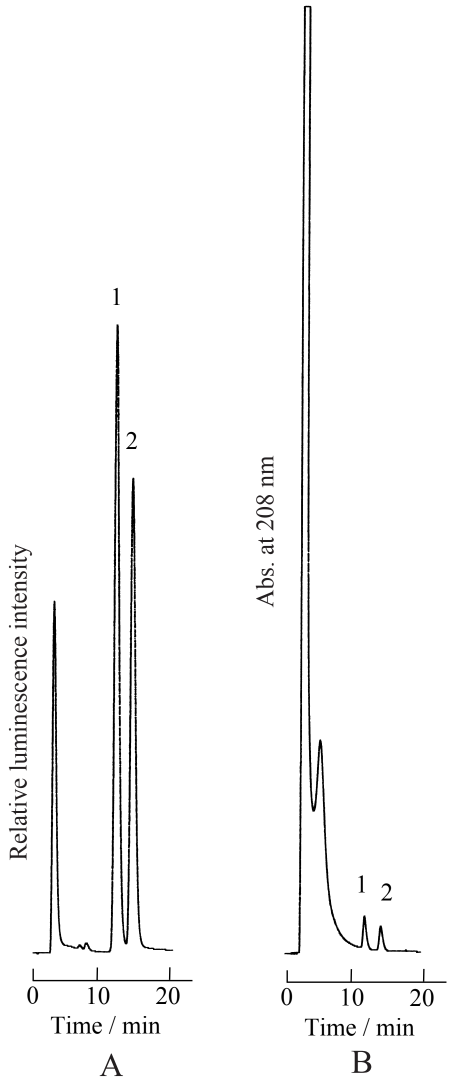

Fig. 28: Chromatograms obtained with CL detection for a 20 times diluted tuber B skin sample (A), and with UV detection for a two times diluted tuber B skin sample (B). Peak identification: 1, α-solanine; 2, α-chaconine. HPLC conditions are same as in Fig. 27.

の含有量を左右するという報告と本実験から得られた測定結果が一致した．また，皮にα-Solanine，α-Chaconine が多く，髄の部分には少ないという報告とも一致した結果が得られた．

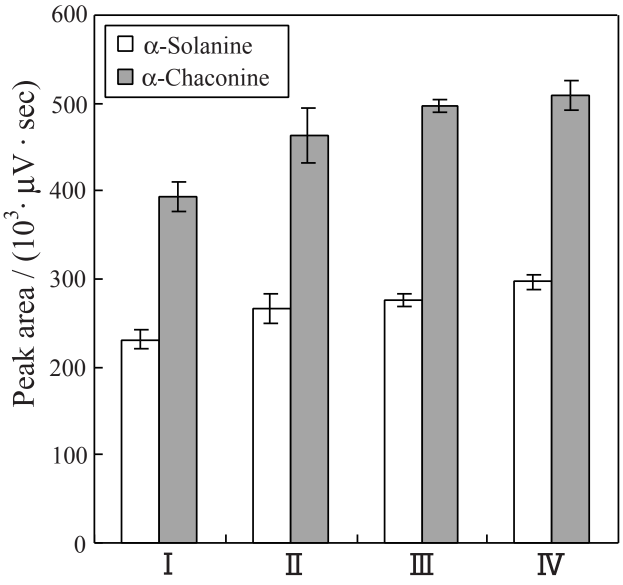

Fig. 29: Extraction profile of α-solanine and α-chaconine from potato tuber with different extraction solutions. (I) Water; (Ⅱ) 0.1 % acetic acid; (Ⅲ) 1 % acetic acid; and (Ⅳ) 5 % acetic acid. Values are means for four operation $\pm$ standard deviation. HPLC conditions are same as in Fig. 27.

Table 11: Contents of α-solanine and α-chaconine in potato. HPLC conditions are same as in Fig. 27.

Sample	Content[a] (mg / 100g)		
	α-Solanine	α-Chaconine	Total PGAs[b]
Tuber A peel	21.8 ± 0.1	48.4 ± 0.5	70.1 ± 0.6
Tuber A pith	0.30 ± 0.01	0.45 ± 0.01	0.75 ± 0.01
Tuber B peel	254 ± 1	220 ± 2	473 ± 3
Tuber B pith	3.21 ± 0.08	4.97 ± 0.15	8.19 ± 0.20

[a]Values are means for four determination ± standard deviation.

[b]Total PGAs = α-solanine + α-chaconine.

5.4 まとめ

Ru 錯体による α-Solanine, α-Chaconine の HPLC–CL 検出法が開発された．感度・簡便さどちらにおいても既存の分析法を上回る良好な結果が得られた．PGA は食中毒物質としてだけでなく，多量に含まれると苦味を感じるため，PGA を多く含むジャガイモは食用・加工用ともに不適当である．現在，ジャガイモ加工工場では表層部が極端に緑化していたり，ナイフで分割した時に内部に生理障害が見られるジャガイモを除去している．しかし，PGA 濃度や含有量については簡便な測定法がないため，見た目には緑化していなくても PGA が多量に生成されたジャガイモを原料に使っている可能性は以前から指摘されている．本研究成果はこれら問題を解決する手段にもなりうると考えられる．

本研究では Ru 錯体と PGA の発光反応を HPLC の検出系として用いたが，感度的に余裕があるため，より迅速な分離法であるキャピラリー電気泳動法などと組み合わせることにより更に迅速な分析法を構築できる．また，暗室でジャガイモの断面に 3 価 Ru 錯体を噴きかけると，目で見えるレベルで発光が確認された．この結果は，ジャガイモ中の PGA 量分布イメージングや簡易 PGA 測定に利用できるかもしれない．

6　アミトロールの化学発光検出法の開発

6.1　序

Amitrole (3-Amino-1,2,4-triazole, Fig. 30) は除草剤として田畑・道路・線路等に使用された農薬で，外因性内分泌攪乱化学物質（Endocrine Disrupting Chemicals: EDCs），いわゆる環境ホルモンとして疑われている物質の一つである．吸引による肺胞の損傷，発癌を引き起こす物質としての報告もある．しかし，この物質の痕跡量レベルでの環境中・生体中の挙動のデータは少ない．なぜなら，高感度分析が非常に難しいためである．高い沸点（260 ℃），高い極性のため農薬の一斉分析に多用される GC–MS での分析が困難で，そのため HPLC による分析法が多く報告されているが，多くの検出法では Amitrole を直接測定するのには感度不足である．また，水への高い溶解性，有機溶媒への低い溶解性のため，水系サンプルからの抽出による濃縮が行えない [38]．そのため有効な濃縮法といえば蒸発法のみであり [39]，このことがさらに高感度分析を難しくしている．しかしながら，EU 諸国においては飲料水中濃度 0.1 ppb の基準値，日本では環境中のモニタリング目標値 1 ppb を満たす感度が必要である．

現在報告されている分析法の中で，EU 諸国の基準値を検出限界でクリアしている報告は electrode array 検出 [40] のみである．しかし，一般に電気化学検出法は測定ごとに電極の研磨が必要なためルーチン分析に向かない．その結果，利用されている分析法のほとんどは，Amitrole を特定の試薬で誘導体化後，濃縮して，HPLC–UV 検出法または FL 検出法で測定するという複雑なものとなっている [41–44]．

第 3 章において Amitrole と Ru 錯体の発光反応が確認されたことから，HPLC–CL 検出法による Amitrole の分析法の開発を試みた．

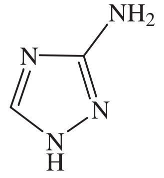

Fig. 30: Structure of amitrole.

6.2 実験

6.2.1 試薬

Tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(Ⅱ) chloride hexahydrate は Palmer の方法 [16] により，Ruthenium(Ⅲ) chloride n-hydrate（試薬特級，和光純薬工業株式会社），2,2'-Bipyridine（試薬特級，和光純薬工業株式会社）を用い合成した．3-Amino-1,2,4-triazole (Amitrole, 98 %, 東京化成工業株式会社）は超純水で 1 ppm に調整し，保存溶液として冷蔵庫内（4 ℃）で保存した．実験直前に溶離液でこれを薄めて使用した．他の試薬は，試薬グレードまたは特級グレードを用い精製などを行わずそのまま使用した．すべての水溶液の調整には水道水を Advantec AQUARIUS GS-200（Advantec）により脱イオン，蒸留後，MILLI-QⅡ システム（日本ミリポア）で超純水としたものを利用した．2 価 Ru 錯体溶液は，$[Ru(bpy)_3]Cl_2 \cdot 6H_2O$ を 1 mM 硫酸を含む 100 mM 硫酸ナトリウム溶液に溶かし，0.5 mM となるように調整して用いた.

6.2.2 装置

本研究で用いた装置を以下に示す．下記の装置を必要に応じ，内径 0.5 mm（外径 1/16）のテフロンチューブで接続して HPLC（FIA）装置とした.

- Pump：GL Sciences PU611C（ジーエルサイエンス株式会社）
- Degasser：Shodex Degaseer（昭和電工株式会社）
- Injector：Rheodyne 7125（100 μL; RHEODYNE）
- CL Detector：Comet3000（PMT, −500 V; 有限会社コメット）
- Data procescer：Hitachi D-2500 Chromato-Integrator（株式会社日立製作所）
- Column：Chromolith Performance RP-18e（100 x 4.6 mm I.D.; Merck）

6.2.3 実試料調整法

実試料として神戸市垂水区を流れる福田川の水と，神戸市の水道水を用いた．河川水，水道水を採取後，濃度変化が無視できるレベルで高濃度リン酸を加え pH が 3 付近になる

ように調整した．得られた溶液を 0.45 μm のメンブランフィルターでろ過後，100 μL を HPLC に注入した．

6.3 結果と考察

6.3.1 最適条件の検討

3-Pump FIA 装置を用い発光強度の pH 依存性を調べた．pH 4 から pH 7 までは 100 mM リン酸緩衝液，それ以上の pH では 100 mM ホウ酸緩衝液を 0.2 ml/min で送液し発光反応時の pH を調節した．結果を Fig. 31 に示す．pH 6 付近から発光が認められ，ホウ酸緩衝液の pH を 9.1 としたとき，発光反応時の pH は 8.7 となりこのとき最大の S/N 比が得られた．試料の希釈を最小限にとどめるため緩衝液の流速を 0.1 ml/min とし，代わりに緩衝液の濃度を 100 mM から 300 mM として最適 pH 値を維持した．

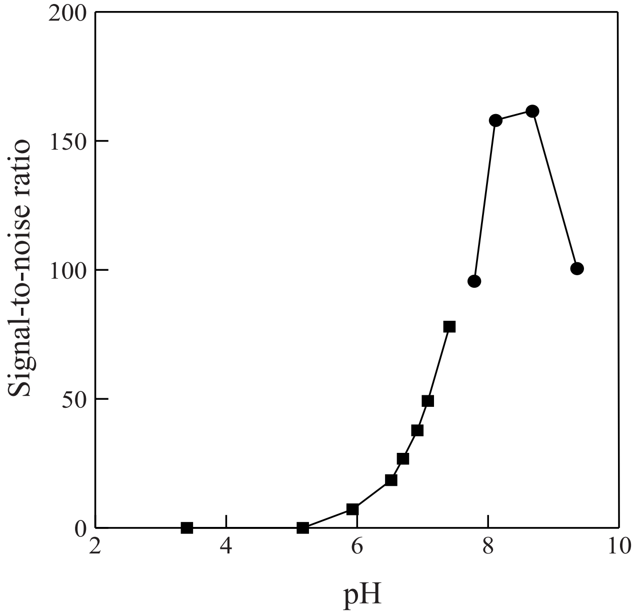

Fig. 31: Effect of the pH on the chemiluminescence intensity for amitrole obtained with FIA. FIA conditions: carrier, 5 mM phosphoric acid (pH 2.8); $Ru(bpy)_3{}^{2+}$ solution, 0.5 mM $Ru(bpy)_3{}^{2+}$ in 100 mM sodium sulfate containing 1 mM sulfuric acid; buffer solution, 100 mM phosphate buffer (■) or 100 mM borate buffer (•), carrier flow rate, 0.5 ml/min; $Ru(bpy)_3{}^{2+}$ solution flow rate, 0.2 ml/min; buffer solution flow rate, 0.2 ml/min.

次に発光強度の 3 価 Ru 錯体量依存性について調べた．発光試薬である 3 価 Ru 錯体が少なすぎると Amitrole の検出感度が落ち，また，発光最適 pH が 9 付近であるため，Ru

錯体が多すぎると水酸化物イオンとの反応によりバックグランドが上昇し検出を妨害することが考えられる．電解電流値を変化させることにより 3 価 Ru 錯体量を変化させ実験を行った．結果を Fig. 32 に示す．電流値の増加にともないピーク高さは大きくなったが，ノイズも大きくなり S/N 比から 60 μA が最適と判断した．

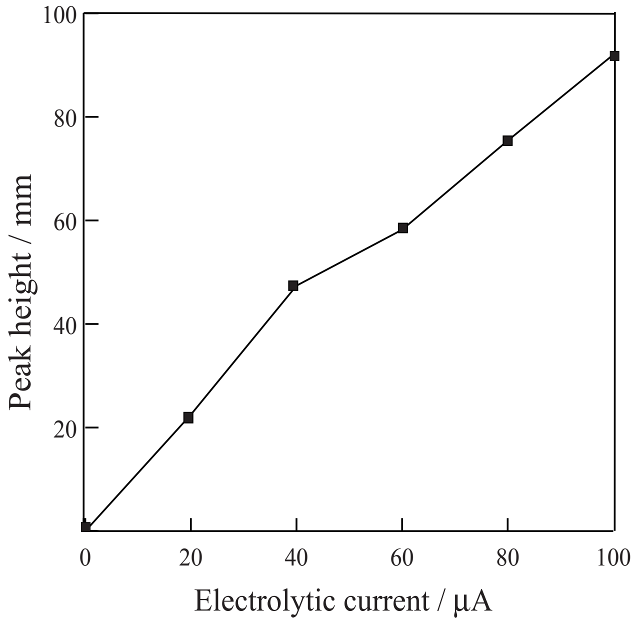

Fig. 32: Effect of the current on the chemiluminescence intensity for amitrole. FIA conditions: buffer solution, 300 mM borate buffer (pH 9.2); other conditions are same as in Fig. 31.

最後に発光強度の流量依存性について検討した．発光反応の速度は試料により異なるため，PMT 前で最大の発光が起こるようにキャリアーの流量を変動させた．Ru 錯体の流速を変化させると 3 価 Ru 錯体の生成量が変動するため固定し，pH が多少変動するが緩衝液も一定速度とした．結果を Fig. 33 に示す．キャリアー流量の増加とともに pH の低下，相対的な 3 価 Ru 錯体量の減少と検出にとって不利な条件になるが，0.5 ml/min までピーク高さの上昇が見られた．

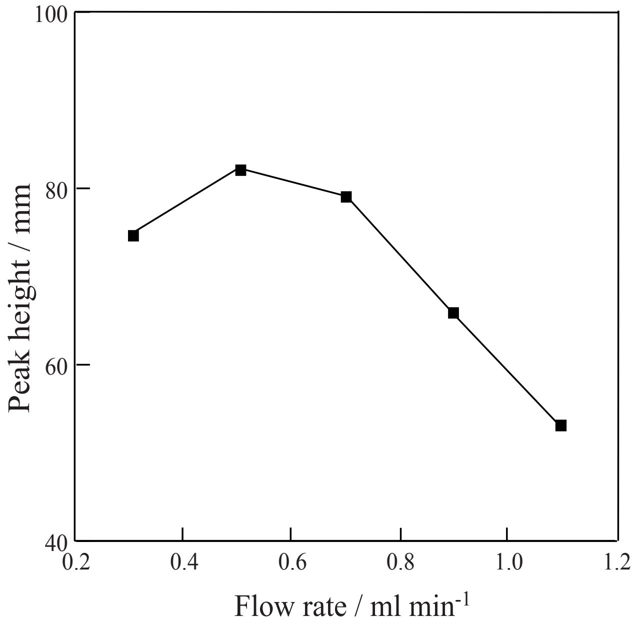

Fig. 33: Effect of the carrier flow rate on the chemiluminescence intensity for amitrole. FIA conditions: buffer solution, 300 mM borate buffer (pH 9.2); buffer solution flow rate, 0.1 ml/min; other conditions are same as in Fig. 31.

6.3.2 分離条件の検討と検出感度

Amitrole は水溶性の高い物質であるため，HPLC で一般的に用いられる ODS カラムでは分離することはできない．そこで多くの報告では，逆相イオンペアクロマトグラフィーによる分離が行われている．逆相イオンペアクロマトグラフィーは，アルキルスルホン酸等をイオンペア剤として溶離液に添加し，対象物質とイオン対を形成させ ODS カラムに保持させる方法である．この方法では，保持時間を有機溶媒量，イオンペア剤の種類・濃度，イオン強度で調節し分離を達成する．逆相イオンペアクロマトグラフィーによる分離条件決定を行う前に，Amitrole と Ru 錯体の発光反応における有機溶媒の添加効果を検討した．溶離液中のアセトニトリルの割合を変化させピーク高さの変化を調べた．結果を Fig. 34 に示す．有機溶媒の添加にともないバックグランドの上昇，ノイズの上昇，ピーク高さの低下が見られた．この結果から出来る限り有機溶媒を添加しない分離を検討した．溶離液に 8 %アセトニトリル，5 mM オクタンスルホン酸を含む 5 mM リン酸緩衝液（pH 2.8）を用いた．この条件により保持時間 15 分程で分離が達成された．標準溶液によるクロマトグラムを Fig. 35 に示す．

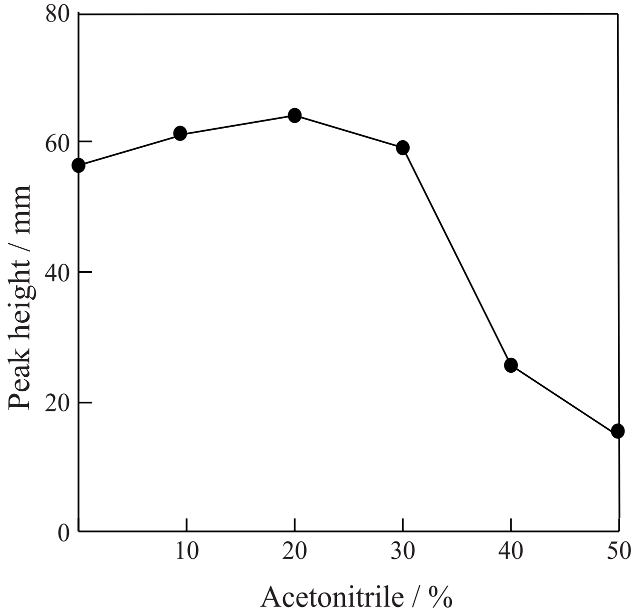

Fig. 34: Effect of the acetonitrile composition on the intensity for amitrole. FIA conditions are same as in Fig. 31.

本章（6.3.1）における pH 依存性の実験結果から発光反応時の最適 pH は 9 付近となったが，Amitrole をイオンペアクロマトグラフィーで保持するには Amitrole が陽イオンとなる pH 3 付近が溶離液条件として要求される．そのため分離後 pH を最適発光反応時 pH にするため 3-Pump HPLC 装置を用いた．（装置の簡略化のため Ru 溶液を pH 9 の緩衝溶液で調整し，緩衝溶液と Ru 錯体溶液を一体化しようと試みたが Ru 錯体が生成していないか，生成してもすぐに水酸化物イオンと反応しているためか，バックグランドが異常に低くなり，発光反応も起こらなかった.）

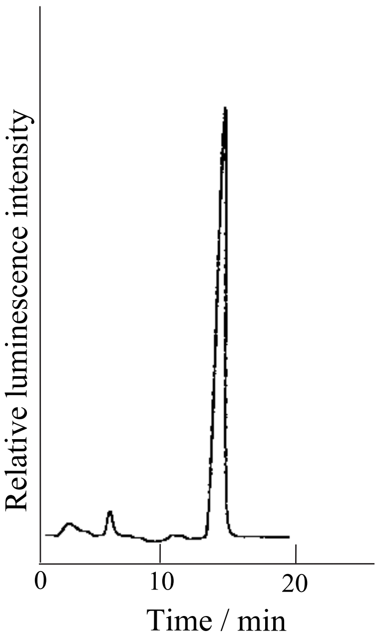

Fig. 35: Chromatogram of standard amitrole. Sample: 100 ng/ml amitrole. HPLC conditions: eluent, 8 % acetonitrile and 5 mM sodium octanesulfonate in 5 mM phosphate buffer (pH 2.8); $Ru(bpy)_3{}^{2+}$ solution, 0.5 mM $Ru(bpy)_3{}^{2+}$ in 100 mM sodium sulfate containing 1 mM sulfuric acid; buffer solution, 300 mM borate buffer (pH 9.2); eluent flow rate, 0.5 ml/min; $Ru(bpy)_3{}^{2+}$ solution flow rate, 0.2 ml/min; buffer solution flow rate, 0.1 ml/min.

得られた最適条件下で Amitrole の検量線を作成したところ 1 – 100 ppb の範囲で非常に良好な直線（$r^2 = 0.9999$）が得られ，検出限界は 0.25 ppb（S/N = 3）となった．また連続測定による再現性は，2.2 %（n = 5，2.5 ppb）であった.

6.3.3 実試料測定

本検出法が実用可能か確認するため，河川水を 0.45 μm のメンブランフィルターでろ過し測定したところ Fig. 36（A）のように Amitrole の保持時間にピークが見られなかった．そこで Amitrole 標準液を添加して測定可能であるか検討した．Amitrole を添加した試料のクロマトグラムを Fig. 36（B）に示す．Amitrole は確認されたが，幅の広いピークとなった．試料の pH を測定したところ pH 7 付近であり，Amitrole の陽イオン化が起こりにくいため幅の広いピークになったものと考えられた．そこで高濃度リン酸を体積変化が無視できるレベルで添加し，pH 3 付近に調整したところ Fig. 36（C）のようにシャープなピークを得ることができた．この実験結果から，河川水試料の前処理として pH を 3 付近に調整することとした．

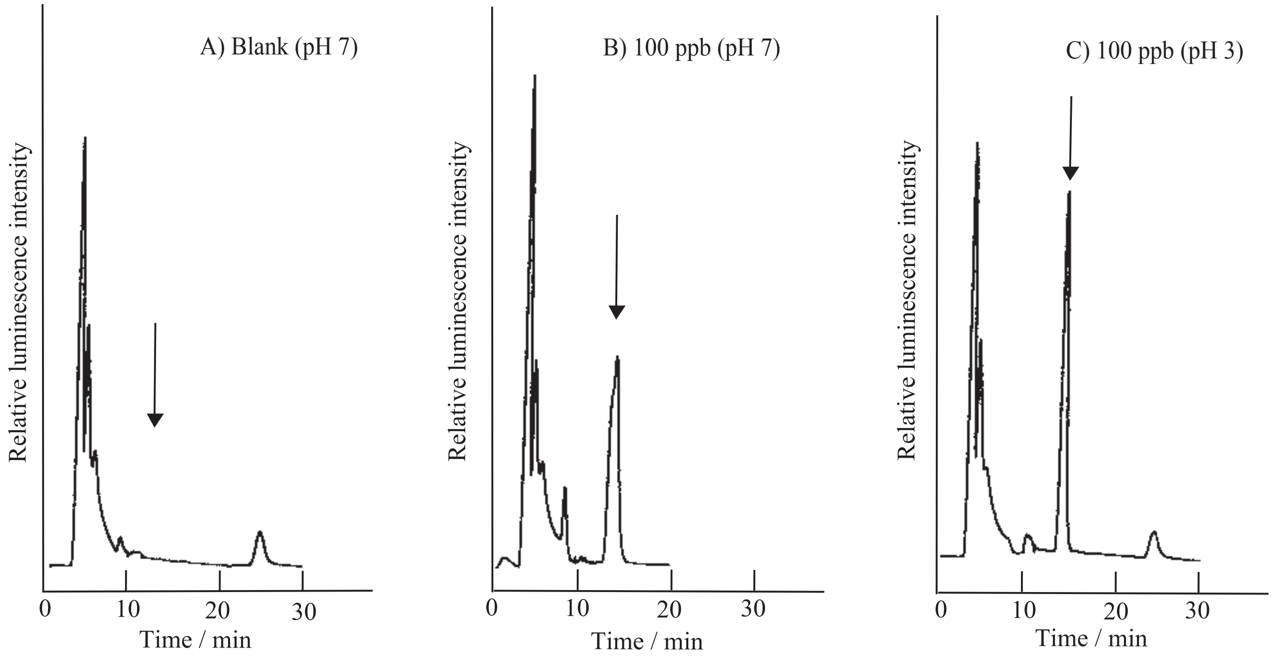

Fig. 36: Chromatograms of river water spiked samples. HPLC conditions are same as in Fig. 35.

Fig. 37 に河川水と水道水にそれぞれ 1 ppb，2 ppb となるように Amitrole を添加したときのクロマトグラムを示す．どちらにおいても，妨害ピークはなく検出が可能であった．河川水に 5 ppb となるように Amitrole をスパイクしたとき，添加回収率は 98 % (n = 7) であった．

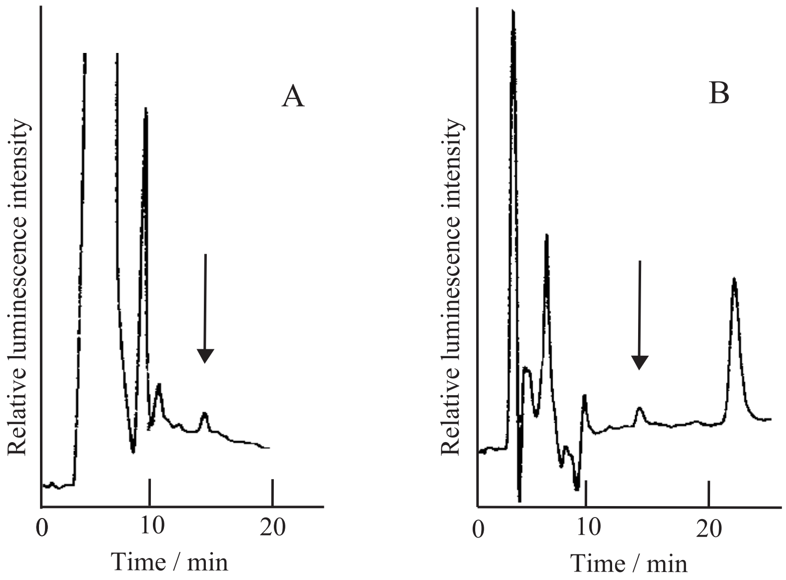

Fig. 37: Chromatograms of A) river water and B) tap water spiked with 1 ppb and 2 ppb, respectively. HPLC conditions are same as in Fig. 35.

6.4 まとめ

日本では環境中の Amitrole のモニタリング目標値を 1 ppb としている．本研究で開発した分析法を用いれば 1 ppb レベルの Amitrole は検出可能である．EU 諸国の基準値 0.1 ppb の検出に適用する場合には濃縮を必要とするが，蒸発による濃縮が現実的なレベル（10 倍程度）で行えるため有効な方法になると考えられる．

7　ドウモイ酸の高感度検出法の開発

7.1　序

1987 年，カナダ大西洋岸プリンスエドワード島周辺において，養殖ムール貝による集団食中毒が起こった. 患者は 153 名に達し, うち数名が死亡した. その症状は他の二枚貝中毒にみられる腹痛や下痢だけでなく記憶の混乱や喪失が起き, 重症者の記憶喪失は 18 ヶ月にも及んだ．過去に例をみない症状のため，新たに記憶喪失性貝中毒（ASP：Ammesic Shellfish Poisoning）と命名された [45]．この ASP の原因物質は Domoic acid（DA, Fig. 38）と同定され，毒化の原因は事件当時，大発生し赤潮を形成していた珪藻の *Nitzchia pungens forma multiseries* であることが確認された．以降の調査で同地域の他の二枚貝やアンチョビー，ダンジネスクラブ，牡蠣なども毒化していたことが確認された.

以降，カナダにおいては魚介類中の DA 量は 20 μg/g 以下と規制値が設けられている．日本においてはこれまでのところ DA による被害は報告されていない．しかし，帆立貝などから低濃度の DA が検出されており [46]，また，DA を生産する珪藻の存在も確認されている．加えてムール貝などの魚介類は輸入に頼っていることが多いため ASP が発生する可能性はあると考えられる．したがって，重篤な食中毒の突発を防ぐため DA のモニタリングが必要である．しかし，検査機関において検査項目が一つ増えることは大変な労力を必要とするため，分析方法は簡便かつ正確であることが望まれる．現在の DA 分析法の主流は，HPLC–UV 検出法である [47–49]．この方法では，感度面に多少不足があること，また検出を妨害する夾雑物を取り除くため固相抽出の前処理が必要とされている．より高感度な検出を行うため，プレカラム誘導体化を用いた蛍光検出法（HPLC–FL）[50]，質量分析法（LC–MS）[49, 50] も開発されているが，いずれも前処理に手間がかかり，機器が大型・高価で使用者に高い専門性が要求されるなどの諸問題がある.

DA は，第二アミンでありながら，強い発光を与えることが報告されているアミノ酸の Proline [6] と同じ構造を有し，また，第 2 章において Ru 錯体を発光させることが明らかになった共役二重結合構造を持つ．この 2 つの分子構造を持つことから，Ru 錯体を用いた CL 検出法により高感度検出が期待できると考え分析法の開発を試みた.

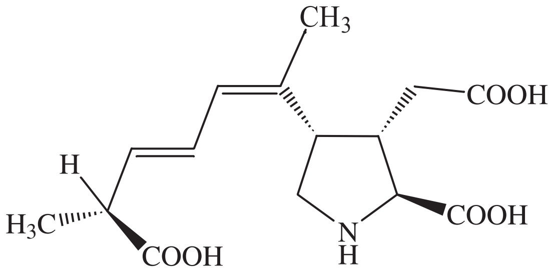

Fig. 38: Structure of domoic acid.

7.2 実験

7.2.1 試薬

Tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(Ⅱ) chloride hexahydrate は Palmer の方法 [16] により，Ruthenium(Ⅲ) chloride n-hydrate（試薬特級，和光純薬工業株式会社），2,2'-Bipyridine（試薬特級，和光純薬工業株式会社）を用い合成した．Domoic acid（和光純薬工業株式会社）は 0.1 mg/ml に調整し，保存溶液として冷蔵庫内（4 ℃）にて保存した．実験直前に溶離液で薄めて使用した．他の試薬は，試薬グレードまたは特級グレードを用い精製などを行わずそのまま使用した．すべての水溶液の調整には水道水を Advantec AQUARIUS GS-200（Advantec）により脱イオン，蒸留後，MILLI-QⅡ システム（日本ミリポア）で超純水としたものを利用した．2 価 Ru 錯体溶液は，$[Ru(bpy)_3]Cl_2 \cdot 6H_2O$ を 1 mM 硫酸を含む 100 mM 硫酸ナトリウム溶液，または，50 mM 硫酸ナトリウムを含む 50 mM リン酸緩衝液（pH 6.8）に溶かし，0.5 mM となるように調整して用いた．

7.2.2 装置

本研究で用いた装置を以下に示す．下記の装置を必要に応じ，内径 0.5 mm（外径 1/16）のテフロンチューブで接続して HPLC（FIA）装置とした．

- Pump：GL Sciences PU611C（ジーエルサイエンス株式会社）
- Degasser：Shodex Degaseer（昭和電工株式会社）
- Injector：Rheodyne 7125（20 μL; RHEODYNE）
- CL Detector：Comet3000（有限会社コメット）
- UV-VIS Detector：L-4200（株式会社日立製作所）
- Data procescer：Hitachi D-2500 Chromato-Integrator（株式会社日立製作所）
- Column：Chromolith Performance RP-18e（100 x 4.6 mm I.D.; Merck）

7.2.3 実試料調整法

実試料としてムール貝（広島産）を用いた．4 g のムール貝に 50 %メタノール水溶液を 16 mL 加えブレンダーでホモジナイズし，3000 rpm で 10 分間遠心分離した．上澄み液を 0.45 μm のシリンジフィルターでろ過後，溶離液で 5 倍に希釈して 20 μL を HPLC に注入した．

7.3 結果と考察

7.3.1 発光反応条件の決定

3-Pump HPLC 装置を用い Ru 錯体と DA の発光反応の有無を調べた．分離条件は先に報告されている HPLC–UV 検出法を参考とした [48]．結果を Fig. 39 に示す．15 分付近に DA と思われるピークが得られた．また DA のピーク以外に数本のピークが見られた．これらは，数種あると報告されている DA の異性体であると考えられる．

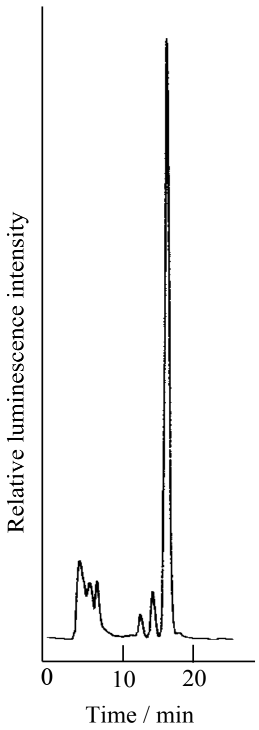

Fig. 39: Chromatogram of standard DA solution.

より高感度な検出法とするため，発光反応の最適条件を求めた．まず，発光反応時の pH を調整して発光強度の変化を測定した．結果を Fig. 40 に示す．pH 2 付近では発光が認められず，pH 6.5 付近で最大の S/N 比が得られた．よって以降の実験では発光反応時の pH が 6.5 付近になるよう溶液を調整した．

次に有機溶媒種の検討を行った．HPLC において最も多用されるメタノールとアセトニトリルについて検討した．メタノールを使用した場合は，アセトニトリルと比較して

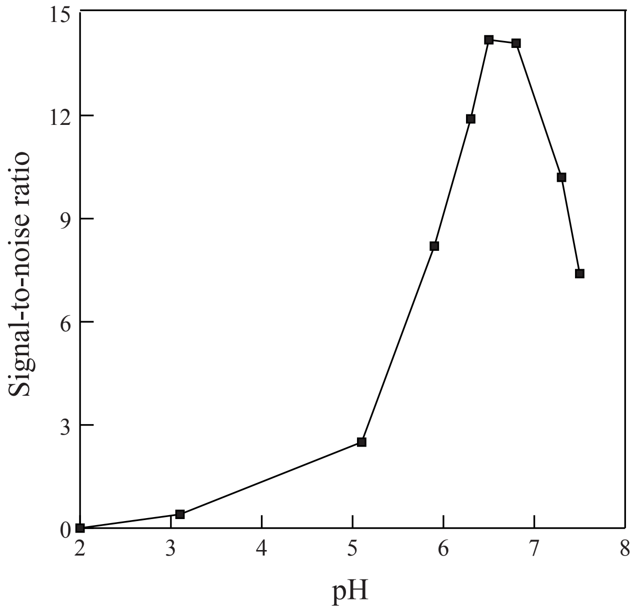

Fig. 40: Effect of the pH on the chemiluminescence intensity for DA obtained with HPLC. Sample: 0.1 μg/ml DA. HPLC conditions: eluent, 5 mM phoshate buffer (pH2.7)–acetonitrile (9:1, v/v); $Ru(bpy)_3{}^{2+}$ solution, 0.25 mM $Ru(bpy)_3{}^{2+}$ in 100 mM sodium sulfate containing 1 mM sulfuric acid; buffer solution, 100 mM phosphate buffer; eluent flow rate, 0.5 ml/min; $Ru(bpy)_3{}^{2+}$ solution flow rate, 0.3 ml/min; buffer solution flow rate, 0.1 ml/min; ECR, 80 μA; PMT biased at -550 V.

pH が高くなるに従いバックグランドの値が高くなった．この結果はメタノールを用いた場合，ノイズ値の上昇および発光試薬量の減少となることを意味しており，DA の高感度検出を妨げる．そこでバックグランドの低いアセトニトリルを用いることとした．（アルコール類は塩基性側で Ru 錯体と弱い発光反応を起こすことが報告されている [7].）緩衝液としては酢酸緩衝液とリン酸緩衝液について検討した．これらの緩衝液では同濃度，同 pH においてピークの大きさに変化は見られなかった．しかし，DA の最適発光反応 pH は 6.5 付近であることから，緩衝能が 6.5 付近で高いほうが pH の調整が行いやすい．また発光強度が pH に大きく依存することから pH 調整のゆらぎは実験の再現性に大きく影響することが予想される．したがって pH 7 付近で最大の緩衝作用を示すリン酸緩衝液を用いた．

最適条件の決定と同時に, 装置の最適化も行った．3-Pump HPLC 装置では，注入された試料が緩衝溶液により途中で希釈されるため感度の低下を招く．そこで，Ru 錯体溶液を 50 mM 硫酸ナトリウムを含む 50 mM リン酸緩衝液（pH 6.9）で調整することで，発

光反応時 pH を調整する緩衝液と 2 価 Ru 錯体溶液を一体化し，装置を 2-Pump HPLC に簡略化した．

7.3.2 標準試料による検量線および他法との比較

これまでの実験から最適装置および条件にて DA 標準試料による検量線の作成を行った．1 – 500 ppb の範囲で良好な直線（r^2 = 0.9995）となり，検出限界 26 fmol （S/N = 3）と高感度な結果が得られた．また再現性は 1.6 %（n = 6，10 ppb）であった．他の分析法との比較を Table 12 に示す．高価な装置である LC–MS を超える感度が得られた．また，誘導体化を必要とする HPLC–FL 検出法と比べても高い感度が得られた．

Table 12: Comparison of analytical characteristics obtained for DA using the present methodology along with those of previously reported HPLC techniques.

Detection method	D. L. / ng ml^{-1}	Linear range / μg ml^{-1}	r^2	Reference
FL detection	1	0.04 – 2.0	0.998	[51]
MS^3 detection	8	0.025 – 10	0.9994	[50]
Present method	0.4	0.001 – 0.5	0.9995	

7.3.3 実試料測定

現在，DA のルーチン分析に最もよく用いられている HPLC–UV 検出法においては，前濃縮のために固相抽出が行なわれている．これは，DA の検出を妨害する物質の除去も兼ねている．しかし，塩濃度の濃い試料には適用できず（強アニオン交換樹脂を使用しているため，塩濃度が大きいと DA が保持されない)，また分析に時間がかかる原因となっている．これまでの結果から，Ru 錯体による DA 検出は非常に高感度であることが証明された．また，選択性の高い検出法であるため，現在用いられている UV 検出とくらべ妨害ピークが少ないことが予想される．そこで前処理を軽減するため固相抽出の手順を省いた試料調整法を用いて UV 検出法と CL 検出法で比較をおこなった．UV 検出には DA の極大吸収波長 $\lambda_{max} = 242$ nm を用いた．

ムール貝を試料として測定を行った結果，DA は検出されなかった．そこでカナダ基準（20 μg/g）の 1/10 である 2 μg/g の DA が含まれるように標準 DA を添加し測定を行った．DA を添加したものと，添加しないもの（Blank）を測定した．結果を Fig. 41 に示す．CL 検出では，UV 検出より明確なピークが得られた．CL 検出のクロマトグラムに見られる前方の巨大なピークは，プロリン等の遊離アミノ酸であると考えられる．添加回収率を求めたところ，106.2 ± 2.1 %（n = 5，2 μg/g）となった．

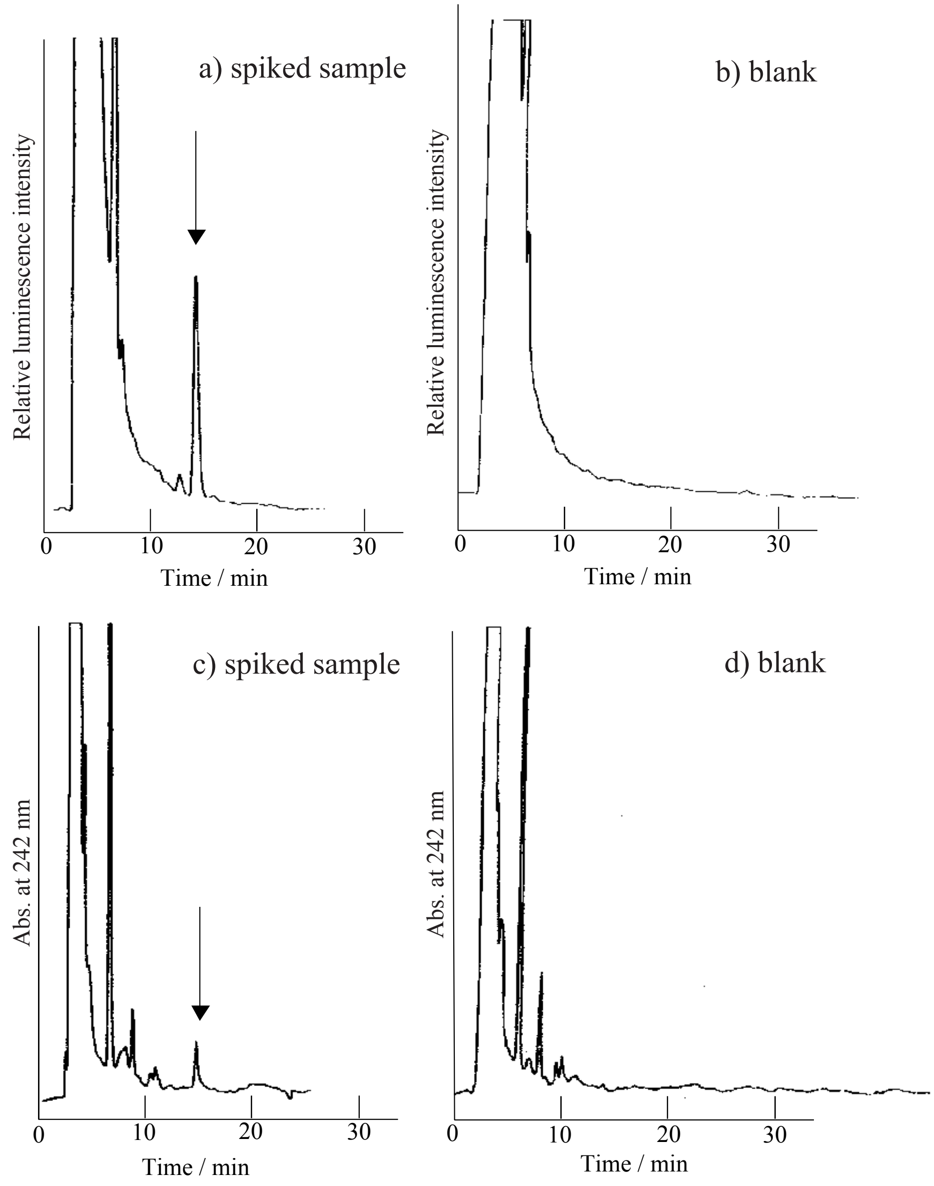

Fig. 41: Chromatograms obtained with HPLC–CL detection for a) a mussel sample spiked with 2 μg/g of DA and b) blank, and with HPLC–UV detection for c) a mussel sample spiked with 2 μg/g of DA and d) blank. HPLC conditions: eluent, 5 mM phoshate buffer (pH 2.7)–acetonitrile (9:1, v/v); $Ru(bpy)_3{}^{2+}$ solution, 0.25 mM $Ru(bpy)_3{}^{2+}$ in 50 mM sodium sulfate containing 50 mM phoshate buffer (pH 6.9); eluent flow rate, 0.5 ml/min; $Ru(bpy)_3{}^{2+}$ solution flow rate, 0.3 ml/min.

7.4 まとめ

Ru 錯体化学発光法による DA の検出は，非常に高感度な結果が得られた．本報告では，HPLC の検出系として Ru 錯体化学発光法を用いたが，μ-TAS などの検出系として利用することもできオンサイト測定，常時モニタリングを必要とする DA 測定において，より迅速な測定を実現できると考えられる．

また，DA が神経伝達物質であるグルタミン酸と同様のコンフォーメーションを有しており，グルタミン酸レセプターのアゴニストとして働くことはわかっているが，それがなぜ記憶の喪失に繋がるのかは解明されていない．この問題の解明は，記憶の蓄積，呼び出しがどのように行われるのか知る手がかりとなる．さらに珪藻が DA を生産するメカニズム等も明らかになっていない．本研究で開発した DA の高感度分析法はこれらの問題を解決するための助けになるのではないかと期待している．

8　ピペコリン酸の高感度検出法の開発

8.1　序

Pipecolic acid（PA，Fig. 42）は非タンパク質性のアミノ酸の一つで動植物を問わず広く存在している物質である．その働きははっきりしていないが，遺伝子性疾患であるペルオキソーム病，特に Zellweger 症候群の患者などにおいて血中濃度が上昇することが知られており，これら疾病の診断マーカーとして用いられている [52,53].

通常，人血清中の PA 量は 1 μM 程度であり，他のアミノ酸類と比べると 100 分の 1 程度の濃度レベルである．そのため PA の分析には，高感度なプレカラム蛍光誘導体化 HPLC–FL 検出法が主に用いられている．しかしながら，第二アミンである PA に選択的な蛍光誘導体化試薬は存在せず，必ず共存する他アミノ酸も同時に誘導体化されるため分離・検出は容易ではなく複雑で時間のかかる分析手順を必要とする．例えば，近年報告された Inoue らの手法 [52] では，まず，第一アミン類に選択的な誘導体化法である OPA 法（オルトフタルアルデヒドにより第一アミンをイソインドール体に変換する）を用い，第一アミン類をブロックした後，蛍光誘導体化試薬を加え蛍光誘導体化を行うことで，第二アミン類のみを蛍光誘導体化している．さらに，他成分との分離のためにグラジエント分離を採用している．

第 7 章において，Ru 錯体を強く発光させることで知られる Proline 構造を持つドウモイ酸の高感度検出が可能であった．PA は Proline と非常に似た構造をしており，PA においても Ru 錯体による高感度検出が可能であることが予測された．そこで Ru 錯体を用いた PA の高感度分析法の開発を目的として実験を行った．

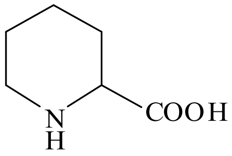

Fig. 42: Structure of pipecolic acid.

8.2 実験

8.2.1 試薬

Tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(Ⅱ) chloride hexahydrate は Palmer の方法 [16] により，Ruthenium(Ⅲ) chloride n-hydrate（試薬特級，和光純薬工業株式会社），2,2'-Bipyridine（試薬特級，和光純薬工業株式会社）を用い合成した．他の試薬は，試薬グレードまたは特級グレードを用い精製などを行わずそのまま使用した．PA 標準溶液は Pipecolic acid (98 %, Aldrich) を超純水で 10 mM に調整し，冷蔵庫内 (4 ℃) で保存した．保存溶液を実験直前に溶離液で薄めて使用した．水溶液の調整には水道水を Advantec AQUARIUS GS-200（Advantec）により脱イオン，蒸留後，MILLI-QⅡ システム（日本ミリポア）で超純水としたものを利用した．2 価 Ru 錯体溶液は，$[Ru(bpy)_3]Cl_2 \cdot 6H_2O$ を 1 mM 硫酸を含む 100 mM 硫酸ナトリウム溶液に溶かし，0.5 mM となるように調整して用いた．0.4 M BR 緩衝液は，酸溶液として 27.1 mL のリン酸（85 %），22.8 mL の氷酢酸（99.7 %），24.7 g のホウ酸（99.5 %）を超純水で 1 L にメスアップして調整し，2 M 水酸化ナトリウム溶液で pH を調整して用いた．

8.2.2 装置

本研究で用いた装置を以下に示す．下記の装置を必要に応じ，内径 0.5 mm (外径 1/16) のテフロンチューブで接続して HPLC（FIA）装置とした．

- Pump：GL Sciences PU611C（ジーエルサイエンス株式会社）
- Degasser：Shodex Degaseer（昭和電工株式会社）
- Injector：Rheodyne 7125（20 μL; RHEODYNE）
- CL Detector：Comet3000（有限会社コメット）
- UV-VIS Detector：L-4200（株式会社日立製作所）
- Data procescer：Hitachi D-2500 Chromato-Integrator（株式会社日立製作所）
- Column：Chromolith Performance RP-18e （100 x 4.6 mm I.D.; Merck）x 2 combined with column coupler（Merk）
- Column Oven： 655A-52 Column Oven（45 ℃; 株式会社日立製作所）

8.2.3 実試料調整法

実試料として人血清（精度管理用血清液状ネスコール-N，正常域，オリエンタル酵母工業株式会社），およびビール 2 種類，100 %リンゴジュース，牛乳（それぞれ市販品を購入）を用いた．

全ての試料は, 限外ろ過装置 (ULTRA FILTER UNIT USY-1, molecular cutoff 1,000, Advantec）で除タンパク後，血清は 10 倍，リンゴジュースおよび牛乳は 100 倍，ビールは 1000 倍に溶離液で希釈し，同時に 50 μL の氷酢酸で酸性化した後，20 μL を HPLC に注入した．

8.3 結果と考察

8.3.1 検出条件の検討

まず最初に 3-Pump の FIA 装置を用い検出条件の最適化を行った．PA の発光反応時の pH 依存性を Fig. 43A に示す．pH 8.5 付近で最大の発光が得られた．Fig. 43B にバックグランドの pH 依存性，およびノイズ値の pH 依存性を示す．pH の上昇に伴い，バックグランドの発光（水酸化物イオンと Ru 錯体の発光による）が起こり，バックグランドを上昇させノイズ値を上昇させることが確認された．S/N 比から，pH 8.5 付近を検出最適 pH として採用した．

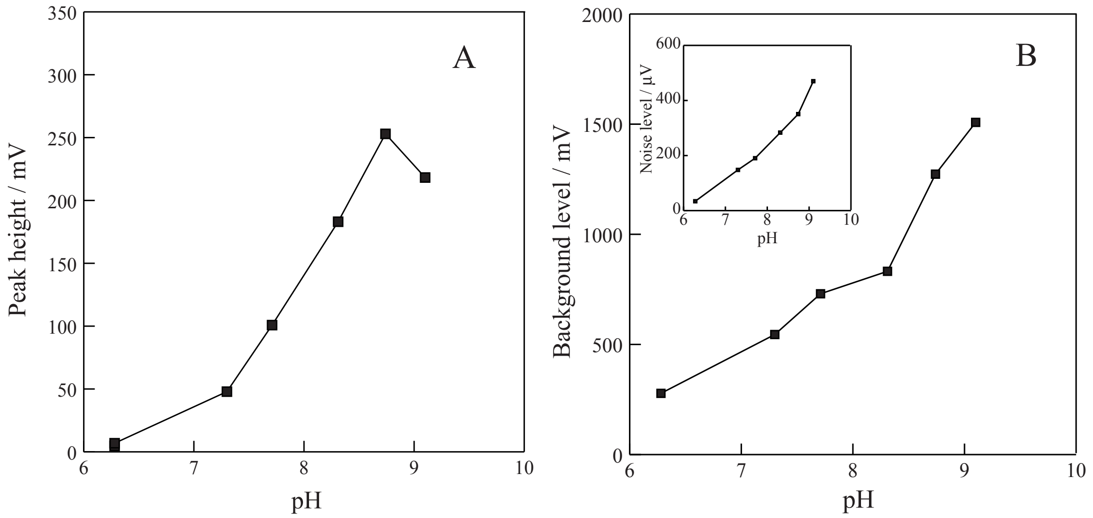

Fig. 43: Effect of the pH on (A) the chemiluminescence intensity for PA and (B) the background level obtained with FIA. Inset of B: noize revel as a function of pH. Sample: 1 μM PA. FIA conditions: carrier, water; $Ru(bpy)_3{}^{2+}$ solution, 0.5 mM $Ru(bpy)_3{}^{2+}$ in 100 mM sodium sulfate containing 1 mM sulfuric acid; buffer solution, 0.4 M BR buffer; carrier flow rate, 0.5 ml/min; $Ru(bpy)_3{}^{2+}$ solution flow rate, 0.3 ml/min; buffer flow rate, 0.1 ml/min; ECR, 50 μA; PMT biased at -500 V.

次に 2-Pump FIA 装置を用いキャリアーに緩衝溶液を使用することで発光反応時の pH を 8.5 付近に固定し，キャリアー流量および Ru 錯体溶液の電解電流値を最適化した. Fig. 44 の通り流量 0.7 ml/min のとき最も強い発光が得られたため以降この条件とした. 電解電流値を大きくするに従い発光強度も強くなったがノイズ値も上昇し相対的な感度はほとんど変化しなかったため 50 μA を採用した.

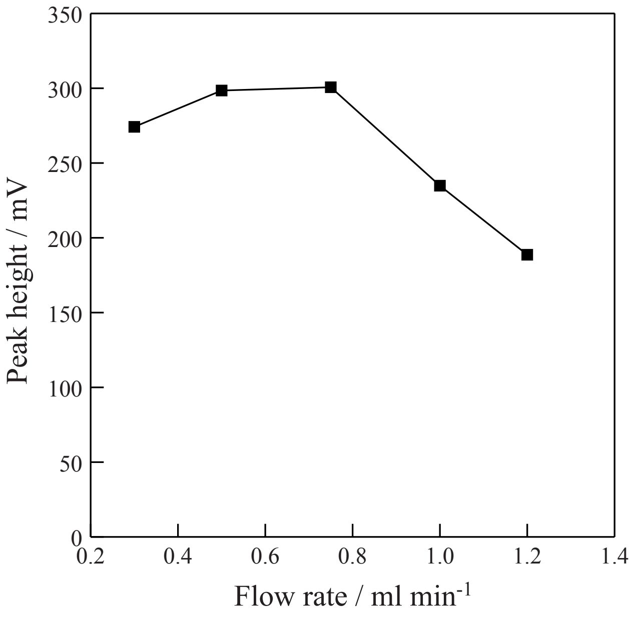

Fig. 44: Effect of the carrier flow rate on the chemiluminescence intensity for PA obtained with FIA. Sample: 1 μM PA. FIA conditions: carrier, 20 mM BR buffer (pH 8.6); $Ru(bpy)_3{}^{2+}$ solution, 0.5 mM $Ru(bpy)_3{}^{2+}$ in 100 mM sodium sulfate containing 1 mM sulfuric acid; $Ru(bpy)_3{}^{2+}$ solution flow rate, 0.3 ml/min; ECR, 50 μA; PMT biased at -500 V.

8.3.2　他アミノ酸の発光と分離条件の検討

得られた PA 最適検出条件を用い，PA 検出の妨げとなる可能性の高い他アミノ酸の発光を測定した．アミノ酸においては，Proline 以外でも Tryptophan [5] や Histidine [6] が比較的強い発光を起こすことが報告されており，また発光反応時の pH を 10 前後にすることで Leucine や Serine の pmol レンジの検出が報告されている [7].

PA 検出最適条件下におけるアミノ酸類の発光を Table 13 に示す．大部分のアミノ酸において，PA より 100 倍多く存在していても大きな妨害とならないことが明らかになった．PA の検出を妨害すると考えられるのは，PA と同程度の発光を示すイミノ酸類であり，中でも最も存在量が多い Proline と考えられる．そこで先ず，PA と Proline の分離を最適化した．

アミノ酸類の分離には，一般に陽イオン交換カラムとクエン酸緩衝液を使用したイオン交換分離が用いられるが，より迅速で高い分離を達成するため逆相イオンペアクロマトグラフィーも報告されている．逆相イオンペアクロマトグラフィーでは，溶離液の pH，イオン強度，イオンペア剤の種類・濃度，有機溶媒の種類・濃度，銅イオンの濃度で分離条件が決定される [54]．本実験では PA を他成分から完全分離するため変数の多い逆相イオンペアクロマトグラフィーによる分離を検討した．

Ru 錯体の化学発光検出を用いた Proline と Hydorxyproline の同時分離検出の報告 [55] を基に，3-Pump HPLC 装置を用いて銅イオン存在下での分離を検討した．結果として分離は達成されたが，銅イオンは PA の発光反応最適 pH である 8 付近では沈殿してしまい流路が詰まり HPLC システムを不安定化させた．そこで沈殿が生成しない pH 5 付近で測定を行ったが，検出感度が 100 分の 1 程度まで低下した．この検出感度では血中 PA の無濃縮での測定が不可能となるため，pH 8 付近でも銅が沈殿しないように錯化剤の添加を検討した．クエン酸や酒石酸は二座配位子として，銅イオンと金属キレート陰イオンを形成するため沈殿防止剤として用いることができる．また，緩衝溶液種でもあるため，分離後 pH を上昇させるための第 3 ポンプから送液する緩衝溶液に加えることで，沈殿抑制剤と緩衝液の両方の役割を担うことができるのではないかと考えた．クエン酸，酒石酸をそれぞれ第 3 ポンプから流す緩衝液に加えた結果，発光反応時の pH を 8 付近にしても銅イオンの沈殿は起こらなくなった．しかしながら，PA の検出感度が大きく低下した．この原因を確認するため，3-Pump FIA–CL 装置を用いで様々な添加剤を加えたときの発光強度を調べた．結果を Fig. 45 に示す．クエン酸や酒石酸は高濃度であるため単独でも微弱ながら発光が確認された．これに PA 標準液を加えたところ，加えた PA 分の発光

Table 13: Chemiluminescence intensity for amino acids obtained with FIA. FIA conditions: carrier, 10 mM acetic acid solution; $Ru(bpy)_3{}^{2+}$ solution, 0.5 mM $Ru(bpy)_3{}^{2+}$ in 100 mM sodium sulfate containing 1 mM sulfuric acid; buffer solution, 0.4 M BR buffer (pH 9.8); carrier flow rate, 0.7 ml/min; $Ru(bpy)_3{}^{2+}$ solution flow rate, 0.3 ml/min; buffer flow rate, 0.1 ml/min; ECR, 50 μA; PMT biased at −450 V.

Compound	Concentration / μM	Chemiluminescence intensity / mV
Serine	100	19
Glycine	100	22
Threonine	100	43
Asparagine	100	46
Lysine	100	98
Alanine	100	110
Glutamine	100	133
Aspartic acid	100	161
Cysteine	10	15
Tryptophan	10	23
Valline	10	34
Glutamic acid	10	38
Isoleucine	10	45
Tyrosine	10	50
Leucine	10	52
Phenylalanine	10	61
Methionine	10	108
Histidine	10	157
Sercosine	1	48
Hydroxyproline	1	183
Pipecolic acid	1	199
Proline	1	250

強度の増大がみられ，クエン酸，酒石酸は発光を抑制しないことが明らかになった．しかし，この溶液にさらに銅イオンを加えたところ，発光は起こらずマイナスピークとなり，また銅イオンとクエン酸，酒石酸の混合溶液のみでもマイナスピークとなった．この理由は定かではないが，常磁性イオンである銅イオンによる消光，Ru 錯体の発光（橙色）を銅錯体溶液（青色）が吸収している等が考えられる．これらの結果から，分離条件の設定は難しくなるが，銅イオンを用いない分離条件を検討した．

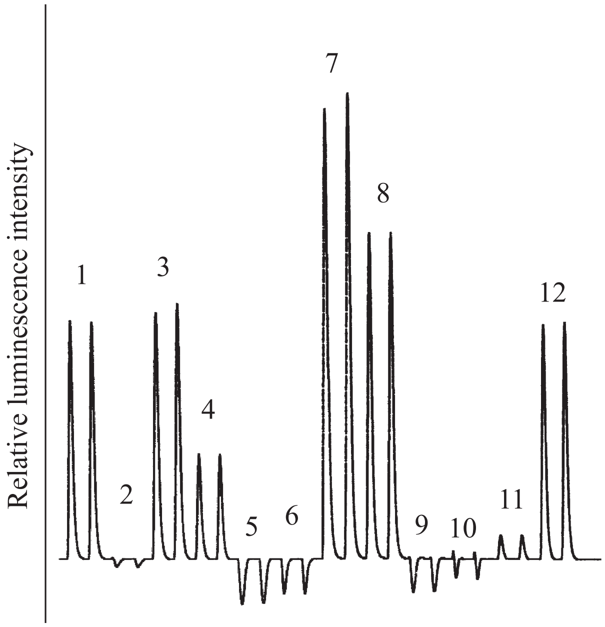

Fig. 45: Effect of the addition agents on the chemiluminescence intensity for PA obtained with FIA. Sample: 1, 1 μM PA; 2, 1 mM $CuSO_4$; 3, 5 mM citric acid; 4, 5 mM tartaric acid; 5, 2+3; 6, 2+4; 7, 1+3; 8, 1+4; 9, 1+2+3; 10, 1+2+4; 11, 15 mM sodium octanesulfonate; 12, 1+11. FIA conditions are same as in Table 13.

銅イオンを用いずに分離条件を検討したところ，Fig. 46 のように保持時間が pH に大きく依存した．pH 2 – 3 付近でもっとも大きな選択性が得られた．そこで pH を低く保ち，有機溶媒量で保持時間を調整し分離を試みた．その結果，標準溶液においては分離検出が可能であったが，実試料分析において他成分のピークが PA の保持時間と重なってしまい PA を検出することができなかった．

そこで，有機溶媒を利用しないことで保持時間をできるだけ長く確保した後，pH を変動させ保持時間を調整した．結果，実試料分析においても PA のピークを確認することが

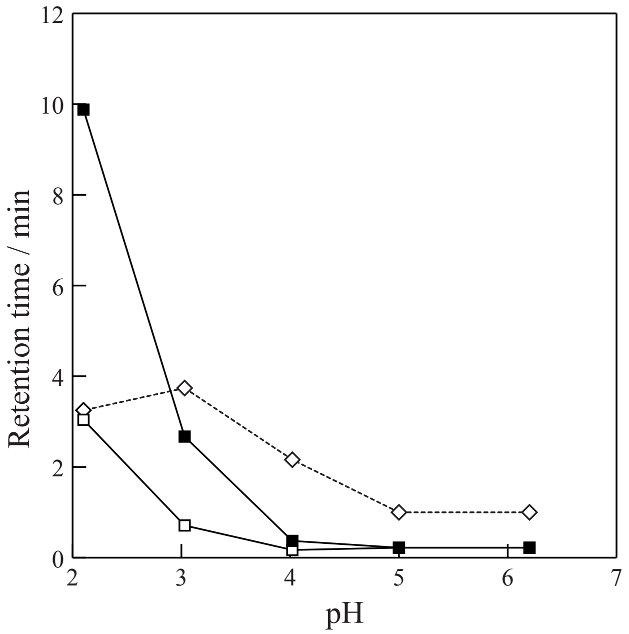

Fig. 46: Effect of the pH on the retention time for PA and proline. Sample: 1 μM, PA (■); 1 μM, proline (□). Separation factor (◇) = (PA retention time)/(proline retention time). HPLC conditions: eluent, 5 mM sodium octanesulfonate in 20 mM phosphate buffer–acetonitrile (98:2, v/v); $Ru(bpy)_3{}^{2+}$ solution, 0.5 mM $Ru(bpy)_3{}^{2+}$ in 100 mM sodium sulfate containing 1 mM sulfuric acid; buffer solution, 0.4 M BR buffer (pH 9.8); eluent flow rate, 0.5 ml/min; $Ru(bpy)_3{}^{2+}$ solution flow rate, 0.3 ml/min; buffer flow rate, 0.1 ml/min; ECR, 50 μA; PMT biased at −500 V.

できた．しかし他成分との分離が不完全であったため，カラムの長さを二倍にすることで分離を達成した．また，イオンペア剤濃度は 5 mM 以上で PA の保持時間に変化はなかったが，他成分との分離がよくなった 15 mM を採用した．このとき得られた PA および Proline 標準溶液のクロマトグラムを Fig. 47 に示す．最適条件のもと PA の検量線を作成したところ 5 nM – 20 μM まで良好な直線（r^2 = 1.000）が得られ，検出限界は 24 fmol（S/N = 3）と高感度な値が得られた．

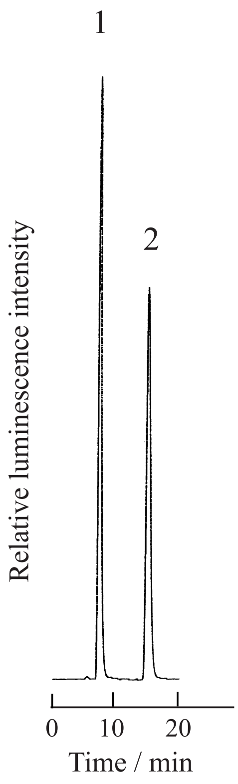

Fig. 47: Chromatogram of PA and proline standard solution. Sample: 1 μM. Peak identification: 1, proline; 2, PA. HPLC conditions: eluent, 15 mM sodium octanesulfonate in 20 mM acetic acid (pH 3.5); $Ru(bpy)_3{}^{2+}$ solution, 0.5 mM $Ru(bpy)_3{}^{2+}$ in 100 mM sodium sulfate containing 1 mM sulfuric acid; buffer solution, 0.4 M BR buffer (pH 10.2); eluent flow rate, 0.7 ml/min; $Ru(bpy)_3{}^{2+}$ solution flow rate, 0.3 ml/min; buffer flow rate, 0.1 ml/min; ECR, 50 μA; PMT biased at -450 V.

8.3.3 実試料の測定

これまでの研究で得られた最適検出・分離条件を用い，実試料中の PA の検出を行った．それぞれの実試料で得られたクロマトグラムを Fig. 48 に示す．いずれの試料においても他成分の妨害なく検出可能であった．得られた結果を Table 14 に示す．添加回収率はいずれも 100 %前後と高い精度で測定が可能であった．

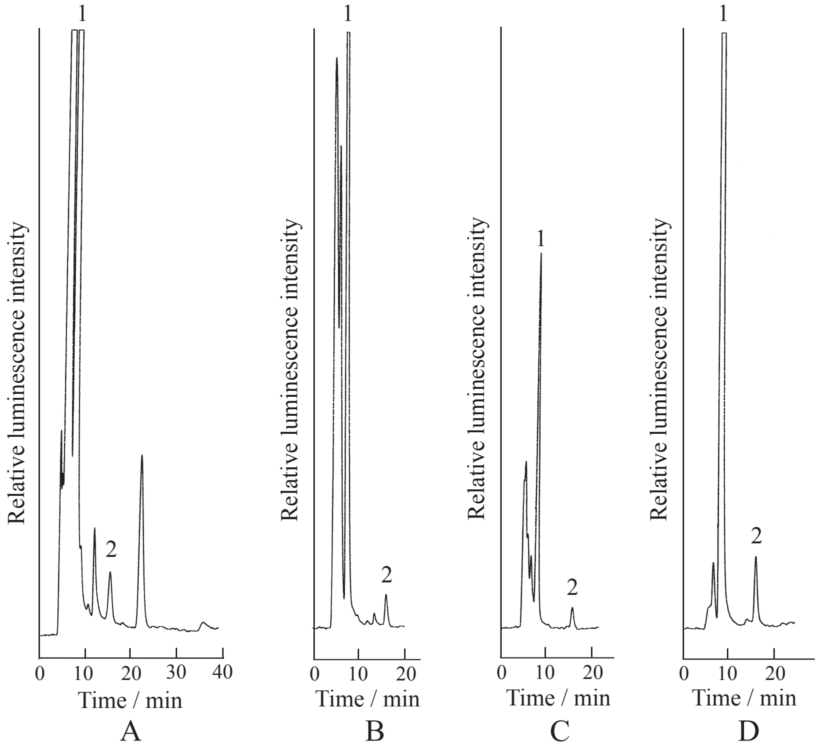

Fig. 48: Chromatograms of (A) a 10 times diluted human serum, (B) a 100 times diluted apple juice, (C) a 100 times diluted cow's milk, and (D) a 1000 times diluted beer. Peak identification: 1, proline; 2, PA. HPLC conditions are same as in Fig. 47.

Table 14: Contents of PA in various samples.

Sample	Found / μM[a]	R. S. D / %	Recovery / %[b]
Human serum	0.62 ± 0.02	2.5	-
Apple juice	3.3 ± 0.1	1.8	99.2 ± 3.8[c]
Cow's milk	1.8 ± 0.1	2.8	109.7 ± 3.4[c]
Beer 1	28.6 ± 0.5	1.6	-
Beer 2	62.8 ± 2.2	3.4	97.7 ± 6.8[d]

[a]Values are means for six determination ± standard deviation.

[b]Values are means for four operation ± standard deviation.

[c]Added 2 μM.

[d]Added 30 μM.

8.4 まとめ

PA の簡便で高感度な分析法を開発した．既存の方法と比べると圧倒的に容易な分析法となった．しかし，有機溶媒を用いない逆相カラムでは保持時間が少しずつ低下していくことが報告されており，本研究においてもそれが確認された．また，PA の体内挙動を調査するには，L 体と D 体の光学分割が必要となる．これらの問題の解決のためにも分離面の改善が今後の課題である．（一つの方法として，前処理段階で OPA 法 [52] や亜硝酸法 [53] を用い第一アミン類を除去することにより，カラムによる分離を軽減してより安易な条件での HPLC 分離を行うことが考えられる．）

9 チオフェン部位を持つ新規発光誘導体化試薬の開発

9.1 序

近年，極微量でも人体に影響を与える環境ホルモン物質などを正確・迅速に測定するため，また分析機器の小型化に伴う試料体積の微量化，それにより生じる濃度感度の低下を克服するため，より高感度な検出法が求められている．HPLC の検出法だけに限っても，吸光法，蛍光法，電気化学検出法，質量分析法など様々な高感度検出法が存在する．しかしながら，いずれかの検出法を用いれば測定対象物が必ず高感度検出できるとは限らない．そのため目的とする物質をより高感度で測定する手法として誘導体化と呼ばれる手法が用いられる．HPLC においては，測定対象物をカラムで分離したのち検出に適した物質に変換するポストカラム誘導体化法と，測定対象物を検出に適した物質に変換したのち分離検出を行なうプレカラム誘導体化法の二種類が存在する．ポストカラム誘導体化法の方が様々な利点（第 10 章参照）があるが，ポストカラム誘導体化法は，誘導体化試薬と測定対象物の反応がすばやく起こり，かつ誘導体化試薬自体は検出されないという条件を満たさなければならず適用できる反応は限られる．一方，プレカラム誘導体化法では " 測定対象物特有の構造と結合反応を起こす反応部位 " に " 使用する検出法で高感度検出できる物質 " を持たせることで誘導体化試薬として利用することができる．

一般にプレカラム誘導体化試薬に求められる性質は，1）高感度検出が可能，2）反応生成物が安定，3）温和な条件での誘導体化が可能，4）誘導体化後過剰試薬と生成物の分離が容易等が挙げられる．しかし，蛍光検出法や UV 検出法では，上記の条件を満たすような試薬の開発は容易ではない．一方，Ru 錯体により CL 検出を行う場合，脂肪族第三アミン部位，ジケトン部位など特定の化学構造を持たせた誘導体化試薬を開発するだけで容易に上記の条件を満たすことができる．そのため様々なプレカラム誘導体化試薬が開発されてきた．第一アミン類と反応し脂環式第三アミン構造を形成するジビニルスルホン [56]，第三アミン部位を有する蛍光誘導体化試薬であるダンシルクロリド [57]，ジケトン部位を持ちカルボニル化合物と反応するメチルマロン酸 [58]，第一アミン類と反応しジケトン構造を形成するジケテン [59] などが報告されている．

Ru 錯体は脂肪族第三アミンと特に強い発光反応を起こすため，この構造を持つ誘導体化試薬を利用することが高感度な検出を可能にする [22, 60]．しかしながら，脂肪族アミンと Ru 錯体の発光反応は一般に中性以降で強くなるため，高いバックグランド中で検出

を行わなければならない，また生体試料などでは夾雑物にもアミン部位を持つものが多く存在するため検出が妨害されやすい等の問題がある．さらに分離面においても第三アミン部位は，カラム充填剤のシラノール残基と相互作用を起こすため，溶離液を酸性にしてシラノールの解離を抑える，もしくは塩基性にしてアミンのプロトン化を防がなければならない．つまり使用できる溶離液 pH が限定される．また Ru 錯体は酸性側で保存して用いる方が，生成した 3 価錯体が安定であり都合がよい．そのため最終的に発光検出時の pH を最適値に調整するためには，pH 調整のためだけに緩衝液を送液する 3-Pump の HPLC システムを用いなければならないことが多い．近年，これら諸問題を解決するため Morita らにより，酸性側で強い発光をおこす第三アミン構造を有する誘導体化試薬が開発され，HPLC プレカラム誘導体化検出法としては最高感度の 0.4 fmol / 20 μL が達成されている [29]．

第 3 章において，2,5 位にアルキル基を持つチオフェン環が Ru 錯体と強い発光を起こすことを新たに見出し報告した．チオフェン環は，酸性側においても Ru 錯体と強い発光を起こす，疎水性で小さい分子，イオン化部位を持たないなどの特徴があり，誘導体化試薬として用いることが有用ではないかと考えられた．そこで Ru 錯体化学発光検出のためのチオフェン環を有する誘導体化試薬の開発を行った．

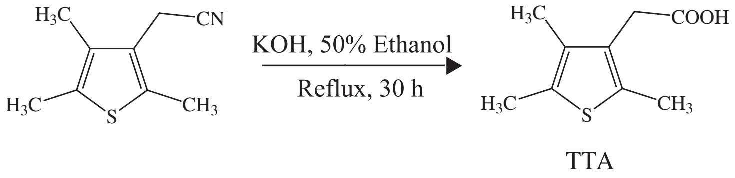

Fig. 49: Synthetic pathway of TTA from 3-cyanomethyl-2,4,5-trimethylthiophene.

今回，最も容易に合成できる誘導体化試薬として (2,3,5-Trimethylthiophene-3-yl)-acetic acid（TTA）を開発した．TTA は市販の 3-Cyanomethyl-2,4,5-trimethylthiophene をアルカリ加水分解する一段階の反応で得ることができる（Fig. 49）．この TTA はカルボキシル基を有するため，塩基性触媒下，カルボジイミドを用いることで，第一・第二アミン，アルコール性水酸基，フェノール性水酸基を有する物質を誘導体化することができる．本研究では，環境ホルモンとして知られる物質 [61,62] であるアルキルフェノール類（APs）およびビスフェノール A（BPA, Fig. 50）をターゲットとして，Fig. 51 のように誘導体化することで，これら物質の高感度一斉分析法の開発を目的として実験を行った．

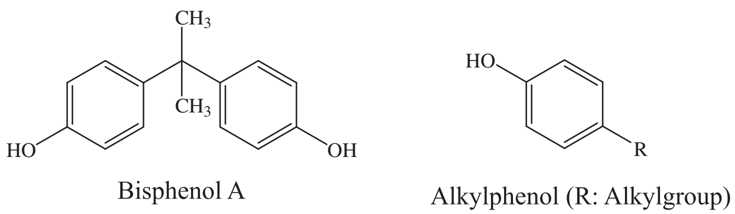

Fig. 50: Structure of bisphenol A and alkylphenols.

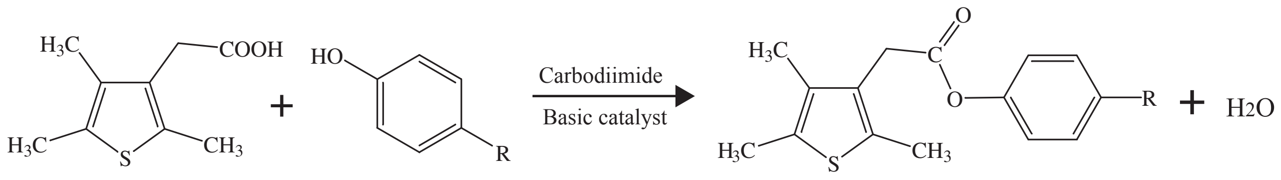

Fig. 51: Reaction scheme of phenols with TTA.

9.2 実験

9.2.1 試薬

Tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(Ⅱ) chloride hexahydrate は Palmer の方法 [16] により，Ruthenium(Ⅲ) chloride n-hydrate（試薬特級，和光純薬工業株式会社），2,2'-Bipyridine（試薬特級，和光純薬工業株式会社）を用い合成した．TTA は，3-Cyanomethyl-2,4,5-trimethylthiophene（東京化成）より合成して用いた．また，カルボジイミドとして，N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide（DCC, 東京化成）または 1-Ethyl-3-(3-dimeethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride（WSC, 同人化学研究所）を塩基性触媒として，4-Dimethylaminopyridine（DMAP, 和光純薬工業株式会社），または Pyridine（東京化成）を用いた．アルキルフェノール標準品として 4-n-Butylphenol, 4-t-Octylphenol, 4-n-Octylphenol, 4-n-Nonylphenol, Bisphenol A（環境分析用，和光純薬工業株式会社），4-Nonylphenol（分岐型，東京化成）を用いた．これらはアセトニトリルで 10 mM に調整し，冷蔵庫内（4 ℃）で保存し使用直前にアセトニトリルで希釈して用いた．またアルキルフェノール 13 種混合液（0.1 mg/ml, Alkylphenols and Bisphenol A, 1 mg/ml Nonylphenol in dichloromethane, 関東化学）も標準試料として使用した.

9.2.2 装置

本研究で用いた装置を以下に示す．下記の装置を必要に応じ，内径 0.5 mm（外径 1/16）のテフロンチューブで接続して HPLC（FIA）装置とした.

- Pump：GL Sciences PU611C（ジーエルサイエンス株式会社）
- Degasser：Shodex Degaseer（昭和電工株式会社）
- Injector：Rheodyne 7125（20 μL, 500μL, RHEODYNE）
- CL Detector：Comet3000（PMT biased at -500 V, 有限会社コメット）
- Data procescer：Hitachi D-2500 Chromato-Integrator（株式会社日立製作所）
- Column：Chromolith Performance RP-18e（100 × 4.6 mm I.D.; Merck）x 2 combined with column coupler（Merk）

9.2.3 TTA および TTA-OP の合成法

[TTA 合成法]

ニトリルの加水分解によるカルボン酸の合成 [63] を参考に以下の操作で合成を行った．50 mL のエタノールに 1 g の 3-Cyanomethyl-2,4,5-trimethylthiophene を溶解した．20 mL の水に 1.4 g の水酸化カリウムを溶解した．両液を 100 mL の三口フラスコ内で混合し，30 時間還流した．還流管を外し，エタノールを蒸発させ水を少量足し濃塩酸で pH 2 以下にした．クロロホルムで 3 回抽出操作を行い目的物をクロロホルム層に移し，クロロホルムをエバポレーターで取り除くことで粗誘導体化試薬を得た．この粗誘導体化試薬を逆相オープンカラム（コスモシール 75C18, 20 x 2.8 cm I.D.; eluent, water–acetonitrile（80:20, v/v））にかけ，二番目の分画を蒸発乾固することで白いパウダー状の TTA を得た．得られた TTA をさらにデシケーターで乾燥させた．^{1}HNMR（JNM-GSX400, 400 MHzJEOL），元素分析（CHN CORDER MT-5, Yanaco），および融点測定（MICRO MELTING POINT APPARATUS, Yanaco）により構造確認を行った．

収量 0.46 g．^{1}H NMR（使用溶媒 $CDCl_3$, 基準物質 TMS）δ 2.03（3H, S, $-CH_3$），δ 2.28（3H, S, $-CH_3$），δ 2.33（3H, S, $-CH_3$），δ 3.49（2H, S, $-CH_2$-COOH）．元素分析（Calculated C: 58.67, H: 6.56, O: 17.37，S: 7.40; Found C: 58.58，H: 6.54）．融点（106 – 107 ℃）．

[標準 TTA-OP 合成法]

0.5 mmol（100 mg）の 4-n-octylphenol（OP），約 0.5 mmol（100 mg）の TTA，約 0.5 mmol（122 mg）の DMAP，約 2 mmol（400 mg）の WSC を 20 mL のアセトニトリルに溶解し室温で一日放置した．この溶液を逆相カラム（コスモシール 75C18, 10 x 3.4 cm I.D.; eluent, water–acetonitrile（20:80, v/v））にかけ夾雑物を溶出したのち 100 %アセトニトリルで TTA-OP を溶出させた．この溶液をエバポレーターで濃縮乾固し，得られた TTA-OP をデシケーターで乾燥させた．^{1}H NMR（JNM-GSX400, 400 MHz, JEOL），元素分析（CHN CORDER MT-5, Yanaco），および融点測定（MICRO MELTING POINT APPARATUS, Yanaco）により確認をおこなった．

収量 105 mg．^{1}H NMR（使用溶媒 $CDCl_3$, 基準物質 TMS）δ 0.86 – 0.89（3H, t, J = 6.8Hz, $-CH_3$），δ 1.28 – 1.55（14H, m），δ 2.11（3H, S, $-CH_3$），δ 2.30（3H, S, $-CH_3$），δ 2.24（3H, S, $-CH_3$），δ 2.55 – 2.59（2H, t, J = 8.0 Hz, Phenyl-CH_2），δ 3.68（2H, S, Phenyl-CH_2-CO-），δ 6.94 – 6.96（2H, d, J = 8.0 Hz, Phenyl-H），δ

7.13 – 7.15（2H, d, J = 8.0 Hz, Phenyl-H）. 元素分析（Calculated C: 74.15, H: 8.66, O: 8.59, S: 8.61; Found C: 74.20, H: 8.68）. 融点（40 – 41 ℃）.

9.2.4 誘導体化法の検討

誘導体化手順は，Morita らの報告を参考にした [60]．最初に 20 mM TTA，塩基性触媒として 100 mM DMAP，カルボジイミドとして 50 mM DCC をそれぞれアセトニトリルで調整し，この条件を基本条件として，TTA 濃度，カルボジイミド濃度・種類，塩基性触媒濃度・種類を決定した．アセトニトリルで調整した 50 μL の 100 μM OP に TTA，DMAP，DCC をそれぞれ 50 μL ずつ添加し，2 時間誘導体化反応を行った後，反応停止剤としてメタノールを 300 μM を加えた．（誘導体化操作後の OP 濃度は約 10 μM となる．）誘導体化試薬と 10 μM 標準 TTA-OP 試料を用い，溶離液に 10 mM リン酸水溶液–アセトニトリル（2:8, v/v）を用いた HPLC–CL 検出（20 μL 注入）を行うことで効率よく誘導体化が進む各試薬の濃度条件を検討した．

最適誘導体化法として，アセトニトリルで調整した 250 μL の試料に 300 mM DMAP を 20 μL，50 mM TTA，50 mM WSC をそれぞれ 10 μL 加え 2 時間以上室温で放置した後，過剰試薬を除去するため 20 μL のメタノールを加え 10 分以上放置し，最後に 50 mM リン酸水溶液を 300 μL 加える手順を採用した．得られた試料溶液 500 μL を HPLC に注入した．

9.3 結果と考察

9.3.1 誘導体化条件の決定

誘導体化反応を行うための最適条件を決定した．TTA 濃度，カルボジイミド濃度，塩基性触媒濃度，反応時間・温度について検討した．結果を Fig. 52 に示す．TTA およびカルボジイミド（DCC，WSC）は 1 mM 以上の濃度でほぼ一定の誘導体化効率が得られた．塩基性触媒として用いた Pyridine では，塩基性が弱いため（pKa 5.42）誘導体化を進めることが出来なかった．一方，DMAP では濃度が高くなるにつれて効率よく誘導体化が進んだ．また，反応温度は高い（60 ℃）方が速く反応が進んだが，室温（24 ℃）と比べてそれほど大きな差はなかった．

これらの結果から誘導体化反応時，最低 1 mM TTA，1 mM WSC，25 mM DMAP の試薬濃度，室温 2 時間以上の反応条件を採用した．これは，DMAP は第三アミン部位を持ち，また TTA も発光反応を起こすため，出来る限り低濃度とした．また，WSC は第三アミン部位を持つため DCC と比べると反応を妨害することが予測されるが，過剰試薬および反応後生成する尿素体が容易に除去できるため WSC を採用することとした．（水溶性である WSC を使用することで，水溶液中においても誘導体化を行うことが可能であった．同一濃度の WSC でアセトニトリル中での誘導体化効率を 100 %としたとき，10 %の水を含む条件では 70 %，40 %の水を含む条件では 10 %程度の誘導体化効率が得られた．）

9.3.2 検出条件の決定

次に，標準 TTA および TTA-OP を用い検出最適条件を検討した．発光反応時 pH，電解電流値，流量について最適化を行った．結果を Fig. 53 に示す．反応時 pH が高くなるにつれて，発光強度も強くなったがそれ以上にバックグランドの上昇が大きく，より低 pH であるほうが高い感度が得られた．特に発光強度の電解電流値および流量の依存実験において，他にはない特徴が見られた．“ 電解電流値が高くなる ＝ 発光試薬量が増える ” であるため，通常，電解電流値が大きくなると発光強度は強くなり，小さくなると発光は弱くなる．Fig. 53B で確認できるように電解電流値が大きくなるに従い，第三アミン部位を持つ DMAP の発光は強くなり，また水酸化物イオンとの反応も起こりやすくなるた

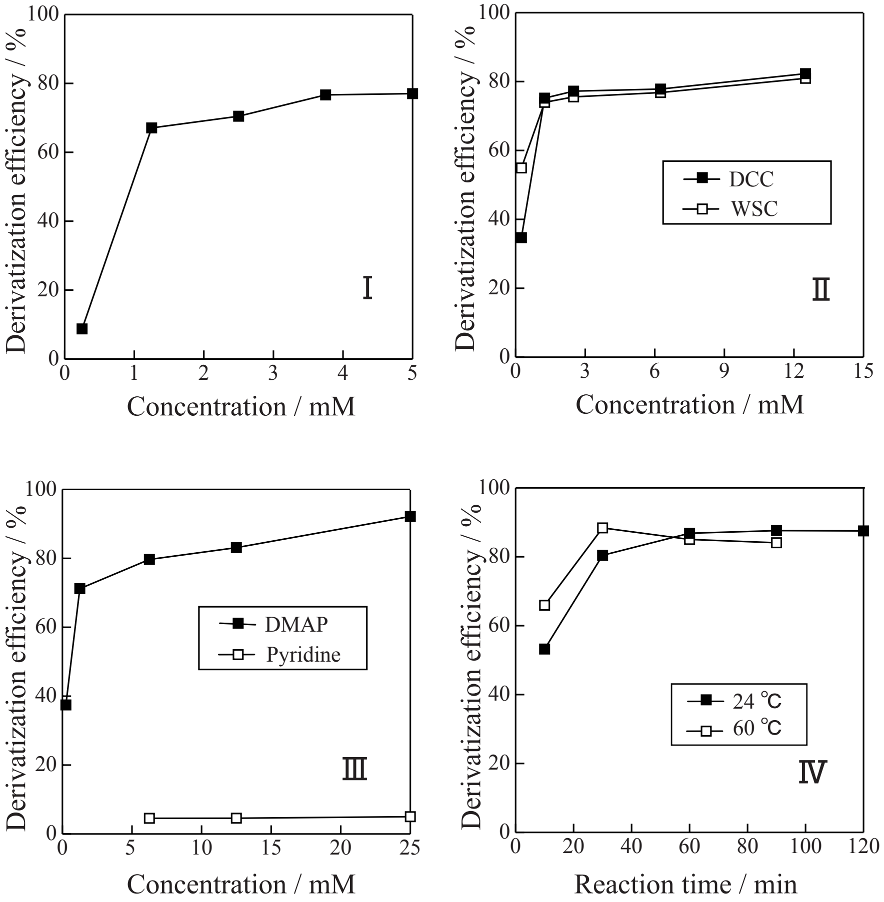

Fig. 52: Effect of the (I) TTA concentration, (II) carbodiimide concentration, (III) basic catalyst concentration, and (IV) reaction temperature on the derivatization efficiency. HPLC conditions: eluent, 10 mM phospharic acid–acetonitrile (2:8, v/v); $Ru(bpy)_3{}^{2+}$ solution, 0.5 mM $Ru(bpy)_3{}^{2+}$ in 10 mM sulfuric acid; eluent flow rate, 0.8 ml/min; $Ru(bpy)_3{}^{2+}$ solution flow rate, 0.3 ml/min; ECR, 50 μA.

めバックグランド値の上昇が確認された．しかし，TTA および TTA-OP は，電解電流値が小さいほど強い発光が得られるという結果が得られた．そこで電解電流値を最低の 1 μA にセットし，キャリアー溶液の流量を変化させた．結果，流量が大きくなるに従い，更に発光強度が強くなった．（Fig. 53C においては，1.2 ml/min までしか検討していないが，後の実験で 1.6 ml/min まで発光の増大が見られた．）これらの結果は，TTA および TTA-OP は発光反応速度が非常に速く，大量の 3 価 Ru 錯体と混合されると検出セルに到達する前に発光反応が終わってしまうため，電解電流値が小さく，流量が速い方が強

い発光を得られたものと考えられる．検出セルを改良し効率よく発光反応を捉えることで更なる高感度化が望めるが，速い流量，少ない発光試薬という条件の適用は，他成分の検出を抑制することとなり選択性の向上につながる．そこで本研究においては，電解電流値 1 μA，流量 1.6 ml/min，pH 2 付近の発光反応条件を採用した．

また，脱気直後の溶液では強い発光が得られるが，時間経過と共に感度が低下していくことが確認された．窒素ガスによる脱気後の溶離液を用いると，脱気を行わない溶離液を用いた時に比べ 6 倍近くピーク高さが上昇した．チオフェン環の酸化により生成するカチオンラジカルが酸素分子と反応することが報告 [64] されており，第 3 章で提案した DMT の発光反応機構（Fig. 14）における 2 式の反応が酸素分子により阻害されるため，発光が減少しているものと考えられる．（励起 2 価 Ru 錯体の酸素分子による消光反応も考えられるが，他の実験においてこれほど大きな依存は確認されていない．）現在用いている装置は，流路および検出セルもすべて酸素を透過する PTFE チューブであるため溶存酸素を完全に取り除くことはできない．そこで本実験においては，脱気は行わないことにした．

9.3.3　分離条件の決定

2 時間の誘導体化反応後，メタノールを加えずに分離を行うと Fig. 54B のように検出を妨害する物質が現れた．誘導体化反応における過剰試薬（TTA のみなど個々に HPLC に注入しても同じ保持時間に現れる試薬は無い）と考えられたため，過剰試薬を潰すためメタノールを添加することとした．その結果，Fig. 54A のように過剰な試薬類は全てクロマトグラム前方に溶出し試料の検出を妨げることはなかった．

誘導体化した APs および BPA を効率よく短時間で分離検出するため，分離には有機溶媒比率を段階的に増加させるステップグラジエント法を用いた．Fig. 55 に 13 種の APs と BPA 混合溶液のクロマトグラムを示す．40 分程度で 14 種のうち 13 種を分離し，確認することができた．

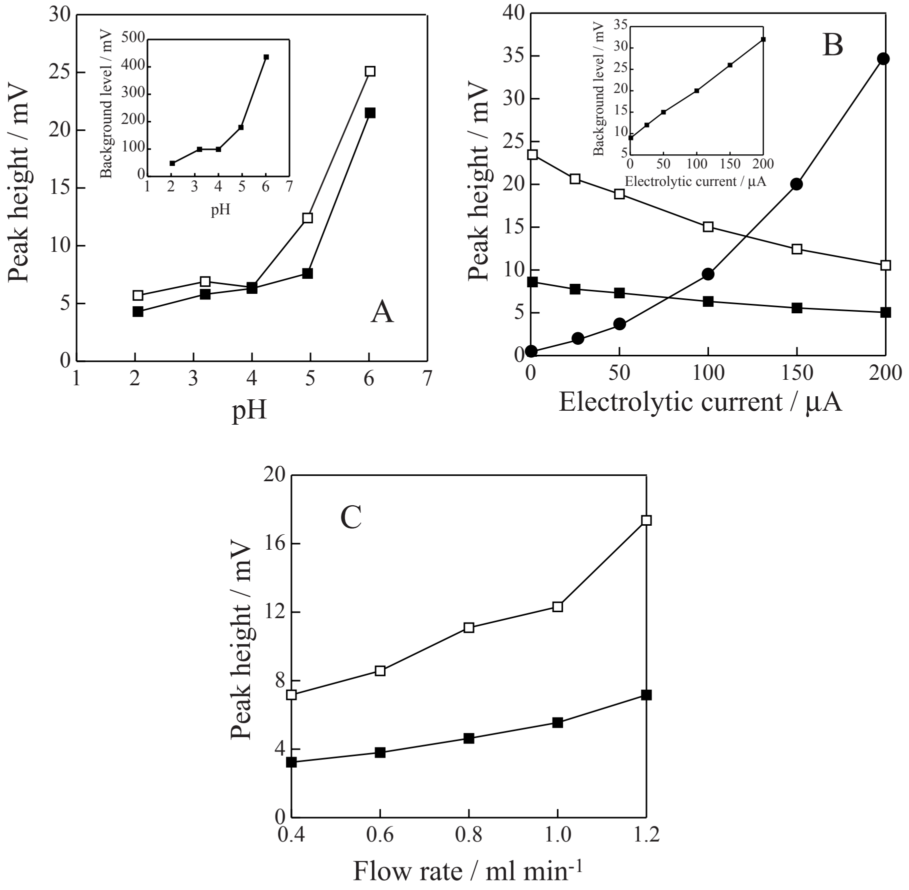

Fig. 53: Effect of the (A) pH, (B) electrolytic current, and (C) flow rate on the chemiluminescence intensity. Inset of (A): effect of electrolytic pH on background level. Inset of (B): effect of electrolytic current on background level. Sample: 1 μM, TTA (■); 1 μM, TTA-OP (□); 100 μM, DMAP (•). FIA conditions: carrier, water-acetonitrile (4:6, v/v); $Ru(bpy)_3{}^{2+}$ solution, 0.5 mM $Ru(bpy)_3{}^{2+}$ in 10 mM sulfuric acid; $Ru(bpy)_3{}^{2+}$ solution flow rate, 0.3 ml/min.

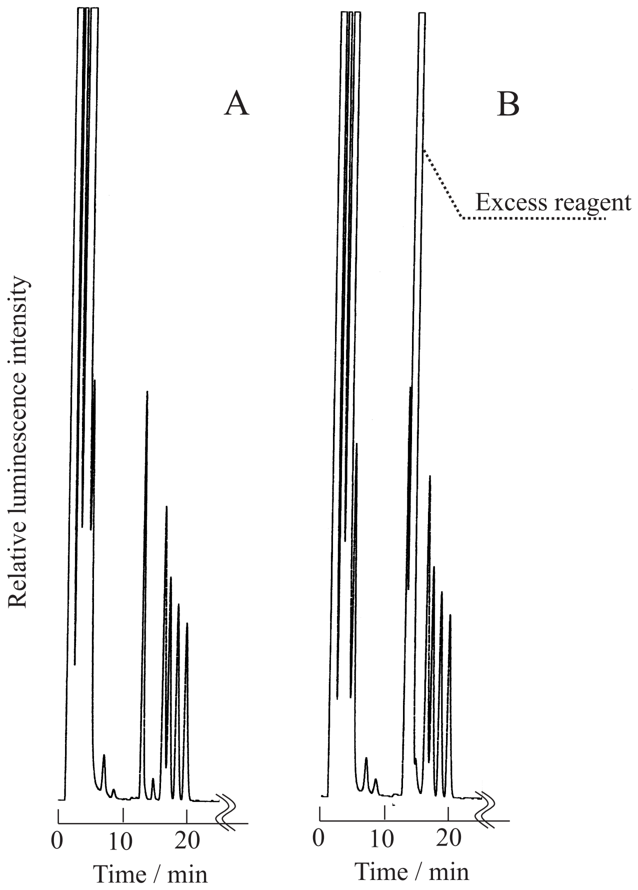

Fig. 54: Chromatograms of APs and BPA obtained with (A) 20 μL methanol addition and (B) 20 μL acetonitrile addition. Sample: 50 ng/ml

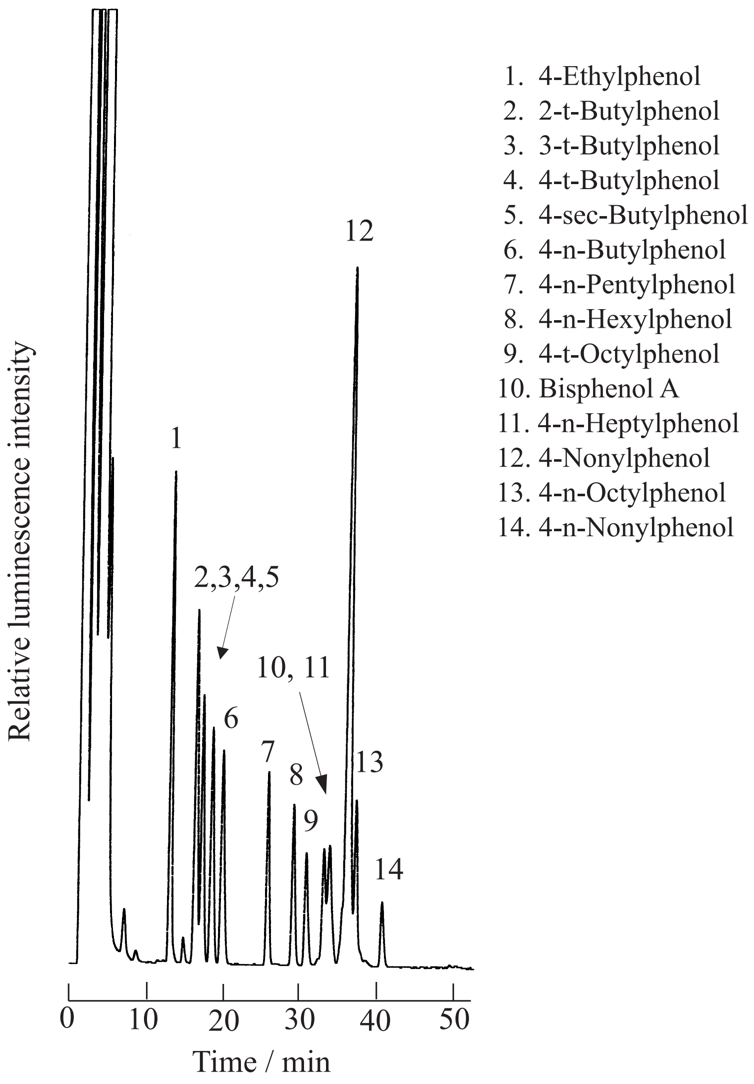

Fig. 55: Chromatogram of APs and BPA obtained by HPLC–CL. Sample: 50 ng/ml (4-nonylphenol, 500 ng/ml). HPLC conditions: eluent; (A) acetonitrile, (B) 10 mM phosphoric acid. $Ru(bpy)_3^{2+}$ solution, 0.5 mM $Ru(bpy)_3^{2+}$ in 10 mM sulfuric acid; eluent flow rate, 1.6 ml/min; $Ru(bpy)_3^{2+}$ solution flow rate, 0.3 ml/min; ECR, 1 μA. Gradient program: 0 – 10 min, 50 % A; 10 – 25 min, 60 % A; 25 – 35 min, 70 % A; 35 – 50 min, 80 % A; 50 – 60 min, 100 % A; 60 – 70 min, 50 % A.

9.3.4 試薬の評価

これらの分離・検出条件を基に 4-n-Butylphenol，4-t-Octylphenol，Bisphenol A，4-Nonylphenol，4-n-Octylphenol，4-n-Nonylphenol について検量線を作成した．結果を Table 15 に示す．

Fig. 55 の分離条件では完全分離ができていなかった．そこでカラム長を 2 倍にし，グラジエントプログラムを変更することでより高分離を達成した．（それでも 2-t-Butylphenol と 3-t-Butylphenol の分離は出来なかった．）Fig. 56 に得られたクロマトグラムを示す．本研究では一斉分析を目指した分離条件の検討を行ったが，BPA のみの測定など比較的容易なグラジエントプログラム変更で対応できる．

Table 15: Parameters of calibration graphs and precision values of standard alkylphenols and BPA with HPLC–CL. HPLC conditions are same as in Fig. 55.

Compound	Linear range / ng ml^{-1}	D. L. / ng ml^{-1}	R. S. D. / %[a]	r^2
4-n-Butylphenol	5 – 1000	1.4	1.3	0.9996
4-t-Octylphenol	5 – 1000	3.5	2.5	0.9996
Bisphenol A	5 – 1000	2.3	1.3	0.9972
4-Nonylphenol	10 – 1000	5.7	4.3	0.9997
4-n-Octylphenol	5 – 1000	1.5	2.9	0.9999
4-n-Nonylphenol	10 – 1000	4.4	5.1	0.9952

[a]Six operation at 50 ng/ml.

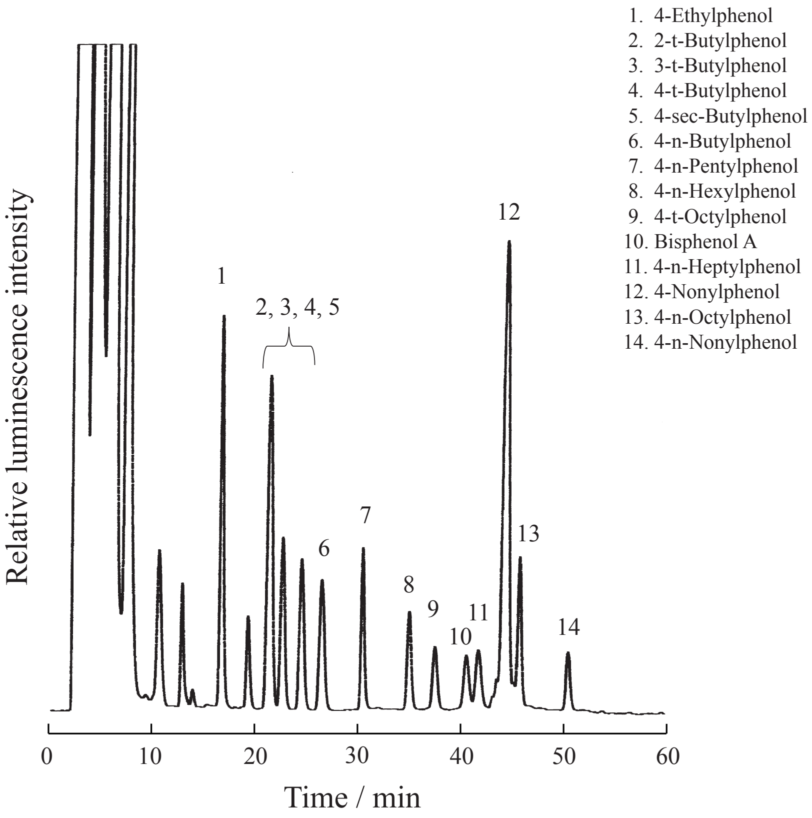

Fig. 56: Chromatogram of APs and BPA obtained by HPLC-CL. Sample: 50 ng/ml (4-nonylphenol, 500 ng/ml). HPLC conditions: eluent; (A) acetonitrile, (B) 10 mM phosphoric acid. $Ru(bpy)_3{}^{2+}$ solution, 0.5 mM $Ru(bpy)_3{}^{2+}$ in 10 mM sulfuric acid; eluent flow rate, 1.6 ml/min; $Ru(bpy)_3{}^{2+}$ solution flow rate, 0.3 ml/min; ECR, 1 μA. Gradient program: 0 – 10 min, 50 % A; 10 – 25 min, 60 % A; 25 – 40 min, 70 % A; 40 – 50 min, 80 % A; 50 – 60 min, 100 % A; 60 – 70 min, 50 % A.

9.4 まとめ

開発した TTA により APs および BPA の一斉分析が可能となった．今後，河川水などの実試料測定を行い，合わせて試料の前処理法等を検討していくことで分析法としての評価を行っていく必要がある．

発光誘導体化試薬としての TTA は，酸性側での検出，少ない発光試薬，高流量を用いることで高い感度が得られた．この条件は Ru 錯体と発光反応を起こす夾雑物の検出を低減することとなり，更に高い選択性を発現できる．しかしながら現在の装置構成では TTA のパフォーマンスを最大限引き出せているとは言えない．検出セル構造の最適化や溶存酸素の影響を受けないようにすることで更なる高感度化が望める．また TTA での誘導体化は，測定対象物質に対し pH に依存しない疎水性を付加することとなるので，逆相系分離が容易に適用できるようになるという利点もある．本研究ではフェノール類をターゲットとしたが，今回開発した TTA でアルコール，糖，アルキルアミンなどの高感度測定も期待できる．

10　光化学反応を用いたベンゼン誘導体の検出法の開発

10.1　序

第 1 章でも述べたように Ru 錯体により化学発光検出できる化合物の報告は，脂肪族アミン，シュウ酸，ジケトン構造を有するものなどに限られていた．そこで Ru 錯体化学発光検出法の適用範囲を広げるため様々な方法が考案されてきた．脂肪族第三アミン構造やジケトン構造が Ru 錯体化学発光検出法により高感度に測定できることから，これら構造を持つ物質を測定対象物に結合させることで測定可能にするプレカラム誘導体化法（第 9 章参照），流路下で化学的，光化学的，電気化学的に測定対象物質を Ru 錯体化学発光法が適用できる化合物に誘導するポストカラム誘導体化法などである．

ポストカラム法は，プレカラム法のように手作業を必要としないため全自動化が容易で，測定者ごとの誤差もなく再現性に優れている．中でも光化学反応を用いたポストカラム法は，光が反応試薬であるため，反応性が高く不安定な反応試薬の調整も必要としない．また，試薬由来の汚染もなく，光照射の ON，OFF により異なる情報が得られるため有用な方法とされている [65]．そのためポストカラム光化学反応と Ru 錯体による化学発光検出法を組み合わせた分析法が多数報告されている．Yokota らは，アミノ酸が酸化剤共存下，紫外線照射によりシュウ酸になることを利用し，Ru 錯体を用いた HPLC によるアミノ酸の分析法を報告している [66]．また，Ruiz らはカルバリルやニトロソアミンが紫外線照射によりアルキルアミンを生成することを利用し，Ru 錯体を用いた FIA によるこれら化合物の測定法を報告している [67, 68]．

本研究は，低圧水銀灯により紫外線を照射した Triphenyltin(Ⅳ) が，Ru 錯体と発光反応を起こすという実験結果を基に，なぜ発光反応を起こすのか解明を試みた．また，発光強度が芳香環の数，UV 照射時間，置換基の種類に依存し，特にフェノール類の検出に有用との結果が得られたので，応用の一つとして茶に含まれるポリフェノールであるカテキンの分析法を開発した．

10.2　実験

10.2.1　試薬

Tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(Ⅱ) chloride hexahydrate は Palmer の方法 [16] により，Ruthenium(Ⅲ) chloride n-hydrate（試薬特級，和光純薬工業株式会社），2,2'-Bipyridine（試薬特級, 和光純薬工業株式会社）を用い合成した．(−)-Epicatechin（purity not specified, Sigma），(−)-Epigallocatechin gallate（from green tea，minimum 95 %, Sigma）は，メタノールで 1 mM に調整したのち冷蔵庫（4 ℃）に保存し，使用直前に溶離液で希釈して用いた．また，カテキン類は不安定であるため保存液の保存も一週間を限度とした．すべての試薬は，試薬グレードまたは特級グレードを用い精製などを行わずそのまま使用した．水溶液の調整には水道水を Advantec AQUARIUS GS-200（Advantec）により脱イオン，蒸留後，MILLI-QⅡ システム（日本ミリポア）で超純水としたものを利用した．2 価 Ru 錯体溶液は，$[Ru(bpy)_3]Cl_2$・$6H_2O$ を 10 mM 硫酸溶液に溶かし，0.5 mM となるように調整して用いた．0.2 M BR 緩衝液は，酸溶液として 13.6 mL のリン酸（85 %），11.4 mL の氷酢酸（99.7 %），12.4 g のホウ酸を超純水で 1 L にメスアップして調整し，2 M 水酸化ナトリウム溶液で pH を調整して用いた．

10.2.2　装置

本研究で用いた装置を以下に示す．下記の装置を必要に応じ，内径 0.5 mm（外径 1/16）のテフロンチューブで接続して HPLC（FIA）装置とした．

- Pump：GL Sciences PU611C（ジーエルサイエンス株式会社）
- Degasser：Shodex Degaseer（昭和電工株式会社）
- Injector：Rheodyne 7125（20 μL; RHEODYNE）
- CL Detector：Comet3000（PMT, −500 HV; ECR, 100 μA; 有限会社コメット）
- UV-VIS Detector：L-4200（株式会社日立製作所）
- Data procescer：Hitachi D-2500 Chromato-Integrator（株式会社日立製作所）
- Column：Chromolith Performance RP-18e 100 × 4.6 mm I.D.（Merck）
- Photochemical Reactor：自作（次項参照）

10.2.3 光化学反応器の作成と光照射法

光化学反応器は，プラスチック製のブラックボックスと 20 W の低圧水銀灯（254 nm）から作成した（Fig. 57）．オンラインでの光照射は，低圧水銀灯に反応コイルを巻きつけ照射を行った．反応コイルは 20 m の PTFE チューブ（内径 0.5 mm，外径 1/16）を三次元的に編みこんだ Knitted open tubular（KOT） [69] を用い試料ゾーンをできるだけ拡散させないようにした．UV 照射時間は，コイルを水銀灯に巻きつける長さで調節した．また，バッチ法での光照射はオンライン法と同じ水銀灯の横に 1 cm の石英セルを任意時間配置することで行った．光源からの熱による試料の蒸発を防ぐため，石英セルは蓋をして利用した．

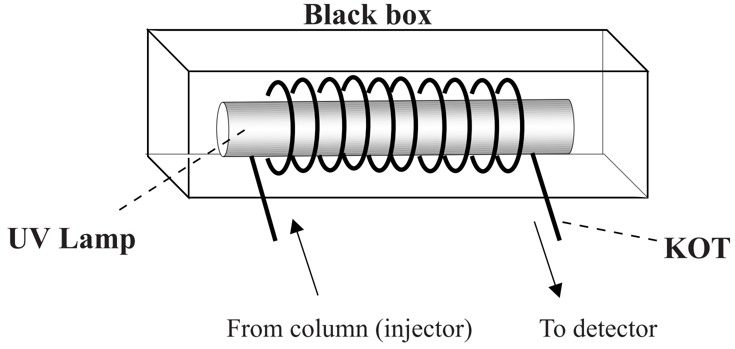

Fig. 57: Construction of photochemical reactor for post-column reaction.

10.2.4 カテキン類の分析法

実試料として，ペットボトル入りの茶 3 種を用いた．溶離液で 50 倍希釈後，0.45 μm の親水性 PTFE シリンジフィルターでろ過し，20 μL を HPLC に注入した．

10.3　結果と考察

10.3.1　反応部位の確認

2-Pump FIA 装置のインジェクターの後に光化学反応器を接続し，試料として Triphenyltin(Ⅳ)，Diphenyltin(Ⅳ)，Phenyltin(Ⅳ)，Tributyltin(Ⅳ)（以降，それぞれを TPT，DPT，PT，TBT とする）を用い，UV 照射時間と発光強度との関係を調査した．結果を Fig. 58 に示す．TPT，DPT，PT は UV 照射時間が長いほど強い発光を示し，また発光強度はそれぞれの時間で常に TPT ＞ DPT ＞ PT であった．また TBT は UV 照射しても発光は得られなかった．

この結果は，明らかにフェニル基が発光反応に関与していることを示唆している．そこでバッチ法を用い任意時間 UV 照射した TPT を吸光光度計で測定したところ Fig. 59 のように UV 照射時間の経過と共にフェニル基由来の 200 nm 付近の UV 吸収が減少しているのが確認できた．また，Yokoi らによっても低圧水銀灯による紫外線照射で芳香族化合物が分解することが報告されている [70]．これらの結果・報告は，UV 照射によりフェニル基が分解し，Ru 錯体と発光反応を起こす物質が生成していることを示している．

10.3.2　反応生成物の同定

近年，高度酸化処理（Advanced oxidation process: AOP）と呼ばれる化学物質の分解技術が多く研究されている [71]．AOP はオゾンや紫外線，光触媒などを組み合わせ難分解性の有害物質を分解する技術である．AOP による芳香環の分解過程でフマル酸，マレイン酸，シュウ酸などのジカルボン酸が生成することが報告されている [72]．これらの報告から，フェニル基の UV 照射による分解生成物質は，Ru 錯体と強い発光反応を起こすことが知られているシュウ酸ではないかと考えられた．そこで，バッチ法で任意時間 UV 照射した TPT を試料としてシュウ酸が生成しているか確認を行った．

2-Pump HPLC 装置を用い，第四級アンモニウム塩をイオンペア剤として使用したイオンペアクロマトグラフィーによりシュウ酸生成の確認を行った．結果を Fig. 60 に示す．5 分間 UV 照射した試料（b）において，3 つのピークが見られ，最後のピークの保持時間がシュウ酸標準試料（e）のピークと一致した．この結果は，最後のピークがシュウ酸であることを示している．UV 照射時間の増加と共にシュウ酸のピークが大きくなり，

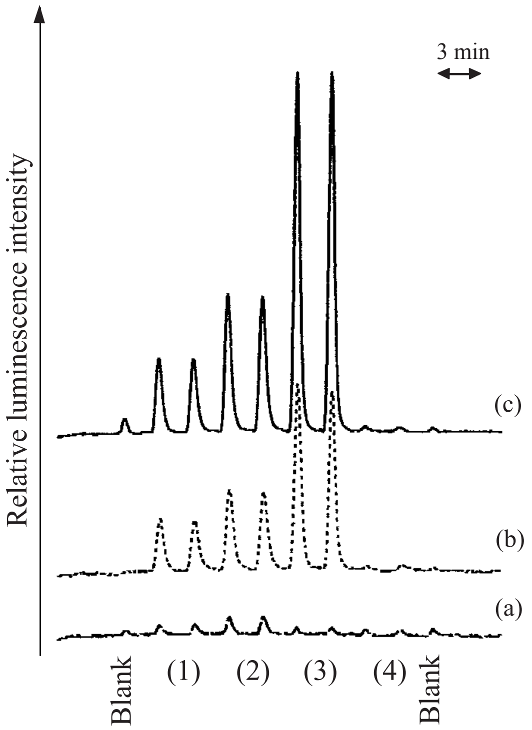

Fig. 58: Effect of the UV irradiation time on the chemiluminescence intensity for phenyltin compounds. Sample: 10 μM. PT, (1); DPT, (2); TPT, (3); TBT, (4). UV irradiation time, (a) 0 min, (b) 1 min, (c) 3 min. FIA conditions: carrier, water–actonitrile (1:1, v/v); $Ru(bpy)_3{}^{2+}$solution, 0.5 mM $Ru(bpy)_3{}^{2+}$ in 10 mM sulfuric acid; carrier flow rate, 0.5 ml/min; $Ru(bpy)_3{}^{2+}$ solution flow rate, 0.3 ml/min.

60 分間 UV 照射した試料（d）においてはシュウ酸のみが検出された．他の二つの生成物については定かではないが，Ru 錯体と発光反応を起こし 60 分照射時にはシュウ酸のみとなっていることから，ジケトン構造を有するシュウ酸先駆体であると考えられる．これらの結果からフェニル基への UV 照射により生成し，Ru 錯体を発光させている物質はシュウ酸であることが確認された．

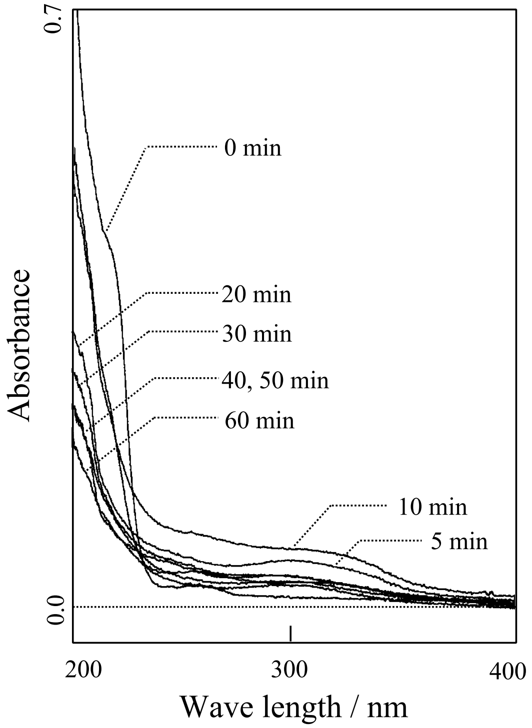

Fig. 59: Absorption spectra for UV irradiated solutions of TPT. Sample: 0.1 mM TPT in water–acetonitrile (1:1, v/v). A sample solution was irradiated with UV for a given length of time at a batch method.

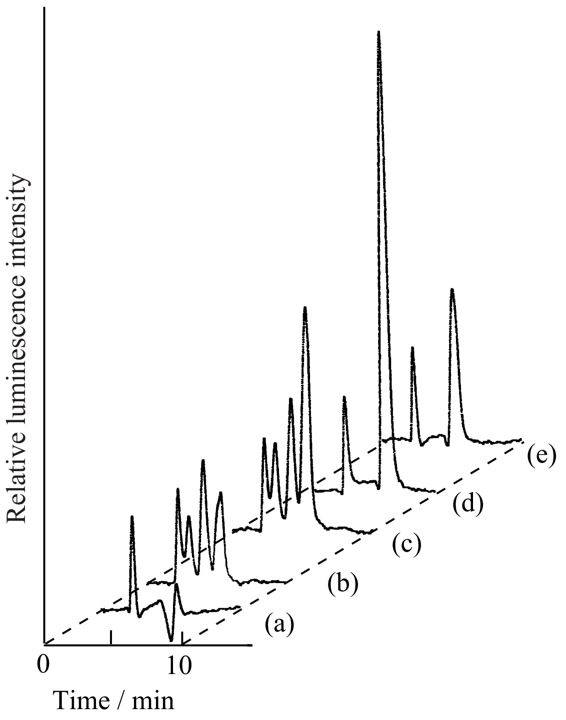

Fig. 60: Chromatograms of UV irradiated TPT. Sample: 10 μM, TPT; (e) 0.1 μM, oxalic acid in water–acetonitrile (1:1, v/v). UV irradiation time (batch method), (a) 0 min, (b) 5 min, (c) 30 min, (d) 60 min. HPLC conditions: eluent, 5 mM tetradecyltrimethylammonium bromide in 20 mM phoshoric acid–acetonitrile (7:3, v/v; pH 3, 6 M NaOH); $Ru(bpy)_3{}^{2+}$solution, 0.5 mM $Ru(bpy)_3{}^{2+}$ in 10 mM sulfuric acid; eluent flow rate, 0.5 ml/min; $Ru(bpy)_3{}^{2+}$ solution flow rate, 0.3 ml/min.

10.3.3　置換基種の効果

フェニル基への UV 照射によりシュウ酸が生成し，Ru 錯体と発光反応を起こすことが明らかになった．この結果からは，シュウ酸に変換されやすい（酸化されやすい）芳香環は，短い UV 照射時間で強い発光を起こすことが期待できる．そこで様々な官能基を持つベンゼン誘導体について，UV 照射時間と発光強度の関係を調べた．

まずシュウ酸検出のための最適条件を検討した．Fig. 61 に示すように反応時の pH が 2 で最も強い発光が見られたので発光反応時の pH が 2 付近になるようにキャリアーを調整した．また，キャリアー流量についても検討し，1.0 ml/min まで発光の増大が見られたが，速い流量の適用は UV 照射できる時間を短くするため 0.5 ml/min を採用した．キャリアー流量 0.5 ml/mim のとき，本研究で用いた反応コイル（20 m）で最大 5 分程の UV 照射が可能であった．

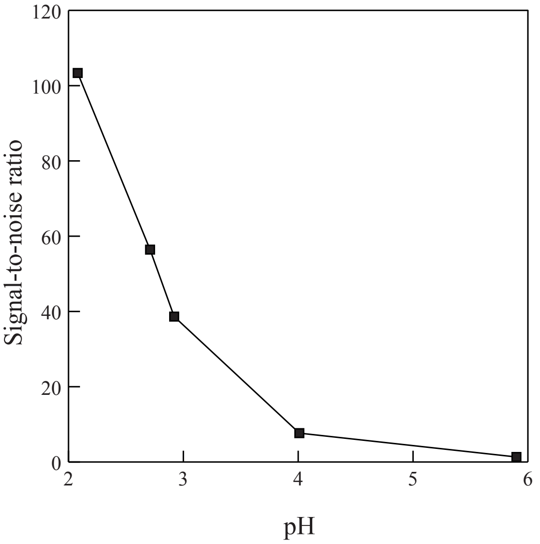

Fig. 61: Effect of the pH on the chemiluminescence intensity for oxalic acid obtained with FIA. Sample: 1 μM oxalic acid; FIA conditions: carrier, water–actonitrile (1:1, v/v); $Ru(bpy)_3{}^{2+}$solution, 0.5 mM $Ru(bpy)_3{}^{2+}$ in 10 mM sulfuric acid; carrier flow rate, 0.5 ml/min; $Ru(bpy)_3{}^{2+}$ solution flow rate, 0.3 ml/min.

ベンゼン誘導体について UV 照射時間と発光強度の関係を調べた．結果を Fig. 62 に示す．ベンゼン環を活性化させるヒドロキシル基が一つ置換した Phenol に特に強い発光が見られ，アミノ基が置換した Aniline でも強い発光が見られた．ベンゼン環を不活性化さ

せるニトロ基を持つ Nitrobenzene，カルボキシル基を持つ Benzoic acid でも UV 照射時間が長くなると比較的強い発光が得られた．しかし，置換基を持たない Benzene やメチル基を持つ Toluene では発光は微弱であった．これらの結果から，単純に置換基によるベンゼン環の活性・不活性の差だけではなく，共鳴効果が光分解過程に関与しているものと考えられる．また，すべての試料において UV 照射時間と発光強度の関係に頭打ちが見られた．これは UV 照射により生成したシュウ酸がさらなる UV 照射により分解し，生成と分解の平衡状態にあるもの考えられる．これらの結果は，置換基による選択的な検出が可能であることを示しており，本法がベンゼン誘導体の中でもフェノール類に対して特に有効であることを示している．そこで様々なフェノール類について UV 照射時間と発光強度の関係を調べた．結果を Fig. 63 に示す．ここでも芳香環の数に発光強度が依存する結果が得られた．

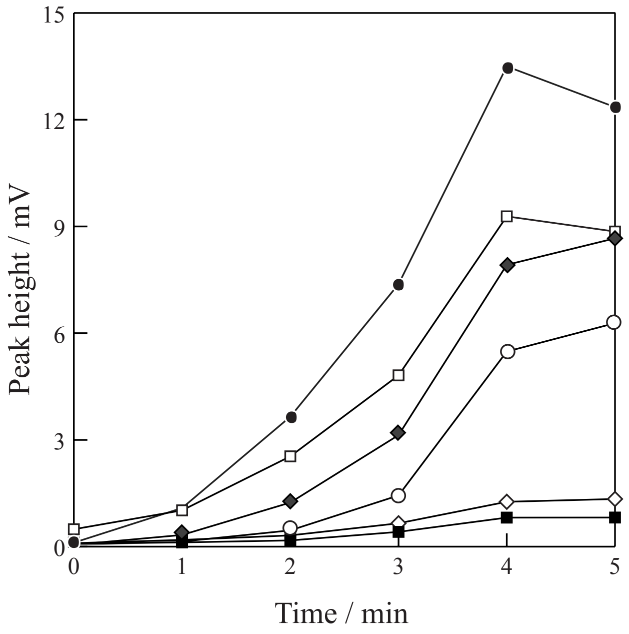

Fig. 62: Effect of the UV irradiation time on the chemiluminescence intensity for benzene derivatives obtained with FIA. Sample: 10 μM, benzene (■); 10 μM, toluene (◇); 10 μM, phenol (●); 10 μM, aniline (□); 10 μM, nitrobenzene (♦); 10 μM, benzoic acid (○). FIA conditions: carrier, 20 mM phosphoric acid–methanol (4:6, v/v); $Ru(bpy)_3{}^{2+}$solution, 0.5 mM $Ru(bpy)_3{}^{2+}$ in 10 mM sulfuric acid; carrier flow rate, 0.5 ml/min; $Ru(bpy)_3{}^{2+}$ solution flow rate, 0.3 ml/min.

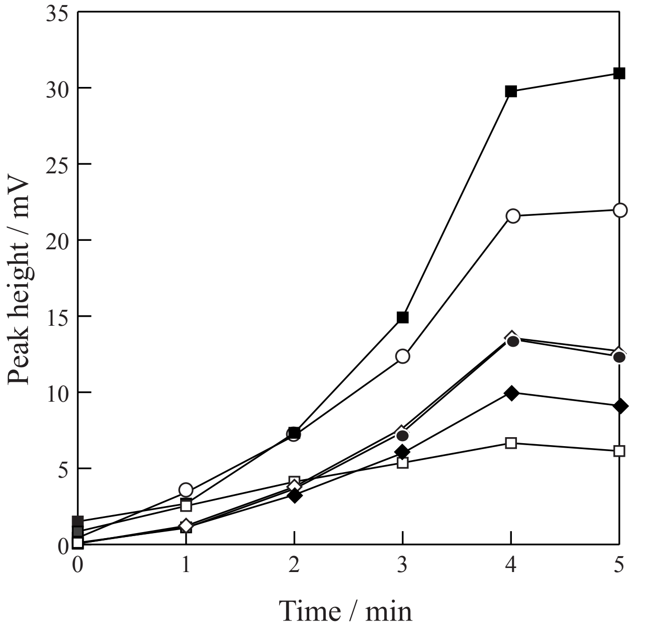

Fig. 63: Effect of the UV irradiation time on the chemiluminescence intensity for phenol derivatives obtained with FIA. Sample: 10 μM, phenol (•); 10 μM, catechol (♦); 10 μM, hydroquinon (◊); 10 μM, pyrogallol (□); 10 μM, (−)-epicatechin (∘); 10 μM, (−)-epigallocatechin gallate (■). FIA conditions are same as in Fig. 62.

10.3.4 茶中カテキン分析法の開発

カテキンは茶に含まれるポリフェノールで，近年，抗酸化作用，抗ガン作用等様々な生理活性作用が報告され注目を集めている物質である．カテキンの測定には，一般に HPLC–UV 検出法が用いられているが，生体中での挙動を調べるにはより高感度・高選択的な分析法が必要であるといえる．これまでの実験結果から光化学反応過程を組み込んだ Ru 錯体化学発光検出法は，特にフェノール類に有効であることが明らかになった．ポリフェノールであるカテキンは，より高効率でシュウ酸へ変換され，より高感度な検出が期待できる．本実験では，主要カテキンの中で，(−)-Epigarocatechin gallate（EGCg），(−)-Epicatechin（EC）の 2 種の定量を行った．Fig. 63 に示したように，UV 照射をすることで強い発光が得られたため最適条件を検討し検量線を作成した．結果を Table 16 に示す．

Table 16: Parameters of calibration graphs and precision values obtained with HPLC–CL. HPLC conditions: eluent, 20 mM phosphoric acid–methanol (8:2, v/v); $Ru(bpy)_3{}^{2+}$solution, 0.5 mM $Ru(bpy)_3{}^{2+}$ in 10 mM sulfuric acid; eluent flow rate, 0.5 ml/min; $Ru(bpy)_3{}^{2+}$ solution flow rate, 0.3 ml/min.

Compound	Linear range / μM	r^2	D. L. / pmol	R. S. D./%[a]
EGCg	0.1 – 50	0.9999	0.8	2.8
EC	0.1 – 50	0.9997	1.2	3.3

[a]Six determination at 1 μM.

本研究で開発された発光検出法と比較するために同試料を同条件で UV 検出したクロマトグラムを Fig. 64 に示す．UV 検出法ではピークの大きさは物質ごとの吸収波長およびモル吸光係数に依存するため他の物質（ここでは Caffeine）の妨害を受けている．これに対し，本法では芳香環の数に発光強度が依存するため選択的にカテキン類を捉えていると考えられる．前方に現れる巨大なピークは茶に内在するシュウ酸である．他のピークに関しては (+)-Catechin のみ同定できた．茶試料へのスパイク量がそれぞれ 2 μM となるように添加回収実験を行ったところ，回収率はそれぞれ EGCg 103.7 ± 5.0 %，EC 103.6 ± 7.1 % (n = 4，mean ± standard deviation) であった．実試料測定結果を Table 17 に示す．本研究では，EC と EGCg の 2 種のみ測定を行ったが，Fig. 65 のようにグラジエント分離を適用することも可能であり他のポリフェノール類の測定も可能である．

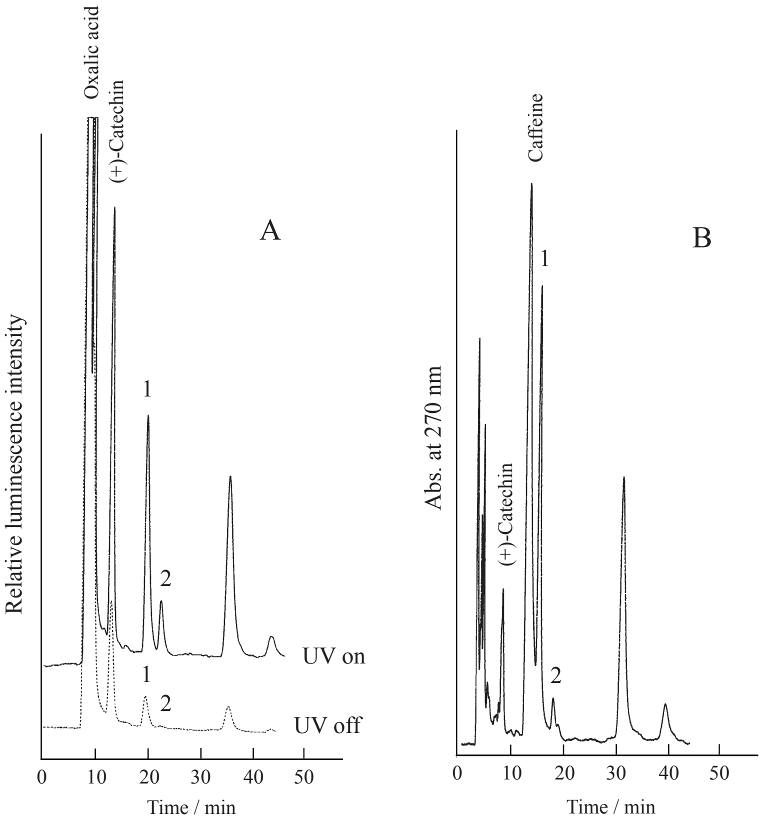

Fig. 64: Chromatograms of tea using isocratic elution system with A) CL detection and B) UV detection. Peak identification: 1, EGCg; 2, EC. HPLC conditions are same as in Table 16.

Table 17: Contents of catechins in different teas determined with HPLC–CL. HPLC conditions are same as in Table 16.

Sample	EGCg / μM	EC / μM
Green tea 1	142 ± 3	75 ± 5
Green tea 2	299 ± 2	119 ± 3
Oolong tea	74 ± 3	30 ± 4

Values are mean for four determiantion ± standard deviation.

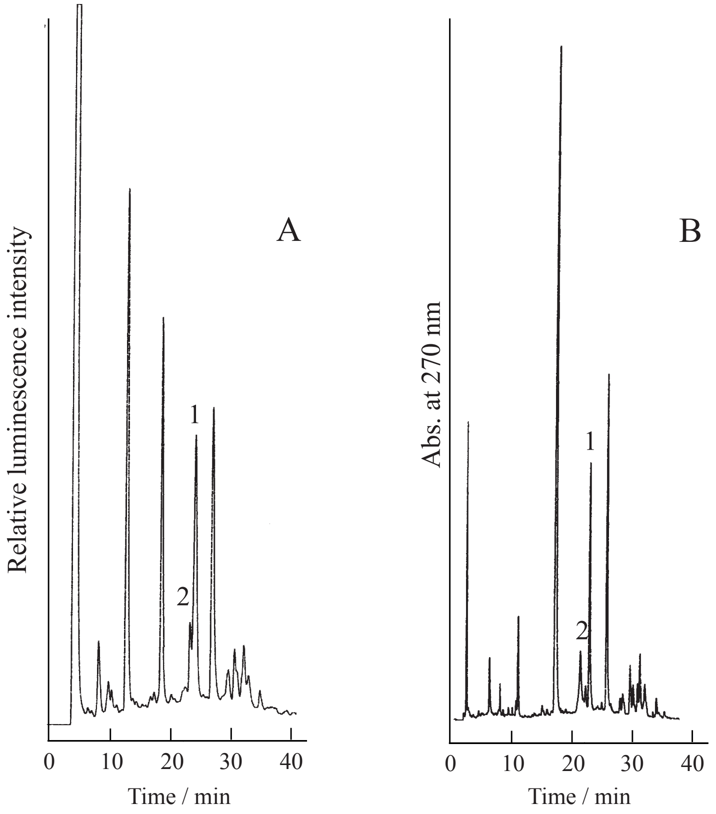

Fig. 65: Chromatograms of tea using gradient elution system with A) CL detection and B) UV detection. Peak identification: 1, EGCg; 2, EC. HPLC conditions: eluent, (a) 20 mM phosphoric acid, (b) acetonitrile; eluent flow rate, 1.0 ml/min; other condtions same as in Table 16. The eluent composition started at 100 % (a), then linearly increased to 20 % (b) in 40 min.

10.4 まとめ

低圧水銀灯により UV 照射された芳香環が光分解することにより，シュウ酸となり Ru 錯体と発光反応を起こすことを確認した．発光強度は，紫外線照射時間，芳香環の数，芳香環に導入された置換基の種類に依存した．オンライン光照射過程を組み込んだ Ru 錯体による化学発光検出法は，特にフェノール類の検出に有効である．

この検出方法を利用した応用研究の一例として茶中カテキンの測定を行った．結果として高選択的にカテキン類を検出することが可能であった．しかし，長い紫外線照射時間を必要とするため試料ゾーンの拡散が起こり分離面・検出面で不利な条件となっている．効果的な分解を起こすため，紫外線放電管の出力を上げる，酸化チタンなどの光触媒を用いるなどの方法を検討すれば，これらの問題は解決すると考えられ，さらなる高感度化が望める．また，検出物であるシュウ酸の検出最適条件については検討したが，光分解の最適条件については検討できていない．これらを含め今後さらなる検討が必要である．

11　結論

Ru 錯体と炭素鎖共役二重結合構造，ヘテロ五員芳香環構造が発光反応を起こすことを新たに見出した．これら構造と Ru 錯体の発光反応の特徴は，アミンのそれと類似しており，また発光反応機構も同様である可能性が非常に高い．これまでアミンと同様の発光機構を通る物質は報告されておらず，アミン，共役二重結合，ヘテロ五員芳香環について反応中間体の性質等を比較・検討することで Ru 錯体の発光反応の全容解明が大きく前進すると考えられる．

またアミンと Ru 錯体の発光反応において，近くに存在する電子吸引基が重要な役割を担っていることを明らかにした．電子吸引効果と発光反応の関係を明確にするには，更なる検討が必要であるが，この知見を基に，アミン構造を持つ物質の高感度検出法の開発が効率よく進むことが期待される．また可能性のひとつとして，アミン，共役二重結合，ヘテロ五員芳香環が同様の発光反応機構を通るのであれば，共役二重結合やヘテロ五員芳香環においてもアミンと同様に電子吸引基の存在が発光反応に影響することが予測される．実際に 2-Methylthiophene では発光は得られないが，2-Methylthiophene のメチル基にカルボキシル基が置換した 2-Thiopheneacetic acid において中性付近で発光反応が起こることを確認している．置換基の効果についても同様にアミン，共役二重結合，ヘテロ五員芳香環について比較・検討することで有用な情報が得られると考えられる．

本研究ではフロースルー型の検出セルを使用しているため，発光反応の全容を捉えているとは言えない．特に発光反応の pH 依存性実験などでは，pH により発光が増減しているとしか捉えていないが，純粋に発光が強くなる以外にも発光反応速度の変化により，検出できる光量が変化しているだけの可能性もある．よって今後の詳しい検討には，発光反応の全容を捉えられるバッチ式の発光検出器とストップドフロー装置を用い反応速度等についても検討していかなければならない．

また，応用研究を通して環境水，生体試料，加工食品など様々な試料を扱った．Ru 錯体による化学発光検出法は，生体中の薬物分析に主に用いられてきたが，本研究により環境分析や食品分析においても有用であることが示された．今後，これらの分野においても有用な検出法となることが期待される．

謝辞

本研究を行うにあたり，終始御指導頂いた神戸大学発達科学部　齊藤惠逸教授，丸谷宣子教授，矢野澄雄教授に厚く御礼申し上げます．また本論文の審査にあたり，貴重なる御助言を頂いた神戸大学発達科学部　田中洋一教授ならびに白杉直子助教授に深く感謝致します．さらに，本研究を遂行するにあたり共同研究者として終始御支援，御助言頂いた岡山理科大学理学部　山崎重雄教授，新名伸光博士に対し，また，御在職中ならびに御退官後も有益な御助言と激励を頂きました神戸大学　室松昭彦名誉教授に心から感謝いたします.

本研究を推進するにあたり，特に第 3 章，第 4 章は笹川科学研究助成よりご支援頂き，第 9 章においては神戸大学　工学部　岡田悦治助教授に元素分析を行って頂きました．更に本研究すべてを通して使用した電解化学発光検出器 COMET3000 をお貸し頂きました有限会社コメット　桜田郁雄氏に感謝申し上げます．また，研究のみならず様々な面で御支援，御助言頂きました産業技術総合研究所ヒューマンストレスシグナル研究センターストレス計測チーム　チーム長　脇田慎一博士，同職員で齊藤研究室修了生でもある宮道隆氏に深く感謝申し上げます.

最後に 5 年間の長きに渡り良い研究環境を提供してくださった発達科学部　上地眞一教授，江原靖人助教授ならびに両研究室の皆様，神戸大学発達科学部齊藤研究室，岡山理科大学山崎研究室の皆様に厚く御礼申し上げます.

付録A　電気化学セルの評価

この研究で用いた電解化学発光検出器 COMET3000 付属の電気化学セル（ECR）について評価を行なった．3 価 Ru 錯体の正確な生成量を見積もることは難しく，また電極（作用電極および参照電極）の状態も一定ではないため，常に同じ結果が得られるとは限らないが，実験を進める上での目安を得るため実験を行った．装置に Fig. 66 に示したものを用い，3 価 Ru 錯体に特異的な吸収波長 674 nm における吸光度を測定することにより，3 価 Ru 錯体の生成量を調べた．

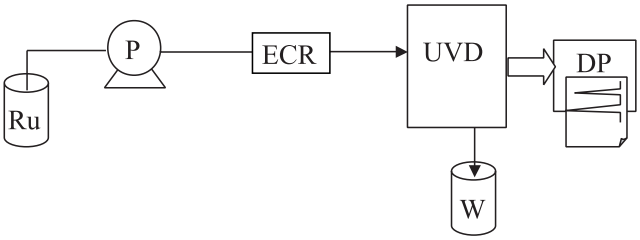

Fig. 66: 使用装置概略図. Ru, $Ru(bpy)_3^{2+}$ solution; W, waste; P, pump; UVD, UVdetector; ECR, electrochemical reactor; DP, data processor.

まず，電解電流値と 3 価 Ru 錯体生成量の関係を調べた．濃度の異なる 3 種類の 2 価 Ru 錯体溶液を 10 mM 硫酸を電解質として調整し，流量 0.3 ml/min で送液して一定時間ごとに電解電流を変化させた．結果を Fig. 67 に示す．電流値の上昇に比例して 3 価 Ru 錯体の生成量は増大するが，2 価 Ru 錯体濃度が 0.25 mM では 150 μA 以上で，0.5 mM では 200 μA 以上で，1 mM では 400 μA 以上で生成量はほぼ一定となる．したがって，各濃度これ以上の電流値を検討しても 3 価 Ru 錯体の量は増えず無意味である．

次にポンプの流量を変化させ Ru 錯体の生成量を調べた．（10 mM 硫酸で調整した 0.25 mM の Ru 錯体溶液を 80 μA で電解酸化する条件.）結果を Fig. 68 に示す．流量が小さくなるに従い 3 価 Ru 錯体の生成量は増えることが確認された．

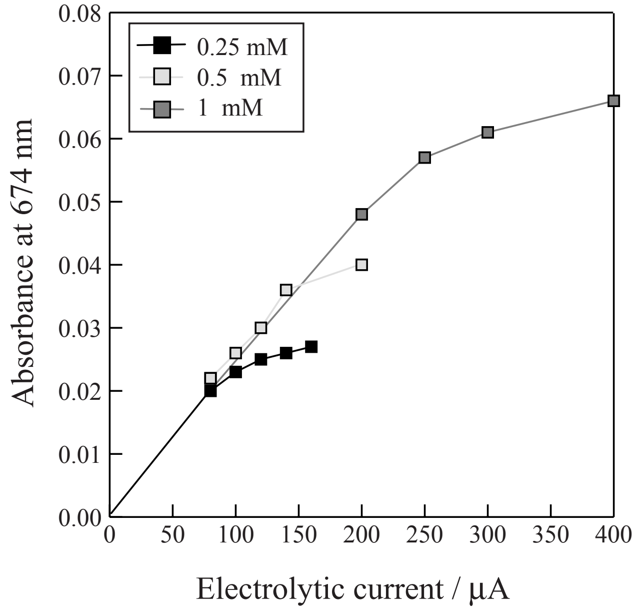

Fig. 67: 電解電流値と 3 価 Ru 錯体生成量の関係

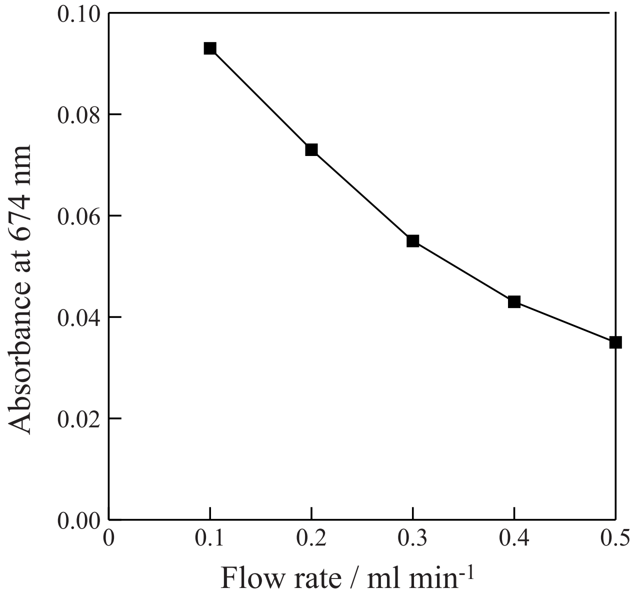

Fig. 68: 流量と 3 価 Ru 錯体生成量の関係

最後に硫酸濃度と 3 価 Ru 錯体の生成量について調べた．一般に Ru 錯体溶液の調整には電解質として，また生成した 3 価 Ru 錯体を安定に保つため硫酸水溶液が用いられる．しかしながら，Ru 錯体の発光反応は溶液 pH に大きく依存するため，過量な硫酸の使用は，発光反応時の pH 調整を困難にする．そこで硫酸量の検討を行った．0.25 mM Ru 錯体溶液，80 μA の電解電流，0.5 ml/min の流量を用いて硫酸量の最適条件を検討した．Fig. 69 に結果を示す．10 mM の硫酸濃度で 3 価 Ru 錯体の生成量はほぼ一定となることが確認された．しかし，硫酸濃度 10 mM でも発光反応時の pH 調節を行うのは困難で，高濃度の緩衝溶液を必要とする．

そこで硫酸の代わりの電解質として硫酸ナトリウムを用いた．硫酸ナトリウムのみでは，3 価 Ru 錯体の生成が非常に不安定であったため，硫酸の添加，電解電流を変化させるなど，10 mM 硫酸を電解質としたときと同じ生成量が得られる条件を求めた．結果を Fig. 70 に示す．0.25 mM の Ru 錯体溶液に 0.5 mM の過硫酸カリウムを加え蛍光灯による光照射で 3 価 Ru 錯体を生成させるバッチ法を 100 としたときの相対的な生成量で示している．1 mM 硫酸を含む 100 mM 硫酸ナトリウムを Ru 錯体調整水溶液としたとき，硫酸 10 mM と同様の結果が得られた．発光反応の最適 pH を検討するとき，この条件を用いることで効率よく 3 価 Ru 錯体を生成でき，発光反応時 pH の調整も比較的容易である．また，pH 7 付近リン酸緩衝液と硫酸ナトリウムの混合溶液では，安定的に 3 価 Ru 錯体が生成するが硫酸使用時より生成量は少ない.（同程度生成していても水酸化物イオンとの反応により減少しているのかもしれない.）

電解セルの状態が検出感度，再現性等に大きく影響するため電解電圧の監視は特に重要である．電解電圧の急激な変化は電解セルが安定していないことを示しており，特に電解セル内での気泡の発生は，ノイズ値を上昇させ検出感度を大きく低下させる．室温を出来る限り一定にし，電解セルの出口に内径 0.25 mm の PTFE チューブを 8 m ほど繋ぐことにより背圧（0.5 MPa）をかけると非常に安定的なベースラインが得られた.

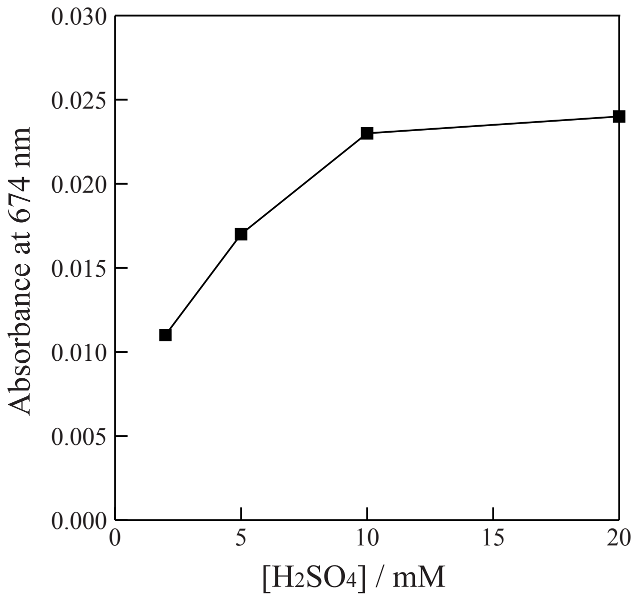

Fig. 69: 硫酸濃度と 3 価 Ru 錯体生成量の関係

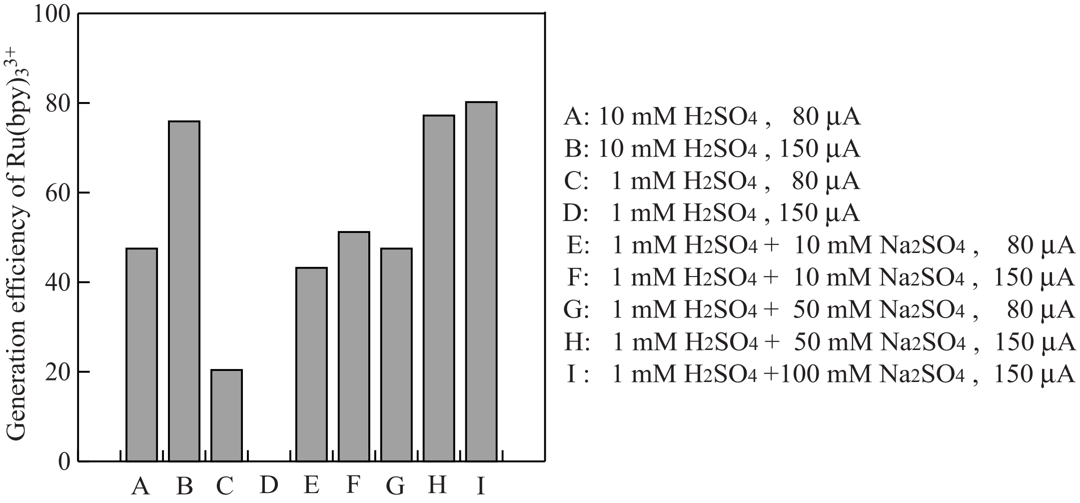

Fig. 70: 電解質・濃度・電解電流値と 3 価 Ru 錯体生成量の関係

参考文献

[1] David M. Hercules and Fred E. Lytle. Chemiluminesnece from reduction reactions. *Journal of American Chemical Society*, Vol. 88, pp. 4745–4746, 1966.

[2] Allen J. Bard. *Electrogenerated chemiluminescence*. Marcel Dekker, New York, 2004.

[3] James B. Noffsinger and Neil D. Danielson. Generation of chemiluminescence upon reaction of aliphatic amines with tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(Ⅲ). *Analytical Chemistry*, Vol. 59, pp. 865–868, 1987.

[4] Israel Rubinstein, Charles R. Martin, and Allen J. Bard. Electrogenerated chemiluminescent determination of oxalate. *Analytical Chemistry*, Vol. 55, pp. 1580–1582, 1983.

[5] Kazuo Uchikura and Makoto Kirisawa. Chemiluminescence of tryptophan with electrogenerated tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(Ⅲ). *Chemistry Letters*, pp. 1373–1376, 1991.

[6] Li He, Kathleen A. Cox, and Neil D. Danielson. Chemiluminescence detection of amino acids, peptides, and proteins using tris 2,2'-bipyridine ruthenium (Ⅲ). *Analytical Letters*, Vol. 23, No. 2, pp. 195–210, 1990.

[7] Stephen N. Brune and Donald R. Bobbitt. Role of electron-donating/withdrawing character, pH, and stoichiometry on the chemiluminescent reaction of tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(Ⅲ) with amino acids. *Analytical Chemistry*, Vol. 64, pp. 166–170, 1992.

[8] Kazuo Uchikura. Electochemiluminescence reaction by mixing tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(Ⅲ) with ketones. *Analytical Sciences*, Vol. 15, pp. 1049–1050, 1999.

[9] Richard D. Gerardi, Neil W. Barnett, and Simon W. Lewis. Analytical applications of tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(Ⅲ) as a chemiluminescent reagent. *Analytica Chimica Acta*, Vol. 378, pp. 1–41, 1999.

[10] Kärsten A. Fahnrich, Miloslav Pravda, and George G. Gulbault. Recent applications of electrogenetated chemiluminescence in chemical analysis. *talanta*, Vol. 54, pp. 531–559, 2001.

[11] Xue-Bo Yin, Shaojun Dong, and Erkang Wang. Analytical applications of the

electrochemiluminescence of tris(2,2'-bipyridine)ruthenium and its derivatives. *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 23, No. 6, pp. 432–441, 2004.

[12] Neil W. Barnett, Ben J. Hindson, Simon W. Lewis, Stuart D. Purcell, and Philip Jones. Preparation and preliminary evaluation of anhydrous tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(Ⅲ) perchlorate as a temporally stable reagent for analytical chemiluminescence. *Analytica Chimica Acta*, Vol. 421, pp. 1–6, 2001.

[13] Shigeo Yamazaki, Tomoki Shinozaki, and Takenori Tanimura. Detection of tertiary amines with chemiluminescent reaction using tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(Ⅲ) prepared by on-line photochemical oxidation. *Journal of High Resolution Chromatography*, Vol. 21, pp. 315–316, 1998.

[14] Xi Chen, Wei Chen, Yaqi Jang, Li Jia, and Xiaoru Wang. Electrogenerated chemiluminescence based on tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(Ⅱ) with hydroxyl carboxylic acid. *Microchemical Journal*, Vol. 59, pp. 427–436, 1998.

[15] Won-Yong Lee and Timothy A. Nieman. Evaluation of use of tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(Ⅲ) as a chemiluminescent reagent for quantitation in flowing streams. *Analytical Chemistry*, Vol. 67, pp. 1789–1796, 1995.

[16] R. A. Palmer and T. S. Piper. 2,2'-Bipyridine complexes.I. Polarizes crystal spectra of tris(2,2'-bipyridine)copper(Ⅱ), -nickel(Ⅱ), -cobalt(Ⅱ), -iron(Ⅱ), and -ruthenium(Ⅱ). *Inorganic Chemistry*, Vol. 5, No. 5, pp. 1954–1960, 1966.

[17] Andrew W. Knight and Gillian M. Greenway. Relationship between structural attributes and observed electrogenerated chemiluminescence (ECL) activity of tertiary amines as potential analytes for the tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(Ⅱ) ECL reaction -A Review-. *The Analyst*, Vol. 121, pp. 101R–106R, 1996.

[18] 山中宏, 日野亨, 中川昌子, 坂本尚夫. ヘテロ環化合物の化学. 株式会社　講談社, 1988.

[19] Rhoda D. Levin and Sharon G. Lias. *Ionization Potential and Appearance Potential Measurements, 1971-1981.* U.S. GOVERNMENT PRINTING OFFICE, 1982.

[20] C. R. Bock, J. A. Connor, A. R. Gutierrez, Thomas J. Meyer, D. G. Whitten, B. P. Sullivan, and J. K. Nagle. Extimation of excited-state redox potentials by electron-transfer quenching. application of electron-transfer theory to excited-state redox processes. *Journal of American Chemical Society*, Vol. 101, pp. 4815–4823, 1979.

[21] Gunnar Engelmann, Gerhard Kossmehl, Jürgen Heinze, Peter Tschuncky, Werner Jugelt, and Hans-Peter Welzel. Studies on β-methylated end-capped bithiophenes. *Journal of the Chemical Society. Perkin transactions 2*, pp. 169–175, 1998.

[22] Hirotoshi Morita and Masaharu Konishi. Electrogenerated chemiluminescence derivatization reagents for carboxylic acids and amines in high-performance liquid chromatography using tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(Ⅱ). *Analytical Chemistry*, Vol. 74, pp. 1584–1589, 2002.

[23] Jennifer S. Ridlen, Gary J. Klopf, and Timothy A. Nieman. Determination of glyphosate and related compounds using HPLC with tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(Ⅱ) electorogenerated chemiluminescence detection. *Analytical Chimica Acta*, Vol. 341, pp. 195–204, 1997.

[24] 江頭直義, 朴錦順, 一二三恵美, 宇田泰三. ルテニウムビピリジン錯体の電解発光に基づく小型セルの試作とペプチド測定への応用. 分析化学, Vol. 49, No. 12, pp. 1029–1031, 2000.

[25] Loranelle L. Shultz, Jennifer S. Stoyanoff, and Timothy A. Nieman. Temporal and spatial analysis of electrogenerated $Ru(bipy)_3{}^{3+}$ chemiluminescent reactions in flowing streams. *Analytical Chemistry*, Vol. 68, pp. 349–354, 1996.

[26] Jonathan K. Leland and Michael J. Powell. Electrogenerated chemiluminescence: An oxidative-reduction type ECL reaction sequence using tripropyl amine. *Journal of Electrochemical Socetiy*, Vol. 137, No. 10, pp. 3127–3131, 1990.

[27] Kazuhiko Tsukagoshi, Kazuhide Miyamoto, Riichiro Nakajima, and Naoki Ouchiyam. Sensitive determination of metal ions by liquid chromatography with tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(Ⅱ) complex electrogenerated chemiluminescence detection. *Journal of Chromatography A*, Vol. 919, pp. 331–337, 2001.

[28] Gillian M. Greenway, Andrew W. Knight, and Paul J. Knight. Electrogenerated chemiluminescent determination of codeine and related alkaloids and pharmaceuticals with tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(Ⅱ). *The Analyst*, Vol. 120, pp. 2549–2552, 1995.

[29] Hirotoshi Morita and Masaharu Konishi. Electrogenerated chemiluminescence derivatization reagent, 3-isobutyl-9,10-dimethoxy-1,3,4,6,7,11b-hexahydro-2H-pyrido[2,1-a]isoquinolin-2-ylamine, for carboxylic acid in high-performance liquid chromatography using tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(Ⅱ). *Analytical Chem-*

istry, Vol. 75, pp. 940–946, 2003.

[30] S. F. Osman, R. M. Zacharius, E. B. Kalan, T. J. Fitzpatrick, and S. Krulick. *Journal of Food Protection*, Vol. 42, p. 502, 1979.

[31] S. C. Morris and T. H. Lee. The toxicity and teratogenicity of solanaceae glycoalkaloids, particularly those of the potato (solanum tuberosum): a review. *Food Technology in Australia*, Vol. 36, No. 3, pp. 118–124, 1984.

[32] David R. Lawson, W. Alan Erb, and A. Raymond Miller. Analysis of solanum alkaloids using internal standardization and capillary gas chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 40, pp. 2186–2191, 1992.

[33] Breda Simonovska and Irena Vovk. High-performance thin-layer chromatographic determination of potato glycoalkaloids. *Journal of chromatography A*, Vol. 903, pp. 219–225, 2000.

[34] Everard J. Edwards and Andrew H. Cobb. Improved high-performance liquid chromatographic method for the analysis of potato (*Solanum tuberosum*) glycoalkaloids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 44, pp. 2705–2709, 1996.

[35] Koichi Saito, Masakazu Horie, Youji Hoshino, Norihide Nose, and Hiroyuki Nakazawa. High-performance liquid chromatographic determination of glycoalkaloids in potato products. *Journal of Chromatography*, Vol. 508, pp. 141–147, 1990.

[36] Y. I. Korpan, V. V. Volotovsky, C. Martelet, N. Jaffrezic-Renault, E. A. Nazarenko, A. V. El'skaya, and A. P. Soldatkin. A novel enzyme biosensor for steroidal glycoalkaloids detection based on pH-sensitive field effect transistors. *Bioelectrochemistry*, Vol. 55, pp. 9–11, 2002.

[37] F. Kvasnicka, K. R. Price, K. Ng, and G. R. Fenwick. Determination of potato glycoalkaloids using isotachophoresis and comparison with a HPLC method. *Journal of liquid chromatography*, Vol. 17, No. 9, pp. 1941–1951, 1994.

[38] V. Pichon and M. C. Hennion. Comparison of on-line enrichment based on ion-pair and cation-exchange liquid chromatography for the trace-level determination of 3-amino-1,2,4-triazole (aminotriazole) in water. *Analytica Chimica Acta*, Vol. 284, pp. 317–326, 1993.

[39] A. Pachinger, E. Eisner, H. Begutter, and H.Klus. A simple method for the determination of amitrole in drinking and ground water. *Fresenius' Journal of*

Analytical Chemistry, Vol. 342, pp. 413–415, 1992.

[40] I. Bernwieser and G. Sontag. HPLC with electrode array detection determination of amitrole in drinking and ground water. *Fresenius' Jornal of Analytical Chemistry*, Vol. 347, pp. 499–501, 1993.

[41] Alan W. Archer. Determination of 3-amino-1,2,4-triazole (amitorole) in urine by ion-pair high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, Vol. 303, pp. 267–271, 1984.

[42] I. Bobeldijk, K. Broess, P. Speksnijder, and T. van Leedam. Determination of the herbicide amitrole in water with pre-column derivatization, liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, Vol. 938, pp. 15–22, 2001.

[43] F. García Sánchez, A. Navas Díaz, A. García Pareja, and V. Bracho. Liquid chromatographic determination of asulam and amitrole with pre-column derivatization. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, Vol. 20, No. 4, pp. 603–615, 1997.

[44] Hans LΦkke. Determination of amitrole by ion-pair high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, Vol. 200, pp. 234–237, 1980.

[45] Ewen C. D. Todd. Domoic acid and amnesic shellfish poisoning - a review. *Journal of Food Protection*, Vol. 56, No. 1, pp. 69–83, 1993.

[46] 小瀧裕一. 記憶喪失性貝毒ドウモイ酸の分析. ぶんせき, Vol. 6, pp. 474–476, 1995.

[47] James F. Lawrence, Claudette F. Charbonneau, Cathie Ménard, Michael A. Quilliam, and P. Greig Sim. Liquid chromatographic determination of domoic acid in shellfish products using the paralytic shellfish poison extraction procedure of the association of official analytical chemists. *Journal of Chromatography*, Vol. 462, pp. 349–356, 1989.

[48] Michael A. Quilliam, Mie Xie, and William R. Hardstaff. Rapid extraction and cleanup for liquid chromatographic determination of domoic acid in unsalted seafood. *Jornal of AOAC International*, Vol. 78, No. 2, pp. 543–553, 1995.

[49] James F. Lawrence, Benjamin P.-Y. Lau, Chantal Cleroux, and David Lewis. Comparison of UV absorption and electorospray mass spectrometry for the high-performance liquid chromatographic determination of domoic acid in shellfish and biological samples. *Journal of Chromatography A*, Vol. 659, pp. 119–126, 1994.

[50] A. Furey, M. Lehane, M. Gillman, P. Fernandez-Puente, and K.J. James. Determination of domoic acid in shellfish by liquid chromatography with electrospray ionization and multiple tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, Vol. 938, pp. 167–174, 2001.

[51] Kewin J. James, Marion Gillman, Mary Lehane, and Ana Gago-Martinez. New fluorimetric method of liquid chromatography for the determination of the neurotoxin domoic acid in seafood and marine phytoplankton. *Journal of Chromatography A*, Vol. 871, pp. 1–6, 2000.

[52] Hirofumi Inoue, Yasuhiko Sakata, Keiko Fukunaga, Hiroaki Nishio, and Yasuto Tsuruta. Sensitive determination of pipecolic acid in serum by high-performance liquid chromatography using 4-(5,6-dimethoxy-2-phthalimidinyl)-2-methoxyphenylsulfonyl chroride as a fluorescent labelling reagent. *Analytical Chimica Acta*, Vol. 511, pp. 267–271, 2004.

[53] Michaël Moulin, Carole Deleu, François Robert Larher, and Alain Bouchereau. High-performance liquid chromatography determination of pipecolic acid after precolumn ninhydrin derivatization using domestic microwave. *Anaylical Biochemistry*, Vol. 308, pp. 320–370, 2002.

[54] Shulamit Levin and Eli Grushka. Reversed-phase liquid chromatographic separation of amino acids with aquious mobile phases containing copper ions and alkylsulfonates. *Analytical Chemistry*, Vol. 57, pp. 1830–1835, 1985.

[55] 内倉和雄, 桜田郁雄, 手塚高, 小池勝也. ルテニウム錯体電解化学発光検出/高速液体クロマトグラフィーによる血清中ヒドロキシプロリンとプロリンの分析. 分析化学, Vol. 51, No. 10, pp. 953–957, 2002.

[56] Kazuo Uchikura, Makoto Kirisawa, and Atsusi Sugii. Electrochemiluminescence detection of primary amines using tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(Ⅲ) after derivatization with divinylsulfone. *Analytical Sciences*, Vol. 9, pp. 121–123, 1993.

[57] Won-Youg Lee and Timothy A. Nieman. Determination of dansyl amino acids using tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(Ⅱ) chemiluminescence for post-column reaction detection in high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, Vol. 659, pp. 111–118, 1994.

[58] Kazuo Uchikura. Tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(Ⅲ) chemiluminescence detection of carbonyl compounds with methylmalonic acid. *Analytical Sciences*, Vol. 16, pp. 453–454, 2000.

[59] Kazuo Uchikura. $Ru(bpy)_3{}^{3+}$ electrochemiluminescence detection of aliphatic and aromatic amines with diketene. *Chemistry Letters*, Vol. 32, No. 1, pp. 98–99, 2003.

[60] Hirotoshi Morita and Masaharu Konishi. A new electrogenerated chemiluminescence derivatization reagent, 3-(diethylamino)propionic acid for alchol in HPLC using tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(Ⅱ). *Journal of liquid chromatography & related technologies*, Vol. 25, No. 16, pp. 2413–2423, 2002.

[61] 環境省. 内分泌攪乱化学物質問題への環境庁の対応方針について-環境ホルモン戦略計画 SPEED'98-. 1998.

[62] 環境省. 化学物質の内分泌かく乱作用に関する環境省の今後の対応方針について-ExTEND2005-. 2005.

[63] J. R. Ruhoff. *Organic syntheses II*, p. 292. 1943.

[64] Atsushi Wakamiya, Tohru Nishinaga, and Kouichi Komatsu. The stable radical cation of thiophene annelated with bicyclo[2.2.2]ocatene and its reaction with triplet oxygen to give a protonated cation on 2-butene-1,4-dione derivative. *Chemical communication*, pp. 1192–1193, 2002.

[65] 田尾博明. 光化学反応を利用する水環境汚染物質の分析法. 資源と環境, Vol. 9, No. 3, pp. 203–213, 2000.

[66] Kuriko Yokota, Keiitsu Saito, Shigeo Yamazaki, and Akihiko Muromatsu. New detection method of α-, β-, and γ -amino acids coupled with an on-line photochemical oxidation and tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(Ⅲ) chemiluminescence. *Analytical Letters*, Vol. 35, No. 1, pp. 185–194, 2002.

[67] Tomás Pérez-Ruiz, Carmen Martinez Lozano, Virginia Tomás, and Jesús Martin. Flow injection chemiluminescence determination of carbaryl using photolytic decomposition and photogenerated tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(Ⅲ). *Analytica chimica acta*, Vol. 476, pp. 141–148, 2003.

[68] Tomás Pérez-Ruiz, Carmen Martinez Lozano, Virginia Tomás, and Jesús Martin. Flow injection chemiluminescent determination of N-nitrosodimethylamine using photolytic decomposition and photogenerated tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(Ⅲ). *Analytical chimica acta*, 2004.

[69] Carl M. Selavka, Kai-Sheng Jiao, and Ira S. Krull. Construction and comparison of open tubular reactors for postcolumn reaction detection in liquid chromatography. *Analytical Chemistry*, Vol. 59, pp. 2221–2224, 1987.

[70] Kunihiko Yokoi, Maki Yalushiji, Mayumi Hatanaka, Koji Kubono, and Tsutomu Koide. Novel photolytic decomposition method of organic compounds with a high output low-pressure mercury lamp for voltammetric trace metal analysis. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 1999.

[71] B. Roig, C. Gonzalez, and O. Thomas. Monitoring of phenol photodegradation by ultraviolet spectroscopy. *Spectrochimica acta part A*, Vol. 59, pp. 303–307, 2003.

[72] Maria Isabel Franch, José Antonio Ayllón, José Peral, and Xavier Doménech. Photocatalytic degradation of short-chain organic diacids. *Catalysis Today*, Vol. 76, pp. 221–233, 2002.

研究業績

誌上発表

[投稿論文]

1. Hitoshi Kodamatani, Hisashi Shimizu, Keiitsu Saito, Shigeo Yamazaki, Youichi Tanaka, High-performance liquid chromatography of aromatic compounds with photochemical decomposition and tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(Ⅲ) chemiluminescence detection, *Journal of Chromatography A* 1102, 200-205, 2005.（第 10 章）

2. Hitoshi Kodamatani, Keiitsu Saito, Nobumitsu Niina, Shigeo Yamazaki, Youichi Tanaka, Simple and sensitive method for determination of glycoalkaloids in potato tubers by high-performance liquid chromatography with chemiluminescence detection, *Journal of Chromatography A*, 1100, 26-31, 2005.（第 5 章）

3. Nobumitsu Niina, Hitoshi Kodamatani, Kayoko Uozumi, Yuki Kokufu, Keiitsu Saito, Sigeo Yamazaki, Detection of monoethanolamine, diethanolamine, and triethanolamine by HPLC with chemilluminescence reaction and online derivatization to tertiary amine, *Analtical Sciences* 21, 497-500, 2005.

4. Hitoshi Kodamatani, Keiitsu Saito, Akihiko Muromatsu, Nobumitsu Niina, Shigeo Yamazaki, New chemiluminecscece detection method of aliphatic conjugated dienes with electrogenerated tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(Ⅲ), *Analytical Letters* 38, 291-301, 2005.（第 2 章）

5. Hitoshi Kodamatani, Keiitsu Saito, Nobumitsu Niina, Shigeo Yamazaki, Akihiko Muromatsu, Ikuo Sakurada, Sensitive determination of domoic acid using high performance liquid chromatography with electrogenerated tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(Ⅲ) chemiluescence detection, *Analytical Sciences* 20, 1065-1068, 2004.（第 7 章）

6. 新名伸光, 児玉谷　仁, 齊藤惠逸, 山崎重雄, トリス（2,2'-ビピリジル）ルテニウム錯イオンの化学発光を利用したチウラムとその類似物質の検出, **分析化学** 52, 763-767, 2003.

7. Hitoshi Kodamatani, Keiitsu Saito, Nobumitsu Niina, Shigeo Yamazaki, Determination of Amitrole with Chemiluminescence Reaction Using Electrogenerated Tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(Ⅲ), *Journal of Ion Exchange* 14, supplement, 229-232, 2003.（第 6 章）

[国際学会 Proceedings]

1. Hitoshi Kodamatani, Atsushi Ogino, Kuriko Yokota, Keiistu Saito, Akihiko Muromatsu, Keiichi Fukushi, Nobumitsu Niina, Shigeo Yamazaki, Generation of chemiluminescence upon reaction of photo-decomposed phenyltin(IV) compounds and electrogenerated tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(Ⅲ), The 13th International Symposium on Bioluminescence & Chemiluminescence, *Luminescence* 19, 154, 2004.

2. Nobumitsu Niina, Hitoshi Kodamatani, Keiitsu Saito, Shigeo Yamazaki, Isoluminol chemiluminescence detection of reducing sample using the ligand exchange effect, The 13th International Symposium on Bioluminescence & Chemiluminescence, *Luminescence* 19,166-167, 2004.

3. Nobumitu Niina, Hiroto Masunaga, Hitoshi Kodamatani, Shigeo Yamazaki, Keiitsu Saito, CL of ruthenium complex with active oxygen, International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, *Chromatography* 22, 188, 2001.

[その他]

1. Hitoshi Kodamatani, Keiitsu Saito, Shigeo Yamazaki, Determinatioin method of pipecolic acid by high-performance liquid chromatography with tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(Ⅲ) chemiluminescence detection, Abstracts of the 12th Chromatography Symposium, *Chromatography* 26, 83-84, 2005.

2. Kayo Taniguchi, Hitoshi Kodamatani, Keiitsu Saito, Shigeo Yamazaki, Derivatization reagent for phenols in high-performance liquid chromatography using tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(Ⅲ) chemiluminescence detection, Abstracts of the 15th Conference of The Society for Chromagoraphic Sciences, *Chromatography* 25, 83-84, 2004.

3. Nobumitsu Niina, Hitoshi Kodamatani, Hiroto Masunaga, Shigeo Yamazaki, Keiitsu Saito, Detection of Hydroperoxide by Chemiluminescence, Proceedings of the 8th Chromatography Symposium on Separation/Detection Sciences and Functional Genomics in the 21th Century, *Chromatography* 22, 17-18, 2001.

学会発表

[国際学会]

1. Hitoshi Kodamatani, Keiitsu Saito, Shigeo Yamazaki, Chemiluminescent Reaction of Tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(Ⅲ) with Heteroaromatic Compounds, PACIFICHEM 2005, (Honolulu, 2005/12).

2. Yuki Kokufu, Nobumitsu Niina, Mie Baba, Shintaro Kikuchi, Hitoshi Kodamatani, Keiitsu Saito, Shigeo Yamazaki, Detection of reductant using ligand release of cobalt complex and o-phthalaldehyde (OPA) fluorescence derivatization, PACIFICHEM 2005, (Honolulu, 2005/12).

3. Shintaro Kikuchi, Nobumitsu Niina, Yuki Kokufu, Hitoshi Kodamatani, Keiitsu Saito, Shigeo Yamazaki, Simultaneous detection of monoethanolamine, diethanolamine and triethanolamine by HPLC with a chemiluminescence reaction and on-line derivatization to tertiary amine, PACIFICHEM 2005, (Honolulu, 2005/12).

4. Nobumitsu Niina, Aoi Miyamoto, Hitoshi Kodamatani, Keiitsu Saito, Shigeo Yamazaki, Chemiluminescence of $[Ru(bpy)_3]^{3+}$ on Ion Exchanger, International Conference on Ion Exchange, (Kanazawa, 2003/8).

[国内学会]

1. 児玉谷 仁，齊藤惠逸，山崎重雄，ルテニウム錯体を用いたヘテロ芳香環化合物の化学発光検出 (2), 日本分析化学会第 54 年会 名古屋大学（2005 年 9 月）.

2. 太田奈奈美，児玉谷 仁，齊藤惠逸，山崎重雄，ルテニウム錯体化学発光法を利用したポリフェノール類の検出法の開発，日本分析化学会第 54 年会 名古屋大学（2005 年 9 月）.

3. 児玉谷 仁，齊藤惠逸，山崎重雄, Tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(Ⅲ) 錯体を用いた活性メチレン化合物の化学発光検出, 日本分析化学会 第 53 年会 千葉工業大学（2004 年 9 月）.

4. 國府裕樹，馬場美衣，齋藤悦式，新名伸光，山崎重雄，児玉谷 仁，齊藤惠逸，Co 錯体を利用したイソルミノール化学発光法による還元性物質の検出，日本分析化学会第 53 年会 千葉工業大学（2004 年 9 月）.

5. 齋藤悦式，國府裕樹，新名伸光，山崎重雄，児玉谷 仁，齊藤惠逸，1,1'-biisoquinoline を配位子とする Ru 錯体を用いた化学発光，日本分析化学会第 53 年会 千葉工業大学（2004 年 9 月）.

6. 吉川晴美，児玉谷 仁，齊藤惠逸，山崎重雄, Tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(Ⅲ) 錯体を用いたサリチル酸分析法の開発，日本分析化学会第 53 年会 千葉工業大学（2004 年 9 月）.

7. 児玉谷 仁，齊藤惠逸，新名伸光，山崎重雄，Tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(Ⅲ) 錯体を用いた Glycoalkaloids の高感度化学発光検出，第 65 回日本分析化学討論会　琉球大学（2004 年 5

月).

8. 吉川晴美，児玉谷 仁，齊藤惠逸，新名伸光，山崎重雄，Tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(Ⅲ) 錯体を用いたサリチル酸及びその類似体の化学発光検出，第 65 回日本分析化学討論会　琉球大学（2004 年 5 月）.
9. 谷口佳代，児玉谷 仁，齊藤惠逸，山崎重雄，Tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(Ⅲ) 錯体化学発光法を用いたアルキルフェノール及びビスフェノール類の HPLC 分析，第 65 回日本分析化学討論会　琉球大学（2004 年 5 月）.
10. 児玉谷 仁，齊藤惠逸，新名伸光，山崎重雄，ルテニウム錯体の化学発光反応を用いたヘテロ芳香環化合物の化学発光検出，日本分析化学会第 52 年会 宮城教育大学（2003 年 9 月）.
11. 中井庸司，新名伸光，齊藤悦式，山崎重雄，児玉谷 仁，齊藤惠逸，流路酸化-還元カラムを用いる窒素含有有機化合物の測定，日本分析化学会第 52 年会 宮城教育大学（2003 年 9 月）.
12. 新名伸光，中井庸司，齊藤悦式，山崎重雄，児玉谷 仁，齊藤惠逸，流路酸化法を利用したコリン，アセチルコリンの検出，日本分析化学会第 52 年会 宮城教育大学（2003 年 9 月）.
13. 児玉谷 仁，齊藤惠逸，山崎重雄，室松昭彦，記憶喪失性貝毒の化学発光検出，日本分析化学会第 51 年会 北海道大学（2002 年 9 月）.
14. 中井庸司，福原かおり，新名伸光，山崎重雄，児玉谷 仁，齊藤惠逸，化学発光検出用 Ru(Ⅲ) 錯体連続供給法，分析化学会第 51 年会　北海道大学（2002 年 9 月）.
15. 児玉谷 仁，齊藤惠逸，山崎重雄，室松昭彦，新名伸光，Tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(Ⅲ) 錯体を用いた二重結合をもつ化合物の検出法の開発，日本分析化学会第 50 年会　熊本大学（2001 年 9 月）.
16. 増長洋登，新名伸光，児玉谷 仁，山崎重雄，齊藤惠逸，流路反応を用いた含窒素化合物の化学発光検出法，日本分析化学会第 49 年会　岡山大学（2000 年 9 月）.

その他

[研究助成金]

1. 平成 16 年度笹川科学研究助成 研究テーマ「ルテニウム錯体とπ電子化合物による化学発光反応の解明と分析化学的応用」.

2. 近畿分析技術研究国際交流助成（2005 年度第 1 期）発表テーマ「Chemiluminescence Reaction of Tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(Ⅲ) with Heteroaromatic Comopunds」.