

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

<mark>(Degree)</mark> 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	ローンジェンジン・ロージョン・ロージン・ロージン・ロージン・ロージン・ロージン・ロージン・ロージン・ロージ	9
	2.1	亨	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	ロージョン・シード・ロード・ロード・ロード・ロード・ロード・ロード・ロード・ロード・ロード・ロ	21
	3.1	· 予	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		70
	0	6.2.1 試薬	70
		6.2.2 装置	. 0 70
		6.2.3 <b>実</b> 試料調整法	. 0 70
	6.3		. 0 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	D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	、	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	後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	、	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	フェン音	『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		╩┍┍┾┙			110
10	尤化·	子反心を	を用いたペンセン誘導体の検出法の開発		110
	10.1	· · · ·		•	118
	10.2	天缺 ·	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	•	119
		10.2.1	武衆 · · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	•	119
		10.2.2		•	119
		10.2.3		•	120
	10.9	10.2.4	カテキン類の分析法	•	120
	10.3	結果と		•	121
		10.3.1		•	121
		10.3.2	区心主成初の向走	•	121
		10.3.3		•	120
	10.4	10.3.4 まとめ		•	120
	10.4	よこの		•	191
11	結論				132
	謝辞				133
А	雷気	化学ヤル	レの評価		134
	-271				101
	参考	文献			138
	যোকা	娄结			116
	ップ	禾限			140

## 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\*<sup>†</sup>, Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>3+</sup>, 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).

<sup>\*&</sup>lt;sup>†</sup> 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.

 $\begin{aligned} &\operatorname{Ru}(\mathrm{bpy})_{3}^{2^{+}} \xrightarrow{-e^{-}} &\operatorname{Ru}(\mathrm{bpy})_{3}^{3^{+}} \\ &\operatorname{Ru}(\mathrm{bpy})_{3}^{3^{+}} + \operatorname{reductant} \longrightarrow &\operatorname{Ru}(\mathrm{bpy})_{3}^{2^{+}} + \operatorname{intermediate} \\ &\operatorname{Ru}(\mathrm{bpy})_{3}^{3^{+}} + \operatorname{intermediate} \longrightarrow &\operatorname{Ru}(\mathrm{bpy})_{3}^{2^{+}*} + \operatorname{product} \\ &\operatorname{Ru}(\mathrm{bpy})_{3}^{2^{+}*} \longrightarrow &\operatorname{Ru}(\mathrm{bpy})_{3}^{2^{+}} + \operatorname{h}\nu \text{ (610 nm)} \end{aligned}$ 

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 **3** [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

7

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.

a) 2-Pump HPLC system



b) 3-Pump HPLC system



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, -Terpinene,

-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, -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  $\mu$ L; 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, -Terpinene, -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 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  $\mu$ M. FIA conditions: carrier, water-methanol (3:7, v/v); Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> solution, 0.5 mM Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> in 10 mM sulfuric acid; carrier flow rate, 0.8 ml/min; Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> solution flow rate, 0.3 ml/min; ECR, 150  $\mu$ A; 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
$\alpha$ -Terpinene	83
$\alpha$ -Phellandren	42
Abietic acid	40
1,5-Hexadiene	0
1,4-Hexadiene	0
$\gamma$ -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( $_{max}$ )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<sub>3</sub>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 -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);  $\operatorname{Ru}(\operatorname{bpy})_3^{2+}$  solution, 0.25 mM  $\operatorname{Ru}(\operatorname{bpy})_3^{2+}$  in 10 mM sulfuric acid; eluent flow rate, 0.5 ml/min;  $\operatorname{Ru}(\operatorname{bpy})_3^{2+}$  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 ( $\blacksquare$ ), 2 nmol; 2,5dimethyl-2.4-hexadiene ( $\diamondsuit$ ), 0.2 nmol; sorbic alcohol ( $\square$ ), 2 nmol;  $\alpha$ -terpinene ( $\circ$ ), 2 nmol;  $\alpha$ -phellandrene ( $\bullet$ ), 2 nmol; abietic acid ( $\blacklozenge$ ), 2 nmol. FIA conditions: Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> solution, 0.5 mM Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> 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,  $\alpha$ -terpinene, 2 nmol; 5,  $\alpha$ -phellandren, 2 nmol; 6, abietic acid, 2 nmol; 7,  $\gamma$ -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()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. / $\text{pmol}^a$	R. S. D. / % <sup>b</sup>	$\varepsilon_{max}$ $(\lambda_{max})$
2,4-Hexadiene	1	1.4	$23000~(227~{\rm nm})$
2,5-Dimethyl-2,4-hexadiene	0.6	1.0	$23000 \ (241 \ nm)$
Sorbic alcohol	1	1.8	$23950 \ (228 \ nm)$
-Terpinene	2	1.2	$3600~(262~{\rm nm})$
-Phellandren	1	2.3	$2500~(263~{\rm nm})$
Abietic acid	6	6.1	- ( - )

<sup>*a*</sup>Detection limit (S/N = 3).

<sup>b</sup>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  $\mu$ M. Peak identification: 1, sorbic alcohol; 2, 2,4-hexadiene; 3, 2,5-dimethyl-2,4-hexadiene; 4,  $\alpha$ -terpinene; 5,  $\alpha$ -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 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 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<sup>2</sup> 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 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 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<sup>2</sup> 混成軌道の5つの炭素原子と一つの窒素原子により6 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 電子密度が小さくなる.したがって 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, 電子が発光反応に関与し, さらに 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 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 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  $\pi$ -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)<sub>3</sub>]Cl<sub>2</sub>・6H<sub>2</sub>O 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 (  $20 \ \mu L$ ; 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<sup>2</sup>)
- 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<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 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10mLメスフラスコにアセトニトリルで調整した1mMのDMTを1mL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, 2,3,4,5mL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 $\mu$ M)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  $\mu$ M 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  $\mu$ L 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  $\mu$ M)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. 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, 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 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</p> 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 電子によるものであり, 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

26

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  $\mu$ M. FIA conditions: carrier, water-acetonitrile (3:7, v/v); Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> solution, 0.5 mM Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> 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)<sub>3</sub><sup>2+</sup> 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	

<sup>*a*</sup>The first ionization potential as measured by photoelectron spectroscopy or electron impact<sup>*b*</sup> 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 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 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 -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.

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
$\beta$ -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

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

#### 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とこ



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)<sub>3</sub><sup>2+</sup>; (b) 1 mM Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> + 2 mM DMT. (B) (c) 1 mM Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>; (d) 1 mM Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> + 2 mM DMT. All samples were prepared with 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>3</sub>–Acetonitrile (1:1, v/v), pH 5.0.

Table 5: Chemluminescence intensity of thiophene derivatives and related compounds. Sample: 10  $\mu$ M. FIA conditions: carrier, water–acetonitrile (3:7, v/v); Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> solution, 0.5 mM Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> in 10 mM sulfuric acid; carrier flow rate, 0.8 ml/min; Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> solution flow rate, 0.3 ml/min; PMT biased at -500 V; ECR, 50  $\mu$ A; effluent pH value, 2.2.

Compound	CL intensity / mV	I. P. / $\mathrm{eV}^a$	Epa / $\mathbf{V}^b$
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	-
$\operatorname{Ru}(\operatorname{bpy})_3{}^{2+}$	-	-	1.21

<sup>*a*</sup>The first ionization potential as measured by photoelectron spectroscopy or electron impact<sup>c</sup> 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-5thiophenecarboxaldhyde (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.

33



Fig. 12: (A) Chromatograms obtained with HPLC–UV detection. Sample: (a) The mixed solution of 100  $\mu$ M Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> and 50  $\mu$ M MTA; (b) The mixed solution of 100  $\mu$ M Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>3+</sup> and 100  $\mu$ M DMT. (B) The relationship between decreased DMT ( $\Box$ ) and generated MTA ( $\blacksquare$ ).


Fig. 13: Stoichiometric study of the reaction of DMT with  $\operatorname{Ru}(\operatorname{bpy})_3^{3+}$ . Sample: DMT( $\blacksquare$ ); oxalic acid( $\Box$ ). FIA conditions: carrier, water–acetonitrile (1:1, v/v);  $\operatorname{Ru}(\operatorname{bpy})_3^{2+}$  solution, 0.5 mM  $\operatorname{Ru}(\operatorname{bpy})_3^{2+}$  in 10 mM sulfuric acid; carrier flow rate, 0.5 ml/min;  $\operatorname{Ru}(\operatorname{bpy})_3^{2+}$  solution flow rate, 0.3 ml/min; ECR, 50  $\mu$ A; 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 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 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 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  $\operatorname{Ru}(\operatorname{bpy})_3^{3+}$  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  $\operatorname{Ru}(\operatorname{bpy})_3^{3+}$  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 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 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]. Glv-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 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 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<sub>2</sub>O (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)<sub>3</sub>]Cl<sub>2</sub>・6H<sub>2</sub>O 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1Lにメスアップして調整した ものを用い,2M 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  $\mu$ L; 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1mM 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  $\mu$ L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  $\mu$ L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  $\mu$ Lに 30 mM リン酸水溶液を 800  $\mu$ L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  $\mu$ L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,,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 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 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 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.

43



Fig. 16: The relationship between chemiluminescence intensity and position of carboxylic group. Sample: 10  $\mu$ M. FIA conditions: carrier, water–acetonitrile (1:1, v/v); Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> solution, 0.5 mM Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> 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)<sub>3</sub><sup>2+</sup> solution flow rate, 0.3 ml/min; buffer flow rate, 0.1 ml/min; ECR, 50  $\mu$ A; PMT biased at -400 V.

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

Table 6: Relative luminescence intensity of all samples. Sample: 10  $\mu{\rm M}.$  FIA conditions are same as in Fig. 16.

#### 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 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\*<sup>‡</sup>.

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.

<sup>\*&</sup>lt;sup>‡</sup> 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 ( $\diamond$ ); nipecotic acid ( $\blacklozenge$ ); isonipecotic acid ( $\Box$ ); piperidine ( $\blacksquare$ ). FIA conditions: carrier, 50 % acetonitrile–0.4 M BR buffer (5:1, v/v; pH 8.3); Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> solution, 0.5 mM Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> in 100 mM sodium sulfate containing 1 mM sulfuric acid; carrier flow rate, 0.6 ml/min; Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> solution flow rate, 0.3 ml/min; ECR, 50  $\mu$ A; PMT biased at -350 V.



Fig. 18: Effect of the pH on the chemiluminescence intensity for piperidine derivatives. Sample: 1  $\mu$ M, pipecolic acid ( $\diamond$ ); 1  $\mu$ M, nipecotic acid ( $\blacklozenge$ ); 1  $\mu$ M, sonipecotic acid ( $\Box$ ); 1  $\mu$ M, piperidine ( $\blacksquare$ ). 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, 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 位にメチル基を持つ N-Methylalanine,N, -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  $\mu$ M, N-methylisopropylamine ( $\diamond$ ); 1  $\mu$ M, N-methylalanine ( $\circ$ ); 1  $\mu$ M, N, -dimethylamine ( $\Box$ ); 1  $\mu$ M, N-methylglycine ( $\bullet$ ); 1  $\mu$ M, N-methylbenzylamine ( $\blacksquare$ ); 1  $\mu$ M, methylaminoacetonitrile ( $\blacklozenge$ ). 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  $\mu$ M, TPA ( $\blacksquare$ ); 1  $\mu$ M, N,N'-dipropyl-Lalanine ( $\Box$ ); 1  $\mu$ M, N,N'-dimethyl-1-phenethylamine ( $\Diamond$ ). 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 または 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 pH1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 -Solanine, -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 炭素にカルボキシル基を 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.

52

#### 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 / $\mu {\rm M}$	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);  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  solution, 0.5 mM  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  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;  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  solution flow rate, 0.3 ml/min; buffer flow rate, 0.1 ml/min; ECR, 150  $\mu$ A; 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.

Compound	Found / $\mu M^a$	Recovery / $\%^b$
Hydoxyproline	$3.65\pm0.14$	$94.2 \pm 3.7^{c}$
Sarcosine	$0.60\pm0.01$	$112.6\pm2.5^d$
N-Methylalanine	-	_ d
Proline	$95.10\pm3.29$	$110.7 \pm 4.0^{e}$
Pipecolic acid	$0.33\pm0.05$	$92.0 \pm 5.4^{d}$

Table 8: Contents of imino acids in human serum.

 $^a \rm Values$  are means for four determination  $\pm$  standard deviation.  $^b \rm Values$  are means for four operation  $\pm$  standard deviation.  $^c \rm Added~5~\mu M.$   $^d \rm Added~2~\mu M.$ 

 $^e\mathrm{Added}$  50  $\mu\mathrm{M}.$ 

## 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<sup>-</sup>)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 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,<sup>1</sup>H NMR によ り 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 -Solanine と -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, -Solanine, -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.

-Solanine, -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  $\alpha$ -solanine and  $\alpha$ -chaconine. The suger group for  $\alpha$ -solanine consists of  $R_1 = \beta$ -D-galactose,  $R_2 = \beta$ -D-glucose and  $R_3 = \alpha$ -L-rhamnose, and  $R_1 = \beta$ -D-glucose and  $R_2 = R_3 = \alpha$ -L-rhamnose for  $\alpha$ -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. -Solanine(95% From Potato sprouts,Sigma), -Chaconine(95% From Potato sprouts,Sigma)は,精製せ ずそのまま用いた. -Solanine, -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)<sub>3</sub>]Cl<sub>2</sub>・6H<sub>2</sub>O 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 (  $20 \ \mu L$ ; 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 -Solanine, -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
 -Solanine, -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 -Solanine, -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. -Solanine, -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,  $\alpha$ -solanine ( $\blacklozenge$ ); 100 ng/ml,  $\alpha$ -chaconine( $\triangle$ ). FIA conditions: carrier, water–acetonitrile (6:4, v/v); Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> solution, 0.5 mM Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> 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)<sub>3</sub><sup>2+</sup> 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  $\alpha$ -solanine. FIA conditions: carrier, 20 mM phosphate buffer (pH 6.0)–acetonitrile (65:35, v/v); Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> solution, 0.5 mM Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> in a 100 mM sodium sulfate containing 1 mM sulfuric acid; Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> solution flow rate, 0.3 ml/min.

#### 5.3.2 分離条件の検討と検出感度

-Solanine, -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 / $\mu g m l^{-1}$	$r^2$	D. L./ ng ml <sup><math>-1a</math></sup>	R. S. D. / $\%^b$
$\alpha$ -Solanine	0.005 - 10	0.9999	1.2	2.6
$\alpha$ -Chaconine	0.005 - 10	0.9999	1.3	2.4

<sup>*a*</sup>Detection limit (S/N = 3).

<sup>b</sup>Six determinations at 10 ng/ml.



Fig. 27: Chromatogram obtained with HPLC–CL detection for a standard  $\alpha$ -solanine and  $\alpha$ -chaconine solution. Peak identification: 1,  $\alpha$ -solanine; 2,  $\alpha$ -chaconine. Sample: 1  $\mu$ g/ml  $\alpha$ -solanine and  $\alpha$ -chaconine. HPLC conditions: eluent, 20 mM phosphate buffer (pH 7.8)–acetonitrile (65:35, v/v); Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> solution, 0.5 mM Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> in 10 mM sulfuric acid; eluent flow rate, 0.6 ml/min; Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> solution flow rate, 0.3 ml/min.

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

Method	D. L.	Linear range	Reference
GC-FID	$3 \mathrm{ng}$	-	[32]
HPTLC-FL	10 ng	-	[33]
Enzyme biosensor	$0.5 \ \mu M$	$0.5-100~\mu{ m M}$	[36]
HPLC-UV	-	$1.0-50.0~\mu\mathrm{g/ml}$	[35]
Capillary ITP	-	$0.5-100~\mu{ m M}$	[37]
Present method	1.2  ng/ml (1.4  nM, 24  pg)	$0.005-10~\mu\mathrm{g/ml}$	

#### 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 -Solanine, -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 -Solanine, -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

 ・Solanine, -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,  $\alpha$ -solanine; 2,  $\alpha$ -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 -Solanine, -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  $\alpha$ -solanine and  $\alpha$ -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  $\alpha$ -solanine and  $\alpha$ -chaconine in potato. HPLC conditions are same as in Fig. 27.

Sample	$Content^a$	(mg / 100g)	
	$\alpha$ -Solanine	$\alpha$ -Chaconine	Total $PGAs^b$
Tuber A peel	$21.8\pm0.1$	$48.4\pm0.5$	$70.1\pm0.6$
Tuber A pith	$0.30\pm0.01$	$0.45\pm0.01$	$0.75\pm0.01$
Tuber B peel	$254\pm1$	$220\pm2$	$473\pm3$
Tuber B pith	$3.21\pm0.08$	$4.97\pm0.15$	$8.19\pm0.20$

<sup>*a*</sup>Values are means for four determination  $\pm$  standard deviation. <sup>*b*</sup>Total PGAs =  $\alpha$ -solanine +  $\alpha$ -chaconine.

## 5.4 まとめ

Ru 錯体による -Solanine, -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)<sub>3</sub>]Cl<sub>2</sub>・6H<sub>2</sub>O 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 (  $100 \ \mu L$ ; 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  $\mu m$ のメンプランフィルターでろ過後 , 100  $\mu L$  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);  $\operatorname{Ru}(\operatorname{bpy})_3^{2+}$  solution, 0.5 mM  $\operatorname{Ru}(\operatorname{bpy})_3^{2+}$  in 100 mM sodium sulfate containing 1 mM sulfuric acid; buffer solution, 100 mM phosphate buffer ( $\blacksquare$ ) or 100 mM borate buffer ( $\bullet$ ), carrier flow rate, 0.5 ml/min;  $\operatorname{Ru}(\operatorname{bpy})_3^{2+}$  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,5mM オクタンスルホン酸を含む5mM 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);  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  solution, 0.5 mM  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  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;  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  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  $\mu$ g/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.

80



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)<sub>3</sub>]Cl<sub>2</sub>・6H<sub>2</sub>O を1mM 硫酸を含む100mM 硫酸ナトリウム溶液,または,50mM 硫酸ナトリウムを含 む50mM リン酸緩衝液(pH 6.8)に溶かし,0.5mM 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 (  $20 \ \mu L$ ; 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.4g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  $\mu$ g/ml DA. HPLC conditions: eluent, 5 mM phoshate buffer (pH2.7)–acetonitrile (9:1, v/v); Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> solution, 0.25 mM Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> 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)<sub>3</sub><sup>2+</sup> solution flow rate, 0.3 ml/min; buffer solution flow rate, 0.1 ml/min; ECR, 80  $\mu$ A; 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 / $\mu g m l^{-1}$	$r^2$	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 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  $\mu$ g/g)の1/10である2 $\mu$ g/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 $\mu$ g/g)となった.



Fig. 41: Chromatograms obtained with HPLC–CL detection for a) a mussel sample spiked with 2  $\mu$ g/g of DA and b) blank, and with HPLC–UV detection for c) a mussel sample spiked with 2  $\mu$ g/g of DA and d) blank. HPLC conditions: eluent, 5 mM phoshate buffer (pH 2.7)–acetonitrile (9:1, v/v); Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> solution, 0.25 mM Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> in 50 mM sodium sulfate containing 50 mM phoshate buffer (pH 6.9); eluent flow rate, 0.5 ml/min; Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> 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, 第一アミン類をプロックした後,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10mM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)<sub>3</sub>]Cl<sub>2</sub>・6H<sub>2</sub>O を1mM 硫酸を含む100mM 硫酸ナトリウム溶液に溶かし,0.5mM 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 27.1mLのリン酸(85%),22.8mLの 氷酢酸(99.7%),24.7gのホウ酸(99.5%)を超純水で1Lにメスアップして調整し, 2M 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 (  $20 \ \mu L$ ; 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  $\mu$ M PA. FIA conditions: carrier, water; Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> solution, 0.5 mM Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> 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)<sub>3</sub><sup>2+</sup> solution flow rate, 0.3 ml/min; buffer flow rate, 0.1 ml/min; ECR, 50  $\mu$ A; 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  $\mu$ A を採用した.



Fig. 44: Effect of the carrier flow rate on the chemiluminescence intensity for PA obtained with FIA. Sample: 1  $\mu$ M PA. FIA conditions: carrier, 20 mM BR buffer (pH 8.6); Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> solution, 0.5 mM Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> in 100 mM sodium sulfate containing 1 mM sulfuric acid; Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> solution flow rate, 0.3 ml/min; ECR, 50  $\mu$ A; 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除イオン 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;  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  solution, 0.5 mM  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  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;  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  solution flow rate, 0.3 ml/min; buffer flow rate, 0.1 ml/min; ECR, 50  $\mu$ A; PMT biased at -450 V.

Compound	Concentration / $\mu M$	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  $\mu$ M PA; 2, 1 mM CuSO<sub>4</sub>; 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  $\mu$ M, PA ( $\blacksquare$ ); 1  $\mu$ M, proline ( $\Box$ ). Separation factor ( $\Diamond$ ) = (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)<sub>3</sub><sup>2+</sup> solution, 0.5 mM Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> 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)<sub>3</sub><sup>2+</sup> solution flow rate, 0.3 ml/min; buffer flow rate, 0.1 ml/min; ECR, 50  $\mu$ A; 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 $5 \text{ nM} - 20 \ \mu\text{M}$ 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  $\mu$ M. Peak identification: 1, proline; 2, PA. HPLC conditions: eluent, 15 mM sodium octanesulfonate in 20 mM acetic acid (pH 3.5); Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> solution, 0.5 mM Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> 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)<sub>3</sub><sup>2+</sup> solution flow rate, 0.3 ml/min; buffer flow rate, 0.1 ml/min; ECR, 50  $\mu$ A; 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.

Sample	Found / $\mu M^a$	R. S. D / %	Recovery / $\%^b$
Human serum	$0.62\pm0.02$	2.5	-
Apple juice	$3.3\pm0.1$	1.8	$99.2\pm3.8^c$
Cow's milk	$1.8\pm0.1$	2.8	$109.7\pm3.4^c$
Beer 1	$28.6\pm0.5$	1.6	-
Beer 2	$62.8\pm2.2$	3.4	$97.7\pm6.8^d$

Table 14: Contents of PA in various samples.

<sup>*a*</sup>Values are means for six determination  $\pm$  standard deviation.

 $^b \textsc{Values}$  are means for four operation  $\pm$  standard deviation.

 $^c\mathrm{Added}$  2  $\mu\mathrm{M}.$ 

<sup>*d*</sup>Added 30  $\mu$ M.

# 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  $\mu$ L 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 (  $20 \ \mu L$ ,  $500 \ \mu L$ , RHEODYNE )
- CL Detector: Comet3000 (PMT biased at -500 V, 有限会社コメット)
- Data processer: 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.<sup>1</sup>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.<sup>1</sup>H NMR (使用溶媒 CDCl<sub>3</sub>,基準物質 TMS) 2.03 (3H, S, -CH<sub>3</sub>),
2.28 (3H, S, -CH<sub>3</sub>), 2.33 (3H, S, -CH<sub>3</sub>), 3.49 (2H, S, -CH<sub>2</sub>-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.<sup>1</sup>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. <sup>1</sup>H NMR (使用溶媒 CDCl<sub>3</sub>,基準物質 TMS) 0.86 - 0.89 (3H, t, J = 6.8Hz, -CH<sub>3</sub>), 1.28 - 1.55 (14H, m), 2.11 (3H, S, -CH<sub>3</sub>), 2.30 (3H, S, -CH<sub>3</sub>), 2.24 (3H, S, -CH<sub>3</sub>), 2.55 - 2.59 (2H, t, J = 8.0 Hz, Phenyl-CH<sub>2</sub>), 3.68 (2H, S, Phenyl-CH<sub>2</sub>-CO-), 6.94 - 6.96 (2H, d, J = 8.0 Hz, Phenyl-H),

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  $\mu$ L の 100  $\mu$ M OP に TTA, DMAP,DCC をそれぞれ 50  $\mu$ L 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  $\mu$ M を加えた.(誘導体化操作後の OP 濃度は約 10  $\mu$ M とな る.)誘導体化試薬と 10  $\mu$ M 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  $\mu$ L 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  $\mu$ Lの試料に 300 mM DMAP を 20  $\mu$ L, 50 mM TTA, 50 mM WSC をそれぞれ 10  $\mu$ L 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  $\mu$ L 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  $\mu$ L 加える手順を採用した.得られた試料溶液 500  $\mu$ L 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)<sub>3</sub><sup>2+</sup> solution, 0.5 mM Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> in 10 mM sulfuric acid; eluent flow rate, 0.8 ml/min; Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> solution flow rate, 0.3 ml/min; ECR, 50  $\mu$ A.

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  $\mu$ A 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チュープであるため溶存酸 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  $\mu$ M, TTA ( $\blacksquare$ ); 1  $\mu$ M, TTA-OP ( $\Box$ ); 100  $\mu$ M, DMAP ( $\bullet$ ). FIA conditions: carrier, water-acetonitrile (4:6, v/v); Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> solution, 0.5 mM Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> in 10 mM sulfuric acid; Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> solution flow rate, 0.3 ml/min.



Fig. 54: Chromatograms of APs and BPA obtained with (A) 20  $\mu L$  methanol addition and (B) 20  $\mu L$  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)<sub>3</sub><sup>2+</sup> solution, 0.5 mM Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> in 10 mM sulfuric acid; eluent flow rate, 1.6 ml/min; Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> solution flow rate, 0.3 ml/min; ECR, 1  $\mu$ A. 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

<sup>a</sup>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)<sub>3</sub><sup>2+</sup> solution, 0.5 mM Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> in 10 mM sulfuric acid; eluent flow rate, 1.6 ml/min; Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> solution flow rate, 0.3 ml/min; ECR, 1  $\mu$ A. 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)<sub>3</sub>]Cl<sub>2</sub>・6H<sub>2</sub>Oを10mM 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 (  $20 \ \mu L$ ; 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  $\times$  4.6 mm I.D. (Merck )
- Photochemical Reactor: 自作(次項参照)

光化学反応器は,プラスチック製のブラックボックスと20W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20m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  $\mu$ M. 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)<sub>3</sub><sup>2+</sup> solution, 0.5 mM Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> in 10 mM sulfuric acid; carrier flow rate, 0.5 ml/min; Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> 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  $\mu$ M, TPT; (e) 0.1  $\mu$ M, 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)<sub>3</sub><sup>2+</sup> solution, 0.5 mM Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> in 10 mM sulfuric acid; eluent flow rate, 0.5 ml/min; Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> 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/min 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  $\mu$ M oxalic acid; FIA conditions: carrier, water-actonitrile (1:1, v/v); Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>solution, 0.5 mM Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> in 10 mM sulfuric acid; carrier flow rate, 0.5 ml/min; Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> 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  $\mu$ M, benzene ( $\blacksquare$ ); 10  $\mu$ M, toluene ( $\diamondsuit$ ); 10  $\mu$ M, phenol ( $\bullet$ ); 10  $\mu$ M, aniline ( $\Box$ ); 10  $\mu$ M, nitrobenzene ( $\blacklozenge$ ); 10  $\mu$ M, benzoic acid ( $\circ$ ). FIA conditions: carrier, 20 mM phosphoric acid-methanol (4:6, v/v); Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> solution, 0.5 mM Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> in 10 mM sulfuric acid; carrier flow rate, 0.5 ml/min; Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> 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  $\mu$ M, phenol (•); 10  $\mu$ M, catechol (•); 10  $\mu$ M, hydroquinon ( $\diamond$ ); 10  $\mu$ M, pyrogallol ( $\Box$ ); 10  $\mu$ M, (-)epicatechin ( $\circ$ ); 10  $\mu$ M, (-)-epigallocatechin gallate ( $\blacksquare$ ). FIA conditions are same as in Fig. 62.

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);  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  solution, 0.5 mM  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  in 10 mM sulfuric acid; eluent flow rate, 0.5 ml/min;  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  solution flow rate, 0.3 ml/min.

Compound	Linear range / $\mu {\rm M}$	$r^2$	D. L. / pmol	R. S. D./ $\%^a$
EGCg	0.1 - 50	0.9999	0.8	2.8
$\mathbf{EC}$	0.1 - 50	0.9997	1.2	3.3

<sup>*a*</sup>Six determination at 1  $\mu$ M.

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  $\mu$ M 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 / $\mu {\rm M}$	EC / $\mu {\rm M}$
Green tea 1	$142 \pm 3$	$75\pm5$
Green te a $2$	$299\pm2$	$119\pm3$
Oolong tea	$74 \pm 3$	$30 \pm 4$

Values are mean for four determiantion  $\pm$  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 conditions 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,へ 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10mM 硫酸を電解質として調整し,流量 0.3ml/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 0.25mM では 150 $\mu$ A 以上で,0.5mM では 200 $\mu$ A 以上で,1mM では 400 $\mu$ A 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.

136



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

- 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 excitedstate 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)<sub>3</sub><sup>3+</sup> 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 ionpair 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 highperformance 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 highperformance liquid chromatography using 4-(5,6-dimethoxy-2-phthalimidinyl)-2methoxyphenylsulfonyl 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)<sub>3</sub><sup>3+</sup> 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]

- <u>Hitoshi Kodamatani</u>, 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)
- <u>Hitoshi Kodamatani</u>, 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)
- Nobumitsu Niina, <u>Hitoshi Kodamatani</u>, 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.
- <u>Hitoshi Kodamatani</u>, 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. <u>Hitoshi Kodamatani</u>, 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, <u>児玉谷 仁</u>, 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. <u>Hitoshi Kodamatani</u>, 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]

- <u>Hitoshi Kodamatani</u>, 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.
- Nobumitsu Niina, <u>Hitoshi Kodamatani</u>, Keiitsu Saito, Shigeo Yamazaki, Isoluminol chemiluminescence detection of reducing sample using the ligand exchange effect, The 13th International Symposium on Bioluminescence & Chemiluminescence, *Lumines*cence 19,166-167, 2004.
- Nobumitu Niina, Hiroto Masunaga, <u>Hitoshi Kodamatani</u>, 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]

- <u>Hitoshi Kodamatani</u>, 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.
- Kayo Taniguchi, <u>Hitoshi Kodamatani</u>, 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.
- Nobumitsu Niina, <u>Hitoshi Kodamatani</u>, 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.

[国際学会]

- <u>Hitoshi Kodamatani</u>, Keiitsu Saito, Shigeo Yamazaki, Chemiluminescent Reaction of Tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(Ⅲ) with Heteroaromatic Compounds, PACIFICHEM 2005, (Honolulu, 2005/12).
- Yuki Kokufu, Nobumitsu Niina, Mie Baba, Shintaro Kikuchi, <u>Hitoshi Kodamatani</u>, Keiitsu Saito, Shigeo Yamazaki, Detection of reductant using ligand release of cobalt complex and o-phthalaldehyde (OPA) fluorescence derivatization, PACIFICHEM 2005, (Honolulu, 2005/12).
- Shintaro Kikuchi, Nobumitsu Niina, Yuki Kokufu, <u>Hitoshi Kodamatani</u>, 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).
- Nobumitsu Niina, Aoi Miyamoto, <u>Hitoshi Kodamatani</u>, Keiitsu Saito, Shigeo Yamazaki, Chemiluminescence of [Ru(bpy)<sub>3</sub>]<sup>3+</sup> on Ion Exchanger, International Conference on Ion Exchange, (Kanazawa, 2003/8).

#### [国内学会]

- <u>児玉谷 仁</u>, 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, <u>児玉谷 仁</u>, 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. <u>児玉谷 仁</u>, 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,<u>児玉谷 仁</u>,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,<u>児玉谷 仁</u>,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,<u>児玉谷 仁</u>, 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. <u>児玉谷 仁</u>, 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,<u>児玉谷 仁</u>, 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,<u>児玉谷 仁</u>, 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. <u>児玉谷 仁</u>, 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,<u>児玉谷 仁</u>,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,<u>児玉谷 仁</u>, 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. <u>児玉谷 仁</u>, 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,<u>児玉谷 仁</u>,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. <u>児玉谷 仁</u>, 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,<u>児玉谷 仁</u>,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 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<sup>「</sup>Chemiluminescence Reaction of Tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(Ⅲ) with Heteroaromatic Comopunds」.