

—平成14年度 岐阜薬科大学特別研究費（一般）—

## 増幅電流検出を用いる環境ホルモンのオンサイト分離 分析システムの開発

宇野 文二

### 1. 緒言

内分泌攪乱物質として注目される 4-nonylphenol や 4-*tert*-octylphenol などのアルキルフェノール類の環境分析と、そのホルモン様作用の評価のための生体試料分析のニーズから、極めて高感度かつ簡便なアルキルフェノール類の分離定量法が要請されている。現在、卓越した感度を有する GC-MS 法が広く用いられている<sup>1</sup>。しかし、オンサイト分析に適するセンサー開発の点から、より簡便な測定法が強く求められ、電気化学検出法を用いた HPLC 法が提案されてきた<sup>2</sup>。しかし、感度の点で GC-MS 法に劣っている。本研究では、アルキルフェノール類の検出電流の大幅の増幅法の開発、およびこの検出法を利用したアルキルフェノール類のオンサイト簡易分離分析システムの提案とその基礎的検討を行った。

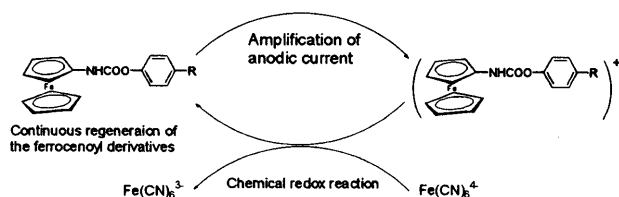
### 2. 実験

イリノイ環境保護局によって内分泌攪乱性としてリストアップされている 4-*tert*-butylphenol (1)、4-*sec*-butylphenol (2)、3-*tert*-butyl-4-hydroxyanisole (3)、bisphenol A (4)、4-*tert*-amylphenol (5)、4-*tert*-octylphenol (6) 及び 4-nonylphenol (7) を試料とした。本検出法の誘導体化試薬として、ferrocenoyl azide、ferrocenesulfonyl chloride、ferrocenecarboxylic chloride を合成して用いた。検出に用いたアルキル基修飾電極は、金電極を各種のアルカンチオールのエタノール溶液に浸漬することによって調製した。検出セルは 3 電極系のクロスフロー形セルを用いた。HPLC 分離には C<sub>8</sub>-鎖修飾シリカゲルカラム (4.6×150 mm のコ

ンベンショナルサイズおよび 1.5×150 mm のセミマイクロサイズ) を用いた。固相抽出には Sep-pak® カートリッジを用いた。

### 3. 結果・考察

超高感度電流増幅電気化学検出系：電気化学検出は高感度検出法として知られ、センサーへの応用やチップへの展開などの易容性を有する。フェノール骨格の直接酸化による多電極クーロメトリー法による極微量の 4-*tert*-octylphenol や 4-nonylphenol の検出 (nmol レベル) が報告されている<sup>2</sup>。著者らは、Scheme 1 に示すような、移動相中に含まれる電子供与体との化学反応を組み合わせ、電極上で測定試料の還元体を再生することにより観測電流を増幅する方法を検討した<sup>3</sup>。この原理は Creager らによる修飾電極を用いた分子認識により実現される<sup>4</sup>。つまり、還元性無機イオンは脂溶性膜に親和性を持たないため直接還元が阻害される。一方、有機化合物が脂溶性膜に取り込まれ電極に応答することによって酸化電流増幅が行われる<sup>5</sup>。このようなリサイクリゼーションは電極と基質との間の相対的に速い電子移動を必要とするので、フェノール類はフェロセン誘導体とした。実験の部に示す誘導体化試薬を合成して用いた。脂溶性の高い長鎖アルキル鎖を持つフェノール類のフェロセン誘導体はアルキル鎖修飾電極によって、Scheme 1 に示すような効率良いサイクリゼーションが期待される。1 の ferrocenoyl azide を用いた誘導体 (Fc-1) および無機還元剤であるフェロシアン化カリウムのサイクリックボルタモグラム (CV) を測定した結果、アルキル鎖修飾電極はアルキル鎖の長さの増加に伴いフェロシアンイオンの酸化を強く抑制するが、Fc-1 に対する酸化は抑制されることなく可逆な CV 波を与えた<sup>5</sup>。また、Fc-1 の酸化波は、フェロシアン化カリウム共存下では化学反応により Fc-1 の還元体を再生し、効率的に増幅された酸化電流を観測することができた。この効果は C<sub>12</sub>-鎖を修飾した電極において、フェロシアン化カ



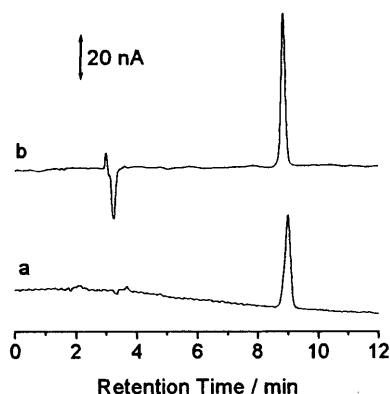


Fig. 1

HPLC response for  $3.91 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$  Fc-1 at the bare Au electrode (a), and for  $3.91 \times 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$  Fc-1 with a mobile phase containing  $1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$  FCN at the  $C_{12}$  chain-coated Au electrode (b).

リウムの共存下で最も効率よく観測された。Figure 1 に裸の金電極と  $C_{12}$ -アルキル鎖修飾電極を用いて検出した HPLC レスポンスを示した。検出最適加電圧 +0.8 V vs Ag/AgCl はハイドロダイナミックボルタンメトリーから決定した。このクロマトグラムから明らかなように、通常の電極では  $10^{-6} \text{ mol/L}$  レベルの試料濃度に数十 nA オーダーの電流値を与えるのに対し、 $C_{12}$ -鎖修飾電極では  $10^{-8} \text{ mol/L}$  レベルの試料濃度に数十 nA オーダーの電流値を与え、大幅に検出電流を増幅できることが分かる<sup>5</sup>。

一方、適当な無機酸化剤を選択することにより、Scheme 1 に示した逆方向にサイクリゼーションさせ、加電圧 0V で還元電流を増幅することが期待される。加電圧 0V での検出は環境試料を対象とする分析では高度な選択性を持つため有用である。種々の無機還元剤を検討した結果、 $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$  を用いたとき、加電圧 0V で還元電流を観測することができた。しかし、現時点では増幅率は数倍程度であったため更なる検討が必要である。

固相濃縮-反応カートリッジの概念確立と作成：環境試料を濃縮した固相上で濃縮と同時に誘導体化反応を実現し、フェロセン誘導体として溶出するための固相充填カートリッジを作成し、効率のかつクリーンな誘導体化法の概念と、これを利用した分離系への試料注入等流れ分析法

Table 1. Derivatization yields for ferrocenecarboxylic chloride, RSD values of the proposed method and recovery from tap water with SPE.

Compound	Yield, %	RSD, %	Recovery, %
1	98.4	3.0	98.0
2	93.3	2.4	85.3
3	35.3	2.6	92.5
4	95.2	2.2	83.2
5	92.3	2.1	83.1
6	94.7	2.3	78.0
7	93.2	3.0	81.1

への応用性を検討した。

Table 1 に示すように、ODS を用いた固相抽出法による水道水中への添加実験による回収率は非常に高いことが分かった<sup>6</sup>。一方、誘導体化試薬の反応率は ferrocene azide では 70%程度であったが、スルフォニルクロライドや酸クロライドでは高回収率を得た。Table 1 に示すように、酸クロライドは立体障害を持つ 3 を除くフェノール類に対し、ほぼ定量的に ferrocene 誘導体を得ることができた。現在、抽出に用いる固相上に誘導体化試薬を固定した固相濃縮-反応カートリッジ法を検討している。

マイクロ分離系の構築：アルキルフェノール類の同時一斉簡易分析を目的として、上述の検出法を利用した HPLC 分析法を検討した。サンプル調製は、1-7 のアセトニトリル溶液と 0.01 mol/L 誘導体化試薬のアセトニトリル溶液を 80°C、15 分還流し、その溶液を直接 HPLC に注入した。1-7 の ferrocene 誘導体は脂溶性が高いため通常用いられる ODS カラムでは溶出できず、 $C_8$ -カラムによって良好な分離を得た。セミマイクロカラムでも同様の結果であった。この分離分析法の相対標準偏差は Table 1 に示した。また、この方法による検出限界は 1 に対して  $5.4 \times 10^{-11} \text{ mol/L}$  (0.008 ppb)、7 に対して  $9.4 \times 10^{-11} \text{ mol/L}$  (0.02 ppb) であった。

オンサイト簡易分析システムの提案：上述の各方法をカップルし、一連の流れの中で簡便に測定できる高感度オンサイト分析システムを提案する。現在、検討段階であるが、環境試料からの対象環境ホルモンの固相抽出と濃縮、同じ固相上での電気化学検出のための誘導体化、誘導体の分離と電流増幅高感度検出をマイクロスケールで簡便に行うシステムである。この方法は、上述した基礎研究の成果から従来の HPLC 法に比べ 100-1000 倍程高感度で、GC-MS 法の検出感度に匹敵する。現在、実用化のためのマイクロスケールへの展開を図っている。

#### 4. 引用文献

- 1) a) H. G. J. Mol, S. Sunarto, and O. M. Steijger, *J. Chromatogr., A*, **879**, 97 (2000). b) D. Jahr, *Chromatographia*, **47**, 49 (1998). c) R. A. Rudel, S. J. Melly, R. W. Geno, G. Sun, and J. G. Brody, *Environ. Sci. Technol.*, **32**, 861 (1998).
- 2) a) T. Tsuda, K. Suga, E. Kaneda, and M. Ohsuga, *J. Chromatogr., B*, **746**, 305 (2000). b) M. Ahel, W. Giger, E. Molnar, and S. Ibric, *Croat. Chem. Acta*, **73**, 209 (2000). c) A. Marcomini and W. Giger, *Anal. Chem.*, **59**, 1709 (1987).
- 3) B. Uno and Y. Kato, *Chem. Lett.*, **2002**, 652.
- 4) P. T. Radford, M. French, and S. E. Creager, *Anal. Chem.*, **71**, 5101 (1999).
- 5) a) C. E. Chidsey and D. N. Loiacono, *Langmuir*, **6**, 682 (1990). b) M. French and S. E. Creager, *Langmuir*, **14**, 2129 (1998).
- 6) B. Uno, Y. Kato, and S. Miwa, *Anal. Sci.*, **18**, 685 (2002).