

—平成17年度 岐阜薬科大学特別研究費（一般）—

HPLC/CE-時間分解蛍光検出法を用いた重要生体成分の 超高感度分析法の開発

江坂 幸宏

1. 緒言

生体分子に関する現行分析法の感度を1桁以上上げることは、“今まで全く知られていなかった生命活動の担い手”の発見につながり、これによって生命科学の新しい局面を生む可能性がある。更に、現代社会では、疾病と関連した分子-バイオマーカー-を監視（モニタリング）することが、衛生的見地から極めて重要であると認識されている。分析法の著しい感度向上は、より多くのバイオマーカーによる有益なモニタリングを可能にする。汎用検出法による場合、高倍率濃縮前処理が必要となるが、目的物と類似の多くの物質を含む生体試料では、このような濃縮はしばしば困難である。つまり、検出法が本質的に高感度であり、かつモニタリングにも活用できる比較的簡易な分析システムが切望されている。

ここでは、超微量生体物質の実用分析法の開発を目的に、本質的に高感度となる仕組みをもつ検出機構として“希土類錯体の長寿命蛍光”を採用した[1-4]。希土類錯体の中には、配位子の受光部で吸光し励起した電子のエネルギーが希土類イオン部に錯体内で移動し、希土類の発光波長で発光するものがある。従って、励起波長と発光波長の重なりがほとんどなく励起光によるバックグラウンド蛍光がない。また、この発光機構のために発光寿命が長く、時間分解（遅延）検出することで、生体試料のマトリクス成分由来の短寿命蛍光が除去され、特に実分析において著しいS/N比向上が期待できる。そして、強い発光を得る観点で、ユーロピウムイオン (Eu^{3+}) と配位子として β ジケトン構造を有する芳香族化合物からなる錯体が有望であることが分かっている。また、希土類錯体の時間分解蛍光を利用した分析法は大部分がバッチ法と固相法であるが、分離過程を組み込むことで分析法の有用性は格段に高められる。本研究では、試料の修飾試薬として β ジケトン化合物を用い、セミマイクロ HPLC-時間分解蛍光検出による重要生体成分の超高感度分析法を開発することを目的とし、具体的には内分泌攪乱物質であるアルキルフェノール類の分析に関する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アルキルフェノール類 (APS) のうち、日本の環境水中で検出履歴のある 4-*tert*-butylphenol (1)、4-*tert*-octylphenol (2)及び 4- nonylphenol (3)、bisphenol A (4) を分析対象とした。これらの APS は β ジケトン誘導体化試薬である 4-(1,1,1,2,2-pentafluoro-3,5-dioxo-pentyl)-[1,11'-bipenyl]-4'-sulfonylchloride (PDBS-Cl)でプレカラム修飾し、PDBS 誘導体 (Fig.2 参照) として分離検出される。

システム構成を Fig.1 に示す。4種の PDBS 誘導体標品をセミマイクロ HPLC で分離し、ポストカラムで EuCl_3 、Topo、Brij 35 からなる組成の試薬溶液を混合し、時間分解蛍光

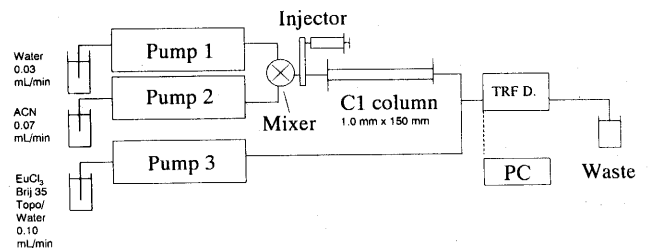


Fig.1 Schematic diagram of the Present Analysis System

(TRF) 検出を行った。HPLC 装置は島津製、TRF 検出器は浜松フォトリクス製のものをいた。試料注入量は特に断りのない場合は $0.5 \mu\text{L}$ とした。HPLC 分離には C_1 -修飾シリカゲルカラム ($1.0 \times 150 \text{ mm}$ 、YMC) を用いた[4]。

3. 結果・考察

錯形成試薬溶液組成の最適化：HPLC 分離された後、ポストカラム試薬と合流した β ジケトン化合物である PDBS 誘導体は、Fig.2 に示すような錯体形態で存在すると考えられる。TOPO は金属キレート抽出する際の抽出促進剤であり、これにより錯体から結晶水が置換されることに加え、TOPO 自身の疎水性も高いため Brij 35 ミセルへの錯体抽出が促進されているものと思われる。ミセル中というバルク相に比較して消光成分の少ない疎水環境下で、より強

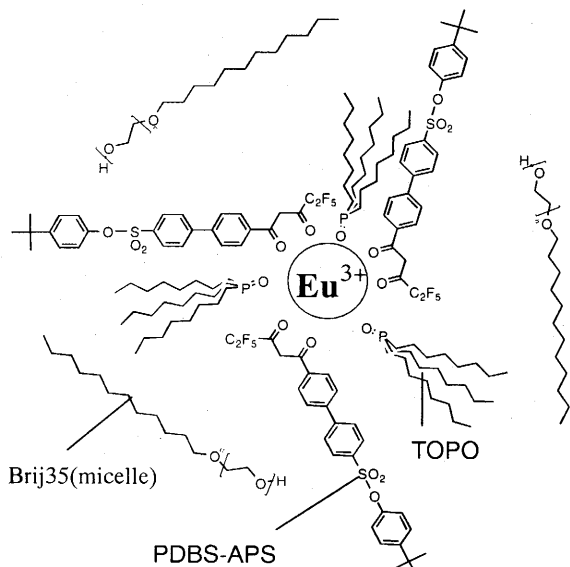


Fig.2 Proposed structure of the Eu^{3+} complex in Brij 35 micelle

い蛍光が観測されると期待される。 Eu^{3+} 濃度、TOPO濃度については、互いのパラメータからほぼ独立に、ピーク高と明確な正の相関があった。前者は、PDBS誘導体が蛍光活性である Eu^{3+} 錯体として存在する比率が高まることで、後者は周囲環境からのクエンチャーの減少及びミセルへの抽出効率の向上によって説明され、実験結果は機構的に妥当と思われた。

Brij35単独の濃度上昇は、意外にもピーク高の減少を起こした。一方で、Brij35の濃度上昇は、TOPOの溶解度を高めた。このTOPOの溶解度上昇は、TOPOがBrij35ミセルによって可溶化されている、即ち、一種の混合ミセルを形成していることを示唆する。そこで、TOPO濃度との混合比を一定にして双方を増加させると、より高いTOPO濃度を利用することが可能になった。そして、結果としてTOPO濃度単独の増加で得られるより大きなピーク高が得られた。この結果について、少なくとも2つの解釈ができる。ひとつは、混合ミセルでTOPOの組成比が減少すると、錯体のミセルへの分配が有意に減少する。もうひとつは、錯形成したPDBS誘導体が強い蛍光を発するには、錯体が分配する混合ミセル環境が非常に重要であり、TOPOが多く共存する場が蛍光発光に適しているということである。両方の効果が働いている可能性が高いが、Brij35の濃度を単独で上げることは、ミセル相の相比を高めることであり、一般に、溶質（この場合錯体）のミセルへの分配比を高めるため、直接の正の効果があつてよい。しかし、現実には蛍光強度は明確に弱められている。したがって、現在のところは、後者の寄与のほうが大きいと考えている。

検出感度及び分析例：最適条件下で、 $0.5\mu\text{L}$ 注入の場合、 10^{-10}M 程度の検出限界 ($\text{S/N}=3$) を得た。Fig. 3に前出4種の誘導体の本システムでの分離検出例を示した。この誘導体の脂溶性の大きさや試料官能基とカラムシラ

ノール基間の静電的相互作用のため、分析系での試料吸着によるピークのテーリングが見られ、幾分か分離が損なわ

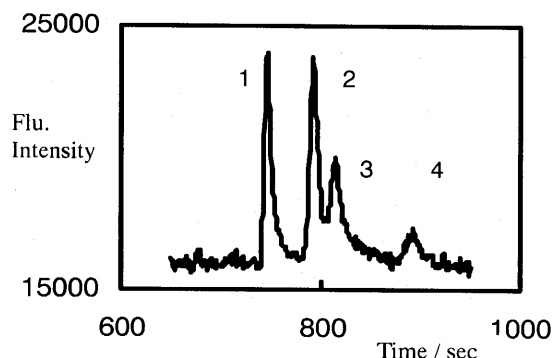


Fig. 3 HPLC Analysis of PDBS-*tert*-butyl-phenol (1), PDBS-octyl-phenol (2), PDBS-nonyl-phenol (3) and $(\text{PDBS})_2$ -bis-phenol A (4)

Concentrations of the each analytes in the sample solution (nM); 0.44 (1), 0.44 (2), 0.25 (3), 0.09 (4)
Conditions: Eluent: ACN:H₂O = 70:30; flow rate= 0.1 mL/min, C1 column (150mm x 1mm i.d.), reagent solution: 0.6 mM EuCl_3 , 2 mM TOPO, 3% Brij 35, flow rate= 0.1 mL/min, injection volume = $0.5\mu\text{L}$

れており、改善が求められる。

小さな径のカラムを用いると、必要試料量、使用溶媒量を著しく小さくすることが可能になる。このことは、質量感度が高いことと深く関係している。微小径カラム、小さな流速で行う分離では、それに伴う試料希釈が小さいため、同質量の試料ならば、コンベンショナルサイズカラムを使用した場合に比較し、はるかに高いピーク高を観測できる。このため、試料量が限られる場合は、実質的に濃度感度を高めることにつながる。ここでは、セミマイクロカラムでの分離を深刻に損わない程度で注入量を $20\mu\text{L}$ まで増加することで、PDBS-*tert*-butylphenolの検出限界を $2 \times 10^{-12}\text{M}$ まで小さくすることに成功した。これは環境水中 APS 分析に必要な濃度感度である pM レベルの簡便な高感度分析が無濃縮で可能であることを示している。

展望：現在は環境水中の APS 分析法として検討中であるが、本法は、むしろ採取可能試料量のわずかな生体関連試料中の重要成分の高感度分析に適していると言える。また、TRF 検出器はキャピラリー電気泳動法 (CE) の検出器としても使用できる。今後、適用試料範囲の拡大と装置面での発展を行い、本法の有用性を拡大する計画である。

4. 引用文献

- 1) E.P. Diamandis and T.K. Christopoulos, *Anal. Chem.*, 1990, 62, A1149-1157.
- 2) J. Yuan, K. Matsumoto, H. Kimura, *Anal. Chem.*, 1998, 70, 596-601.
- 3) K. Matsumoto et al., *J. Chromatogr. B*, 2002, 773, 135-142.
- 4) K. Matsumoto et al., *Chromatography*, 2002, 23, 73-78.