

博士論文要録

高速液体クロマトグラフィーによる微量重金属の同時定量法に関する研究

一ノ木 進

学位授与：金沢大学（1991年9月28日）

当初は、主に有機化合物の分離に用いられていた高速液体クロマトグラフィー（HPLC）が、金属錯体の分離によく利用され始めたのは、1970年代末頃からである。

著者も1970年代末頃から、吸光検出 HPLC による多元素同時分析法の研究に着手した。この方法の第一の魅力は、従来の吸光光度法では他の共存元素が目的元素と同様に錯体を形成して妨害するような場合でも、これを流れ分析の中に置くことで、共存元素までもが同時に定量できることにある。第二には市販の安価な HPLC を何ら改造することなく、そして特別な熟練を要さずに高感度にかつ正確に分析できることである。

1. ジチオカルバミン酸塩をキレート試薬とする方法

ジエチルジチオカルバミン酸ナトリウム（DDTC）を用いて、重金属イオンを中性の金属錯体としてクロロホルムに抽出し、その一定量をテフロン製の C₁₈ ミクロカラムに注入して、Cd, Mn, Pb, Fe, Zn 及び Cu 錯体を30分で分離できた。金属錯体のカラム内解離を抑制する目的で、溶離液にも DDTC を添加した。Pb, Zn 及び Cu の3金属についてブランク及び0.5~10 ppm の水溶液50 ml を用い、溶媒抽出/HPLC 法による検量線の相関係数は0.999以上であった。本法による河川水中の Pb, Zn 及び Cu の分析結果は、AAS 法とよく一致した。

ピロリジンジチオカルバミン酸アンモニウム（APDC）でも APDC を溶離液に添加したが、その自己縮合反応のために、室温ではクロマトグラムのベースラインがドリフトした。そこで、溶離液びんを氷冷したところ、自己縮合反応が抑制され、極めて安定したベースラインが得られた。このベースラインの安定化、APDC の金属錯体の安定性及び分離能の高いステンレス製 C₁₈ カラムを用いたことが相まって、Pb, Ni, Co, Cu, Hg 及び Bi の6錯体が定量的にベースライン分離でき、定量下限は0.5 ppm から5 ng/ml(ppb) に改善された。本法を河川水及び果樹葉試料に適用して得られた結果は、

AAS 法及び保証値と良く一致した。

ヘキサメチレンジチオカルバミン酸塩（HMDC）を用いて検討したところ、逆相系の溶離液中でのキレート剤自身の安定性は DDTC や APDC よりも優れており、その金属錯体のモル吸光係数も最も大きかった。この方法によると、Cd, Ni, Pb, Zn, Cu, Hg, Co 及び Bi の8金属錯体が完全分離でき、定量下限も1 ppb まで下げることができた。検量線も1 ppb から1 ppm の範囲で相関係数は0.999以上であった。本法を河川水、動物及び植物組織中の重金属の分析に応用し良好な結果を得た。

2. βジケトンキレート試薬とする方法

上記の SS 配位のキレート剤では対象金属に限られるので、OO 配位のキレート剤、アセチルアセトン（AA）について種々の検討を行った。その結果、Cu, Be, Al, Ga, Fe 及び Pd キレートが分離できることが分かった。今までと同様に溶媒抽出の後に抽出液を HPLC 分析した結果、Cu, Fe 及び Pd の3金属について、およそ5 ppb から10 ppm の範囲内で良好な検量線が得られた。本法を水、ウシ肝臓組織及び植物葉中の Cu と Fe の定量に応用し、良好な結果を得た。次に、AA キレートよりも大きなモル吸光係数の期待できる、ベンゾイルアセトンについて検討したところ、Be, Cu, Al, Ga, Fe 及び Pd について100倍の濃度範囲で良好な検量線が得られ、Al, Ga, Fe, In の4金属は、フレイム AAS よりも高感度に分析できることが分かった。

3. オンラインカラム濃縮を利用する方法

以上の溶媒抽出法は、ppb レベルの金属を定量するには約50 ml の試料水を必要とし、また抽出液のごく一部（約10 µl）だけを分析に用いるという無駄がある。そこで、HMDC 錯体をオンカラム濃縮の後に分析する方法を検討した。試料液に緩衝液と HMDC 溶液を添加し、この液の2 ml を濃縮カラム内で濃縮した後、分析カラムに導いて分離定量した。2 ml の標準液を用いて作成した両対数検量線は、金属によって下限0.1~2 ppb から上限200~800 ppb まで相関係数0.9995以上の良好な直線となり、検出限界は金属によって0.04~0.55 ppb であった。また6回の測定における再現

性は 10 ppb 試料で相対標準偏差が平均 1.5 % であった。本法により 1 ml 程度の試料中の ppb レベルの Cd, Ni, Pb, Cu, Hg, Co, 及び Bi の同時定量が可能となった。

公表論文

- 1) 山崎 満, 一ノ木 進, 五十嵐 理恵子: 分析化学, **30**, 40 (1981).
- 2) S. Ichinoki, M. Yamazaki: *Bunseki Kagaku*, **31**, E319 (1982).
- 3) 一ノ木 進, 森田 俊博, 山崎 満: 分析化学, **32**, 285 (1983).
- 4) S. Ichinoki, T. Morita, M. Yamazaki: *J. Liq. Chromatogr.*, **6**, 2079 (1983).
- 5) S. Ichinoki, T. Morita, M. Yamazaki: *J. Liq. Chromatogr.*, **7**, 2467 (1984).
- 6) S. Ichinoki, M. Yamazaki: *Anal. Chem.*, **57**, 2219 (1985).
- 7) S. Ichinoki, N. Hongo, M. Yamazaki: *J. Agric. Food Chem.*, **35**, 448 (1987).
- 8) S. Ichinoki, N. Hongo, M. Yamazaki: *Anal. Chem.*, **60**, 2099 (1988).
- 9) S. Ichinoki, M. Yamazaki: *Anal. Sci.*, **5**, 465 (1989).
- 10) S. Ichinoki, M. Yamazaki: *J. Chromatogr. Sci.*, **28**, 258 (1990).
- 11) S. Ichinoki, M. Yamazaki: *J. Chromatogr. Sci.*, **29**, 184 (1991).



Digest of Doctoral Dissertation

Studies of the Simultaneous Determination of Trace Metals by High-Performance Liquid Chromatography

Susumu ICHINOKI

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokuriku University,

Ho 3, Kanagawa-machi, Kanazawa, Ishikawa 920-11

(Awarded by Kanazawa University dated September 28, 1991)

Simultaneous determination methods for trace metals have been studied by high-performance liquid chromatography (HPLC) with photometric detection. The metals to be determined were extracted into the organic phase of a small volume or enriched on a C₁₈ mini-column as their metal chelates. The extracted or enriched metal chelates were separated on a C₁₈ analytical column and then detected with the usual type photometric detector. Some dithiocarbamates and β-diketonates were used as chelating agents. The HPLC methods combined with solvent extraction enabled a multielement analysis of ng/ml (ppb) levels of Cd, Ni, Pb, Zn, Cu, Hg, Co, and Bi in a 50-ml water sample. The methods were applied to multielement analyses of river water as well as several standard reference materials. The results showed good agreement with those of AAS or certified values. An on-line column enrichment method was also used for the simultaneous determination of Cd, Ni, Pb, Cu, Hg, Co, and Bi. To a 2-ml sample solution, 400 μl of a buffer solution, 100 μl of 0.01 M hexamethylenedithiocarbamate (HMDC) and 5 μl of chloroform were added. Then, a 2-ml aliquot of the resultant solution was injected onto a C₁₈ mini-column. The enriched HMDC chelates were then separated on a C₁₈ analytical column. The detection limits were 0.04 to 0.55 ppb, depending on the metals. The method was applied to a multielement analysis of tap water.

(Received November 24, 1993)

Keywords reversed-phase high-performance liquid chromatography, metal chelate, solvent extraction, trace enrichment, photometric detection, multielement trace analysis

博士論文要録

新規な機能をもつ核酸結合性小分子の研究

井原 敏博

学位授与：九州大学（1993年3月26日）

本研究では、全く新しいタイプの DNA の切断試薬と検出試薬を開発することを目的とした。これらの試薬は遺伝子解析技術にとってはまさに主役である。具体的には、適当な DNA 結合性分子と機能性分子のハイブリッド化という非常にシンプルな概念に基づいて分子設計を行った。その結果、DNA 切断試薬に関しては、これまでにない機構によって切断を行う新規化合物を実現するに至った。一方、DNA の検出試薬に関しては、電気化学活性基を有する DNA リガンドを合成した。電気化学的検出法は本来、非常に高感度な手法であり、この新規試薬によって微量の DNA を高感度に分離・分析する新しい方法論の有用性を示すことができた。

本論文は、これらの研究成果をまとめたものであり、全5章から構成されている。

第1章“序論”では、本研究の背景、意義、ならびに目的、新規機能性配位子の分子設計、さらに論文構成について述べた。

第2章“連結鎖が金属配位能をもつビスアクリジン型化合物”では、典型的な DNA 結合性物質の一つであるインターカレタと金属配位能を有すると考えられるオリゴエチレンジグリコールとのハイブリッド化合物について論じた。この機能性配位子については、1) 金属が DNA のリン酸と、配位子のエチレンジグリコール鎖へ配位することによる複合体の安定化と、2) 金属の DNA への濃縮による DNA 鎖の部位特異的加水分解の二つが期待できる。具体的にはビスインターカレタの連結鎖にペンタエチレンジグリコール鎖を導入したビスアクリジンを合成した。

1) に関する明確な定量化はできなかったものの 2) の DNA の加水分解については、共存金属として Cu^{2+} や La^{3+} を用いた系において切断が促進されていることがわかった。さらに、 Cu^{2+} の系においては機能性配位子の結合部位と切断部位はかなり良い一致を示しており、機能性配位子と Cu^{2+} の協同的作用で DNA を切断し

ていることが明らかになった。この金属配位部位を有する配位子によって、人工の化合物を用いた DNA の加水分解をはじめて示唆することができた。

第3章“連結鎖が電気化学的活性をもつビスアクリジン型化合物”においては、DNA の電気化学的検出について論じた。DNA は通常の状態では酸化還元不活性である。したがって、DNA を電気化学的手法により高感度に検出するためには酸化還元活性基でラベル化することが必要である。さらに、このラベル化剤としては、共有結合を用いない可逆的な結合によるものが簡便で取扱いやすいと考えられる。そこで、機能性 DNA 配位子として、ビスインターカレタの連結鎖に酸化還元活性であるピビリジル基を導入したビスアクリジンを合成した。

この酸化還元活性配位子は、DNA に結合した状態でもその活性を失わず、電気化学的応答が可能であった。このことは、この配位子が DNA の電気化学的ラベル化剤としての可能性を有することを示すものである。さらには、その酸化還元電位の変化は、DNA との相互作用様式についての情報も与えることがわかった。

また、この酸化還元活性配位子は、複合体への可視光照射により、DNA を効率良く切断するフォトスクレーパーゼとしての活性も有することがわかった。反応機構の検討により、この切断反応は、光照射に伴うアクリジン部位からピビリジル部位への分子内電子移動が関与した非常にユニークなものであることが示唆された。

これまでに、DNA の研究に電気化学を用いた例はほとんどなく、この化合物により、DNA 化学への電気化学の導入が非常に興味深い知見を与えることを示すことができた。

第4章“電気化学活性基で修飾したオリゴヌクレオチド”においては、第3章と同様、DNA の電気化学的高感度検出を目的として合成した酸化還元活性配位子について論じた。第3章で得られた結果の上から、DNA 結合部位としてオリゴヌクレオチドを用いた。即ち、標的配列との特異的3本鎖形成を期待した。さらに酸化還元活性部位としてフェロセンを用いて、正電位側でのアノード酸化による高感度な応答を期待し

た。

合成したオリゴヌクレオチドは、フェロセン修飾後も3本鎖形成能を維持しているばかりでなく、逆に、修飾により若干ながら親和性の増大も観察された。この原因としては、フェロセンを含む修飾部位とDNA塩基との疎水の相互作用や水素結合による安定化が示唆された。さらに、DNAとの複合体の電気化学的検出実験においては、 10^{-15} モルという驚異的な高感度検出が可能であった。

DNAフラグメントをその長さや全体的な疎水性などで分離する方法はあっても、塩基配列を認識したうえで分離・分析する手法は未だほとんど未開拓の状態にある。本法は、DNAの微量検出にこれまで用いられてきたラジオアイソトープ(RI)にも代わり得る、非常に実用的な新検出手法としての可能性を有することがわかった。

第5章“結論”では、以上の成果を総括し、全般にわたって考察を行った。

公表論文

- 1) N. Nakashima, K. Nakano, T. Ihara, M. Takagi: *J. Mater. Sci. Lett.*, **8**, 387 (1989).
- 2) S. Takenaka, T. Ihara, M. Takagi: *J. Mol. Recog.*, **3**, 156 (1990).
- 3) S. Takenaka, T. Ihara, M. Hamano, M. Takagi: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1990**, 1271.
- 4) S. Takenaka, T. Ihara, M. Takagi: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1990**, 1485.
- 5) S. Takenaka, H. Sato, T. Ihara, M. Takagi: *Anal. Sci.*, **7** (supplement), 1385 (1991).
- 6) S. Takenaka, T. Ihara, M. Takagi: *Chem. Lett.*, **1992**, 1.



Digest of Doctoral Dissertation

DNA Ligands with New Functions for Analyzing DNA

Toshihiro IHARA

Department of Chemical Science and Technology, Faculty of Engineering, Kyushu University,
6-10-1, Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812
(Awarded by Kyushu University dated March 26, 1993)

DNA ligands carrying new functions such as metal binding capability and redox activity were synthesized. These novel DNA ligands were designed for 1) hydrolytic cleavage of DNA phosphodiester backbone assisted by the metal ion and 2) the ultrasensitive detection of DNA by using electrochemical methods. In the DNA cleavage experiments, a cooperativity was observed between the action of metal ions and metal-binding DNA intercalator. It was assumed that the strain in the phosphodiester bonds induced by the intercalator accelerated the metal-assisted hydrolysis reaction. This is the first example of the intercalator-metal cooperated hydrolysis of DNA phosphate chain. The electrochemical labeling of DNA based on reversible binding modes such as intercalation and oligonucleotide-directed triple helix formation was realized. Using the spectroscopic, hydrodynamic and voltammetric methods, the author has made it clear that a bis-acridine-type DNA ligand containing viologen unit is useful as a nondestructive activating reagent for DNA for electrochemical study of DNA-ligand interactions. On the other hand, oligopyrimidines modified with ferrocenyl group as a reporter moiety have been proven to be applicable to practical use as a probe for electrochemical detection of targeted double stranded DNA. This detecting system combined with HPLC (equipped with an ordinary electrochemical detector) has facilitated an ultrasensitive analysis of DNA sequence; detection below femto mol level has been accomplished. The methodologies developed in these studies provide a new possibility in analytical technique of DNA. In addition, a facile introduction of redox active site onto DNA is expected to give a new tool for studying the chemistry of DNA.

(Received November 12, 1993)

Keywords DNA ligand, DNA cleavage, hydrolysis, nondestructive labeling, DNA probe, electrochemical detection, HPLC-ECD, triple stranded DNA, sequence specific detection