

●——水中で高速で反応する高輝度化学発光試薬

化学発光を用いた分析法は、励起光が必要な蛍光分析のような光ノイズが原理的に生じない。そのため、光電子増倍管や CCD などの光検出器の感度を最大限に上げることができ、極微量な物質の検出に適する。イミダノピラジノンやルミノールに代表される従来の化学発光物質は、酸化剤などと反応して不安定な反応中間体を経て分解して発光する多段階の反応機構を有するが、近年 1,2-ジオキセタンにアダマンチル基のようなかさ高い置換基と 3-ヒドロキシアリール基を導入することで、水溶液中で安定だがヒドロキシ基が脱プロトン化されると速やかに分解して発光する化学発光物質が開発されている。文献¹⁾では、速やかな分解速度を維持したまま高い輝度を持つジオキセタン誘導体と水中で化学発光反応させる際の添加物について検討された。アリール基の 4-位に *p*-オリゴフェニレンを直結した新規化合物は、アセトニトリル及び DMSO 中で有機塩基を加えると従来の物質よりも早く分解し、ベンゼン環の数が増えるほど発光極大波長が長波長化した。しかし、水中で水酸化ナトリウムを加えて分解させた場合は、大きく化学発光の効率が低下したので、2 種の添加物により発光効率の改善がなされた。メチル化された β -シクロデキストリンを添加した場合、分解反応速度をほとんど変えることなく化学発光効率は 3~84 倍に増加し、ベンゼン環の数が多いほどその効果は大きかった。ベンゼン環の数が多いほどシクロデキストリンの疎水性の空孔により強く包摂されるが、化学発光反応を阻害しないことが示唆される。一方、臭化ヘキサデシルホスホニウムを添加した場合は、化学発光分子全体を疎水性の環境で包み込むため、化学発光効率を数百倍程度上昇させたが、分解反応速度は数分の一になった。ヒドロキシ基を各種エステルに置き換えるとジオキセタンはエステル加水分解によって同様の化学発光反応をする。そのためエステラーゼなどの酵素反応によって発光のタイミングをコントロールし、極微量な生理活性物質の臨床検査などへの応用が可能である。

1) N. Watanabe, H. Takatsuka, H. K. Ijuin, M. Matsumoto : *Tetrahedron*, **76**, 131203 (2020) .

〔北海道大学大学院地球環境科学研究院 山田 幸司〕

●——アミノ酸が LC/MS 測定におけるシグナルサプレッションを改善する

タンパク質の分析・解析を行うにあたり、液体クロマトグラフ-質量分析計 (LC-MS, liquid chromatography/mass spectrometry) の有用性は言うまでもない。とくに近年では、バイオ医薬品に代表されるタンパク質製剤の品質や安全性、有効性などを確認するためには必須の装置として位置づけられている。一般にタンパク質を分析する際は、トリプシンなどで消化してペプチド断片とし、それを逆相系 LC で分離後、吸光度計や質量分析計で検出するといった手段がとられる。そのとき対象となるペプチドのカラムへの保持や分離、ピーク形状の改善などを目的として、多くの場合、移動相ヘトリフルオロ酢酸 (TFA, trifluoroacetic acid) が添加される。しかしながら TFA の添加によって、一部のペプチドは TFA とのイオンペアを形成し、MS におけるエレクトロスプレーイオン化 (ESI, electrospray ionization) 法でのイオン化効率が抑制され、TFA 以外の酸 (酢酸やギ酸) を用いた場合と比較して相当の感度低下 (サプレッション) を引き起こすことが知られている。これまでに、TFA 添加移動相によるクロマトグラフィー的利点を保ちつつ、MS 感度を改善するための試みが多数報告されている。酢酸やプロピオン酸などの弱酸やそのアンモニウム塩を TFA とともに移動相に添加する、あるいはそれら弱酸やアンモニア水のような弱塩基をポストカラムで MS イオン源導入前に混合するといった方法などである¹⁾²⁾。これらはいずれも TFA とのイオンペア形成を抑制するため、プロトン化や中和といった反応によって TFA アニオンの発生を抑えるというものである。一方、Mao らは、移動相への添加剤としては通常用いられることのないアミノ酸を利用する方法を報告している。グリシンを移動相に直接添加するといったシンプルな方法であり、極めて良好な結果を得ている³⁾。双性イオンであるグリシンは、低 pH 条件下においてほぼグリシニウムカチオンとして存在しており、同一分子内におけるカルボキシ基 (-COOH) とプロトン化されたアミノ基 (-NH₃⁺) の相乗効果によって TFA アニオンの発生を抑制できる。他のアミノ酸についても同様に検討されているが、移動相への溶解性などの問題から、グリシンが最も効果的であり、本手法によってペプチドの検出感度を 10 倍程度向上させることが可能であることが報告されている。また、グリシンの添加濃度は、TFA 濃度 0.05% に対し、2 mM 程度の低濃度で十分であることから、LC 分離への影響はほぼないとのことである。ただし、対象となるタンパク質の分析条件によっては、より多量の TFA アニオンが発生する可能性があり、その場合は、グリシンの必要量を増加しなければならない可能性があることが示唆されている。バイオ医薬品の普

及に伴い、タンパク質の高感度分析に対する需要は今後益々増加するものと考えられる。このようなシンプルではあるが独創的な方法論のより一層の発展を期待したい。

- 1) C. Chan, M. S. Bolgar, D. Dalpathado, D. K. Lloyd : *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **26**, 1507 (2012).

- 2) S. Wang, T. Xing, A. P. Liu, Z. He, Y. Yan, T. J. Daly, N. Li : *Anal. Chem.*, **91**, 3156 (2019).
3) Y. Mao, A. Kleinberg, Y. Zhao, S. Raidas, N. Li : *Anal. Chem.*, **92**, 8691 (2020).

(福岡大学薬学部 巴山 忠)

日本分析化学会研究懇談会の御案内

日本分析化学会の研究懇談会に入会御希望の方は下記に照会ください。

- ① ガスクロマトグラフィー研究懇談会
- ② 高分子分析研究懇談会
- ③ X線分析研究懇談会
- ④ 液体クロマトグラフィー研究懇談会
- ⑤ 分析試薬研究懇談会
- ⑥ 有機微量分析研究懇談会
- ⑦ 溶液界面研究懇談会
- ⑧ 化学センサー研究懇談会
- ⑨ 電気泳動分析研究懇談会
- ⑩ イオンクロマトグラフィー研究懇談会
- ⑪ フローインジェクション分析研究懇談会
- ⑫ 環境分析研究懇談会
- ⑬ 表示・起源分析技術研究懇談会
- ⑭ 熱分析研究懇談会
- ⑮ レアメタル分析研究懇談会
- ⑯ 溶液反応化学研究懇談会
- ⑰ 受託分析研究懇談会
- ⑱ 電気分析化学研究懇談会
- ⑲ ナノ・マイクロ化学分析研究懇談会
- ⑳ バイオ分析研究懇談会
- ㉑ スクリーニング分析研究懇談会

◇照会先

- ① : 〒859-3298 佐世保市ハウステンボス町 2825-7 長崎国際大学薬学部薬学科 佐藤 博 [TEL・FAX : 0956-20-5668, E-mail : satoh@niu.ac.jp]
- ② : [E-mail : infopacd.jp]
- ③ : 〒558-8585 大阪市住吉区杉本 3-3-138 大阪市立大学大学院工学研究科 辻 幸一 [TEL・FAX : 06-6605-3080, E-mail : tsuji@a-chem.eng.osaka-cu.ac.jp]
- ④ : 中村 洋 [TEL : 03-3490-3351, E-mail : nakamura@jsac.or.jp]
- ⑤ : 〒102-8554 東京都千代田区紀尾井町 7-1 上智大学理工学部物質生命理工学科分析化学研究室内 [TEL : 03-3238-3370, FAX : 03-3238-3361, E-mail : ta-hayas@sophia.ac.jp]
- ⑥ : 〒263-8522 千葉県稲毛区弥生町 1-33 千葉大学共用機器センター 榎 飛雄真 [TEL : 043-290-3810, E-mail : masu@faculty.chiba-u.jp]
- ⑦ : 〒560-0043 大阪府豊中市待兼山町 1-1 大阪大学大学院理学研究科化学専攻分析化学研究室 塚原 聡 [TEL : 06-6850-5411, E-mail : sxt@chem.sci.osaka-u.ac.jp]
- ⑧ : 〒599-8531 大阪府堺市中区学園町 1-1 大阪府立大学大学院工学研究科 久本秀明 [TEL : 072-254-9285, E-mail : hisamoto@chem.osakafu-u.ac.jp]

- ⑨ : 〒501-1196 岐阜市大学西 1-25-4 岐阜薬科大学機能分子学大講座薬品分析化学研究室 江坂幸宏 [TEL : 058-230-8100 (内線3640), E-mail : esaka@gifu-pu.ac.jp]
- ⑩ : 〒780-8520 高知市曙町 2-5-1 高知大学教育研究部総合科学系複合領域科学部門 [TEL : 088-844-8306, E-mail : IC@jsac.jp]
- ⑪ : 〒470-0392 豊田市八草町八千草 1247 愛知工業大学工学部応用化学科 村上博哉 [TEL : 0565-48-8121, E-mail : jafia@aitech.ac.jp]
- ⑫ : 〒192-0392 八王子市堀之内 1432-1 東京薬科大学生命科学部 熊田英峰 [E-mail : kumata@ls.toyaku.ac.jp]
- ⑬ : 〒120-8551 東京都足立区千住旭町 5 東京電機大学工学部環境化学科内 保倉明子 [TEL : 03-5284-5445, E-mail : kigen@jsac.jp]
- ⑭ : 〒259-1293 平塚市土屋 2946 神奈川大学理学部 西本研究室 [TEL : 0463-59-4111, E-mail : y24moto@kanagawa-u.ac.jp]
- ⑮ : 〒141-0031 東京都品川区西五反田 1-26-2 五反田サンハイツ 304 号 (公社)日本分析化学会事務局 [TEL : 03-3490-3351, E-mail : rare_metals@jsac.or.jp]
- ⑯ : 〒950-2181 新潟市西区五十嵐 2 の町 8050 新潟大学教育研究院自然科学系 梅林泰宏 [TEL : 025-262-6265, E-mail : yumescc@chem.sc.niigata-u.ac.jp]
- ⑰ : 〒590-0984 大阪府堺市堺区神南辺町 1-4-6 (株)総合水研究所 中田邦彦 [TEL : 072-224-3532, E-mail : k_nakata@mizuken.com]
- ⑱ : 〒606-8585 京都市左京区松ヶ崎橋上町 1 京都工芸繊維大学大学院 前田耕治 [TEL : 075-724-7523, E-mail : maedak@kit.ac.jp]
- ⑲ : 〒060-8628 札幌市北区北 13 条西 8 丁目 北海道大学大学院工学研究院 渡慶次 学 [TEL : 011-706-6744, E-mail : tokeshi@eng.hokudai.ac.jp]
- ⑳ : 〒153-8902 東京都目黒区駒場 3-8-1 東京大学大学院総合文化研究科 吉本敬太郎 [TEL : 03-5454-6591, E-mail : keitaro@yoshimotolab.c.u-tokyo.ac.jp]
- ㉑ : 〒110-0015 台東区東上野 4-10-3 ASANO ビル 1 階 101 号室 (株)神戸工業試験場生産本部技術開発部 三島有二 [TEL : 03-3843-5691, E-mail : scr-info@jsac.jp]