

博士論文

HPLC ポストカラム法による Fe(III)キレーター分析法の開発とその応用

有賀 智子

目次

第 1 章 序論	
1.1 はじめに	1
1.2 高等植物における Fe の吸収と輸送	2
1.3 Fe(III)キレーター分析法	7
1.4 本研究の目的	9
第 2 章 蛍光法による Fe(III)キレーターの HPLC 分析法の開発	
2.1 はじめに	10
2.2 材料および方法	13
2.3 結果	18
2.4 考察	51
第 3 章 化学発光法による Fe(III)キレーターの HPLC 分析法の開発	
3.1 はじめに	54
3.2 材料および方法	58
3.3 結果	62
3.4 考察	100
第 4 章 植物サンプル中の Fe(III)キレーター分析	
4.1 はじめに	105
4.2 材料および方法	107
4.3 結果	112
4.4 考察	136
第 5 章 総合考察	144
参考文献	150
謝辞	159

第 1 章 序論

1.1 はじめに

鉄 (Fe) はカタラーゼやペルオキシダーゼ、シトクローム、Fe 硫黄タンパク質など電子伝達系や呼吸に関わる重要なタンパク質を構成する元素であり、高等植物の必須元素である。Fe は地球の地殻上に多く含まれる元素の一つであるが、耕作地などの酸化環境では根から吸収された Fe のうち多くが水に難溶性な $\text{Fe}(\text{OH})_3$ または Fe_2O_3 などの状態で存在している。そのため、通常土壌 pH において Fe(III) はほとんど水に溶解せず、土壌中の可溶性 Fe の濃度は植物が正常に生育するには不十分である。そこで、高等植物は土壌中の Fe を効率的に吸収するための Fe 獲得機構を発達させてきた。この Fe 獲得機構には Fe(III)キレーター (Ferric Iron Chelator、FIC) が大きく関与している。また、高等植物体内において Fe は導管および篩管を通じて輸送されているが、導管内を満たす導管液の pH は 5.5~6.0 の弱酸性、篩管内を満たす篩管液の pH は 8.0 の弱アルカリ性であり、これらの pH における Fe(III) の溶解度は非常に低い。そこで、高等植物体内における Fe(III) の溶解性を向上させるため、Fe(III) の輸送にも FIC が関わっていると考えられる。

このように、高等植物における Fe の栄養生理には FIC が大きく関与しており、Fe が関わる多くの生理学的機構を解明するには FIC を化学的に分析する技術が必要不可欠である。しかし、従来の FIC 分析法には感度の低さや FIC の有するキレート錯体形成能 (ここでは Fe(III)キレート能とする) に対する検出の選択性の欠如などの問題点があった。本章では、本研究の背景として高等植物による Fe(III)獲得機構や従来の FIC 分析法について概説し、本研究の目的を記した。

なお、本論文掲載の内容は全て博士課程において行った研究の成果である。

1.2 高等植物における Fe の吸収と輸送

土壌中の水分や炭素、窒素、リンなどの必須元素は高等植物の根から吸収された後、導管を通じて地上部へ輸送される。Fe は銅 (Cu) やマンガン (Mn)、モリブデン (Mo) と並んで高等植物の生育に必須の遷移金属の一つであり、Fe(II)は電子の供与、Fe(III)は電子の受容を行うことで生体内における酸化還元反応の担い手となっている。光合成は高等植物の地上部 (葉、茎) に含まれる葉緑体で行われるが、光合成の光化学反応ではシトクロームや Fe 硫黄タンパク質など Fe を含む多くのタンパク質が必要となる。また光合成色素であるクロロフィルの生合成にも Fe が必要であるため、高等植物の地上部は特に多くの Fe を必要とする。Fe は地殻に含まれる元素の中で 4 番目に多い元素であるが、土壌中のほとんどの Fe は水に難溶性 Fe(OH)₃ または Fe₂O₃ の形で存在することから、通常の土壌 pH において水に溶解している Fe の濃度は植物の正常な生育のためには不十分である。

高等植物は土壌中の Fe を効率的に吸収するために 2 つの Fe 獲得機構を発達させてきた。一つ目は、非イネ科植物が持つ Strategy-I である (Fig. 1-1A)。非イネ科植物は根から Fe(III)キレーター (Ferric Iron Chelator, FIC) の一つであるフェノール性の酸を分泌し土壌中の難溶性 Fe(III)を可溶化する (Römheld and Marschner, 1983)。このフェノール性の酸としてはプロトカテク酸やカフェイン酸などが知られている (Yoshino *et al.*, 1998, Jin *et al.*, 2007, Ishimaru *et al.*, 2011)。可溶化した Fe(III)-FIC 錯体のうちの Fe(III)は Fe(III)錯体還元酵素によって Fe(II)に還元された後、Fe(II)イオントランスポーターを通じて体内へ取り込まれる (Fig. 1-1A)。Fe(III)錯体還元酵素遺伝子としてシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) とエンドウマメ (*Pisum sativum*) から *AtFRO1* と *PsFRO2* がそれぞれ同定されている (Robinson *et al.*, 1999, Waters *et al.*, 2002)。Fe(II)イオントランスポーター遺伝子としてはシロイヌナズナから *AtIRT1* が同定されている (Eide *et al.*, 1996)。

一方 Strategy-II を持つイネ科植物は、Fe 欠乏に際して根から FIC の一つであるムギネ酸類 (MAs) を分泌して土壌中の難溶性 Fe(III)を可溶化する (Fig. 1-1B)。ムギネ酸類は非タンパク質性のアミノ酸であり、1976 年にイネ (*Oriza sativa* L.) およびエンバク (*Avena sativa* L.) の根洗浄液中に存在する Fe 可溶化物質として Takagi により発見された (Takagi, 1976)。現在までにムギネ酸類としてムギネ酸、2'-デオキシムギネ酸 (DMA, Fig. 1-2B)、3-ヒドロキシムギネ酸、アベニン酸、3-エピヒドロキシムギネ酸など様々な物質が単離・同定されている (Nomoto *et al.*, 1981, Takemoto *et al.*, 1978, Nomoto *et al.*, 1979,

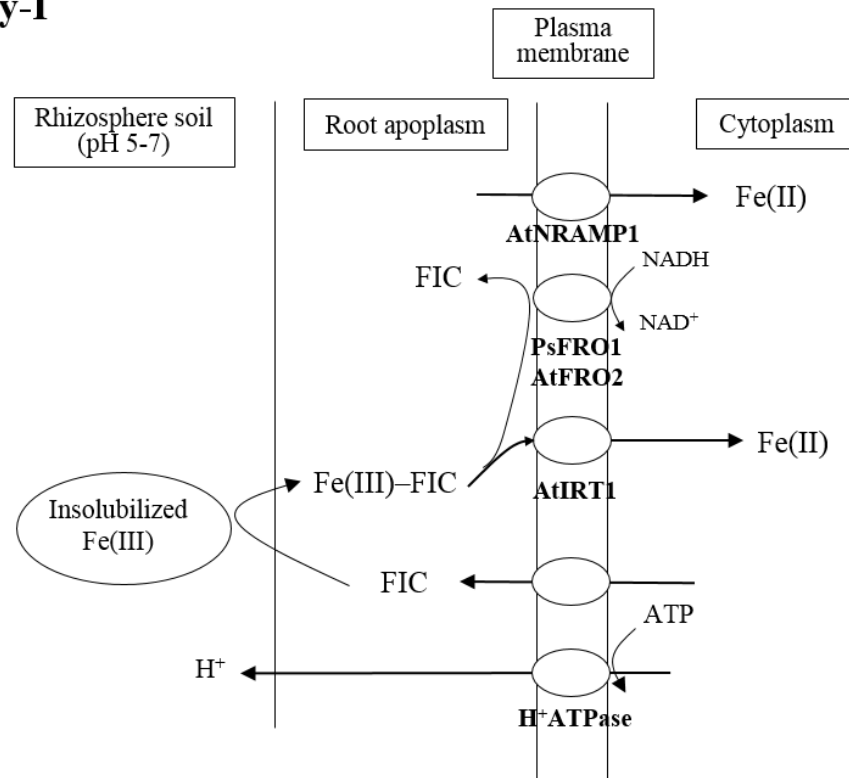
Fushiya *et al.*, 1981, Iwashita *et al.*, 1981)。また、3-ヒドロキシ-2'-デオキシムギネ酸、2'-ヒドロキシアベニン酸は近年になって新たに同定されたムギネ酸類である (Ueno *et al.*, 2007)。ムギネ酸類の根からの分泌トランスポーターとしてオオムギから HvTOM1 が同定されている (Nozoe *et al.*, 2011)。このトランスポーターを経て根から分泌されたムギネ酸類は根圏の難溶性 Fe(III) と Fe(III)-MAs 錯体を形成し、Fe(III)-MAs 錯体は Fe(III)-MAs トランスポーターによって体内へ取り込まれる (Fig. 1-1B)。Fe(III)-MAs トランスポーター遺伝子としてトウモロコシ (*Zea mays*)、イネ、オオムギ (*Hordeum vulgare* L.) からそれぞれ *ZmYS1*、*OsYSL15*、*HvYSL2* が同定されている (Curie *et al.*, 2001, Inoue *et al.*, 2009, Lee *et al.*, 2009, Murata *et al.*, 2006)。さらに、近年イネの根から *OsIRT1*、*OsIRT2*、*OsNRAMP1* などの Fe(II) トランスポーター遺伝子が同定されており (Ishimaru *et al.*, 2006, 2012, Takahashi *et al.*, 2011)、イネ科植物であってもイネのように還元的な環境を好む種の場合には、Fe を Fe(II) の形で土壌から吸収していることが明らかになっている。

以上のような Fe 獲得機構によって根から吸収された Fe は、その後導管を通じて地上部 (茎や葉) に輸送され伸長途中の若い葉や果実へは篩管液を通じて輸送される (Fig. 1-3)。導管液は pH 5.5 前後の弱酸性を示し、篩管液は pH 8.0 前後の弱アルカリ性を示すが、これらの pH における Fe(III) の溶解度は非常に低いため、植物体内において Fe(III) は何らかの FIC と結合した状態で輸送されているものと考えられる。今日に至るまで導管液中の主要な FIC はクエン酸であると考えられてきた。これは Fe 欠乏下でトマト (*Solanum lycopersicum* Mill.)、ダイズ (*Glycine max* Merr.)、ソラマメ (*Vicia faba* L.) などの導管液中のクエン酸濃度が上昇するためである (Pich *et al.*, 1994, Brown and Tiffin, 1965, Nikolic and Römheld, 1999)。近年になって実際に Fe 欠乏状態のトマト導管液から Fe(III)₃-Cit₃ 錯体が同定されている (Rellán-Álvarez *et al.*, 2010)。また、イネ科植物の導管液中の FIC としては DMA が重要な働きを果たしていると考えられている。これはイネ (*Oriza sativa* L.) 導管液から DMA が検出されたことや (Kakei *et al.*, 2009)、イネの根から吸収された Fe(III)-DMA が実際に地上部へと移行することが示されているためである (Ishimaru *et al.*, 2006)。篩管液中の FIC としてはニコチアナミン [2(S),3'(S),3''(S)-N-[N-(3-amino-3-carboxypropyl)-3-amino-3-carboxypropyl]-azetidine-2-carboxylic acid, NA, Fig. 1-2A] が主要な役割を担っていると考えられている。NA はムギネ酸類の前駆物質であり、イネ科・非イネ科を問わず全ての高等植物が生合成する FIC である (Scholz *et al.*, 1992)。NA はムギネ酸類とは異なり根からは分泌されず、植物体内における Fe(II) および Fe(III) の輸送において大きな役割を果たしていると考えられている (Schuler *et al.*,

2012)。

以上のように、根からの Fe の吸収だけでなく植物体内における Fe の輸送にも FIC は大きく関与している。高等植物における Fe の栄養生理を理解する上で導管液や篩管液中の Fe の化学形態を詳細に解析することは必要不可欠であるが、これらについては未だ不明な点も多く全貌は明らかになっていない。これまでの研究で、前述の Rellán-Álvarez *et al.* (2010) によってトマト導管液中の Fe(III)-Cit 錯体が同定された他、Krüger *et al.* (2002) によってヒマ (*Ricinus communis* L.) 篩管液中で Fe(III) と結合している Iron Transport Protein (ITP) が同定され、Nishiyama *et al.* (2012) によってイネ篩管液中の Fe(III)-DMA が同定されたが、導管液や篩管液中で実際に Fe と錯体を形成している FIC が同定されたのはこの 3 例のみである。

(A) Strategy-I



(B) Strategy-II

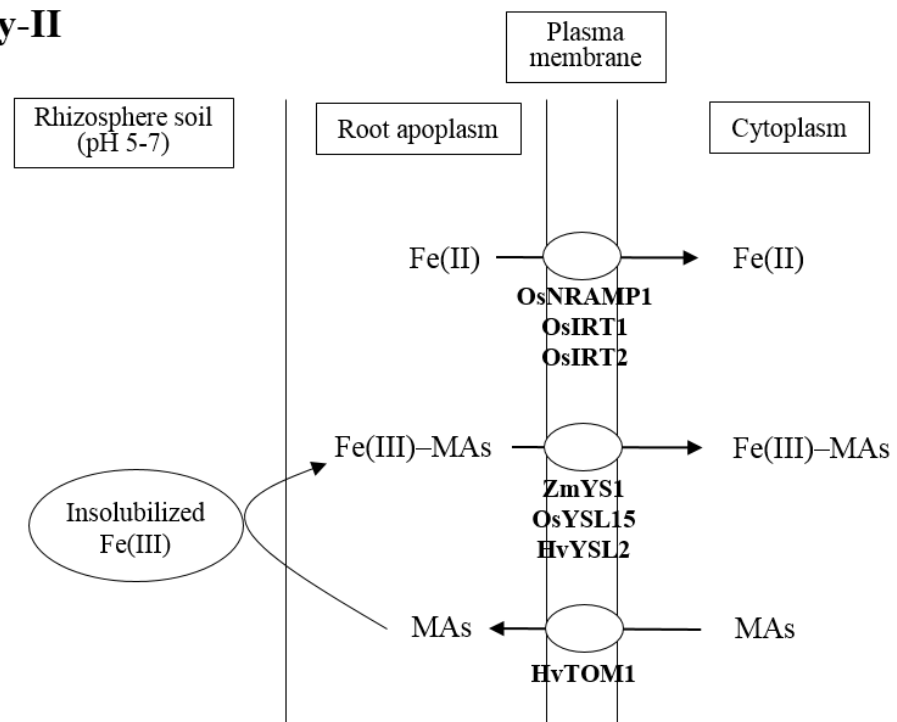
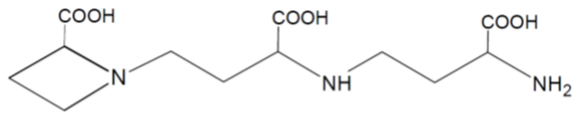
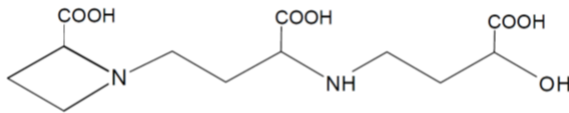


Figure1-1. Models of Fe acquisition from soil in (A) non-graminaceous (Strategy-I) and (B) graminaceous (Strategy-II) plans. [Modified from Römheld, (1994)]

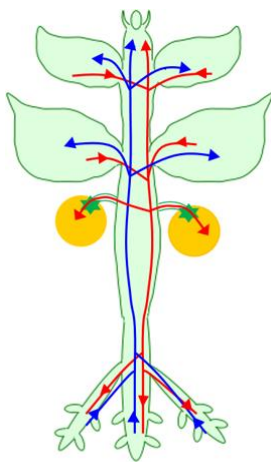


(A) Nicotianamine (NA)



(B) Deoxymugineic acid (DMA)

Figure1-2. Structures of nicotianamine (NA) and 2'-deoxy mugineic acid (DMA).



→ Phloem
→ Xylem

Figure1-3. Model of long-distance transport of water and nutrient in higher plants via xylem and phloem. Red arrow indicates flow path of phloem and blue arrow indicates flow path of xylem sap.

1.3 Fe(III)キレーター分析法

筆者は修士課程在学中にサイズ排除高速液体クロマトグラフィー (SE-HPLC) と原子吸光分析法 (GFAAS) を組み合わせて、イネ科植物および非イネ科植物導管液中の Fe の化学形態の分析を行った (参考文献、Ariga *et al.*, 2014)。これは SE-HPLC で分画したフラクションを一度分取し、各フラクション中の Fe 濃度を GFAAS で測定して Fe の溶出フラクションを特定するという方法であった。この方法は導管液中の Fe-FIC 錯体の分離と溶出した Fe の検出を一度に行うことができなかつたため、分析操作が煩雑になり分析に要する時間が長い、操作の途中で環境中の Fe によるコンタミネーションが非常に起こりやすく操作に熟練を要する、といった問題点があった。

HPLC による分離と UV-Vis 検出器による検出を組み合わせた HPLC 直接検出法は分離・検出を一度に行うことができる非常に簡便な分析法である。前述のように高等植物由来の代表的な FIC としてはクエン酸やリンゴ酸などの低分子有機酸や、ムギネ酸類が挙げられる。このうち低分子有機酸の分析には、カラム溶出液の 210 nm 付近における吸光度を検出する直接検出法が用いられている (Gomis *et al.*, 1988, Marcé *et al.*, 1990, Yang *et al.*, 2000, Nour *et al.*, 2010)。210 nm における吸光はカルボキシル基の $n-\pi^*$ 遷移によるものであるためカルボキシル基を有する化合物であれば一律に検出してしまい、Fe(III)キレート能の低い物質であっても検出してしまうという問題点があった。さらに、一般に吸光検出を用いた直接検出法は検出感度が低いという問題点もある。Nour *et al.* (2010) によって開発された直接検出法のクエン酸の検出限界は 210 pmol であった。クエン酸と同様に、代表的な合成金属キレーターであるエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) は 258 nm における吸光度を測定する直接検出法で検出されており (Loyaux-Lawniczak *et al.*, 1999)、この方法の検出限界は 1.71 pmol であった。

HPLC 直接検出法の検出感度の低さを改善するために、HPLC プレカラム誘導体化法と呼ばれる手法が一般的に用いられる。HPLC プレカラム誘導体化法は分析前に試料に誘導体化試薬を添加し、対象となる化合物を誘導体化したのちカラムで分離し、誘導体の示す特異的な吸光や蛍光を検出する手法である。この HPLC プレカラム誘導体化法を用いた低分子有機酸の分析法がこれまでにいくつか開発されている。これらの方法では、低分子有機酸の有するカルボキシル基がフェナシル (Mentasti *et al.*, 1985, Caccamo *et al.*, 1986)、2-ナフタシル (Cooper *et al.*, 1974)、*p*-ニトロベンジル (Grushka *et al.*, 1975, Badoud *et al.*, 1986) などの誘導体化試薬を用いて修飾され、誘導体の示す特異的な波長の吸光

が検出される。これらの分析法のうち、Grushka ら (1975) によって開発された分析法の検出限界はマロン酸が 15 pmol であった。HPLC プレカラム誘導体化法は一般に直接検出法より検出感度は向上するものの、試料に煩雑な手順からなる前処理を加える必要があり、夾雑物が多い試料を分析する場合には試料マトリクスとの予期せぬ相互作用も考えられ生体試料の分析には不向きであった。

FIC の中でもムギネ酸類の分析には従来、HPLC プレカラム誘導体化法または HPLC ポストカラム法が用いられてきた。HPLC ポストカラム法はカラムで試料を分離した後にポストカラム溶液と反応させ、対象となる化合物を検出する手法である。カラムによる分離後に試料とポストカラム溶液と反応させるため、試料マトリクスとの相互作用の影響を考慮する必要がなく、また HPLC カラムを用いた対象物質の分離と検出器による対象物質の特異的な検出を一度の分析で行うことができる簡便な方法である。また、検出器は HPLC 用の UV-Vis 検出器や蛍光検出器、化学発光検出器を用いることができる、大掛かりな装置も必要としない。ムギネ酸類は第一級および第二級アミノ基を有し、これらの官能基はムギネ酸類の HPLC プレカラム誘導体化法、または HPLC ポストカラム法において修飾の標的となる部位である。フェニルイソチオシアネートを用いたムギネ酸類の HPLC プレカラム誘導体化法では、ムギネ酸類の有するアミノ基が誘導体化され、誘導体の示す特異的な波長の吸光が検出される (Howe *et al.*, 1999)。また、*o*-フタルアルデヒドを用いた HPLC ポストカラム法 (Mori *et al.*, 1987, Neumann *et al.*, 1999) や 9-フルオレニルメチルクロロホルマーを用いた HPLC プレカラム誘導体化法 (Wheal *et al.*, 2002) でもアミノ基が誘導体化され、誘導体が示す特異的な蛍光が検出される。これら従来法の検出限界はムギネ酸、2'-デオキシムギネ酸、3-エピヒドロキシムギネ酸、NA がそれぞれ、370、70 pmol (Wheal *et al.*, 2002) および 100、50 pmol (Neumann *et al.*, 1999) であった。

以上のように、従来の低分子有機酸やムギネ酸類分析法はカルボキシル基やアミノ基を一律に検出する手法であったため、Fe(III)とのキレート能の低い化合物であっても一律に検出してしまう、単一の分析法では低分子有機酸とムギネ酸を一度に分析することができない、などの問題点があった。また、検出感度も十分とは言えなかった。

1.4 本研究の目的

1.2 で述べたように根からの Fe の吸収や植物体内における Fe の輸送には FIC が大きく関与しており、高等植物の Fe 栄養生理を理解する上で FIC を選択的かつ高感度に検出する分析手法が必要不可欠である。このような分析手法が開発されれば、試料中にごく微量にしか存在しない FIC であっても高い Fe(III)キレート能を有していれば高感度に検出することができるようになるため、生体試料中に存在する FIC の機能の側面に着目した網羅的な解析が可能となる。

そこで、本研究では従来法のようにカルボキシル基やアミノ基など特定の化学構造に依存した検出を行うのではなく、FIC の機能の面に着目し Fe(III)とのキレート能を有する化合物を網羅的に分析できる分析法の開発を目的とした。本研究では、試料に複雑な前処理を加える必要がなく操作も非常に簡便な、HPLC ポストカラム法を応用して FIC を分離・検出する高感度な分析手法の開発を行った。第 2 章では、蛍光検出を用いた FIC 分析法を開発した。第 3 章では更に高感度な分析法の開発を目指して、一般に蛍光検出よりも高感度な検出が可能と言われている化学発光検出を用いた FIC 分析法の開発を行った。第 4 章では第 3 章で開発した高感度な FIC 分析法を応用して植物から採取した導管液中の FIC 分析を行い、導管液中の Fe の化学形態の解明を試みた。

第2章

蛍光法による Fe(III)キレーターの HPLC 分析法の開発

Journal of Chromatography B (2015) Vol. 985, pp. 48-53

2.1 はじめに

本章では、Fe(III)とのキレート能に従って FIC を特異的に検出する FIC 分析法の開発を目指した。本分析法は対象物質の化学構造に従って Fe(III)キレーター (FIC) を分析する従来法とは一線を画すものである。

蛍光物質の中には特定の金属イオンと結合して消光する性質を持つものがある。その中で、Fe(III)と結合し消光する性質を持つ蛍光物質の消光および脱消光の現象を HPLC ポストカラムに応用し FIC 分析法を開発しようと考えた。本分析法の検出原理の概略図を Fig. 2-1 に示す。ポストカラム溶液には Fe(III)と錯体を形成し消光した蛍光物質を加える。分析試料中の FIC をカラムで分離した後にポストカラム溶液と反応させ、Fe(III)-蛍光物質錯体中の Fe(III)を FIC と結合させることで蛍光物質を遊離させる。その際の脱消光で生じる蛍光を検出することによって FIC を検出する。本分析法はカルボキシル基やアミノ基といった特定の官能基を有しなくても Fe(III)キレート能を示す物質であれば検出することが可能であり、対象物質の化学構造ではなくその化学的な機能に着目して FIC を分析する新規の手法である。

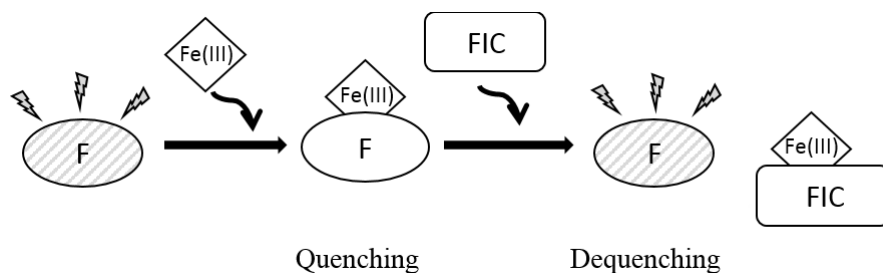
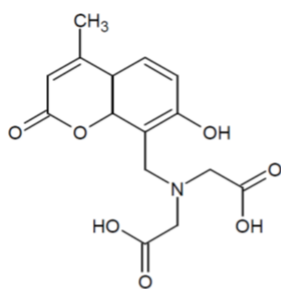


Fig. 2-1. Schematic diagram of detection mechanism of present method.

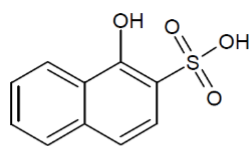
F: fluorescent substance.

カルセインブルー [CB、8-[N,N-Bis (carboxymethyl) aminomethyl]-4-methylumbelliferone、Fig. 2-2A] は pH 4.0~11.0 において $\lambda_{em} = 440 \text{ nm}$ の強い蛍光を有する蛍光物質であり、先行研究において CB と Fe(II) が結合し消光することが示されている (Noiré and Duréault, 1995)。1-ナフトール-2-スルホン酸 (1-NOH-2-S、Fig. 2-2B) も CB と同様に Fe(III) と結合して消光する蛍光物質である。水への溶解性が高いという特徴や、蛍光強度が比較的強く Fe(III) への結合の選択性も高いといった特徴を利用して工業排水中の Fe(III) の高感度フローインジェクション分析 (FIA) に利用されている (Sayour *et al.*, 2011)。1-ヒドロキシ-2-ナフトエ酸 (1-H-2-NA、Fig. 2-2C) や 2-ヒドロキシ-1-ナフトエ酸 (2-H-1-NA、Fig. 2-2D) などのナフタレン誘導体も Fe(III) と結合し消光することが知られており (Rodríguez-Cáceres *et al.*, 2005)、ナフタレン (Fig. 2-2E) も陰イオン界面活性剤の共存下で Fe(III) により消光することが知られている (Vargas *et al.*, 2005)。

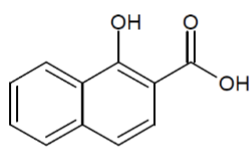
本章ではこれら CB、1-NOH-2-S、1-H-2-NA、2-H-1-NA、ナフタレンを用いた FIC 分析法の開発可能性についてそれぞれ検討し、高感度な FIC 分析法の開発を目指して分析条件の最適化を行った。FIC の分離および検出には、操作が簡便かつ対象物質の分離と検出を一度に行うことが可能な HPLC ポストカラム法を採用した。



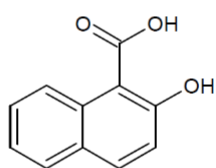
(A) Calcein Blue (CB)



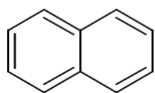
(B) 1-Naphthol-2-sulfonic acid
(1-NOH-2-S)



(C) 1-Hydroxy-2-naphthoic acid
(1-H-2-NA)



(D) 2-Hydroxy-1-naphthoic acid
(2-H-1-NA)



(E) Naphthalene

Fig. 2-2. Structures of fluorescent substance studied in this research; (A) Calcein Blue (CB), (B) 1-naphthol-2-sulfonic acid (1-NOH-2-S), (C) 1-hydroxy-2-naphthoic acid (1-H-2-NA), (D) 2-hydroxy-1-naphthoic acid (2-H-1-NA) and (E) naphthalene.

2.2 材料および方法

2.2.1 試薬

1-ナフトール-2-スルホン酸 (1-NOH-2-S)、1-ヒドロキシ-2-ナフトエ酸 (1-H-2-NA)、2-ヒドロキシ-1-ナフトエ酸 (2-H-1-NA)、クエン酸一水和物、マロン酸、DL-リンゴ酸、シュウ酸、DL-酒石酸、L (+) -アスコルビン酸ナトリウム、DL-乳酸、酢酸、プロピオン酸、L-ヒスチジンは和光純薬工業株式会社 (大阪、日本) から、CB [8-[N,N-Bis (carboxymethyl) aminomethyl]-4-methylumbelliferone]、2-morpholinoethanesulfonic acid monohydrate (MES)、2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperziny] ethanesulfonic acid (HEPES)、エチレンジアミン-N,N,N',N'-四酢酸ナトリウム鉄(III) [Fe(III)-EDTA] は同仁化学研究所 (熊本、日本) から、ナフタレンは関東化学株式会社 (東京、日本) から購入した。アセトニトリル(高速液体クロマトグラフ用)、メタノール(高速液体クロマトグラフ用)、ホウ酸は国産化学株式会社 (日本) から購入した。試薬の溶解や希釈にはミリ Q 超純水 (Merckmillipore、Darmstadt、ドイツ) を使用した。

CB はアルカリ性溶液への溶解性が高いため、秤量した CB はまず少量の 1 M KOH に溶解し、その後 pH 6.0 に調整した 50 mM の MES 緩衝液で希釈して 10 μ M の CB ストック溶液を調整した。ストック溶液は 1 ヶ月ごとに調整した。1-NOH-2-S は水への溶解性が比較的高いため、秤量した 1-NOH-2-S を直接ミリ Q に溶解して 1 mM の 1-NOH-2-S ストック溶液を調整した。1-H-2-NA、2-H-1-NA およびナフタレンも同様に水への溶解性が低いため、それぞれ一度メタノールに溶解させた後ミリ Q で希釈して 1 mM の 1-H-2-NA ストック溶液、1 mM 2-H-1-NA ストック溶液および 10 mM のナフタレンストック溶液を調整した。

2.2.2 蛍光スペクトルのおよび Fe(III)の添加による消光の測定

2.2.2.1 CB の蛍光スペクトル測定

10 μ M CB ストック溶液を pH 6.0 に調整した 50 mM の MES/NaOH 緩衝液で希釈し、終濃度 200 nM の CB 水溶液を調整した。この CB 水溶液の蛍光スペクトルを蛍光光度計 (FP-6500、日本分光株式会社、東京、日本) で測定した。励起波長 λ_{ex} は 330 nm に設定し、蛍光波長 $\lambda_{em} = 350 \sim 600$ nm における蛍光強度を測定した。また、Fe(III)の添加による CB の消光を測定するために、終濃度 0~200 nM の Fe(III)と終濃度 100 nM の CB を pH 3.0、4.0、6.0、7.0 に調整した pH 緩衝液中で混合し、 $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 330/440$ nm に

おける蛍光強度を蛍光光度計で測定した。pH 3.0 および 4.0 の pH 緩衝液として 50 mM クロロ酢酸緩衝液、pH 6.0 の pH 緩衝液として 50 mM MES/NaOH 緩衝液、pH 7.0 の pH 緩衝液として 50 mM HEPES/NaOH 緩衝液を用いた。また、pH 6.0 における CB の消光について更に詳しく調べるために、終濃度 0~400 nM の Fe(III)と終濃度 200 nM の CB を 50 mM の MES/NaOH バッファー (pH 6.0) と 20%アセトニトリル中で混合し、 $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 330/440$ nm における蛍光強度を蛍光光度計で測定した。得られた測定値を元に CB と Fe(III)の結合定数を求め、その結合定数を元に Origin8.1 (OriginLab、MA、アメリカ合衆国) を用いて非線形最小二乗法により Fe(III)による CB の消光曲線を作成した。さらに、Fe(III)-CB 水溶液にクエン酸を添加するバッチ実験を行い、実際に CB の脱消光による蛍光回復が観察されるかを確認した。終濃度 200nM の Fe(III)-CB と終濃度 0~2500 nM のクエン酸を 50 mM の MES/NaOH バッファー (pH 6.0) と 20%アセトニトリル中で混合し、 $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 330/440$ nm における蛍光強度を蛍光光度計で測定した。

2.2.2.2 1-NOH-2-S の蛍光スペクトル測定

1 mM の 1-NOH-2-S ストック溶液を 50 mM の MES/NaOH 緩衝液 (pH 6.0) で希釈し、終濃度 20 μ M の 1-NOH-2-S 水溶液を調整した。この 1-NOH-2-S 水溶液の蛍光スペクトルを蛍光光度計で測定した。励起波長は 283 nm に設定した。また、Fe(III)の添加による 1-NOH-2-S の消光を測定するために、終濃度 0~200 μ M の Fe(III)と 20 μ M の 1-NOH-2-S を pH 6.0 に調整した 50 mM MES 緩衝液中で混合し、 $\lambda_{ex} = 283$ nm、 $\lambda_{em} = 350$ nm または 450 nm における蛍光強度を蛍光光度計で測定した。

2.2.2.3 1-H-2-NA および 2-H-1-NA の蛍光スペクトル測定

1 mM の 1-H-2-NA および 2-H-1-NA のストック溶液をそれぞれ 50 mM の MES/NaOH 緩衝液 (pH 6.0) で希釈し、終濃度 20 μ M の 1-H-2-NA および 2-H-1-NA 水溶液を調整した。これらの水溶液の蛍光スペクトルを蛍光光度計で測定した。励起波長は 1-H-2-NA が 340 nm、2-H-1-NA が 290 nm に設定した。また、Fe(III)の添加による 1-H-2-NA および 2-H-1-NA の消光を測定するために、終濃度 0~400 μ M の Fe(III)と 20 μ M の 1-H-2-NA および 2-H-1-NA を 50 mM の MES/NaOH 緩衝液中で混合し、1-H-2-NA は $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 340/415$ nm、2-H-1-NA は $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 290/409$ nm における蛍光強度を蛍光光度計で測定した。

2.2.2.4 ナフタレンの蛍光スペクトル測定

ナフタレンの蛍光スペクトルを測定するため、ナフタレンの 10 mM ストック溶液を 10 mM の SDS を含む 50 mM の MES/NaOH 緩衝液 (pH 6.0) で希釈し、終濃度 100 μ M のナフタレン水溶液を調整した。SDS は水へのナフタレンの溶解性を高めるため Vargas ら (2005) の方法を参考にして添加した。励起波長 275 nm におけるナフタレン水溶液の蛍光スペクトルを蛍光光度計で測定した。また、Fe(III)の添加によるナフタレンの消光を測定するために、終濃度 0~2000 μ M の Fe(III)と 100 μ M のナフタレンを 50 mM の MES/NaOH 緩衝液 (pH6.0) 中で混合し、 $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 275/335$ nm における蛍光強度を蛍光光度計で測定した。

2.2.3 HPLC 分析条件

使用した HPLC システムは Pump 1 (PU2080) と Pump 2 (PU-980)、デガッサー (DG 2080-53)、オートサンプラー (AS-950-10)、カラムオープン (CO-965)、蛍光検出器 (FP-2025) から構成されている (Fig. 2-3)。いずれも日本分光株式会社 (日本) のものを使用した。カラムはイオン排除カラム (8.0 mm \times 50 mm、RSpak KC-811、昭和電工株式会社、日本) にガードカラム (8.0 mm \times 50 mm、RSpak KC-LG、昭和電工株式会社) を取り付けて使用した。カラムオープンは 50 $^{\circ}$ C に設定し、カラムと反応コイルを収納した。FIC の分離には移動相として 1 mM HClO₄ を用いたアイソクラティック溶出を行った。移動相はミリ Q を用いて分析日ごとに新たに調整し、十分脱気してから使用した。移動相の送液には Pump 1 を用い流速は 1 mL/min に設定した。各分析試料はオートサンプラーで 20 μ L ずつインジェクトした。分析試料に含まれる FIC をカラムで分離した後、ポストカラム溶液中の Fe(III)-蛍光物質錯体と反応コイル内で反応させた。ポストカラム溶液は Pump 2 を用いて流速 1 mL/min で送液した。ポストカラム溶液は 50 mM MES/NaOH 緩衝液と 20% アセトニトリルからなり、Fe(III)と蛍光物質を含む。反応コイルは PEEK チューブ (長さ 1 m \times 内径 0.25 mm) で構成され、反応コイルの温度はカラムオープン内で 50 $^{\circ}$ C に保った。蛍光検出器では $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 330/440$ nm における蛍光強度を測定した。HPLC 蛍光検出器によるカラム溶出液のシグナル測定は溶出時間 0.5 秒毎に行った。

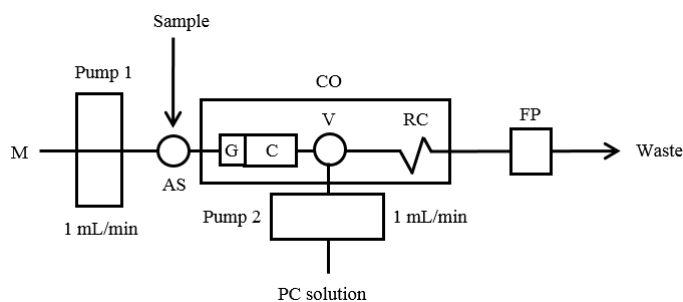


Fig. 2-3. Schematic diagram of HPLC detection system. M: mobile phase (1 mM HClO₄); PC solution: post-column solution containing CB: Fe(III), MES pH buffer and acetonitrile; Pump1: PU-2080 (Jasco); Pump2: PU-980 (Jasco); AS: automatic sampler (AS-950-10, Jasco); C: an ion exclusion column (8.0 mm × 300 mm, RSpak KC-811, Shodex); G: a guard column (8.0 mm × 50 mm, RSpak KC-LG, Shodex); V: three-way valve; RC: reaction coil [PEEK tubing (3 m long × 0.25 mm i.d.)]; CO: column oven (CO-965, Jasco) containing the column and reaction coil; UV: UV detector (UV-Vis, Jasco); FP: fluorescence detector (FP-2025, Jasco, $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 330/440$ nm).

2.2.4 分析条件の最適化

分離に使用するカラムやポストカラム溶液組成などの分析条件の最適化には FIC として 100 μ M のクエン酸を用いた。ポストカラム溶液の組成によってクロマトグラムのノイズの大きさが著しく増減したため、最適化はノイズの大きさに対するピーク高さの割合 (S/N 比) の比較によって行った。ノイズの大きさは溶出時間 3.0~4.0 分におけるシグナル強度の標準偏差として定義した。この溶出時間にはクエン酸は溶出しないことを確認している。

2.2.5 FIC 標準物質の分析および検出限界の決定

FIC の標準物質として有機酸からクエン酸、シュウ酸、マロン酸、リンゴ酸、乳酸、酒石酸、酢酸、アスコルビン酸を、アミノ酸からはヒスチジン、システインを選択し、開発した FIC 分析法を用いて分析を行った。それぞれのストック溶液を 1 mM の HClO₄ 水溶液で適宜希釈し、0.45- μ m の遠心ろ過フィルターユニット (Ultrafree-MC、Merck Millipore、Darmstadt、ドイツ) でろ過してからカラムに 20 μ L インジェクトした。次に、検出が可能であった FIC に関して、その検出限界を求めた。クエン酸、シュウ酸、マロ

ン酸、リンゴ酸、乳酸、酒石酸、アスコルビン酸水溶液をそれぞれ 20 μ L インジェクトし、クロマトグラム上に現れたピークの高さを求め、検量線を作成した。検出限界は $S/N = 3$ として計算した。また、各 FIC の検出感度 (Sensitivity) を比較する際には検量線の傾き [クロマトグラム上のピーク高さ/濃度 (V/M)] を求め、これを検出感度と定義して比較した。

2.2.6 植物の栽培

冷蔵保存していたオオムギ (*Hordeum vulgare* L. cv Ehimehadaka No.1) の種子を 1% の次亜塩素酸ナトリウムで 30 分間殺菌した後、プラスチック製の網に載せ、pH 5.5 に調整した蒸留水に浮かべて暗所で 7 日間発芽させた。発芽およびその後の栽培は、自然光人工気象室において昼/夜 = 25/20°C の条件で行った。発芽した幼苗の中から大きさが均等なものを 24 本選別し、20 L の水耕液を含むプラスチック製コンテナへ移植した。水耕液は蒸留水中に 2.0 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 、0.7 mM K_2SO_4 、0.5 mM MgSO_4 、0.1 mM KH_2PO_4 、0.1 mM KCl 、100 μ M $\text{Fe}(\text{III})\text{-EDTA}$ 、10 μ M H_3BO_3 、10 μ M MnSO_4 、0.5 μ M ZnSO_4 、0.2 μ M CuSO_4 、0.01 μ M $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ を含む水溶液である。水耕液の pH は希釈 HCl または NaOH を用いて 5.5 に調整した。水耕液の水替えは 7 日おきに行い、pH の調整は 3 日おきに行った。水耕液は常にエアレーションした。

2.2.7 オオムギ導管液の採取

自然光人工気象室で 28 日間栽培を行った植物体の地上部と根の境目から上方約 2 cm の部分をステンレスのカミソリ刃 (B-43-1SW、貝印株式会社、日本) で切断し、切断面から滲出する導管液をピペットマン (Eppendorf、Hamburg、ドイツ) で採取した。切断後最初の 5 分間に滲出した導管液は、篩管液などによるコンタミネーションが予想されたためキムワイプ (日本製紙クレシア株式会社、東京、日本) で拭き取り破棄した。採取した導管液は 1.5 mL のマイクロチューブ (WATSON、兵庫、日本) に入れ、分析を行うまで -80°C の冷凍庫で保管した。

2.3 結果

2.3.1 Fe(III)イオンによる蛍光試薬の消光

2.3.1.1 カルセインブルー (CB) の蛍光スペクトルと Fe(III)の添加による消光

pH 6.0 の溶液中における 200 nM CB の蛍光スペクトルを Fig. 2-4A に示した。CB は $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 330/440$ nm において蛍光強度が最大になった。pH 3.0~7.0 の条件で様々な濃度の Fe(III)を CB に添加し消光が見られるかを確認すると、pH 3.0、4.0、6.0、7.0 の全ての pH において消光が観察された (Fig. 2-5)。pH 6.0 における CB の消光について更に詳細に調べるため、200 nM の CB に終濃度 0~400 nM の Fe(III)を添加し $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 330/440$ nm における蛍光強度を測定した (Fig. 2-6 の黒丸)。添加した Fe(III)の濃度が 200 nM 以下の時、CB の蛍光強度は添加した Fe(III)の濃度に従って直線的に減少したが、200 nM 以上になるとそれ以上は変化しなかった。この結果は、CB が Fe(III)と 1:1 錯体を形成することによって消光するという Yoshida ら(1993)の報告と一致している。CB は Fe(III)以外にも Cu(II)、Mn、Ni、Co(II)、Pd、Fe(II)等と結合して消光することが知られているが (Wilkins *et al.*, 1960, Huitink *et al.*, 1974, Noiré and Duréault, 1995)、本研究の Fig. 2-4 および Fig. 2-5 の結果から、pH 3.0~7.0 において CB は Fe(III)とも結合し消光することが示された。また Fig. 2-4B に示したように、CB に対して Fe(III)が過剰に存在する条件においてフリーの CB の約 18%の強度の蛍光が観察された。フリーの CB は $\lambda_{em} = 440$ nm において極大を示すが (Fig. 2-4A)、Fe(III)濃度が 400 nM の時は $\lambda_{em} = 415$ nm において極大を示していた (Fig. 2-4B)。この蛍光極大波長のシフトは Fe(III)-CB 錯体自体が $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 330/415$ nm において弱い蛍光を示しており、Fe(III)濃度が 400 nM 以上の時の蛍光はフリーの CB によるものではなく Fe(III)-CB の有する蛍光であることを示している。

次に、終濃度 200 nM の CB に 0~400 nM の Fe(III)を添加した混合液の蛍光強度を測定しグラフにしたものが Fig. 2-6 の黒丸である。混合液中の Fe(III)の総濃度を $[Fe]_{total}$ 、CB の総濃度を $[CB]_{total}$ 、フリーの CB の濃度を $[Fe]$ 、フリーの CB の濃度を $[CB]$ 、Fe(III)-CB 錯体の濃度を $[FeCB]$ とすると

$$[Fe]_{total} = [Fe] + [FeCB] \quad \dots \textcircled{1}$$

$$[CB]_{total} = [CB] + [FeCB] \quad \dots \textcircled{2}$$

の式が成立する。また、混合液中の CB と Fe(III)の間には下記③の式で示す化学平衡が成立しており、この平衡定数を④の式で示すように K とする。



$$K = \frac{[\text{FeCB}]}{[\text{CB}][\text{Fe}]} \quad \dots \textcircled{4}$$

また、混合液の蛍光強度の実測値を y、フリーの CB の蛍光強度を決定する定数を α 、Fe(III)-CB 錯体の蛍光強度を決定する定数を β とすると蛍光の実測値 y は

$$y = \alpha [\text{L}] + \beta [\text{FeL}] \quad \dots \textcircled{5}$$

で表すことができる。①、②、④、⑤の式から、 $[\text{Fe}]_{\text{total}}$ は以下の式で表すことができる。

$$[\text{Fe}]_{\text{total}} = [\text{L}]_{\text{total}} (\alpha - \beta) / K(y - \beta [\text{L}]_{\text{total}}) - Ay - 1/K + A \alpha [\text{L}]_{\text{total}}$$

この式と、混合液中の $[\text{Fe}]_{\text{total}}$ と $[\text{L}]_{\text{total}}$ および蛍光実測値 y の値から非線形最小二乗法を用いて Fe(III)と CB の 1:1 錯体の結合定数 K を求めると、 $K_{\text{Fe(III)CB}} = 5.2 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ の値が得られた。この結合定数を用いた CB の消光曲線は Fig. 2-6 の実線で示され、黒丸で示した蛍光の実測値と良好な一致を示した。Fe(III)との安定度定数はクエン酸が 11.2、EDTA が 25.1 (Martell and Smith, 1977)、ムギネ酸類の 1 つであるデオキシムギネ酸 (DMA) が 18.4 (Murakami *et al.*, 1989) であり CB と Fe(III)の結合定数は既知の FIC よりも十分に低いこと、また Fe(III)-CB 錯体にクエン酸を加えるバッチ実験を行うと実際に CB が脱消光したことから (Fig. 2-7)、CB の消光と脱消光を HPLC ポストカラム法に応用することで高感度な FIC 分析法を開発できると考えた。

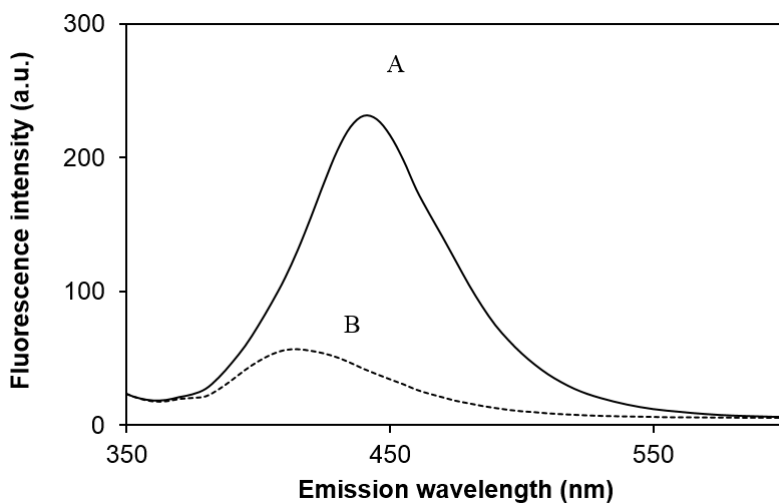


Fig. 2-4. Fluorescence spectra of (A) 200 nM CB and (B) 200 nM CB added 400 nM Fe(III). Each sample contains 200 nM CB, (A) 0 nM or (B) 400 nM Fe(III), 50 mM MES/NaOH buffer (pH6.0) and 20% acetonitrile at final concentration. Fluorescence spectra was measured at $\lambda_{ex} = 330$ nm using the fluorescence spectrophotometer. Scan speed was 5000 nm/min and slit of emission wavelength was 5 nm.

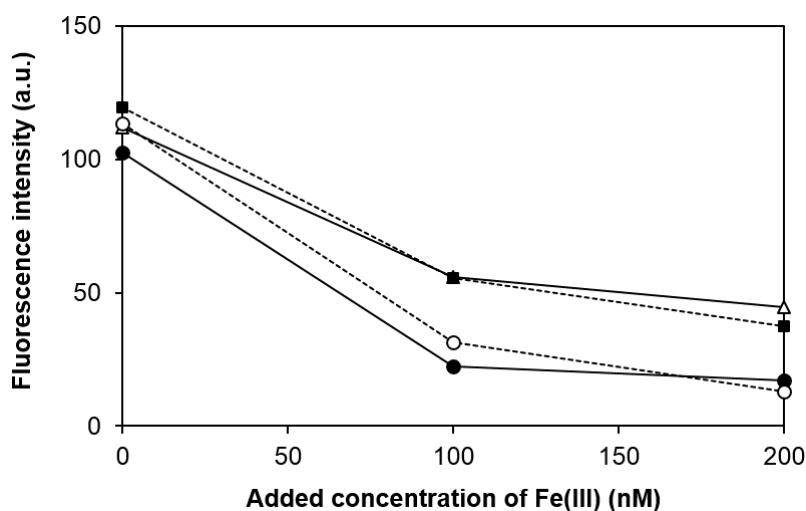


Fig. 2-5. Quenching of CB by Fe(III) ion. FeCl_3 in 1 mM HCl were added to 100 nM CB in pH 3.0 (open triangle), pH 4.0 (closed square and dashed line), pH 6.0 (closed circle), or pH 7.0 (open circle and dashed line). Each reaction mixture contains 100 nM CB, 1-200 nM Fe(III), and 50 mM monochloroacetic acid buffer (pH 3.0 or 4.0), 50 mM MES/NaOH buffer (pH 6.0), or 50 mM HEPES/NaOH buffer (pH 7.0). Fluorescence intensity of each reaction mixture was measured at $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 330/440$ nm using the fluorescence spectrophotometer. The fluorescent intensities were plotted against added concentration of Fe(III).

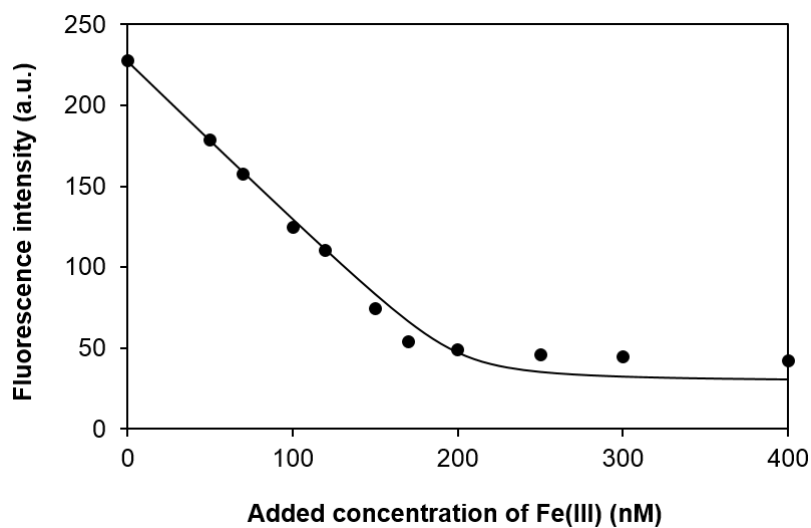


Fig. 2-6. The quenching curve of CB by Fe(III) ion. FeCl₃ in 1 mM HCl were added to 200 nM CB in 50 mM MES/NaOH buffer and 20% acetonitrile. Each reaction mixture contains 200 nM CB, 0-400 nM Fe(III), 50 mM MES/NaOH buffer (pH6.0), and 20% acetonitrile at final concentration. Fluorescence intensity of each reaction mixtures was measured at $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 330/440$ nm using the fluorescence spectrophotometer. The fluorescent intensities of each reaction mixture were plotted against added concentration of Fe(III).

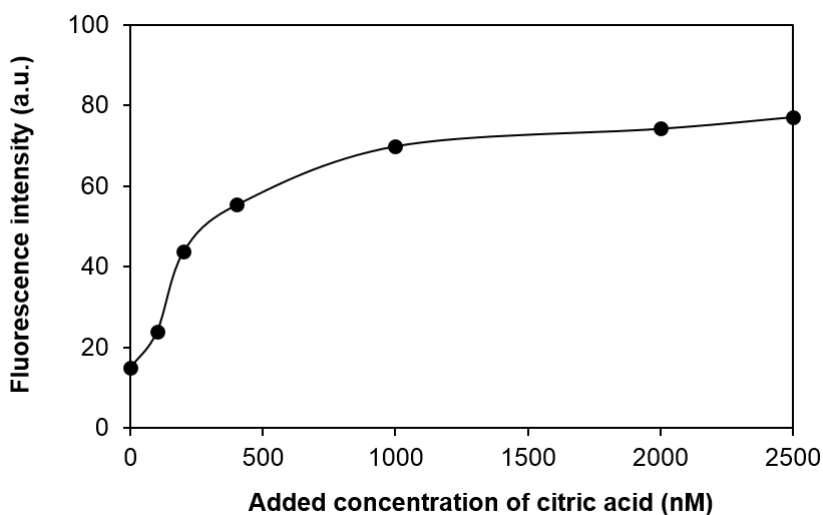


Fig. 2-7. Fluorescence dequenching Fe(III)-CB by citric acid. Citric acid were added to 100 nM Fe(III)-CB. Each reaction mixture contains 100 nM CB-Fe(III), 0-2500 nM citric acid, 50 mM MES/NaOH buffer (pH6.0), and 20% acetonitrile at final concentration. Fluorescence intensity of each reaction mixtures was measured at $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 330/440$ nm using the fluorescence spectrophotometer. The fluorescent intensities of each reaction mixture were plotted against added concentration of citric acid.

2.3.1.2 1-ナフトール-2-スルホン酸 (1-NOH-2-S) の消光

pH 6.0 における 20 μM 1-NOH-2-S の蛍光スペクトルは Fig. 2-8 の実線 A であり、 $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 283/350 \text{ nm}$ および $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 283/450 \text{ nm}$ で蛍光強度が最大を示した。 $\lambda_{\text{em}} = 350 \text{ nm}$ は 1-NOH-2-S によるものであり、 $\lambda_{\text{em}} = 450 \text{ nm}$ は 1-NOH-2-S から水素イオンが解離した 1-NO⁻-2-S によるものであると推測されている (Abdel-Shafi, 2001)。20 μM の 1-NOH-2-S に 200 μM の Fe(III)を加えると $\lambda_{\text{em}} = 350 \text{ nm}$ および 450 nm とともに蛍光強度の減少が見られたが、完全には消光しなかった (Fig. 2-8B)。Fe(III)による 1-NOH-2-S の消光についてさらに詳細に調べるために、pH6.0 の 50 mM MES/NaOH 緩衝液中で 20 μM の 1-NOH-2-S と 0~200 μM の Fe(III)を混合した時の 1-NOH-2-S の蛍光強度の変化を蛍光光度計で測定したところ、 $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 283/350 \text{ nm}$ および $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 283/450 \text{ nm}$ 双方で蛍光強度は減少した (Fig. 2-9)。以上のことから、1-NOH-2-S、1-NO⁻-2-S 双方とも Fe(III)と錯体を形成し消光することが示されたが、1-NOH-2-S は CB と比較して蛍光強度が弱く、なおかつ高濃度の Fe(III)を添加しても完全に消光しなかったことから、ポストカラム法を応用した FIC 分析法に用いた場合の FIC の検出感度は良好ではないと考えられた。そのため、ポストカラム法に使用する蛍光試薬として CB の方がより適していると判断した。

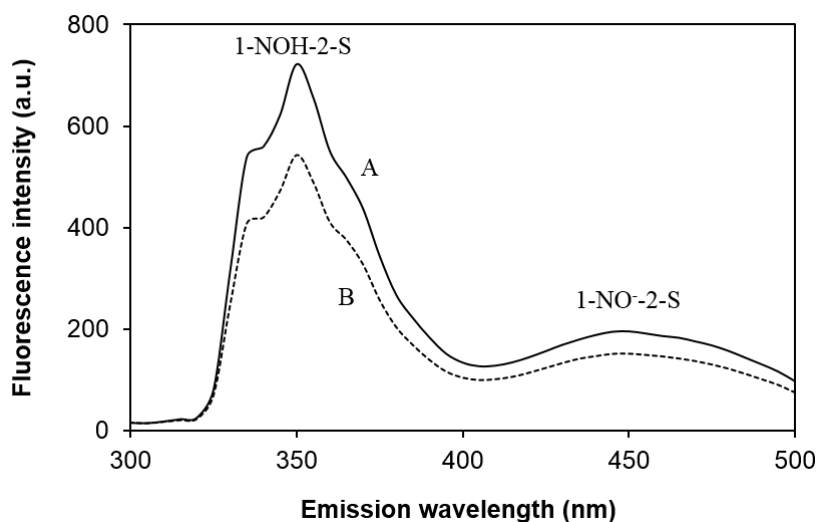


Fig. 2-8. Fluorescence spectra of (A) 20 μM 1-NOH-2-S and (B) 20 μM 1-NOH-2-S added 200 μM Fe(III) in 50 mM MES/NaOH buffer (pH 6.0). Each sample contains 20 μM 1-NOH-2-S, (A) 0 μM or (B) 20 μM Fe(III), and 50 mM MES/NaOH buffer (pH6.0) at final concentration. Fluorescence spectra was measured at $\lambda_{\text{ex}} = 283$ nm using the fluorescence spectrophotometer. Scan speed was 5000 nm/min and slit of emission wavelength was 5 nm.

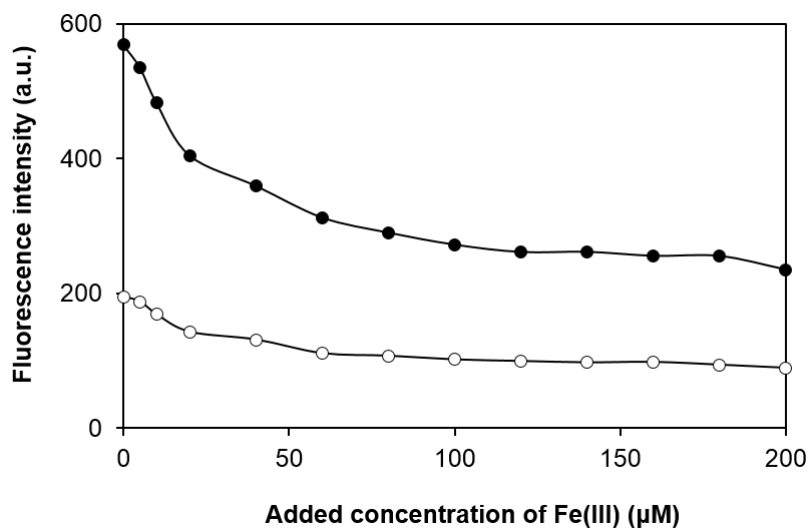


Fig. 2-9. Quenching of 1-NOH-2-S by Fe(III) ion. FeCl_3 in 1 mM HCl were added to 20 μM 1-NOH-2-S in 50 mM MES/NaOH buffer (pH 6.0). Each reaction mixture contains 20 μM 1-NOH-2-S, 0-200 μM Fe(III), and 50 mM MES/NaOH buffer (pH6.0) at final concentration. Fluorescence intensity of each reaction mixtures was measured at $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 283/350$ nm (closed circle) or 283/450 nm (open circle) using the fluorescence spectrophotometer. The fluorescent intensities were plotted against added concentration of Fe(III).

2.3.1.3 1-ヒドロキシ-2-ナフトエ酸 (1-H-2-NA) および 2-ヒドロキシ-2-ナフトエ酸 (2-H-1-NA) の消光

pH 6.0 における 20 μM 1-H-2-NA と 20 μM 2-H-1-NA の蛍光スペクトルはそれぞれ Fig. 2-10、2-12 の実線で示した A のようになり、1-H-2-NA は $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}=340/415\text{ nm}$ で、2-H-1-NA は $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}=290/409\text{ nm}$ で蛍光強度は最大になった。20 μM 1-H-2-NA および 20 μM 2-H-1-NA にそれぞれ 400 μM の Fe(III)を加えると両者とも蛍光強度は減少したが (Fig. 2-10B、2-12B)、完全には消光しなかった。

Fe(III)による 1-H-2-NA および 2-H-1-NA の消光についてさらに詳細に調べるために、pH 6.0 の 50 mM MES/NaOH 緩衝液中で 20 μM 1-H-2-NA または 20 μM 2-H-1-NA と 0~400 μM の Fe(III)をそれぞれ混合した時の蛍光強度の変化を蛍光光度計で測定したところ、Fe(III)の濃度が 0~400 μM の範囲において蛍光強度が減少した (Fig. 2-11、2-13)。このことから、1-H-2-NA と 2-H-1-NA とともに Fe(III)と錯体を形成し消光することが示されたが、1-H-2-NA および 2-H-1-NA はいずれも CB と比較すると蛍光強度が弱く、高濃度の Fe(III)を加えても完全には消光しなかったことから、ポストカラム法を用いた Fe(III)-FIC 分析に用いる蛍光試薬としては CB の方がより適していると判断した。

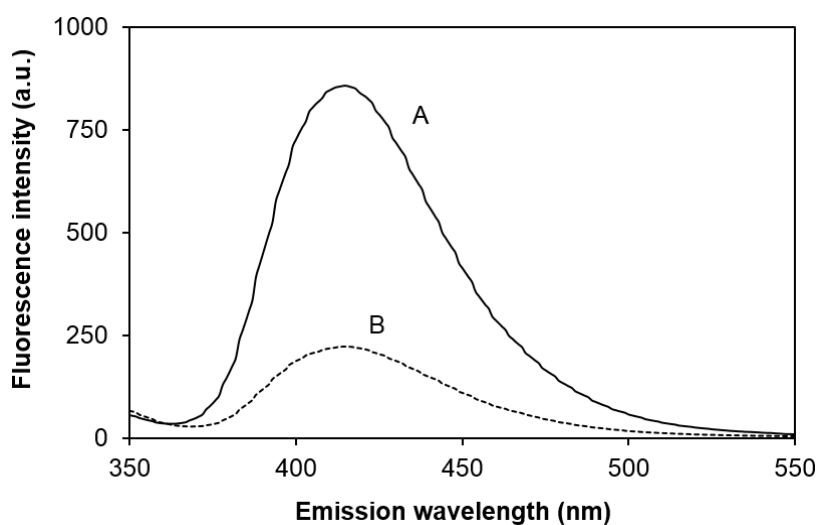


Fig. 2-10. Fluorescence spectra of (A) 20 μM 1-H-2-NA and (B) 20 μM 1-H-2-NA added 400 μM Fe(III) in 50 mM MES/NaOH buffer (pH 6.0). Each sample contains 20 μM 1-H-2-NA, (A) 0 μM or (B) 400 μM Fe(III), and 50 mM MES/NaOH buffer (pH6.0) at final concentration. Fluorescence spectra was measured at $\lambda_{\text{ex}} = 340$ nm using the fluorescence spectrophotometer. Scan speed was 5000 nm/min and slit of emission wavelength was 5 nm.

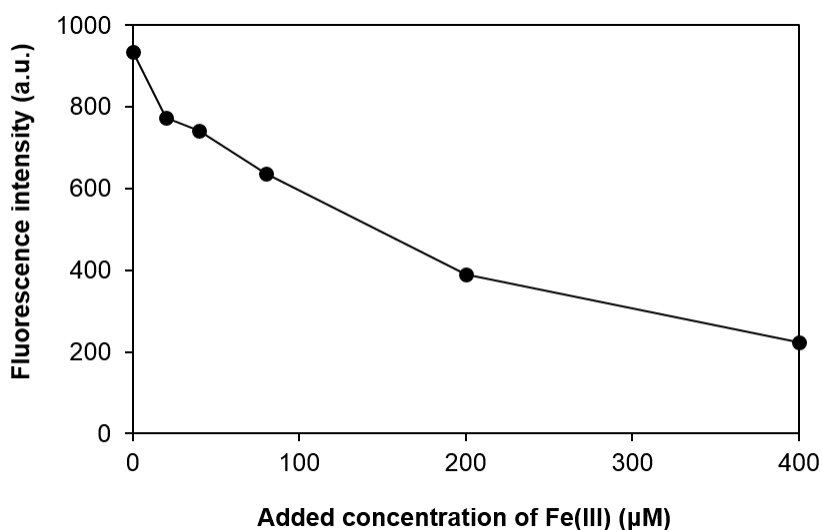


Fig. 2-11. Quenching of 1-H-2-NA by Fe(III) ion. FeCl_3 in 1 mM HCl were added to 20 μM 1-H-2-NA in 50 mM MES/NaOH buffer (pH 6.0). Each reaction mixture contains 20 μM 1-H-2-NA, 0-400 μM Fe(III), and 50 mM MES/NaOH buffer (pH 6.0) at final concentration. Fluorescence intensities of each reaction mixtures were measured at $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 340/415$ nm using the fluorescence spectrophotometer. The fluorescent intensities were plotted against added concentration of Fe(III).

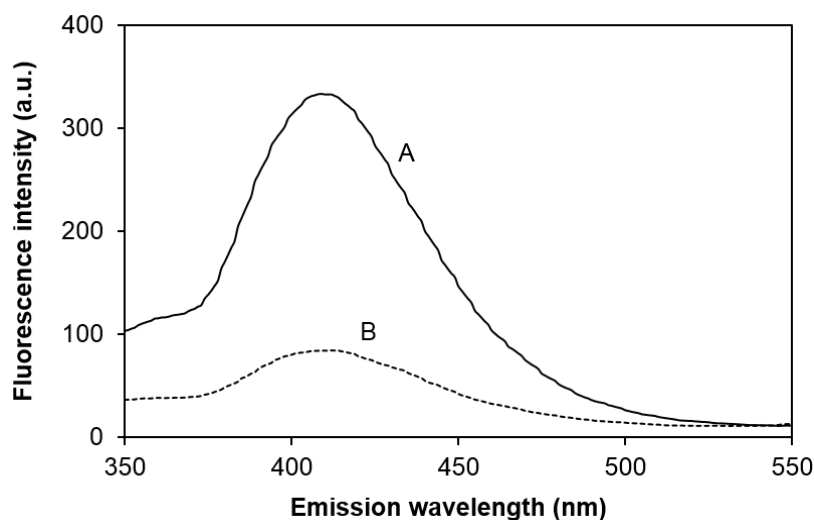


Fig. 2-12. Fluorescence spectra of (A) 20 μM 2-H-1-NA and (B) 20 μM 2-H-1-NA added 400 μM Fe(III) in 50 mM MES/NaOH buffer (pH 6.0). Each sample contains 20 μM 2-H-1-NA, (A) 0 μM or (B) 400 μM Fe(III), and 50 mM MES/NaOH buffer (pH6.0) at final concentration. Fluorescence spectra was measured at $\lambda_{\text{ex}} = 290$ nm using the fluorescence spectrophotometer. Scan speed was 5000 nm/min and slit of emission wavelength was 5 nm.

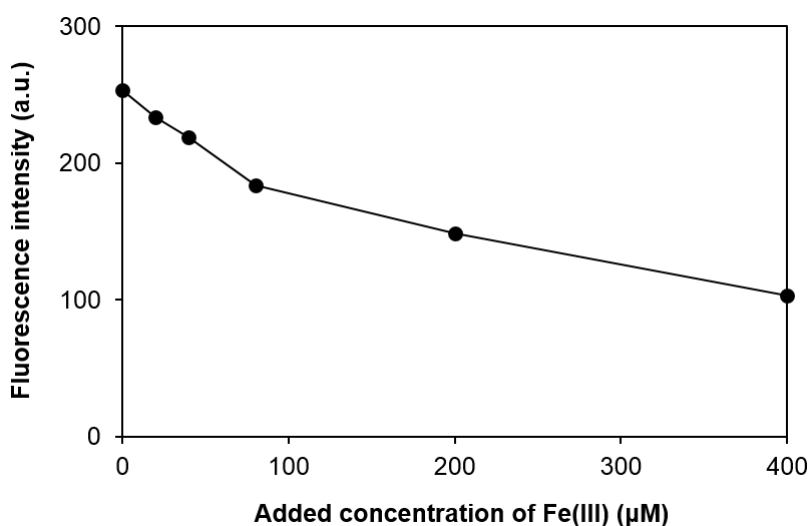


Fig. 2-13. Quenching of 2-H-1-NA by Fe(III) ion. FeCl_3 in 1 mM HCl were added to 20 μM 2-H-1-NA in 50 mM MES/NaOH buffer (pH 6.0). Each reaction mixture contains 20 μM 2-H-1-NA, 0-400 μM Fe(III), and 50 mM MES/NaOH buffer (pH 6.0) at final concentration. Fluorescence intensities of each reaction mixtures were measured at $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 290/409$ nm using the fluorescence spectrophotometer. The fluorescent intensities were plotted against added concentration of Fe(III).

2.3.1.4 ナフタレンの消光

pH 6.0 における 100 μM ナフタレンの蛍光スペクトルを Fig. 2-14A に示す。蛍光強度は $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 275/325 \text{ nm}$ および 335 nm で最大になった。2000 μM の Fe(III)を加えると $\lambda_{\text{em}} = 325 \text{ nm}$ および 335 nm とともに蛍光強度の減少が見られたが (Fig. 2-14B)、完全には消光しなかった。Fe(III)によるナフタレンの消光についてさらに詳細に調べるために、pH6.0 の 50 mM MES/NaOH 緩衝液中で 100 μM のナフタレンと 0~2000 μM の Fe(III)を混合すると $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 275/325 \text{ nm}$ における蛍光強度は減少した (Fig. 2-15)。ナフタレンは CB と比較すると蛍光強度が弱く、高濃度の Fe(III)を加えても完全には消光しなかったことから、ポストカラム法を用いた Fe(III)-FIC 分析に用いる蛍光試薬としては CB の方がより適していると判断した。

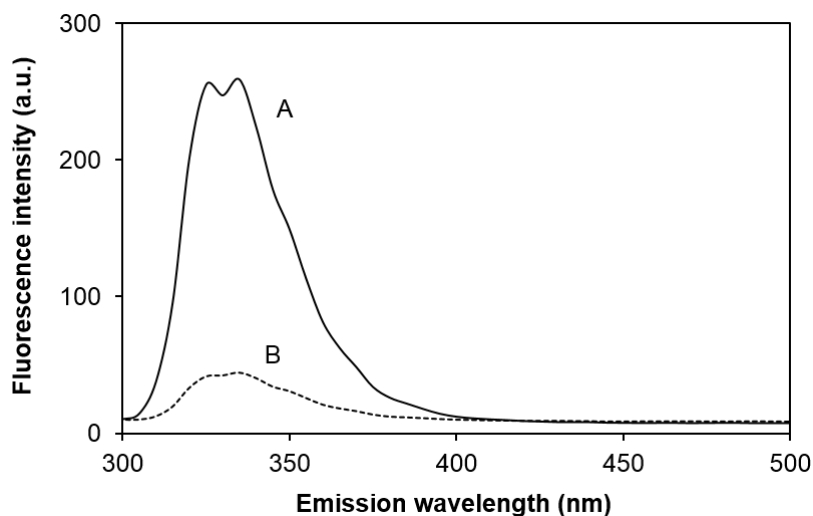


Fig. 2-14. Fluorescence spectra of (A) 100 μM naphthalene and (B) 100 μM naphthalene added 2000 μM Fe(III) in 50 mM MES/NaOH buffer (pH 6.0). Each sample contains 100 μM naphthalene, (A) 0 μM or (B) 100 μM Fe(III), and 50 mM MES/NaOH buffer (pH6.0) at final concentration. Fluorescence spectra was measured at $\lambda_{\text{ex}} = 275$ nm using the fluorescence spectrophotometer. Scan speed was 5000 nm/min and slit of emission wavelength was 5 nm.

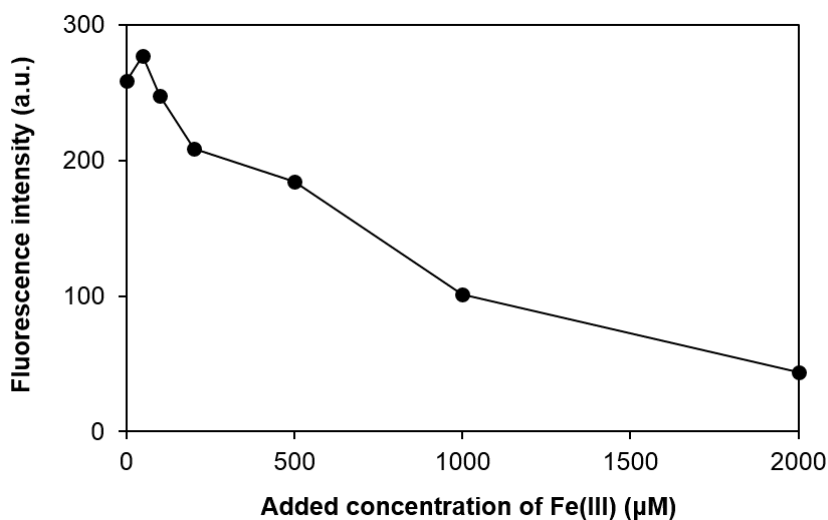


Fig. 2-15. Quenching of naphthalene by Fe(III) ion. FeCl_3 in 1 mM HCl were added to 100 μM naphthalene in 50 mM MES/NaOH buffer (pH 6.0). Each reaction mixture contains 100 μM naphthalene, 0-2000 μM Fe(III), and 50 mM MES/NaOH buffer (pH 6.0) at final concentration. Fluorescence intensities of each reaction mixtures were measured at $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 272/335$ nm using the fluorescence spectrophotometer. The fluorescent intensities were plotted against added concentration of Fe(III).

2.3.2 分析条件の最適化

FIC の検出感度は分離に使用するカラムやポストカラム溶液の組成などの分析条件の影響を大きく受けるため、その最適化を行った。

2.3.2.1 使用するカラムの選択

本分析法の開発にあたって FIC の分離に使用するカラムとして、有機酸類の分離に汎用されるイオン排除クロマトグラフィー用カラム RSpak KC-811 の他に、低分子化合物の分離に汎用される逆相クロマトグラフィー用カラム TSKgel ODS-80_{TM} (東ソー株式会社、日本) を検討した。

まず初めに、ODS-80_{TM} を使用して 1 mM クエン酸を分離した後、10 nM の CB および Fe(III) と pH 緩衝液からなるポストカラム溶液と反応コイル内で反応させた。ODS-80_{TM} を用いた分離では、5%メタノールを含む 0.1%の TFA 水溶液 (A 液) と 40%メタノールを含む 0.1%の TFA 水溶液 (B 液) を用いたグラジエント溶出を行った。グラジエント溶出の条件は、0~5.0 分において A 液 100%、5.0~20.0 分において B 液 0~50%、20.0~25.0 分において B 液 50~0%のリニアグラジエント、25.0~30.0 分において A 液 100%である。Fig. 2-16A~D にそれぞれ pH 3.0、4.0、5.0、6.0 のポストカラム溶液を用いて 1 mM クエン酸を検出した際のクロマトグラムを示した。pH 3.0 および 4.0 の pH 緩衝液としては 50 mM モノクロロ酢酸緩衝液、pH 5.0 の緩衝液としては 50 mM 酢酸緩衝液、pH 6.0 の緩衝液としては 50 mM の MES 緩衝液を用いた。pH 6.0 のポストカラム溶液を使用した場合にピークは激しくテーリングし、またそれに伴ってベースラインも大きく上昇している (Fig. 2-16D)。210 nm における吸光度を測定したクロマトグラムではピークのテーリングやベースラインの上昇は見られなかったことから (データは示さず)、これらの現象はポストカラム反応に起因していると考えられる。また、Fig. 2-16A~D を見るとポストカラム溶液の pH が上がるにつれてテーリングやベースラインの上昇がより激しくなっていることから、ポストカラム溶液の pH が上がるにつれてカラム溶出液とポストカラム溶液の混合液中での Fe(III)の溶解性が低下することがこの現象の一因ではないかと推測される。一方、イオン排除カラム RSpak KC-811 を用いて 1 mM のクエン酸を分離した後、10 nM の CB および Fe(III) と pH 6.0 に調整した 50 mM の MES/NaOH 緩衝液 (pH 6.0) からなるポストカラム溶液と反応コイル内で反応させた時のクロマトグラムを Fig. 2-16E に示した。RSpak KC-811 は 100%水系の移動相の使用が可能であり、移動相として 1 mM の HClO₄ 水溶液を使用した。クエン酸のピークには若

干のテーリングが見られたものの、ODS-80TMを使用した場合のクロマトグラムと比較してその程度は軽くベースラインの上昇も見られなかった。この理由として、移動相として 100%水系の溶液を使用しているため溶出液における Fe(III)の溶解性を高く保つことができ、Fe(III)の沈殿が起こりにくかったためと推測される。そこで以降は RSpak KC-811 を使用して分析条件の最適化を行うことにした。

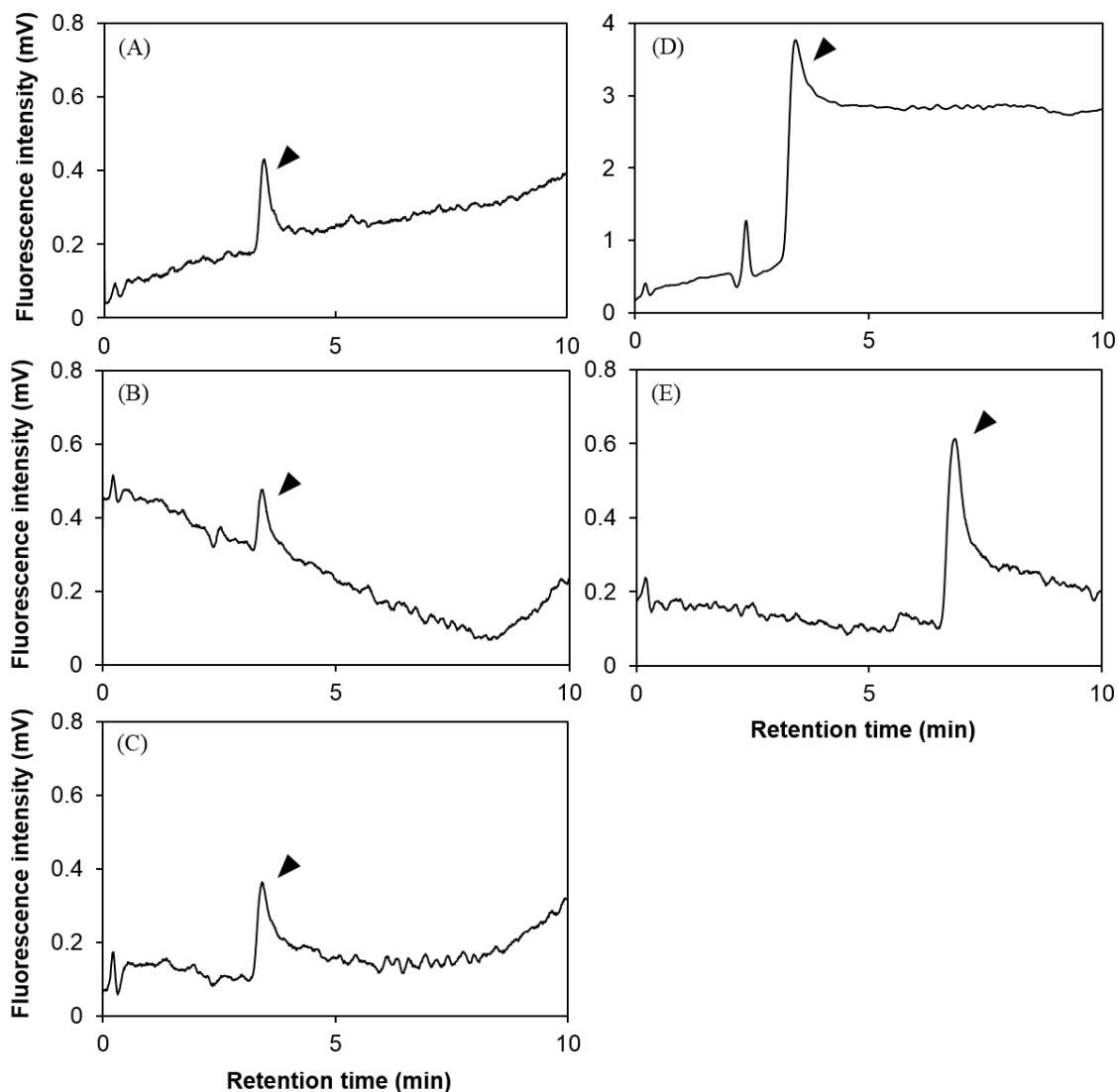


Fig. 2-16. Chromatograms of 20 μ L-spikes of 1 mM citric acid which were separated using (A)-(D) ODS 80_{TM} column (E) or RSpak KC-811 column. Each column eluate was reacted with PC solution which contains 10 nM CB, 10 nM Fe(III) and 50 mM monochloroacetic acid buffer at (A) pH 3.0 or (B) pH 4.0, (C) 50 mM acetate buffer at pH 5.0, or (D, E) 50 mM MES buffer at 6.0. With ODS 80_{TM} column, gradient elution was operated using solution A: 20% methanol in 0.1% TFA solution and solution B: 40% methanol in 0.1% TFA. The time course of this gradient elution is as follows; 0-5.0 min: 100% solution A, 5.0-20 min: 0-50% solution B, 20-25 min: 50-0% solution B, 25-30 min: 100% solution A. With RSpak KC-811 column, isocratic elution was operated using 1 mM HClO₄ solution. Arrow heads indicate 20- μ L spike of 1 mM citric acid.

2.3.2.2 ポストカラム溶液へのアセトニトリルの添加

次に、20 nM の CB と 10 nM の Fe(III)を含む 50mM MES/NaOH 緩衝液 (pH 6.0) からなるポストカラム溶液を用い、分離には RSpak KC-811 を使用して 100 μ M クエン酸を分析すると Fig. 2-17A に示すようにピークがテーリングしピーク高さも低かったが、ポストカラム溶液にアセトニトリルを添加するとピークテーリングは解消しピーク高さも大幅に増大した (Fig. 2-17C、D)。アセトニトリルを 20% または 40% 含むポストカラム溶液を用いて 100 μ M クエン酸を分析した際のクロマトグラムを比較すると、両者でピーク形状に大きな違いはなかった (Fig. 2-17C、D)。アセトニトリルと同様に有機溶媒であるメタノールを 20% 添加した場合にはピークテーリングは解消しなかった (Fig. 2-17B)。そこで、ポストカラム溶液にはピークテーリングに防止のために 20% のアセトニトリルを添加することとした。アセトニトリルの添加によりクエン酸のピーク形状が改善しピーク高さも高くなったのは、ポストカラム溶液中の CB の溶解性が向上したためと考えられる。

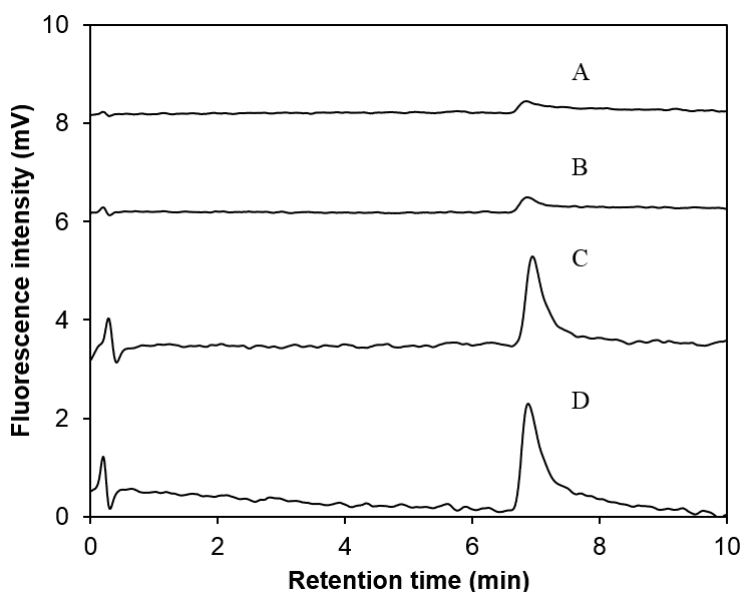


Fig. 2-17. Chromatogram of a 20- μ L spike of 100 μ M citric acid using PC solutions containing 20 nM CB and 10 nM Fe(III) in 50 mM MES/NaOH buffer at pH 6.0 added (A) no organic solvent, (B) 20% methanol, (C) 20% acetonitrile or (D) 40% acetonitrile.

2.3.2.3 ポストカラム溶液中の CB と Fe(III)濃度の最適化

ポストカラム溶液中の CB と Fe(III)の濃度は、FIC の検出感度を決定する重要な要因になるため、高感度分析法の開発を目指して最適化を行うことにした。まず初めに、ポストカラム溶液中の CB 濃度について検討するために、CB と Fe(III)を等量ずつ含むポストカラム溶液を用いて 100 μM クエン酸を分析した。CB 濃度および Fe(III)濃度が 10 nM 以下の時、100 μM のクエン酸を検出することができなかった。一方で、CB 濃度および Fe(III)濃度を 40 nM 以上に設定するとクロマトグラムのノイズが顕著に大きくなったことから（データは示さず）、ポストカラム溶液中の CB 濃度は 20 nM に設定することにした。

次に、ポストカラム溶液中の Fe(III)濃度を最適化するため、Fe(III)濃度の異なるポストカラム溶液を用いて 100 μM クエン酸を分析した際のクロマトグラムからピーク高さ、ノイズ大きさおよび S/N 比を求め比較した。Fig. 2-18A に示したように Fe(III)が 3 nM の場合を除いてポストカラム溶液中の Fe(III)濃度が低い程ピーク高さは高くなり、ノイズの大きさは Fe(III)が 7 nM の場合を除いて Fe(III)濃度が低い程大きくなる傾向があった (Fig. 2-18B)。これは、ポストカラム溶液とカラム溶出液の 1:1 混合液中の Fe(III)濃度が低いほど、混合液中のフリーの CB 濃度が増加しバックグラウンドの蛍光強度が増加するためと考えられる。ここで、上で求めた CB と Fe(III)の結合定数 [$K_{\text{Fe(III)CB}} = 5.2 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$] を用いて、10 nM CB を含む混合液が示す蛍光強度と混合液中の Fe(III)濃度の関係を求めたものが Fig. 2-19 である。本分析法ではポストカラム溶液とカラム溶出液の 1:1 混合液中でポストカラム反応が起こっているため、Fig. 2-19 は 20 nM の CB を含むポストカラム溶液を用いて分析を行った際の HPLC クロマトグラムのバックグラウンド蛍光強度をシミュレートしたものである。このシミュレーション結果から、反応液中の Fe(III)が減少するにつれてフリーの CB が増加し CB の示すバックグラウンド強度が増加することが示された。この曲線の一次微分係数の絶対値は FIC を分析した際のクロマトグラム上の FIC のピーク高さを反映する数値であるが、この数値とポストカラム溶液中の Fe(III)濃度の関係をグラフにしたものが Fig. 2-19 右上の挿入図である。Fe(III)濃度が低いほど傾きの絶対値は大きくなっており、これは Fig. 2-18A においてクエン酸のピーク高さは Fe(III)濃度が低い程大きくなったことと一致している。

Fig. 2-18C には 100 μM クエン酸の示す S/N 比の変化を示した。ポストカラム溶液中の Fe(III)の濃度が 3~20 nM の時 S/N 比は大きく変化しなかったが、ポストカラム溶液中の Fe(III)濃度が 10 nM よりも小さくなるとクロマトグラムの形状に変化が見られた。

すなわち、Fig. 2-20A のクロマトグラムはポストカラム溶液中の Fe(III)濃度が 7 nM の時のものを示すが、ベースラインが徐々に上昇し不安定になっている。このような現象は Fe(III)濃度が 3 nM および 5 nM の時にも同様に観察された。一方でポストカラム溶液中の Fe(III)濃度が 10 nM の時ベースラインは安定し、ピーク形状も正常であった (Fig. 2-20B)。以上の結果を踏まえて、ポストカラム溶液に添加する最適の Fe(III)濃度としては 10 nM を選択した。

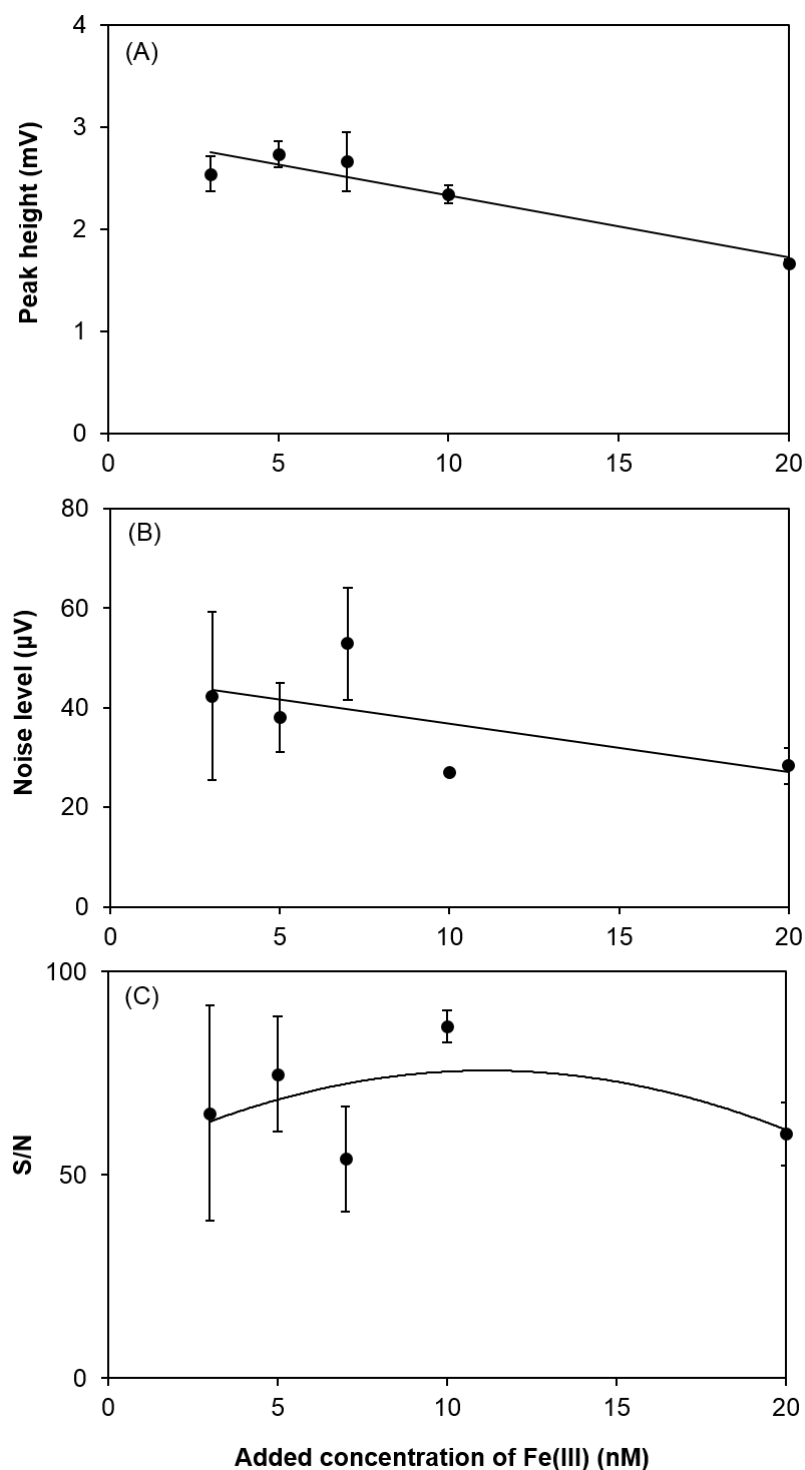


Fig. 2-18. Effect of added concentration of Fe(III) in PC solution on the (A) peak height, (B) noise level, and (C) S/N ratio. Each parameter was obtained from chromatograms of a 20- μ L spike of 100 μ M citric acid which were monitored by HPLC fluorescence detector at $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 330/440$ nm after the post-column reaction with PC solutions of various Fe(III) concentration. Each PC solution contains 20 nM CB, 3-20 nM Fe(III), 50 mM MES buffer of pH6.0 and 20% acetonitrile.

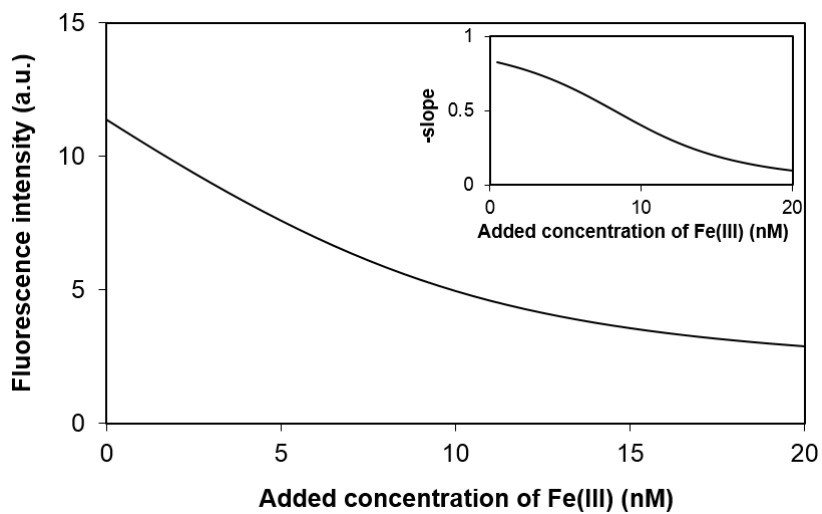


Fig. 2-19. The background fluorescence intensity of 10 nM CB was calculated from the determined conditional association constant. The insert shows the first derivative of the fluorescence intensity.

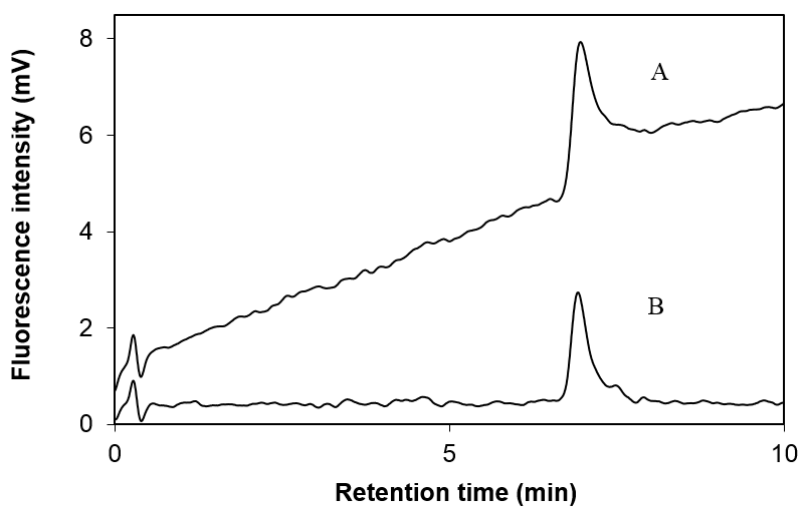


Fig. 2-20. Chromatograms of 20- μ L spike of 100 μ M citric acid. Fluorescence signals were monitored by HPLC fluorescence detector at $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 330/440$ nm after the post-column reaction with PC solution which contained 20 nM CB and (A) 7 nM or (B) 10 nM Fe(III) in 50 mM MES buffer (pH 6.0) and 20% acetonitrile.

2.3.2.4 ポストカラム溶液 pH の最適化

次にポストカラム溶液の pH を最適化した。20 nM の CB と 10 nM の Fe(III)、20% のアセトニトリルを含むポストカラム溶液の pH を 5.0~7.5 まで変化させ、100 μ M のクエン酸 20 μ L をインジェクトした際のピーク高さ、ノイズ大きさ、S/N 比をそれぞれ比較した。pH 5.0~6.5 のポストカラム溶液は pH 緩衝液として 50 mM MES/NaOH 緩衝液を使用し、pH 7.0~7.5 のポストカラム溶液は 50 mM の HEPES/NaOH 緩衝液を使用した。Fig. 2-21A に示すようにポストカラム溶液の pH が 5.0~6.5 の時、ピーク高さは徐々に増加した。また、pH 6.5~7.0 の時はほとんど変化せず、pH 7.5 において急激に減少した。ノイズの大きさは Fig. 2-21B に示すように pH 5.0~6.0 において比較的小さいが、pH 6.5~7.5 において増加した。S/N は Fig. 2-21C に示すように pH 6.0 において最大となったため、ポストカラム溶液の最適 pH は 6.0 と求めた。

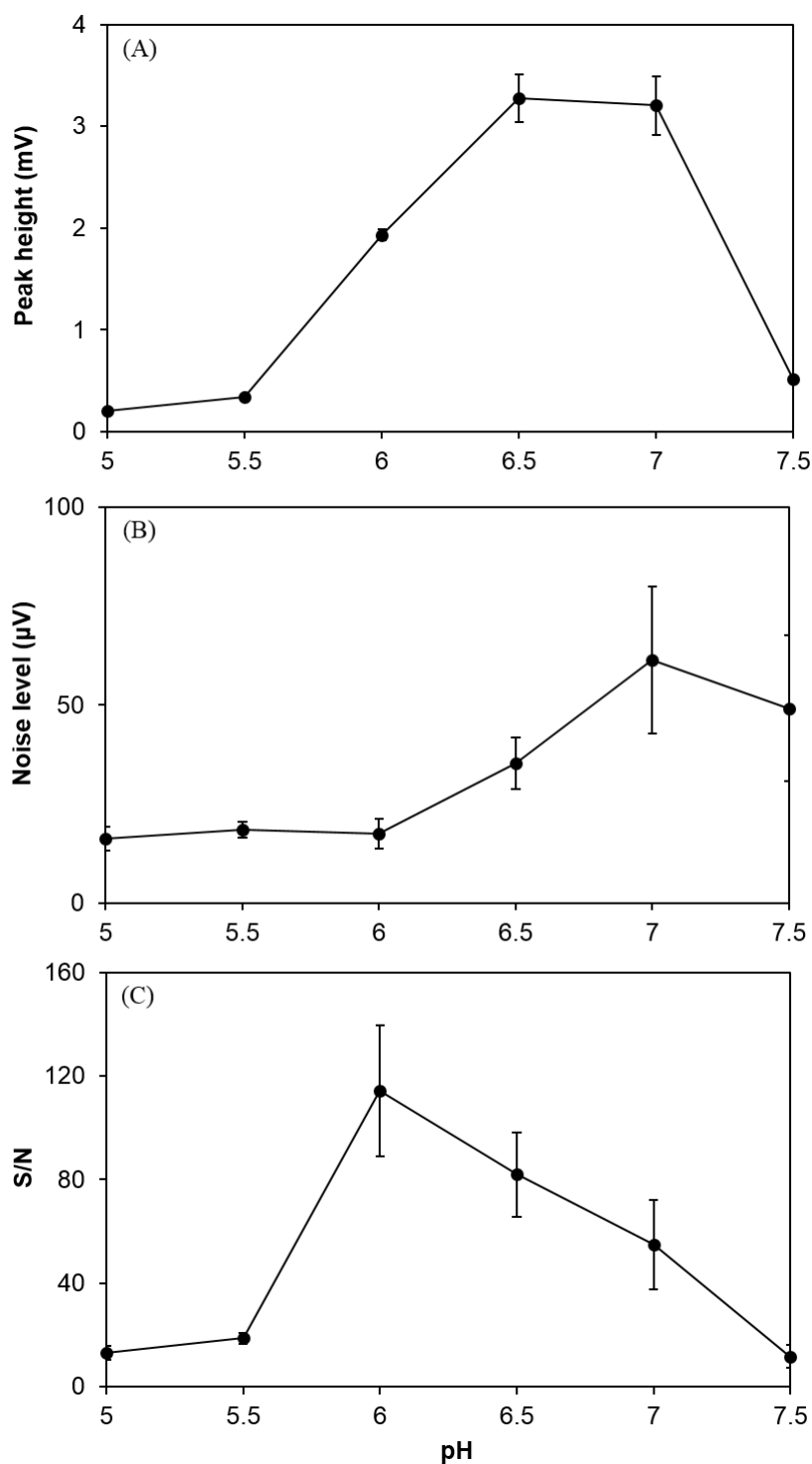


Fig. 2-21. Effect of pH of PC solution on the (A) peak height, (B) noise level, and (C) S/N ratio. Each parameter was obtained from chromatograms of a 20- μ L spike of 100 μ M citric acid which were monitored by HPLC fluorescence detector at $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 330/440$ nm after the post-column reaction with PC solutions of various pH. Each PC solution contains 20 nM CB, 10 nM Fe(III), 50 mM pH buffer (pH5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0 was MES/NaOH buffer and pH7.5 was HEPES/NaOH buffer) and 20% acetonitrile.

2.3.2.5 ポストカラム溶液への界面活性剤の添加

Al(III)によって消光する性質を持つ蛍光試薬 *m*-カルボキシフェニルフルオロン (MCPF) を用いた研究において、Hoshino *et al.* (2011) は Al(III)と MCPF の混合液に 0.1%の PVP または 1 mM の Zp と 0.1%の Brij35 を合わせて添加した場合、Al(III)による MCPF の消光の程度がいずれの界面活性剤も加えない場合よりも大きくなることを示し、これは混合液中でミセルが形成されることによって MCPF の溶解性が向上したことが理由であると考察している。このことから、MCPF と同様に水への溶解性が低い CB の場合にもポストカラム溶液へ界面活性剤を添加してその溶解性を上げることで、FIC の検出感度を向上できるのではないかと考えた。そこで本研究では上記の先行研究を参考にして、ポストカラム溶液に非イオン性界面活性剤の一つである PVP を単独で添加した場合、または陽イオン界面活性剤であるゼフィラミン (Zp) と非イオン性界面活性剤である Brij35 を混合して添加した場合に感度の向上が見られるかを検討した。

まず初めに、蛍光光度計を用いたバッチ実験を行った。界面活性剤を何も加えない 200 nM CB 水溶液、0.1%の PVP または 1 mM の Zp および 0.1%の Brij35 を添加した 100 nM の CB 水溶液の蛍光強度 (F_0 とする) を測定した。次にそれぞれの 200 nM CB 水溶液に 100 nM の Fe(III)を添加した時の蛍光強度 F を測定し ΔF ($F_0 - F$) を求めた。 ΔF の数値が大きい程、HPLC ポストカラム法に応用した時に高い検出感度が期待できる。その結果、Fig. 2-22 に示すように PVP を添加した場合に ΔF は最も大きくなった。

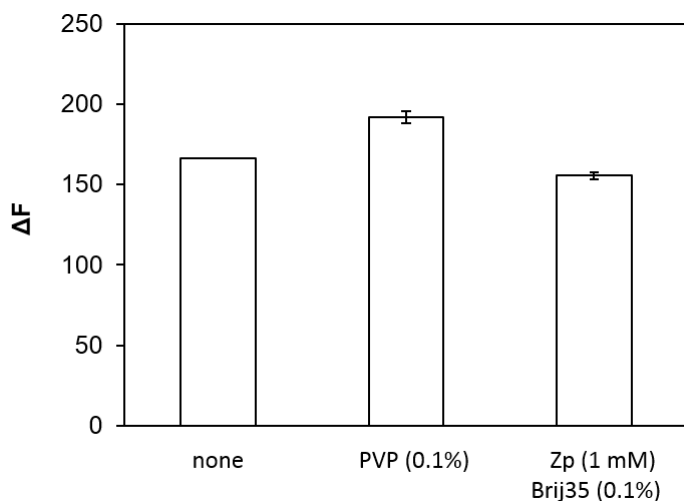


Fig. 2-22. Effect of addition of surface-active agent on ΔF of CB. 0.1% PVP or 1 mM zephiramine (Zp) and 0.1% Brij35 was added to 200 nM CB with or without 100 nM Fe(III) in 50 mM MES/NaOH (pH 6.0) and 20% acetonitrile. The ΔF is fluorescence intensity quenching value, which was calculated as difference between fluorescence intensity of 200 nM CB (F_0) and 200 nM CB with 100 nM Fe(III) (F). Fluorescence intensity was measured at $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 330/440$ nm using fluorescence spectrophotometer.

以上の結果から、ポストカラム溶液に PVP を添加した場合に検出感度の向上が期待できると考えられた。そこで RSpak KC-811 カラムを用いて 1 mM のクエン酸、500 μM のマロン酸、1 mM のリンゴ酸、10 mM の乳酸を分画した後、0.1% PVP を添加したポストカラム溶液と反応させた時に得られる FIC の検出感度 ($\mu\text{V}/\mu\text{M}$) を求め、比較することにした。ポストカラム溶液は 0.1% PVP の他に 20 nM CB、10 nM Fe(III)、50 mM MES/NaOH 緩衝液 (pH 6.0)、20% アセトニトリルを含む。PVP の添加前には検出感度はクエン酸が 21.6 $\mu\text{V}/\mu\text{M}$ 、マロン酸が 3.63 $\mu\text{V}/\mu\text{M}$ 、リンゴ酸が 0.888 $\mu\text{V}/\mu\text{M}$ 、乳酸が 0.0754 $\mu\text{V}/\mu\text{M}$ であったのに対し、PVP の添加後にはクエン酸が 13.9 $\mu\text{V}/\mu\text{M}$ 、マロン酸が 2.37 $\mu\text{V}/\mu\text{M}$ 、リンゴ酸が 0.797 $\mu\text{V}/\mu\text{M}$ 、乳酸が 0.0461 $\mu\text{V}/\mu\text{M}$ であった。以上のように PVP を添加することによって本実験で検証した全ての FIC において検出感度が低下していたことから、ポストカラム溶液への界面活性剤の添加は本分析法の検出感度の向上には応用できないことが示された。

2.3.2.6 ポストカラム溶液への Fe(III)の弱い配位子の添加

CB を用いた FIC の分析においては、検出にポストカラム溶液中の Fe(III)-CB とサンプル中の FIC の間での配位子置換反応を用いているが、この配位子置換反応において Fe(III)-CB から Fe(III)-FIC に変化する際、反応中間体として Fe(III)に水分子が配位したアクア錯体が存在すると考えられる。酢酸イオン (CH_3COO^-) に代表されるカルボン酸イオンは 2 個の酸素原子が 2 つの金属イオンに配位して橋掛け構造を持つカルボキシラート架橋錯体を形成する傾向がある。オキソイオンが 3 個の金属イオンに結合し、隣り合う金属イオン同士を CH_3COO^- が二重に架橋した 3 核錯体 $\text{M}_3(\mu_3\text{-O})(\mu\text{-CH}_3\text{COO})_6$ 型の骨格を持つ構造 (Fig. 2-23) は 3 価の金属イオンによく知られているが、この 3 核錯体において架橋配位子はトランス位にある他の配位子の配位子置換反応を活性化する。このことから、反応中間体としてアクア錯体の形態を取るよりカルボキシラート架橋錯体を取る方が Fe(III)-CB から Fe(III)-FIC への配位子置換反応は格段に起こりやすくなり、結果的に本分析法の検出感度も向上すると考えられる。そこで本研究では、ポストカラム溶液にあらかじめ CH_3COONa を添加し、FIC の検出感度が向上するかを検討した。 CH_3COO^- の他に比較対象としてカルボン酸イオン以外の弱い Fe(III)配位子であるチオシアン酸イオン (SCN^-) を添加し比較した。

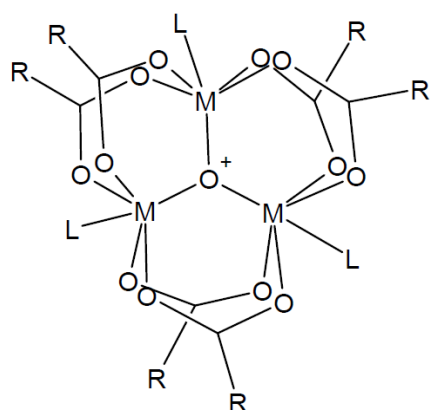


Fig. 2-23. Structure of carboxylate bridged complex; M: metal(III) ion; L: ligand.

まず初めに、蛍光光度計を用いたバッチ実験を行った。50 mM MES/NaOH 緩衝液 (pH 6.0) に溶解させた 100 nM の CB 水溶液に、終濃度で 1、10、100 μ M および 200 mM の CH_3COONa 、または 1 μ M の NaSCN を添加した。混合液の $\lambda_{\text{ex}} \lambda_{\text{em}} = 330/440 \text{ nm}$ における蛍光強度 F_0 を蛍光光度計で測定し、さらに 50 nM の Fe(III) を添加した時の蛍光強度 F を測定した。これらの測定値の差 ($F_0 - F$) を CB の消光の程度を示す数値 ΔF とし、 CH_3COO^- または SCN^- 添加の有無とその濃度ごとに比較を行った (Fig. 2-24A、B)。 ΔF が大きいほど Fe(III) 添加による CB の消光の程度が大きいことを示し、HPLC ポストカラム法に応用した際に FIC の検出感度が向上することを示す。その結果、 SCN^- を添加しなかった場合には ΔF は 67.3 であったのに対し、添加した場合には ΔF は 50.3 となり、添加しない場合と比較して消光の程度は小さくなった (Fig. 2-24B)。この理由として、 SCN^- はカルボン酸イオンではないためにカルボキシラート架橋錯体の形成による配位子置換反応の活性化が起こらなかったことに加え、反応液中で SCN^- と Fe(III) がアキア錯体よりも安定な錯体を形成するために Fe(III)-SCN と CB の間で配位子置換反応が起こりにくくなったためと予想される。次に CH_3COO^- を添加した場合、 CH_3COO^- の添加濃度が 200 mM の場合を除いていずれの濃度でも ΔF は大きくなった (Fig. 2-24A)。この理由として、混合液中の Fe(III) イオンと CH_3COO^- 、水分子の間でカルボキシラート架橋錯体 $\text{M}_3(\mu_3\text{-O})(\mu\text{-CH}_3\text{COO})_6$ が形成され、配位子置換反応の活性化によってこのカルボキシラート架橋錯体中の水分子と CB との間で配位子置換反応が起こりやすくなることで、 Fe(III)-CB の形成が促進されて CB の消光が促進したためと考えられる。また、200 mM のような高濃度では Fe(III) と CH_3COO^- の解離が起こりにくくなり、逆に Fe(III)-CB 錯体の形成が阻害されたと考えられる。以上のバッチ実験の結果から、HPLC を用いた FIC 分析においてポストカラム溶液に CH_3COO^- を適切な濃度で添加することによって検出感度が向上する可能性が示された。

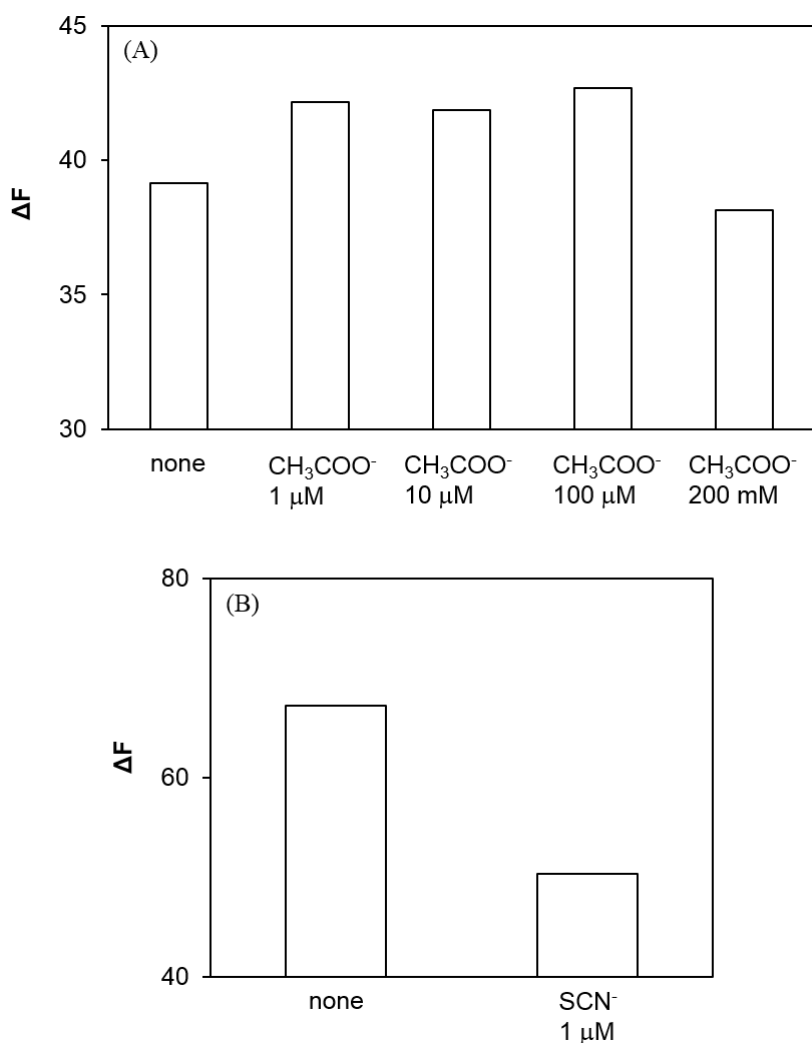


Fig. 2-24. Effect of addition of CH_3COO^- or SCN^- ion on ΔF . CH_3COO^- or SCN^- of each final concentration was added to 100 nM CB with or without 50 nM Fe(III) in 50 mM MES/NaOH at pH 6.0 and 20% acetonitrile. The ΔF is fluorescence intensity quenching value and calculated as difference between fluorescence intensity of 100 nM CB (F_0) and 100 nM CB with 50 nM Fe(III) (F). Fluorescence intensity was measured at $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 330/440$ nm using fluorescence spectrophotometer.

そこで次に、ポストカラム溶液に CH_3COONa を 0、0.2、2、20 μM 添加し 100 μM のクエン酸と 500 μM のマロン酸を分析してそれぞれの検出感度 ($\mu\text{V}/\mu\text{M}$) を求め比較した。100 μM のクエン酸と 500 μM のマロン酸はそれぞれ 20 μL ずつ RSpak KC-811 カラムにインジェクトし、反応コイル内でポストカラム溶液と反応させた。ポストカラム溶液は 20 nM の CB、10 nM の Fe(III)、各濃度の CH_3COO^- および pH 6.0 に調整した 50 mM

MES/NaOH 緩衝液を含む。その結果が Fig. 2-25 である。CH₃COO⁻を添加することによってクエン酸、マロン酸ともに検出感度は向上し、中でも CH₃COO⁻濃度が 2 μM の時検出感度は最大となった。この時、クエン酸の検出感度は CH₃COO⁻添加前の 19.8 μV/μM から 36.2 μV/μM へ約 2 倍に向上し、マロン酸の検出感度は 6.88 μV/μM から 9.34 μV/μM へ約 1.4 倍に向上した。以上のことから、ポストカラム溶液に弱い Fe(III)の配位子である CH₃COO⁻を適切な濃度で添加することによって実際に HPLC ポストカラム法における FIC の検出感度が向上することが示された。

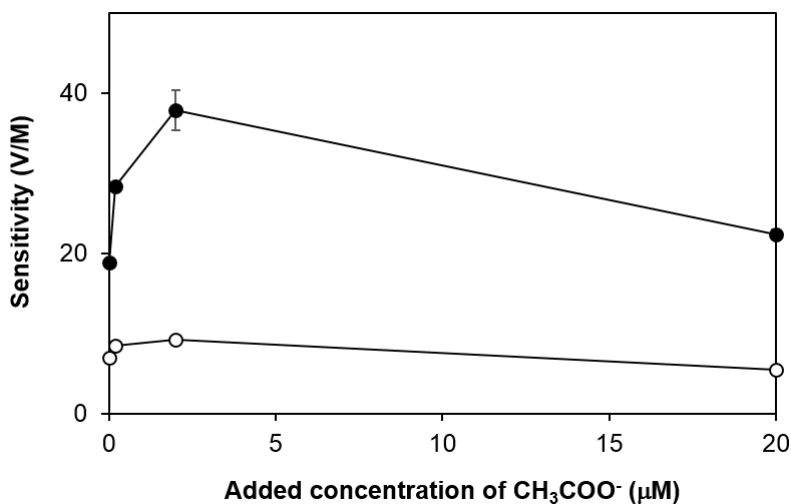


Fig. 2-25. Effect of addition of CH₃COO⁻ ion into PC solution on sensitivity of 20-μL spike of 100 μM citric acid (closed circle) and 500 μM malonic acid (open circle). Each FIC was separated by RSpak KC-811 and reacted with PC solution which contains 20 nM CB, 10 nM Fe(III), CH₃COO⁻ of each final concentration, 50 mM MES/NaOH buffer (pH 6.0) and 20% acetonitrile. Value of sensitivity was calculated as peak height (μV)/concentration of each FIC (μM).

以上の結果から求められたポストカラム溶液の最適な組成を Table 2-1. に示した。

Table 2-1

Optimized post-column (PC) solution composition for the detection of FICs.

Parameter	Condition
pH	6.0 (50 mM MES/NaOH buffer)
Fe(III) concentration	10 nM
Calcein Blue concentration	20 nM
Acetonitrile	20%

2.3.3. FIC 標準物質の分析

Table 2-1 に示した最適な組成のポストカラム溶液を用いて、数種類の有機酸を含む FIC 標準物質の分析を行った。混合サンプルには 100 μ M クエン酸、500 μ M マロン酸、1 mM リンゴ酸、10 μ M アスコルビン酸、10 mM 乳酸が含まれ、それぞれ 6.91、7.41、7.81、8.31、9.8 分に溶出した (Fig. 2-26)。S/N 比の 3 倍を検出限界としてクエン酸、マロン酸、シュウ酸、リンゴ酸、アスコルビン酸、乳酸、酒石酸の検出限界を求め、Table 2-2 に示した。アスコルビン酸の検出限界が顕著に高いのはアスコルビン酸によってポストカラム溶液中の Fe(III) が Fe(II) に還元され、結果としてポストカラム溶液中の Fe(III)-CB 錯体の結合が外れやすくなり、CB の脱消光が促進されるためではないかと考えられる。これらの FIC のうち、クエン酸、マロン酸、シュウ酸、アスコルビン酸に関しては検量線のダイナミックレンジと測定値の変動係数を求めた (Table 2-2)。

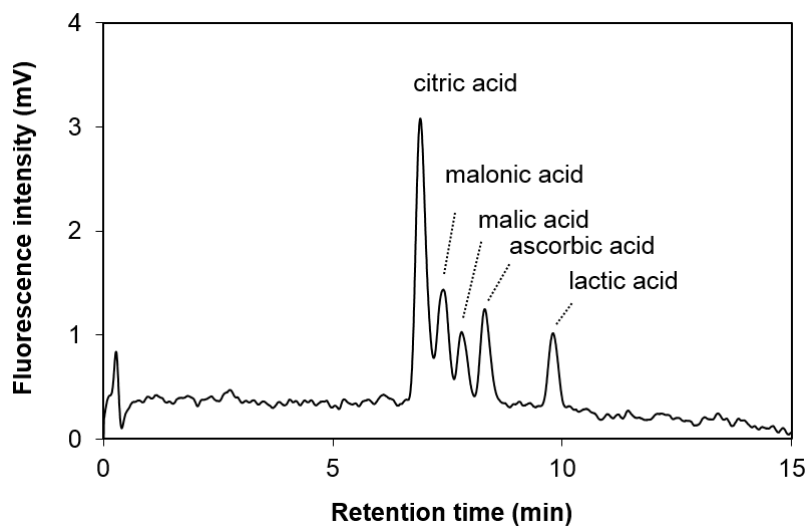


Fig. 2-26. Chromatogram of organic acid mixture which contained 100 μM citric acid, 500 μM malonic acid, 1 mM malic acid, 10 μM ascorbic acid, and 10 mM lactic acid respectively. Fluorescence signal was monitored at $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 330/440$ nm by HPLC fluorescence detector after post-column reaction with PC solution of optimized composition shown in table 2-1. Twenty microliters of organic acid mixture was injected into the column.

Table 2-2. Relationship between $\log K_{ML}$ and detection limit of each FIC.

<i>Substance</i>	<i>log K_{ML}</i>	<i>Detection limit</i>	<i>Linear range</i> (μM)	<i>R²</i>	<i>C.V.</i> (%)
Tartaric acid	6.49	233.0 nmol			
Malic acid	7.1	12.0 nmol			
Lactic acid	7.1	56.6 nmol			
Oxalic acid	7.53	849.7 pmol	100-1000	0.99	6.26
Malonic acid	7.52	2.4 nmol	100-1000	0.99	0.17
Citric acid	11.5	79.2 pmol	30-150	0.99	2.75
Ascorbic acid	--	3.3 pmol	5-40	0.99	2.19

本分析法の感度を示す数値として各 FIC について検量線の傾き（ピーク高さ/FIC の濃度）を求め、Fe(III)との結合定数との関係をグラフにした (Fig. 2-27)。縦軸に感度を取り、横軸には結合定数の対数をとった。各 FIC の感度と結合定数の間には直線的な関係が見られた。酒石酸やリンゴ酸、乳酸などのように Fe(III)との結合定数が $10^{7.5}$ 以下の FIC は比較的感度が低く、酢酸、プロピオン酸、ヒスチジン、システインなどのように Fe(III)との結合定数が $10^{4.7}$ 以下の FIC は濃度を 10 mM まで上げて本分析法で検出することはできなかった。一方、Fe(III)との結合定数が比較的高いクエン酸は良好な感度を示した。

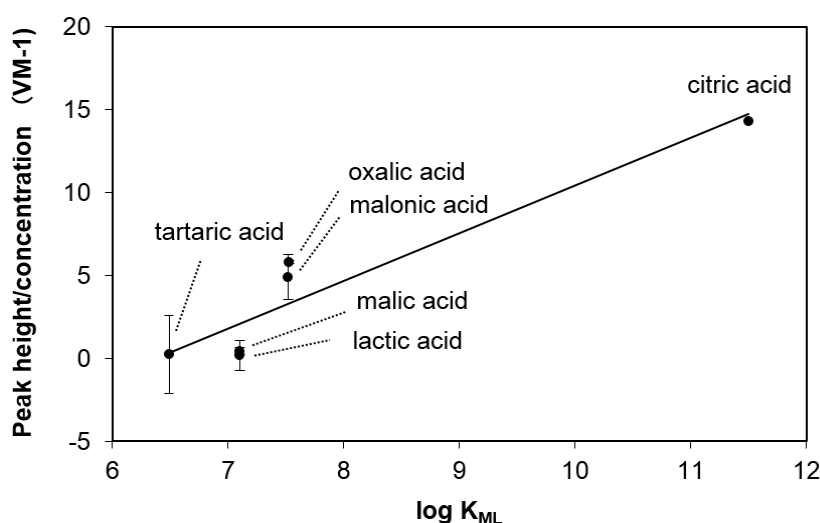


Fig. 2-27. Relationship between $\log K_{ML}$ values and peak height/concentration of various Fe(III) chelators. Peak heights were calculated from HPLC chromatograms which were obtained when 20 μL of Fe(III) chelators were injected. The value of peak height/concentrations were calculated from the peak height of 1, 5, 10 mM tartaric acid, 1 mM malic acid, 1 mM lactic acid, 100 and 500 μM malonic acid, 0.2, 0.5 and 1 mM oxalic acid, and 50 μM citric acid. Peak height/concentration of each Fe(III) chelator was plotted against $\log K_{ML}$ value.

以上の結果から、本分析法は FIC の Fe(III) とのキレート能に応じた検出が可能であることが示され、従来法では困難であった Fe(III) とのキレート能に応じた対象物質の選択的な検出が可能であった。

2.3.4 オオムギ導管液中の FIC 分析

Table 2-1 に示した最適な組成のポストカラム溶液を用いてオオムギ導管液を分析した結果を Fig. 2-28 の A に示した。溶出時間 5.0~17.0 分間にいくつかのピークが現れたが、自家蛍光物質由来のピークである可能性を排除するために CB と Fe(III) を含まないポストカラム溶液を用いて同様に導管液を分析した (Fig. 2-28B)。Fig. 2-28B には溶出時間 5.84, 8.40, 12.5 分に 3 つの大きなピークが現れているが、これは $\lambda_{ex}/\lambda_{em}=330/440$ nm において蛍光を有する自家蛍光物質由来のピークであると考えられる。Fig. XXA のクロマトグラムにおいて自家蛍光物質以外のピークを黒丸で示した。溶出時間 6.93、

7.84、9.81 分のこれらのピークは FIC 由来のピークであると考えられる。6.93 分のピークはクエン酸の溶出時間と一致しており、クエン酸由来の物と考えられる。

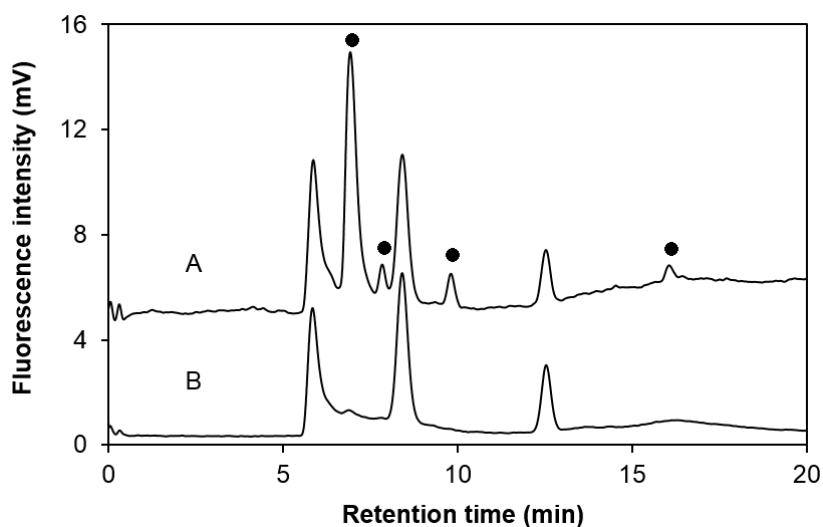


Fig. 2-28. Chromatograms of xylem sap from hydroponically cultured Fe-sufficient barley (*Hordeum vulgare* cv Ehimehadaka No.1). Fluorescent signals were monitored by HPLC fluorescence detector at $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 330/440$ nm after the post-column reaction with PC solution containing 20 nM CB (A) or containing none of CB (B). Chemical compositions of A and B were the same as optimized composition (table.) except with or without CB. Unidentified peaks of Fe(III) chelator marked by close circle appeared at 6.93, 7.84, 9.81 and 16.1 min. Common peaks which appeared in chromatogram A and B at 5.84, 8.41 and 12.5 min were assumed to result from unidentified substances which show intrinsic fluorescence.

2.4 考察

FICの高感度分析法を開発するためには、ポストカラム反応に用いる蛍光物質の条件として、①蛍光量子収率が高く低濃度でも十分な蛍光強度を示すこと、②低濃度のFe(III)とも結合し消光すること、③本分析法では100%水系の移動相を用いているため水への溶解性が高いこと、などがある。本章ではカルセイブルー(CB)以外にも、Fe(III)と結合して消光するという報告のある1-ナフトール-2-スルホン酸(1-NOH-2-S)や1-ヒドロキシ-2-ナフトエ酸(1-H-2-NA)、2-ヒドロキシ-1-ナフトエ酸(2-H-1-NA)、ナフタレンについてFe(III)との結合実験を行い、それぞれpH 6.0においてFe(III)と結合し消光することを示した(Fig. 2-8、2-10、2-12、2-14)。特に1-NOH-2-Sについては先行研究において工業排水中のppmレベルでのFeの検出に用いられていることから(Sayour *et al.*, 2011)当初FICの高感度分析への応用の可能性が期待されたが、CBと比較すると蛍光強度が著しく低いことが明らかになった(Fig. 2-8A)。また、1-H-2-NA、2-H-1-NA、ナフタレンは蛍光強度が低いことに加え水への溶解性が低かったことから、いずれも本分析法で使用する蛍光試薬としては適していないと結論付けた。一方、CBは高い蛍光量子収率を示し、本章における蛍光光度計を用いた分析では低濃度(200 nM)でも非常に強い蛍光強度を示しており(Fig. 2-4A)、pH 6.0の溶液中で等濃度のFe(III)により約20%の蛍光強度まで消光することが示された。これらCBの有する①蛍光量子収率の高さ、②Fe(III)との結合のしやすさ(消光のしやすさ)などの性質を踏まえると、FICの高感度分析法にはCBが最適であると考えられた。また、前述の③水への溶解性の高さについては、CBはアルカリ性溶液には溶けやすいものの中性～酸性溶液には溶けにくいという性質を持つ。本分析法では分析対象の分離にイオン排除カラムであるRSpak KC-811を用いており、良好な分離のためには移動相として酸性溶液を使用する必要がある。また、ポストカラム溶液のpHが7.0以上になるとクエン酸の示すピーク高さは減少しS/N比も大幅に低下したが(Fig. 2-21A、C)、これはpHが高いとFe(III)-CBと分析試料中のFICとの間で配位子置換反応が起きにくくなるためと考えられる。以上の理由から移動相やポストカラム溶液のpHをアルカリ性に設定することによってCBの溶解性を向上させることは困難であったため、ポストカラム溶液にアセトニトリルを添加しCBの溶解性を上げようと試みた。その結果、Fig. 2-17に示すようにポストカラム溶液にアセトニトリルを添加することによって100 μMクエン酸のピーク高さは大幅に増加し、ピークテーリングも解消した。ピーク高さの向上およびピークテーリン

グの解消はアセトニトリルの代わりにメタノールを添加した場合には見られなかった (Fig. 2-17B)。この理由として、アセトニトリルの添加によってポストカラム溶液への CB の溶解性が高まることの他に、水およびメタノールと比較してアセトニトリルのドナー数 (DN) およびアクセプター数 (AN) が少ないという特徴が関係しているのではないかと考えられる。ドナー数とは溶媒分子の電子供与性を示す数値であり、この数値が大きい程金属イオンに配位する傾向が強い。また、アクセプター数は溶媒の電子受容性を示す数値であり、この数値が大きい程イオン性の配位子が溶媒分子に配位しやすくなる (Gutmann, 1978)。つまり、DN や AN が大きいほど溶媒中での錯形成や配位子置換反応が阻害されると言える。水は DN が 18.0、AN が 54.8、メタノールは DN が 19、AN が 41.3 であるのに対し、アセトニトリルは DN が 14.1、AN が 19.3 であり (化学便覧基礎編改訂 5 版、日本化学会編、2004)、いずれの数値も水およびメタノールより低い。以上のことから、アセトニトリルは水やメタノールと比べて Fe(III) や CB に配位しにくい性質を持ち、ポストカラム溶液にアセトニトリルが含まれると Fe(III)-CB 錯体の形成が促進されるのではないかと推測される。また、FIC と Fe(III)-CB 錯体の間での配位子置換反応も促進されるため、FIC の検出感度が向上したのではないかと考えられる。ピークテーリングの解消についても、アセトニトリルの添加によって CB の溶解性が向上したと同時に配位子置換反応が速やかに進行するようになったことが原因だと判断した。

また、2.2.2.1 で述べたが、逆相カラム ODS 80_{TM} を用いてクエン酸を分析すると、pH 6.0 のポストカラム溶液を用いた場合にテーリングと共にベースラインの上昇が観察された (Fig. 2-16D)。RSpak KC-811 を用いた分離系の場合と異なり ODS 80_{TM} を用いた分離には移動相にメタノールが含まれており CB の溶解性は比較的高いことが予想されるため、この現象は CB の水への溶解性の低さが原因ではなく Fe(III) の溶解性の低さが一因と考えられる。有機溶媒中の Fe(III) の溶解性は 100% 水系の移動相を用いた時と比較して低下するため、メタノールが含まれる移動相を用いた場合は FIC と Fe(III)-CB 錯体の間での配位子置換反応が速やかに起こらなくなると推測される。

従来の FIC 分析法は対象物質の化学構造に従って分析を行うものであり、Fe(III) とのキレート能を評価することはできなかった。しかし、本分析法は分析対象の Fe(III) とのキレート能に応じて対象物質を検出することを可能にした。高い Fe(III) キレート能を示し、Fe 栄養生理において重要な役割を果たしている化学物質を選択的に検出することを可能にした点で、本分析法は画期的な分析手法である。加えて、本分析法は煩雑な前

処理を必要としないことから分析手順は単純であり、かつ生体試料の生体マトリクスと誘導体化試薬の間での相互作用も考慮する必要がない。また、高価な試薬も必要としないことから、本分析法は **Fe(III)** とのキレート能を有する生体試料由来の新規 **FIC** の探索などにも大いに貢献する可能性のある分析法であると言える。

第3章

化学発光法を用いた Fe(III)キレーターの HPLC 分析法の開発

Journal of Chromatography B (投稿中)

3.1 はじめに

第二章では蛍光物質 CB を用いた FIC 分析法の開発し、FIC の Fe(III)キレート能を指標とした分析法の開発を行った。本章では、FIC 分析の更なる高感度化を目指して化学発光法を用いた FIC 分析法の開発を行った。化学発光 (CL) とは化学反応により生じた分子が過剰のエネルギーを有する場合にそのエネルギーを光として放出する現象を言う。この現象は多くの場合化学発光物質の酸化反応に伴って起きるため、発光に励起光を必要としない。そのため励起光を必要とする蛍光法と比べて検出器のバックグラウンドノイズを低く抑えることができ、一般に蛍光検出よりも高感度な検出が可能である。また、化学発光検出では検量線の直線範囲も広く検出器の大きさも比較的コンパクトであるため、これまでも HPLC やフローインジェクション分析 (FIC) に幅広く用いられてきた。そこで本研究では、化学発光検出を用いた HPLC ポストカラム法を応用して FIC の高感度分析法の開発を目指した。

本研究では、使用する化学発光試薬として化学発光検出に汎用されているルミノール (5-amino-2,3-dihydro-phthalazine-1,4-dione; Fig. 3-1A) と *o*-フェナントロリン (Fig. 3-1B) を検討した。ルミノールはアルカリ条件下で酸化剤によって酸化され波長 425 nm に非常に強い化学発光を生じる。*o*-フェナントロリンも同様にアルカリ条件下で酸化され、445 ~ 450 nm の波長に化学発光を生じる。これらの化学発光物質の酸化反応は酸化補助剤の共存下で起こるが、酸化補助剤として Fe(II)、Fe(III)、銅 [Cu(II)]、コバルト [Co(II)]、Mn(II)、カドミウム [Cd(II)] などの遷移金属イオンおよびその錯体が挙げられる。Fe が化学発光反応の酸化補助剤として機能するという性質を利用して、ルミノールは FIA による海水中の Fe の高感度分析に利用されており (Obata *et al.*, 1997, De Jong *et al.*, 1998, Borman *et al.*, 2009)、*o*-フェナントロリンも FIA の他にキャピラリー電気泳動を用いた Fe(III)や Fe(II)の高感度分析に利用されている (Nogami *et al.*, 2009, 渡辺ら, 2006)。本研究の予備実験において、Fe(III)-FIC 錯体もルミノールおよび *o*-フェナントロリンの化

学発光反応の酸化補助剤として機能することを確認したため、本研究では化学発光物質としてルミノールまたは *o*-フェナントロリン、酸化剤として過酸化水素 (H_2O_2) を用いて、両者の間の化学発光反応を利用することで FIC の高感度分析法の開発を行った。

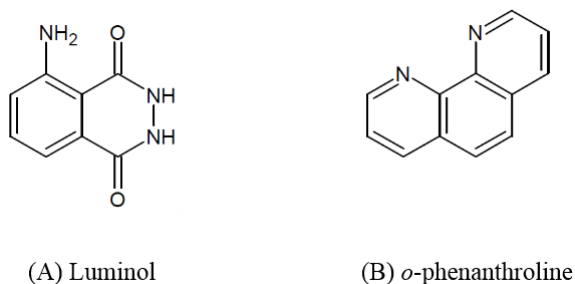


Fig. 3-1. Structures of luminol and *o*-phenanthroline.

ここで、Fig. 3-2 にルミノールと H_2O_2 の反応機構を示した。アルカリ条件下でルミノール (H_2Lum とする) が脱プロトン化され、ルミノールモノアニオン (HLum^-) が生成する。ここに Fe(III) などの酸化補助剤が共存すると、 HLum^- は 1 電子酸化されルミノールラジカル ($\text{HLum}\cdot$) が生成する。 $\text{HLum}\cdot$ は不均一化反応を起こし、ジアザキノン化合物 (Lum) および H_2Lum を生成する。生成した Lum は、過酸化水素から生じたヒドロペルオキシイオン (HOO^-) と反応して過酸化物 [$\text{HLum}(\text{OO})^-$] が生成する。その後 $\text{HLum}(\text{OO})^-$ が分解して励起状態の 3-アミノフタル酸イオン (AP^{2-})^{*} を生成し、この (AP^{2-})^{*} が基底状態に遷移するときにエネルギーを化学発光として放出する。このルミノールの化学発光反応において $\text{HLum}\cdot$ の生成に Fe(III) などの酸化補助剤 (−電子酸化剤) が必要である。また、 H_2Lum の化学発光反応は高 pH でないと進行しない。これは pH が低いと $\text{HLum}(\text{OO})^-$ のプロトン付加物 $\text{HLum}(\text{OOH})$ が生成し、化学発光反応を妨げるからである (Merényi and Lind, 1980)。

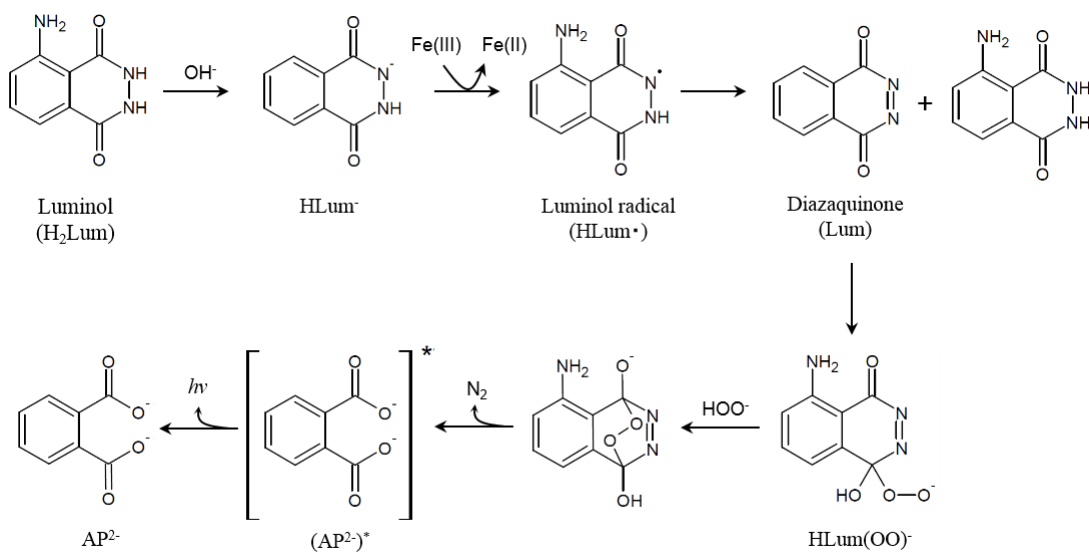


Fig. 3-2. Major pathway of the CL reaction of luminol in alkaline media.

本分析法は、第一章と同様 HPLC ポストカラム法を用いている。分析原理を Fig. 3-3 に示した。分析試料にはあらかじめ Fe(III)を添加して試料中の FIC と結合させ、Fe(III)-FIC 錯体をカラムで分離したのち、化学発光物質と H₂O₂ を含むポストカラム溶液と反応させる。Fe(III)-FIC 錯体の共存下で化学発光物質が酸化され生じた化学発光を検出することによって、Fe(III)とのキレート能を有する FIC を特異的に検出する。本章では、ルミノールまたは *o*-フェナントロリンを用いた FIC 分析法の開発可能性について検討し、高感度な FIC 分析法開発を目指して分析条件の最適化を行った。また、最適化した分析条件で様々な Fe(III)-FIC 錯体標準物質を分析し、その検出限界を求めて従来法と比較した。

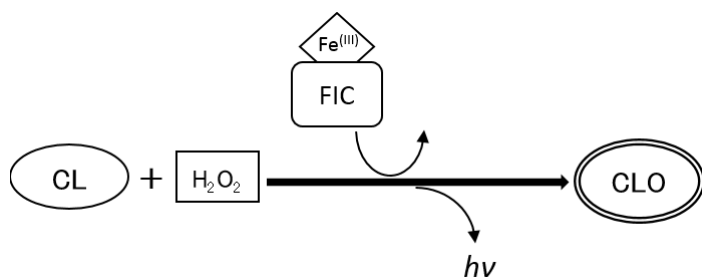


Fig. 3-3. Schematic diagram of detection mechanism of present method.
CL: chemiluminescent reagent; CLO: oxidized chemiluminescent reagent.

3.2 材料および方法

3.2.1 試薬

ルミノール、*o*-フェナントロリン、 H_2O_2 、1 M 酢酸アンモニウム水溶液（高速液体クロマトグラフ用）、酢酸、25%アンモニア水、塩化カリウム、クエン酸一水和物は和光純薬株式会社（大阪、日本）から、重炭酸アンモニウム（LC-MS 用）は Sigma-Aldrich（MO、アメリカ合衆国）、エチレンジアミン- N,N,N',N'' -四酢酸ナトリウム鉄(III)〔Fe(III)-EDTA〕、エチレンジアミン- N,N,N',N'' -四酢酸ナトリウム（Na-EDTA）、ジエチレントリアミン- N,N,N',N'',N''' -五酢酸（DTPA）、*O,O'*-Bis（2-アミノエチル）エチレングリコール- N,N,N',N'' -四酢酸（GEDTA）、*trans*-1,2-ジアミノシクロヘキサン- N,N,N',N'' -四酢酸（CyDTA）一水和物、は同仁化学研究所（熊本、日本）から、塩化鉄(III)六水和物、ホウ酸は国産化学株式会社（東京、日本）から購入した。合成ニコチアナミン〔2(S),3'(S),3''(S)-N-[N-(3-amino-3-carboxypropyl)-3-amino-3-carboxypropyl]-azetidine-2-carboxylic acid, NA, Fig. XXA〕は森敏東京大学名誉教授からご恵与いただいた。試薬の溶解や希釈にはミリ Q 超純水（Merckmillipore、Darmstadt、ドイツ）を使用した。

3.2.2 HPLC 分析条件

本分析法の開発に使用した HPLC システムの概略図を Fig. 3-4 に示した。本システムは 3 台のポンプ〔Pump 1（PU980）、Pump 2、3（PU2080）、いずれも日本分光株式会社（東京、日本）製〕、ダイナミックミキサー（MX-2080-32、日本分光株式会社）、三方デガッサー（DG-2080-53、日本分光株式会社）、オートサンプラー（AS-950-10、日本分光株式会社）、2 台のカラムオープン〔CO-965（日本分光株式会社）および SSC-2120（センシュー科学株式会社、東京、日本）〕、化学発光検出器（CL-2027、日本分光株式会社）、UV-Vis 検出器（UV-970、日本分光株式会社）から構成されている。分析対象の分離には pH 5.5 と 8.0 の移動相を用いた。pH 5.5 の移動相として、希釈酢酸を用いて pH を 5.5 に調整した 10 mM 酢酸アンモニウム水溶液を使用した。pH 8.0 の移動相としては、希釈アンモニア水で pH を 8.0 に調整した 10 mM 重炭酸アンモニウム水溶液を使用した。移動相の pH はそれぞれ高等植物の導管液（pH 5.5 前後）と篩管液（pH 8.0 前後）に合わせて設定した。移動相は分析日ごとに調整し、よく脱気してから使用した。分析試料は遠心式フィルターユニット（Ultrafree MC-HV、Merckmillipore、Darmstadt、ドイツ）を用いて 12,000 g、4°C で 4 分間遠心ろ過してからカラムに 20 μ L をインジェクトした。

分離には種々の分離カラムを検討した結果（後述）ゲルろ過カラム（8.0 mm×300 mm、Superdex Peptide 10/300 GL、GE ヘルスケア株式会社、CT、アメリカ合衆国）を用いた。分離はアイソクラティック溶出により行い、カラム温度は 39°C、移動相の流速は 0.5 mL/min とした。カラムで分離された Fe(III)-FIC 錯体はポストカラム溶液 A（PCS-A）とポストカラム溶液 B（PCS-B）の 1:1 混合液からなるポストカラム溶液（PC solution）と反応コイル内で反応させた。PCS-A は化学発光試薬を含む 100 mM のホウ酸/NaOH 緩衝液であり、PCS-B は過酸化水素水溶液である。PCS-A と PCS-B はそれぞれ Pump 2、3 によって 0.5 mL/min の流速で送液し、ダイナミックミキサーにより混合した。反応コイルとして PEEK チューブ（3 m×0.25 mm i.d.）を使用し、反応コイルの温度はカラムオーブン（SSC-2120）で一定に維持した。カラム溶出液の 210 nm の吸光度をモニターし、その後化学発光強度をモニターした。それぞれの信号強度は 0.5 秒ごとにサンプリングした。

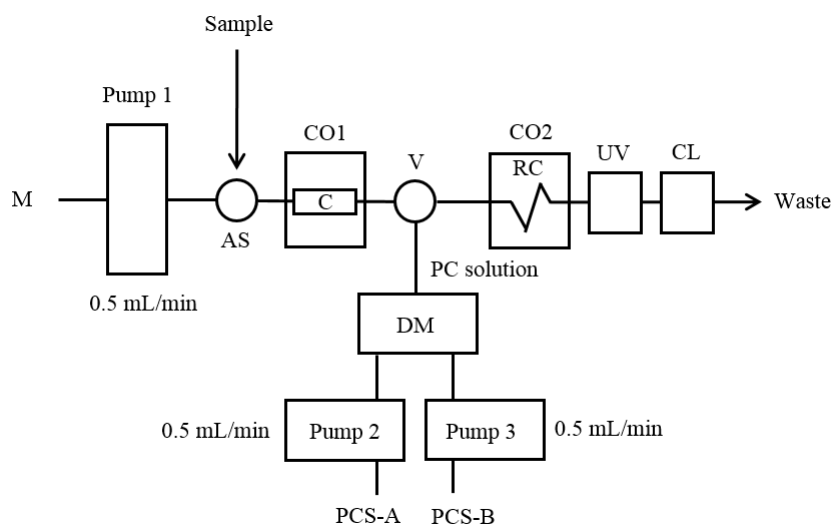


Fig. 3-4. Schematic diagram of HPLC detection system. M: mobile phase (10 mM ammonium acetate buffer at pH 5.5); PCS-A: lumino solution containing luminol and pH buffer; PCS-B: H₂O₂ solution; PC solution: the 1:1 mixture of PCS-A and PCS-B; pump1: PU-980 (Jasco); Pump2 and 3: PU-980 (Jasco); AS: automatic sampler (AS-950-10, Jasco); DM: dynamic mixer (MX-2080-32, Jasco); C: a size exclusion column (Superdex peptide 10/300 GL, 10 mm × 300 mm); V: three-way vulve; RC: reaction coil [PEEK tubing (3 m long × 0.25 mm i.d.)]; CO1; column oven containing the column (CO-965, Jasco); CO2: column oven containing reaction the coil (SSC-2120, Senshu scientific) UV: UV detector (UV-Vis, Jasco) CL: chemiluminescence detector (CL-2027, Jasco).

3.2.3 Fe(III)-FIC 錯体標準物質の調整

Fe(III)-EDTA、クエン酸 (Cit)、NA、DMA の 1 mM ストック溶液はそれぞれの試薬をミリ Q に溶解させて調整した。1 mM の FeCl₃ ストック溶液は 1 mM HCl に FeCl₃ を溶解させて調整した。Fe(III)-Cit、Fe(III)-NA、Fe(III)-DMA の Fe(III)-FIC 錯体標準物質は、1 mM のクエン酸、NA、DMA ストック溶液をそれぞれ等量の 1 mM FeCl₃ 水溶液と混合した後、HPLC 用の移動相 (pH 5.5 の場合は 10 mM 酢酸アンモニウム水溶液、pH 8.0 の場合は 10 mM 重炭酸アンモニウム水溶液) で適宜希釈したものを用了。

3.2.4 ポストカラム液の組成とその他の分析条件の最適化

ポストカラム溶液の組成およびその他の分析条件の最適化には Fe(III)-FIC 錯体の標準物質として 10 μM Fe(III)-EDTA と 10 μM または 100 μM Fe(III)-Cit を使用し、分離には pH 5.5 の移動相を用いた。クロマトグラムのノイズの大きさは分析条件によって大きく変化したため、分析条件の最適化はクロマトグラムのノイズの大きさに対するピーク高さの割合 (S/N 比) を比較することによって行った。ノイズの大きさは溶出時間 3.0 ~4.0 分におけるクロマトグラムの信号強度の標準偏差として定義した。この溶出時間にはいずれの分析サンプルのピークも現れないことは予め確認してある。

3.2.5 Fe(III)-FIC 錯体標準物質の検出限界の決定

分離に使用する移動相の pH が 5.5 および 8.0 それぞれの場合について、各 Fe(III)-FIC 錯体の検出限界を求めた。Fe(III)-EDTA、Fe(III)-Cit、Fe(III)-NA の標準物質水溶液をそれぞれ 20 μL カラムにインジェクトし、クロマトグラム上に現れたピークの高さを求め、検量線を作成した。検出限界は S/N = 3 を与える物質質量として計算した。また、各 FIC の検出感度 (Sensitivity) を比較する際には検量線の傾き [クロマトグラム上のピーク高さ/濃度 (V/M)] を求め、これを検出感度と定義して比較した。

3.3 結果

3.3.1 使用する化学発光物質の検討

本分析法に使用する化学発光物質の候補として *o*-フェナントロリンとルミノールを選択した。そのどちらが最適かを検討するため、*o*-フェナントロリン/H₂O₂系とルミノール/H₂O₂系で Fe(III)-EDTA の検出感度を比較した。化学発光反応を用いた際の検出感度と比較することにした。標準物質の分析には Fig. 3-4 に示した HPLC システムを使用した。標準物質は取り付けず、分析試料はオートサンプラーから直接 HPLC にインジェクトし分析した。

3.3.1.1 *o*-フェナントロリン/H₂O₂化学発光反応を用いた分析

まず、PCS-A 中の *o*-フェナントロリン濃度を 100 μM に固定し、PCS-B 中の H₂O₂ 濃度を 88 mM (0.3%)、882 mM (3%)、2.94 M (10%) と 3 通りに変化させ、10 mM の Fe(III)-EDTA を分析した。その結果、10 mM Fe(III)-EDTA の示すピーク高さは H₂O₂ 濃度が 882 mM の時最大になった (Fig. 3-5)。この時の Fe(III)-EDTA の検出感度をピーク高さ/濃度 (μV/μM) として求めると 8.8 μV/μM であった。

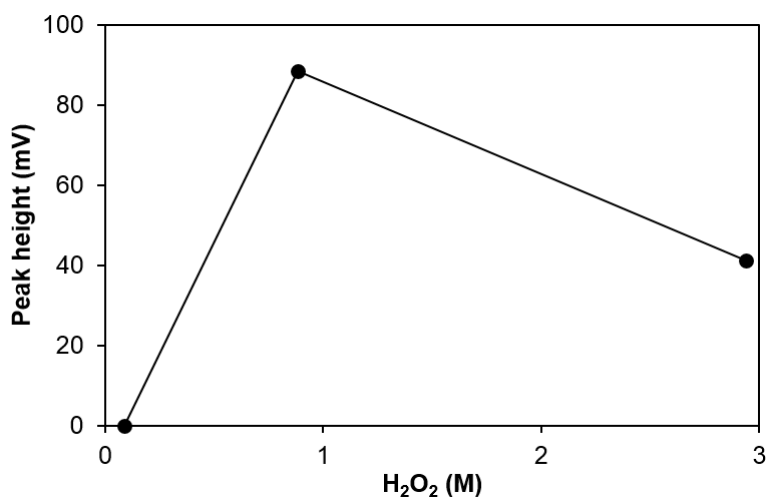


Fig. 3-5. Effect of H₂O₂ concentration in PCS-A on peak height of 20 μ L-spike of 10 mM Fe(III)-EDTA. Peak height was obtained from chromatograms of 10 mM Fe(III)-EDTA which were monitored by HPLC chemiluminescence detector after the post-column reaction with 1:1 mixture of PCS-A (100 μ M *o*-phenanthroline in 100 mM H₃BO₄/NaOH buffer at pH 10.5) and PCS-B (0.088, 0.88 or 2.9 M H₂O₂ solution). Each sample was injected into HPLC system without column.

3.3.1.2 ルミノール/H₂O₂化学発光反応を用いた分析

同様にして、ルミノール/H₂O₂の化学発光反応を用いた際のFe(III)-EDTAの検出感度を求めた。まず、PCS-A中のルミノール濃度を100 μ Mに固定し、PCS-B中のH₂O₂濃度を1、10、100 mMと3通りに変化させ10 μ M Fe(III)-EDTAを分析した。その結果、H₂O₂濃度が10 mMの時ピーク高さは最大になった (Fig. 3-6)。この時のFe(III)-EDTAの検出感度を求めると $10 \times 10^4 \mu\text{V}/\mu\text{M}$ であった。以上のことから、ルミノールを用いた時のFe(III)-EDTAの検出感度は*o*-フェナントロリン/H₂O₂を用いた時よりも4桁大きく、ルミノール/H₂O₂の化学発光反応を利用した方がより高感度なFe(III)-FIC分析法を開発できると判断した。

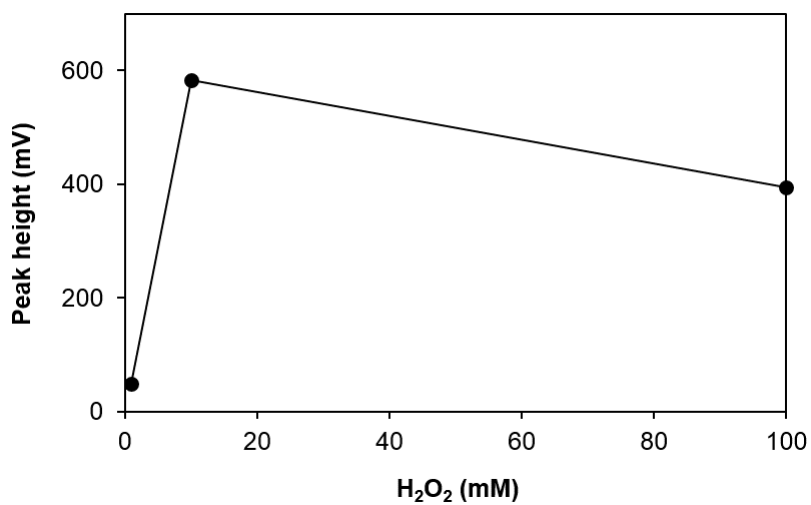


Fig. 3-6. Effect of H₂O₂ concentration in PCS-A on peak height of 20 μ L-spike of 10 μ M Fe(III)-EDTA. Each peak height was obtained from chromatograms of 10 μ M Fe(III)-EDTA which were monitored by HPLC chemiluminescence detector after the post-column reaction with 1:1 mixture of PCS-A (100 μ M luminol in 100 mM H₃BO₄/NaOH buffer at pH 10.5) and PCS-B (1, 10, 100 M H₂O₂ solution). Each sample was injected into HPLC system without column.

3.3.2 分析条件の最適化

3.3.2.1 使用するカラムおよび移動相の検討

3.3.2.1.1 有機溶媒を含む移動相について

HPLC を用いた分析手法を開発する上で、使用するカラムの選択は非常に重要である。通常の HPLC による分離・検出システムでは対象物質の分離に最も適したカラムを選択することが重要であるが、本分析法では化学発光検出によるポストカラム法を採用しているため、分離に使用する移動相と化学発光検出の相性についても検討する必要がある。つまり、カラムによる FIC の分離も良好であり、なおかつそのカラムに適した移動相とポストカラム溶液の混合液中でルミノール/ H_2O_2 の化学発光反応が効率良く進行するような条件を選択する必要がある。HPLC を用いた分離において、イオン交換クロマトグラフィーやイオン排除クロマトグラフィーでは 100%水系の移動相が用いられるが、逆相クロマトグラフィー、順相クロマトグラフィーでは有機溶媒を含む移動相が用いられる。そこでまず、100%水系の移動相と有機溶媒を含む移動相を用いた場合では検出感度に違いがあるかを確認することにした。

ミリ Q にメタノールを 50、75、90% 添加した水溶液またはエタノールを 75% 添加した水溶液を移動相として用い、 $10 \mu\text{M}$ の Fe(III)-EDTA を分析して S/N 比を比較した。PCS-A として $100 \mu\text{M}$ ルミノールを含む 100 mM ホウ酸/NaOH 緩衝液 (pH 10.5)、PCS-B として 10 mM の H_2O_2 水溶液を用いた。HPLC 装置にカラムを接続せずに分析試料を直接流路にインジェクトした。その結果、Fig. 3-7A に示すように移動相にメタノールを 50% 以上含むと $10 \mu\text{M}$ Fe(III)-EDTA の示すピーク高さが大幅に減少する。一方で、ノイズ大きさはピーク高さ程ではないものの有機溶媒の添加によって減少したため (Fig. 3-7B) S/N 比は大幅に減少した (Fig. 3-7C)。メタノールの代わりにエタノールを添加した場合も同様な傾向が見られた (Fig. 3-7A~C)。アセトニトリルを添加した場合にはシグナルは全く検出されなくなり、ピーク高さおよび S/N 比は 0 になった (データは示さず)。以上のことから、メタノール、エタノール、アセトニトリルなどの有機溶媒を含む移動相はルミノール/ H_2O_2 の化学発光反応を利用した検出系には不適であることが示された。

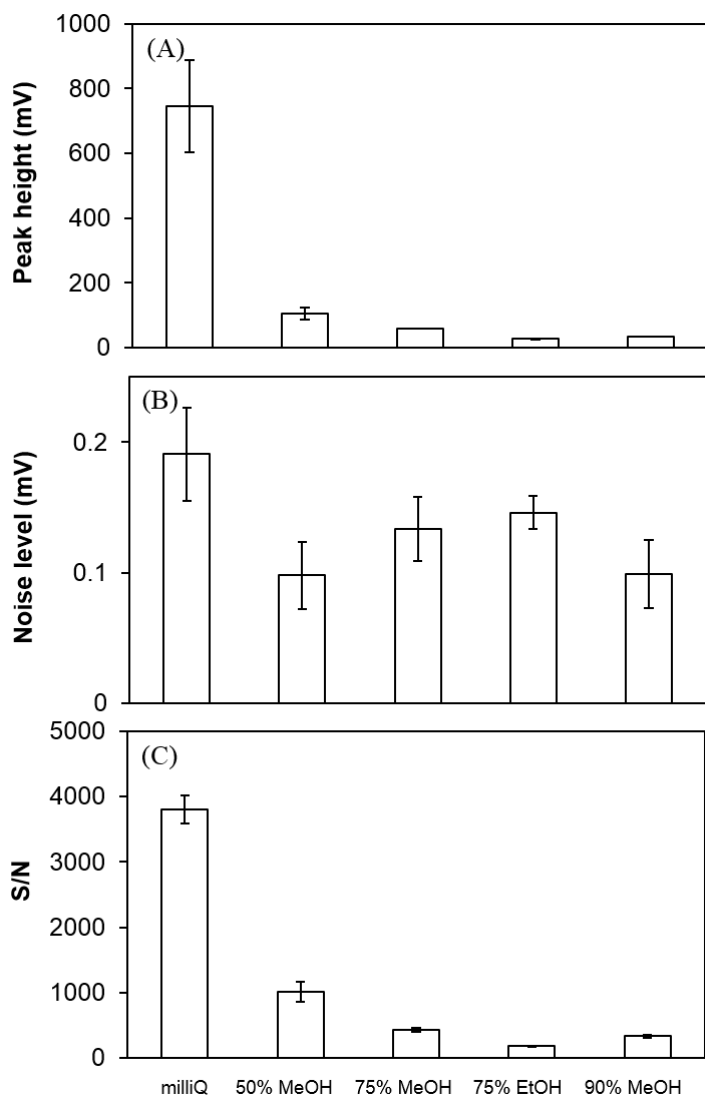


Fig. 3-7. Effect of percentage of organic solvent in mobile phase on (A) peak height, (B) noise level and (C) S/N ratio of 20 μL -spike of 10 μM Fe(III)-EDTA. Each S/N ratio was obtained from chromatograms of 10 μM Fe(III)-EDTA which were monitored by HPLC chemiluminescence detector after the post-column reaction with 1:1 mixture of PCS-A (100 μM luminol in 100 mM $\text{H}_3\text{BO}_4/\text{NaOH}$ buffer at pH 10.5) and PCS-B (10 mM H_2O_2 solution). Each sample was injected into HPLC system without column.

3.3.2.1.2 使用するカラムの検討

低分子有機酸やムギネ酸類など FIC の分離においては、主に①イオン排除クロマトグラフィー、②イオン交換クロマトグラフィー、③親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC)、④逆相クロマトグラフィー、⑤サイズ排除クロマトグラフィーなどの分離モードが使用される。それぞれの分離モードについて検討を行った。

① イオン排除クロマトグラフィー

イオン排除クロマトグラフィーは有機酸類の分離に最も良く使用される分離モードである。イオン排除クロマトグラフィーカラムを用いた分離には酸性の移動相が用いられる。しかし、ルミノール/H₂O₂の化学発光反応の進行には OH⁻イオンが必要であり反応液の pH を 9~11 のアルカリ性に保つ必要があるため、酸性の移動相を用いるイオン排除クロマトグラフィーカラムは本分析法には適していないと判断した。

② イオン交換クロマトグラフィー

イオン交換クロマトグラフィーも有機酸類の分離に一般的に使用される。そこで、実際にイオン交換クロマトグラフィーカラム (TSKgel DEAE-5PW、東ソー株式会社、日本) を接続した HPLC システムを用いて 10 μM の Fe(III)-EDTA の分析を行った。イオン交換クロマトグラフィーによる有機酸類の分離には、一般に塩濃度の高い移動相を用いたグラジエント溶出を行うが、本研究においても pH 5.5 に調整した 10 mM 酢酸アンモニウム水溶液 (A 液) と A 液に 300 mM の NaCl を添加した B 液を用いたグラジエント溶出を行った。グラジエント溶出は、0~5.0 分において A 液 100%、5.0~40.0 分において B 液 0~90%、40.0~45.0 分において B 液 90%、45.0~55.0 分において B 液 90~0%、55.0~60.0 分において A 液 100%のリニアグラジエントにより行った。PCS-A として 100 μM ルミノールを含む 100 mM ホウ酸/NaOH 緩衝液 (pH 10.5)、PCS-B として 10 mM H₂O₂ 水溶液を用いた。その結果、Fig. 3-8A に示したようにグラジエント溶出の際の移動相の塩濃度の変化に起因すると考えられるクロマトグラムベースラインのドリフトやノイズの増大が見られたことから、本分析法の検出系にはイオン交換カラムは不適であると判断した。

③ 親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC)

近年、FIC の分離に親水性相互作用クロマトグラフィー (Hydrophilic Interaction Chromatography, HILIC) が多く用いられるようになってきている (Rellán-Álvarez *et al.*, 2010, Tsednee *et al.*, 2012 など)。HILIC は順相クロマトグラフィーの一種であり、有機溶媒を含む移動相を使用しカラム担体および移動相と分析対象間の相互作用を利用して分離を行う。本研究では、HILIC カラムの一種である ZIC-HILIC, PEEK column (Merckmillipore) を接続した HPLC システムを用いて 10 μ M の Fe(III)-EDTA を分析した。分離の際には 50%メタノールを含む 10 mM ギ酸アンモニウム水溶液 (pH 5.5) を移動相として用い、アイソクラティック溶出を用いた。ポストカラム溶液の組成は前述のイオン交換カラムの場合と同様である。Fig. 3-8B に示すようにクロマトグラム上には 10 μ M Fe(III)-EDTA のピークが現れたが、ピーク高さは非常に低く検出感度は良好とは言えなかった。これは、3.3.2.1.1 で示したように有機溶媒を含む移動相を用いた場合に Fe(III)-EDTA の検出感度が低下するためと考えられる。

④ 逆相クロマトグラフィー

逆相クロマトグラフィーも順相クロマトグラフィーと同様に分配クロマトグラフィーの一つであり、逆相カラムを用いた良好な分離には有機溶媒を含む移動相を使用する必要がある。また、カラム担体への分析対象の吸着を防ぐために移動相に TFA などの酸を加え移動相を酸性にする必要があることから、逆相カラムを用いた HPLC 分析では Fe(III)-FIC の検出感度の低下が予想された。そこで、本分析法の分離には逆相カラムは不適であると判断した。

⑤ サイズ排除クロマトグラフィーカラム

サイズ排除クロマトグラフィーは通常、タンパク質やペプチドなど比較的高分子の物質の分離に用いられる分離モードであるが、サイズ排除クロマトグラフィーカラムを用いた分離には 100%水系の移動相を使用できることから、本研究では分析対象の分離にゲルろ過カラムの一種である Superdex Peptide 10/300 GL カラムの使用を検討することとした。この Superdex Peptide カラムは分子量 100~7000 のペプチドやその他の低分子生体化合物の分離のために開発されたものであり、pH 1~14 の広い pH 領域で良好な分離を達成できる。そこで、Superdex Peptide カラムを接続した HPLC システムを用いて 10 μ M Fe(III)-EDTA の分析を行った。分離の際には 10 mM 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH

5.5) を移動相として用い、アイソクラティック溶出を行った。ポストカラム溶液の組成は前述のイオン交換クロマトグラフィーカラムおよび親水性相互作用クロマトグラフィーカラムの場合と同様である。Fig. 3-8C に示すようにクロマトグラム上には 10 μ M Fe(III)-EDTA のピークが現れたが、前述のイオン交換クロマトグラフィーカラムおよび親水性相互作用クロマトグラフィーカラムのピークと比較するとピーク高さが顕著に高かった。以上のことから、Superdex Peptide カラムは分析対象である FIC の分離および検出の両面で最適なカラムであると判断し、本分析法では Superdex Peptide カラムを使用することとした。

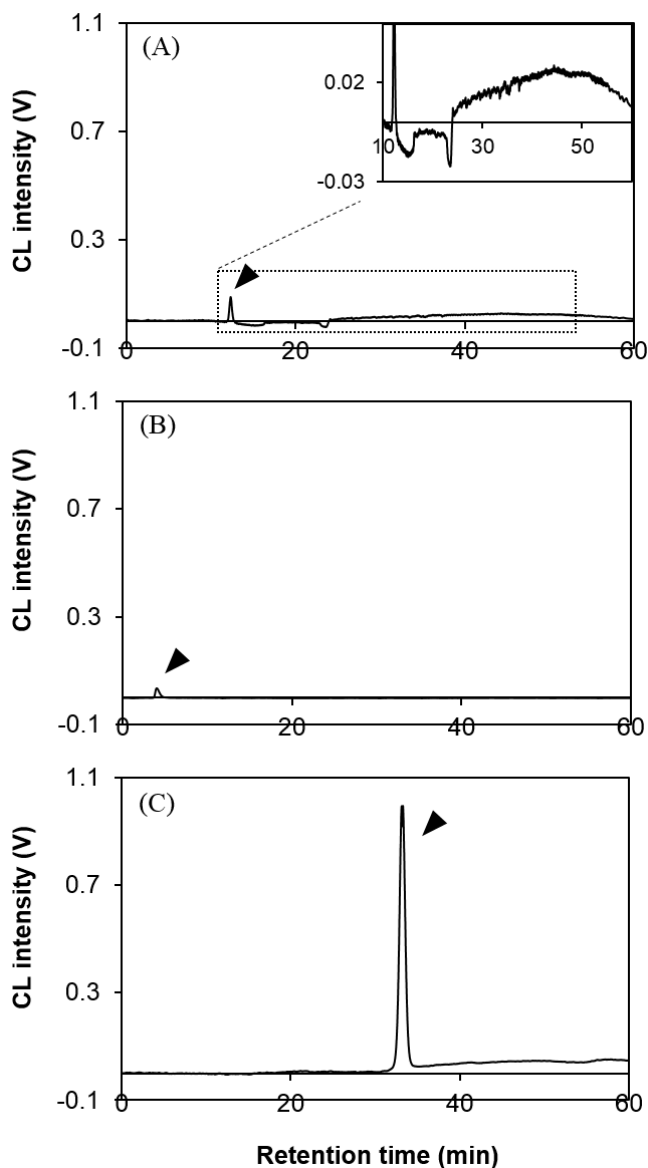


Fig. 3-8. Chromatograms of 20-mL spike of 10 μM Fe(III)-EDTA which was separated, using (A) DEAE-5PW (B) ZIC-HILIC and (C) Superdex Peptide column respectively. The gradient elution was performed with DEAE-5PW column using mobile phase which consisted of 10 mM ammonium acetate (pH 5.5) in milliQ (buffer A) and 300 mM NaCl in buffer A (buffer B). The isocratic elution was performed with ZIC-HILIC column, using mobile phase which contained 10 mM ammonium formate (pH 5.5) and 50% methanol, and with Superdex Peptide column, using mobile phase which consisted of 10 mM ammonium acetate solution (pH 5.5). The flow rate of mobile phase was 0.5 mL/min with all three columns. CL intensities of each eluates were monitored after post-column reaction with 1:1 mixture of PCS-A (100 μM luminol in $\text{H}_3\text{BO}_4/\text{NaOH}$ buffer at pH 10.5) and PCS-B (10 mM H_2O_2 solution). Twenty microliter spike of 10 μM Fe(III)-EDTA is indicated by a black arrow head.

3.3.2.1.3 使用する移動相の検討

続いて、Superdex Peptide カラムによる分離において使用する移動相の組成について検討を行った。本研究では、開発した分析法を用いて実試料から Fe(III)-FIC を検出し最終的には LC-MS を用いて同定することを目的としていたため、揮発性の移動相を用いる必要があった。また、生体試料の中でも特に高等植物の導管液 (pH 5.5 前後) および篩管液 (pH 8.0 前後) 中の Fe(III)-FIC 分析を想定していたため、移動相は各々の pH に合わせて pH 5.5 と pH 8.0 を使い分けることにした。酢酸アンモニウム緩衝液は pH 5.5 を緩衝範囲内に含む揮発性の緩衝液であるため、pH 5.5 の移動相として 10 mM の酢酸アンモニウム緩衝液を用いることにした。また、重炭酸アンモニウム緩衝液は pH 8.0 を緩衝範囲内に含む揮発性の緩衝液であるため、pH 8.0 の移動相として 10 mM の重炭酸アンモニウム緩衝液を用いることにした。

3.3.2.2 PCS-A および PCS-B の流速

PCS-A および PCS-B をどのような混合比率で混合するかは反応系におけるルミノールと H_2O_2 の存在量を決定する要素でもあるため、その混合比率の最適化を行うことにした。PCS-A と PCS-B の混合比率はその流速で決定するため、PCS-A および PCS-B の流速を変化させた時の 10 μM Fe(III)-EDTA の示す S/N 比、ピーク高さ、ノイズ大きさを比較した。移動相は流速 0.5 mL/min で送液し、10 μM Fe(III)-EDTA はカラムの接続していない HPLC システムに直接インジェクトした。PCS-A および PCS-B は等しい流速で送液し、それぞれの流速を移動相と同じ 0.5 mL/min、0.75 mL/min、1.0 mL/min の 3 通りに変化させた。PCS-A として 100 μM ルミノールを含む 100 mM ホウ酸/NaOH 緩衝液 (pH 10.5)、PCS-B として 10 mM の H_2O_2 水溶液を用いた。Fig. 3-8C に示すように 1:1:1 の流速で PCS-A、PCS-B を送液した時に S/N 比は最大になった。これは、PCS-A および PCS-B の流速を上げるとそれに伴ってノイズが増大し、ピーク高さは逆に低下するためである (Fig. 3-9A、B)。これは反応に関わるルミノールと H_2O_2 の絶対量が増えるために化学発光強度のバックグラウンドノイズが増大するためと考えられる。PCS-A および PCS-B の送液に使用した PU2080 が正確な流量を送液できる流速範囲は 0.5 mL/min 以上であるため、それより小さな流速だと流量の正確性が担保されない。また、カラムの圧力上限との兼ね合いで移動相の流速を 0.5 mL/min より高く設定することができなかつたため、移動相の流速を 0.5 mL/min、PCS-A および PCS-B の流速を 0.5 mL/min に設定することとした。

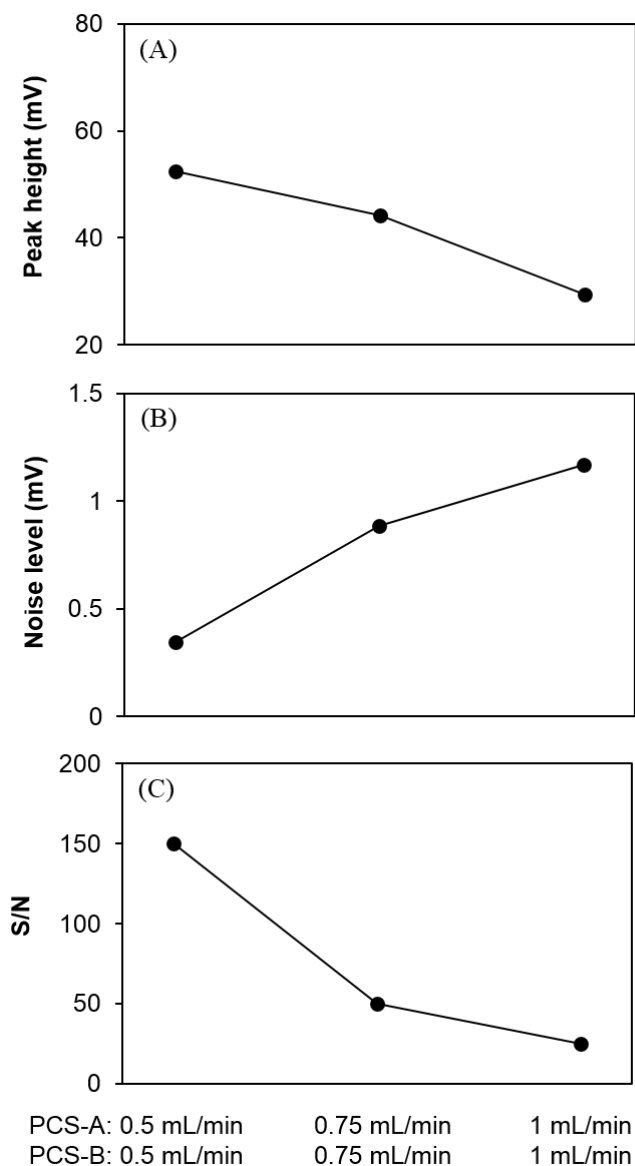


Fig. 3-9. Effect of flow rate of PCS-A and PCS-B on (A) peak height, (B) noise level and (C) S/N ratio. Each peak height and noise level was obtained from chromatograms of 20- μ L spike of 10 μ M Fe(III)-EDTA which were monitored by HPLC chemiluminescence detector after post-column reaction with the 1:1 mixture of PCS-A (100 μ M luminol in $H_3BO_4/NaOH$ buffer at pH 10.5) and PCS-B (10 mM H_2O_2 solution) which were pumped at flow rate of 0.5, 0.75 or 1.0 mL/min. Mobile phase (milliQ) was pumped at 0.5 mL/min and each sample was injected into HPLC system without column for the sake of simplified comparison.

3.3.2.3 ポストカラム溶液の混合方法

本分析法ではポストカラム溶液として PCS-A と PCS-B の 2 液を送液してカラム溶出液と反応させている。この 2 液の送液方法として、PCS-A と PCS-B を 2 台のポンプでそれぞれ送液し、ダイナミックミキサーを用いて混和させるオンラインと、PCS-A と PCS-B を予め混合してからその混合液（ポストカラム溶液）を 1 台のポンプで送液してカラム溶出液と反応させるオフラインが考えられる。後者の方法ではポストカラム溶液中に微量に含まれる金属イオンとルミノール/ H_2O_2 が反応し、ポストカラム溶液の調整から時間が経過すると分析対象の検出感度が低下する可能性が考えられた。そこでオンラインとオフラインで PCS-A および PCS-B を混合した場合のそれぞれについて、 $1\ \mu\text{M}$ Fe(III)-EDTA を分析し S/N 比を求めた。Fig. 3-10 中の SN_0 とはポストカラム溶液を調整してからすぐに分析を行った際の S/N 比を示し、SN とはポストカラム溶液を調整してから各経過時間を経て分析を行った際の S/N 比を示す。SN/ SN_0 とは、各経過時間を経て S/N 比がどれだけ減少したか、または増加したかの割合を示す。経過時間 0 時間とは PCS-A と PCS-B を混合してすぐに分析を行った場合を示すので、この場合 SN と SN_0 は同一であり SN/ SN_0 は 1 となる。オフライン (Fig. 3-10 中の白丸) における経過時間 1 時間とは、PCS-A と PCS-B を混合して 1 時間後に分析を行った場合を示し、その際に得られた SN が SN_0 に占める割合をグラフに示した。一方、オンライン (Fig. 3-10 中の黒丸) において経過時間 1 時間とは、オフラインとの比較のために 1 回目の分析の 1 時間後に再び分析を行った場合を示す。移動相として 10 mM 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 5.5) を用い、また PCS-A として 100 μM ルミノールを含む 100 mM ホウ酸/NaOH 緩衝液 (pH 10.5)、PCS-B として 10 mM の H_2O_2 水溶液を用いた。HPLC システムにはカラムを接続せずに分析試料を直接流路にインジェクトした。オンラインの混合では、ポンプで送液するまで PCS-A と PCS-B は混和せずルミノールと H_2O_2 も反応しないため、理論的には 0 時間ごと 1 時間後の S/N 比に差はないことが予想されたが、Fig. 3-10 を見るとオンラインでは 1 時間と 0 時間後の S/N 比に大きな差は認められなかった。一方、オフラインで混合した場合には、10 μM の Fe(III)-EDTA の示す S/N 比は 1 時間経過後には約 70% にまで減少していた。これは当初の予想通りポストカラム溶液中の微量金属イオン存在下でルミノールと H_2O_2 が反応したためと考えられる。そこで、本分析法では PCS-A と PCS-B は 2 台のポンプで別々に送液し、ダイナミックミキサーを用いてオンラインで混合した後、反応コイル内でカラム溶出液と反応させることとした。

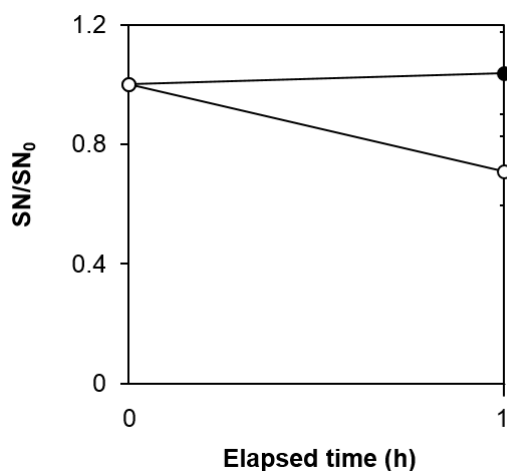


Fig. 3-10. The effect of elapsed time from the preparation of post-column solutions on the S/N ratio of 20- μ L spike of 1 μ M Fe(III)-EDTA. The ratio of SN, the S/N ratio which was obtained after each elapsed time, to SN_0 , the S/N ratio which was obtained without elapsed time. The SN/SN₀ ratios were shown by closed circles when PCS-A (100 μ M luminol in H₃BO₄/NaOH buffer at pH 10.5) and PCS-B (10 mM H₂O₂ solution) were prepared separately and allowed to stand for the indicated time until the analysis. Also the S/N ratios were shown by open circles when PCS-A and PCS-B were mixed in advance and allowed to stand for the indicated time. Each sample was injected into HPLC system without column for the sake of simplified comparison.

3.3.2.4 検出器の接続順序と反応コイルの長さ

3.3.2.4.1 検出器の接続順序

ルミノール/H₂O₂/Mn(II)の化学発光反応において、発光強度はおおよそ 4 秒前後で最大に達し、その後 10 秒前後で消失することが示されている (Burguera and Townshend, 1981)。このようにルミノールの化学発光反応はルミノール、酸化剤、酸化補助剤が混和するとすぐに最大強度に達し、発光の持続時間はわずかであると考えられる。そのため、ルミノールや H₂O₂を含むポストカラム溶液と Fe(III)-FIC を含むカラム溶出液が混和してから化学発光検出器に至るまでにかかる時間も、FIC の検出感度を決定する非常に重要な要素であると考えられる。そこで本研究では、反応コイルから化学発光検出器に至るまでの時間、つまり流路の長さを最適化するために UV 検出器、CL 検出器の順 (UV-CL とする) で検出器を接続した場合と、CL 検出器、UV 検出器の順 (CL-UV と

する) で接続した場合それぞれの HPLC システムを用いて 10 μM の Fe(III)-EDTA を分析した。UV-CL の接続順の方が化学発光検出器に至るまでの時間は長くなり、CL-UV の接続順の方が短くなる。移動相として 10 mM 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 5.5)、PCS-A として 100 μM ルミノールを含む 100 mM ホウ酸/NaOH 緩衝液 (pH 10.5)、PCS-B として 10 mM の H_2O_2 水溶液を用いている。HPLC システムにはカラムを接続せずに分析試料を直接流路にインジェクトした。その結果 Fig. 3-11A に示すように CL、UV の順に接続した場合、従来の UV、CL の順と比較するとピーク高さは約 1.3 倍に向上したが、一方でノイズの大きさも約 1.6 倍に増大したことから (Fig. 3-11B)、結果的に S/N 比は 0.78 倍に低下した (Fig. 3-11C)。これは CL 検出器を UV 検出器の上流に設置することによってルミノールの発する化学発光強度が最大になる瞬間により近い点で化学発光強度を検出することが可能となったが、一方で UV 検出器が上流に接続されている場合よりも溶出液の脈流が強い状態で CL 検出器内に流入することとなり、検出されるノイズの大きさが増大したためと考えられる。このことから、検出器の接続順は従来通り UV 検出器、CL 検出器の順とした。

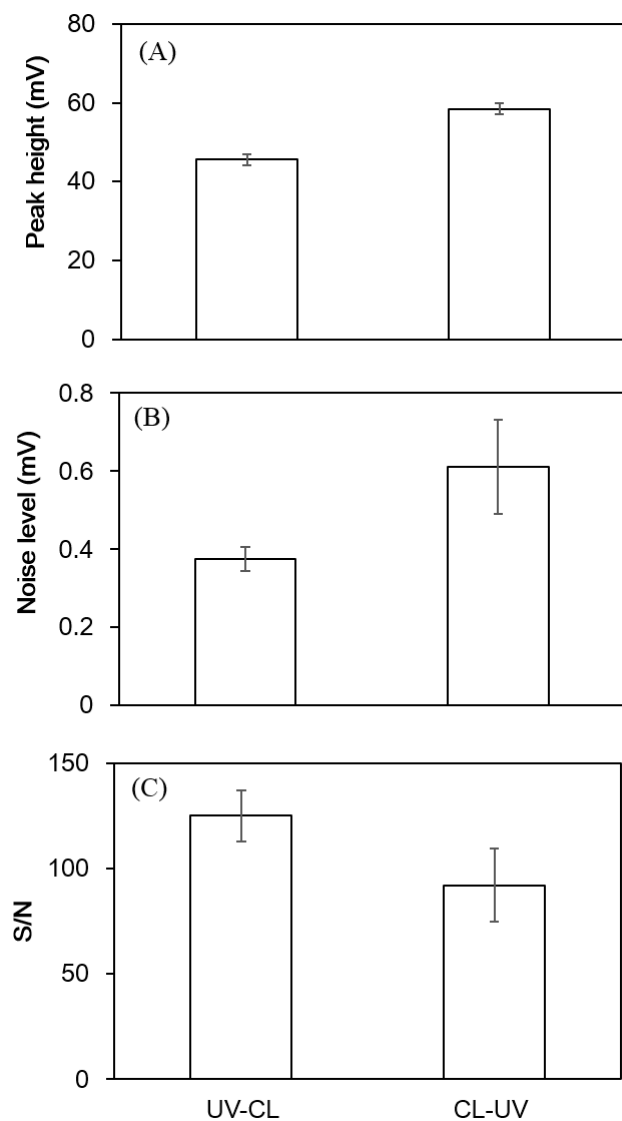


Fig. 3-11. The effect of connection order of HPLC detector on (A) peak height, (B) noise level and (C) S/N ratio of 20- μ L spike of 1 μ M Fe(III)-EDTA. Each peak height and noise level was obtained from chromatograms of 20- μ L spike of 1 μ M Fe(III)-EDTA which were monitored by HPLC chemiluminescence detector connected below (UV-CL) or above HPLC UV/Vis detector (CL-UV) after post-column reaction with the 1:1 mixture of PCS-A (100 μ M luminol in $H_3BO_4/NaOH$ buffer at pH 10.5) and PCS-B (10 mM H_2O_2 solution). Each sample was injected into HPLC system without column for the sake of simplified comparison.

3.3.2.4.2 反応コイルの長さ

検出器の接続順だけではなく、反応コイルの長さもルミノール、 H_2O_2 、 Fe(III)-FIC が混和してから検出器に至るまでの時間を決定する要素の一つである。また、反応コイルの長さはルミノール、 H_2O_2 、 Fe(III)-FIC 、本分析法の反応時間を決定する重要な分析条件の一つでもある。そこで、全長 1 m と 3 m の 2 種類の長さの反応コイルを用いて 1 μM の Fe(III)-EDTA を分析し、それぞれの S/N 比を比較した。HPLC システムにはカラムを接続せずに分析試料を直接流路にインジェクトした。その結果 Fig. 3-12 に示すように両者で大きな差異はなかったため、本分析法で用いる反応コイルの長さは 1 m とした。

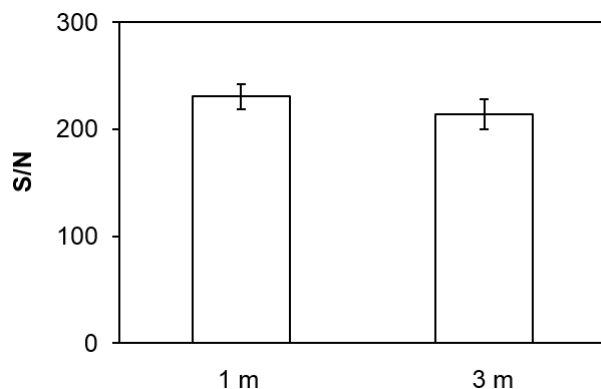


Fig. 3-12. The effect of length of reaction coil on S/N ratio. Each S/N ratio was calculated from peak height and noise level obtained from chromatograms of 20- μL spike of 1 μM Fe(III)-EDTA which were monitored by HPLC chemiluminescence detector after post-column reaction with the 1:1 mixture of PCS-A (100 μM luminol in $\text{H}_3\text{BO}_4/\text{NaOH}$ buffer at pH 10.5) and PCS-B (10 mM H_2O_2 solution) in the reaction coil of 1 m or 3 m. Each sample was injected into HPLC system without column for the sake of simplified comparison.

3.3.2.5 100 mM 酢酸を用いた HPLC 流路の洗浄

本分析法を開発するにあたって、10 μ M の Fe(III)-EDTA を繰り返し分析した場合に、分析日ごとのピーク高さのばらつきが大きいことが問題になった。Fig. 3-13A~C に分析日ごとの S/N 比、ピーク高さ、ノイズ大きさの変化を示した。移動相として 10 mM 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 5.5)、PCS-A として pH 10.5 の 100 mM ホウ酸/NaOH 緩衝液に溶解させた 100 μ M ルミノール水溶液、PCS-B として 10 mM の H₂O₂ 水溶液を用いた。HPLC システムにはカラムを接続せずに Fe(III)-EDTA を直接流路へインジェクトした。白丸のマーカで示した分析日は前日と比較して S/N 比が低下した日であり、黒丸のマーカで示した分析日は前日と比較して S/N 比が高かった日である。それぞれの分析日の前後に行った操作を 1~5 の矢印で示している。1 は 12 時間にわたるミリ Q 水を用いた HPLC 配管の洗浄、2 は短時間 (2 時間) のミリ Q 水を用いた HPLC 配管の洗浄、3 は配管の洗浄の不実施、4 は 0.1% の TFA を含む移動相を用いた 6 時間にわたる分析、5 は配管の洗浄の不実施を示す。分析の前日に 12 時間ミリ Q 水による洗浄を行った場合 (1) や、0.1% の TFA を含む移動相を用いた分析 6 時間を行った場合 (4) の後には S/N 比が高くなり、ミリ Q 水での洗浄時間が 2 時間と短時間であった場合 (2) やミリ Q 水での洗浄および 0.1% の TFA を含む移動相を用いた分析を行わなかった場合 (3、5) の後には S/N 比が低くなる現象が観察された (Fig. 3-13C)。S/N 比の他にもピーク高さ、ノイズ大きさについても同様のグラフを作成するとそれぞれ Fig. 3-13A、B のようになり、S/N 比が低下した日 (白丸のマーカ) にはピーク高さが減少するとともに (Fig. 3-13A) ノイズ大きさが増加していた (Fig. 3-13B)。一方、S/N 比が高かった日 (黒丸のマーカ) にはピーク高さは増加するとともにノイズ大きさは減少していた。本分析法では pH 10 以上のアルカリ性のポストカラム溶液を流しており、移動相と混合後の溶出液の pH も 9.5 前後とアルカリ性を示すため、HPLC の配管内で分析試料中に含まれる一部の Fe(III) が FIC から解離し、アルカリ条件下で水酸化物となって沈殿することによって化学発光強度のバックグラウンドが高くなったと考えられる。その結果、ピーク高さは低く、ノイズ大きさは大きくなるために分析対象の S/N 比が低下するのではないかと考えられた。また、カラムを用いた Fe(III)-FIC の分離の過程で一部の Fe(III) が FIC から解離しカラム担体と相互作用してカラム内に残存する可能性も高かったため、分析を行った後は 100 mM の酢酸水溶液を脱気し、洗浄液として送液してカラムおよび HPLC 配管を洗浄することとした。この洗浄を行うことによって分析サンプルのピーク高さ、ノイズ大きさは分析日を変えてもばらつきがなくなった。

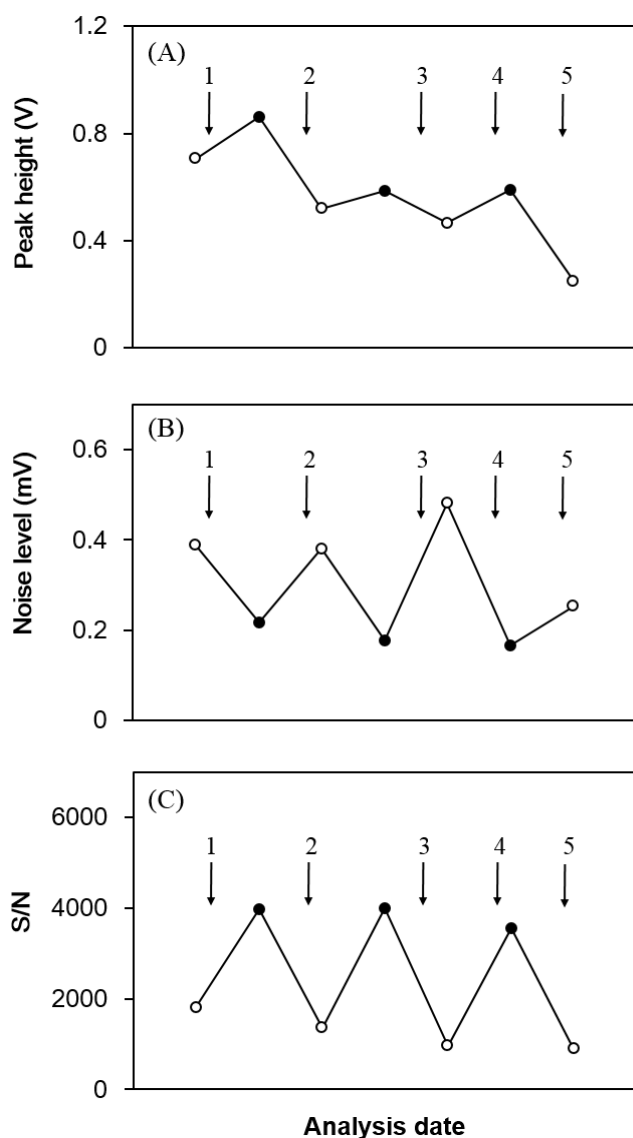


Fig. 3-13. The diurnal variance of (A) peak height, (B) noise level and (C) S/N ratio. Each S/N ratio was calculated from peak height and noise level obtained from chromatograms of 20- μ L spike of 10 μ M Fe(III)-EDTA which were monitored by HPLC chemiluminescence detector after post-column reaction with the 1:1 mixture of PCS-A (100 μ M luminol in $H_3BO_4/NaOH$ buffer at pH 10.5) and PCS-B (10 mM H_2O_2 solution). Each sample was injected into HPLC system without column for the sake of simplified comparison. Each number and allow indicates following operation, respectively; 1: 12 hours-long washing of HPLC flow path by milliQ, 2: 2 hours-long washing of HPLC flow path by milliQ, 3: inexecution of washing, 4: 6 hours-long HPLC analysis using mobile phase containing 0.1% TFA and 5: inexecution of washing. Closed circles indicate the analysis date of higher S/N ratio, and open circles indicate the analysis date of lower S/N ratio.

3.3.2.5 ポストカラム溶液組成の最適化

3.3.2.5.1 PCS-B 中の H_2O_2 の濃度

PCS-B 中の H_2O_2 濃度の最適化を行うために、PCS-A の組成を 100 μM ルミノール、pH 10.5 の 100 mM ホウ酸/NaOH 緩衝液に固定し、PCS-B 中の H_2O_2 濃度を変化させて濃度の最適化を行った。HPLC システムには Superdex Peptide カラムを接続し、10 μM の Fe(III)-EDTA および 100 μM の Fe(III)-Cit をインジェクトした。その結果、ピーク高さは Fe(III)-EDTA の場合には H_2O_2 濃度が 10 mM の時に最大になり、Fe(III)-Cit の場合には 50 mM の時に最大になったが(Fig. 3-14A-1、A-2)、 H_2O_2 濃度が 50 mM を超えるとノイズの大きさが急激に増加し (Fig. 3-14B-1、B-2) S/N 比は減少した (Fig. 3-14C-1、C-2)。S/N 比は 10 μM の Fe(III)-EDTA および 100 μM の Fe(III)-Cit において共に H_2O_2 濃度が 10 mM の時最大になったため (Fig. 3-14C-1、C-2)、最適の H_2O_2 濃度を 10 mM とした。

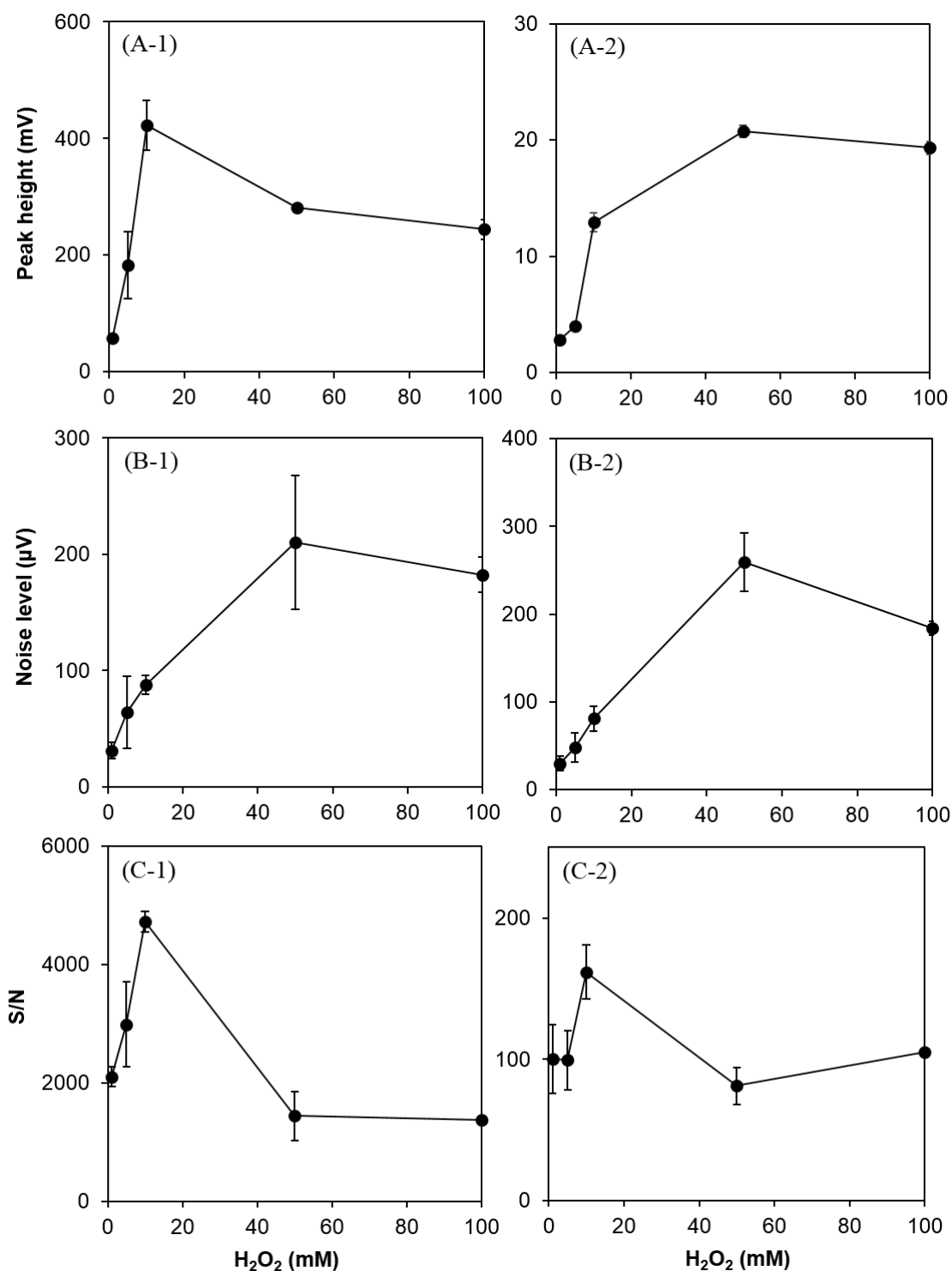


Fig. 3-14. The effect of H_2O_2 concentration in PCS-B on (A-1, A-2) peak height, (B-1, B-2) noise level, and (C-1, C-2) S/N ratio of 20- μL spike of (A-1, B-1, C-1) 10 μM Fe(III)-EDTA and (A-2, B-2, C-2) 100 μM Fe(III)-Cit. Each sample was injected onto Superdex Peptide column and the eluate was reacted with the 1:1 mixture of PCS-A (100 μM luminol solution in 100 mM $H_3BO_4/NaOH$ buffer at pH 10.5) and PCS-B of each H_2O_2 concentration. The reaction temperature was set at 50 $^{\circ}C$. Lines are only eye guide.

3.3.2.5.2 PCS-A 中のルミノールの濃度

PCS-A 中のルミノール濃度を最適化するために PCS-B 中の H_2O_2 濃度を 10 mM に固定し、PCS-A 中のルミノール濃度を変化させて濃度の最適化を行った。HPLC システムには Superdex Peptide カラムを接続し、10 μM の Fe(III)-EDTA と 100 μM の Fe(III)-Cit をインジェクトした。ピーク高さは Fe(III)-EDTA の場合には 100 μM 、Fe(III)-Cit の場合には 250 μM の時最大になった (Fig. 3-15A-1、A-2)。ノイズの大きさはルミノール濃度が増加するにつれて増加していた (Fig. 3-15B-1、B-2)。S/N 比は Fe(III)-EDTA と Fe(III)-Cit の双方においてルミノール濃度が 100 μM を超えると急激に減少することから (Fig. 3-15C-1、C-2)、最適のルミノール濃度を 100 μM とした。

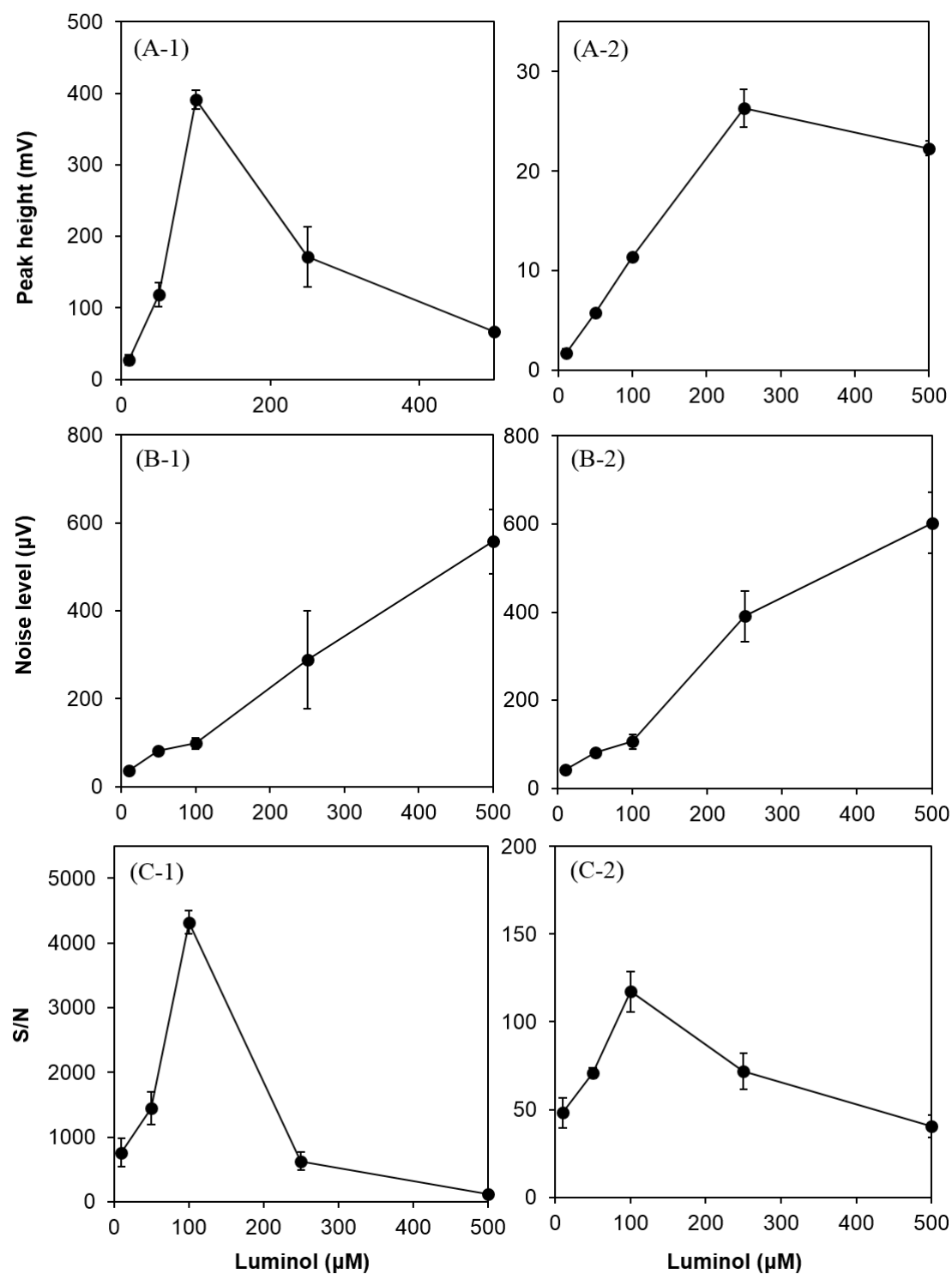


Fig. 3-15. The effect of luminol concentration in PCS-A on (A-1, A-2) peak height, (B-1, B-2) noise level, and (C-1, C-2) S/N ratio of 20- μ L spike of (A-1, B-1, C-1) 10 μ M Fe(III)-EDTA and (A-2, B-2, C-2) 100 μ M Fe(III)-Cit. Each sample was injected onto Superdex Peptide column and the eluate was reacted with the 1:1 mixture of PCS-A (luminol of each concentration in 100 mM $\text{H}_3\text{BO}_4/\text{NaOH}$ buffer at pH 10.5) and PCS-B. The reaction temperature was set at 50 $^\circ\text{C}$. Lines are only eye guide.

3.3.2.5.3 PCS-A への合成金属キレーターの添加

PCS-A として 100 μM ルミノールを含む 100 mM ホウ酸/NaOH 緩衝液 (pH 10.5)、PCS-B として 10 mM の H_2O_2 水溶液を用いて、100 nM の Fe(III)-EDTA と 20 μM の Fe(III)-Cit を 20 μL ずつ、Superdex Peptide カラムにインジェクトし分析した。移動相として 10 mM 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 5.5) を用いた。得られたクロマトグラムを Fig. 3-16A および B に示した。Fe(III)-Cit の濃度は Fe(III)-EDTA よりも 200 倍高いのにも関わらず、ピーク高さは Fe(III)-Cit が Fe(III)-EDTA の約 0.8 倍にとどまっていた。検出感度は Fe(III)-EDTA が 36 mV/ μM 、Fe(III)-Cit が 0.082 mV/ μM であり前者が 3 桁高く、Fe(III)-FIC 錯体の種類によって検出感度が異なることが示された。

以上の結果から、Fe(III)-FIC 錯体をカラムで分離したのち、高い検出感度を示す配位子で交換しルミノール/ H_2O_2 系に導入すると分析の高感度化が図れると着想した。分析原理を Fig. 3-17 に示した。分析試料中に含まれる Fe(III)-FIC は PCS-A 中に含まれる金属キレーター (X) との間で配位子置換反応を起こし、その結果 Fe(III)は Fe(III)-X に変化し FIC はフリーになる。PCS-A に含まれるルミノール、PCS-B に含まれる H_2O_2 が Fe(III)-X の存在下で化学発光反応を起こし、その結果生じた化学発光を Fe(III)-FIC のシグナルとして検出する。

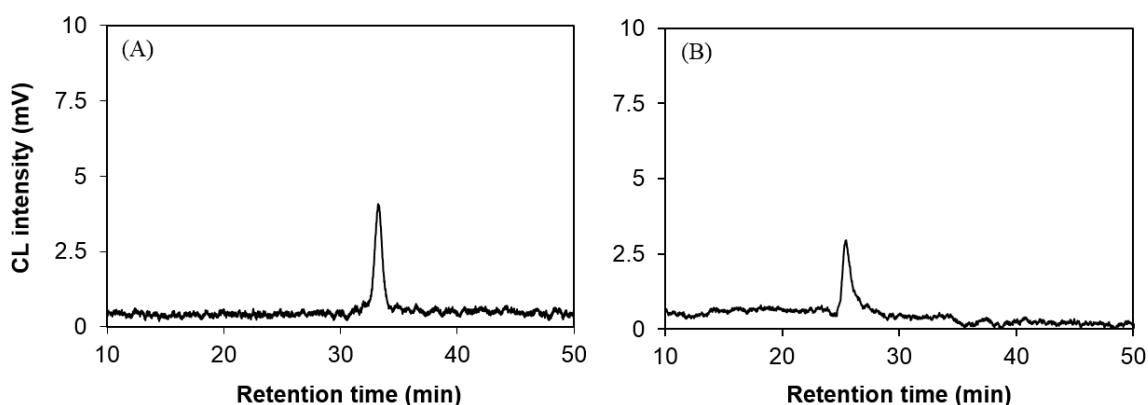


Fig. 3-16. Chromatograms of 20- μL spike of (A) 100 nM Fe(III)-EDTA and (B) 20 μM Fe(III)-Cit. Each Fe(III)-FIC complex was separated by Superdex Peptide column using 10 mM ammonium acetate buffer (pH 5.5) as mobile phase, and the column eluate was reacted with the 1:1 mixture of PCS-A (luminol of each concentration in 100 mM $\text{H}_3\text{BO}_4/\text{NaOH}$ buffer at pH 10.5) and PCS-B. The reaction temperature was set at 50 $^\circ\text{C}$.

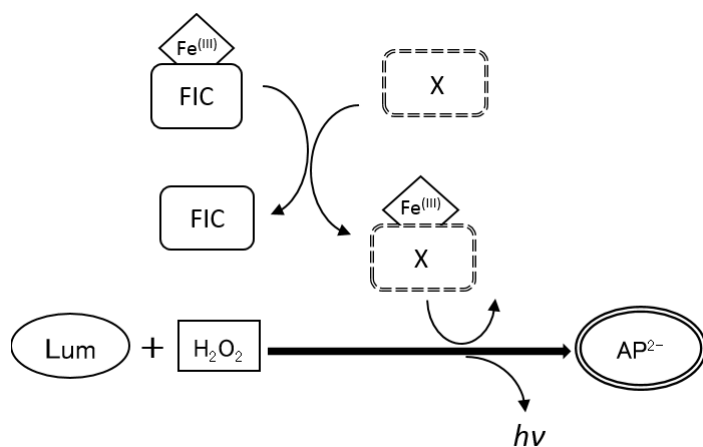


Fig. 3-17. Schematic diagram of detection mechanism of present method.

Lum: luminol; X: metal chelator; AP²⁻: aminophthalate.

そこで次に、PCS-A に数種類の金属キレーターX を加え Fe(III)-Cit を分析し、検出感度が向上するかを確認した。分析試料中の Fe(III)-Cit はカラムで分離された後、PCS-A 中に含まれる金属キレーターと反応し、Fe(III)-Cit 錯体中のクエン酸は合成金属キレーターによって配位子置換される。その結果生じた Fe(III)-金属キレーター錯体が Fe(III)-Cit よりも良好な感度を示す場合、Fe(III)-Cit の検出感度は向上する。100 μ M のルミノールと 100 mM ホウ酸/NaOH 緩衝液 (pH 10.5) からなる PCS-A に、金属キレーターX として EDTA (Fig. 3-18A)、DTPA (Fig. 3-18B)、GEDTA (Fig. 3-18C)、CyDTA (Fig. 3-18D) をそれぞれ 5 μ M ずつ添加した。10 μ M の Fe(III)-Cit 20 μ L を Superdex Peptide カラムへインジェクトし、PCS-A および PCS-B と反応コイル内で反応させた。得られた Fe(III)-Cit のクロマトグラム上のピークから S/N、ピーク高さ、ノイズを求め比較した。

EDTA と CyDTA を添加した場合にピーク高さは大幅に増加した (Fig. 3-19A)。同様にノイズの大きさも EDTA と CyDTA の添加後に増加したが、CyDTA を添加した場合により増大した (Fig. 3-19B)。その結果、S/N 比は EDTA を添加した場合に最も向上した (Fig. 3-19C)。そこで、PCS-A に EDTA を添加することとした。

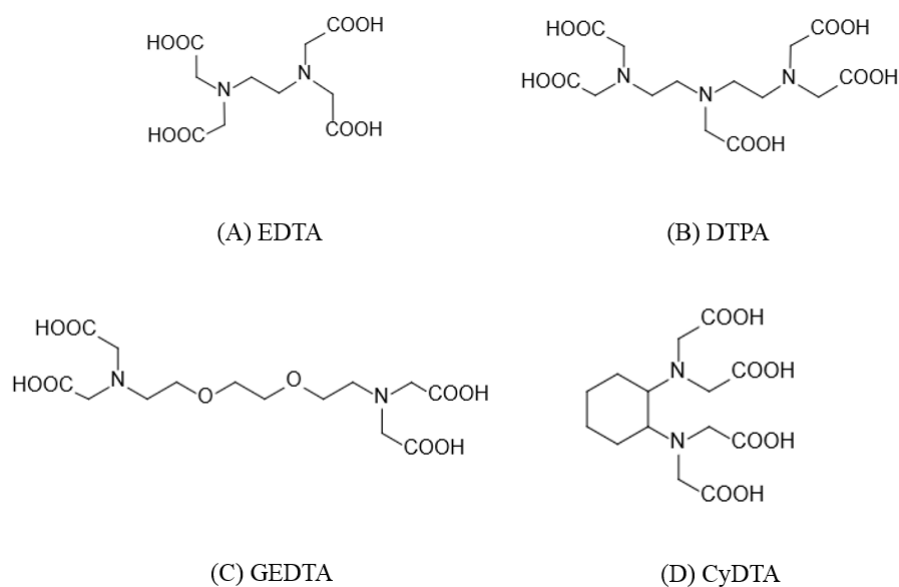


Fig. 3-18. Structures of synthetic FICs added in PCS-A.

(A) EDTA: Ethylenediamine-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid; (B) DTPA: Diethylenetriamine-*N,N,N',N'',N''*-pentaacetic acid; (C) GEDTA: *O,O'*-Bis (2-aminoethyl) ethyleneglycol-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid; (D) CyDTA: *trans*-1,2-Diaminocyclohexane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid, monohydrate.

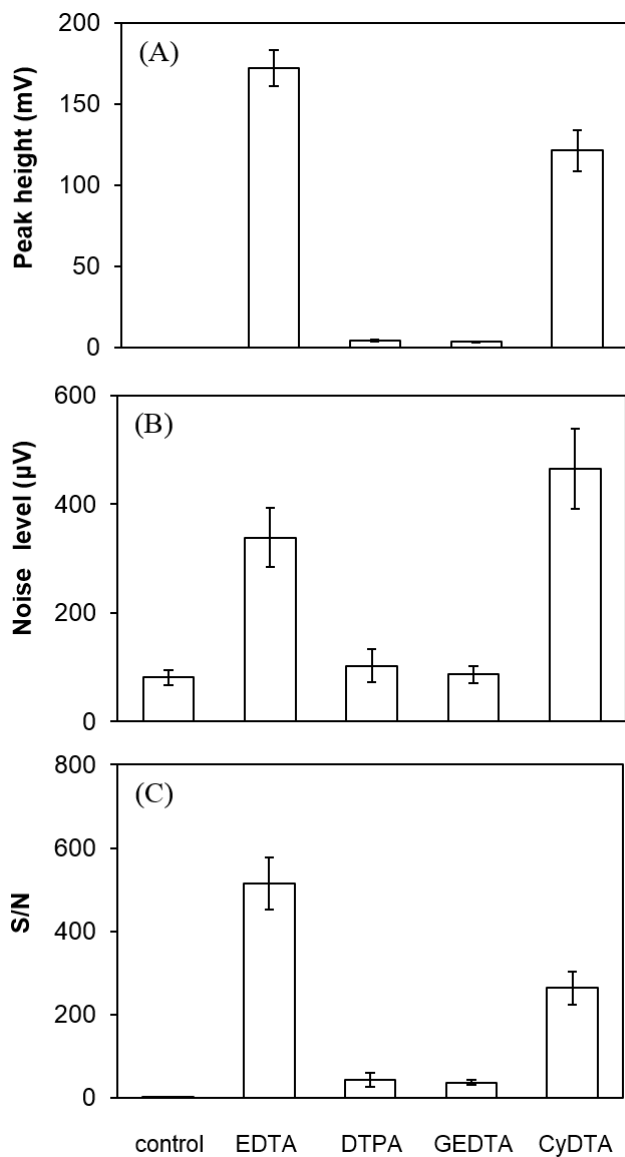


Fig. 3-19. The effect of type of synthetic Fe(III) chelators added in PCS-A on (A) peak height, (B) noise level, and (C) S/N ratio. Twenty microliter of 10 μ M Fe(III)-Cit was injected onto Superdex Peptide column and chromatogram of the eluate was monitored by HPLC chemiluminescence detector after post-column reaction with 1:1 mixture of PCS-A (100 μ M luminol and each synthetic Fe(III) chelator of 5 μ M in $H_3BO_4/NaOH$ buffer at pH 10.5) and PCS-B (10 mM H_2O_2). Each peak height and noise level was obtained from the chromatogram. The reaction temperature was set at 50°C.

続いて、PCS-A 中の EDTA の濃度を最適化するために PCS-A 中の EDTA の添加濃度を変化させ、10 μM の Fe(III)-Cit を分析した。PCS-A はルミノール、100 mM ホウ酸/NaOH 緩衝液 (pH 10.5) および各濃度の EDTA を含む。PCS-B としては 10 mM H_2O_2 を用いた。20 μL の 10 μM Fe(III)-Cit を Superdex Peptide カラムにインジェクトし、それぞれの EDTA 濃度の PCS-A および PCS-B と反応コイル内で反応させた。それぞれの条件において得られた S/N 比、ピーク高さ、ノイズを示したグラフが Fig. 3-20A~C である。EDTA の濃度が濃くなるに従って Fe(III)-Cit の示すピーク高さは双曲線的に増加し (Fig. 3-20A)、ノイズの大きさもピーク高さと同様に増加した (Fig. 3-20B)。S/N 比の変化を見ると、EDTA 濃度が 5 μM に達するまでは増加しその後は徐々に減少した (Fig. 3-20C)。以上の結果から、PCS-A 中の EDTA の最適濃度は 5 μM であることが示された。

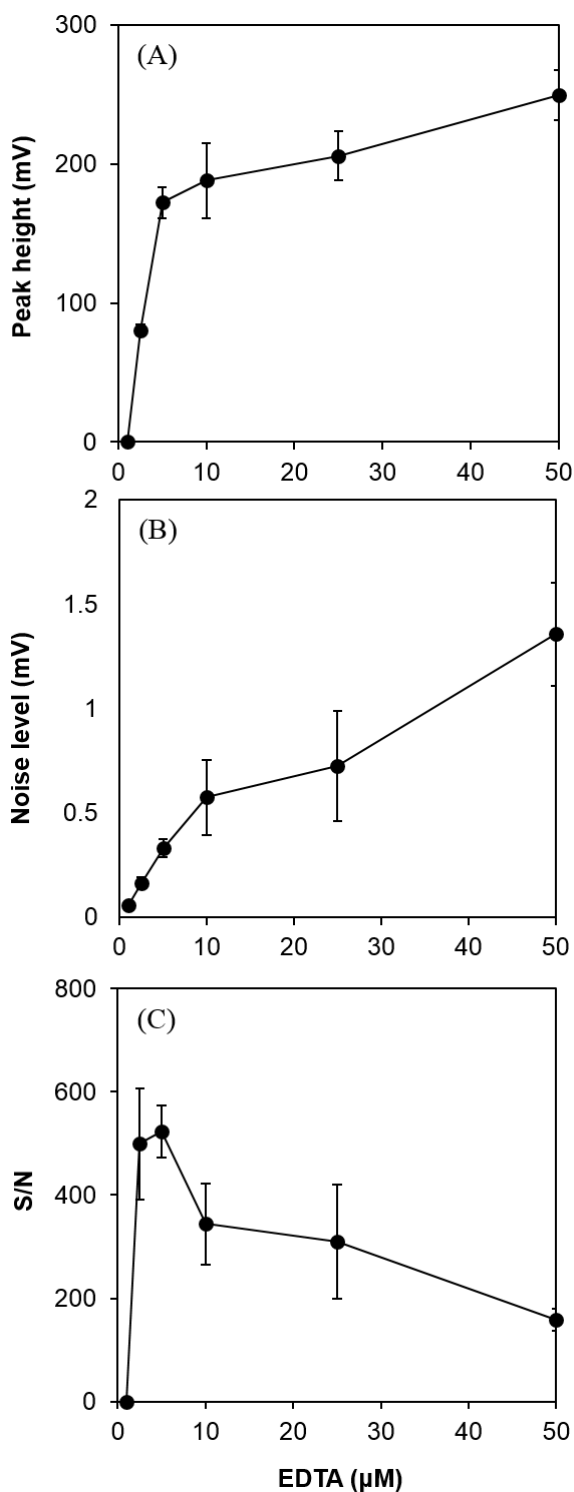


Fig. 3-20. Effect of the concentration of EDTA in PCS-A on (A) peak height, (B) noise level, and (C) S/N ratio. Twenty microliter of 10 μM Fe(III)-Cit was injected onto Superdex Peptide column and chromatogram of the eluate was monitored by HPLC chemiluminescence detector after post-column reaction with 1:1 mixture of PCS-A (100 μM luminol and EDTA of each concentration in 100 mM $\text{H}_3\text{BO}_4/\text{NaOH}$ buffer at pH 10.5) and PCS-B (10 mM H_2O_2). Each peak height and noise level was obtained from the chromatogram. The reaction temperature was set at 50 $^\circ\text{C}$.

3.3.2.5.4 PCS-A の pH

続いて PCS-A の pH を最適化するために、PCS-A の pH を 9.5~12.0 の範囲で変化させた。pH 9.5~11.5 の時は pH 緩衝液として 100 mM ホウ酸/NaOH 緩衝液を、pH 12.0 の時は 12 mM の NaOH/KCl 緩衝液を使用した。各 PCS-A は全て 100 μ M のルミノールおよび 5 μ M EDTA を含む。10 μ M の Fe(III)-Cit を Superdex Peptide カラムに 20 μ L インジェクトし、各 pH の PCS-A と PCS-B (10 mM H₂O₂) と反応させた。PCS-A の pH 毎の S/N 比、ピーク高さ、ノイズ大きさは Fig. 3-21A~C のようになった。ピーク高さは pH 11.5 において最大になったが (Fig. 3-21A)、同様に pH 9.5~11.5 の範囲でノイズ大きさも増加しているため (Fig. 3-21B)、S/N 比は pH 10.5 の時に最大になった (Fig. 3-21C)。そこで、PCS-A の最適 pH は 10.5 とし、pH 緩衝液として pH 10.5 に調整した 100 mM ホウ酸/NaOH 緩衝液を用いることにした。

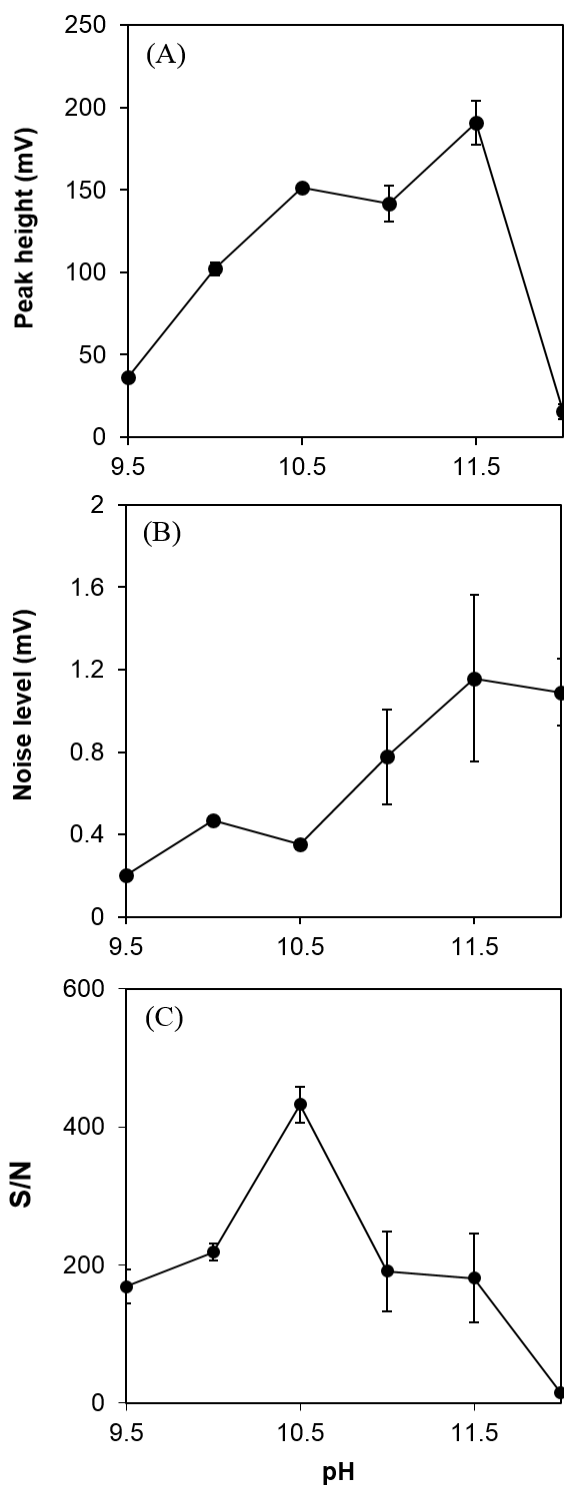


Fig. 3-21. The effect of the pH of PCS-A on (A) peak height, (B) noise level, and (C) S/N ratio. Twenty microliter of 10 μM Fe(III)-Cit was injected onto Superdex Peptide column and chromatogram of the eluate was monitored by HPLC chemiluminescence detector after post-column reaction with 1:1 mixture of PCS-A (100 μM luminol and 5 μM EDTA in pH buffer at each pH) and PCS-B (10 mM H_2O_2). Each peak height and noise level was obtained from the chromatogram. The reaction temperature was set at 50 $^\circ\text{C}$.

3.3.2.5.5 反応温度

次に、ルミノールと H_2O_2 の反応温度も FIC の検出感度を決定する要因であると考えられるので、反応コイルを収納したカラムオーブンの設定温度を $40\sim 65^\circ\text{C}$ の範囲で変化させ反応温度を最適化した。PCS-A として $100\ \mu\text{M}$ のルミノールおよび $5\ \mu\text{M}$ EDTA を含む $100\ \text{mM}$ ホウ酸/NaOH 緩衝液 (pH 10.5)、PCS-B として $10\ \text{mM}$ の H_2O_2 水溶液を用い、 $10\ \mu\text{M}$ の Fe(III)-Cit を Superdex Peptide カラムにインジェクトした。それぞれの反応温度において得られた S/N 比、ピーク高さ、ノイズを示したグラフが Fig. 3-22A～C である。ピーク高さは 55°C で最大になったがノイズ大きさも 55°C 以上の反応温度において上昇したため (Fig. 3-22A、B)、S/N 比は 50°C の時に最大になった (Fig. 3-22C)。よって最適の反応温度を 50°C とした。

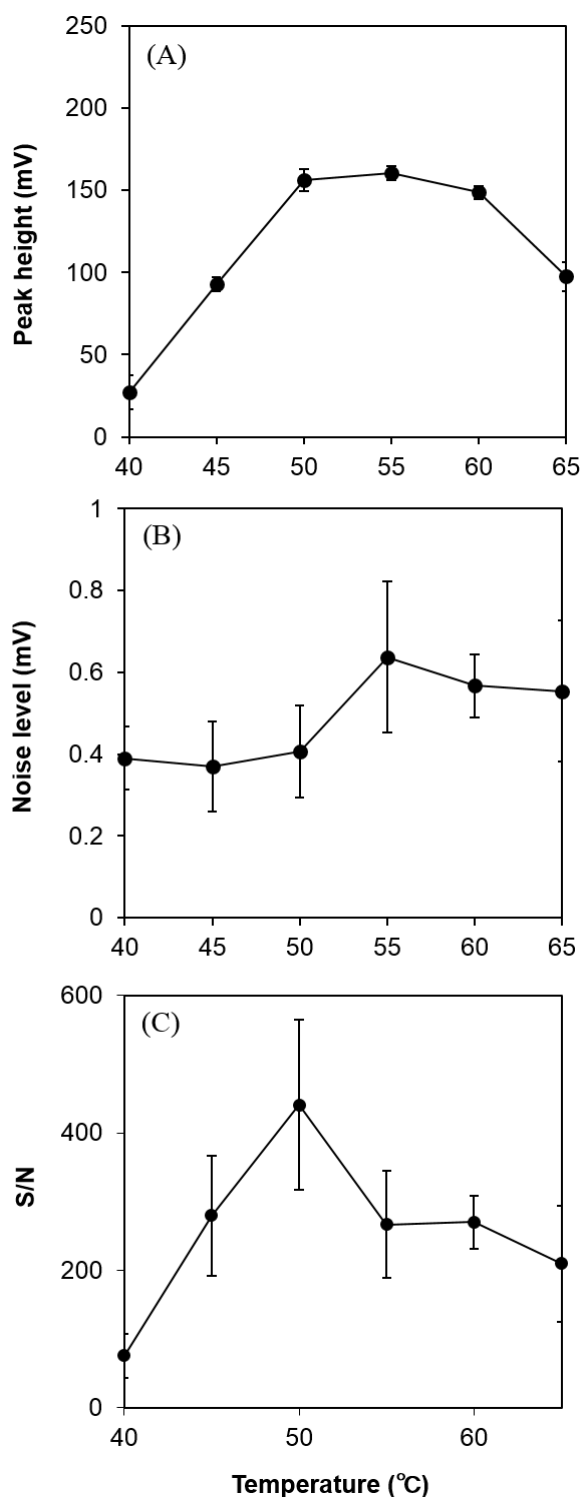


Fig. 3-22. The effect of the reaction temperature on (A) peak height, (B) noise level, and (C) S/N ratio. Twenty microliter of 10 μM Fe(III)-Cit was injected onto Superdex Peptice column and chromatogram of the eluate was monitored by HPLC chemiluminescence detector after post-column reaction with 1:1 mixture of PCS-A (100 μM luminol and 5 μM EDTA in pH buffer at each pH) and PCS-B (10 mM H_2O_2). Each peak height and noise level was obtained from the chromatogram. The reaction temperature was set at each temperature.

以上の結果を元に決定した FIC の最適な分析条件を Table 3-1 に示した。

Table 3-1. Optimized conditions for post-column solutions of Fe(III)-FICs analysis.

Parameter	Condition
PCS-A	
concentration of luminol	100 μ M
concentration of EDTA	5 μ M
pH	10.5
PCS-B	
concentration of H ₂ O ₂	10 mM

3.3.3 Fe(III)-FIC 錯体標準物質の分析

3.3.3.1 Fe(III)-FIC 錯体標準物質の HPLC 分析

Table 3-1 に示した FIC の最適な分析条件を用いて、Fe(III)-FIC の標準物質を分析した。フリーの Fe(III)イオンは溶出時間 0~90 分の間に溶出しないことはあらかじめ確認した。

pH 5.5 の移動相を用いて 100 nM の Fe(III)-EDTA と 20 μ M の Fe(III)-Cit を分析した際のクロマトグラムが Fig. 3-23 の A と B である。Fe(III)-EDTA は 33.4 分前後、Fe(III)-Cit は 25.5 分前後に溶出した。このクロマトグラムのピーク高さと分析試料の濃度から各 Fe(III)-FIC の検出感度 (mV/ μ M) を求め、PCS-A 中に EDTA を含まない場合 (Fig. 3-16) の検出感度と比較すると、Fe(III)-EDTA の場合は検出感度が 36 mV/ μ M から 96 mV/ μ M になり 2 倍以上向上した。Fe(III)-Cit の場合はこれよりも更に大幅な検出感度の向上が見られ、0.082 mV/ μ M から 20 mV/ μ M になり 3 桁向上した。これは Fe(III)-Cit 中の Cit が PCS-A 中の EDTA によって配位子置換され、より検出感度の高い Fe(III)-EDTA として検出されたことに起因する。しかし、PCS-A への EDTA の添加後の Fe(III)-EDTA の検出感度 (96 mV/ μ M) と Fe(III)-Cit の検出感度 (20 mV/ μ M) を比較すると、後者の検出感度は依然として低い。これは、Cit は EDTA と比較して Fe(III)との安定度定数が小さいため ($\log K_{\text{Fe(III)Cit}} = 11.5$, $\log K_{\text{Fe(III)EDTA}} = 25.1$)、カラムによる分離の際に分析試料中の一部の Fe(III)-Cit が解離し、カラム担体に Fe(III)が吸着したものと考えられる。次に、植物由来の FIC である NA (Fig. 1-2A) と DMA (Fig. 1-2B) のそれぞれと Fe(III)との錯体標準物質を調整し、Table 3-1 の条件で分析した。pH 5.5 の移動相を用いて分析すると、Fe(III)-NA は 34.1 分前後に、Fe(III)-DMA は 32.0 分前後にピークが現れた (Fig. 3-23C、D)。

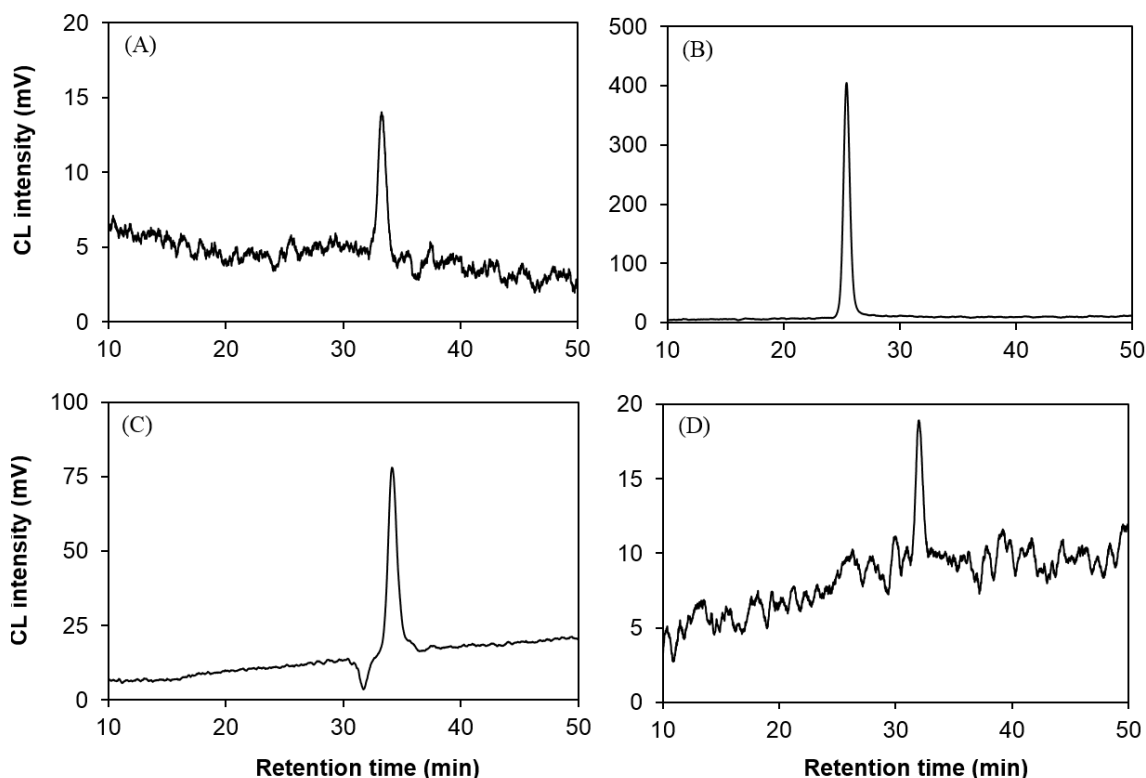


Fig. 3-23. Chromatograms of 20- μ L spike of (A) 100 nM Fe(III)-EDTA and (B) 20 μ M Fe(III)-Cit, (C) 150 μ M Fe(III)-NA and (D) 10 μ M Fe(III)-DMA. Each Fe(III)-FIC complex was separated by Superdex Peptide column using 10 mM ammonium acetate buffer at pH 5.5 as mobile phase, and each chromatogram was obtained in the optimal analytical condition shown in Table 3-1.

次に pH 8.0 の移動相を用いて 500 nM の Fe(III)-EDTA および 50 μ M の Fe(III)-Cit を分析した際のクロマトグラムが Fig. 3-24 の A および B である。Fe(III)-EDTA は 32.1 分前後に、Fe(III)-Cit は 22.4 分と 24.2 分前後の 2 ヶ所に溶出した。Fe(III)-Cit のピークが 2 ヶ所に現れたのは、pH 8.0 において Fe(III)-Cit が異なる二つの結合比率の錯体 (Fe₃-Cit₃、Fe₂-Cit₂ など) を形成しており、それぞれが異なる時間に溶出したものと予想される。植物由来の FIC である NA の Fe(III)錯体標準物質を調整し分析すると 31.3 分前後に溶出した (Fig. 3-24C)。

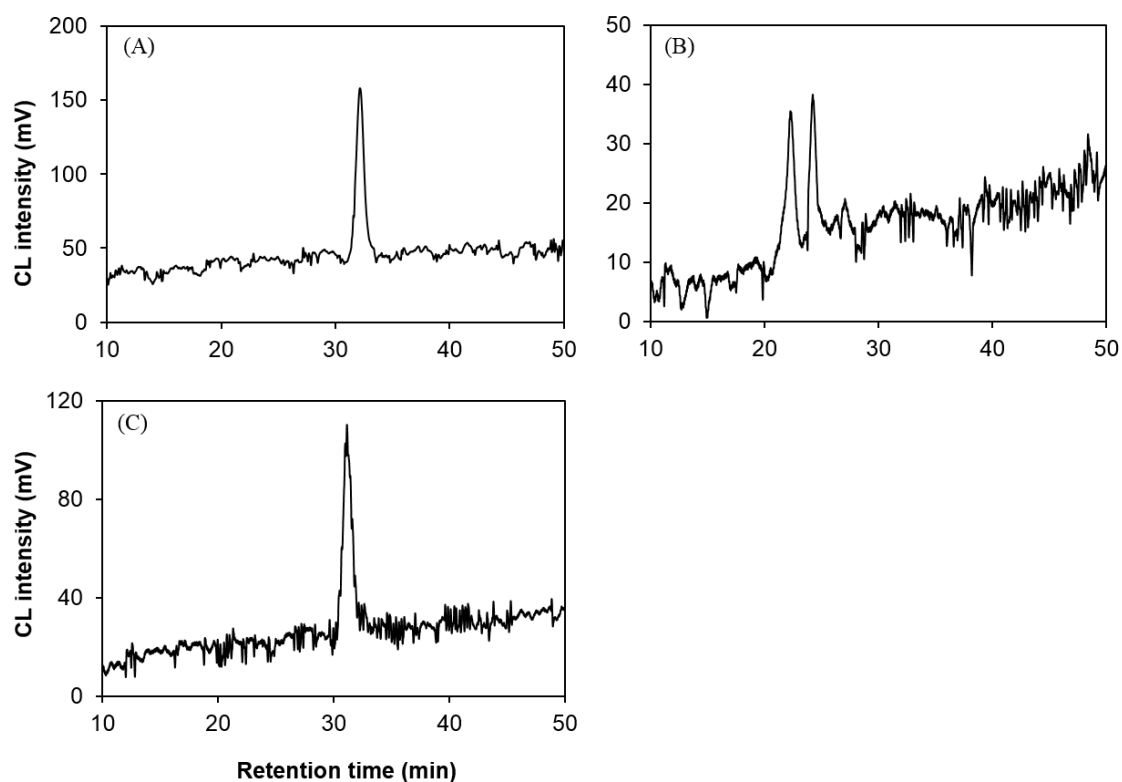


Fig. 3-24. Chromatograms of 20- μ L spike of (A) 500 nM Fe(III)-EDTA and (B) 20 μ M Fe(III)-Cit and (C) 2.5 μ M Fe(III)-NA. Each Fe(III)-FIC complex was separated by Superdex Peptide column using 10 mM ammonium hydrogen carbonate buffer at pH 8.0 as mobile phase, and each chromatogram was obtained in the optimal analytical condition shown in Table 3-1.

3.3.3.2 Fe(III)-FIC 錯体標準物質の検出限界の決定

S/N = 3.0 として本分析法の検出限界を求め、Table 3-2 にそれぞれの Fe(III)-FIC の検出限界を示した。分析条件は Table 3-1 に示した。Fe(III)-Cit の pH 5.5 における検出限界は 2.3 pmol であり、これは Fe(III)-EDTA の検出限界である 0.77 pmol の約 3 倍の数値である。これは Fe(III)-EDTA の検出感度 (96 mV/ μ M) と比較して Fe(III)-Cit の検出感度 (20 mV/ μ M) が低いことに起因していると考えられる。また、pH 8.0 における Fe(III)-Cit の検出限界は 22 分前後のピークと 24 分前後のピークのそれぞれについて検量線を作成し求めた。Fe(III)-Cit の検出限界は 22 分のピークが 62 pmol、24 分のピークが 36 pmol であった。Fe(III)-EDTA の検出限界は移動相の pH が 5.5 において 0.77 pmol であ

ったのに対し pH が 8.0 の時は 0.25 pmol であり、Fe(III)-Cit の場合と同様に検出限界は移動相 pH の影響を受けていた。この理由として、EDTA の Fe(III) への親和性は溶液 pH の影響を受けるため (von Wirén *et al.*, 1999)、移動相の pH が低くなるとカラムでの分離の過程で EDTA からの Fe(III) の解離が起きやすくなるためと考えられる。Cit および EDTA の従来法の検出限界は Cit が 210 pmol、EDTA が 1.71 pmol であることを踏まえると、本分析法の検出限界は従来法の検出限界と比較して十分低い数値であり、また検量線のダイナミックレンジも十分な濃度範囲であった (Table 3-2)。次に、Fe(III)-NA の検出限界を求めると、Table 3-2 に示すように pH 5.5 の移動相を用いた場合は 25 pmol であったのに対し、pH 8.0 の移動相を用いた場合はそれより 1 桁程低い 1.1 pmol であった。これは、EDTA の場合と同様に NA の Fe(III) への親和性も溶液 pH の影響を受けるため (von Wirén *et al.*, 1999) pH 8.0 において Fe(III) に対する NA の親和性が高まり、カラムでの分離の際に Fe(III) から NA が解離しにくくなるためと考えられる。高等植物体内における Fe(III) の長距離輸送のうち、NA は主に篩管液 (pH 8.0 前後) 中の輸送に関与していると考えられているが (Schmidke and Stephan, 1995, Schuler *et al.*, 2012)、pH 8.0 における Fe(III)-NA の検出感度の高さはこの生理的な機能とも矛盾しない。また、従来法の NA の検出限界が 50 pmol であることを踏まえると (Neumann *et al.*, 1999)、本分析法の NA の検出限界は最低で 1.1 pmol であり、この数値は十分低い数値であると言える。

Table 3-2. Detection limits of typical Fe(III)-FICs.

Analyte	pH of eluent	Detection limit ^a (pmol)	Dynamic range (μM)	<i>R</i> ² ^b
Fe(III)-EDTA	5.5	0.77	1-15	0.99
	8.0	0.25	1-10	0.99
Fe(III)-Cit	5.5	2.3	1-20	0.99
	8.0	62 (peak of 22 min)	20-150	0.99
		36 (peak of 24 min)	50-100	0.99
Fe(III)-NA	5.5	25	50-150	0.99
	8.0	1.1	1-10	0.99

The analytical conditions were the same as in Table. 1.

Cit: citric acid; NA: nicotianamine.

^aDetection limits of each FICs were calculated from calibration plots using peak height in the concentration range 0-10 μM Fe(III)-EDTA and 0-20 μM Fe(III)-Cit with S/N ratio of 3.

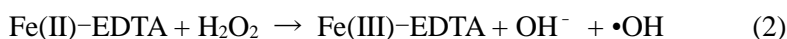
^b*R*² represent correlation coefficient between peak height and concentration of Fe(III)-FIC.

3.4 考察

本章では、化学発光検出が励起光を必要とせず一般に蛍光検出よりも高感度な検出が可能である点に着目して、化学発光検出を利用した HPLC ポストカラム法を FIC 分析に応用した。本分析法の化学発光検出に用いる化学物質として、先行研究において Fe の検出に汎用されてきたルミノールと *o*-フェナントロリンの 2 つについて検討した。実際にルミノールまたは *o*-フェナントロリンと H₂O₂ を含むポストカラム溶液を用いて Fe(III)-EDTA を分析すると、検出感度(μV/μM)はルミノールを用いた方が 4 桁高かった。このことから検出に用いる化学発光物質としてルミノールの方が適していると結論付け、ルミノールを用いた分析法を開発した。

PCS-A への合成金属キレターの添加による Fe(III)-FIC の検出感度の向上について

ルミノールを用いた分析法の開発では Fe(III)-EDTA の検出感度が顕著に高いことに着目して、PCS-A に EDTA を添加し分析試料中の Fe(III)-FIC と EDTA の間での配位子交換反応を検出に利用することによって、FIC の検出感度を向上させることに成功した。PCS-A に添加する合成金属キレターの種類およびその濃度を最適化することによって、Fe(III)-Cit の検出感度は 3 桁向上した。Fe(III)-EDTA の検出感度が顕著に高かったことは、Fe(III)-EDTA の酸化補助剤としての活性の高さに起因していると考えられる。ルミノール/H₂O₂ の化学発光反応において、Fe(III)-EDTA はルミノールアニオン (HLum⁻) から電子を受け取り Fe(II)-EDTA に還元される (Fig. 3-25A [Fig. 3-2 と同じ])。Fe(II)-EDTA はフェントン反応 [以下の反応式 (2)] の活性が非常に高いことが知られているため (von Wirén *et al.*, 1999)、酸化補助剤として Fe(III)-EDTA を加えた場合には下記の (1) と (2) の反応を繰り返すことによって Fe(III)-EDTA が見かけ上消費されないと考えられる。



ルミノールの化学発光反応の進行にはルミノールラジカル (HLum[•]または Lum^{•-}) の生成が必要であるが、このラジカルの生成には大きく分けて 2 つの経路が提案されている (Merényi *et al.*, 1990)。まず 1 つ目は、アルカリ条件下で生じたルミノールモノアニオン (HLum⁻) が Fe(III)などの酸化補助剤存在下で HLum[•]に変化する経路である (Fig. 3-25A [Fig. 3-2 と同じ])。もう 1 つは、H₂O₂ と Fe(II)のフェントン反応によって生じたヒ

ドロキシラジカル ($\bullet\text{OH}$) と HLum⁻が反応して Lum \bullet^{-} に変化する経路である (Fig. 3-25B)。Lum \bullet^{-} は溶存酸素から生じたスーパーオキシドアニオン ($\text{O}_2\bullet^{-}$) と反応して HLum (OO^{-})となり、これが分解する過程で化学発光が生じる (Merényi *et al.*, 1990)。ここで、Fe(III)-EDTA が酸化補助剤の場合、Fig. 3-25A の経路で化学発光反応が進むだけではなく、Fig. 3-25A の経路の進行で生じた Fe(II)-EDTA と H_2O_2 の間でのフェントン反応によって $\bullet\text{OH}$ が生じる [上記反応式 (2)]。この $\bullet\text{OH}$ と HLum⁻が反応することによって Lum \bullet^{-} が生じ、Fig. 3-25B の反応経路でもルミノールの化学発光反応が進行していると考えられる。そして、上記 (2) の反応で生じた Fe(III)-EDTA は再び Fig. 3-25A の経路で化学発光反応の進行を補助する。このように Fe-EDTA の場合、Fe(III)-EDTA が電子の受け取り手となるだけではなく、Fe(II)-EDTA がフェントン反応を経て $\bullet\text{OH}$ を生成することによってもルミノールの化学発光反応の進行を持続的に補助するため、Fe(III)-Cit と比較して Fe(III)-EDTA の検出感度が大幅に高くなったものと推定される。

また、EDTA や CyDTA のようにエチレンジアミン骨格を持つ金属キレーターと Fe(II)との錯体は、GEDTA などのエチレンジアミン骨格を持たない金属キレーターと Fe(II)の錯体よりもフェントン反応の活性が高いことが示されている (Jansen *et al.*, 1989)。Fig. 3-17C において、エチレンジアミン骨格を持つ EDTA と CyDTA をポストカラム溶液に添加した場合には Fe(III)-Cit の示す S/N 比が比較的高かったのに対し、GEDTA や DTPA を添加した場合には S/N 比は低かった。EDTA や CyDTA はエチレンジアミン骨格を有しているが (Fig. 3-16A, D)、DTPA はエチレントリアミンの構造を有し GEDTA はエチレングリコールの構造を有する (Fig. 3-16B, C)。このような EDTA および CyDTA と、GEDTA および DTPA が示す化学構造上の差異が、Fig. 3-17C に見られたような検出感度の違いを生むと推測される。GEDTA と GEDTA は EDTA や CyDTA と比較するとフェントン反応の活性が低く、その結果 (1) および (2) の反応サイクルが進行しにくいために酸化補助剤としての活性が低いものと考えられる。クエン酸や NA はエチレンジアミン骨格を持たないため (Fig. 1-2A)、フェントン活性が低いことが推測される。これは、PCS-A に EDTA を添加せずに pH 5.5 の移動相を用いて Fe(III)-Cit を分析すると Fe(III)-Cit の検出感度 (0.082 mV/ μM) は Fe(III)-EDTA (36 mV/ μM) よりも大幅に低かったこと、また、同様の条件では 100 μM の Fe(III)-NA を検出することができず (データは示さず) Fe(III)-NA の検出感度は Fe(III)-Cit と同様に低かったこととも一致している。

有機溶媒中における Fe(III)-FIC の検出感度の低下について

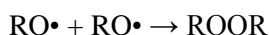
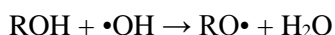
化学発光検出を用いた高感度 FIC 分析法の開発においては、ポストカラム溶液の組成最適化の他に分析対象の分離に使用するカラムや移動相とルミノール/H₂O₂ の化学発光反応を用いた検出系との相性を見極めることも重要であった。3.3.2.1.1 で述べたように、移動相中にメタノールやエタノール、アセトニトリルなどの有機溶媒が含まれると Fe(III)-EDTA の示す S/N 比は大幅に減少した (Fig. 3-6C)。この際、有機溶媒としてメタノールやエタノールを使用した場合は S/N 比は低下するもののシグナル自体は検出されていたのに対し (Fig. 3-6C)、アセトニトリルの場合シグナルは全く検出されなかった (データは示さず)。この感度低下の原因として、①アルコールや水などのプロトン性溶媒とアセトニトリルなどの非プロトン性溶媒中ではルミノール/H₂O₂ の化学発光反応の進行経路が異なること、②アルコールがラジカル捕捉材 (radical scavenger) として機能すること、の主に 2 つが推測される。

① プロトン性溶媒と非プロトン性溶媒中のルミノールの化学発光反応について

Fig. 3-25A や B の経路で示したルミノールの化学発光反応は、水やアルコールなどプロトン性の溶媒中でのものであり、非プロトン性溶媒中では異なる反応経路を辿る。ジメチルスルホキシドやアセトニトリルなどの非プロトン性溶媒中では、酸化剤や酸化補助剤が存在しなくてもアルカリ条件であれば溶媒中の溶存酸素によって化学発光反応が進む (Fig. 3-25C、White *et al.*, 1964、White and Bursey, 1964)。非プロトン性溶媒中でルミノールは OH⁻によってジアニオン (Lum²⁻) まで酸化され、Lum²⁻は溶存酸素により更に酸化されて Lum が生成する。移動相に非プロトン性溶媒であるアセトニトリルが含まれる場合、酸化補助剤である Fe(III)-FIC が存在しなくてもポストカラム溶液とカラム溶出液の混合液中で上記の反応が進んで一部のルミノールが消費されるために、Fe(III)-FIC のシグナルが全く検出されなかったのではないかと考えられる。

② アルコールのラジカル捕捉剤活性

Pascual and Romay (1992) はエタノールがヒドロキシラジカル (•OH) のラジカル捕捉材として働き、ルミノールの化学発光を抑制することを示している。アルコールと •OH の反応としては以下のような反応が予想される。



移動相に含まれるエタノールやメタノールなどのアルコールによって $\cdot\text{OH}$ が捕捉され ROOR および H_2O が生成すると、Fig. 3-25Bの経路は進行しなくなると考えられる。前述のようにメタノールおよびエタノールを含む移動相を使用することによって Fe(III)-EDTA のS/N比が大幅に減少するが、この際ピーク高さだけではなくノイズ大きさも減少していることを踏まえると (Fig. 3-6A~C)、化学発光強度のバックグラウンド自体が低下していると予想され、Fig. 3-25Bの経路の進行が阻害されている可能性が高いと考えられる。

総括

本章で開発したFIC分析法の検出限界を求めると、EDTAでは最低で0.25 pmol、クエン酸では最低で2.3 pmol、植物由来の代表的なFICであるニコチアナミンでは1.1 pmolであった (Table 3-2)。従来法の検出限界はEDTAが1.71 pmol (Loyaux-Lawniczak *et al.*, 1999)、クエン酸が210 pmol (Nour *et al.*, 2010)、ニコチアナミンが50 pmol (Neumann *et al.*, 1999)であることを踏まえると、検出限界は最大で2桁向上し本分析法は世界一高感度な分析法である。

本分析法はサンプルにあらかじめ Fe(III) を加えてインキュベートし、サンプル中のFICと結合させ Fe(III)-FIC 錯体を検出することによってFICを検出する方法であることから、対象物質の化学構造に依存することなくその Fe(III) とのキレート能に応じて検出することができる。また本分析法は非常に高感度であり、試料中のごく微量のFICであっても検出可能である。そのため、高等植物のFe栄養生理において重要な役割を果たすと考えられる高い Fe(III) キレート能を有する化合物であれば、生体サンプル中にごく微量にしか存在しなくても優先的に検出することができる点で従来法とは一線を画す方法である。本分析法はサンプルに複雑な前処理を加える必要はなく、また高価な試薬も必要としないことから、幅広い Fe(III)-FIC 分析に応用可能な方法であると言える。次の第4章では本分析法を用いて高等植物から採取した実試料中のFIC分析を行った。

第4章

植物サンプル中の Fe(III)キレーター分析

4.1 はじめに

本章では、数種類の高等植物から導管液を採取し、第3章で開発した HPLC ポストカラム法（以下本分析法とする）を用いて導管液中の FIC の分析を行った。

第1章で述べた高等植物の Fe 獲得機構の違いに着目し、本章では Strategy-II で Fe を吸収するイネ科植物のオオムギ (*Hordeum vulgare* L. cv Ehimehadaka No.1) とヒエ (*Echinochloa esculenta* sp.)、Strategy-I で Fe を吸収する非イネ科植物のアマランサス (*Amaranthus hypochondriacus* sp.) とハウレンソウ (*Spinacia oleracea* cv. Hoyo) を研究対象として選択した。オオムギはイネ科植物の中でも Fe 欠乏耐性が高く、アルカリ土壌でも比較的良好な生育を示すことが知られている。また、オオムギは根からのムギネ酸の分泌量や生合成するムギネ酸類の種類も他のイネ科植物と比較して多いことから (Kawai *et al.*, 1988, Mori *et al.*, 1991)、より多くの量、多くの種類の FIC を生体試料中に含んでいると考え研究対象として選択した。同じイネ科植物のヒエは pH 5.5~6.5 の弱酸性土壌を好む植物であり、アルカリ土壌でも良好な生育を示すオオムギとムギネ酸類の種類やその含有量に差異があるかを比較する目的で研究対象として選択した。アマランサスは子実中の Fe 含有量が精白米の 50 倍と多く、pH 8.5 前後のアルカリ土壌でも生育が可能である。また、Fe 欠乏の代表的な症状であるクロロシスを起こしたセイヨウナシ (*Pyrus communis* L.) にアマランサスの茎や葉の水溶性抽出物を与えるとクロロシスが改善したという報告もある (Sorrenti *et al.*, 2011)。ハウレンソウは葉身に多くの Fe を蓄積することが知られている。また、pH 7.0 までの土壌で生育可能であり他の植物と比較すると適応土壌 pH が広い。以上のことから、アマランサスやハウレンソウが Fe(III)キレート能の高い何らかの新規な FIC を生合成している可能性があるのではないかと考え、研究対象として選択した。

本研究では、植物種間で導管液中 FIC の質的、量的差異があるかを比較するだけでなく、同じ植物種間で Fe 栄養状態の変化に伴って導管液中の FIC に質的、量的な変化があるかを比較した。各植物種とも Fe 充足状態で栽培を行うグループと Fe 欠乏処理を加えるグループの 2 つに分けて、それぞれのグループから導管液を採取した。Fe 充足

グループは生育に必要な濃度の Fe を含む水耕液中で 42～63 日間栽培した。一方、Fe 欠乏処理を加えるグループは、通常の Fe を含む水耕液で 14～49 日間栽培した後、Fe を全く含まない水耕液中でクロロシスが観察されるまで栽培した。各植物種の各グループから採取した導管液をそれぞれ本分析法で分析した。本章では導管液 (intact xylem sap) だけでなく、導管液に *in vitro* で FeCl₃ を加えた Fe(III) 添加試料 (+Fe treatment xylem sap) の分析も同時に行うことによって、より詳細な考察を行った。導管液で見られるピークは生理的な条件で Fe と結合している FIC を示し、Fe(III) 添加試料において増加するピークは過剰の Fe(III) が存在するときに増加する Fe(III)-FIC 錯体のピークを示す。

4.2 材料および方法

4.2.1 植物の栽培

オオムギは 2.1.6 に記した方法と同様の条件で栽培を行った。冷蔵保存していたヒエ、アマランサス、ハウレンソウ（品種：豊葉）の種子はオオムギと同様の方法で発芽させた後、発芽した苗の中から大きさが均等なものを 24 本選別し、20 L の水耕液を含むプラスチック製コンテナへ移植した。水耕液は 1/2 Hoagland-Arnon solution [2.0 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 、2.0 mM KNO_3 、0.5 mM NH_4NO_3 、0.5 mM MgSO_4 、0.25 mM KH_2PO_4 、40 μM $\text{Fe}(\text{III})\text{-EDTA}$ 、25 μM H_3BO_3 、2.0 μM MnCl_2 、2.0 μM ZnSO_4 、0.5 μM CuSO_4 、0.075 μM $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$] を用いた。水耕液の pH は希釈 HCl または NaOH を用いて 5.5 に調整した。水耕液の水替えは 7 日おきに行い、pH の調整は 3 日おきに行った。水耕液は常にエアレーションを行った。

Fe 欠乏処理を加えないグループは、オオムギとヒエの場合は播種後 42 日間、アマランサスは 63 日間、ハウレンソウは 42 日間 $\text{Fe}(\text{III})\text{-EDTA}$ を含む水耕液中で栽培した。Fe 欠乏処理を加えるグループは、オオムギでは発芽後 14 日間、ヒエでは 28 日間、アマランサスは 49 日間、ハウレンソウは 28 日間 $\text{Fe}(\text{III})\text{-EDTA}$ を含む水耕液で栽培した後、 $\text{Fe}(\text{III})\text{-EDTA}$ を全く含まない水耕液に移植した。この Fe を含まない水耕液を用いて、オオムギは更に 28 日間、ヒエ、アマランサス、ハウレンソウは更に 14 日間栽培を行った。この Fe を含まない水耕液で栽培することを Fe 欠乏処理とし、以下この処理を加えたグループを Fe 欠乏、加えないグループを Fe 充足と呼ぶ。Fe 欠乏処理はクロロシスが観察されるまでの期間行った。Fig. 4-1 に播種後 42 日目のオオムギおよび播種後 63 日目のアマランサスの植物体全体と葉の写真を示した。いずれの植物体も導管液採取時の様子を示し、オオムギの Fe 欠乏グループは Fe 欠乏処理を 28 日間、アマランサスの Fe 欠乏グループは Fe 欠乏処理を 14 日間既に加えた個体である。Fe 欠乏処理を加えたグループはいずれも葉が黄化するクロロシスの症状が見られた。

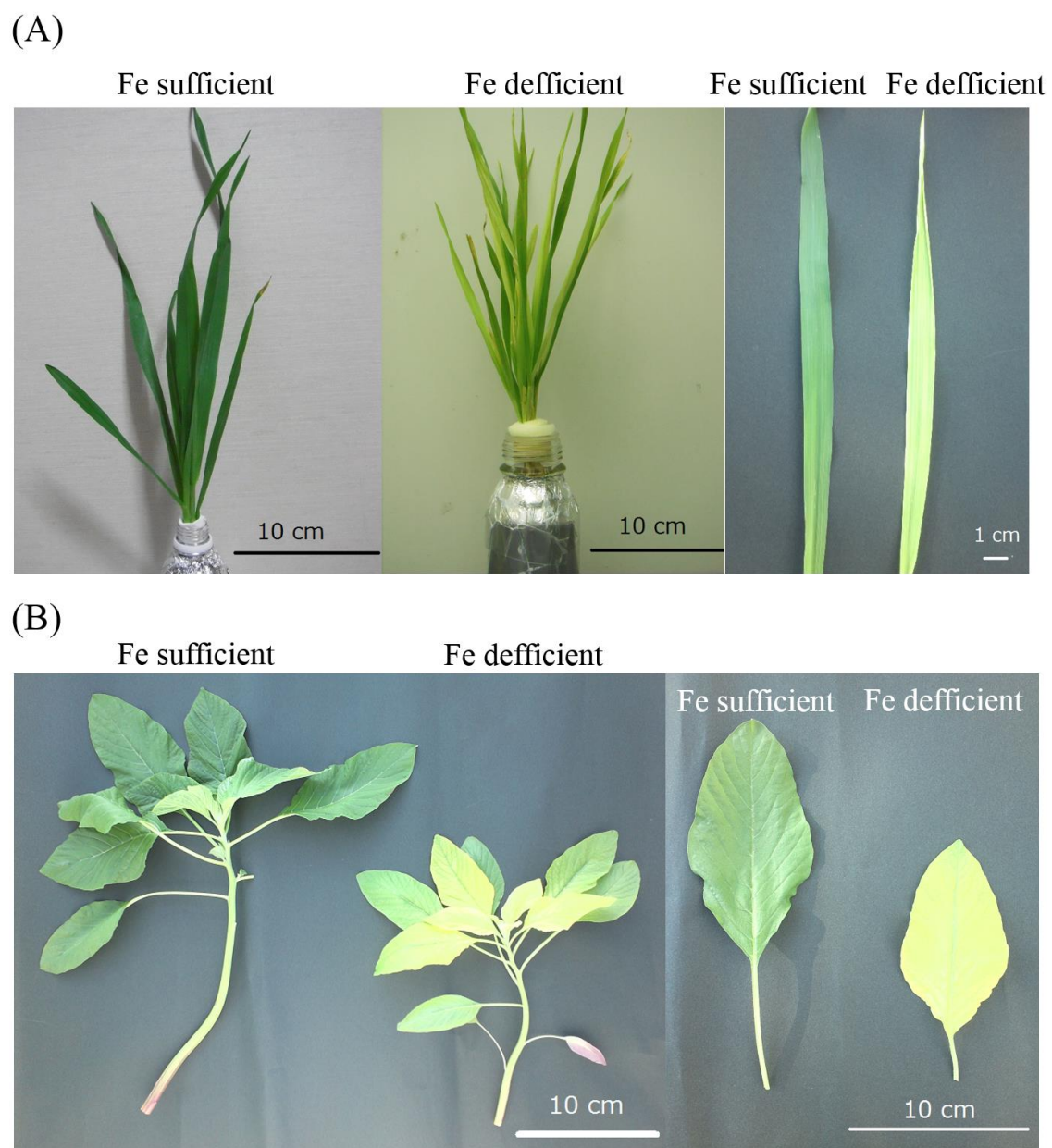


Fig. 4-1. Fe sufficient or Fe deficient (A) 42 days old barley (*Hordeum vulgare* L. cv Ehimehadaka No.1) and (B) 63 days old amaranthus (*Amaranthus hypochondriacus* sp.). Fe deficient barley has been cultured in nutrient solution without Fe for 28 days after 14-days cultivation in nutrient solution with Fe, and Fe deficient amaranthus has been cultured in nutrient solution without Fe for 14 days after 49-days cultivation in nutrient solution with Fe.

4.2.2 導管液の採取

第2章の2.1.7に記した方法と同様にしてオオムギ、ヒエ、アマランサス、ホウレンソウから導管液を採取した。オオムギはFe充足、Fe欠乏いずれも3つの異なるグループから、アマランサスはFe充足が3つ、Fe欠乏が2つの異なるグループから、ヒエとホウレンソウはFe充足、Fe欠乏いずれも1つのグループから採取した。

4.2.3 pH 5.5 における Fe(III)-FIC 錯体標準物質の分析

4.2.3.1 Fe(III)-Cit の分析

① FIC 分析法を用いた HPLC 分析

Rellán-Álvarez *et al.* (2010) は pH 5.5 の溶液中でクエン酸と Fe の混合比率を変化させると、混合比率によって Fe-Cit 錯体中の Fe とクエン酸の結合比が変化することを示した。高等植物体内における導管を介した Fe(III) の輸送においては、クエン酸は FIC として大きな役割を果たしていると予想される。そこで本研究では、Fe(III)-Cit 錯体について更に詳細に分析するために、Fe(III) とクエン酸を様々な混合比率で混合し第3章で開発した FIC 分析法を用いて Fe(III)-Cit を分析し、Fe(III) とクエン酸の混合比率を変えると Fe(III)-Cit の結合比や溶出時間がどのように変化するかを確認することにした。1 mM クエン酸水溶液と 1 mM FeCl₃ 水溶液を混合した後、pH 5.5 に調整した 10 mM 酢酸アンモニウム緩衝液で希釈し、終濃度で Fe(III) を 20 μM、クエン酸を 20 μM 含む 1:1 混合液、クエン酸を 100 μM 含む 1:5 混合液、クエン酸を 200 μM 含む 1:10 混合液をそれぞれ調整した。各 Fe(III):Cit 混合液を、ルミノールを用いた FIC 分析法で分析し、クロマトグラム上に現れた Fe(III)-Cit のピーク位置を比較した。

② HPLC/エレクトロスプレーイオン化-飛行時間型質量分析 (ESI-TOF-MS)

①で現れたピークに溶出する Fe(III)-Cit の Fe(III) とクエン酸の結合比率を明らかにするために、ピークフラクションを分取してエレクトロスプレーイオン化-飛行時間型質量分析 (ESI-TOF-MS) を行った。移動相として pH 5.5 に調整した 10 mM 酢酸アンモニウム緩衝液を用い、Fe(III) とクエン酸を終濃度で 500 μM ずつ含む 1:1 混合液を Superdex Peptide カラムで分画した。分画の際にはポストカラム溶液は流さず、210 nm における吸光を UV-Vis 検出器で検出しながら①で現れたピークに相当するフラクションを分取した。分取したフラクションは遠心エバポレーターを用いて乾燥するまで濃縮し、5 μL の 50% メタノール/50% 10 mM 酢酸アンモニウム水溶液 (pH 5.5) に溶解させた後、The

Accu TOF JMS-T100LC (日本電子、日本) を用いて ESI-TOF-MS 分析を行った。Fe(III)-Cit はネガティブモード (ESI-) で分析した。分析試料は流速 0.1 mL/min の 100% メタノールによって質量分析装置に導入した。質量分析装置のニードル電圧は 2000 V、リングレンズ電圧は 10 V、検出器電圧は 2500 V に設定した。脱溶媒室温度が高温だと試料中の Fe(III)-FIC 錯体が解離してしまい錯体の形で検出することができなかつたため、溶媒室温度を 250°C から 80°C に下げ、さらにオリフィス 1 温度を 50°C まで下げて測定を行った。

4.2.3.2 Fe(III)-DMA の分析

① FIC 分析法を用いた HPLC 分析

オオムギ導管液中で Fe(III) との結合が予想される DMA と Fe(III) を終濃度で 10 μ M ずつ含む Fe(III)-DMA 標準物質を pH 5.5 の移動相 (10 mM 酢酸アンモニウム緩衝液) を用いて分画した。Fe(III)-DMA 標準物質の調整方法は第 3 章の 3.2.3 と同様に行った。

② HPLC/ESI-TOF-MS

① で現れたピークに溶出する Fe(III)-DMA の ESI-TOF-MS 分析を行うために、Fe(III) と DMA を終濃度で 100 μ M ずつ含む Fe(III)-DMA 標準物質を Superdex Peptide カラムで分画した。ピークフラクションを分取し、遠心エバポレーターを用いて乾燥するまで濃縮した。濃縮後のフラクションは 5 μ L の 50% メタノール/50% 10 mM 酢酸アンモニウム水溶液 (pH 5.5) に溶解させてから The Accu TOF JMS-T100LC を用いて ESI-TOF-MS 分析を行った。イオン化はポジティブモード (ESI+) で行った。その他の測定条件は上記の Fe(III)-Cit の場合と同様である。

4.2.4 高等植物導管液中の FIC 分析

① FIC 分析法を用いた HPLC 分析

導管液の分析の際には導管液 40 μ L と 10 mM 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 5.5) 20 μ L を混合したものを遠心式フィルターユニット (Ultrafree MC-HV 0.45 μ m, Merckmillipore、ドイツ) を用いて 12,000 g、4°C で 4 分間遠心ろ過してから、ろ液 20 μ L をカラムヘインジェクトし HPLC 分析に供した。Fe(III) 添加試料の分析の際には導管液 40 μ L と 10 mM 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 5.5) 14 μ L、1 mM FeCl₃ 水溶液 6 μ L を混合したものを同様に遠心式フィルターユニットでろ過してから、ろ液 20 μ L をカラムヘインジェクトし

HPLC 分析に供した。

② HPLC/ESI-TOF-MS

導管液を FIC 分析法で分析した際にクロマトグラム上に現れたピークのフラクションを分取し、そのフラクション中に含まれる Fe(III)-FIC 錯体の同定のため ESI-TOF-MS 分析を行った。濃縮を行わない導管液原液を HPLC で分画した場合、ピークフラクション中に含まれる Fe(III)-FIC は非常に低濃度であったため ESI-TOF-MS 分析を行うことができなかった。そこで、オオムギおよびアマランサスの導管液は濃縮を行ってからフラクション分取および ESI-TOF-MS 分析を行うこととした。

1 mL の Fe 充足オオムギおよび Fe 充足アマランサス導管液を遠心エバポレーターで乾燥するまで濃縮し 40 μ L の 10 mM 酢酸アンモニウム水溶液 (pH 5.5) に溶解してから、遠心式フィルターユニットを用いて遠心ろ過した。ろ液 20 μ L をカラムヘインジェクトした。Fe 充足オオムギ導管液については、この濃縮導管液の他に、濃縮導管液に FeCl₃ を終濃度で 1 mM になるように添加した濃縮 Fe(III)添加試料についても同様にフラクション分取を行った。ポストカラム溶液を流した場合と流さない場合とで、溶出時間がほとんど変わらないことをあらかじめ確認したため、導管液の分画の際にはポストカラム溶液は流さず、FIC 分析法を用いた時のピーク溶出時間に相当するフラクションを 30 秒間ずつ分取した。分取したフラクションは遠心エバポレーターを用いて乾燥させた。その後 5 μ L の 50%メタノール/50% 10 mM 酢酸アンモニウム水溶液 (pH 5.5) に溶解させ、流速 0.1 mL/min の 100%メタノールによって The Accu TOF JMS-T100LC に導入した。ピークフラクションのうち、Fe-Cit であることが予想されるフラクションはネガティブモード (ESI-) で、Fe(III)-DMA であることが予想されるピークフラクションはポジティブモード (ESI+) で分析を行った。

4.3 結果

4.3.1 pH 5.5 における Fe(III)-FIC 錯体標準物質の分析

4.3.1.1 Fe(III)-Cit の分析

① FIC 分析法を用いた HPLC 分析

Fe(III)とクエン酸の 1:1、1:5、1:10 混合液を第 3 章で開発した FIC 分析法を用いて分析した結果を Fig. 4-2 の A~C に示した。1:1 混合液では 25.8 分にもみピークが現れているが、このピーク (P₂₅とする) は 1:5 や 1:10 の混合液にも共通して現れている。1:5 混合液と 1:10 混合液には共通して 27.3 分にピーク (P₂₇とする) が現れており、P₂₇のピーク強度は混合液中のクエン酸の割合が高くなるほど大きくなった。1:10 混合液には 31.2 分にもピークが現れていた (P₃₁とする)。1:5 混合液には P₃₁に近い溶出時間に小さなピークが現れていたが、このピークの溶出時間は 32.3 分であり P₃₁より若干遅かった。P₂₅、P₂₇、P₃₁に溶出する Fe(III)-Cit 錯体は、Fe(III)とクエン酸の結合比率がそれぞれ異なる錯体であると考えられた。P₃₁の溶出時間が B と C でわずかに異なるのは、Fe(III):Cit の混合比率によって P₃₁に溶出する Fe(III)-Cit 錯体の化学形態がわずかに異なるためではないかと推測された。

次に、Fig. 4-2 のクロマトグラフ上に現れた P₂₅、P₂₇、P₃₁のそれぞれのピーク高さが 3 つのピーク高さの合計に占める割合を求め、混合液中の Fe(III):Cit の比率との間の関係を Fig. 4-3 に示した。B の 32 分前後のピークは P₃₁と同一のピークと仮定した。P₂₅の全体に占める割合は Fe(III):Cit の混合比率が低下するにつれ低くなっていき、逆に、P₂₇ならびに P₃₁の占める割合は高くなっていった。

以上のことから Fe-Cit 錯体は pH 5.5 において結合比率および分子量の異なるいくつかの形を取り、Fe(III)、クエン酸混合液中の Fe(III):Cit 比によってその割合は変化することが明らかになった。

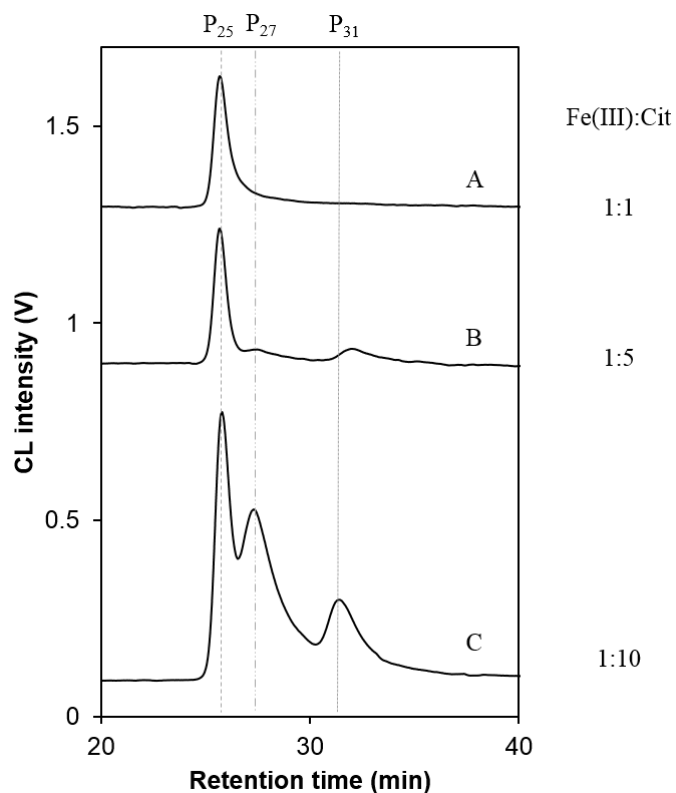


Fig. 4-2. Chromatograms of 20- μ L spike of mixture of 20 μ M FeCl₃ and (A) 20 μ M citric acid (1:1 mixture), (B) 100 μ M citric acid (1:5 mixture), and (C) 200 μ M citric acid (1:10 mixture) at final concentration in 10 mM ammonium acetate buffer at pH 5.5. Each sample was separated by Superdex Peptide column using 10 mM ammonium acetate buffer at pH 5.5 as mobile phase, and each chromatogram was obtained in the optimal analytical condition shown in Table 3-1 with chemiluminescence detector. The temperature of post-column reaction was set at 50°C.

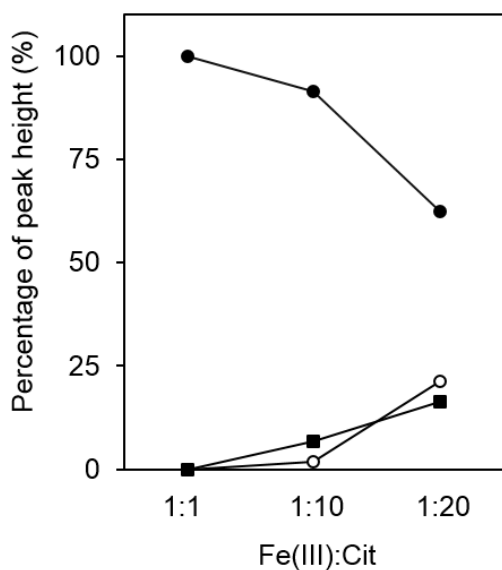


Fig. 4-3. Effect of Fe(III):Cit ratio on peak height balance of P₂₅ (closed circle), P₂₇ (open circle) and P₃₁ (closed square), respectively. Percentage of each peak height was calculated from chromatogram of Fe(III)-Cit standard solution with Fe(III):Cit ratio of 1:1, 1:10, 1:20 (Fig. 4-1A, B, C), respectively.

② HPLC/ESI-TOF-MS 分析

①において主要なピークであった P₂₅ に溶出している Fe(III)-Cit 錯体の Fe(III) とクエン酸の結合比率を明らかにするために、終濃度 500 μM の Fe(III) とクエン酸の 1:1 混合液を HPLC で分画し、溶出時間 25.5~26.0 分のフラクションを分取してネガティブイオン化モードで ESI-TOF-MS 分析を行った。その結果、P₂₅ のフラクションから m/z 366.46 のピークを検出した (Fig. 4-4)。Fe とクエン酸の 3:3 錯体である $[\text{Fe}_3\text{Cit}_3\text{H}]^2$ の m/z は 366.40 と計算されることから、P₂₅ は Fe とクエン酸が 3:3 で結合した Fe₃-Cit₃ 錯体のピークであることが示された。

Fig. 4-3 を見ると、Fe(III) とクエン酸の混合液中の Fe(III):Cit 比が高いほど P₂₅ の占める割合は高くなっている。P₂₅ が Fe₃-Cit₃ 錯体のピークであったことを踏まえると、混合液中の Fe(III):Cit 比が高いほど Fe(III)-Cit は Fe₃-Cit₃ 錯体の形態を取りやすく、Fe(III):Cit 比が低いほど Fe₃-Cit₃ 錯体以外の形態を取りやすいことが明らかになった。

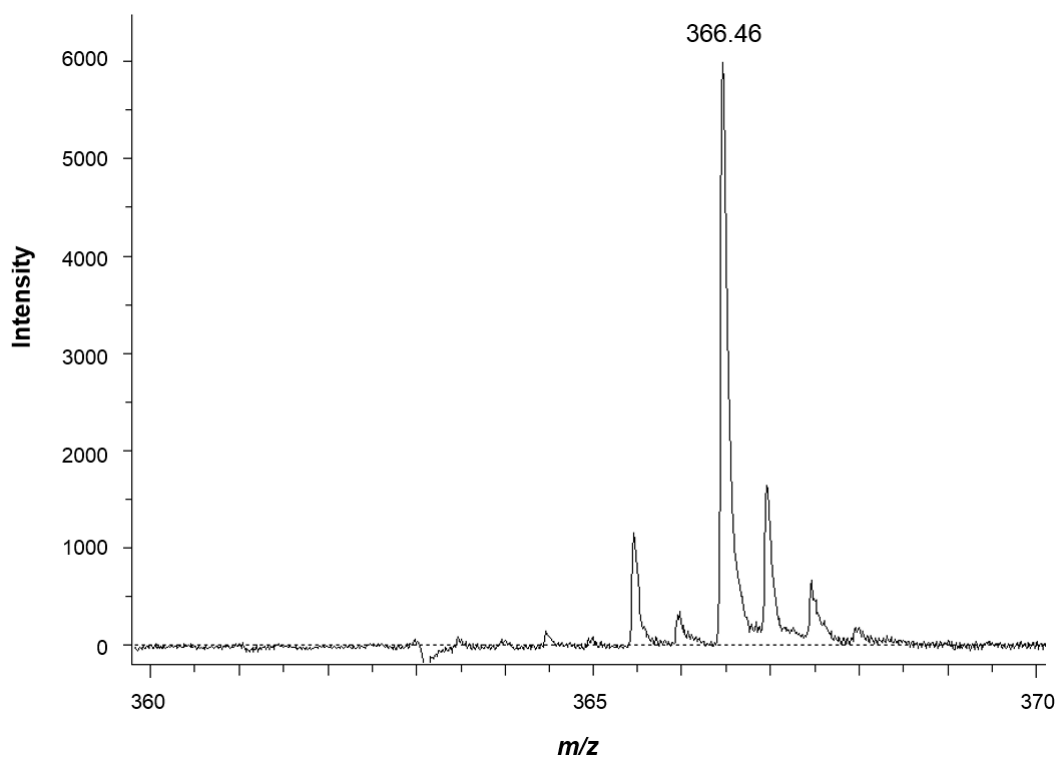


Fig. 4-4. ESI-TOF-MS spectra in negative ionization (-ESI) mode of the 25.5-26.0 min fraction of 20- μ L spike of the mixture of 500 μ M FeCl₃ and 500 μ M citric acid, which was fractionated by Superdex Peptide column, using 10 mM ammonium acetate buffer (pH 5.5) as an eluent. Peak corresponding to m/z 366.46 was assigned to [Fe₃Cit₃H]²⁻.

4.3.1.2 Fe(III)-DMA の分析

① FIC 分析法を用いた HPLC 分析

10 μ M の Fe(III)-DMA 錯体標準物質を第 3 章で開発した FIC 分析法を用いて分析した際のクロマトグラムを Fig. 4-5 に示した。Fe(III)-DMA のピークは 32.0 分に現れた。そこで次に、Fe(III)-DMA 錯体のピークフラクションを分取し標準物質として ESI-TOF-MS 分析を行った。

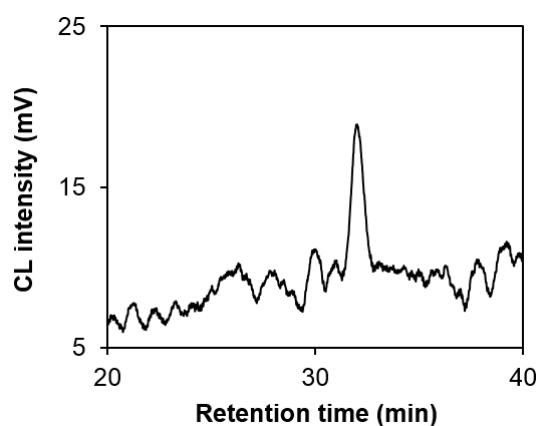


Fig. 4-5. Chromatograms of 20- μ L spike of 1 μ M Fe(III)-DMA. Fe(III)-DMA complex was separated by Superdex Peptide column using 10 mM ammonium acetate buffer at pH 5.5 as mobile phase, and a chromatogram was obtained in the optimal analytical condition shown in Table 3-1.

② HPLC/ESI-TOF-MS 分析

終濃度 100 μ M の Fe(III)-DMA 錯体標準物質を HPLC で分画し、溶出時間 32.5~33.0 分のフラクションを分取してポジティブイオン化モードで ESI-TOF-MS 分析を行った結果、32.5~33.0 分のフラクションから m/z 305.13 および 358.04 のピークを検出した (Fig. 4-6A、B)。[DMA+H]⁺は m/z 305.13、[Fe(III)-2H+DMA]⁺は m/z 358.04 と計算されることから、前者は [DMA+H]⁺、後者は [Fe(III)-2H+DMA]⁺ のピークである。

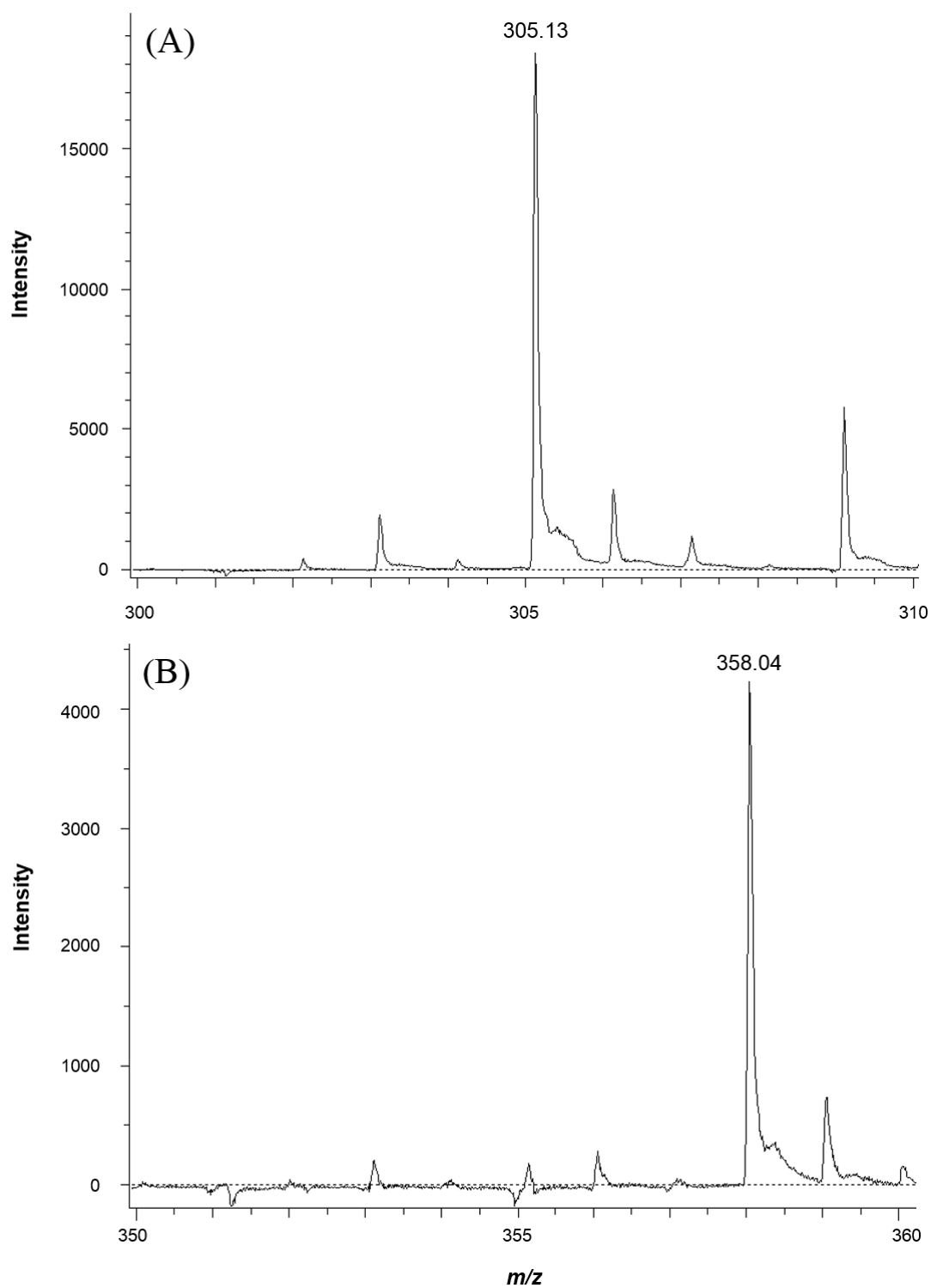


Fig. 4-6. ESI-TOF-MS spectra in positive ionization (+ESI) mode of the 32.5-33.0 min fraction of 20- μ L spike of the mixture of 100 μ M FeCl₃ and DMA for m/z from (A) 300 to 310, and (B) 350-360. The mixture was fractionated by Superdex Peptide column, using 10 mM ammonium acetate buffer (pH 5.5) as an eluent. Peak corresponding to m/z 305.13 was assigned to [DMA+H]⁺ and m/z 358.04 was assigned to [Fe(III)-2H+DMA]⁺.

4.3.2 高等植物導管液中の FIC 分析

4.3.2.1 オオムギ導管液中の FIC 分析

① FIC 分析法を用いた HPLC 分析

Fe 充足オオムギ導管液を HPLC 分析した結果を Fig. 4-7 に示した。A は導管液、B は導管液に *in vitro* で FeCl₃ を 100 μM 添加した Fe(III)添加試料のクロマトグラムである。各図中で(1)、(2)、(3)で示した一連のクロマトグラムは、それぞれ異なるグループから採取した導管液のクロマトグラムである。Fig. 4-7 試料(1)の導管液 A では 25 分、30 分、32 分前後にピークが現れた。それぞれのピークを P₂₅、P₃₀、P₃₂ とする。試料(2)と(3)の導管液 A でも(1)と同様に P₂₅、P₃₀、P₃₂ が現れていた。試料(3)の導管液 A ではこれら 3 つのピークに加えて 27 分前後にもピーク (P₂₇ とする) が現れていた。Fig. 4-7 試料(1)の Fe(III)添加試料 B では P₂₅ のピーク強度が顕著に高くなっており、試料(2)および(3)の Fe(III)添加試料 B でも同様に P₂₅ のピーク強度は顕著に増加していた。また、(2)および(3)の Fe(III)添加試料 B では 34 分前後のピークが A の導管液と比較して増加していた。以上のことから、過剰な Fe(III)を *in vitro* で添加することによって FIC と Fe(III)が結合し、P₂₅ および P₃₄ に溶出する Fe-FIC 錯体の量が増加することが分かった。

次に Fe 欠乏オオムギ導管液を HPLC 分析した結果を Fig. 4-8 に示した。Fig. 4-8 試料(1)の導管液 A では、25、27、30、32、34 分前後にピークが現れた。それぞれのピークを P₂₅、P₂₇、P₃₀、P₃₂、P₃₄ とする。試料(2)と(3)の導管液 A でも同様に P₂₅、P₂₇、P₃₀、P₃₂、P₃₄ が現れていた。Fig. 4-8 試料(1)の Fe(III)添加試料 B では Fig. 4-7B に示した Fe 充足の場合と同様に導管液 A と比較して P₂₅ のピーク強度が顕著に高くなっていた。試料(2)および(3)の Fe(III)添加試料 B でも P₂₅ のピーク強度は顕著に増加していた。

次に、Fe 充足オオムギ導管液 (Fig. 4-7A) と Fe 欠乏オオムギ導管液 (Fig. 4-8A) を比較した。Fe 欠乏オオムギ導管液では P₂₇ が 3 つのグループ全てで現れており、Fe 充足オオムギ導管液と比較すると P₃₂ のピーク強度が比較的強くなっていた。また、Fe 充足オオムギ導管液ではほとんど見られなかった P₃₄ も Fe 欠乏オオムギ導管液ではわずかながら現れていた。

以上のことから、生理的な条件ではオオムギ導管液中の Fe は主に P₂₅、P₂₇、P₃₀、P₃₂、P₃₄ に溶出する 4 つの化学形態で存在することが分かり、特に Fe 欠乏状態においては P₂₇、P₃₂、P₃₄ の化学形態をとる Fe の割合が増加することが明らかになった。前述の 4.3.1.1 において、pH 5.5 の移動相を用いて Fe(III)-Cit 標準物質を分画した際 25 分に現れるピークは Fe₃-Cit₃ 錯体であると同定した。オオムギ導管液にも同一の溶出時間にピーク P₂₅

が現れており、これは $\text{Fe}_3\text{-Cit}_3$ 錯体のピークだと考えられた。また、pH 5.5 の移動相を用いて Fe(III)-DMA を分画すると 32 分に Fe(III)-DMA 錯体が溶出した (Fig. 4-5)。オムギ導管液でも同一の溶出時間にピーク P_{32} が現れており、これは Fe(III)-DMA 錯体のピークだと推測された。

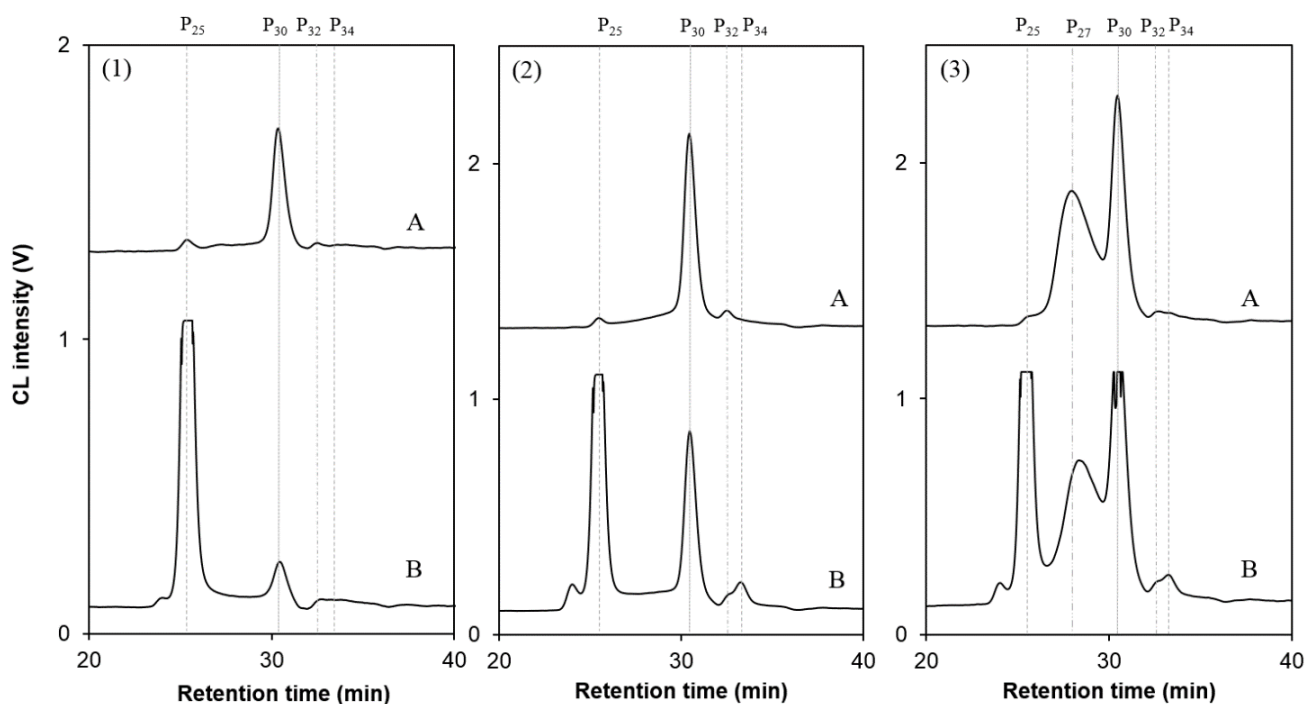


Fig. 4-7. Chromatograms of xylem sap from hydroponically cultured Fe-sufficient barley (*Hordeum vulgare* cv. Ehimehadaka No. 1) of three groups [(1), (2), and (3)] are shown. A is the chromatogram of intact xylem sap, and B is that of +Fe treatment xylem sap. The +Fe treatment xylem sap is intact xylem sap added 100 μM FeCl_3 *in vitro*. Each sample was separated by Superdex Peptide column using 10 mM ammonium acetate buffer at pH 5.5 as mobile phase and reacted with post-column solution of optimized condition shown in Table 3-1.

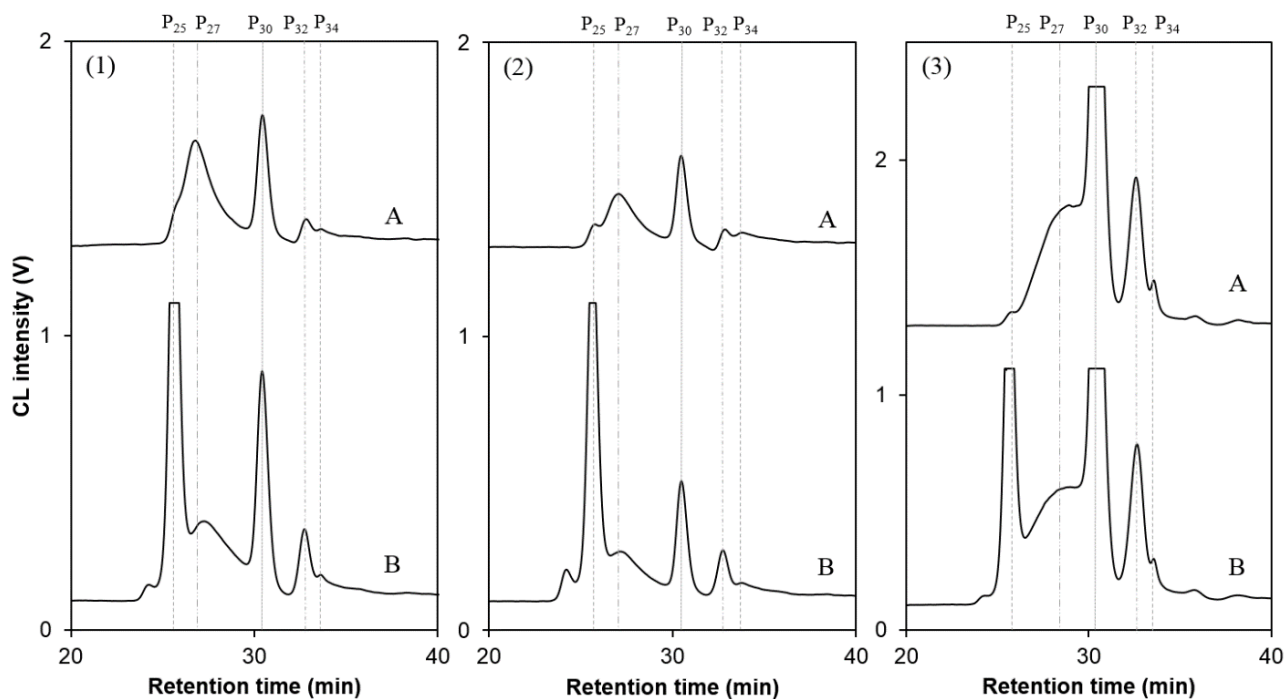


Fig. 4-8. Chromatograms of xylem sap from hydroponically cultured Fe-deficient barley (*Hordeum vulgare* cv. Ehimehadaka No. 1) of three groups [(1), (2), and (3)] are shown. A is the chromatogram of intact xylem sap, and B is that of +Fe treatment xylem sap. The +Fe treatment xylem sap is intact xylem sap added 100 μM FeCl_3 *in vitro*. Each sample was separated by Superdex Peptide column using 10 mM ammonium acetate buffer at pH 5.5 as mobile phase and reacted with post-column solution of optimized condition shown in Table 3-1.

② HPLC/ESI-TOF-MS 分析

オオムギ導管液クロマトグラムの P₂₅ に溶出する Fe の化学形態を明らかにするために、Fe 充足オオムギ導管液を 25 倍に濃縮してから分画し溶出時間 25.5~26.0 分のフラクションを分取した。そのフラクションを濃縮してからネガティブイオン化モードでの ESI-TOF-MS 分析に供すると、Fe(III)-Cit 錯体の濃度が薄く錯体の形で検出を行うことができなかった(データは示さず)。そこで、25 倍に濃縮した Fe 充足オオムギ導管液に Fe(III) を終濃度 1 mM になるように *in vitro* で添加した Fe(III) 添加試料を調整し、それを分画した際の 25.5~26.0 分のフラクションを分取、濃縮し ESI-TOF-MS 分析に供した。その結果、Fig. 4-9 に示したように 366.46 のピークを検出した。以上のことからオオムギ導管液クロマトグラムの P₂₅ は Fe とクエン酸が 3:3 で結合した Fe₃-Cit₃ 錯体のピークであることが示された。

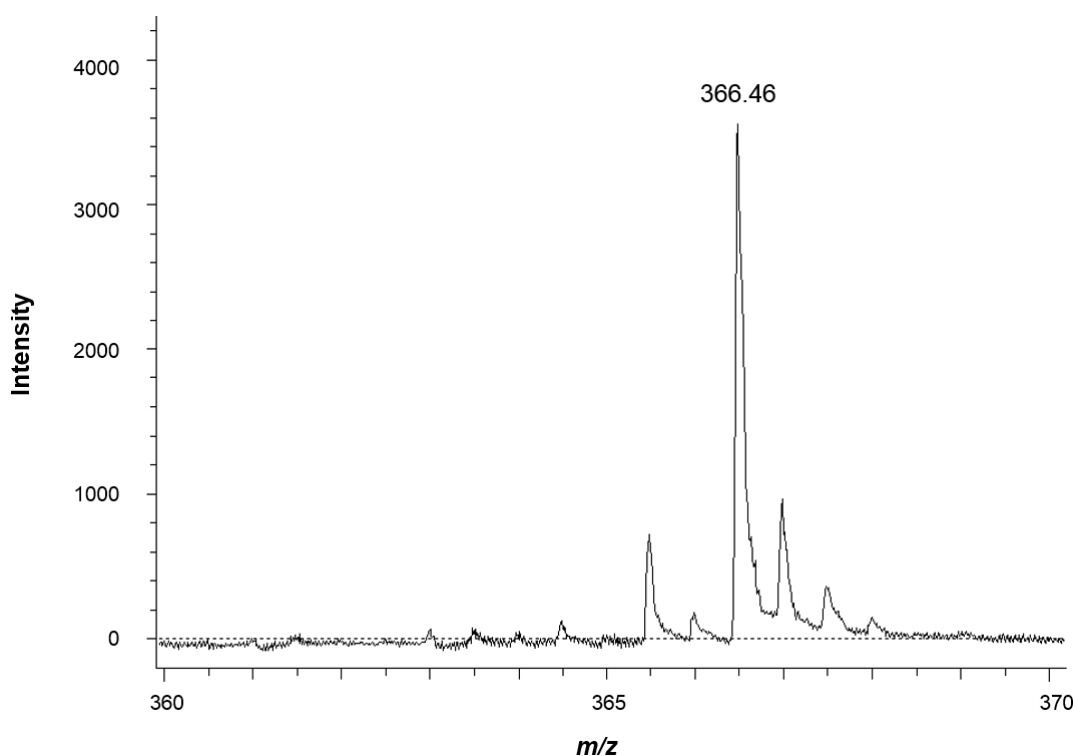


Fig. 4-9. ESI-TOF-MS spectra in negative ionization (-ESI) mode of the 25.5-26.0 min fraction of 20- μ L spike of xylem sap of Fe-sufficient barley (*Hordeum vulgare* cv. Ehimehadaka No. 1). The intact xylem sap was 25-fold concentrated and 1 mM FeCl₃ at final concentration was added to it *in vitro* before the fractionation by Superdex Peptide column, using 10 mM ammonium acetate buffer (pH 5.5) as an eluent. Peak corresponding to m/z 366.4 were assigned to [Fe₃Cit₃H]⁻².

続いて、オオムギ導管液クロマトグラムの P₃₂ に溶出する Fe の化学形態を明らかにするため、Fe 充足オオムギ導管液を 25 倍に濃縮してから分画し、溶出時間 32.5～33.0 分のフラクションを分取して濃縮した。ポジティブイオン化モードにてこのフラクションの ESI-TOF-MS 分析を行った。その結果、Fig. 4-10 に示したように m/z 305.13 のピークを検出し、フリーの DMA が検出された。前述の 4.3.1.2 において、Fe(III)-DMA 錯体標準物質を分画した時の溶出時間 32.5～33.0 分のフラクションから m/z 305.13 および 358.04 のピークを検出した (4-6A、B)。これを踏まえると、Fe 充足オオムギ導管液の 32.5～33.0 分フラクションから検出された m/z 305.13 のピークはイオン化の過程で Fe(III)-DMA から Fe(III) が解離することで生じたフリーの DMA のものと推測された。Fe(III)-DMA 錯体 $\{[\text{Fe(III)}-2\text{H}+\text{DMA}]^+, m/z 358.04\}$ のピークが検出されなかった理由は、Fe 充足オオムギ導管液中の Fe(III)-DMA 濃度が低すぎたためと考えられた。本分析では Fe(III)-DMA 錯体の形で検出することはできなかったが、Fe 充足および Fe 欠乏オオムギ導管液のクロマトグラムに P₃₂ が現れていること (Fig. 4-7 の A、4-8 の A)、P₃₂ のフラクションに DMA が含まれていたことを踏まえると、オオムギ導管液クロマトグラムの P₃₂ は Fe(III)-DMA のピークであると推測された。

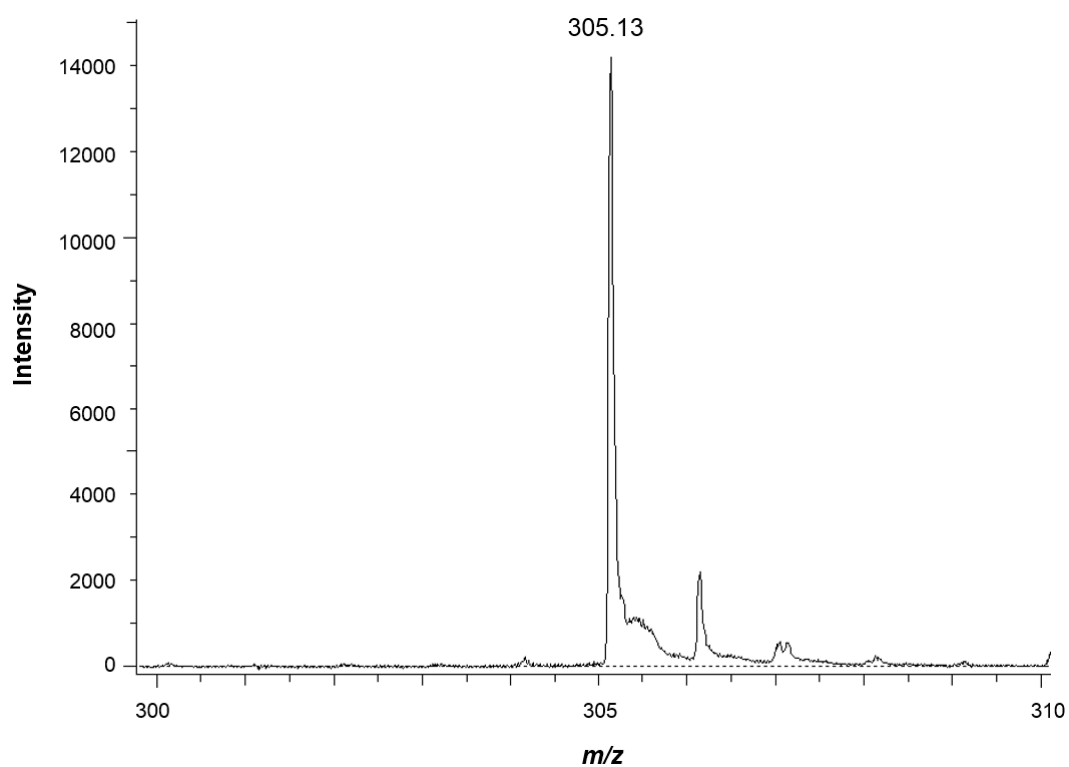


Fig. 4-10. ESI-TOF-MS spectra in positive ionization (+ESI) mode of the 32.5-33.0 min fraction of 20- μ L spike of xylem sap of 25-fold concentrated Fe-sufficient barley (*Hordeum vulgare* cv. Ehimehadaka No. 1), which was fractionated by Superdex Peptide column, using 10 mM ammonium acetate buffer (pH 5.5) as an eluent. Peak corresponding to m/z 305.1 was assigned to $[\text{DMA}+\text{H}]^+$.

4.3.2.2 ヒエ導管液中の FIC 分析

FIC 分析法を用いた HPLC 分析

Fe 充足ヒエ導管液を HPLC 分析した結果を Fig. 4-11 に示した。A は導管液、B は導管液に *in vitro* で FeCl₃ を 100 μM 添加した Fe(III) 添加試料のクロマトグラムである。Fig. 4-11A の導管液では 25、27、30、34 分前後にピークが現れた。それぞれのピークを P₂₅、P₂₇、P₃₀、P₃₄ とする。B の Fe(III) 添加試料では P₂₅ および P₃₀ のピーク強度が高くなっていた。以上のことから、過剰な Fe(III) を *in vitro* で添加することによって FIC と Fe(III) が結合し、P₂₅ および P₃₀ に溶出する Fe-FIC 錯体の量が増加することが分かった。

次に Fe 欠乏ヒエ導管液を HPLC 分析した結果を Fig. 4-12 に示した。A の導管液では、25、27、30、34 分前後にピークが現れた。それぞれのピークを P₂₅、P₂₇、P₃₀、P₃₄ とすると、B の Fe(III) 添加試料では Fig. 4-11 に示した Fe 充足の場合と同様に、P₂₅ のピーク強度が高くなっていた。

Fe 充足ヒエ導管液 (Fig. 4-11A) と Fe 欠乏ヒエ導管液 (Fig. 4-12A) を比較すると、Fe 充足と Fe 欠乏では導管液のピーク位置や高さに大きな差はなかった。4.3.2.1 で示したオオムギ導管液では、Fe 欠乏導管液において Fe(III)-DMA のピーク (P₃₂) が増大していたが (Fig. 4-8A)、ヒエ導管液の場合は Fe 充足、Fe 欠乏のいずれの導管液クロマトグラムにも P₃₂ は現れていなかった。

以上のことから、生理的な条件ではヒエ導管液中の Fe は主に P₂₅、P₂₇、P₃₀、P₃₄ に溶出する 4 つの化学形態で存在することが明らかになった。前述の 4.3.2.1 の結果からオオムギ導管液の P₂₅ は Fe₃-Cit₃ 錯体のピークであることが示された。ヒエ導管液の P₂₅ は Fe₃-Cit₃ 錯体の溶出時間と一致しているため、P₂₅ は Fe₃-Cit₃ 錯体のピークであると推測された。

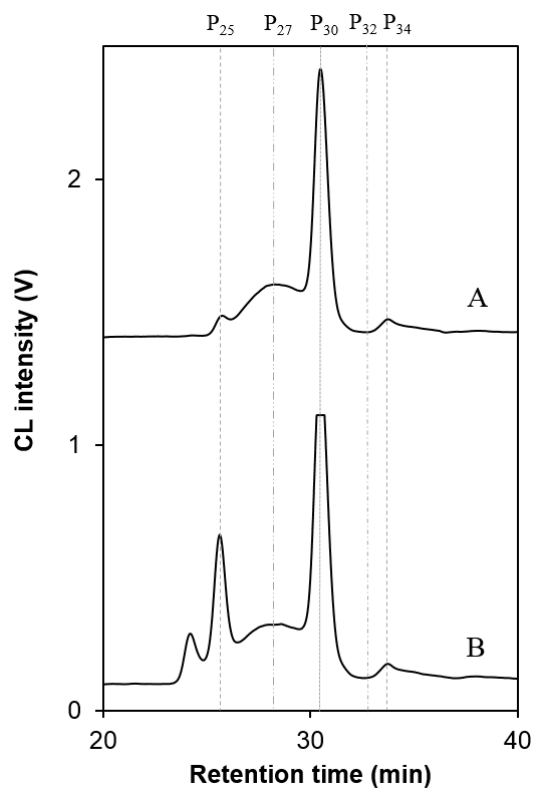


Fig. 4-11. Chromatograms of xylem sap from hydroponically cultured Fe-sufficient Japanese barnyard millet (*Echinochloa esculenta* sp.) are shown. A is the chromatogram of intact xylem sap, and B is that of +Fe treatment xylem sap. The +Fe treatment xylem sap is intact xylem sap added 100 μ M FeCl_3 *in vitro*. Each sample was separated by Superdex Peptide column using 10 mM ammonium acetate buffer at pH 5.5 as mobile phase and reacted with post-column solution of optimized condition shown in Table 3-1.

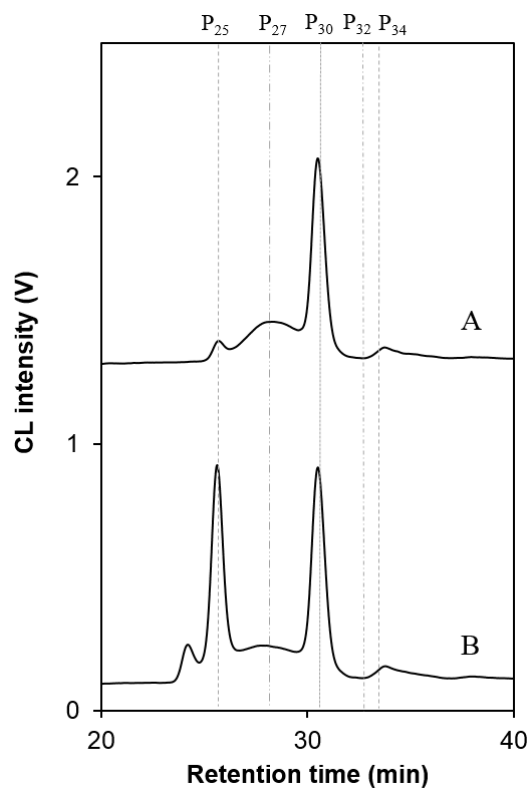


Fig. 4-12. Chromatograms of xylem sap from hydroponically cultured Fe-deficient Japanese barnyard millet (*Echinochloa esculenta* sp.) are shown. A is the chromatogram of intact xylem sap, and B is that of +Fe treatment xylem sap. The +Fe treatment xylem sap is intact xylem sap added 100 μM FeCl_3 *in vitro*. Each sample was separated by Superdex Peptide column using 10 mM ammonium acetate buffer at pH 5.5 as mobile phase and reacted with post-column solution of optimized condition shown in Table 3-1.

4.3.2.3 アマランサス導管液中の FIC 分析

① FIC 分析法を用いた HPLC 分析

Fe 充足アマランサス導管液を HPLC 分析した結果を Fig. 4-13 に示した。A は導管液、B は導管液に *in vitro* で FeCl₃ を 100 μM 添加した Fe(III)添加試料のクロマトグラムである。各図中で(1)、(2)、(3)で示した一連のクロマトグラムは、それぞれ異なるグループから採取した導管液のクロマトグラムである。Fig. 4-13 試料(1)の導管液 A では 25、30、34 分前後にピークが現れた。それぞれのピークを P₂₅、P₃₀、P₃₄ とすると、試料(2)と(3)の導管液 A でも(1)と同様に P₂₅、P₃₀、P₃₄ が現れていた。試料(3)の導管液 A では、これら 3 つのピークに加えて 27 分前後にもピーク (P₂₇ とする) が現れていた。Fe 充足アマランサス導管液では P₂₅ は主要なピークであるが、これは Fe 充足オオムギや Fe 充足ヒエ導管液とは異なる特徴であった。Fig. 4-13 試料(1)の Fe(III)添加試料 B では P₂₅ のピーク強度が顕著に高くなっており、試料(2)および(3)の Fe(III)添加試料 B でも同様に P₂₅ のピーク強度は顕著に増加していた。以上のことから、過剰な Fe(III)を *in vitro* で添加することによって FIC と Fe(III)が結合し、P₂₅ に溶出する Fe-FIC 錯体の量が増加することが分かった。

次に Fe 欠乏アマランサス導管液を HPLC 分析した結果を Fig. 4-14 に示した。Fig. 4-14 試料(1)の導管液 A では、25、30、34 分前後にピークが現れた。わずかではあるが 27 分前後にもピークが現れた。それぞれのピークを P₂₅、P₂₇、P₃₀、P₃₄ とすると、試料(2)の導管液 A でも同様に P₂₅、P₃₀、P₃₄ が現れていた。Fig. 4-14 試料(1)の Fe(III)添加試料 B では Fig. 4-13 に示した Fe 充足の場合と同様に P₂₅ のピーク強度が顕著に高くなっていた。試料(2)の Fe(III)添加試料 B でも P₂₅ のピーク強度は顕著に増加していた。

Fe 充足アマランサス導管液 (Fig. 4-13A) と Fe 欠乏アマランサス導管液 (Fig. 4-14A) を比較すると、Fe 欠乏アマランサス導管液では Fe 充足と比較して全体的にピーク強度が低く、特に P₂₅ が小さくなっていた。また、Fe 充足、Fe 欠乏いずれの導管液にも Fe(III)-DMA のピークである P₃₂ は現れていなかった。

以上のことから、生理的な条件ではアマランサス導管液中の Fe は主に P₂₅、P₂₇、P₃₀、P₃₄ に溶出する 4 つの化学形態で存在することが分かった。前述の 4.3.1.1 の結果から、pH 5.5 の移動相を用いて Fe(III)-Cit 標準物質を分画した際に 25 分に現れるピークは Fe₃-Cit₃ 錯体と同定した。アマランサス導管液にも同一の溶出時間にピーク P₂₅ が現れており、これは Fe₃-Cit₃ 錯体によるものと推測された。そこで次に、アマランサス導管液の P₂₅ に溶出する Fe の化学形態を明らかにするために溶出時間 25.5~26.0 分のフラ

クシオンを分取し、後述する ESI-TOF-MS 分析を行った。

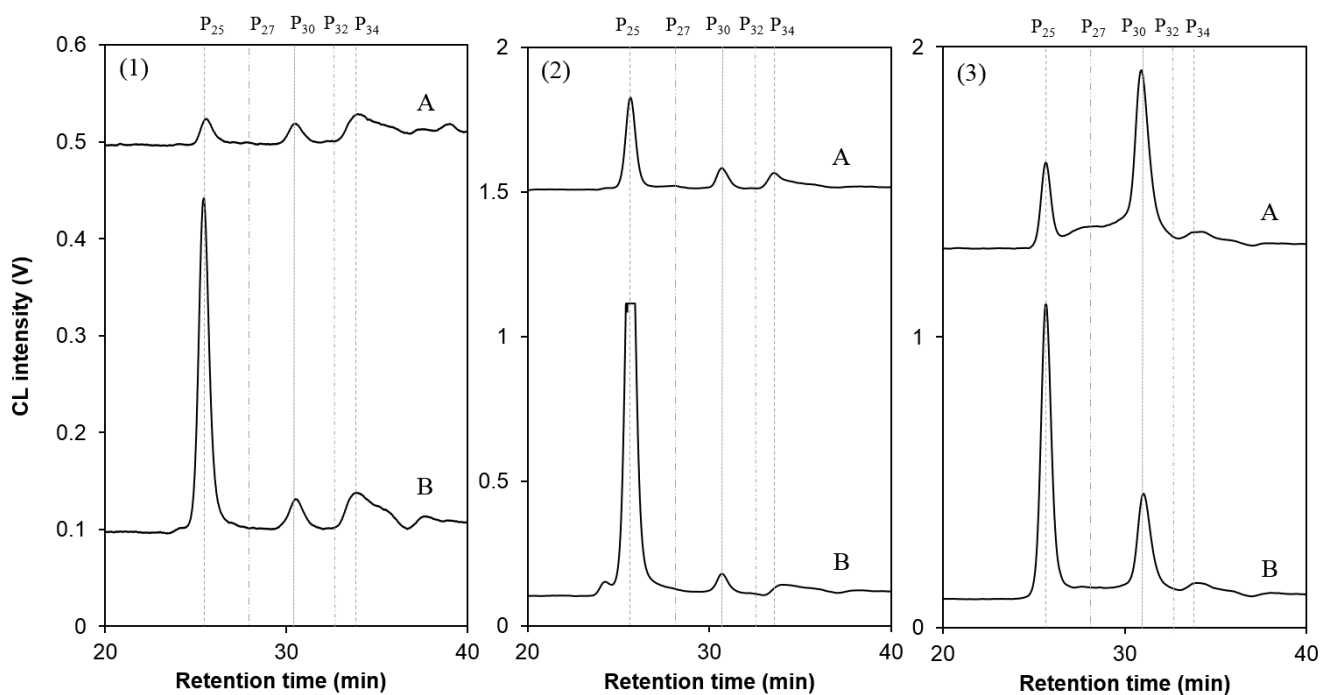


Fig. 4-13. Chromatograms of xylem sap from hydroponically cultured Fe-sufficient amaranthus (*Amaranthus hypochondriacus* sp.) of three groups [(1), (2), and (3)] are shown. A is the chromatogram of intact xylem sap, and B is that of +Fe treatment xylem sap. The +Fe treatment xylem sap is intact xylem sap added 100 μ M FeCl₃ *in vitro*. Each sample was separated by Superdex Peptide column using 10 mM ammonium acetate buffer at pH 5.5 as mobile phase and reacted with post-column solution of optimized condition shown in Table 3-1.

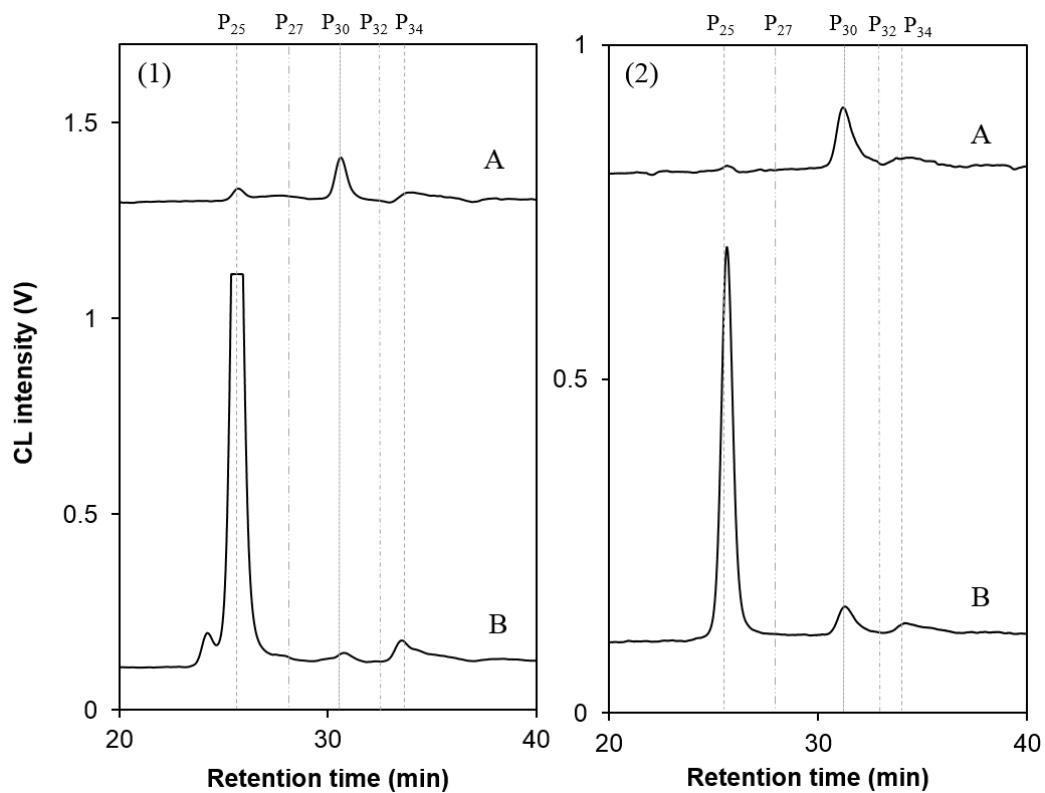


Fig. 4-14. Chromatograms of xylem sap from hydroponically cultured Fe-deficient amaranthus (*Amaranthus hypochondriacus* sp.) of three groups [(1), (2), and (3)] are shown. A is the chromatogram of intact xylem sap, and B is that of +Fe treatment xylem sap. The +Fe treatment xylem sap is intact xylem sap added 100 μM FeCl_3 *in vitro*. Each sample was separated by Superdex Peptide column using 10 mM ammonium acetate buffer at pH 5.5 as mobile phase and reacted with post-column solution of optimized condition shown in Table 3-1.

② HPLC/ESI-TOF-MS 分析

アマランサス導管液クロマトグラムの P₂₅ に溶出する Fe の化学形態を明らかにするために、Fe 充足アマランサス導管液を 25 倍に濃縮してから分画し溶出時間 25.5~26.0 分のフラクションを分取した。分取したフラクションを濃縮してから、ネガティブイオン化モードで ESI-TOF-MS 分析に供した。その結果、 m/z 366.46 のピークが検出された (Fig. 4-15)。以上のことからアマランサス導管液の P₂₅ には Fe₃-Cit₃ が溶出していることが明らかになった。

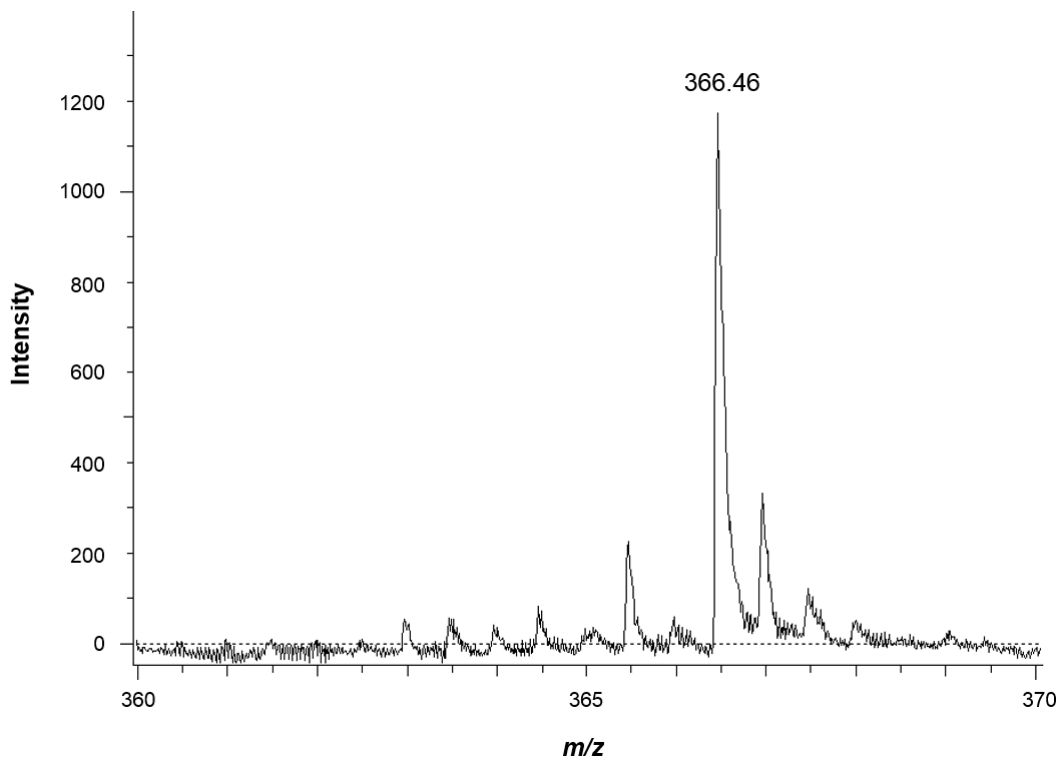


Fig. 4-15. ESI-TOF-MS spectra in negative ionization (-ESI) mode of the 25.5-26.0 min fraction of 20- μ L spike of xylem sap of Fe-sufficient amaranthus (*Amaranthus hypochondriacus* sp.). The intact xylem sap was 25-fold concentrated before the fractionation by Superdex Peptide column, using 10 mM ammonium acetate buffer (pH 5.5) as an eluent. Peak corresponding to m/z 366.46 were assigned to $[\text{Fe}_3\text{Cit}_3\text{H}]^{2-}$.

4.3.2.4 ホウレンソウ導管液中の FIC 分析

FIC 分析法を用いた HPLC 分析

Fe 充足ホウレンソウ導管液を HPLC 分析した結果を Fig. 4-16 に示した。A は導管液、B は導管液に *in vitro* で FeCl₃ を 100 μM 添加した Fe(III) 添加試料のクロマトグラムである。A の導管液では 25 分、27 分、30 分、34 分前後にピークが現れた。それぞれのピークを P₂₅、P₂₇、P₃₀、P₃₄ とする。P₂₅ は主要なピークであり、この特徴は Fe 充足アマランサス導管液と同じであった。Fig. 4-16B の Fe(III) 添加試料では A と比較すると P₂₅ のピーク強度が顕著に高くなっていたことから、過剰な Fe(III) を *in vitro* で添加することによって FIC と Fe(III) が結合し、P₂₅ に溶出する Fe-FIC 錯体の量が増加することが分かった。

次に Fe 欠乏ホウレンソウ導管液を HPLC 分析した結果を Fig. 4-17 に示した。Fig. 4-17A の導管液では、25、27、30、34 分前後にピークが現れた。それぞれのピークを P₂₅、P₂₇、P₃₀、P₃₄ とする。Fig. 4-17B の Fe(III) 添加試料では Fig. 4-16 に示した Fe 充足の場合と同様に A と比較すると P₂₅ のピーク強度が顕著に高くなっていた。

Fe 充足ホウレンソウ導管液 (Fig. 4-16A) と Fe 欠乏ホウレンソウ導管液 (Fig. 4-17A) を比較すると、Fe 欠乏ホウレンソウ導管液では P₂₅ が小さくなった一方で、P₂₇ は増大していた。また、Fe 充足、Fe 欠乏いずれの導管液にも Fe(III)-DMA のピークである P₃₂ は現れていなかった。

以上のことから、生理的な条件ではホウレンソウ導管液中の Fe は主に P₂₅、P₂₇、P₃₀、P₃₄ に溶出する 4 つの化学形態で存在することが分かった。前述の 4.3.1.1 の結果から、pH 5.5 の移動相を用いて Fe(III)-Cit を分画した際に 25 分に現れるピークは Fe₃-Cit₃ 錯体と同定した。ホウレンソウ導管液にも同一の溶出時間にピーク P₂₅ が現れており、これは Fe₃-Cit₃ 錯体によるものと推測された。

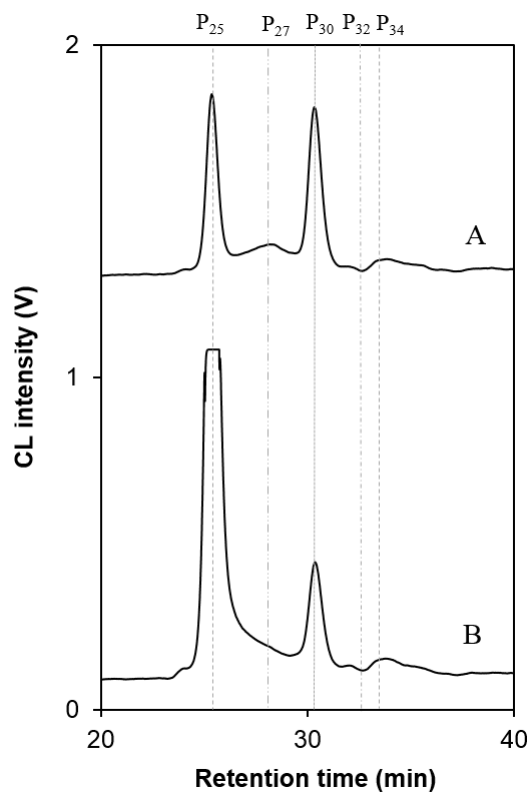


Fig. 4-16. Chromatograms of xylem sap from hydroponically cultured Fe-sufficient spinach (*Spinacia oleracea* cv. Hoyo) are shown. A is the chromatogram of intact xylem sap, and B is that of +Fe treatment xylem sap. The +Fe treatment xylem sap is intact xylem sap added 100 μM FeCl_3 *in vitro*. Each sample was separated by Superdex Peptide column using 10 mM ammonium acetate buffer at pH 5.5 as mobile phase and reacted with post-column solution of optimized condition shown in Table 3-1.

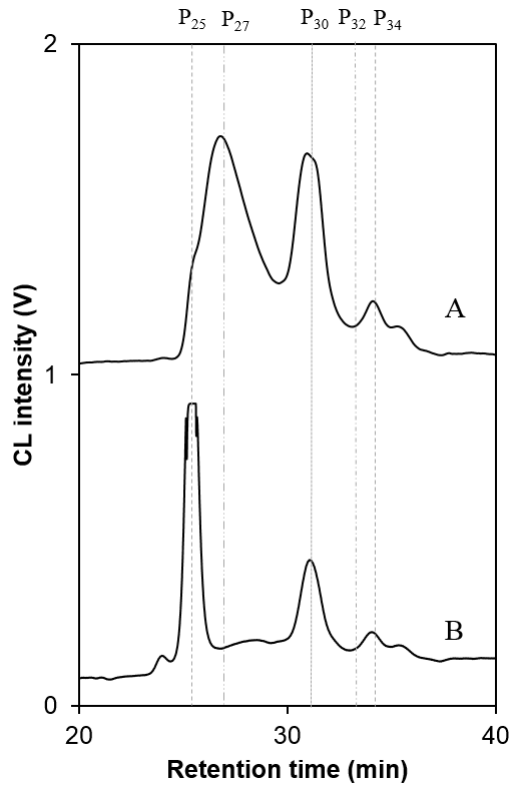


Fig. 4-17. Chromatograms of xylem sap from hydroponically cultured Fe-deficient spinach (*Spinacia oleracea* cv. Hoyo) are shown. A is the chromatogram of intact xylem sap, and B is that of +Fe treatment xylem sap. The +Fe treatment xylem sap is intact xylem sap added 100 μM FeCl_3 *in vitro*. Each sample was separated by Superdex Peptide column using 10 mM ammonium acetate buffer at pH 5.5 as mobile phase and reacted with post-column solution of optimized condition shown in Table 3-1.

以上オオムギ、ヒエ、アマランサス、ハウレンソウ導管液のクロマトグラムを元に P₂₅、P₂₇、P₃₀、P₃₂、P₃₄それぞれのピーク高さがこれら 5 つのピーク高さの合計に占める割合を計算し、植物種ごと、Fe 充足、Fe 欠乏ごとに分けて Table 4-1 に示した。各割合は、Fe 充足オオムギでは Fig. 4-7 試料(1)~(3)の A、Fe 欠乏オオムギでは Fig. 4-8 試料(1)~(3)の A、Fe 充足ヒエでは Fig. 4-11 の A、Fe 欠乏ヒエでは Fig. 4-12 の A、Fe 充足アマランサスでは Fig. 4-13 試料(1)~(3)の A、Fe 欠乏アマランサスでは Fig. 4-14 の試料(1)および(2)の A、Fe 充足ハウレンソウでは Fig. 4-16 の A、Fe 欠乏ハウレンソウでは Fig. 4-17 の A のクロマトグラムから計算した。また、Fe₃-Cit₃ 錯体標準物質を分析した際の濃度ごとのピーク高さを元に pH 5.5 における Fe₃-Cit₃ の検量線を作成し、この検量線と各植物種の P₂₅ ピーク高さを元に導管液中の Fe₃-Cit₃ の濃度を求めて Table 4-1 に示した。

Table 4-1 Peak height balance of P₂₅, P₂₇, P₃₀, P₃₂, P₃₄ in chromatograms of intact xylem saps from hydroponically cultured Fe-sufficient or Fe-deficient graminaceous plants (barley and Japanese barnyard millet) and non-graminaceous plants (amaranthus and spinach).

Plant species	Percentage of peak height (%)				Concentration of Fe ₃ -Cit ₃ (μM)		
	P ₂₅ Fe ₃ -Cit ₃ *	P ₂₇	P ₃₀	Total percentage of P ₂₅ , P ₂₇ and P ₃₀	P ₃₂ Fe-DMA*	P ₃₄	
Barley							
<i>(Hordeum vulgare</i> L. cv Ehimehadaka No.1)							
Fe sufficient	3.6%	12%	82%	98%	2.6%	n.d.	2.2 ± 0.7
Fe deficient	1.7%	23%	55%	80%	18%	2.4%	1.8 ± 0.5
Japanese barnyard millet							
<i>(Echinochloa esculenta</i> sp.)							
Fe sufficient	3.3%	6.4%	87%	97%	n.d.	3.3%	2.8
Fe deficient	6.3%	7.0%	83%	96%	n.d.	3.8%	3.7
Amaranthus							
<i>(Amaranthus hypochondriacus</i> sp.)							
Fe sufficient	55%	0.70%	34%	90%	n.d.	10%	12.9 ± 5.7
Fe deficient	17%	3.4%	66%	86%	n.d.	13%	2.0 ± 0.6
Spinach							
<i>(Spinacia oleracea</i> cv. Hoyo)							
Fe sufficient	51%	2.3%	45%	98%	n.d.	2.2%	27.0
Fe deficient	n.d.	52%	41%	93%	n.d.	7.2%	n.d.

*Chemical species which were identified in this study.

Percentage of each peak height was calculated from chromatograms of Fig. 4-7A (Fe-sufficient barley), Fig. 4-8A (Fe-deficient barley), Fig. 4-11A (Fe-sufficient Japanese barnyard millet), Fig. 4-12A (Fe-deficient Japanese barnyard millet), Fig. 4-13A (Fe-sufficient amaranthus), Fig. 4-14A (Fe-deficient amaranthus), Fig. 4-16A (Fe-sufficient spinach), and Fig. 4-17A (Fe-deficient spinach), respectively.

4.4 考察

本章では第3章で開発した FIC 分析法を用いて、高等植物導管液中の FIC 分析を試みた。その結果、複数のピークを検出し、ESI-TOF-MS 分析の結果からそのうち1つである P₂₅ は Fe₃-Cit₃ 錯体のピークであることが明らかになった。また、オオムギにのみ存在するピーク P₃₂ からは単体の DMA (*m/z* 305.13) を検出した。P₃₂ は Fe(III)-DMA のものと推測され、Fe 欠乏オオムギ導管液ではピーク強度の増大が見られた。

本分析法を用いた植物試料分析結果の妥当性について

本分析法ではルミノール/H₂O₂ の化学発光反応を Fe(III)-FIC の検出に利用しているが、この反応の酸化補助剤として働く金属イオンまたは金属錯体は Fe(III) に限定されず、Co(II)、Cu(II)、Ni(II) などの遷移金属イオンおよびその錯体も含まれる。本章で研究対象として選んだオオムギ、アマランサス、ハウレンソウ、カボチャの水耕液は遷移金属として Fe(III) の他に Mn(II)、Cu(II)、Mo(IV) を微量金属として含有する。そのため、導管液には Fe(III) 以外にも遷移金属として Mn(II)、Cu(II)、Mo(IV) が含まれると考えられる。第3章で開発した FIC 分析法の検出原理を踏まえると、導管液中の Fe(III)-FIC 分析の際、Mn(II)、Cu(II)、Mo(IV) などのキレート錯体を同時に検出してしまう可能性についても考慮しなければならない。

Mo(IV) はその他の金属イオンとは異なり土壤中でモリブデン酸イオン (MoO₄²⁻) としてアニオンの形で存在する。シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の根や葉からは MoO₄²⁻ のトランスポーター MOT1 が同定されており (Tomatsu *et al.*, 2007)、導管液中でも Mo(IV) はカチオンではなく MoO₄²⁻ として存在していることが推測される。MoO₄²⁻ の分子量は Superdex Peptide カラムの浸透限界以下であるため、本章で示したクロマトグラムの溶出時間範囲である 20~40 分の間には溶出しない。Mn(II) はルミノール/H₂O₂ の化学発光反応においてラジカル捕捉剤としての活性を有しており、Mn(II) の共存下でルミノールの化学発光強度が減少することが明らかになっている (Szentmihályi *et al.*, 2003)。このことから、Mn(II) キレート錯体が本分析法で検出される可能性は低いと考えられる。Cu(II) はフリーの 2 価イオンの形ではルミノール/H₂O₂ の化学発光反応において非常に強い酸化補助剤としての活性を示すが、EDTA や DTPA などのキレーターと錯体を形成した状態ではその活性を完全に失うことから (Kim *et al.*, 2012)、Cu(II) キレート錯体が本分析法で検出される可能性も低いと考えられる。以上のことから、導管液中に存在す

る Fe 以外の遷移金属およびそのキレート錯体が本分析法で検出されてしまう可能性は低いと考えられる。

イネ科植物導管液中の FIC について

① オオムギ

本章の結果からオオムギ導管液の P₂₅ は Fe₃-Cit₃ のピークであることが明らかになった。全てのオオムギ導管液に共通して Fe(III) 添加試料において P₂₅ のピークが大幅に増大していた (Fig. 4-7B、4-8B)。Fig. 4-3 の結果から、Fe(III) とクエン酸の標準混合液中の Fe(III):Cit の比率が大きいほど P₂₅ の割合が大きく Fe(III)₃-Cit₃ 錯体を形成しやすいことが示されたことから、Fe(III) 添加試料において P₂₅ のピーク強度が増大していたのは *in vitro* での Fe(III) を添加したことにより導管液中の Fe(III):Cit 比が増大したためと推測された。また、P₂₅ が P₂₅~P₃₄ 全体に占める割合は Fe 充足および Fe 欠乏の導管液においてわずかに 3.6% および 1.7% であり (Table 4-1)、Fe₃-Cit₃ はオオムギ導管液中の Fe の主要な化学形態ではないことが明らかになった。

また、P₂₅ の他にもオオムギ導管液には P₂₇ や P₃₀ が現れていた (Fig. 4-7A、4-8A)。P₂₇ は Fe 欠乏オオムギ導管液において全体の 23% を占める主要ピークであり (Fig. 4-8A、Table 4-1)、P₃₀ は Fe 充足、Fe 欠乏においてそれぞれ 82%、55% を占める主要なピークであった (Fig. 4-7A、4-8A、Table 4-1)。P₃₀ は今回研究に用いたオオムギ、ヒエ、アマランサス、ホウレンソウの全ての導管液クロマトグラムに共通して存在するピークであり、このピークが占める割合はいずれの導管液においても 34%~87% と比較的高いことから (Table 4-1)、P₃₀ に溶出する Fe-FIC 錯体は高等植物導管液中の主要な Fe の化学形態である。本研究中では P₂₇ および P₃₀ に溶出する Fe-FIC 錯体を同定することはできなかったが、Fe(III) とクエン酸の標準混合液を分析した際のクロマトグラムには P₂₇ および P₃₀ に近い溶出時間にピークが現れていたため (Fig. 4-2 の P₂₇ および P₃₁)、オオムギ導管液の P₂₇ および P₃₀ には Fe₃-Cit₃ 以外の結合比率の Fe-Cit 錯体が溶出している可能性が高い。P₂₇ の溶出時間は分析サンプルによって 1 分前後変化することがあったことから [Fig. 4-8 の試料(1)の A と試料 v (3)の A など]、P₂₇ には複数の化学形態の Fe-Cit が完全に分離されない状態で溶出している可能性も考えられた。ここで、中性付近の pH において存在し得る Fe₃-Cit₃ 以外の Fe-Cit 錯体として Fe₂-Cit₂ や Fe-Cit₂ などが知られる。特に Fe-Cit₂ は酸性~中性の生理的 pH における主要な Fe-Cit 錯体の化学形態であり、Fe: Cit 比が 0.5~0.001 の広い範囲において存在が確認されている (Gautier-Luneau *et al.*, 2005,

Andre *et al.*, 2009)。筆者らは修士課程在籍中にキャピラリー電気泳動-質量分析およびグラフアイト炉原子吸光法を用いて Fe 充足オオムギ導管液中のクエン酸および Fe 濃度をそれぞれ約 250 μM 、約 25 μM と求めたが (参考文献、Ariga *et al.*, 2014)、この濃度から Fe 充足オオムギ導管液の Fe: Cit 濃度比は約 0.1 と求められる。Fe 欠乏状態の高等植物では導管液中のクエン酸濃度が増加することが知られており (Pich *et al.*, 1994, López-Millán *et al.*, 2000, Nikolic and Römheld, 1999) それに伴い Fe: Cit は減少する。オオムギ導管液中の Fe: Cit 比は Fe 充足においては 0.1 前後、Fe 欠乏においてはそれより小さいと考えられる。Fe 充足、Fe 欠乏を問わずオオムギ導管液中で Fe-Cit₂ が主要な Fe-Cit 錯体として存在する可能性は高いことから、Fe 充足、Fe 欠乏のいずれにおいても主要なピークであった P₃₀ が Fe-Cit₂ である可能性は高い。また、P₂₇ のピーク高さが全体に占める割合を Fe 充足と Fe 欠乏オオムギ導管液で比較すると、Table 4-1 に示すように 12% から 23% まで増加している。このことから、P₂₇ が Fe-Cit のピークであると仮定すると、このピークに溶出する Fe-Cit 錯体は Fe₂-Cit₂ 錯体などの Fe: Cit 比が低い混合液中で形成されやすい Fe-Cit 錯体であると推測された。導管液の pH に近い pH 5.5 において Fe とクエン酸の標準混合液中の Fe: Cit 比が減少すると Fe₂-Cit₂ が増加することが明らかになっており (Rellán-Álvarez *et al.*, 2010)、P₂₇ が Fe₂-Cit₂ である可能性は高いと考えられた。

P₃₂ は ESI-TOF-MS 分析の結果から Fe(III)-DMA のピークであることが示唆された。P₃₂ は Fe 充足のオオムギ導管液では 2.6% のみを占める小さなピークであったのに対し、Fe 欠乏のオオムギ導管液では 18% を占めており (Table 4-1)、Fe(III)-DMA は主に Fe 欠乏条件下においてオオムギ導管液中の主要な Fe の化学形態であることが示された。これまでの研究で、イネ科植物では Fe 欠乏に応答してムギネ酸類の生合成や根からの Fe(III)-MAs の吸収が促進されることが明らかになっている (reviewed by Kobayashi *et al.*, 2010)。本研究は Fe 欠乏応答として導管液中の Fe(III)-DMA 濃度の上昇も同時に起こり、導管液中の限られた Fe を効率的に可溶化し輸送していることを示した。

以上のことから、イネ科植物であるオオムギ導管液のクロマトグラム上に現れた主要な 5 つのピーク P₂₅、P₂₇、P₃₀、P₃₂、P₃₄ のうち、P₂₅、P₂₇、P₃₀ に関しては Fe-Cit 錯体であることが同定または推測された。これら 3 つのピーク割合の合計は Fe 充足で 98%、Fe 欠乏で 80% となり (Table 4-1)、オオムギ導管液中で大部分の Fe が Fe-Cit 錯体の形で存在することが示唆された。また、Fe 欠乏状態では一部の Fe が Fe(III)-DMA 錯体の形で存在していることが明らかになった。

② ヒエ

ヒエ導管液ではオオムギ導管液と同様 P₂₅、P₂₇、P₃₀、P₃₄ の位置にピークが現れた (Fig. 4-11A、4-12A)。オオムギと同じイネ科植物であるのにも関わらず Fe 充足、Fe 欠乏の両方において P₃₂ の位置にはピークが現れなかった。前述のように P₃₂ は Fe(III)-DMA のピークであるが、ヒエの場合には Fe 欠乏状態においても導管液中の Fe(III)-DMA は増加せず DMA は Fe の輸送には関与していないことが示された。イネ科植物であってもオオムギは高いアルカリ土壌耐性を示すのに対し、イネやトウモロコシはアルカリ土壌耐性が低く Fe 欠乏を起こしやすい (Mori *et al.*, 1991)。これはイネやトウモロコシはムギネ酸類の生合成能や根からの分泌能が低いためであり、同じイネ科植物であっても種によってアルカリ土壌耐性には差がある。今回分析対象として選んだヒエは酸性土壌を好む植物であり、生育可能な土壌 pH も pH 5.5~6.5 と酸性寄りである。また、Fe を含む水耕液でオオムギを栽培した後、Fe を含まない水耕液に移植すると約 28 日前後でクロロシスが観察されるようになったのに対し、ヒエは Fe を含まない水耕液に移植後 14 日前後でクロロシスが観察されたことから (データは示さず)、ヒエはオオムギと比較して Fe 欠乏耐性が低いことが示唆された。以上のことから、ヒエは Fe 欠乏に応答して導管液中の DMA 濃度を上昇させる能力がオオムギよりも低く、結果として Fe 欠乏耐性が低いこと推論された。

非イネ科植物導管液中の FIC について

① アマランサス

非イネ科植物であるアマランサス導管液のクロマトグラムにもオオムギと同様に P₂₅ のピークが現れており (Fig. 4-13A、4-14A)、これは ESI-TOF-MS 分析の結果から Fe₃-Cit₃ のピークであることが明らかになった。P₂₅ は Fe 充足アマランサス導管液において 55% を占める主要なピークであり (Table 4-1)、Fe₃-Cit₃ は Fe 充足アマランサス導管液中の主要な Fe の化学形態であることが明らかになった。一方、Fe 欠乏アマランサス導管液では P₂₅ の占める割合は 17% まで低下した (Table 4-1)。これは Fe 欠乏下で導管液中の Fe: Cit の比率が減少することによって Fe₃-Cit₃ 錯体の存在量も減少するためと考えられた。P₂₇ は一部の導管液でわずかに観察されたものの (Fig. 4-13 試料(3)の A、4-14 試料(1)の A)、その他の導管液ではほとんど観察されなかった。P₃₀ はオオムギやヒエと同様にアマランサス導管液においても Fe 充足で 34%、Fe 欠乏で 66% を占める主要なピーク

であった (Table 4-1)。これら P₂₇、P₃₀ の溶出時間はオオムギ導管液の P₂₇、P₃₁ と近似していることから、これらのピークにはオオムギの場合と同様にいずれかの結合比率の Fe-Cit 錯体が溶出してきているものと推測された。アマランサスは非イネ科植物であるため DMA は生合成せず、P₃₂ の位置にもピークは観察されなかった。また、P₃₄ は Fe 充足、Fe 欠乏のアマランサス導管液両方で観察され (Fig. 4-13A、4-14A)、オオムギやヒエなどのイネ科植物においては P₃₄ のピーク高さの占める割合は数%前後と非常に小さかったのに対しアマランサスでは Fe 充足で 10%、Fe 欠乏で 13% とその割合は比較的大きかった (Table 4-1)。

② ホウレンソウ

ホウレンソウ導管液のクロマトグラムにも P₂₅ が現れており (Fig. 4-16A、4-17A)、アマランサスの場合と同様 Fe 充足導管液において 51% を占める主要なピークであった (Table 4-1)。本研究ではホウレンソウ導管液の ESI-TOF-MS 分析は行わなかったが、ホウレンソウの P₂₅ は Fe₃-Cit₃ と同一の溶出時間であることから Fe₃-Cit₃ 錯体のピークであると推測され、Fe 充足ホウレンソウ導管液中の主要な Fe の化学形態は Fe₃-Cit₃ であると考えられた。また、P₂₇、P₃₀ の溶出時間はオオムギ導管液の P₂₇、P₃₀ と一致しており、オオムギの場合と同様にこれらのピークにはいずれかの結合比率の Fe-Cit 錯体が溶出してきているものと推測された。Fe 欠乏ホウレンソウ導管液では P₂₇ の割合が 52% であり Fe 充足と比較して大幅に高かったことから、P₂₇ はオオムギ導管液の場合と同様に Fe:Cit 比が小さい時に生成しやすい Fe-Cit 錯体であると考えられた。

総括

本章ではオオムギの Fe(III) 添加試料およびアマランサス導管液の P₂₅ のフラクションから [Fe₃Cit₃H]²⁺ (*m/z* 366.4) を検出し P₂₅ には Fe₃-Cit₃ が溶出していることを明らかにした。Table 4-1 に示したようにオオムギ導管液においては Fe 充足、Fe 欠乏いずれの場合も P₂₅ は主要なピークではなかったことから Fe₃-Cit₃ はオオムギ導管液中の Fe の主要な化学形態ではないことが明らかになった。一方で、非イネ科植物であるアマランサスやホウレンソウでは、特に Fe 充足導管液において P₂₅ が主要なピークであったことから、Fe₃-Cit₃ が導管液中の主要な Fe の化学形態であることが明らかになった。また、本章では導管液中の Fe₃-Cit₃ の濃度を求めたところ、特に非イネ科植物の Fe 充足導管液においてその濃度は高かった (Table 4-1)。P₂₇、P₃₀ も Fe-Cit 錯体のピークではないかと

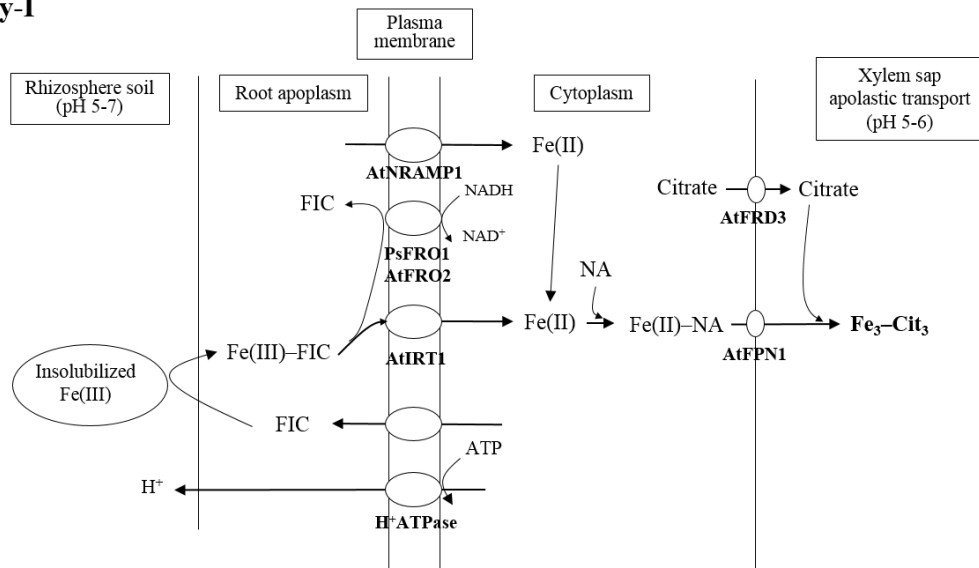
推測され、P₂₅、P₂₇、P₃₀は全てが化学形態の異なる Fe-Cit であると考えられた。これらのピークに溶出する Fe の割合の合計を求めると 80~98%に上り非常に高い値であることから、イネ科、非イネ科を問わず Fe-Cit 錯体が導管液中の主な Fe の化学形態であることが示唆された。これまで複数の先行研究において、非イネ科植物導管液中の Fe の主要な化学形態として Fe-Cit 錯体が示唆されてきたが (Nikolic and Römheld, 1999, López-Millán *et al.*, 2000 など)、本章の結果はそれを支持するものであった。

DMA はイネの導管液および篩管液から検出されており (Mori *et al.*, 1991, Kakei *et al.*, 2009)、実際に Fe-DMA がイネ篩管液から同定されている (Nishiyama *et al.*, 2012)。このように、DMA はイネ科植物における根からの Fe の吸収だけでなく篩管や導管を通じた植物体内における Fe の輸送にも大きく関与している。本章では、Fe 充足オオムギ導管液の P₃₂のフラクションから DMA (*m/z* 305.1) を検出し、P₃₂が Fe(III)-DMA のピークであることを示した。P₃₂のピーク強度は Fe 充足の導管液においてはいずれも小さく主要ピークではなかった一方で、Fe 欠乏の導管液では 18%を占める主要ピークであったことから、DMA は特に Fe 欠乏下で導管液中の主要な FIC として機能していることが明らかになった。イネの持つ DMA の生合成に関与する酵素遺伝子 (*OsNAS1*、*OsNAS2*、*OsNAAT1*、*OsDMAS1*) や Fe(III)-DMA トランスポーター遺伝子 (*OsYSL15*、*OsYSL16*)、オオムギの持つ Fe(III)-MAs トランスポーター遺伝子 (*HvYSL1*) の発現は Fe 欠乏に応答して誘導される (Inoue *et al.*, 2003, Inoue *et al.*, 2008, Bashir *et al.*, 2006, Murata *et al.*, 2006, Inoue *et al.*, 2009, Ueno *et al.*, 2009)。これらの応答によって Fe 欠乏下で導管液中の DMA 濃度も増加し Fe の効率的な輸送が可能となっているものと考えられた。また、ヒエ導管液には Fe 充足、Fe 欠乏のいずれにおいても P₃₂は現れなかったことから、同じイネ科植物であっても導管液中の Fe の輸送に DMA が寄与している程度は大きく異なっており、その差が Fe 欠乏耐性の高さにも影響していることが示唆された。本研究では P₃₄に溶出する FIC を同定することはできなかったが、P₃₄に溶出する FIC はイネ科、非イネ科植物導管液に共通して存在し、特に非イネ科植物導管液中の Fe の輸送に関与している物質であることが示された。P₃₄のピーク高さは Fe 欠乏状態でより高くなる傾向があったため (Table 4-1)、P₃₄に溶出する FIC は Fe 欠乏に応答して生合成される物質である可能性が高い。

本章の結果を元に、根における Fe の吸収および導管液中における Fe の輸送に関わる Fe の化学形態を Fe 獲得機構の違いごとに図にまとめた (Fig. 4-18)。Strategy-I で Fe を吸収する非イネ科植物の導管液中では Fe₃-Cit₃を始めとした Fe-Cit 錯体が主要な Fe の

化学形態である。Strategy-II で Fe を吸収するイネ科植物の導管液中でも同様に Fe-Cit が主要な Fe の化学形態であるが、特に Fe 欠乏状態においては一部の Fe は Fe(III)-DMA として存在する。

(A) Strategy-I



(B) Strategy-II

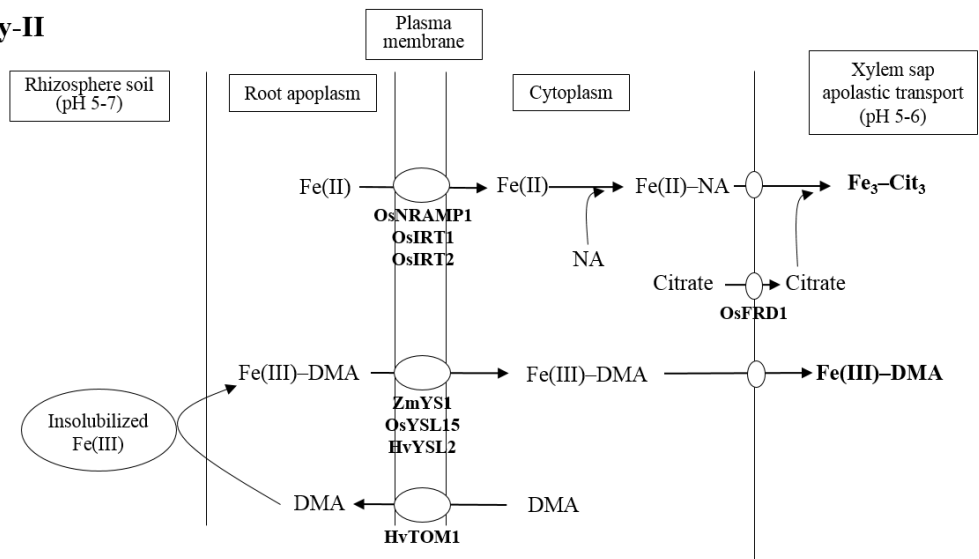


Fig. 4-18. Uptake and xylem transport of Fe in (A) non-graminaceous (Strategy-I) and (B) graminaceous plants (Strategy-II).

第5章 総合考察

分析化学の大目的の一つは、新しい分析原理を着想し、その分析原理に基づいて新規な分析法を開発することによって微量分析、高感度分析、高選択性分析、迅速分析を可能にすることである。新規分析法が他分野に応用されることでその分野の研究が飛躍的に進展することが見込まれるため、その開発がもたらす波及効果は非常に大きい。分析化学に携わる者には新しい発想に基づいて新規の分析法を構築することが求められるのみならず、対象とする試料の特性やその試料についてどのような情報が求められているか、従来法では何故その情報がもたらされなかったのかといった問題点についての知識も求められる。

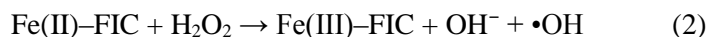
前述のように、従来の低分子有機酸やムギネ酸類分析法はカルボキシル基やアミノ基を一律に検出する手法であり、Fe(III)とのキレート能が低い化合物であっても一律に検出してしまい、単一の分析法では低分子有機酸とムギネ酸を一度に分析することができない、といった問題点があった。高等植物体内において Fe の吸収や輸送に関わる FIC として低分子有機酸やムギネ酸類が代表的であるが、ITP のようなタンパク質も Fe の輸送に関わっている。そのため高等植物体内に存在する FIC を広く分析し Fe 栄養生理の仕組みを解明するためには、特定の化学構造を有していなくても Fe(III)キレート能を有していれば網羅的な分析が可能な FIC 分析法が必要不可欠であった。さらに、生体試料中の微量 FIC を分析するために、高感度な FIC 分析法が求められていた。

本研究の第2章では蛍光試薬 CB が Fe(III)と結合して消光する性質を持つことに着目し、この性質を HPLC ポストカラム法に応用することで Fe(III)とのキレート能に応じた FIC 分析法の開発に成功した。本分析法を用いて実際に複数の FIC を分離・検出すると Fig. 2-27 に示すように Fe(III)とのキレート能に応じて FIC を特異的に検出することが可能であった。本分析法は従来法とは異なり化学構造に関わらず対象物質の Fe(III)キレート能に応じて検出することができるため、Fe 栄養生理において重要な生体内化合物を優先的に解析できるという点で画期的であった。

続く第3章で開発したルミノールを用いた FIC 分析法（以下、本分析法とする）では、ルミノールと H₂O₂ の化学発光反応が Fe(III)-FIC 錯体の共存下で進行することを検出に利用している。Fe(III)-EDTA の検出感度が他の Fe(III)-FIC 錯体と比較して顕著に高かった。そこで、ポストカラム溶液に EDTA を添加しサンプル中の Fe(III)-FIC 錯体のうち FIC を EDTA で配位子交換し Fe(III)-EDTA を検出することによって FIC を高感

度に検出しようと試みた。ポストカラム溶液に EDTA を添加した結果、Fe(III)-Cit の検出感度は EDTA を添加しない場合と比較して 3 桁向上した。それぞれの Fe(III)-FIC 錯体の検出限界を求めると Fe(III)-EDTA では 0.25 pmol、Fe(III)-Cit では 2.3 pmol、植物由来の代表的な FIC であるニコチアナミンの Fe(III)錯体 [Fe(III)-NA] では 1.1 pmol であった。従来法の検出限界は EDTA が 1.71 pmol (Loyaux-Lawniczak *et al.*, 1999)、クエン酸が 210 pmol (Nour *et al.*, 2010)、ニコチアナミンが 50 pmol (Neumann *et al.*, 1999) であることを踏まえると、従来法より検出限界を最大で 2 桁向上させることに成功しており、世界一高感度な FIC 分析法の開発に成功した。

第 3 章でも考察したように、本分析法における検出感度はそれぞれの Fe(III)-FIC 錯体が示す還元電位と Fe(II)-FIC が示すフェントン活性によって決定するものと考えられる。Fe(III)-EDTA 錯体の還元電位は +0.12 V と大きく (Smith and Martell, 1989) 還元されやすいことを示す。また、Fe(II)-EDTA のフェントン活性は 0.24 であり Fe(II)-NA などと比較して高い数値である (von Wirén *et al.*, 1999)。このような性質から Fe(III)-EDTA/Fe(II)-EDTA はルミノール/H₂O₂ の化学発光反応における酸化補助剤としての活性が高いと予想される。第 3 章では、Fe-EDTA の示すこれらの性質を Fe(III)-FIC 錯体の検出に利用することによって FIC の検出感度の向上に繋がった。高等植物体内で Fe は何らかの Fe キレーターと結合した状態で存在していると考えられるが、第 1 章でも述べたようにこの理由の一つとして高等植物体内の生理的な pH (弱酸性~弱アルカリ性) において Fe は溶解性が低いためキレーターと錯体を形成することで溶解性が高く維持されていると推測されることが挙げられる。そしてもう一つの理由として、Fe が酸化還元反応を起こすことで反応性の高いラジカルが生成し細胞に損傷が起きることを防ぐために、高等植物体内では Fe はフリーの Fe イオンよりも反応性の低い Fe 錯体の形で存在していると推測されることが挙げられる。高等植物由来の代表的な FIC の一つであるムギネ酸 (MA) や NA の Fe(III)-FIC 錯体の還元電位はそれぞれ -0.10 V および -0.18 V であり (Sugiura and Nomoto, 1984) 合成金属キレーターである Fe(III)-EDTA の還元電位である +0.12 V より小さく、還元されにくいことを示している。また、Fe(II)-FIC 錯体のフェントン活性は Fe(III)-EDTA が 0.24 であるのに対して Fe(II)-NA は 0.13 であり活性が低い (von Wirén *et al.*, 1999)。以上のことから、生体由来の FIC は下記の (1)の反応および(2)のフェントン反応が起きにくく、細胞に有害なラジカルが生成されにくいと推測される。



実際、EDTA を添加していないポストカラム溶液を用いて第 4 章 Fig. 4-7A で分析したものと同一の Fe 充足オオムギ導管液を分析すると、Fig. 4-7A において主要なピークであった P₃₀ と近似する溶出時間にピークが現れたが、そのピーク高さは Fig. 4-7A の 1/1000 以下であった (データは示さず)。この分析結果は、生体由来の FIC が上記の(1)、(2)の反応を起こしにくいという前述の考察を支持するものである。ポストカラム溶液に EDTA を添加せずに Fe(III)-Cit を分析するとその検出感度 (0.082 mV/μM) は Fe(III)-EDTA の検出感度 (36 mV/μM) の約 1/500 であったことから、生体由来の FIC であるクエン酸の Fe 錯体は(1)および(2)の反応を起こしにくい、つまり還元電位やフェントン活性が低いと考えられる。同様にポストカラム溶液に EDTA を添加せずに Fe(III)-DMA、Fe(III)-NA を分析すると 100 μM であっても検出することができなかった (データは示さず)。これは Fe(III)-DMA の還元電位が小さいことや Fe(II)-NA のフェントン活性が低いことに起因すると考えられる。生体由来の FIC が生体内で果たす役割を考えると還元電位やフェントン活性は当然低いことが予想され、本来生体由来の FIC の分析にはルミノール/H₂O₂ の化学発光反応を利用した検出系は不適であるとも言えるが、本分析法では還元電位やフェントン活性の高い合成金属キレーターである EDTA を検出に利用することによって、生体由来の FIC の非常に高感度な検出を達成した。

また本分析法では、FIC を直接検出するのではなく FIC と結合した Fe(III)を検出することで間接的に FIC を検出している。そのため、原理的には Fe との結合様式によらず分子内に Fe を含む Fe 含有 (結合) 物質を広く検出することができる。なお、ここでは Fe と結合する性質を持つ化合物を Fe との結合様式を限定せず広く「Fe 結合物質」と表現する。Fe(III)とキレート錯体を形成する FIC も Fe 結合物質の中に含まれる。前述の通り従来法と比較して大幅な高感度化に成功したことから、少量の生体試料中に微量しか存在しない Fe 結合物質の検出が可能になった。さらに、本分析法の Superdex Peptide カラムを用いた分離系は

1. 低分子化合物からペプチド、タンパク質などの高分子化合物に至るまで幅広い分子量の生体化合物の分離に適用可能である。
2. 100%水系かつ弱酸性～弱アルカリ性 pH の移動相を利用可能であることから、生体内の環境により近い条件で分析を行うことが可能である。

3. カラム担体には高架橋アガロースおよびデキストランを使用しており陽イオンの吸着が比較的起きにくいいため、バッファー成分など塩を多く含む生体試料であっても分析が可能である。

などの特長を有することから、生体試料中の Fe 結合物質の分析を行う上で実用に耐える手法である。

最後に、第 3 章で開発した高感度な FIC 分析法を応用して今後のどのような展開が期待されるかについて述べる。高等植物における Fe 栄養生理には大きく分けて以下の①～④の段階がありそれぞれに Fe 結合物質が関与している。

- ① 根からの Fe の吸収
- ② 導管・篩管を通した Fe の輸送
- ③ 器官・組織間での Fe の再分配
- ④ 細胞内における Fe の分配・再分配

① 根からの Fe の吸収

Strategy-I 植物は根から FIC であるフェノール性の酸を、Strategy-II 植物は同じく FIC であるムギネ酸類を分泌し土壤中の不溶態 Fe を可溶化して吸収する。地球上の全陸地の 25%は作物の生産に適さないアルカリ土壌であり、今後予想される食糧難を解決するためにはアルカリ土壌を農業に活用する方法を探索する必要がある。本研究で開発した FIC 分析法を用いて高等植物の根浸出液に含まれる FIC の種類や分泌量について詳細な解析が進めば、上記の①の機構の解明が進むと期待される。ひいては、アルカリ土壌でも良好に生育するアルカリ土壌耐性植物の開発にもつながる。

② 導管・篩管を通した Fe の輸送

根から吸収された Fe は、導管や篩管を通して地上部の葉や子実へ輸送される。導管液は弱酸性、篩管液は弱アルカリ性のため、これらの溶液中で Fe は何らかの FIC と結合し溶解性を維持した状態で輸送されていると考えられる。本研究で開発した FIC 分析法を用いて高等植物の導管液および篩管液中の Fe の化学形態が明らかにされ上記②の機構の解明が進めば、可食部である子実や葉身中の Fe の含有量を制御し人類にとって好ましい高栄養価の作物の開発にも繋がる可能性がある。実際に、本研究の第 4 章では第 3 章で開発した FIC 分析法を用いて高等植物導管液中の FIC の分析を行い、オオムギ、およびアマランサス導管液中の $\text{Fe}_3\text{-Cit}_3$ を同定した。また、この $\text{Fe}_3\text{-Cit}_3$ 錯体は非

イネ科植物であるアマランサスやハウレンソウ導管液中の主要な Fe の化学形態であることを明らかにした。オオムギ導管液からは DMA を同定し、Fe 欠乏に応答して導管液中の Fe(III)-DMA 量が増加することを示した。また、この Fe 欠乏に応答した導管液中の Fe(III)-DMA の増加が Fe 欠乏耐性に寄与していることを示唆した。このように本研究では、実際に FIC 分析法を用いて導管・篩管を通した Fe の輸送機構の一部について明らかにすることができた。

③ 器官・組織間での Fe の再分配

これまで高等植物体内における Fe 恒常性維持は土壌からの Fe の吸収や導管・篩管を通じた各器官・組織への輸送の観点から主に議論されてきたが (Mori, 1999 など)、一度各器官・組織に輸送された Fe が Fe 栄養状態の変化に伴って他の器官・組織に再分配される機構も Fe 恒常性維持に大きく寄与していると考えられる。例えば、Fe 欠乏耐性を持つオオムギは Fe 欠乏下で古い葉 (下位葉) から若い葉 (上位葉) に Fe を積極的に再分配する仕組みを持つ (Maruyama *et al.*, 2005)。一度下位葉に分配された Fe が再分配される際には Fe の溶解性を上げるために何らかの Fe 結合物質 (Fe 再分配因子とする) が関わっていると予想されるが、未だその同定には至っていない。そこで、本研究で開発した FIC 分析法を用いて今後この Fe 再分配因子の同定や、Fe 欠乏耐性植物と Fe 欠乏感受性植物間の Fe 再分配因子の質的・量的な差異の解明を行うことができれば、前述の③の機構の解明が進み高等植物の持つ Fe 欠乏耐性機構の解明に繋がる可能性がある。

④ 細胞内における Fe の分配・再分配

Fe 栄養生理に関する高等植物の細胞レベルの現象として、Fe 欠乏耐性植物は Fe 欠乏に際して Fe を葉緑体のチラコイド膜に優先的に分配し光合成を維持する仕組みを持つ (Mikami *et al.*, 2011)。細胞内における Fe の分配や再分配を調整して局在様式を最適化する能力も Fe 欠乏耐性の獲得に寄与していることが推測され、この能力は細胞内における Fe 結合物質の質的・量的な調節機構の発達により獲得されるものと推測される。細胞内小器官に存在する Fe 結合物質の解析は、細胞レベルでの Fe 栄養生理の解明において非常に重要である。これまでも、Fe 貯蔵タンパク質遺伝子 (フェリチン遺伝子の FER) や Fe 錯体トランスポーター遺伝子 (Fe-NA トランスポーター遺伝子の YSL) の発現を確認することで細胞内小器官における Fe 結合物質を推測する試みは行われてき

たものの (Petit *et al.*, 2001 など)、Fe の実際の化学形態やその局在様式についてはほとんど解明されてこなかった。この理由として、細胞内小器官にごく微量にしか存在しない Fe の化学形態を定性的に分析する手段がなかったことが挙げられる。また細胞内での Fe の化学形態は、低分子 Fe 結合物質と結合した可溶性の錯体、Fe 貯蔵タンパク質との錯体、膜内の難溶性 Fe 含有タンパク質、など多岐にわたっており、Fe 結合能という共通の生理機能に基づいてそれらを網羅的に分析する手段がなかったことが挙げられる。

本分析法を応用することによって、Fe 結合能という実際の機能の面から前述の①～④の各段階に関与する様々な Fe 結合物質を定性的・網羅的に分析できることが期待され、これにより土壌からの Fe の吸収や高等植物体内での Fe の輸送の仕組みが更に詳細に明らかになると期待される。また、器官や組織の間での Fe の再分配や細胞内の Fe 分配機構といったこれまでほとんど明らかにされてこなかった機構の詳細が解明される可能性もある。これらの機構の解明が進めば、高等植物の Fe 栄養生理のより深い解明が進み、将来的には欠乏耐性の高い植物の開発や、ひいては不良土壌における農業の安定化に資することが期待される。本研究では新規の検出原理に基づいて高感度かつ FIC の機能、すなわち Fe(III)とのキレート能 (もしくは Fe 結合能) に応じた検出が可能な分析法を開発した。これにより、これまで一斉分析が難しかった試料中の Fe 結合物質の網羅的な分析が可能になった。これは植物栄養や植物生理の分野の今後の研究の進展にも繋がる大きな成果であると考えている。

参考文献

- Abdel-Shafi, A.A. (2001) Effect of β -cyclodextrin on the excited state proton transfer in 1-naphthole-2-sulfonate. *Spectrochim. Acta A*. **57**: 1819-1828.
- Alam, S., Kamei, S., Kawai, S. (2001) Metal micronutrients in xylem sap of iron-deficient barley as affected by plant-borne, microbial and synthetic metal chelators. *Soil Sci. Plant Nutr.* **47**: 149-156.
- Ariga, T., Hazama, K., Yanagisawa, S., Yoneyama, T. (2014) Chemical forms of iron in xylem sap from graminaceous and non-graminaceous plants. *Soil Sci. Plant Nutr.* **60**: 460-469
- Ariga, T., Ito, K., Imura, Y., Yoshimura, E. (2015) High-performance liquid chromatography method for ferric iron chelators using a post-column reaction with Calcein Blue. *J. Chromatogr. B* **985**: 48-53.
- Badoud, R., Pratz, G. (1986) Improved high-performance liquid chromatographic analysis of some carboxylic acids in food and beverages as their *p*-nitrobenzyl esters. *J. chromatogr. A* **360**: 119-136.
- Bashir, K., Inoue, H., Nagasaka, S., Takahashi, M., Nakanishi, H., Mori, S. et al. (2006) Cloning and characterization of deoxymugineic acid synthase genes from graminaceous plants. *J. Biol. Chem.* **43**: 32395-32402.
- Borman, C.J., Sullivan, B.P., Eggleston, C.M., Colberg, P.J.S. (2009) The use of flow-injection analysis with chemiluminescence detection of aqueous ferrous iron in water containing high concentration of organic compounds. *Sensors* **9**: 4390-4406.
- Brown, J.C., Tiffin, L.O. (1965) Iron stress as related to the iron and citrate occurring in stem exudates. *Plant Physiol.* **40**: 395-400.
- Brown, J.C. and Chaney, R.L. (1971) Effect of iron on the transport of citrate into the xylem of soybean and tomatoes. *Plant Physiol.* **47**: 836-840.
- Burguera, J.L., Townshend, A. (1981) Determination of manganese(II) by a chemiluminescence reaction. *Talanta* **28**: 731-735.
- Curie, C., Panaviene, Z., Loulergue, C., Dellaporta, S.L., Briat, J.F., Walker, E.L. (2001) Maize *yellow stripe 1* encode a membrane protein directly involved in Fe(III) uptake. *Nature* **409**: 346-349.
- Caccamo, F., Carfagnini, G., Corcia, A.D., Samperi, R. (1986) Improved high-performance liquid

- chromatographic assay for determining organic acids in wines. *J. Chromatogr. A* **362**: 47-53.
- Cooper, M.J., Anders, M.W. (1974) Determination of long chain fatty acids as 2-naphthacyl esters by high pressure liquid chromatography and mass spectrometry. *Anal. Chem.* **46**: 1849-1852.
- De Jong, J.T.M., den Das, J., Bathmann, U., Stoll, M.H.C., Kattner, G., Nolting, R.F., de Baar, H.J.W. (1998) Dissolved iron at subnanomolar levels in the Southern Ocean as determined by ship-board analysis. *Anal. Chim. Acta.* **377**: 113-124.
- Eide, D., Broderius, M., Fett, J., Guerinot, M.L. (1996) A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 5624-5628.
- Fushiya, S., Sato, Y., Nozoe, S., Nomoto, K., Takemoto, T., Takagi, S. (1980) Avenic acid, a new amino acid possessing an iron chelating activity. *Tetrahedron Lett.* **21**: 3071-3072.
- Gautier-Luneau, T., Merle, C., Phanon, D., Lebrun, C., Biaso, F., Serratrice, G., Pierre, J.L. (2005) New trends in the chemistry and solution species probed by electrospray mass spectrometry and kinetics of iron uptake from citrate by iron chelators. *Chem. Eur. J.* **11**: 2207-2219.
- Gomis, D.B., Gutiérrez, M.J.M., Alvarez, M.D.G., Alonso, J.J.M. (1988) Application of HPLC to characterization and control of individual acids in apple extracts and ciders. *Chromatographia* **25**: 1054-1058.
- Grushka, E., Durst, H.D., Kikta Jr. E.J. (1975) Liquid chromatographic nanogram quantities of carboxylic acids. *J. Chromatography. A* **112**: 673-678.
- Mayer, U., Gutmann, V. (1973) Phenomenological approach to cation-solvent interactions. *Structure and Bonding.* **12**: 113-140.
- Gutmann, V. (1978) The donor-acceptor approach to molecular interactions. *Plenum Press*, New York.
- Harris, D.C. and Aisen, P. (1973) Facilitation of Fe(II) autoxidation by Fe(III) complexing agents. *Biochim. Biophys. Acta* **329**: 156-158.
- Hoshino, M., Kamino, S., Takada, S., Ijyuin, M., Nakanishi, M., Naito, M., Asano, M., Yamaguchi, T., Fujita, Y. (2011) Determination of trace aluminum by fluorescence quenching with *m*-carboxyphenylfluorone as analytical reagent. *Anal. Sci.* **27**: 659-662.
- Howe, J.A., Choi, Y.H., Loeppert, R.H., Wei, L.C., Senseman, S.A. Juo, A.S.R. (1999) Column

- chromatography and verification of phytosiderophores by phenylisothiocyanate derivatization and UV detection. *J. Chromatogr. A* **841**: 155-164.
- Huitink, G.M., Poe, D.P., Diehl, H. (1974) On the properties of Calcein Blue. *Talanta* **21**: 1221-1229.
- Inoue, H., Higuchi, K., Takahashi, M., Nakanishi, H., Mori, S. and Nishizawa, N.K. (2003) Three rice nicotianamine synthase genes, OsNAS1, OsNAS2, and OsNAS3 are expressed in cells involved in long-distance transport of iron and differentially regulated by iron. *Plant J.* **36**: 366-381.
- Inoue, H., Takahashi, M., Kobayashi, T., Suzuki, M., Nakanishi, H., Mori, S. (2008) Identification and localisation of the rice nicotianamine aminotransferase gene OsNAAT1 expression suggests the site of phytosiderophore synthesis in rice. *Plant Mol. Biol.* **66**: 193–203.
- Inoue, H., Kobayashi, T., Nozoye, T., Takahashi, M., Kakei, Y., Suzuki, K. (2009) Rice OsYSL15 is an iron-regulated iron(III)–deoxymugineic acid transporter expressed in the roots and is essential for iron uptake in early growth of the seedlings. *J. Biol. Chem.* **284**: 3470–3479.
- Ishimaru, Y., Suzuki, M., Tsukamoto, T., Suzuki, K., Nakazono, M., Kobayashi, T., Wada, Y., Watanabe, S., Matsushashi, S., Takahashi, M., Nakanishi, H., Mori, S., Nishizawa, N.K. (2006) Rice plants take up iron as Fe³⁺-phytosiderophore and Fe²⁺. *Plant J.* **45**: 335-346.
- Ishimaru, Y., Kakei, Y., Shimo, H., Bashir, K., Sato, Y., Sato, Y., Uozumi, N., Nakanishi, H., Nishizawa, N.K. (2011) A rice phenolic efflux transporter is essential for solubilizing precipitated apoplasmic iron in the plant stele. *J. Biol. Chem.* **286**: 24649-24655.
- Ishimaru, Y., Takahashi, R., Bashir, K., Shimo, H., Senoura, T., Sugimoto, K., Ono, K., Yano, M., Ishikawa, S., Arai, T., Nakanishi, H., Nishizawa, N.K. (2012) Characterizing the role of rice NRAMP5 in manganese, iron and cadmium transport. *Sci. Rep.* **2**: 286.
- Iwashita, T., Naoki, H., Nomoto, K., Mino, Y. (1981) In Abstracts of the 20th NMR Symposium, Japan, 253-256.
- Jansen, E.H.J.M., Van Den Berg, R.H., Gergman, J.J. (1989) Effect of iron chelates on luminol chemiluminescence in the presence of xanthine oxidase. *Anal. Chim. Acta.* **227**: 57-63.
- Jin, C.W., You, G.Y., He, Y.F., Tang, C., Wu, P., Zheng, S.J. (2007) Iron deficiency-induced secretion of phenolics facilitates the reutilization of root apoplasmic iron in red clover. *Trends Plant Sci.* **14**: 280-285.
- Kakei, Y., Yamaguchi, I., Kobayashi, T., Takahashi, M., Nakanishi, H., Yamakawa T., Nishizawa

- N.K. (2009) A Highly Sensitive, Quick and Simple Quantification Method for Nicotianamine and 2'-Deoxymugineic Acid from Minimum Samples Using LC/ESI-TOF-MS Achieves Functional Analysis of These Components in Plants. *Plant Cell Physiol.* **50**: 1988-1993.
- Kamino, S., Yamaguchi, T., Mori, T., Miyamoto, M., Kusumi, Y., Fujita, Y. (2005) Spectrophotometric determination of aluminum with m-carboxyphenylfluorone, a novel chemical probe, and its application. *Anal. Sci.* **21**: 1549-1552.
- Kawabe, S., Fukumorita, T., Chino, M. (1980) Collection of rice phloem sap from stylets of homopterous insects severed by YAG laser. *Plant Cell Physiol.* **21**: 1319-1327.
- Kawai, S., Takagi, S., Sato, Y. (1988) Mugineic acid-family phytosiderophores in root-secretions of barley, corn and sorghum varieties. *J. Plant Nutr.* **11**: 6-11.
- Kim, K.M., Kim, Y.H., Oh, S.H., Lee, S.H. (2012) A chelate complex-enhanced luminol system for selective determination of Co(II), Fe(II), and Cr(III). *Luminescence* **19**: 372-377.
- Kobayashi, T., Nakanishi, H., Nishizawa, N.K. (2010) Recent insights into iron homeostasis and their application in graminaceous crops. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B* **86**: 900-913.
- Kobayashi, T., Itai, R.N., Nishizawa, N.K. (2014) Iron deficiency responses in rice roots. *Rice* **7**: 27
- Krüger, C., Berkowitz, O., Stephan, U.W., Hell, R. (2002) A Metal-binding Member of the Late Embryogenesis Abundant Protein Family Transports Iron in the Phloem of *Ricinus communis* L. *J. Biol. Chem.* **277**: 25062-25069.
- López-Millán, A.F., Morales, F., Abadía, A., Abadía, J. (2000) Effects of iron deficiency on the composition of the leaf apoplastic fluid and xylem sap in sugar beet. *Plant Physiol.* **124**: 873-884.
- Loyaux-Lawniczak, S., Douch, J., Behra, P. (1999) Optimisation of the analytical detection of EDTA by HPLC in natural waters. *Fresen. J. Anal. Chem.* **364**: 727-731.
- Ma J.F., Nomoto, K. (1996) Effective regulation of iron acquisition in graminaceous plants. The role of mugineic acids as phytosiderophores. *Physiol. Plantarum* **97**: 609-617.
- Marcé, R.M., Calull, M., Manchobas, R.M., Borrull, F., Rius, F.X. (1990) An optimized direct method for determination of carboxylic acids in beverages by HPLC. *Chromatographia* **29**: 54-58.
- Martell, A.E., Smith, R.M. (1977). *Critical stability constants*. vol. **1, 3**. Plenum Press,

New York.

- Mayer, U., Gutmann, V. (1970) The influence of anion-solvation on complex formation in donor solvents. *Mh. Chem.* **101**: 912-922.
- Mayer, U., Gutmann, V., Gerger, W. (1975) The acceptor number-A quantitative empirical parameter for the electrophilic properties of solvents. *Monatsh. Chem.* **106**: 1235-1257.
- Mentasti, E., Gennaro, M.C., Sarzanini, C., Baiocchi, C., Savigliano, M. (1985) Derivatization, identification and separation of carboxylic acids in wines and beverages by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **322**: 177-189.
- Merényi, G. and Lind, J.S. (1980) Role of peroxide intermediate in the chemiluminescence of luminol. A mechanistic study. *J. Am. Chem. Soc.* **102**: 5830-5835.
- Merényi, G., Lind, J.S., Eriksen, T.E. (1990) Luminol Chemiluminescence: Chemistry, Excitation, Emitter. *J. Biolum. Chemilum.* **5**: 53-56.
- Mikami, Y., Saito, A., Miwa, E., Higuchi, K. (2011) Allocation of Fe and ferric chelate reductase activities in mesophyll cells of barley and sorghum under Fe-deficient conditions. *Plant Physiol Bioch.* **49**: 513-519.
- Mori, S., Nishizawa, N., Kawai, S., Sato, Y., Takagi, S., (1987) Dynamic state of mugineic acid and analogous phytosiderophores in Fe-deficient barley. *J. Plant Nutr.* **10**: 1003-1011.
- Mori, S., Nishizawa, N.K., Hayashi, H., Chino, M., Yoshimura, E., Ishihara, J. (1991) Why are young rice plants highly susceptible to iron deficiency? *Plant and Soil* **130**: 143-156.
- Mori, S. Iron acquisition by plants. (1999) *Curr. Opin. Plant Bio.* **2**: 250-253.
- Murakami, T., Ise, K., Hayakawa, M., Kamei, S., Takagi, S. (1989) Stabilities of metal complexes of mugineic acids and their specific affinities for iron(III). *Chem. Lett.* **18**: 2137-2140.
- Murata, Y., Ma, J.F., Yamaji, N., Ueno, D., Nomoto, K. and Iwashita, T. (2006) A specific transporter for iron(III)-phytosiderophore in barley roots. *Plant J.* **46**: 563-572.
- Neumann, G., Haake, C., Römheld, V. (1999) Improved HPLC method for determination of phytosiderophores in root washings and tissue extracts. *J. Plant Nutr.* **22**: 1389-1402.
- Nikolic M and Römheld V. **1999**. Mechanism of Fe uptake by the leaf symplast: Is Fe inactivation in leaf a cause of Fe deficiency chlorosis? *Plant Soil* **215**: 229-237.
- Nishiyama, R., Kato, M., Nagata, S., Yanagisawa, S., Yoneyama, T. (2012) Identification of Zn-Nicotianamine and Fe-20 -Deoxymugineic Acid in the Phloem Sap from Rice Plants (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Physiol.* **53**: 381-390.

- Nogami, T., Hashimoto, M., Tsukagoshi, K. (2009) Metal ion analysis using microchip CE with chemiluminescence detection based on 1,10-phenanthroline-hydrogen peroxide reaction. *J. Sep. Sci.* **32**: 408-412.
- Noiré, M.H., Duréault, B. (1995) A ferrous ion optical sensor based on fluorescence quenching, *Sensor. Actuat. B-Chem.* **29**: 386-391.
- Nomoto, N., Yoshioka, H., Takemoto, T., Fushiya, S., Nozoe, S., Takagi, S. (1979) In Abstract of the 22nd Symposium on the Chemistry of Natural Products, Fukuoka, Japan, 619-626.
- Nomoto, K., Yoshioka, H., Arima, M., Fushiya, S., Takagi, S., Takemoto, T. (1981) Structure of 2'-deoxymugineic acid, a novel amino acid possessing an iron chelating activity. *Chimia* **35**: 249.
- Nour, V., Trandafir, I., Ionica, M.E. (2010) HPLC organic acid analysis in different citrus juices under reversed phase conditions. *Not. Bot. Horti Agrobot.* **38**: 44-48.
- Nozoe, T., Nagasaka, S., Kobayashi, T., Takahashi, M., Sato, Y., Sato, Y., Uozumi, N., Nakanishi, H., Nishizawa, N.K. (2011) Phytosiderophore efflux transporters are crucial for iron acquisition in graminaceous plants. *J. Biol. Chem.* **286**: 5446-5454.
- Obata, H., Karatani, H., Matsui, M., Nakayama, E. (1997) Fundamental studies for chemical speciation of iron in seawater with an improved analytical method. *Mar. Chem.* **56**: 97-106.
- Pascual, C., Romay, C. (1992) Effect of antioxidants on chemiluminescence produced by reactive oxygen species. *J. Biolum. Chemilum.* **7**: 123-132.
- Petit, J.M., Briat, J.F., Lobéaux, S. (2001) Structure and differential expression of the four members of the Arabidopsis thaliana ferritin gene family. *Biochem. J.* **359**: 575-582.
- Pich, A., Scholz, G., Stephan, U.W. (1994) Iron-dependent changes of heavy metals, nicotianamine, and citrate in different plant organs and in the xylem exudate of two tomato genotypes. Nicotianamine as possible copper translocator. *Plant and Soil* **165**: 189-196.
- Rellán-Álvarez, R., Giner-Martínez-Sierra, J., Ordura, J., Orera, I., Rodríguez-Castrillón, J.Á., García-Alonso, J.I., Abadía, J., Álvarez-Fernández, A. (2010) Identification of a tri-iron(III), tri-citrate complex in the xylem sap of iron-deficient tomato resupplied with iron: New insights into plant iron long-distance transport. *Plant Cell Physiol.* **51**: 91-102.
- Robinson, N.J., Procter, C.M., Connolly, E.L., Guerinat, M.L. (1999) A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils: *Nature* **397**: 694-697.
- Rodríguez-Cáceres, M.I., Agbaria, R.A., Warner, I.M. (2005) Fluorescence of Metal-Ligand

- Complexes of Monoand Di-Substituted Naphthalene Derivatives. *J. Fluoresc.* **15**: 185-190.
- Römheld, V., Marschner, H. (1983) Mechanism of Iron Uptake by Peanut Plants. I. Fe^{III} reduction, chelate splitting, and release of phenolics. *Plant Physiol.* **71**: 949-954.
- Sayour, H.E.M., Razeq, H.M.A., Fadel, K.F. (2011) Flow Injection Spectrofluorimetric Determination of Iron in Industrial Effluents based on Fluorescence Quenching of 1-Naphthol-2- Sulfonate. *J. Fluoresc.* **21**: 1385-1391
- Schmidke, I., Stephan, U.W. (1995) Transport of metal micronutrients in the phloem of castor bean (*Ricinus communis*) seedlings. *Physiol. Plantarum.* **95**: 147-153.
- Schuler, M., Rellán-Álvarez, R., Fink-Straube, C., Abadía, J., Bauer, P. (2012) Nicotianamine functions in the phloem-based transport of iron to sink organs, in pollen development and pollen tube growth in arabidopsis. *Plant Cell.* **24**: 2380-2400.
- Scholz, G., Becker, R., Pich, A., Stephan, U.W. (1992) Nicotianamine – a common constituent of strategies I and II of iron acquisition in plants. *J. Plant Nutr.* **15**: 1649-1665.
- Silva, A.M.N., Kong, X., Parkin, M.C., Cammack, R., Hider, R.C. (2009) Iron(III) citrate speciation in aqueous solution. *Dalton Trans.* **28**: 8616-8625.
- Smith, R.M., Martell, A.E. (1989) Critical stability constants, Vols 1-6. Plenum Press, New York.
- Sorrenti, G., Toselli, M., Marangoni, B. (2011) Effectiveness of *Amaranthus retroflexus* L. aqueous extract in preventing iron chlorosis of pear trees (*Pyrus communis* L.). *Soil Sci. Plant Nutr.* **57**: 813-822.
- Stephan, U.W. Scholz, G. (1993) Nicotianamine: mediator of transport of iron and heavy metals in the phloem? *Physiol. Plantarum.* **88**: 522-529.
- Sugiura, Y., Nomoto, K. (1984) Phytosiderophores: structures and properties of mugineic acids and their metal complexes. *Struct. Bonding* **58**: 107-135.
- Szentmihályi, K., Blázovics, A., Vinkler, P. (2003) Free radical properties of metal complexes. *Acta Biol. Szeg.* **47**: 107-109.
- Takagi, S. (1976) Naturally occurring iron-chelating compounds in oat- and rice-root washing. I. Activity measurement and preliminary characterization. *Soil Sci. Plant Nutr.* **22**: 423-433.
- Takahashi, R., Ishimaru, Y., Senoura, T., Shimo, H., Ishikawa, S., Arao, T., Nakanishi, H., Nishizawa, N.K. (2011) The OsNRAMP1 iron transporter is involved in Cd accumulation in rice. *J. Exp. Bot.* **62**: 4843-4850.

- Takemoto, T., Nomoto, K., Fushiya, S., Ouchi, R., Kusano, G., Hikino, H., Takagi, S., Matuura, Y., Kakudo, M. (1978) Structure of mugineic acid, a new amino acid possessing an iron-chelating activity from roots washing of water-cultured *Hordeum vulgare* L. *Proc. Jpn. Acad.* **54**: 469-473.
- Tiffin, L.O. (1966a) Iron translocation: I. Plant culture, exudate sampling, iron—citrate analysis. *Plant Physio.* **41**: 510-514.
- Tiffin, L.O. (1966b) Iron translocation: II. Citrate/ iron ratios in plant stem exudates. *Plant Physio.* **41**: 515-518.
- Tomatsu, H., Takano, J., Takahashi, H., Watanabe-Takahashi, A., Shibagaki, N., Fujiwara, T. (2007) An *Arabidopsis thaliana* high-affinity molybdate transporter required for efficient uptake of molybdate from soil. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **20**: 18807-18812.
- Tsednee, M., Mak, Y.W., Chen, Y.R., Yeh, K.C. (2012) A sensitive LC-ESI-Q-TOF-MS method reveals novel phytosiderophores and phytosiderophore-iron complexes in barley. *New Phytol.* **195**: 951-961.
- Ueno, D., Rombolà, A.D., Iwashita, T., Nomoto, K., Ma, J.F. (2007) Identification of two novel phytosiderophores secreted by perennial grasses. *New Phytol.* **174**: 304-310.
- Ueno, D., Yamaji, N. and Ma, J.F. (2009) Further characterization of ferric-phytosiderophore transporters ZmYS1 and HvYS1 in maize and barley. *J. Exp. Bot.* **60**: 3513–3520.
- Von Wirén, N., Klair, S., Bansal, S., Briat, J.F., Khodr, H., Shioiri, T., Leigh, R.A., Hider, R.C. (1999) Nicotianamine Chelates Both Fe^{III} and Fe^{II}. Implications for Metal Transport in Plants. *Plant Physiol.* **119**: 1107-1114.
- Vargas, L.V., Sand, J., Brandão, T.A.S., Fiedler, H.D., Quina, F.H., Nome, F. (2005) Determination of environmentally important metal ions by fluorescence quenching in anionic micellar solution. *The Analyst* **130**: 242-246.
- Waters, B.M., Blevins, D.G., Eide, D.J. (2002) Characterization of FRO1, a pea ferric-chelate reductase involved in root iron acquisition. *Plant Physiol* **129**: 85-94.
- Wheal, M.S., Heller, L.I., Norvell, W.A., Welch, R.M. (2002) Reversed-phase liquid chromatographic determination of phytometallophores from Strategy II Fe-uptake species by 9-fluorenylmethyl chloroformate fluorescence. *J. Chromatogr. A* **942**: 177-183.
- White, E.H., Zafiriou, O., Kagi, H.H., Hill, J.H. (1964) Chemiluminescence of luminol: The chemical reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **86**: 940-941.

- White, E.H., Bursley, M.M. (1964) Chemiluminescence of luminol and related hydrazides: The light emission step. *J. Am. Chem. Soc.* **86**: 941-942.
- Wilkins, D.H. (1960) Calcein blue-a new metalfluorechromic indicator for chelatometric titrations. *Talanta* **4**: 182-184.
- Yang, L., Liu, L., Olsen, B.A., Nussbaum, M.A. (2000) The determination of oxalic acid, oxamic acid, and oxamide in a drug substance by ion-exclusion chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **22**: 487-493.
- Yoshida, H., Ozawa, T., Jitsukawa, K., Einaga, H. (1993) Kinetics and mechanism of complex formation reaction of iron(III) with 4-methyl-8-(carboxymethyl) aminomethyl umbelliferrone and related ligands: role of substituent groups on nitrogen donor atoms on the reaction, *Polyhedron* **12**: 1319-1328.
- Yoshino, M., Murakami, K. (1998) Interaction of iron with polyphenolic compounds: Application to antioxidant characterization. *Anal. Biochem.* **257**: 40-44.
- Zhang, B., Tolstikov, V., Turnbull, C., Hicks, L.M., Fiehn, O. (2010) Divergent metabolome and proteome suggest functional independence of dual phloem transport systems in cucurbits. *PNAS* **27**: 13532-13537.
- 渡辺邦洋、石井泰親、板垣昌幸 (2006) 1,10-フェナントロリンによる化学発光を利用する鉄(III)のオンライン濃縮サイクリックフローインジェクション分析、*BUNSEKI KAGAKU* **55**: 291-298.
- 日本化学会編 (2004) 化学便覧基礎編改訂 5 版、丸善出版、東京、日本

謝辞

本研究を行うにあたり、多くの方々にお力添えいただきました。この場を借りて、心より厚く御礼申し上げます。

吉村悦郎教授には、研究の全般に渡り大変きめ細やかにご指導いただきました。本研究を進める上での指針を示して下さい、真摯に研究に向き合うことの大切さや研究者としてのあるべき姿など研究理念を教えてくださいました。「論理と実践のバランスが大事だ。どちらに偏りすぎても良くないから、いつもそのバランスを考えながら研究をなさい。」と先生には何度か言葉をかけていただきました。実験結果の論理的な背景を考えることの重要性や、論理から先に組み立て結果の予想をした上で実験を行うという基本的な研究姿勢の大切さを学ぶことができました。また、研究室の各人が自主的に考え研究できるような研究室の雰囲気作りにご配慮くださったことにも感謝申し上げます。自分の考えたようにある程度自由に研究を行うことができた環境は、私にとっては大変居心地が良く、モチベーションを高く保つことができました。

鈴木道生講師には、研究の進め方についていつもの確なご指摘をいただき、また ESI-TOF-MS など分析機器の使用方法についても大変きめ細やかな指導をしていただきました。鈴木先生には物事の良い面と悪い面を平等に見通すことの大切さを教えてくださいました。実験結果一つにしても予想通りの結果が出たから良い、予想通りの結果が出なかったから悪いという画一的な見方をするのではなく、予想通りでない結果について十分考察することでそこから全く新しい知見が得られるということを教えてくださいました。科学に対して常に謙虚で誠実な姿勢であることの大切さや、研究においては正にピンチこそチャンスであるということを教えてくださいました。

井村祐己助教には、研究の内容や具体的な実験方法についてご指導いただきました。特に Origin8.1 の操作については時間を割いて大変丁寧にご指導いただきました。また、常日頃から研究室のメンバーが研究生活をスムーズに送ることができるよう様々にお気遣いいただきました。

森敏東京大学名誉教授には、貴重な合成ニコチアナミンをご供与いただきました。

中西啓仁特任准教授には、オオムギ（愛媛裸1号）の種子をご供与いただきました。

分析化学研究室の皆様には研究生活から日常生活に至るまで、あらゆる場面でお力添えいただきました。心より御礼申し上げます。

黒木成子氏には、日頃から体調を気遣っていただき、研究を進める上で精神的な支えになって下さいました。研究室でお見掛けする度に豊富な話題で和ませて下さり、黒木さんにお目に掛かるのが私の日々の楽しみでもありました。また、秘書として研究室の会計業務を一手に引き受けて下さいました。

鈴木（伊藤）恭子氏は、カルセイブルーを用いた FIC 分析法の開発における前任者であり様々なお力添えをいただきました。また、博士論文の執筆にあたっては体調などについてもお気遣いいただきました。

同じ博士課程の吉村航氏、陳嘉上氏、ジセル・リム・グレース・フェルナンド氏とは、4年間苦楽を共にしてきました。

吉村航氏には、研究を進める上でいつも様々な意見やアドバイスをいただき、とても良い刺激を受けました。研究とは、研究者とはどうあるべきか、といった内容について様々な議論を交わしたことは、学生時代のかけがえのない思い出になりました。ゼミで私が研究発表をする度に、良い面、悪い面両方からの率直な意見を言って下さり、そのお陰で研究内容を常に研磨することができました。また、研究室の雰囲気作りや研究環境の整備にも大変力を尽くして下さい、研究室のメンバーが毎日良い環境で研究ができるよう様々な心を砕いて下さいました。

陳嘉上氏には、私が分析化学研究室に博士課程一年生として配属された当初、HPLC の使用方法について大変丁寧にご指導いただきました。また、研究室生活を送る中で様々な困難に直面することもありましたが、陳さんの屈託のない伸びやかな人柄に接する度に救われ、元気をいただいていた。

ジセル・リム・グレース・フェルナンド氏には、いつも明るい笑顔で接していただき、研究室のムードメーカーとして精神的な支えになって下さいました。ジセルさんは常に前向きで決して諦めない心の強さをお持ちの方で、私自身もそうありたいと思ってきました。その気持ちがあったからこそなんとか最後までめげずに頑張れたよう

に思います。

両親には経済的にも精神的にも、あらゆる面で援助いただきました。両親の援助がなければ、この論文を書き上げることはできませんでした。この場を借りて改めて御礼申し上げます。ありがとうございました。

平成 27 年 12 月

有賀 智子