

氏 名	チン 陳	シ 曦
学位(専攻分野)	博 士	(学 術)
学 位 記 番 号	博 甲 第 111 号	
学位授与の日付	平成 8 年 3 月 25 日	
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当	
研 究 科・専 攻	工学科学研究科機能科学専攻	
学 位 論 文 題 目	Studies on the Analytical Application of the Electrochemiluminescence for High-Performance Liquid Chromatography and Flow Injection Analysis	
審 査 委 員	(主査) 教 授 牧 野 圭 祐	
	教 授 田 中 信 男	教 授 村 上 章 助教授 山 田 武

論 文 内 容 の 要 旨

申請者の論文は、分離分析化学の重要な方法である高速液体クロマトグラフィーならびにフローインジェクション分析に用いる新しい高感度検出法の開発に関するものであり、電解化学発光法(Electrochemiluminescence : ECL)の利用をハード及びソフト両面から研究した結果が記載されている。以下、論文内容を章別に概説する。

序論においては、研究目的、内容の概略、既存の方法の問題点を説明している。また既存の方法を改良する手法についても説明を行った。

第 1 章では、本論の説明に必要な概念、ECL の定義、発光機構の概要、フロー系 ECL 検出器の一般的概要、その具備すべき性能などについて要点を述べた。

第 2 章には、用いた試薬の調製及び精製法、ECL を用いるフロー系システムの概要を示した。

第 3 章は、高感度を得るための分析システム設計に関する研究成果がまとめられており、ECL フローセル作製を中心とした結果が示されている。ここでは、まず理論的に予想される高感度化のためのセルに関する要因について吟味を行い、オリフィス形状の改良を行う必要性を示した。この基本概念にのっとり、薄層セルに装着する膜状テフロンスペーサーの開口形状と厚みが感度を支配することを実験的に実証し、50 μm の厚みを持ったオリフィスを具備した高感度 ECL セルの開発に成功した。本研究で開発した ECL セルを用い、ルミノールを発光試薬として用いて全システムの感度を測定し、従来化学発光用に用いられてきたセルを用いた場合よりも 100 倍の感度を得られることを実験的に証明した。またこのシステムを他のルミノール誘導体にも適用し、一般性についても議論している。

第 4 章には、生化学研究において重要な位置を占めているアミノ酸分析への電解化学発光検出法の応用が記載されている。ここでは、一級アミノ酸の発光感度の向上をはかるために、ジビニルスルホンとの反応による新しい誘導体化を行ったが、誘導体化を効率よく行うための詳細な反応条件を決定した。誘導体化の最適条件は以下の通りである：pH 8.5 ホウ酸緩衝液、0.01 M ジビニルスルホンの使用、50 $^{\circ}\text{C}$ で 15 分間加熱。この後、 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 錯体を用いた誘導体の電解化学発光を行い、アミノ酸分析の高感度化へ応用した。論文では、ジビニルスルホン誘導体の諸条件、キャリアー溶液の組成等を含む逆相高速液体クロマトグラフィー分離条件、検出部印加電圧等の電解化学発光条件の詳細な決定が報告されており、これを基礎にして実用化に向けたシステムを開発した。この結果、誘導体化の簡単な本方法を用い、ルミノール類標識による方法と同等の高感度でアミノ酸分析を達成することに成功した。また個々のアミノ酸

について検出限界を測定し、例えばアラニンについては、20 fmol、セリンでは0.5 pmol という良好な値を得た。

第5章も応用例であり、生命現象と密接な関係を持ったアスコルビン酸の高感度検出法の確立を行っている。この化合物の検出には従来より改良が求められてきたが、本研究では、高速液体クロマトグラフィー分離条件を決定し、電解化学発光に適した印加電圧等の電解化学的条件の決定を行い、実用性に富む高感度測定法を確立することに成功した。ここでは、流速 0.3 mL/min の 0.5 mM Ru(bpy)₃²⁺・0.2 M HAc-NaAc (pH 7.8) キャリヤー及び移動相としての 15 mM NaH₂PO₄-K₂HPO₄ (pH 6.5) 溶液を用い、印加電圧は +1.5 V を採用した。アミノ酸分析の場合と同様に、Ru(bpy)₃²⁺ 錯体を用いた検出法の検出限界を求め、2 pmol の検出限界を決定した。またこの方法を用いて、前処理をせず、系中に含まれる他の化合物の妨害無しに、市販の清涼飲料水ならびにリンゴジュース中のアスコルビン酸が検出できることを示し、実際に測定した値が商品に表記されている値を再現することを示した。なお、保持時間がアスコルビン酸と接近しているクエン酸との分離の向上は、移動相に 1.0×10⁻⁴ M テトラフルオロホウ酸テトラ-n-ブチルアンモニウムを添加することで解決した。

第6章では、高速液体クロマトグラフィーで溶離液として多用されているメタノールが強いバックグラウンドシグナルを与え、本システムでは使用できないことに着目し、pH 10 以上で Ru(bpy)₃²⁺ がメタノールと電解化学的に効率よく反応し、化学発光を行うことを明らかにし、その反応メカニズムを推測した。ここではアルコキシラジカルが反応の中間体として重要であることを示した。この結果を他のアルコール類にも適用し、一級アルコールでは炭素鎖長増加とともに発光強度が減少し、多価アルコールでは OH 基の増加とともに発光強度が増大することなどを明らかにし、アルコール類の高感度検出にも Ru(bpy)₃²⁺ を用いた電解化学発光検出法が有効であることを明らかにした。

第7章は、以上の結果のまとめである。

論文審査の結果の要旨

本学大学院工学科学研究科機能科学専攻3回生陳曦氏は、「Studies on the Analytical Application of the Electrochemiluminescence for High-Performance Liquid Chromatography and Flow Injection Analysis」という課題で学位申請論文を提出しており、この学位申請論文について慎重かつ詳細な審査を行った。論文は英文で書かれており、詳細かつ論理的にまとめられており、高い評価を与える。

本論文に記載された内容は、電解化学発光法を用いた高感度高速液体クロマトグラフィー分離分析法ならびにフローインジェクション法の新しい開発に関する重要な知見を多く含むものである。本研究では、Ru(bpy)₃²⁺ 錯体を電解化学発光試薬として用いたが、オンラインでの高感度検出を行うために、まず電解化学発光セルの設計を行い、従来のセルに比べて100倍の高感度検出を得た。開発した検出部を具備した分析システムを用いて、誘導体化の簡単なアミノ酸分離分析法、清涼飲料水中のアスコルビン酸の定量法、アルコール類の検出法などを開発したが、ここでは、それぞれの系で重要な個々の反応について、反応条件決定ならびに反応機構解明を行い、分離法についてはキャリヤーならびに移動相組成等を詳細に決定して実用化を図った。以上のような詳細な研究の結果、それぞれの系で高感度定量が得られたが、これに加えて、開発したシステムでは旧来の方法の持つ欠点も克服されており、高い独創性を持った研究が行われたと評価する。

以上、本論文では、Ru(bpy)₃²⁺ 錯体を発光試薬とした電解化学発光法を利用した新しい高速液体クロマトグラフィー法ならびにフローインジェクション法の開発について、得られた結果が詳細かつ論理的に記述されており、申請者の持つ分析化学の広い知識が有効に発揮されている。記載内容は2編の国際的学術雑誌に報告されたものが中心であり、本審査委員会は、陳曦氏の論文が本学の博士号（学位）を授与するに十分値するものと結論する。