報 文

キレート試薬含有リポソームを用いる水中の銅(II)の選択的捕集

樋口 和義*, 齋藤 徹[®]*, 平出 正孝*

Selective uptake of copper(II) ions in water by chelating agent-impregnated liposomes

Kazuyoshi HIGUCHI, Tohru SAITOH and Masataka HIRAIDE*

*Department of Molecular Design and Engineering, Graduate School of Engineering, Nagoya University, Chikusa-ku, Nagoya 464-8603

(Received 30 April 2002, Accepted 4 July 2002)

Unilamellar vesicles (*i.e.*, liposomes) having 0.4 μm diameters were prepared by an extrusion technique. The liposomes were composed of phosphatidylcholine, phosphatidylglycerol, cholesterol, and chelating agents. When liposomes containing 8-hydroxyquinoline (HQ) were added to a water sample, copper(II) ions were collected with a recovery of $76 \pm 3\%$. The recovery, however, was decreased to 44 or 30% when the sample contained 1 or 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of humic acid, respectively. This was probably due to the exclusion of the copper-humic complex from the surface of liposome. A selective uptake of free copper(II) ion was not achieved by other chelating agents (*e.g.*, 1,10-phenanthroline and *N*-benzoyl-*N*-phenylhydroxylamine). The inclusion of (*N*-ditiocarboxy)sarcosine in the inner water pool of the liposome significantly enhanced the copper uptake, while maintaining the selectivity.

Keywords : copper(II); selective uptake; humic acid; liposome; 8-hydroxyquinoline.

1 緒 言

環境水中の微量物質は共存物質等によって異なる存在形態をとっており、存在形態の違いによって地球化学的挙動はもとより、生物や生態系への影響も大きく異なることが明らかにされてきている。例えば、天然水中には動植物由来の腐植物質であるフミン酸やフルボ酸が主要な有機物質として存在しており、銅(II)などの金属元素はこれらと結びつくことによって、水生生物への毒性が軽減することが報告されている^{1)~4)}。したがって、微量金属元素の環境への影響を評価するためには、その総量を計測するだけではなく、水生生物への取り込みを反映した形態別分析が必要と考えられる。

このような観点から、著者らは環境水中の微量金属元素

の存在状態別分離を系統的に研究してきた。すなわち、巨大網目構造の *O*-ジエチルアミノエチルセルロース (DEAE)-Sephadex A-25 陰イオン交換体や、インジウム処理 Amberlite XAD-2 樹脂を用いる、フミン錯体の選択的分離法を開発し、一般的な河川水中の銅(II)については、溶存化学種の 60~70% がフミン錯体であることを見いだした^{5)~8)}。また、キレート試薬を含有する w/o (water in oil) エマルションを調製し、遊離の銅(II)イオンと銅-フミン錯体を分別定量する方法も提案した⁹⁾。

このような媒体を用いる分離法を更に進展させ、水生生物の物質取り込みに関する選択性をより反映する、分離媒体の開発が環境評価の観点から強く望まれる¹⁰⁾。本研究では、生物の細胞膜のモデルとして用いられるリン脂質二分子膜にキレート試薬を含有させ、これをフミン酸共存下における銅(II)の形態別捕集に適用した (Fig. 1)。更に、幾つかのキレート試薬や通常の液液抽出系との比較を行

* 名古屋大学大学院工学研究科: 464-8603 愛知県名古屋千種区不老町

Fig. 1 Schematic diagram of liposome system for the collection of copper(II) ions

い、形態別捕集の選択性に関する要因について考察した。

2 実験

2.1 試薬

リポソーム調製剤：リン脂質としてホスファチジルコリン（卵白製，PC）及びDL- α -ホスファチジルグリセロールジミリスチル（PG）を，膜安定化剤としてコレステロール（Chol）（いずれも和光純薬製）を用いた。

キレート試薬：8-ヒドロキシキノリン（オキシシン，HQ），1,10-フェナントロリン（phen），5-ニトロ-1,10-フェナントロリン（Nphen），5,6-ジフェニル-3-(2-ピリジル)-1,2,4-トリアジン（PDT），*N*-ベンゾイル-*N*-フェニルヒドロキシルアミン（BPA）を用いた。なお，HQはエタノール中でナラカイトスク製を3回再結晶したものを用い，その他のキレート試薬は和光純薬製又は同仁化学研究所製をそのまま用いた。

蛍光試薬：3,6-ビス（ジメチルアミノ）-10-ドデシルアクリジニウムブロミド（AO-10，同仁化学研究所製）を用いた。

フミン酸溶液（100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）：フミン酸（Aldrich製）を0.1 mol/l 水酸化ナトリウム水溶液に溶解後，0.4 μm ポリカーボネートフィルターで濾過し，冷蔵保存した。

2.2 キレート試薬含有リポソーム溶液の調製

リポソームの調製はMacDonaldら¹¹⁾の方法に準拠し，調製の際にキレート試薬を加えた。PC 100 mg，PG 22.5 mg，Chol 16 mg 及びキレート試薬 0～12 mg を 100 ml ナス型フラスコに入れ，クロロホルム 20 ml を加えて溶解した。ロータリーエバポレーターで溶媒を揮発させてフラスコ壁に薄膜を形成させた後，1 mmol/l *N*-2-ヒドロキシエチルピペラジン-*N'*-2-エタンスルホン酸（HEPES）緩衝溶液 1 ml を加え，超音波を照射して多層膜ベシクルを形

成させた。この溶液をリポソーム作製器（0.4 μm ポリカーボネートフィルター装着，Avestin製）に通し，単層膜ベシクル（キレート試薬含有リポソーム）溶液を得た。

2.3 キレート試薬含有リポソームを用いる銅(II)の捕集

銅(II) 及び 0～5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のフミン酸を含む試料溶液 50 μl に，キレート試薬含有リポソーム溶液 200 μl を加え 5 分間振り混ぜた。この溶液を 1.5 ml 遠心濾過チューブ（Ultrafree-MC，孔径 0.1 μm ，Millipore 製）に入れて 2000 *g* で 15 分間遠心し，リポソームを分離した。濾液 20 μl をパーキンエルマー製 AAnalyst 600 型黒鉛炉原子吸光分析装置に導入して銅の定量を行い，リポソームによる銅の捕集率を算出した。

3 結果と考察

3.1 リポソームの調製と分離

キレート試薬を含有したリポソームは，少なくとも 48 時間は水溶液中で安定に分散した。リポソームはイオン交換体や疎水性担体を用いることによって溶液から分離することができるが，これらの担体にはフミン酸も吸着する¹²⁾¹³⁾。そこで，調製したリポソームが 0.4 μm の単層膜ベシクルであることに着目して，これを 0.1 μm の濾過膜を装着した遠心濾過チューブを用いて分離した。その結果，2000 *g* において透明な濾液が得られた。蛍光試薬 AO-10 が疎水環境において蛍光強度が著しく増大する現象¹⁴⁾を用いて，濾液中に漏出したリポソームの割合を推定した。その結果，濾液中では純水中における強度とほとんど同じであり，蛍光強度から推定される濾液中のリポソーム濃度は初濃度の 2% 以下であった。

3.2 HQ 含有リポソームを用いる銅(II)の捕集

銅(II) 捕集率に及ぼす HQ 含有リポソーム溶液添加量の影響を Fig. 3 に示す。リポソーム溶液添加量の増加とともに銅(II) の捕集率は増大し，HQ 含有リポソームの銅(II) 捕集媒体としての可能性が見いだされた。しかし，200 μl を超えるリポソーム溶液を添加すると，溶液の粘度が著しく高くなり，リポソームの分離が困難になった。

次に，銅(II) 捕集に及ぼす HQ 含有量の影響を Fig. 2 に示す。銅(II) の捕集率は HQ 量の増加とともに増大し，リポソーム溶液の HQ 含有量 12 mg/ml において捕集率は約 80% と最大になった。したがって，リポソームへの銅(II) の捕集は，リポソーム膜中の HQ との錯形成反応によるものと説明できる。しかし，HQ の含有量を更に多くしようとすると，沈殿を生じてしまい，リポソームの調製ができなかった。なお，HQ を含有しないリポソームを用いたときでも，20% を超える銅(II) が捕集された。Kamidate ら¹⁵⁾は，イオノホアを含まないリポソームに銅

Fig. 2 Copper(II) uptake at pH 7.4 as a function of the volume of liposome (concentration of HQ: 12 mg/ml)

Fig. 4 Effect of solution pH on copper(II) uptake with 200 μl of liposome solution (concentration of HQ: 12 mg/ml)

Fig. 3 Effect of HQ amount on copper(II) uptake at pH 7.4 with 200 μl of liposome solution

(II) をはじめとする, 幾つかの遷移金属イオンが捕そくされることを見だし, リポソームを構成しているジアルキルリン酸分子中の, リン酸基との錯形成反応によるものと説明している. HQ が存在しないときの銅(II)の捕集は, リポソーム中のリン酸部分が関与していると考えられる.

リポソームへの銅(II)の捕集は, HQ との錯形成反応によるものであることから, pH に依存すると考えられる.

実際, 銅(II)の捕集に及ぼす pH の影響を調べたところ, pH の増加とともに捕集率は増大し, pH 7~8 の範囲ではほぼ一定かつ最大 ($76 \pm 3\%$) となった (Fig. 4). この pH 範囲は環境水を対象とした捕集媒体として好都合と言える.

3.3 HQ 含有リポソームを用いる銅(II)の形態別捕集

銅-フミン錯体は分子量の大きなフミン酸に銅が結合したものであり, フミン酸とはほぼ同様の性質を持つと考えられる. そこで, リポソームを添加したフミン酸溶液を遠心濾過し, 濾液中のフミン酸を 500 nm における吸光度によって定量したところ, 吸光度の減少は測定のはらつきの範囲内 (2% 以下) であり, フミン酸のリポソームへの吸着は無視できることが分かった. リポソームの分散安定化のために添加された PG の負電荷が, 陰イオン性のフミン酸の非特異的吸着を妨げたものと考えられる.

遊離の銅(II)イオンの捕集率が $76 \pm 3\%$ であったのに対し, フミン酸が 1 又は 5 $\mu\text{g/ml}$ 共存すると, HQ 含有リポソームに捕そくされる銅(II)の割合は 44 及び 30% と大幅に減少した. これは銅(II)の一部がフミン錯体となり, この錯体が生体膜に捕集されにくいと考えられる. なお, DEAE-Sephadex A-25 陰イオン交換体⁹⁾を用いて分離定量したところ, 1 及び 5 $\mu\text{g/ml}$ のフミン酸共存下において, 遊離銅の割合は 66 及び 51% であった. 数値の一致が見られなかったのは, リポソームへの遊離銅の捕そくが完全でないためと考えられる.

これに対して, HQ を含有するトルエン相を用いて通常

Fig. 5 Copper(II) uptake with liposomes containing different chelating agents at pH 7.4 in the absence (■) or presence (▨) of humic acid (5 µg/ml)

の液液抽出操作を行ったところ、フミン酸の存在にかかわらず銅は98%以上抽出された。フミン酸の存在による抽出への影響は、HQを含有したo/wエマルジョンを用いたときにも見られた⁹⁾ことから、界面に界面活性分子が配列した場が銅の形態識別能に関与しているものと考えられる。

3.4 他のキレート試薬を含有するリポソームを用いる捕集

銅(II)イオンの捕集や形態別捕集に関するキレート試薬の種類の影響を明らかにするために、異なるキレート試薬を含むリポソームを用いて銅の捕集を行った(Fig. 5)。比較のために、HQ含有リポソームを用いたときの結果も示す。銅と安定な錯体を形成するphen, Nphen及びPDTを含有したリポソームを用いると、遊離の銅(II)の捕集率はHQ含有リポソームを用いたときと比べて大幅に増大した。これは、これらのキレート試薬が銅(II)とより安定な錯体を形成するためと考えられる。しかし、フミン酸共存下においてもほぼ同じ捕集率が得られたことから、これらのキレート試薬はフミン錯体となっている銅とも反応しているものと考えられる。なお、ヒドロキサム酸基を有するBPAを用いたときには、フミン酸の存在の有無にかかわらず十分な捕集率が得られなかった。このことは、銅(II)の形態別捕集の要因が、キレート試薬との安定度定数の大きさによるものではないことを示唆している。

したがって、各種キレート試薬の中で、HQが形態別捕集のために最もよいことが明らかになった。HQは遊離のアルミニウム(III)イオンと速やかに反応するのに対して、

水酸化コロイド状アルミニウムとは反応しないことから、その反応性の差が水中アルミニウムの形態別分析に応用されている¹⁶⁾。したがって、HQには形態別の反応性に有利な性質を持っているとも考えられる。

3.5 逆抽出剤を用いた内水相へ濃縮

次に、銅(II)イオンの捕集率を向上させるために、リポソーム内水相への逆抽出を図ることによって、銅(II)イオンをより積極的に取り込むことを試みた。リポソーム内水相への金属イオンの逆抽出については、リポソーム中のイオノホア(A23187)に捕そくされた金属イオンを、内水相中のエチレンジアミン四酢酸(EDTA)誘導体を用いて行った例が報告されている¹⁷⁾。しかし、本研究ではHQによって捕そくされた銅(II)は、EDTAによっては逆抽出されなかった。これは、HQとの錯体がA23187との錯体よりも安定なためと考えられる。

そこで銅(II)と安定な錯体を形成し、かつリポソーム内水相に保持されるキレート試薬を探索した。その結果、硫黄を配位原子として持つ水溶性キレート試薬N-(ジチオカルボキシ)サルコシン(DTCS, 同仁化学研究所製)¹⁸⁾が、HQと錯形成した銅(II)を水相に逆抽出できることを見いだした。内水相にDTCSを含むリポソームは、多層膜ベシクル調製時に、0.1 mol/l DTCSを含む1 mmol/l HEPES緩衝溶液1 mlを加え、ポリカーボネートフィルター(0.4 µm)を通過させて調製した。更にこの溶液をSephadex G-25カラムに通してゲルクロマトグラフィーを行い、DTCS内包HQ含有リポソームとDTCSとに分画した。

逆抽出型リポソームによって、遊離の銅(II)イオンが86%捕集されたのに対し、5 µg/ml フミン酸を含む水溶液からの銅の捕集率は42%であった。遊離銅(II)イオンの捕集率が100%にならないのは、クロマトグラフ操作によってリポソームが希釈されたためである。リポソームの凍結乾燥¹⁹⁾による製剤化等の検討により、水中の遊離の銅(II)をフミン結合銅から選択的かつ定量的に捕集できると期待される。

4 結 言

キレート試薬として8-ヒドロキシキノリン(HQ)を含有するリポソームを用いて銅(II)の捕集を行ったところ、HQとの錯形成反応によって銅(II)が捕集される一方、銅-フミン錯体は捕集されず、水生生物による銅の取り込みにおける選択性と類似の選択性が発現した。銅の形態別捕集に関する選択性は、HQがリン脂質膜という特殊な場で機能してしているためと考えられる。今後、捕集率向上のための検討を行うことによって、環境水中の金属元素の生物や生態系への影響を評価するための捕集媒体となりう

ると考えられる。

文 献

- 1) R. Klöcking: *Arch. Exp. Vet. Med.*, **34**, 389 (1980).
- 2) J. Buffle: "Complexation Reaction in Aquatic Systems: An Analytical Approach", (1988), (Ellis Horwood, Chichester).
- 3) H. Shanmukhappa, K. Neelakantan: *Bull. Environ. Contamin. Toxicol.*, **44**, 840 (1990).
- 4) E. M. Lores, R. A. Snyder, J. R. Pennock: *Chemosphere*, **38**, 293 (1999).
- 5) M. Hiraide, S. P. Tillekeratne, K. Otsuka, A. Mizuike: *Anal. Chim. Acta*, **172**, 215 (1985).
- 6) M. Hiraide, Y. Arima, A. Mizuike: *Anal. Chim. Acta*, **200**, 171 (1987).
- 7) M. Hiraide, T. Ueda, A. Mizuike: *Anal. Chim. Acta*, **227**, 421 (1989).
- 8) M. Hiraide, S. Hiramatsu, H. Kawaguchi: *Fresenius' J. Anal. Chem.*, **348**, 758 (1994).
- 9) M. Hiraide, K. Hasegawa: *Fresenius' J. Anal. Chem.*, **363**, 261 (1999).
- 10) 平出正孝: ケミカルエンジニアリング, **45**, 179 (2000).
- 11) R. C. MacDonald, R. I. Macdonald, B. P. H. Menco, K. Takeshita, N. K. Subbarao, L. Hu: *Biochem. Biophys. Acta*, **150**, 76 (1985).
- 12) R. M. Town, H. Kipton, J. Powell: *Anal. Chim. Acta*, **271**, 195 (1993).
- 13) M. Hiraide, A. Ishikawa: *Anal. Sci.*, **18**, 199 (2002).
- 14) Y. Kubota, M. Kodama, M. Miura: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **46**, 100 (1993).
- 15) T. Kamidate, J. Yamaguchi, T. Suita, H. Tani, H. Watanabe: *Chem. Lett.*, **1997**, 971.
- 16) C. T. Driscoll, Int. J. Environ: *Anal. Chem.*, **16**, 267 (1984).
- 17) J. H. van Zanten, D. S. W. Chang, I. Stanish, H. G. Monbouquette: *J. Memb. Sci.*, **99**, 49 (1995).
- 18) 渡辺寛人, 山口信夫, 田中裕晃: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **28**, 368 (1978).
- 19) T. Suzuki, H. Komatsu, K. Miyajima: *Biochim. Biophys. Acta*, **1278**, 176 (1996).

要 旨

ホスファチジルコリン, ホスファチジルグリセロール, コレステロール及びキレート試薬からなる単層膜ベシクル (リボソーム) を銅(II) イオンの選択的捕集媒体として用いた。キレート試薬として8-ヒドロキシキノリン (HQ) を用いた場合, 銅(II) の捕集は HQ 濃度及び pH が増加するにつれて増大した。フミン酸を含む水溶液からは, 遊離の銅(II) イオンが選択的にリボソームに捕集された。しかし, HQ 以外のキレート試薬を含有したリボソームへは銅-フミン錯体の銅も同時に捕集され, 選択的な遊離銅(II) の捕集は不可能であった。HQ 含有リボソームの内水相に (N-ジチオカルボキシ) サルコシンを含ませることにより, 選択性を保ちつつ, 銅(II) イオンの取り込み能を向上させることができた。