

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05944

研究課題名(和文)還元糖の新規機能の開発 - キラル化合物のラセミ化抑制作用機構の解明と食品への展開

研究課題名(英文) A novel property of reducing sugars on the reduction of racemization by chiral HPLC with a mobile phase containing a small amount of cyclodextrins

研究代表者

小玉 修嗣 (Kodama, Shuji)

東海大学・理学部・教授

研究者番号：70360807

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：新規なキラルHPLC法を検討した。フェニルカラムと低濃度の各種シクロデキストリンを添加した移動相を用いることにより、マンデル酸、フェネチルアミン類、カテキン類及びアブシジン酸を光学異性体分離できることを明らかにした。マンデル酸、アドレナリン及びアブシジン酸は100℃で加熱してもラセミ化しなかった。カテキンとエピカテキンは加熱によりエピ化した。加熱時にグルコースとスクロースを添加してもエピ化には影響しなかったが、フルクトースによりエピ化が抑制された。アドレナリンを100℃で加熱すると分解が起こったが、この分解にもフルクトースは抑制作用を示すことが観察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

シクロデキストリン(CD)をキラル化合物として用いるキラルHPLC法が報告されているが、移動相に高濃度のCDを添加するため、非常に高価な分析法となっていた。我々は、粒子径が小さなフェニルカラムを用い、低濃度のシクロデキストリンを用いる方法を検討した。CDの種類を変えることにより、マンデル酸、フェネチルアミン類、カテキン類及びアブシジン酸を光学異性体分析できることが示された。この方法はCDの種類や濃度を自由に調節して最適化できることが特徴である。本キラルHPLC法の対象化合物を拡大できれば、価格的にも操作的にも十分汎用性が認められる方法として多くの研究者への利用が期待される。

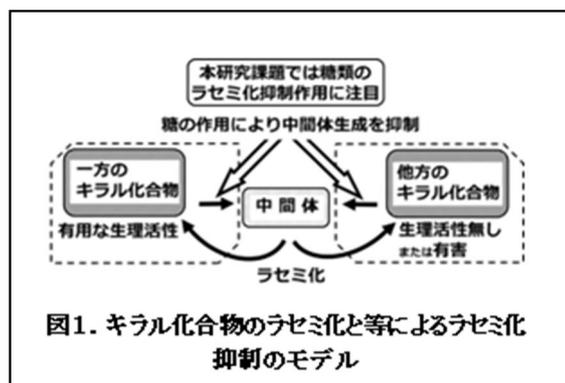
研究成果の概要(英文)：In order to investigate the effect of sugars on the racemization of chiral compounds, novel chiral HPLC methods for chiral compounds were studied with a phenyl column and mobile phases containing at low concentration of cyclodextrins. With the proposed HPLC methods, mandelic acid, phenethyl amines, catechins, and abscisic acid were enantioseparated. Enantiomers of mandelic acid, adrenaline, and abscisic acid were not racemized, but enantiomers of catechin and epicatechin were epimerized by heating at 100 degree C. The effect of three sugars (sucrose, glucose, and fructose) on the epimerization was studied. Only fructose was found to reduce the epimerization. Adrenaline was decomposed by heating at 100 degree C. The decomposition was found to decrease in the presence of fructose.

研究分野：分析化学

キーワード：光学異性体分析 シクロデキストリン ラセミ化 エピ化 フルクトース HPLC

1. 研究開始当初の背景

自然界にはキラル化合物が多く存在し、一方のキラル化合物は有用な生理活性をもつが、他方のキラル化合物には生理活性を有しない、あるいは有害な作用を有することが知られている。食品加工時におこるラセミ化の例として、Chang ら (*J. Agric. Food Chem.*, **1999**, *47*, 479-484) はピータン製造過程での L-アミノ酸から D-アミノ酸が生成するラセミ化速度を報告している。カテキンは 2 つの不斉炭素



原子を有し、1 つの不斉炭素原子の立体配置が異なるエピ化が加熱処理により起こることを申請者らは報告した (*Food Chem.*, **2003**, *83*, 563-568)。Kofink ら (*Molecules*, **2007**, *12*, 1274-1288) はカカオ豆の焙煎時やココアパウダーの製造過程におけるカテキンのエピ化を報告している。また、キラル化合物は熱、光や pH 条件などによりラセミ化する可能性がある (図 1)。

例えば、アミノ酸 (*Org. Proc. Res. Develop.*, **2002**, *6*, 452-457)、ミカンなどの柑橘類に含まれるヘスペリジン (*Chirality*, **2005**, *12*, 373-377) やシネフリン (*J. Chromatogr. A*, **2010**, *1217*, 3503-3510)、申請者らが以前に報告したホップに含まれるイソキサントフモール (*J. Agric. Food Chem.*, **2007**, *55*, 6547-6552) は加熱によりラセミ化しやすい化合物であり、また、ウメなどに含まれるアミグダリン (*Chem. Pharm. Bull.*, **2002**, *50*, 1373-1375) は加熱によりエピ化することが報告されている。一般に、ラセミ化は一方のキラル化合物がラジカルな中間体を経て起こる。この中間体の生成を抑制できれば、ラセミ化を抑制できると考えられる。

エピ化を抑制した例として、加熱による D-アミグダリンのエピ化がクエン酸の添加により抑制されることが報告された (*Chem. Pharm. Bull.*, **2002**, *50*, 1373-1375) が、その抑制作用のメカニズムは明らかになっていない。また、化合物のラセミ化やエピ化に関する研究はシクロデキストリンおよびその誘導体を用いて検討されてきた。 (*Chirality*, **2007**, *19*, 453-463) しかし、シクロデキストリンの種類によってラセミ化の抑制作用だけでなく、促進作用を示すものがあり、さらに、対象化合物が異なると全く異なる結果が得られるため、一貫した作用メカニズムは明らかになっていない。

2. 研究の目的

我々は柑橘類に含まれるシネフリンの加熱において、ラセミ化に及ぼす糖類の影響を検討した。D-グルコースや D-フルクトースのような還元糖にはラセミ化抑制作用があるのに対し、還元性のないスクロースやマンニトールはほとんど抑制作用を示さないことを見いだした。この研究結果からどのような化合物のラセミ化にも還元糖は抑制効果を示すのだろうか？という問いが新たに出てきた。このことを明らかにするためには光学異性体の分析方法が不可欠となる。光学異性体分析法として最もよく利用されているのは高速液体クロマトグラフィー (HPLC) である。HPLC による光学異性体分析法は大きく 3 つに分類される。キラルカラムを用いる方法、キラル試薬で誘導体化してジアステレオマーを分析する方法、及び移動相にキラル試薬を添加する方法である。このうち最もよく利用されているのはキラルカラムを用いる方法である。しかし、どの化合物にも適用できる万能なキラルカラムは存在せず、その化合物に適用できるキラル

カラムが必要になる。このため、数百種類のキラルカラムが市販されているが、汎用性のカラムに比べて非常に高価である。また、キラル試薬で誘導体化する方法では、化合物に誘導体化可能な官能基を有していることや、誘導体化中にラセミ化が起こらないことが条件となり、困難な場合がある。そこで、キラル試薬としてシクロデキストリン (CD) を添加した移動相と汎用性のカラムを用いて光学異性体を分析する新規なキラル HPLC 法を開発し、この方法により種々化合物のラセミ化、シス - トランス異性化、あるいは分解に及ぼす糖類の抑制作用を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 各化合物の光学異性体分析法

シクロデキストリン (CD) を添加した移動相を用いた HPLC の光学異性体分析法が報告されてきた。しかし、これまで報告されてきた方法では 10 ~ 30 mM の CD を移動相に添加している。この濃度では移動相を 1 L 調製するのに 15 g 以上の CD を必要とするため、非常に高価な分析法である。我々はこの CD の使用量を大幅に減らした移動相を用いる HPLC 分析法について検討した。逆相カラムとしてフェニルカラム (InertSustain phenyl カラム) を用い、移動相には各種の CD を添加して光学異性体分離能を検討した。

(2) 加熱実験

各光学異性体の水溶液を 100 °C で一定時間加熱した。加熱後は、各試料を氷水に浸漬してから上記(1)の方法により光学異性体分析した。

(3) 紫外線照射実験

20 mM リン酸緩衝液 (pH 2, 6, 7, 8) あるいは酢酸緩衝液 (pH 4) に溶解したアブシジン酸を氷水中で 0 ~ 30 分間 LED ランプ (365 nm) を用いて紫外線照射した。アブシジン酸のシス - トランス異性化の測定は、Inertsustain phenyl カラム (3 µm, 3.0×150 mm) と 0.1% (v/v) リン酸を含む 30% (v/v) アセトニトリル水溶液を移動相とし、流速 0.3 mL/min、カラム温度 40 °C、検出波長 280 nm で分析した。光学異性体分析は上記(1)に記載した方法を用いた。

4. 研究成果

(1) マンデル酸の光学異性体分析

InertSustain phenyl カラム (5 µm, 4.6×150 mm) を用い、0.1% (w/v) ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン (HP-β-CD) を含む 10 mM 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 4.2) を 40 °C、1 mL/min で 60 分間流した後、HP-β-CD 濃度を 0.02% に下げた移動相を用いることにより再現性良くマンデル酸を光学異性体分析できることが分かった。この分析法により化粧品試料の分析にも適用できた (図 2)。(*Chirality*, 2020, 32, 1020-1029)

(2) フェネチルアミン類の光学異性体分析

InertSustain phenyl カラム (3 µm, 3×150 mm) に 0.5% (w/v) ジメチル-β-CD (DM-β-CD)、0.1 M NaCl、0.1% (v/v) リン酸水溶液を 30 °C、0.5 mL/min で 2 時間通液し、DM-β-CD をコーティングしたフェニルカラムを調製した。このカラムと 0.1 M NaCl、0.1% (v/v) リン酸水溶液を移動相として、カラム温度 30 °C、流速 0.2 mL/min、検出波長 220 nm で分析した (図 3)。フェネチルアミン類 4 化合物 (ノルアドレナリン、アドレナ

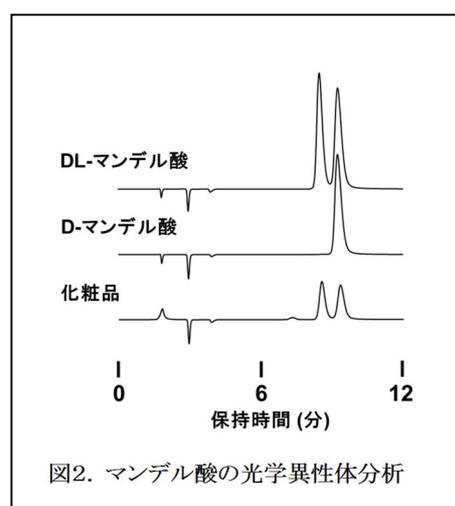


図2. マンデル酸の光学異性体分析

リン、オクトパミン及びシネフリン)は光学異性体分離され、光学異性体が市販されていないオクトパミンを除いて、すべて(R)-体が先に検出され、遅れて(S)-体が検出された。DM-β-CD と上記 (1) で用いられた HP-β-CD はともにフェニルカラムに保持されるため、フェネチルアミン類はカラムのフェニル基と DM-β-CD と三者で複合体を形成し、遅く検出される(S)-体の方が強い複合体を形成すると推定された。この推定はキャピラリー電気泳動分析及び ¹H NMR の実験からも支持された。(J. Sep. Sci.,2021, 44, 2932-2940)

(3) カテキン及びエピカテキンの光学異性体分析

InertSustain Phenyl カラム (5 μm, 4.6 x 150 mm) を用い、2種類の移動相を用いてステップワイズ法によりカテキン及びエピカテキンを HPLC 分析した。移動相 A は 0.05 % (w/v) β-CD、0.1 M NaCl、0.1 % (v/v) リン酸、移動相 B は 0.6 % (w/v) β-CD、0.1 M NaCl、0.1 % (v/v) リン酸を用い、0分 9分(移動相 A)、9分 9.1分(移動相 B)、9.1分 21分(移動相 B)とした。流速 1 mL/min、カラム温度 35 °C、検出波長 220 nm で分析した。また、リニアグラジェント法では、図 3 のように β-CD 濃度を变化させ、カテキン類を一斉分析することができた。(J. Chromatogr. A, 2022, 1673, 463029)

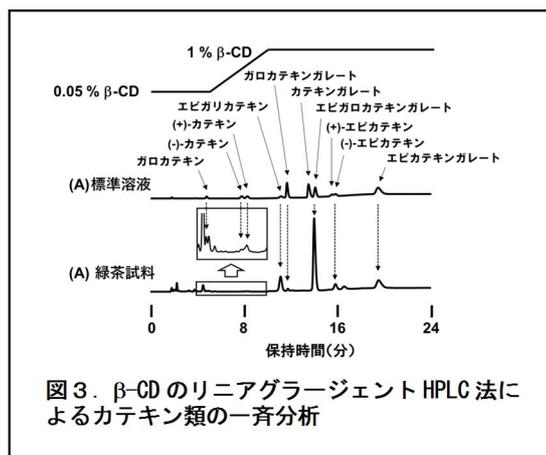


図3. β-CD のリニアグラジェント HPLC 法によるカテキン類の一斉分析

HP-β-CD や DM-β-CD とは異なり、β-CD と下記 (4) の γ-CD はフェニルカラムには保持されなかった。すなわち、移動相中のβ-CD は、カテキンやエピカテキンはフェニルカラムに保持されるのを抑制するため、最初に検出される (-)-カテキンと (+)-エピカテキンはそれぞれの光学異性体、(+)-カテキンと(-)-エピカテキンよりβ-CD と強く複合体を形成することが推定された。この推定はキャピラリー電気泳動分析や蛍光分析により支持された。

(4) アブシジン酸の光学異性体分析

InertSustain phenyl カラム (3 μm, 3×150 mm) を用い、4% (v/v) アセトニトリルと 20 mM リン酸緩衝液 (pH 6.0) を含む溶液中に 0.8% (w/v) γ-CD を加えて移動相とした。カラム温度 35 °C、流速 0.3 mL/min、検出波長 280 nm で分析した(図 4)。この分析法により、ハチミツ中のアブシジン酸を光学異性体分析し、(S)-体だけが検出されることが分かった(図 4)。(J. Sep. Sci., 2023, 46, 2200827)

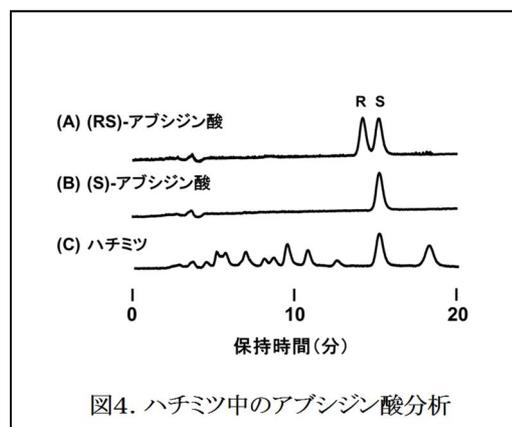


図4. ハチミツ中のアブシジン酸分析

(5) ラセミ化、シストランズ異性化及び加熱分解に及ぼす糖類の影響

(i) 糖類のラセミ化抑制作用

マンデル酸、アドレナリン及びアブシジン酸は加熱によりラセミ化は起こらなかった。カテキンとエピカテキンは 2 つの不斉炭素原子を有し、互いにジアステレオマーの関係にある。2 つの不斉炭素原子のうち、片方の不斉炭素原子の配置がラセミ化することをエピ化という。すなわち、(+)-カテキンの加熱により(+)-エピカテキンが生成し、また、(+)-エピカテキンの加熱により(+)-カテキンが生成する。このエピ化に及ぼす糖類(スクロース、グルコース及びフルクトース)の影響を検討した。0.025 mM (+)-カテキン水溶液中に 0.1 M のスクロース、グルコースあるいはフ

ルクトースのいずれかを加えて 100 °C で 30 分間加熱すると、フルクトースでのみエピ化の抑制がみられた。同様の結果は(+)-エピカテキンのエピ化でも得られた。(J. Chromatogr. A, 2022, 1673, 463029)

(ii) シス-トランス異性化に及ぼす糖類の影響

アブシジン酸は分子内に 2-シス-4-トランス構造を有する。ハチミツ中には 2-トランス-4-トランス構造を有するアブシジン酸 (t-アブシジン酸) も存在すること、及びアブシジン酸に紫外線照射することにより t-アブシジン酸が生成することが知られている。0.04 mM アブシジン酸水溶液 (pH 2-8) を LED ランプで紫外線照射すると、照射時間とともに t-アブシジン酸への異性化が進行し、照射時間 30 分での t-アブシジン酸への異性化率 (29-35%) は pH の影響をあまり受けなかった。100 mM のスクロース、グルコース、あるいはフルクトースを添加したアブシジン水溶液 (pH 7) を紫外線照射しても、t-アブシジンの異性化率は変わらなかったため、単糖の添加による影響は見られなかった。一方、10 mM γ -シクロデキストリンあるいはヒドロキシプロピル- β -シクロデキストリンを添加したアブシジン溶液では、t-アブシジンへの異性化率は 42-44% と少し増加することが分かった。0.04 mM アブシジンのアセトニトリルあるいはメタノール溶液を紫外線照射したときの異性化率はそれぞれ 53% と 49% と高い値を示した。シクロデキストリンを含む溶液中での異性化率の増加は、アブシジンの包接による疎水環境の影響が見られたためと推定された。

(iii) 加熱分解に及ぼす糖類の影響

0.4 mM アドレナリンを 100 °C で 30 分間加熱して残存するアドレナリン濃度を測定したところ、残存率は 14% であった。0.4 mM アドレナリン溶液に 100 mM の各種糖類を加えて 100 °C で 30 分間加熱すると、アドレナリンの残存率はフルクトース (51%)、グルコース (29%)、ガラクトース (25%)、マンノース (22%)、スクロース (17%)、マンニトール (10%) となり、還元性を有する糖類がアドレナリンの分解を抑制することがわかった。0.4 mM ノルアドレナリンに 100 mM の各種糖類を加えて 100 °C で 20 分間加熱すると、糖類無添加のノルアドレナリン残存率 9% に対して、フルクトース (39%)、グルコース (26%)、ガラクトース (22%)、マンノース (14%) の添加によりノルアドレナリンの分解が抑制されることが分かった。アドレナリンと同様にノルアドレナリンも異性化はみられなかったが、糖による分解抑制効果が認められた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Terashima Hiroyuki, Yamamoto Atsushi, Aizawa Sen ichi, Taga Atsushi, Mikami Ikko, Ishihara Yoshimi, Kodama Shuji	4. 巻 44
2. 論文標題 Enantioseparation of phenethylamines by using high performance liquid chromatography column permanently coated with methylated cyclodextrin	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Separation Science	6. 最初と最後の頁 2932 ~ 2940
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jssc.202100343	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Terashima Hiroyuki, Seki Mayuko, Watanabe Saki, Yamamoto Atsushi, Aizawa Sen-ichi, Taga Atsushi, Mikami Ikko, Kodama Shuji	4. 巻 1673
2. 論文標題 Chiral separation of catechin and epicatechin by reversed phase high-performance liquid chromatography with -cyclodextrin stepwise and linear gradient elution modes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Chromatography A	6. 最初と最後の頁 463029 ~ 463029
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chroma.2022.463029	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Watanabe Yuri, Mikami Ikko, Yamamoto Atsushi, Aizawa Sen ichi, Taga Atsushi, Mochizuki Naoki, Ishihara Yoshimi, Kodama Shuji	4. 巻 32
2. 論文標題 Direct enantioseparation of mandelic acid by high performance liquid chromatography using a phenyl column precoated with a small amount of cyclodextrin additive in a mobile phase	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chirality	6. 最初と最後の頁 1020 ~ 1029
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/chir.23228	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Terashima Hiroyuki, Mutoh Yui, Aizawa Sen ichi, Taga Atsushi, Mikami Ikko, Itabashi Yutaka, Tsutsumiuchi Kaname, Yamamoto Atsushi, Kodama Shuji	4. 巻 46
2. 論文標題 Direct chiral separation of abscisic acid by high performance liquid chromatography with a phenyl column and a mobile phase containing cyclodextrin	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Separation Science	6. 最初と最後の頁 2200827 ~ 2200827
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jssc.202200827	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 寺島 弘之・関 眞由子・渡辺 彩希・山本 敦・會澤 宣一・多賀 淳・三上 一行・小玉 修嗣
2. 発表標題 -シクロデキストリン濃度のグラージェント溶出法を用いたカテキン及びエピカテキンのキラルHPLC分析
3. 学会等名 日本分析化学会第71年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東海大学理学部化学科 小玉研究室 https://kodamaken.wixsite.com/kodama

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	多賀 淳 (TAGA Atsushi) (20247951)	近畿大学・薬学部・教授 (34419)	
研究分担者	會澤 宣一 (AIZAWA Sen-ichi) (60231099)	富山大学・学術研究部工学系・教授 (13201)	
研究分担者	山本 敦 (YAMAMOTO Atsushi) (60360806)	中部大学・応用生物学部・教授 (33910)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------