

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26410154

研究課題名(和文)分離分析を活用する副反応進行下での平衡反応解析法の確立

研究課題名(英文) Establishment of Equilibrium Analysis Method Using Separation Analysis under the Concomitant of Side Reactions

研究代表者

高柳 俊夫 (Takayanagi, Toshio)

徳島大学・大学院理工学研究部・教授

研究者番号：50263554

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：キャピラリーゾーン電気泳動法(CZE)の分離分析を活用することにより、水溶液一相系において速度論反応等の副反応の進行下で目的となる迅速な平衡反応の解析法の確立を目的とした。CZEでは比較的遅い反応により生成する物質は分離される一方、迅速な平衡にある化学種は加重平均の電気泳動移動度を測定できる点に本研究の特徴がある。

紫外光により分解するハロペリドール、酸性条件下で分解性を有するヘキサメチレンテトラミン、プラバスタチン、熱により分解するブプロピオン、ヒドロクロロチアジドについて、分解生成物の共存下においても目的物質の電気泳動移動度の測定を通して、それら目的物質の酸解離定数を決定することに成功した。

研究成果の概要(英文)：This study aimed at the establishment of the analysis method of fast equilibrium under the concomitant of side reactions or under the presence of the degraded species from the objective substance in an aqueous solution. Separation analysis by capillary zone electrophoresis (CZE) has been utilized to realize it. Gradually generated substances from the objective substance can be resolved by CZE, while the objective substance in fast equilibrium is detected as a single peak signal with its migration time / electrophoretic mobility of the weighted average of the equilibrium species.

Acid dissociation constants of easily degradable substances have successfully been determined by the proposed analysis method in the presence of the degraded species from the object substance. They were UV-degradable haloperidol, acid-degradable hexamethylenetetramine and pravastatin, as well as heat-degradable bupropion and hydrochlorothiazide.

研究分野：分析化学

 キーワード：キャピラリー電気泳動 分離分析 酸解離定数 トリフェニルメタン系陽イオン染料 ジピクリルアミ
ネートイオン ヘキサメチレンテトラミン 易分解性医薬品 カルボキシエステラーゼ

1. 研究開始当初の背景

溶液内の平衡反応・速度論反応は、自然界や生体内における物質循環を司る化学反応の基礎であり、触媒や酵素が関与する反応も含めて、様々な反応系に関して平衡定数、速度定数が決定されている。平衡反応・速度論反応は、分析化学の領域においては物質分離の高度化、検出の高感度化に様々なかたちで活用されている。クロマトグラフィーや電気泳動などの分離分析の分野では特に平衡反応が活用され、分離カラム等の分離媒体内で、アフィニティーや分子間相互作用の微小な差を異性体等の分離改善に有効に活用している。また、平衡論に基づく分離分析の機能向上のために、各種相互作用試薬やアフィニティー試薬が探索されている。

一方で、分離分析法は物質の「分離と定量」の目的以外にも、平衡反応である相互作用やアフィニティー解析を目的とした「物性分析装置」としても利用されている。キャピラリーゾーン電気泳動法 (CZE) による平衡反応解析は、水系溶媒下で固体固定相を使うことなく均一溶媒系で行える点に特徴を有し、電気泳動移動度の変化を通して平衡定数を決定する手法である。酸解離平衡、錯体生成、イオン会合、ミセル分配、アフィニティー相互作用など、研究代表者らの研究 (Takayanagi, *Anal. Sci.*, **20**, 255 (2004). 等) を含めて多くの研究が報告されている。

分離分析装置による速度論反応の解析を意図した研究では、キャピラリー内の泳動時間に対応する反応時間と残存物質質量から反応速度を解析する CE リアクターの研究 (Iki, *et al.*, *Anal. Chem.*, **72**, 4812 (2000). 等)、平衡混合物からの解離反応を解析する研究 (NECEEM: Berezovski and Krylov, *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 13674 (2002). 等) が報告されている。速度論反応では、泳動の途上で複合体 CA が徐々に C と A に分解し、観測される CA シグナルの減少を速度論解析に用いている。これらの研究では、平衡反応と速度論反応はそれぞれ独立して扱われていたが、研究代表者らは以前、速度論的な副反応により生成する物質が解析対象とする物質系から分離される分離分析の特徴を活用する解析法を見出し、CZE の移動度変化を解析する手法により、アルカリ性溶液中で徐々に分解退色するフェノールフタレインの酸解離平衡の解析に成功した (Takayanagi and Motomizu, *Chem. Lett.*, **30**, 14 (2001).)。この反応解析は、速度論的な分解反応が副反応として伴う複雑な反応系であり、目的となる平衡反応を解析することができた初めての研究である。

フェノールフタレインでの酸解離平衡解析の成功から、「速度論等の副反応進行下での平衡反応解析」は分離分析の特性を活用することで初めて可能な解析法であることに気付いた。すなわち、分光法では均一溶液を

測定するので、必然的に速度論反応による生成物の共存が測定スペクトルに混入して妨害してしまう。一方、分離分析による反応解析では徐々に生成する速度論反応生成物は対象の平衡反応物質から分離され主平衡に関する化学種の測定を妨害しない特徴を有する。速度論反応の他にも、分解反応、沈殿反応も副反応の一つとして挙げられる。反応解析・物性分析を可能とする分離分析機器の新しい活用法として、本研究を着想した。

2. 研究の目的

水溶液一相系で分離分析を行う CZE を用いて、速度論反応等の副反応の進行下での平衡反応解析法を確立することを研究目的とした。本研究で提案する解析法は、分離分析の特徴を活用して副反応を除外、低減することで、均一系溶液での困難を克服する新しい反応解析法である。分離分析である CZE では、数分～数十分の測定時間と比較して遅い反応速度を有する物質 (分解生成物など) は測定対象となる物質から分離されるので、分解生成物の影響を排除して測定対象物質の挙動を測定する点を特徴とした研究である。

副反応を伴う迅速な平衡反応として、分解反応や沈殿反応を伴う酸塩基平衡、イオン会合平衡を取りあげた。

3. 研究の方法

分離分析装置として均一溶液を扱うキャピラリーゾーン電気泳動装置を用い、電気泳動移動度の測定を通して、速度論反応・沈殿生成反応等の副反応進行下での平衡反応の解析を行う新しい装置利用法・反応解析法の開発を進めた。溶液中での基本的な反応である酸塩基平衡、イオン会合平衡を解析対象とし、それら主平衡に伴う分解反応、沈殿反応、速度論反応等を副反応とする種々のモデル反応系の解析を通して、本解析法の適用可能性を探った。適用例として、分解性のある医薬品の物性分析を行った。

(1) 易分解性陽イオン染料の酸解離平衡解析
本解析法の汎用性を高めるために、アルカリ性領域で分解反応を伴うトリフェニルメタン系陽イオン染料を取りあげ、易分解性陽イオン染料の酸解離平衡の解析を進めた。

(2) 疎水性の高い易沈殿性陰イオンの水溶液内イオン会合平衡の解析

ジピクリルアミネートイオンは疎水性の高い陰イオンとして知られており、アルカリ金属イオンの K^+ 、 Cs^+ と難水溶性の沈殿を生成する。分離分析の手法により、疎水性陰イオンの水溶液内イオン会合平衡に関して、各種アルカリ金属 - クラウンエーテル錯体とのイオン会合反応解析を進めた。

(3) 酸性，塩基性，熱，光により分解性を有する医薬品等の酸解離平衡の解析

ヘキサメチレンテトラミン（ヘキサミン）は酸性溶液中で不安定な物質であり，加水分解によりホルムアルデヒドとアンモニアを生成する．この分解性のために，ヘキサミンの精確な酸解離定数 (K_a) は決定されていない．CZE での分離分析を活用する酸解離平衡の解析により，ヘキサミンの K_a を決定した．

また，抗鬱剤であるハロペリドールは熱や光により徐々に分解することが知られており，分解速度の遅い物質は，電気泳動の測定時に目的薬物から明確に電気泳動分離される．目的物質の移動度変化から酸解離定数を決定した．その他，熱や光により分解性を有する医薬品について，本研究の手法を用いて酸解離平衡を解析した．

(4) 速度論的な酵素反応の反応解析

酵素反応は数分～数十分の反応時間を要する比較的遅い反応であり，CZE の測定時間と同程度の反応時間を有することから，速度論反応の解析対象として取り上げた．エステルの加水分解反応を触媒するカルボキシエステラーゼを用いて，反応基質であるエステルと加水分解反応により生成するフェノールの定量を通して，速度論的な酵素反応の反応解析を行った．

4. 研究成果

(1) トリフェニルメタン系陽イオン染料の酸解離定数の決定

遅い平衡反応の例として，マカライトグリーン (MG^+) をはじめとする 3 種類のトリフェニルメタン系陽イオン染料の酸解離定数を決定した．これら陽イオン染料への OH^- の付加反応は酸解離反応と等価であり，トリフェニルメタノール (MG^+ の場合 $MGOH$) を生成する (図 1)．この付加反応は比較的遅く，平衡到達までに数時間を要する．pH を調整した MG^+ 溶液を 24 時間以上静置した後に CZE 測定し， MG^+ と $MGOH$ とを分離定量した．平衡化学種の 1 つである MG^+ の定量結果から酸解離定数を決定し， pK_a 値として 6.34 ± 0.09 を得た．ストップフローによる報告値 ($pK_a = 6.92$) と近い値を得ることができた．

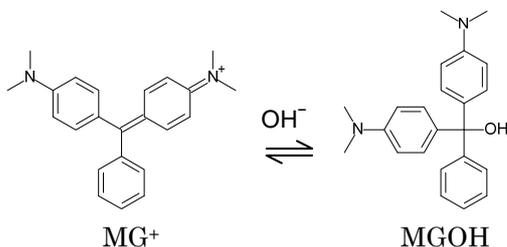


図 1 MG^+ から $MGOH$ を生成する遅い平衡反応

(2) 疎水性の高いジピクリルアミネートイオンのイオン会合平衡の解析

疎水性が高く水溶液内でイオン会合性が高いジピクリルアミネートイオン (DPA^- ，図 2) のアルカリ金属イオンとのイオン会合平衡を CZE の電気泳動移動度から解析した． DPA^- は K^+ や Cs^+ と水溶液中でイオン会合反応により沈殿を生成しやすいが，溶解度以下での解析が可能であり，CZE では DPA^- が通常のシグナルとして検出された．解析によりイオン会合定数 (K_{ass}) を決定したところ，アルカリ金属イオン間では DPA^- との K_{ass} 値に大きな差異は無い一方，疎水性の高い K^+ - 18-クラウン-6-エーテル錯体で大きな定数が得られた．沈殿生成における K^+ および Cs^+ に対する DPA^- の選択性は水溶液内でのイオン会合性に基づくものではなく，沈殿結晶内での分子間 $CH \cdots O$ 結合によるものであることが示唆された．

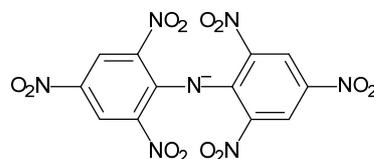


図 2 DPA^- の構造

(3) 光分解性を有するハロペリドールの酸解離定数の決定

易分解性のハロペリドール (HLP) の pK_a を決定した．HLP は紫外光照射により分解し，4-(*p*-クロロフェニル)-4'-ヒドロキシピペリン (CPHP) 等の分解物を生成する (図 3)．紫外光照射による HLP の分解反応後の溶液を CZE 測定したところ，残存する HLP に加えて 2 種類の分解生成物を分離検出した．得られた HLP の pK_a 値は，分解を伴わない条件で測定した結果および文献値と近い値が得られた．また，泳動時間，電気泳動移動度の値，解析で求めた pK_a 値から，分解生成物の一つが CPHP であることが分かった．

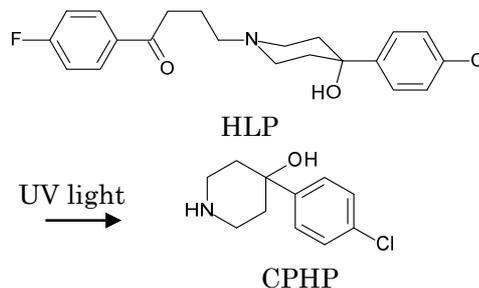


図 3 紫外光照射による HLP から CPHP の生成反応

(4) 酸性領域で易分解性のヘキサミンの酸解離平衡反応の解析

酸性領域で比較的迅速に分解するヘキサミン (図 4) の酸解離平衡を解析した．ヘキサミンは酸性領域で比較的迅速にホルムアルデヒドとアンモニアに分解するが，CZE でヘキサミンは分解生成物から分離されるの

で、分解生成物の妨害を受けずに迅速な酸解離平衡を解析でき、 $pK_a = 4.93 \pm 0.01$ を得た。

また、ヘキサミンはプロトン付加が可能な三級アミン部位を4箇所所有しているが、ヘキサミンの1つのアミン部位をエチル化した物質とプロトン化したヘキサミンとの電気泳動移動度の比較から、1段階のプロトン化であることを確認した。

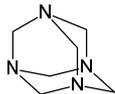


図4 ヘキサメチレンテトラミンの構造

(5) プラバスタチンの酸解離平衡反応の解析
 プラバスタチン(図5)は酸性溶液中で分解しうる。pH = 2.0の条件下で分解により5時間後にはプラバスタチンのCZEシグナルは減少したが、分解生成物の影響を受けることなく残存するプラバスタチンのシグナルから酸解離定数 $pK_a = 4.46 \pm 0.03$ を決定することができ、報告値(4.36, 4.2, あるいは4.6)と一致した。また、分解生成物は無電荷であり、ミセル動電クロマトグラフィーにより2つの分解生成物のCZEシグナルを検出した。

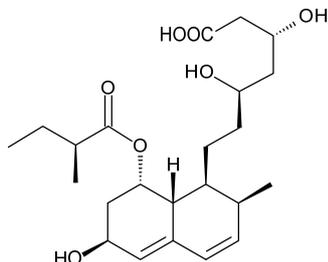


図5 プラバスタチンの構造

(6) プロピオンの酸解離平衡反応の解析
 加熱条件下で比較的迅速に分解するブプロピオン(BUP, 図6)の pK_a を決定した。分解反応下でBUPのCZEシグナルは減少したが、分解生成物を分離することにより目的物質であるBUPの pK_a を決定することができた。また、分解生成物として3-クロロ安息香酸(3Cl-BA)を同定した。

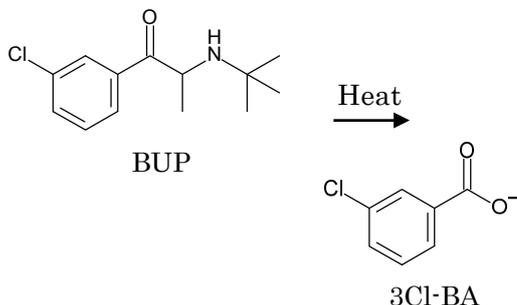


図6 熱分解によるブプロピオンから3-クロロ安息香酸の生成

(7) ヒドロクロロチアジドの酸解離平衡反応の解析
 チアジド系利尿剤の一つであるヒドロク

ロチアジド(HCT, 図7)は水中で加水分解により徐々に4-アミノ-6-クロロ-*m*-ベンゼンジスルホンアミドを生成する。加熱による分解条件下でヒドロクロロチアジドの pK_a を決定したところ、分解生成物の共存下で二段階の $pK_{a1} = 8.95 \pm 0.04$, $pK_{a2} = 10.66 \pm 0.07$ が得られた。また、分解生成物の4-アミノ-6-クロロ-*m*-ベンゼンジスルホンアミドについても二段階の pK_a を決定することができ、 $pK_{a1} = 9.27 \pm 0.06$, $pK_{a2} = 10.79 \pm 0.10$ を得た。

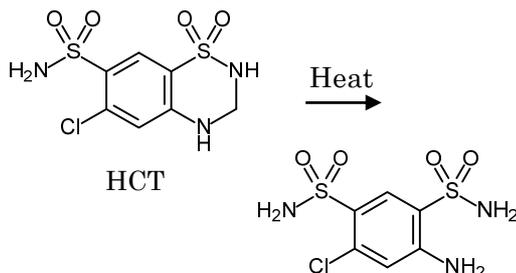


図7 ヒドロクロロチアジドと熱分解による分解生成物

(8) カルボキシエステラーゼによるエステルの加水分解反応

比較的遅い反応である酵素反応について、カルボキシエステラーゼ(CES)による *p*-ニトロフェニルアセテート(NPA)の加水分解反応を対象として研究を進めた。基質であるNPAは中性pH下でCESにより徐々に加水分解して *p*-ニトロフェノールを生成する(図8)。プレキャピラリーで酵素反応を行い、CZEにより *p*-ニトロフェノートを分離検出した。経時測定により *p*-ニトロフェノールが徐々に増加し、CZE分離時間と同程度の数十分単位での反応速度を認めた。

インキャピラリーでの酵素反応においては、キャピラリー中での基質の滞在時間に伴う反応生成物の濃度増加を確認した。

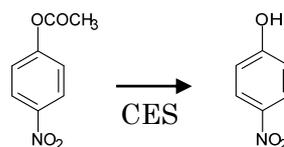


図8 CESによるNPAから *p*-ニトロフェノールへの加水分解反応

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計9件)

1. 高柳俊夫, 磯田昌志, 伊藤大地, 水口仁志, キャピラリーゾーン電気泳動法の電気泳動移動度を用いるヒドロクロロチアジドとその分解生成物の酸解離定数の決定, 分析化学, 査読有, 66, 印刷中(2017).
2. T. Takayanagi, D. Itoh, H. Mizuguchi, Analysis of Acid Dissociation Equilibrium of Bupropion by Capillary

- Zone Electrophoresis After the Heat-Degradation, Chromatography, 査読有, Vol. 37, No. 3, 105-109 (2016). DOI: 10.15583/jpchrom.2016.009
3. T. Takayanagi, N. Shimakami, M. Kurashina, H. Mizuguchi, T. Yabutani, Determination of the Acid-Base Dissociation Constant of Acid-Degradable Hexamethylenetetramine by Capillary Zone Electrophoresis, Anal. Sci., 査読有, Vol. 32, No. 12, 1327-1332 (2016). DOI: 10.2116/analsci.32.1327
 4. T. Takayanagi, M. Amiya, N. Shimakami, and T. Yabutani, Determination of Acid Dissociation Constant of Pravastatin under Degraded Conditions by Capillary Zone Electrophoresis, Anal. Sci., 査読有, Vol. 31, No. 11, 1193-1196 (2015). DOI: 10.2116/analsci.31.1193
 5. K. Hirabayashi, K. Hanaoka, T. Takayanagi, Y. Toki, T. Egawa, M. Kamiya, T. Komatsu, T. Ueno, T. Terai, K. Yoshida, M. Uchiyama, T. Nagano, and Y. Urano, Analysis of Chemical Equilibrium of Silicon-Substituted Fluorescein and Its Application to Develop a Scaffold for Red Fluorescent Probes, Anal. Chem., 査読有, Vol. 87, No. 17, 9061-9069 (2015). DOI: 10.1021/acs.analchem.5b02331
 6. 高柳俊夫, キャピラリーゾーン電気泳動法を活用する副反応進行下での水溶液内平衡反応の解析 (総合論文), 分析化学, 査読有, Vol. 64, No. 2, 105-116 (2015). DOI: 10.2116/bunsekikagaku.64.105
 7. T. Takayanagi, G. Inoue, A. Ikuta, Analysis of Binding Equilibrium of Phenylalkylamines to Brij 58 Micelle through the Measurement of Electrophoretic Mobility by CZE, Chromatography, 査読有, Vol. 35, No. 3, 147-154 (2014). DOI: 10.15583/jpchrom.2014.024
 8. T. Takayanagi, K. Ogura, and T. Yabutani, Analysis of Ion-Association Equilibrium of Precipitable Dipicrylamine Ion in Aqueous Solution by Capillary Zone Electrophoresis, Anal. Sci., 査読有, Vol. 30, No. 9, 919-924 (2014). DOI: 10.2116/analsci.30.919
 9. 島上夏美, 藪谷智規, 高柳俊夫, キャピラリーゾーン電気泳動法を用いる電気泳動移動度の測定による光分解性ハロペリドールの酸解離反応解析, 分析化学, 査読有, Vol. 63, No. 8, 643-648 (2014). DOI: 10.2116/bunsekikagaku.63.643
- [学会発表](計 20 件)
1. 高柳俊夫, 別役優太, 水口仁志, ポリエチレングリコールを添加したミセル動電クロマトグラフィーにおけるグラフェンの保持挙動とシグナル形状の変化, 第 27 回クロマトグラフィー科学会議, 2016 年 11 月 17 日 慶應義塾大学(東京都港区).
 2. 別役優太, 水口仁志, 高柳俊夫, PEG を添加したミセル動電クロマトグラフィーにおけるグラフェン懸濁液の電気泳動, 第 36 回キャピラリー電気泳動シンポジウム, 2016 年 11 月 10 日 徳島大学 (徳島県徳島市).
 3. 岡田英理子, 高柳俊夫, キャピラリー電気泳動法を用いたエステラーゼによる酢酸 p-ニトロフェニルの加水分解反応速度の解析, 第 36 回キャピラリー電気泳動シンポジウム, 2016 年 11 月 10 日 徳島大学 (徳島県徳島市).
 4. 伊藤大地, 高柳俊夫, キャピラリーゾーン電気泳動法を用いたプロピオンの分解反応の追跡と分解条件下での酸解離平衡解析, 第 36 回キャピラリー電気泳動シンポジウム, 2016 年 11 月 10 日 徳島大学 (徳島県徳島市).
 5. 別役優太, 倉科 昌, 高柳俊夫, グラフェン懸濁液のミセル動電クロマトグラフィーにおけるポリエチレングリコールの添加効果, 第 76 回 分析化学討論会, 2016 年 5 月 28 日 岐阜薬科大学 (岐阜県岐阜市).
 6. 伊藤大地, 高柳俊夫, キャピラリー電気泳動法による分解反応下でのプロピオンの酸解離反応解析, 第 76 回 分析化学討論会, 2016 年 5 月 28 日 岐阜薬科大学 (岐阜県岐阜市).
 7. 岡田英理子, 高柳俊夫, キャピラリー電気泳動法を用いたエステラーゼの加水分解反応の速度論解析, 第 76 回 分析化学討論会, 2016 年 5 月 28 日 岐阜薬科大学 (岐阜県岐阜市).
 8. T. Takayanagi, M. Morimoto, Y. Tomiyama, and T. Yabutani, Micellar electrokinetic chromatography of

- graphenes, PACIFICHEM 2015, 2015年12月18日 Hawaii Convention Center (Honolulu, Hawaii).
9. T. Takayanagi, Determination of acid dissociation constants of phenolphthalein and its derivatives under degradation, PACIFICHEM 2015, 2015年12月15日 Waikiki Beach Marriott Resort & Spa (Honolulu, Hawaii).
 10. 高柳俊夫, キャピラリーゾーン電気泳動分離を活用する易分解性物質の反応物性解析(依頼講演), 第26回クロマトグラフィー科学会議, 2015年11月12日九州大学(福岡県福岡市東区).
 11. 島上夏美, 藪谷智規, 高柳俊夫, キャピラリーゾーン電気泳動法によるヘキサメチレンテトラミンの酸解離反応解析, 第35回キャピラリー電気泳動シンポジウム, 2015年11月6日岡山大学(岡山県岡山市北区).
 12. 島上夏美, 藪谷智規, 高柳俊夫, キャピラリーゾーン電気泳動法を用いたヘキサメチレンテトラミンの酸解離反応解析, 第75回分析化学討論会, 2015年5月24日山梨大学(山梨県山梨市).
 13. T. Takahashi, A. Hosono, T. Takayanagi, N. Iki, Kinetic Analysis of Acidic and Basic Hydrolysis of Tetrabromophenolphthalein Ethyl Ester by Zone-passing Mode Capillary Electrophoretic Reactor, 14th Asia-Pacific International Symposium on Microscale Separations and Analysis, 2014年12月8日京都大学(京都府京都市西京区).
 14. N. Shimakami, T. Yabutani, T. Takayanagi, Determination of Acid Dissociation Constant of Haloperidol under Photo-degraded Conditions through the Measurement of Electrophoretic Mobility by Capillary Zone Electrophoresis, 14th Asia-Pacific International Symposium on Microscale Separations and Analysis, 2014年12月8日京都大学(京都府京都市西京区).
 15. T. Takayanagi, Y. Tomiyama, M. Morimoto, T. Yabutani, Micellar Electrokinetic Chromatography of Graphenes with Polymer Additive, 14th Asia-Pacific International Symposium on Microscale Separations and Analysis, 2014年12月8日京都大学(京都府京都市西京区).
 16. T. Takayanagi, Equilibrium Analysis by Capillary Zone Electrophoresis - Its Characteristics and Advantages (Keynote Lecture), 1st Asian Symposium on Analytical Sciences, 2014年9月19日広島大学(広島県東広島市).
 17. 高柳俊夫, キャピラリー電気泳動法によるポリエーテル系非イオン界面活性剤ミセルへの結合反応解析とイオン種結合の選択性(依頼講演), 日本分析化学会第63年会, 2014年9月17日広島大学(広島県東広島市).
 18. 島上夏美, 藪谷智規, 高柳俊夫, キャピラリーゾーン電気泳動法を用いた光分解性ハロペリドールの酸解離反応解析, 日本分析化学会第63年会, 2014年9月17日広島大学(広島県東広島市).
 19. A. Kimura, T. Yabutani, T. Takayanagi, Inhibitor Assay of Xanthine Oxidase by Photometric Flow Injection Analysis with Bindschedler's Green Leuco Base, RSC Tokyo International Conference, JASIS conference, 2014年9月4日幕張メッセ(千葉県千葉市美浜区).
 20. 高柳俊夫, 富山裕紀, 藪谷智規, グラフェンのミセル動電クロマトグラフィーにおける高分子添加の効果, 第21回クロマトグラフィーシンポジウム, 2014年6月6日名古屋市工業研究所(愛知県名古屋市熱田区).
- 〔その他〕
ホームページ等
徳島大学 大学院先端技術科学教育部 物質生命システム工学専攻 分析・環境化学 B-1 講座ホームページ
<http://www.chem.tokushima-u.ac.jp/B1/index.html>
6. 研究組織
- (1)研究代表者
高柳 俊夫 (TAKAYANAGI, Toshio)
徳島大学・大学院理工学研究部・教授
研究者番号: 50263554
 - (2)研究分担者
藪谷 智規 (YABUTANI, Tomoki)
愛媛大学・社会連携推進機構紙産業イノベーションセンター・教授
研究者番号: 80335786
(平成27年4月10日削除)