

令和元年6月13日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K05533

研究課題名(和文) NMRを用いた簡便な食品真正証明システムの開発

研究課題名(英文) Simple evaluation of authenticity of foods by using NMR method

研究代表者

會澤 宣一 (Aizawa, Sen-ichi)

富山大学・大学院理工学研究部(工学)・教授

研究者番号：60231099

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：食品中に人工添加物中を添加すると、光学異性体比等の含有成分組成に違いが現れる。そこで、有機分子のキラル分析ができれば天然食品の真正証明に有用である。本研究では、HPLC法や電気泳動法よりも化合物の同定が容易なNMR法を用い、永久磁石型低磁場NMRでもキラルシグナルの分離ができるような高い分離能を有するキラルシフト試薬を開発し、さらにシグナル分離挙動を決定するパラメータを求めることにより、未測定の状態でもシグナル分離挙動を予想可能とした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

容易に入手できるL-アミノ酸等を連結させて不斉中心を増やしたことにより、ランタノイド錯体のキラルシグナル分離能を向上させた。さらに、付加体の生成定数と結合した基質の化学シフトを実験的に求めたため、測定しなくてもキラルシグナルの分離挙動が予想できるようになった点は学術的に注目に値する。また、開発途上にある可動式の低磁場NMRを利用することによって、食品の汎用的なその場分析にNMRが有効利用でき、新規な食品の真正証明システムを構築できると期待される。キラル化合物が含まれる農薬もあり、光学活性体間で分解・代謝過程や環境に対する影響も異なる場合があるため、農薬の動態分析にも有効な方法となりえる。

研究成果の概要(英文)： Since addition of food adulterants makes a difference in enantiomer distribution from natural products, determination of the enantiomer compositions of organic compounds can become an evaluation of authenticity of natural foods. In this study, the NMR chiral shift reagents with high resolution performance have been developed to take advantage of NMR method, which can identify the compounds simpler than chromatographic or electrophoretic methods. Furthermore, prediction of the chiral signal separation behaviors have become possible by obtaining the parameters that determine the signal separation.

研究分野：錯体化学、無機化学

キーワード：NMRキラルシフト試薬 ランタノイド錯体 食品の真正証明 NMRキラルシグナル分離機構

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

これまで、アミノ酸、有機酸、糖などのキラル分析には HPLC 法やキャピラリー電気泳動(CE)法が用いられてきた。天然の光学活性アミノ酸や有機酸は L 体(イソクエン酸は D 体)であるが人工添加物には DL ラセミ体が含まれるため、小分子のキラル分析技術は食品の真正証明に応用できる。実際、申請者も CE 法を用いたキラル配位子交換法により果実ジュース中の主な有機酸(DL-リンゴ酸、DL-酒石酸、DL-イソクエン酸、クエン酸全7種類)を一斉分析できることを示し、実試料への応用も報告した(*Electrophoresis*, **34**, 1327-1333 (2013))。しかしながら、HPLC 法も CE 法も各成分に対して1つのシグナルが観測されるため、シグナルの重なりが分析を困難にし、保持時間や移動時間も条件によって変化するため、毎回標準試料によるシグナルの同定が必要になる。一方 NMR 法は、各原子に対してシグナルが観測されるため、全てのシグナルが重なることはほとんどなく、既知物質は化学シフトから同定できるため、化合物の構造解析や同定には広く用いられている。しかしながら、他の機器分析と同様に、キラル化合物の分離分析には別の不斉中心の導入が必要である。近年、キラル化合物の NMR 構造解析を簡便に行なうためにキラルシフト試薬が開発された。一つは、キラルな配位子を持つランタノイド錯体を用いて、分析する光学異性体間の擬コンタクトシフトの違いを利用するものである。現在、(R)あるいは(S)-1,2-diaminopropane-*N,N,N',N'*-tetraacetate 六座配位子を有する Sm(III)錯体(*Org. Lett.* **2**, 3543 (2000))が代表的なキラルシフト試薬として市販されている。もう一つは、分析する光学異性体との分子間相互作用に差があるキラル有機化合物をシフト試薬に用いる方法であり、いくつかのシフト試薬が市販されている。しかしながらこれらはかなり高価であり、後者は比較的少量に必要な場合が多い。

そこで、L-アスパラギン酸、L-グルタミン酸といったカルボキシル基を複数有する安価なアミノ酸のアミン窒素を炭素鎖で架橋して、不斉中心を複数持つ不斉多座配位子を合成し、これをランタノイドイオン等に配位させて、簡便な汎用分析をするために、永久磁石を有する低磁場 NMR でもキラルシグナルの分離が可能なキラルシフト試薬の開発が必要となっていた。

2. 研究の目的

- ・ランタノイドイオンは酸素原子と親和性が高いため、配位子としてカルボキシル基を分子中に複数もつ L-アスパラギン酸や L-グルタミン酸を用いて、金属イオンには Sm(III)以外にも、擬コンタクトシフトが大きく常磁性緩和によるシグナルの広幅化が比較的小さい Pr(III)や Nd(III)などを用いて有効なキラルシフト試薬の可能性を検討する。
- ・配位子の解離を防ぐためにアミノ酸のアミノ基を架橋した、不斉中心を複数有し、しかも錯形成能の高い多座配位子を合成し、安価でシグナル分離能の高いキラルシフト試薬を開発する。
- ・天然ジュース等の実試料でも応用が可能かどうかを検証する。
- ・シグナルを分離しようとする基質とキラルシフト試薬との付加体の生成定数および付加した基質の化学シフトを実験的に求め、その値から任意の濃度条件のキラルシグナルの分離挙動を予測可能とする。

3. 研究の方法

・キラル配位子として L-アスパラギン酸や L-グルタミン酸などのアミン窒素をエチレン架橋した多座配位子を合成し、これを Ce(III)、Pr(III)、Nd(III)、Sm(III)などのランタノイドを中心金属イオンとしてキラルシフト試薬とする。

- ・上記の錯体を用いて、様々な DL-アミノ酸や DL-有機酸について、シグナルの分離状況を調査し、D 体と L 体を見分ける指標となるシグナルがあるかどうか検討する。
- ・天然果実ジュース等の実試料中の光学異性体のシグナル分離が可能かどうかを検証する。
- ・各錯体について、シグナル分離機構を明らかにする。すなわち、シグナルを分離しようとする D 体および L 体とキラルシフト試薬との付加体生成定数がシグナルのキラル分離を支配しているか、あるいは付加した基質の化学シフトが支配しているかを実験的に明らかにする。
- ・実験的に求めた D 体および L 体とキラルシフト試薬との付加体生成定数と付加した基質の化学シフトから、任意の濃度条件におけるシグナル分離挙動を再現し、さらに測定せずにシグナルの分離挙動を予測することを試みる。

4 . 研究成果

キラル配位子として L-アスパラギン酸と L-グルタミン酸のアミン窒素をエチレン架橋した多座配位子を合成した。これを Ce(III)、Pr(III)、Nd(III)、Sm(III)などのランタノイドを中心金属イオンとしてキラルシフト試薬を生成させようとしたところ、L-グルタミン酸架橋錯体は加水分解が容易におこることがわかった。そこで以後、L-アスパラギン酸をエチレン架橋した多座配位子を用いて、NMR キラルシグナル分離を行うことにした。

- ・各 L-アスパラギン酸架橋ランタノイド(III)錯体を用いて、様々な DL-アミノ酸や DL-有機酸について、シグナルの分離状況を調査したところ、アミノ酸の α および β 位の水素や炭素の化学シフトの順番に規則性があることがわかり、D 体と L 体を見分ける指標となることが明らかになった。

- ・天然ぶどうジュースの濃縮試料中の DL-酒石酸のシグナル分離が ^{13}C NMR で観測できたため、NMR 法が実試料に応用可能であることが分かった。

- ・各ランタノイド(III)錯体について、シグナル分離機構を明らかにするために、シグナルを分離しようとする D 体および L 体とキラルシフト試薬との付加体生成定数 (K_D と K_L) と付加した基質の化学シフトの値 (δ_D と δ_L) を実験的に明らかにした。この結果、いずれの要因が化学シフトの順番を決めるかは、中心の金属に依存することが分かった。

- ・実験的に求めた付加体生成定数 (K_D と K_L) と付加した基質の化学シフト (δ_D と δ_L) から、任意の濃度条件におけるシグナル分離挙動を再現ができた。さらにシグナルの半値幅を見積もることで、測定せずにシグナルの分離形状を予測することができた。

以上の結果より、アスパラギン酸をエチレン架橋した多座配位子を有する種々のランタノイド(III)錯体を用いると、多くのアミノ酸や有機酸の光学異性体のシグナルが簡便に分離でき、さらに求めた付加体生成定数や付加した基質の化学シフトから、シグナル分離挙動や、測定に適した濃度条件を予想できることが明らかになった。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 9 件)

Sohei Tanaka, Misaki Sekiguchi, Atsushi Yamamoto, Sen-ichi Aizawa, Kanta Sato, Atsushi Taga, Hiroyuki Terashima, Yoshimi Ishihara, Shuji Kodama, Separation of Synephrine enantiomers in Citrus Fruits by a Reversed Phase HPLC After Chiral Precolumn Derivatization, *Anal. Sci.*, 査読有, **35**(4), 407-412 (2019). DOI: 10.2116/analsci.18P441.

yuga Moriya, Sohei Tanaka, Yukari Iida, Satomi Kitagawa, Sen-ichi Aizawa, Atsushi Taga, Hiroyuki Terashima, Atsushi Yamamoto, Shuji Kodama, Chiral separation of isoxanthohumol and

8-prenylnaringenin in beer, hop pellets, and hops by HPLC with chiral columns, *Biomed. Chromatogr.*, 査読有, **32**, e4289(1-8) (2018.9). DOI: 10.1002/bmc.4289

Sohei Tanaka, Takumi Dohi, Sen-ichi Aizawa, Tomoko Kemmei, Hiroyuki Terashima, Atsushi Taga, Atsush Yamamoto, Shuji Kodama, Simultaneous determination of alcohols including diols and triol by HPLC with ultraviolet detector based on the formation of complex with copper(II) ion, *J. Sep. Sci.*, 査読有 **40**(21), 4168-4175 (2017.11). DOI: 10.1002/jssc.201700635

Sen-ichi Aizawa, Masaru Okano, Takahiro Kidani, Enantiomeric NMR Signal Separation Behavior and Mechanism of Samarium(III) and Neodymium(III) Complexes with (S,S)-Ethylenediamine-N,N'-Disuccinate, *Chirality*, 査読有 **29**(6), 273- 281 (2017). DOI: 10.1002/chir.22681

Makiko. Okada, Atsushi. Yamamoto, Sen-ichi Aizawa, Atsushi. Taga, Hiroyuki. Terasima, Shuji Kodama, HPLC Separation of Sulforaphane Enantiomers in Broccoli and Its Sprouts by Transformation into Diastereoisomers Using Derivatization with (S)-Leucine, *J. Agric. Food Chem.*, 査読有, **65**(1), 244-250 (2017). DOI: 10.1021/acs.jafc.6b04966

Sen-ichi Aizawa, Soshi Tsubosaka, Polymer-Supported Optically Active fac(S)-Tris(thiotato)rhodium(III) Complex for Sulfur-Bridging Reaction with Precious Metal Ions, *Chirality*, 査読有, **28**(1), 85-91 (2016). DOI: 10.1002/chir.22546

Kana Arai, Hiroyuki Terashima, Sen-ichi Aizawa, Atsushi Taga, Atsushi Yamamoto, Kaname Tsutsumiuchi, Shuji Kodama, Simultaneous Determination of Trigonelline, Caffeine, Chlorogenic Acid, and Their Related Compounds in Instant Coffee by HPLC Using an Acidic Mobile Phase Containing Octanesulfonate, *Anal. Sci.*, 査読有, **31**(8), 831-835 (2015). DOI: 10.2116/analsci.31.831

Mirei Shou, Hiroyuki Terashima, Sen-ichi Aizawa, Atsushi Taga, Atsushi Yamamoto, Shuji Kodama, Simultaneous Enantioseparation of Aldohexoses and Aldopentoses Derivatized with L-Tryptophanamide by Reversed Phase HPLC Using Butylboronic Acid as a Complexation Reagent of Monosaccharides, *Chirality*, 査読有, **27**(7), 417-421 (2015). DOI: 10.1002/chir.22456

Sen-ichi Aizawa, Takahiro Kidani, Sayuri Takada, Yumika Ofusa, Simple Resolution of Enantiomeric NMR Signals of α -Amino Acids by Using Samarium(III) Nitrate with L-Tartarate, *Chirality*, 査読有, **27**(5), 353-357 (2015). DOI: 10.1002/chir.22443

〔学会発表〕(計 20 件)

太田直希、會澤宣一、「不斉小分子を有する Co(III)Cl(TPPS)錯体の不斉会合体形成」、日本化学会第 99 春季年会、2019 年 3 月 16 日～3 月 19 日

田中壮平、山本敦、會澤宣一、多賀 淳、小玉修嗣、「アブシシン酸の光学異性体分析」、第 35 回イオンクロマトグラフィー討論会、2018 年 12 月 6 日～12 月 6 日

小玉修嗣、石下雄介、後藤宏章、田中壮平、佐野博之、山本敦、會澤宣一、多賀 淳、寺島弘之、「日本酒中フェルラ酸の HPLC 分析」、日本分析化学会第 67 回年会、2018 年 9 月 12 日～9 月 14 日

田中壮平、山本敦、會澤宣一、多賀淳、寺島弘之、小玉修嗣、「プレカラム誘導体化法による柑橘類中シネフリンのキラル HPLC 分析」、日本分析化学会第 67 回年会、2018 年 9 月 12 日～9 月 14 日

Sen-ichi Aizawa, Kouhei Takizawa, Speciation of Ru(II)(*p*-cymene) with Amino Acids and

Reaction Mechanism of Their Formation, 43rd International Conference on Coordination Chemistry, July 30-Aug 4, 2018.

中橋有太、會澤宣一、「オルト置換ジフェニルトリアゼニド配位子を有する Pd(I)-Pd(I)二核錯体の触媒活性」、錯体化学会第 68 回討論会、2018 年 7 月 28 日～7 月 30 日

小玉修嗣、田中壮平、守屋日向、飯田結香莉、北川仁美、會澤宣一、山本敦、多賀淳、寺島弘之、「ピール中のイソキサントフォーム及び 8-プレニルナリンゲニンの光学異性体分析」、日本薬学会第 138 年会、2018 年 3 月 25 日～3 月 28 日

田中壮平、山本敦、多賀淳、會澤宣一、寺島弘之、小玉修嗣、「柑橘類中シネフリンの光学異性体分析」、日本薬学会第 138 年会、2018 年 3 月 25 日～3 月 28 日

太田直希、會澤宣一、「不斉アミンおよびアミノ酸を有するポルフィリン錯体の CD 特性、平成 29 年度北陸地区講演会と研究発表会」、2017 年 12 月 1 日

高木一樹、岡野優、會澤宣一、「L-アスパラギン酸架橋配位子を有するランタノイド(III)錯体のキラル分子に対する NMR シグナル分離機構」、錯体化学会第 67 回討論会、2017 年 9 月 16 日～9 月 18 日

竹内陽一、會澤宣一、「Pd(OAc)₂ を用いた I₂ によるフェニル基のオルトヨウ素化反応の機構論的研究」、錯体化学会第 67 回討論会、2017 年 9 月 16 日～9 月 18 日

岡田眞希子、山本敦、會澤宣一、多賀淳、寺島弘之、小玉修嗣、「スルフォラファンの光学異性体分析 ～ブロッコリーの花蕾と茎中の光学異性体比の検討～」、第 77 回分析化学討論会、2017 年 5 月 27 日～5 月 28 日

田中壮平、土肥巧、會澤宣一、山本敦、多賀淳、寺島弘之、小玉修嗣、「銅錯体形成を利用したアルコール類の HPLC 分析」、第 77 回分析化学討論会、2017 年 5 月 27 日～5 月 28 日

岡田眞希子、寺島博之、山本敦、會澤宣一、多賀淳、小玉修嗣、「単糖類の光学異性体分析」、日本分析化学会第 65 回年会、2016 年 9 月 14 日～9 月 16 日

岡田眞希子、寺島博之、會澤宣一、多賀淳、山本敦、小玉修嗣、「ブロッコリー中のスルフォラファンの光学異性体分析」、日本分析化学会第 65 回年会、2016 年 9 月 14 日～9 月 16 日

岡野優、高木一樹、會澤宣一、「L-アスパラギン酸エチレン架橋配位子を持つランタノイド(III)錯体の不斉分子に対する NMR 特性」、錯体化学会第 66 回討論会、2016 年 9 月 10 日～9 月 12 日

仁井大志、會澤宣一、「ジフェニルホスフィンから三級ホスフィンとジホスフィンを生成する Cu および Ni 触媒の反応」、錯体化学会第 66 回討論会、2016 年 9 月 10 日～9 月 12 日

岡野優、木谷崇宏、會澤宣一、「L-グルタミン酸及び L-アスパラギン酸エチレン架橋配位子を有するランタノイド錯体の NMR キラルシフト試薬としての特性」、錯体化学会第 65 回討論会、2015 年 9 月 21 日～9 月 23 日

岡本哲哉、邑井裕一、山田裕也、會澤宣一、「Ni(II)、Co(II)、Cu(I)触媒を用いたヨウ化アリールと二硫化ジフェニル、チオフェノール、ベンジルアミンのカップリング反応」、錯体化学会第 65 回討論会、2015 年 9 月 21 日～9 月 23 日

翔美玲、寺島博之、會澤宣一、多賀淳、山本敦、小玉修嗣、「L-アミノ酸誘導体化単糖の光学異性体分離」、日本分析化学会第 64 回年会、2015 年 9 月 9 日～9 月 11 日

6. 研究組織

代表者のみ

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。