

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K05905

研究課題名(和文) ポストカラム光学分割による光学異性体一斉定量システムの開発

研究課題名(英文) Post column chiral separation for simultaneous determination of chiral compounds

研究代表者

大平 慎一 (Ohira, Shin-Ichi)

熊本大学・大学院先端科学研究部(理)・准教授

研究者番号：60547826

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：生体は、光学異性体を認識して使い分けしている。一方で、光学異性体の分離・定量には、高度かつ繊細な分離条件の検討が必要であり、光学異性体の生体内・環境中での動態を解明するためには、迅速・高精度な分析手法の開発が必須である。本研究では、電場と膜透過による溶存イオン抽出法による光学分割能の付与を目指した。また、開発した光学分割を物質ごとに分離するカラムの後段に設けることで、光学異性体を一斉分析する手法を検討した。イオン透過膜に選択性を設けることで、従来にない高い光学分割特性が得られた。また、クロスフロー型イオン抽出デバイスを新たに考案することでピーク分散が起こらないポストカラム法を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

光学異性体は、その違いが生体内によって認識されることから、異なる作用を示している。しかしながら、これらの分離は困難であり、製薬、食品などの製造プロセスを煩雑かつ高コストなものにしている。本研究の成果によって、光学異性体の高い分離特性が得られたため、分離に係るコスト面での大幅な改善が見込まれる。また、分析化学への展開により、光学異性体の分析技術が進展することで、生体・環境における動態の解明が進むと期待される。特に、近年、疾病と特定の光学異性体の関係も報告されるようになってきており、新しい医療診断技術への展開も期待される。

研究成果の概要(英文)：Lives can differentiate the chiral compounds. On the other hand, separation of chiral compounds is required high level separation techniques. Acceleration of the study on the function of chiral compounds in lives and environments can be achieved with rapid and reliable quantitation methods. In the present study, ion transfer technology was applied to achieve chiral separation with a single solution path. The developed method can be used as post column separation method and simultaneous quantitation of chiral compounds. The best separation performance was obtained with ion transfer membrane functionalization. Additionally, newly developed cross flow ion transfer device was suitable for post column ion transfer method which can keep the peak resolution.

研究分野：分析化学

キーワード：光学分割 溶存イオン抽出 ポストカラム インライン濃縮

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生体内において、光学異性体は区別して認識されている。例えば、地球上の生体を構成するたんぱく質はL-アミノ酸のみからなっている。一方、1986年に生体内にL体のわずか数%ではあるがD-アミノ酸の存在が発見され、このD体が様々な生理作用を担っていることがわかってきた。また、サリドマイド事件は、光学異性体の一方が薬理効果、他方が毒性を示すことが原因であり、グルタミン酸における味の違い、リモネンにおける香りの違いなど光学異性体により生体反応は大きく異なっている。そのため、医薬品や食品などの産業において光学分割や光学異性体ごとの定量は重要な課題の1つである。最近では、D-アミノ酸のいくつかが慢性腎臓病のバイオマーカーであることが報告され、代謝物中の光学異性体分析による医療診断の可能性も示されている。光学分割を達成する手法は、いくつかあるが、キラルクロマトグラフィーは、分離可能な物質が多く、光学異性体を分取できることから広く用いられている。キラルクロマトグラフィーでは、シクロデキストリンやアミノ酸などを移動相や固定相にキラルなホストとして組み入れることで生成するジアステレオマー会合体の安定度の違いにより分離が達成されている。しかし、現在のクロマトグラフィーによる光学分割の多くは、すでに精製された純物質の光学分割を目的としている。血液などの実試料中化合物を光学異性体ごとに定量するには、二次元クロマトグラフィーを構築し、1本目で分離して得られた純物質をピークごとにサンプルループに導入し、2本目の光学分割カラムへと導入してそれぞれの物質ごとに測定する必要がある。これまでにたんぱく質構成全アミノ酸20種のD体L体の一斉分析が達成されているが、分析に12時間を要するなど測定効率にはまだまだ改善の余地があり、生体内における光学異性体の認識能や異性体ごとの役割を解明するにはより迅速かつ高感度な手法が必要となる。

一方、申請者は、電場と膜透過を利用した溶存イオン抽出デバイス(ITD, ion transfer device)を開発し、溶存イオン分析のためのマトリックスからの分離や分離と同時にインライン濃縮する手法を確立してきた。ITDでは、溶存イオンのみが電場により格段に加速され、わずか数秒で定量的に、透析膜で隔てた抽出溶液に取り込まれる。電場の影響を受けない非イオン性物質や膜透過できない巨大イオンは抽出されない。さらに、陽イオンと陰イオンが電場の向きによって別々の抽出溶液に定量的に抽出されることを利用した3価クロム( $\text{Cr}^{3+}$ )と6価クロム( $\text{CrO}_4^-$ )の分離や、イオンに解離した形態のみが電場で加速され、抽出されることから酸解離定数の違いにより3価ヒ素( $\text{AsO}_3^{3-}$ ,  $\text{p}K_{a1}$  9.2)と5価ヒ素( $\text{AsO}_4^{3-}$ ,  $\text{p}K_{a1}$  2.2)の分離を達成した。本法は、申請者のオリジナルな手法であり、電場における測定対象物質の挙動の違いをうまく利用した分離法である。

本研究では、ITDによる光学分割法を確立し、物質ごとに分離するカラムの後段に設けることで、試料中の物質を光学異性体ごとに一斉分析するシステムの開発を目指す。このようなシステムは、光学異性体による生理作用を探る上での強力な武器となる。これまでの光学異性体分析では、純物質への精製を経て、キラルクロマトグラフィーによる光学分割・定量が達成されてきた。本法では、クロマトグラフィーによる物質ごとの分離後、新たに開発するリアルタイムで光学分割可能なフローデバイスにより光学異性体ごとに分離し同時定量する画期的な手法であり、光学異性体による生理作用の解明への貢献が期待される。また、光学分割は、医薬品や食品工業において、合成したラセミ体を光学分割して薬効の高い光学活性な医薬品や機能性食品などを得るなど、重要かつ不可欠なプロセスである。さらに、研究の盛んな不斉合成のための光学活性触媒の精製への応用も期待される。

### 2. 研究の目的

生体内において明確に識別される光学異性体は、異なる役割を担っていることが解明されてきた。物質を光学異性体ごとに一斉分析する手法の開発によって、生体内における生理作用の制御や代謝メカニズムのさらなる解明が進むと期待される。そこで、本研究では、(1)リアルタイムに光学分割可能なITDの開発、(2)分離カラムの後段に接続しても分離能が低下しないITDの開発、(3)これらを融合した化学物質を光学異性体ごとに一斉分析する手法の開発を目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1)リアルタイムな光学分割が可能なITDの開発

電場と膜透過を利用した溶存イオン抽出デバイスによる光学分割を達成するため、溶液組成やイオン透過膜材料を検討した。試料溶液および抽出溶液は、高速液体クロマトグラフィーによりL体とD体を分離・検出し、分離効率を評価した。

#### (2)分離カラムの後段に接続しても分離能が低下しないITDの開発

従来のITDでは、ピークの分散により、ポストカラムでの利用は難しかった。そこで、新たにクロスフロー型のITDを開発し評価した。光学分割手法の検討と並行して実施するため、対象を陰イオンとし、イオンクロマトグラフィーに組み込んで、ポストカラムでインライン濃縮する手法を検討した。

### 4. 研究成果

(1) リアルタイムな光学分割が可能な ITD の開発

これまでに、電場と膜透過を利用して、試料中の溶存イオンの定量的な抽出を実現してきた。また、溶存イオンの電荷の極性や解離定数の違いを利用した分離を達成してきた。本研究で目的とする光学分割では、構造も物性もほとんど同じ異性体を分離する必要がある。そこで、一方の光学異性体に対し、相対的に強く結合するキラルセクターを試料溶液に導入することで溶液内での電媒による泳動速度に差を設けることを検討した。まず、キラルセクターとして、 $\beta$ -シクロデキストリン ( $\beta$ -CD) を導入した。 $\beta$ -CD のフェニル酪酸 (本研究の最初のモデル化合物) との結合定数は、L 体で 82, D 体で 89 である。 $\beta$ -CD を L 体と D 体の混合溶液に添加し、溶存イオン抽出デバイスの試料溶液チャンネルへと導入した。電場を設けると、錯形成しにくく D 体より泳動しやすい L 体が選択的に抽出されると期待された。わずかな差ではあるが、種々の抽出条件 (印加電圧, 溶液流量,  $\beta$ -CD 濃度, 溶液 pH) を最適化することで、L 体がより高い効率で抽出された (図 1 左)。そこで、L 体と D 体で結合定数の差が大きい 2-ヒドロキシプロピル- $\beta$ -シクロデキストリン (Hp- $\beta$ -CD) をキラルセクターとした。すると、抽出における選択性が向上した。試料中 Hp- $\beta$ -CD 濃度を大きくすることでさらなる選択性の向上が期待される。しかしながら、Hp- $\beta$ -CD の溶解度は大きくないため、Hp- $\beta$ -CD をイオン透過膜に高濃度に含有する方法を検討した。疎水性多孔質膜を高濃度に Hp- $\beta$ -CD を溶解した 2-ブタノール溶液に浸すことでポア内を満たした膜を検討した。膜内にキラルセクターを容易に導入する手法を確立した。さらに、高濃度 Hp- $\beta$ -CD による高い選択透過性を広い面積で実現するため、イオン透過性の高い透析膜の間に Hp- $\beta$ -CD の 2-ブタノール溶液を貯めた溶液膜 (liquid membrane) を厚さ 0.1 mm で形成した。この liquid membrane を構築した ITD で実際に、フェニル酪酸の L 体と D 体の混合溶液を試料溶液として導入したところ、これまでよりも高い L 体選択性を示した。本法では、L 体に対して有意に高い選択性を示した。従来の膜型光学分割デバイスでは、一定量の溶液を送液ポンプでデバイス内に繰り返し循環させることで選択的な抽出が達成されてきた。より高い選択性のために、抽出率が犠牲とされたためである。本研究で用いた ITD は、もともとワンパスで定量的な溶存イオンの抽出を実現しており、liquid membrane とすることで抽出率は低下したが、選択性の点でも従来の手法と比べて、高い特性が得られた。

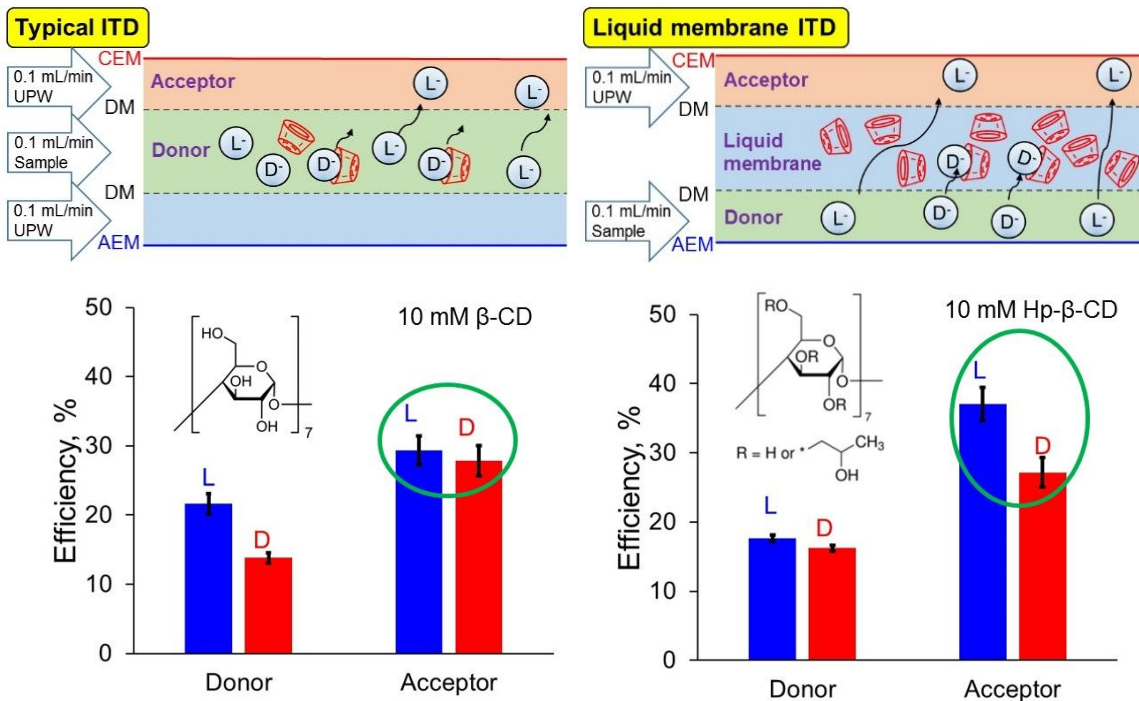


図 1 溶液に導入した光学分割剤シクロデキストリンの種類と分離効率

これまでに、イオン透過膜に光学選択性を持たせることが、最も効率的な分離法であることが示された。そこで、新たにキラルセクターとの分析対象物質の複合体を選択的に透過する膜を合成した。合成条件、抽出条件を最適化したところ、図 2 に示す分離特性が得られた。試料溶液 (donor) からの抽出効率も 80% を超え、さらに、選択性も 2 を超えた。これまでに報告される選択性は、試料溶液の循環させる方法において、1.6 程度であり、試料溶液を循環するのではな

く、ワンパスでかつ 80%を超える抽出率が得られる本法は、光学異性体の選択抽出において従来にない高い特性を示した。

また、本法は、数多くのアミノ酸の中から 1 つのアミノ酸を選択的に抽出することも可能であり、新たな分析法の展開、また、既存の工業的精製プロセスを置き換える技術としても今後の展開が期待できる。

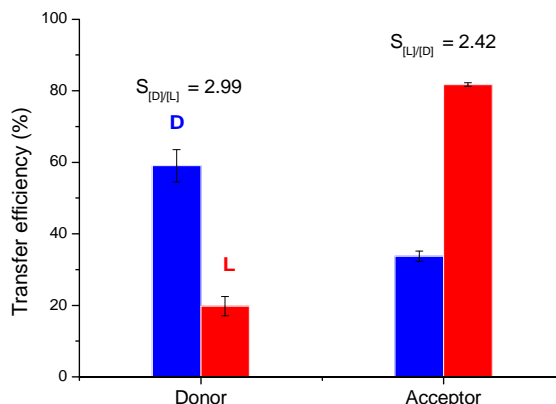


図 2 高選択性・透過性膜による光学分割

(2) 分離カラムの後段に接続しても分離能が低下しない ITD の開発

これまで用いてきた ITD では、高い抽出特性を得るため、チャンネルサイズを幅 5 mm、長さ 40 mm としており、ポストカラムで使用すると、分離されたピークが広がるため、分離特性を大きく悪化させた。そのため、新たにクロスフロー型 ITD (cITD) を考案した。cITD は、大流量の試料溶液チャンネルと小流量のアクセプターチャンネルがクロスする構造で、交差部に電場を設けることで、抽出が達成される (図 3)。電場が極狭いエリア (1x10 mm) にのみかかるため、分離後のピーク形状を維持したままでの検出が可能である。さらに、溶存イオンを全量抽出することで、試料溶液とアクセプター溶液の流量比と同じ濃縮倍率を得ることができる。実際に、本法を陰イオンクロマトグラフィーに組み込んだところ、図 4 に示すようにピーク形状を維持したまま、10 倍に感度を向上できた。この cITD に光学異性体選択性膜を組み込むことで、分離カラムで物質ごとに分けた後、さらに、光学分割する同時分析法を構築を進めていく。

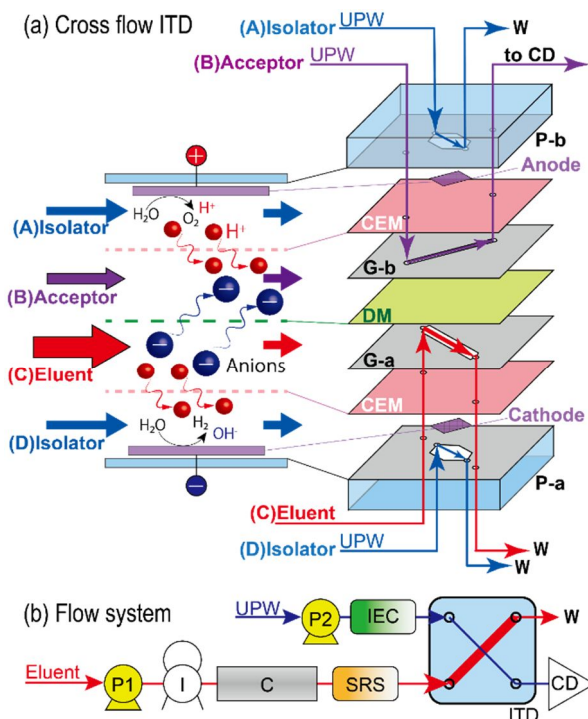


図 3 クロスフロー型 ITD の構成図

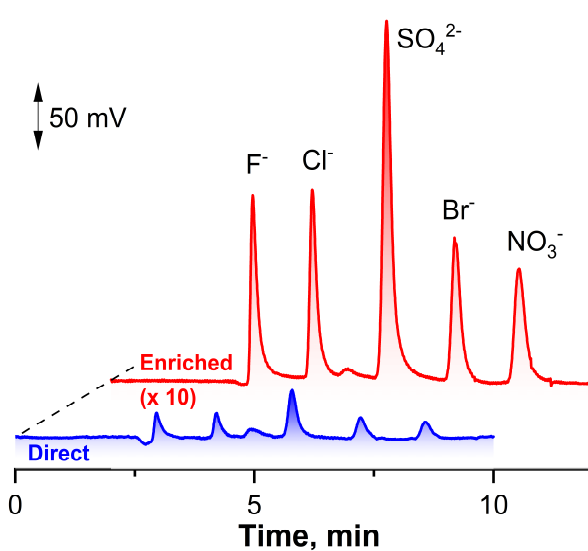


図 4 クロスフロー型 ITD によるポストカラム濃縮

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 NUGRAHA Willy Cahya, NAGAI Haruka, OHIRA Shin-Ichi, TODA Kei	4. 巻 -
2. 論文標題 Semi-Continuous Monitoring of Cr(VI) and Cr(III) during a Soil Extraction Process by Means of an Ion Transfer Device and Graphite Furnace Atomic Absorption Spectroscopy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Analytical Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2116/analsci.19SBN02	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Shin-Ichi Ohira, Tomomi Sakaki, Ryoma Miyachi, Aoi Otsubo, Asami Umemoto, Yoshihide Kuwahara, Kei Toda	4. 巻 -
2. 論文標題 Miniaturized crossflow ion transfer device for post-column enrichment in ion chromatography	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Talanta	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.talanta.2020.120989	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 OHIRA Shin-Ichi, TODA Kei	4. 巻 68
2. 論文標題 Universal Detection Methods in Ion Chromatography	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BUNSEKI KAGAKU	6. 最初と最後の頁 153～162
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2116/bunsekikagaku.68.153	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 OHIRA Shin-Ichi, OKAZAKI Chinatsu, TODA Kei	4. 巻 67
2. 論文標題 Electrodialytic Matrices Isolation for Determination of Heavy Metals in Soil Extracts by Anodic Stripping Voltammetry	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BUNSEKI KAGAKU	6. 最初と最後の頁 761～766
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2116/bunsekikagaku.67.761	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ohira Shin-Ichi, Kaneda Kyosuke, Matsuzaki Toru, Mori Shuta, Mori Masanobu, Toda Kei	4. 巻 90
2. 論文標題 Universal HPLC Detector for Hydrophilic Organic Compounds by Means of Total Organic Carbon Detection	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 6461 ~ 6467
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.7b04849	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 Stamos Brian N., Dasgupta Purnendu K, Ohira Shin-Ichi	4. 巻 89
2. 論文標題 Admittance Scanning for Whole Column Detection	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 7203 ~ 7209
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.7b01412	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Ohira Shin-Ichi, Nugraha, Willy Chaya, Toda Kei	4. 巻 34
2. 論文標題 Review: Speciation Analysis of Chromium Oxidation States by Flow Injection Analysis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Flow Injection Analysis	6. 最初と最後の頁 5-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Ohira Shin-Ichi, Yamasaki Takayuki, Koda Takumi, Kodama Yuko, Toda Kei	4. 巻 180
2. 論文標題 Electrodialytic in-line preconcentration for ionic solute analysis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Talanta	6. 最初と最後の頁 176 ~ 181
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.talanta.2017.12.054	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 Shin-Ichi OHIRA, Nao NAKAMURA, Masaaki ENDO, Yusuke MIKI, Yasuo HIROSE, Kei TODA	4. 巻 34
2. 論文標題 Ultra-sensitive Trace-Water Optical Sensor with In situ- synthesized Metal Organic Framework in Glass Paper	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Analytical Sciences	6. 最初と最後の頁 495-500
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2116/analsci.17P453	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14件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 Shin-Ichi Ohira
2. 発表標題 Miniaturized cross flow electrodialytic device for flow injection analysis and post-column enhancement on an ion chromatography
3. 学会等名 International symposium on miniaturized systems for chemical separation and analysis (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大平慎一, 佐藤裕香, 戸田 敬
2. 発表標題 pHによる有機酸のユニバーサル検出
3. 学会等名 第36回イオンクロマトグラフィー討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大平慎一
2. 発表標題 技術賞受賞講演：電場と膜透過を利用した溶存イオン抽出による前処理・濃縮・分離技術の開発
3. 学会等名 第36回イオンクロマトグラフィー討論会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大平慎一, 宮地凌, 丸山洋平, 須郷由美, 石岡典子, 森 勝伸, 戸田 敬
2. 発表標題 電気透析による放射性金属イオンの抽出とカウンターイオンの置換
3. 学会等名 第38回溶媒抽出討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Bhakti Dwi Yoga, Shin-Ichi Ohira, Kei Toda
2. 発表標題 pH Linear Gradient Generation by Miniaturized Electro-dialysis Device for Chromatographic Separation
3. 学会等名 Asianalysis XIV (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大平慎一, Bhakti Dwi Yoga, 森 秀太, 伊藤貴啓, 戸田 敬
2. 発表標題 電気透析による緩衝溶液の生成とpHのフィードバック制御
3. 学会等名 第78回分析化学討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大平慎一
2. 発表標題 標準物質フリーなHPLCの検出システム
3. 学会等名 第31回バイオメディカル分析科学シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2018年



1. 発表者名 堀内一希, 大平慎一, 戸田 敬
2. 発表標題 電場と膜透過による光学分割の基礎検討
3. 学会等名 日本分析化学会第67年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shin-ichi Ohira
2. 発表標題 Sample pretreatment and separation of ionic solutes by means of electro dialysis
3. 学会等名 3rd International Symposium on Green Technology for Value Chains (GreenVC 2018) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大平慎一, 金田恭介, 戸田 敬
2. 発表標題 標準物質フリーなユニバーサル検出器とその応用
3. 学会等名 第77回分析化学討論会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大平慎一
2. 発表標題 Quantification System without Standard Materials for High Performance Liquid Chromatography (HPLC)
3. 学会等名 第23回日本化学会九州支部・韓国化学会釜山支部合同セミナー (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大平慎一, Willy Cahya Nugraha, 戸田 敬
2. 発表標題 電場による泳動と膜透過による分離手法の展開
3. 学会等名 日本分析化学会第66年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Shin-ichi Ohira, Kyosuke Kaneda, Kei Toda
2. 発表標題 Calibration free detection system for HPLC
3. 学会等名 Asia/ CJK symposium on analytical science 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大平慎一
2. 発表標題 ダイナミックな相間移動による 前処理・分離・検出
3. 学会等名 徳島大学薬学部 第5回Brightシンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<a href="http://www.sci.kumamoto-u.ac.jp/~ohira/">http://www.sci.kumamoto-u.ac.jp/~ohira/</a>
---

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------