

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580192

研究課題名(和文) [金属イオン-配位子]カクテルを用いた新規なキラル配位子交換法の開発

研究課題名(英文) Development of chiral ligand-exchange method using selector ligand and/or metal ion cocktails

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) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：1種類の配位子と2種類の金属イオンから成る泳動緩衝液を用いた配位子交換キャピラリー電気泳動法により、リンゴ酸、酒石酸およびイソクエン酸の光学異性体分析法を検討した。配位にD-キナ酸を、金属イオンにCu(II)イオン単独で用いると、酒石酸だけが学分割され、リンゴ酸とイソクエン酸は光学分割されなかった。しかし、金属イオンとして銅(II)イオンにSc(III)イオンを混合すると、3種類の α -ヒドロキシ酸はすべて光学異性体分離され、また、クエン酸も同時に分析できることが分かった。この配位子交換法はジュース中の α -ヒドロキシ酸光学異性体分析に適用できた。

研究成果の概要(英文)：Using a singular ligand and a dual central ion in a background electrolyte, a ligand exchange CE was investigated for the simultaneous enantioseparation of malic, tartaric and isocitric acids. Tartaric acid was enantioseparated by a ligand exchange CE with 100 mM D-quinic acid as a singular ligand and 10 mM Cu(II) ion as a singular central ion, but malic and isocitric acids were not enantioseparated. Addition of 1.8 mM Sc(III) ion to the background electrolyte with 10 mM Cu(II) ion to create a dual central metal ion system permitted the simultaneous determination of these α -hydroxy acid enantiomers and citric acid. The proposed ligand exchange CE was thus well suited for detecting adulteration of fruit juices.

研究分野：農学

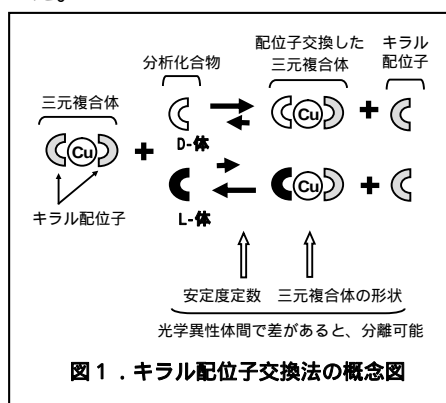
科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：キャピラリー電気泳動 配位子交換 光学分割 α -ヒドロキシ酸 ジュース

1. 研究開始当初の背景

有機酸は様々な食品中の主要成分であり、食品添加物としても使われている他、近年、生分解性プラスチックの原料としての用途も開拓されてきた。しかし、通常有機酸分析は広く行われているが、光学異性体を含めた有機酸類を網羅的には分析できないのが現状である。メタボロミクス研究においても有機酸の光学異性体分析は今後の研究課題となっている。

有機酸を高速液体クロマトグラフィーで光学異性体分析する場合、実試料には様々なマトリックス成分が存在するため、直接光学異性体分析カラムには導入できず、一度アキラルな分析カラムで目的化合物を分取した後、光学分割カラムで分析する必要がある。また、酵素法によるキットが市販されているが、各有機酸光学異性体の個別測定となり、測定できる有機酸は限られている。これに対し、キャピラリー電気泳動法は分離効率が高く、試料抽出液を直接光学異性体分析できるメリットがある。キラル配位子交換法は Davancov の先駆的な研究(Davankov, V.A *et al.*, *J. Chromatogr.*, 1971, **60**, 284-312)に端を発し、キャピラリー電気泳動法にも導入された(Gassmann, E. *et al.*, *Science* 1985, **230**, 813-814)。この方法は中心イオンに配位したキラル化合物(配位子)と分析化合物との交換反応により、[配位子 - 中心イオン - 分析化合物] からなる三元複合体の安定度定数や形状が光学異性体間で差ができたときに光学分割が可能となる(図1)。これまで、中心イオンとして Cu(II)イオンが、配位子としてアミノ酸やその誘導体だけが用いられ、アミノ酸やその誘導体が光学分割の対象となっていた。



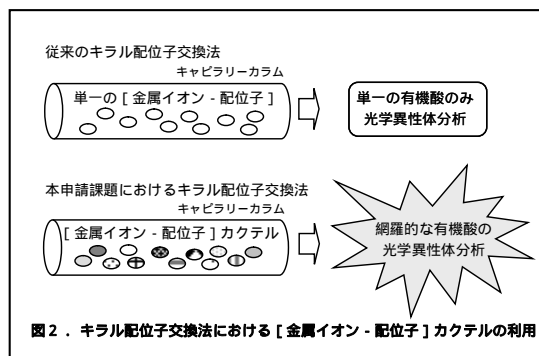
最近、Cu(II)イオンの代わりに Zn(II)イオン(Qi, L., *et al.*, *Electrophoresis*, 2007, **28**, 2629-2634) や Co(II)イオン(Hodl, H. *et al.*, *J. Chromatogr. A*, 2008, **1204**, 210-218) を中心イオンに用いた光学分割法が報告されたが、分析対象化合物はやはりアミノ酸やその誘導体であった。

キャピラリー電気泳動法による有機酸の

光学異性体分析は、我々以外にはほとんど報告されていない。これまで、キャピラリー電気泳動法を用いて、乳酸(*J. Chromatogr. A*, 2000, **875**, 371-377)、リンゴ酸(*Electrophoresis*, 2001, **22**, 3286-3290)、酒石酸(*J. Chromatogr. A*, 2001, **932**, 139-143.) 及びイソクエン酸(研究業績1)の光学異性体分析法を開発し、食品分析に応用してきた。しかし、これら有機酸の光学異性体分析法はいずれも乳酸についてはシクロデキストリンを光学分割剤として用いたが、残りの3化合物についてはいずれもキラル配位子交換法で行い、それぞれ Co(II) - L-酒石酸、Cu(II) - D-キナ酸及び Ni(II) - D-キナ酸を光学分割剤とした。上記4種類の光学分割剤ではそれぞれ対象化合物のみが光学異性体分離されたが、他の化合物には適用できていない。

2. 研究の目的

(1) 本研究初期段階において、金属イオンとして Co(II)、Cu(II)、Ni(II)、Zn(II)イオンなどの遷移金属イオンを用い、それぞれの金属イオンについて多種多様なキラル配位子を個別に組み合わせて各種有機酸類の光学分割能を比較検討する。光学分割能を有する[金属イオン - キラル配位子]の組み合わせを任意の割合で混合して[金属イオン - キラル配位子]カクテルを光学分割剤とし、網羅的な有機酸の光学異性体分析法を構築することを第一の目標とする。



(2) 上記(1)で確立したキラル配位子交換法により、果実及びジュース類を中心とした真正証明としての応用を図るとともに、植物や加工食品中での有機酸のキラルな動態等を明らかにする。

(3) キラル配位子交換における[金属イオン - 配位子]複合体の構造については未だ詳細が明らかにされていない。そこで、NMR、ESR、円二色性スペクトル分光法などの分析手段や分子軌道計算を用いて、光学分割能を示した[金属イオン - キラル配位子]複合体の構造を明らかにし、分離メカニズムの詳細を解明する。

3. 研究の方法

(1) 金属イオンとキラル配位子の種々の組み合わせについて、有機酸光学異性体の分離能について検討する。金属イオンとして Mn(II)、Fe(III)、Co(II)、Ni(II)、Cu(II)、Zn(II)等の遷移金属イオンを用い、キラル配位子として自然界に存在するキラルな有機酸の他、化学合成されているキラルな有機酸など、できる限り多くの種類で検討する。我々はD-キナ酸を配位子としたイソクエン酸の光学異性体分析を通して、上記6種類の金属イオンの内Mn(II)を除く5種類の金属イオンでD-及びL-イソクエン酸の分離が可能であることを見いだしている。分離度については様々であったが、金属イオンとD-キナ酸の濃度を変えることにより分離度も変化するため、金属イオンの濃度に加えて配位子との濃度比を変えた系、pH や有機溶媒添加などの影響についても検討する。

(2) 食品や生体試料分析については、基本的に前処理操作を必要としないが、分析を妨害する複雑なマトリックス成分を含む試料を想定し、有機酸分析専用の前処理カートリッジ充填剤を開発する。前処理操作の評価法としては光学異性体分析法が検討中であるため、すでに報告されているアキラルな分析法(キラル分析でない、通常分析法)により行なう。

(3) キラル配位子交換の分離メカニズムの検討にあたっては、前記した研究目的の で記載した D-キナ酸/金属イオンの濃度比の増加に伴って D-酒石酸と L-酒石酸の泳動時間が逆転する現象について、円二色性及び吸収スペクトル分析、分子軌道計算により解析する。

4. 研究成果

(1) 2種類の中心イオンを用いた配位子交換法
リンゴ酸、酒石酸およびイソクエン酸を対象化合物として、Al(III)、Mn(II)、Fe(III)、Co(II)、Ni(II)、Cu(II)および Zn(II)イオンの7種類の中心金属イオンとD-キナ酸(1:10のモル比)の組み合わせで上記有機酸類の分析を試みた。その結果、Fe(III)-D-キナ酸の組み合わせで上記3種類の有機酸はすべて光学異性体分離された。しかし、ピーク形状やベースラインに問題があり、Fe(III)とD-キナ酸の添加比を変えても改善は見られなかった。Al(III)、Mn(II)および Zn(II)イオンを用いた場合には有機酸のピークを検出することはできなかった。Co(II)および Ni(II)イオンを用いると有機酸のピークは検出されたが、いずれも光学分割されなかった。Cu(II)イオンのみを配位子とした系では酒石酸だけが光学異性体分離されたが、検討した金属イオンの中では最も泳動時間が短く、分析感度が高かった(図3)。このため、金属イオンの一つをCu(II)イオンに固定し、二つ目の金属イオンとして残りの6種類の金属イオンとの組み合わせにつ

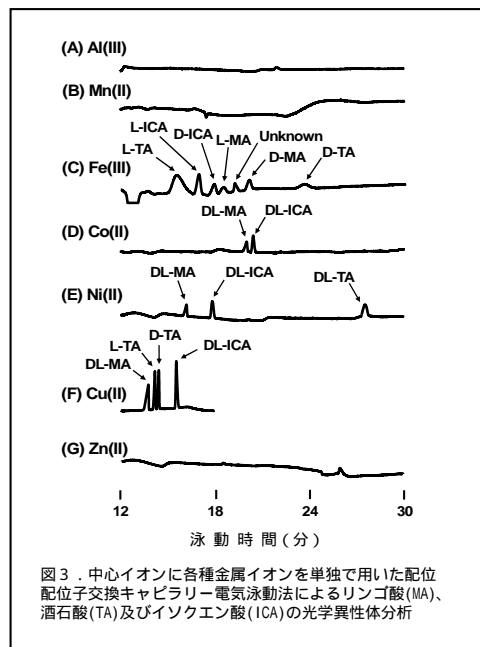


図3. 中心イオンに各種金属イオンを単独で用いた配位子交換キャピラリー電気泳動法によるリンゴ酸(MA)、酒石酸(TA)及びイソクエン酸(ICA)の光学異性体分析

いて検討を加えた。その結果、Cu(II)イオンとAl(III)イオンの2種類の金属イオンを組み合わせた系でリンゴ酸、酒石酸およびイソクエン酸の光学異性体を一斉分析できることが分かった(図4)。

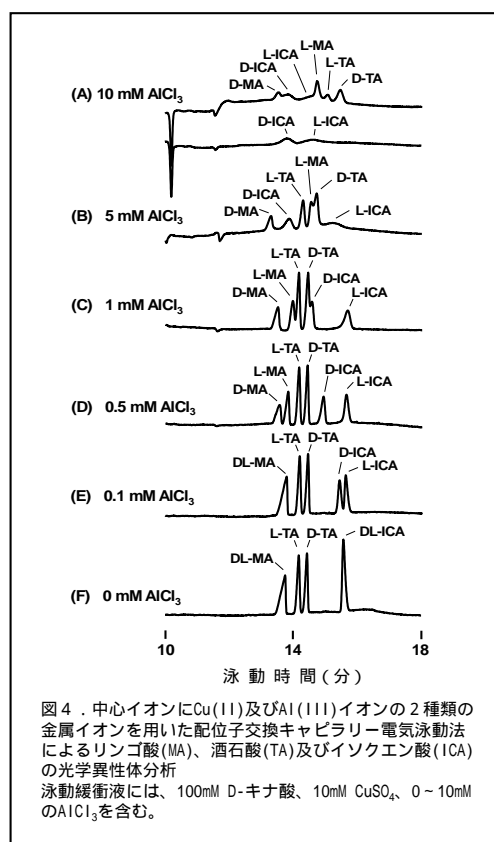


図4. 中心イオンにCu(II)及びAl(III)イオンの2種類の金属イオンを用いた配位子交換キャピラリー電気泳動法によるリンゴ酸(MA)、酒石酸(TA)及びイソクエン酸(ICA)の光学異性体分析
泳動緩衝液には、100mM D-キナ酸、10mM CuSO₄、0-10mMのAlCl₃を含む。

(2) 2種類の中心イオンを用いた配位子交換法による実試料分析

上記で検討したCu(II)およびAl(III)の2種類の金属イオンを中心イオンとし、D-キナ酸を配位子とした配位子交換CE法でジュース中の有機酸の分析を試みた。これまで、リンゴ酸、酒石酸、イソクエン酸の光学異性体分

離に注目してきたが、クエン酸もジュース中の主要な有機酸であるためピークの確認を行った。上記4種類の有機酸を分析したところ、クエン酸は酒石酸とイソクエン酸のピークにまたがるようなブロードなピーク形状を示した(図5-A, B)。Cu(II)とAl(III)イオンの組成比や金属イオンと配位子の組成比を種々検討したが、改善はみられなかった。そこで、さきに行った2種類の金属イオンの組み合わせを再検討した。ここでも金属イオンの一つをCu(II)イオンに固定し、他の金属イオンとして新たにSc(III)、V(III)、Cr(III)およびGa(III)などの3価のイオンを用いた。その結果、Cu(II)とSc(III)イオンの組み合わせにより4種類の有機酸およびその光学異性体をすべて分離できることが分かった(図5-C)。最適な条件は100 mM D-キナ酸、10 mM CuSO₄、1.8 mM ScCl₃の組み合わせであった(図6)。

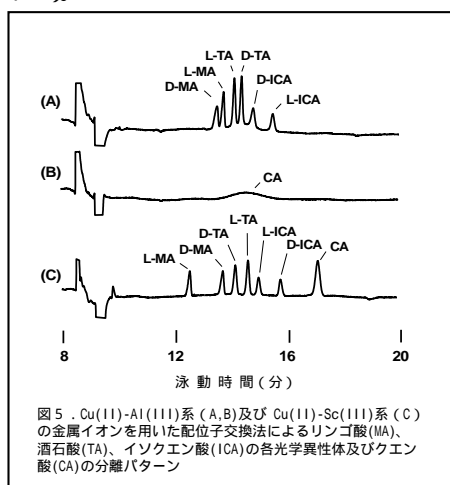


図5. Cu(II)-Al(III)系(A, B)及びCu(II)-Sc(III)系(C)の金属イオンを用いた配位子交換法によるリンゴ酸(L-MA)、酒石酸(TA)、イソクエン酸(ICA)の各光学異性体及びクエン酸(CA)の分離パターン

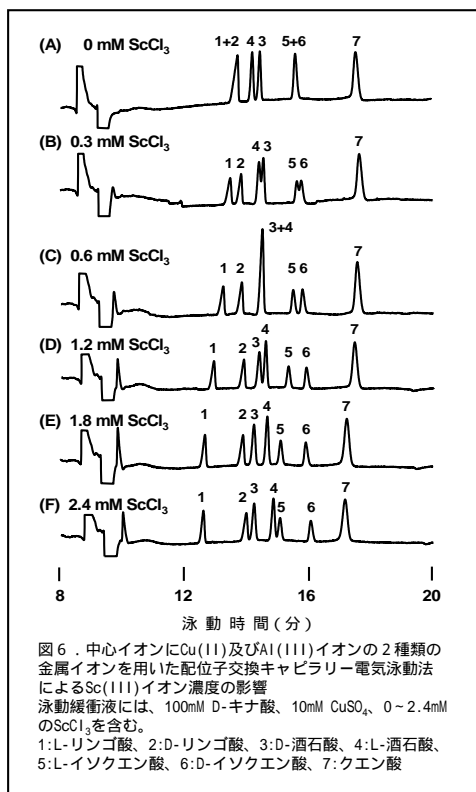


図6. 中心イオンにCu(II)及びAl(III)イオンの2種類の金属イオンを用いた配位子交換キャピラリー電気泳動法によるSc(III)イオン濃度の影響
泳動緩衝液には、100mM D-キナ酸、10mM CuSO₄、0~2.4mMのScCl₃を含む。
1: L-リンゴ酸、2: D-リンゴ酸、3: D-酒石酸、4: L-酒石酸、5: L-イソクエン酸、6: D-イソクエン酸、7: クエン酸

この分析系ではシュウ酸とマロン酸のピークも良好に検出できたが、乳酸などの1価の有機酸は検出されなかった。また、コハク酸、マレイン酸やフマル酸のピークは検出できなかった。これは検出に必要な安定な錯体形成が起こりにくいためと推定された。すなわち、検出された有機酸はCu(II)イオンと5員環あるいは6員環キレートを有する錯体を形成するのに対し、コハク酸やマレイン酸は不安定な7員環キレートとなり、フマル酸はキレートを形成できないためと考えられる。本法を用いてリンゴ、ブドウおよびオレンジジュースなどの分析を行った。試料は水で希釈し、遠心分離した上清のろ液を用いた。ただし、オレンジジュースだけはSep-Pak Plus tC18カートリッジの非吸着画分を試料とした。その結果、これらジュース類中の有機酸を良好に分析できることが分かった。ブドウジュース1件からD-リンゴ酸が検出された(図7)。

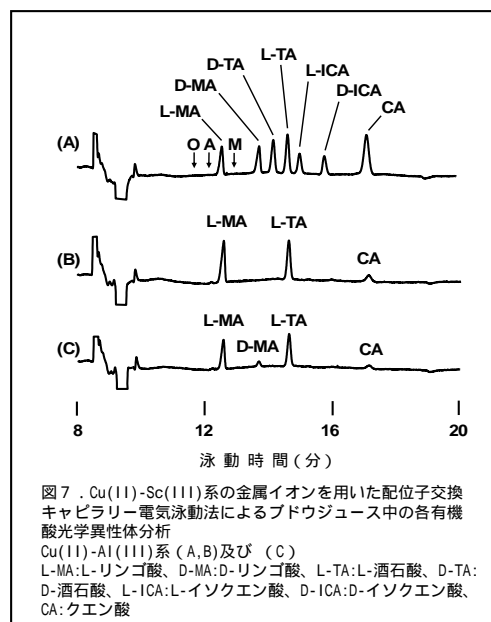


図7. Cu(II)-Sc(III)系の金属イオンを用いた配位子交換キャピラリー電気泳動法によるブドウジュース中の各有機酸光学異性体分析
Cu(II)-Al(III)系(A, B)及び(C)
L-MA: L-リンゴ酸、D-MA: D-リンゴ酸、L-TA: L-酒石酸、D-TA: D-酒石酸、L-ICA: L-イソクエン酸、D-ICA: D-イソクエン酸、CA: クエン酸

(3) 有機酸光学異性体の泳動順と分離メカニズム

興味深いことに、Cu(II) - Al(III)系とCu(II) - Sc(III)系の配位子交換法では有機酸の光学異性体の泳動順が逆転した。すなわち、Cu(II) - Al(III)系ではリンゴ酸はDLの順に、酒石酸ではLDの順に、イソクエン酸ではDLの順に泳動された。しかし、Cu(II) - Sc(III)系ではそれぞれLD、DLおよびLDの順であった。次にCu(II)イオン濃度を10 mMに固定してSc(III)イオン濃度を変える実験を行った。Sc(III)イオンがないと酒石酸だけが光学分割されLDの順で検出された。Sc(III)イオンの濃度が増加するにつれてリンゴ酸とイソクエン酸の光学異性体の分離度は増加し、ともにLDの順で泳動された。一方、酒石酸は0.6

mM のSc(III)イオンの添加で光学分割されなくなり、さらに Sc(III)イオンを加えていくと DL の順で光学分割されたため、泳動順は Sc(III)イオンの添加により逆転する結果となった。この結果から、Cu(II)イオンの役割は有機酸の配位による検出感度の増強と有機酸ごとのアキラルな分離であり、Sc(III)イオンは光学異性体分離に関与していることが明らかとなった。

分離メカニズムについては、D-キナ酸 - Cu(II)イオンを泳動緩衝液としたときの酒石酸の光学異性体分離について明らかにした。D-キナ酸 / Cu(II)イオンの濃度比が増加に伴って D-酒石酸と L-酒石酸の泳動順が逆転する現象について、円二色性及び吸収スペクトル分析、分子軌道計算を用いて解析した。その結果、D-キナ酸 / Cu(II)イオンの濃度比(1:1 ~ 1:3)が低いときには D-キナ酸 - Cu(II)イオン複合体(1:1)に D-酒石酸が優先的に結合して D-キナ酸 - Cu(II) - D-酒石酸が生成しやすいのに対し、D-キナ酸 / Cu(II)イオンの濃度比(8:1 ~ 12:1)が高いときには D-キナ酸 - Cu(II)イオン複合体(2:1 あるいは 3:1)に L-酒石酸が優先的に結合、あるいは配位して D-キナ酸 - Cu(II)イオン - L-酒石酸(2:1:1)が生成しやすいことが分かった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計10件)

- (1) 小玉修嗣, 赤羽麻美, 會澤宣一, 多賀淳, 山本敦, 早川和一, 新規な配位子交換 - キャピラリー電気泳動法による有機酸および単糖の光学異性体分析, *分析化学*, **63**, 371-382 (2014). (査読有)
- (2) Kodama, S., Aizawa, S., Taga, A., Yamamoto, A., Honda, Y., Suzuki, K., T Kemmei, T., Hayakawa, K.. Determination of α -hydroxy acids and their enantiomers in fruit juices by ligand exchange capillary electrophoresis with a dual central metal ion system. *Electrophoresis*, **34**, 1327-1333 (2013). (査読有)
- (3) Kemmei, T., Kodama, S., Yamamoto, A., Inoue, Y., Hayakawa, K., Determination of ethylenediaminetetraacetic acid in foods by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Food Chem.*, **138**, 866-869 (2013) (査読有)
- (4) Kodama, S., Yamamoto, A., Aizawa, S., Honda, Y., Suzuki, K., Kemmei, T., Taga, A., Enantioseparation of α -hydroxy acids by chiral ligand exchange CE with a dual central metal ion system. *Electrophoresis*, **33**, 2920-2924 (2012) (査読有)
- (5) Kodama, S., Taga, A., Aizawa, S., Kemmei, T., Honda, Y., Suzuki, K., Yamamoto, A., Direct Enantioseparation of lipoic acid in dietary supplements by capillary electrophoresis using trimethyl- β -cyclo-dextrin as a chiral selector. *Electrophoresis*, **33**, 2441-2445 (2012). (査読有)
- (6) Aizawa, S., Kodama, S., Mechanism of Change in Enantiomer Migration Order of Enantioseparation of Tartaric Acid by Ligand Exchange Capillary Electrophoresis with Cu(II) and Ni(II)—D-Quinic Acid Systems. *Electrophoresis*, **33**, 523-527 (2012). (査読有)
- (7) Taga, A., Kodama, S., Analysis of reducing carbohydrate and fructosyl saccharides in maple syrup and maple sugars by CE. *Chromatographia*, **75**, 1009-1016 (2012). (査読有)
- (8) Taga, A., Sato, A., Suzuki, K., Takeda, M., Kodama, S., Simple determination of a strongly aromatic compound, sotolon, by capillary electrophoresis. *J. Oleo Sci.*, **61**, 45-48 (2012). (査読有)
- (9) Kemmei, T., Kodama, S., Fujishima, H., Yamamoto, A., Inoue, Y., Hayakawa, K., Determination of ethylenediaminetetraacetic acid in sea water by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, **709**, 54-58 (2012). (査読有)
- (10) Yamamoto, A., Miwa, T., Kawai, M., Tadokoro, T., Tsutsumi, K., Sato, T., Kodama, S., Hayakawa, K., Development of a variable-wavelength optical rotation detector in the ultraviolet region. *Anal. Sci.*, **27**, 799-803 (2011). (査読有)

[学会発表](計7件)

- (1) 小玉修嗣, 他、有機酸のキラル配位子交換キャピラリー電気泳動分析、第30回イオンクロマトグラフィー討論会、2013年11月28 - 29日、(株)豊田中央研究所
- (2) 小玉修嗣, 他、ジュース中有機酸光学異性体のキャピラリー電気泳動分析、日本分析化学会第62年会、2013年9月10 - 12日、近畿大学東大阪キャンパス
- (3) 小玉修嗣, 他、Cu(II)及びSc(III)の2種類

の金属イオンを中心イオンに用いた配位子交換キャピラリー電気泳動法による有機酸類の光学異性体分析、第73回分析化学討論会、2013年5月18-19日、北海道大学函館キャンパス

- (4) 小玉修嗣、他、有機酸の光学異性体分析 - 2価及び3価の金属イオンを組合わせた中心イオンによる配位子交換キャピラリー電気泳動法の開発、日本分析化学会第61年会、2012年9月19-21日、金沢大学角間キャンパス
- (5) Aizawa, S., *et al.* Change in enantiomer migration order of tartaric acid on ligand exchange capillary electrophoresis with Cu(II) and Ni(II)-D-quinic acid system. IUPAC International Congress on Analytical Sciences 2011, May 22-26, 2011, Kyoto International Conference Center.
- (6) Kodama, S., *et al.* Enantioseparation of galactose by ligand-exchange capillary electrophoresis using borate as a central ion of the chiral selector. IUPAC International Congress on Analytical Sciences 2011, May 22-26, 2011, Kyoto International Conference Center.
- (7) 小玉修嗣、他、2種類の金属イオンを中心イオンに用いたキラル配位子交換キャピラリー電気泳動法による有機酸光学異性体分析、日本薬学会132年会、2012年3月29-31日、北海道大学札幌キャンパス

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

山本 敦 (YAMAMOTO ATSUSHI)
中部大学・応用生物学部・教授
研究者番号：60360806

(3) 研究分担者

會澤 宣一 (AIZAWA SEN-ICHI)
富山大学・理工学研究部・教授
研究者番号：60231099

(4) 研究分担者

多賀 淳 (TAGA ATSUSHI)
近畿大学・薬学部・準教授
研究者番号：20247951