

キラルイミダゾリジノン環を有する新規カルボキシ基用誘導体化試薬の創製と 高速液体クロマトグラフィー-タンデム型質量分析計を用いた分離検出への応用

分子病態解析学講座 海野真帆

序論

高速液体クロマトグラフィー-タンデム型質量分析計 (LC-MS/MS) は医療分野をはじめ、食品、環境分析領域等で利用される分析装置である。分析対象となる物質がカルボキシ基を持つ場合、逆相型カラムを用いた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) では、固定相に保持させるために通常、移動相を弱酸性の pH に調整する。しかし、カルボキシ基は陰イオンとして検出されやすいため、弱酸性移動相を用いると、質量分析計 (MS) での検出感度が低下する。そこで、カルボキシ基を有する化合物の LC-MS/MS 分析では、そのカルボキシ基を誘導体化することで検出感度の向上が期待できる。

一方、分析対象物質が光学活性体の場合は、光学異性体の分別定量が必要になるケースがある。HPLC を用いる光学異性体の分離分析には、キラルカラム法が有効であるが、キラルカラムは光学活性分子で化学修飾された粒子を充填しているため高額である。それに加えて、多数の検体を分析することによる劣化は避けられず、永久に使用できるものでない。そのため、より安価で耐久性が高い逆相型固定相がより好ましいと言える。しかし、逆相型固定相を用いて光学異性体の分離分析を行うためには、分析対象物質をジアステレオマーへ誘導体化する必要がある。

こうした研究背景から、本研究では、光学活性有機酸の分離検出を、キラルカラムを用いることなく、汎用性が高いオクタデシルシリル化シリカゲル (ODS) カラムを使用して行うための新規 LC-MS/MS 用ジアステレオマー誘導体化試薬を創製した。次に、創製した新規試薬を用いて、食品試料及び生体試料の分析へ応用した。

第一章 新規カルボン酸誘導体化試薬の創製及び評価

ODS カラムを使用して D, L-乳酸 (Lac) などの光学活性有機酸を効率的に分離分析できる LC-MS/MS 用新規誘導体化試薬の創製を目的として、本研究では、当教室で開発されたアミノ基用ジアステレオマー誘導体化試薬 CIMA-OSu (特開 2022-092263) を基にして試薬を設計した。

CIMA-OSu は、キラルイミダゾリジノン (CIM) 環を持ち、光学活性アミノ酸を効率的に分離できる試薬であった。このことから、CIMA-OSu のスクシンイミドエステルを、カルボキシ基とアミド結合させるために第一級アミノ基へ置き換えた化合物 (CIM 環をもつ試薬 a, b)、および CIM 環を持たず不斉炭素がある試薬 (c, d) の計 4 種 (Fig. 1) を 3~4 工程の反応を経て合成した。次に合成した試薬 a~d) を、それぞれ Lac や 3-ヒドロキシ酪酸 (3HB) などの光学活性有機酸のカルボキシ基に脱水縮合反応させ、有

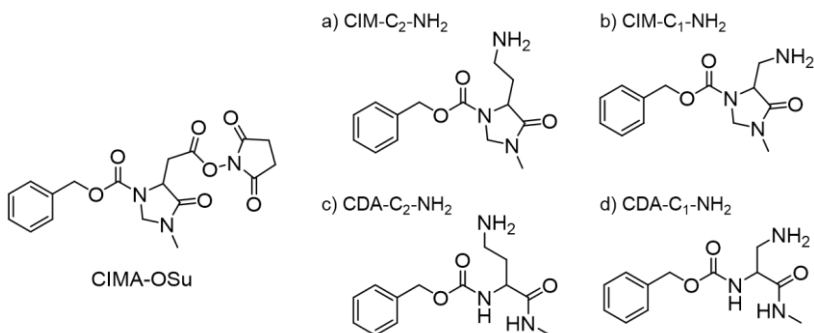


Fig. 1 CIMA-OSuおよび新規誘導体化試薬 a)~d) の構造式

機酸をジアステレオマーに誘導体化した後、ODS カラムを装着した LC-MS/MS (Shimadzu LCMS-8040) により、試薬 a~d) の光学異性体分離能 (分離度 R_s 、分離係数 α) および MS での開裂パターンを評価した。

新たに合成した試薬 a~d) の光学異性体分離能を比較したところ、CIM 環を持つ試薬である CIM-C₂-NH₂ (Fig. 1 a) を使用したとき、誘導体の光学異性体分離能が最も優れており ($R_s > 1.61$)、有機酸光学異性体の完全な分離が達成された (Fig. 2)。

また、光学異性体分離能が最も優れていた CIM-C₂-NH₂ 誘導体の MS での開裂パターンを調べたところ、モノカルボン酸誘導体では $m/z = 91.1$ 、ジカルボン酸誘導体では $m/z = 278$ または $m/z = [M+H] - 277$ の特徴的なプロダクトイオンが認められた (Fig. 3)。CIM-C₂-NH₂ を使用することで、5 種の光学活性有機酸 (乳酸、酒石酸など) と 1 種の光学不活性有機酸 (コハク酸) の一斉分析法を確立した。

新たに合成した誘導体化試薬のうち、CIM-C₂-NH₂ は光学異性体分離に最も優れた試薬であった。また、MS において、モノカルボン酸とジカルボン酸誘導体で異なる特徴的なプロダクトイオンの生成が確認されたことから、モノカルボン酸とジカルボン酸の識別が可能な試薬であった (対象論文 1)。この特徴を生かし、食品及び生体試料へ応用できる可能性が示唆された。

また、以前に行ったカラムスイッチング HPLC では、Lac 光学異性体の分離検出の全自動化は困難であったが (参考論文 1)、プレカラム誘導体化-LC-MS/MS 法では、測定の自動化による終夜運転が可能であり、多検体の分析に適すると考えられる。

第二章 食品試料への応用 -リンゴ中シトラマル酸の定量-

シトラマル酸 (CMA) は、不斉炭素を 1 つ有し (R)-体と (S)-体が存在するジカルボン酸である。しかしながら、(R)-体と (S)-体では合成経路、代謝経路や代謝物も異なっている。また、天然物由来の CMA は (R)-体が主である報告 [Sai et al., *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **11** (4), 355, 1965] と (S)-体が主である報告 [Yin et al., *Food Chemistry: X*, **13**, 100261, 2022] があり、本章で

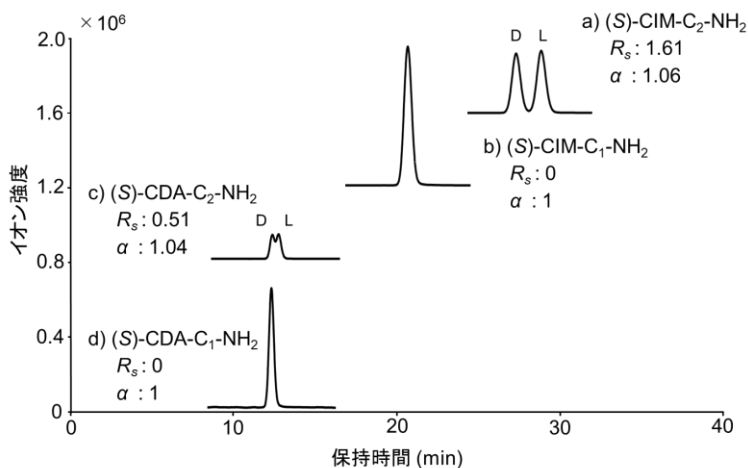


Fig. 2 各誘導体化試薬 a~d) による乳酸光学異性体の分離 (ODSカラムを使用)

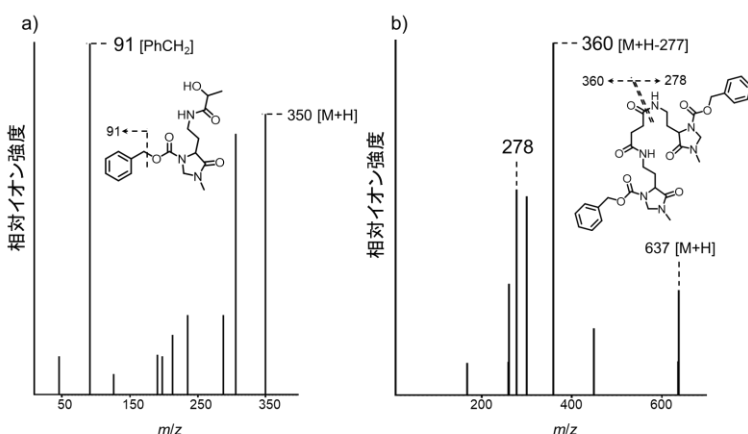


Fig. 3 CIM-C₂-NH₂による a) 乳酸, b) コハク酸誘導体のMSスペクトル

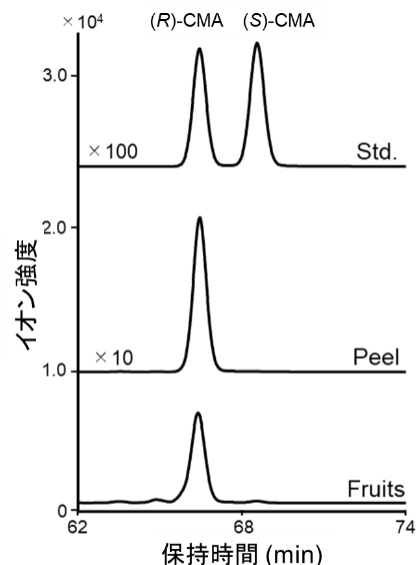


Fig. 4 リンゴ中CMAのクロマトグラム

は (R)-CIM-C₂-NH₂ を使用した応用実験として、リンゴに含有される CMA の絶対配置を明らかにすることを目的とした。市販のリンゴ3種類 (とき・つがる・サンつがる) の実と皮を、それぞれミキサーで攪拌・粉砕した。次に、得られたペーストを遠心分離し、上清をサンプルとした。希釈したサンプル 10 μL を (R)-CIM-C₂-NH₂ で誘導体化し、第一章で確立した測定方法を用いて分析した。

すべてのリンゴの実及び皮から、(R)-CMA のみ検出され、(S)-体は検出されなかった (Fig. 4)。また、検出された (R)-CMA は実よりも皮に多く含まれていた。さらに、赤色品種 (つがる・サンつがる) と黄色品種 (とき) に含まれる (R)-CMA の量を比較すると、赤色品種より黄色品種の方が多かった (Fig. 5)^{対象論文2)}。また、本法を用いて、ワインなどの発酵飲料に含まれる CMA は (R)-体であることも分かった。

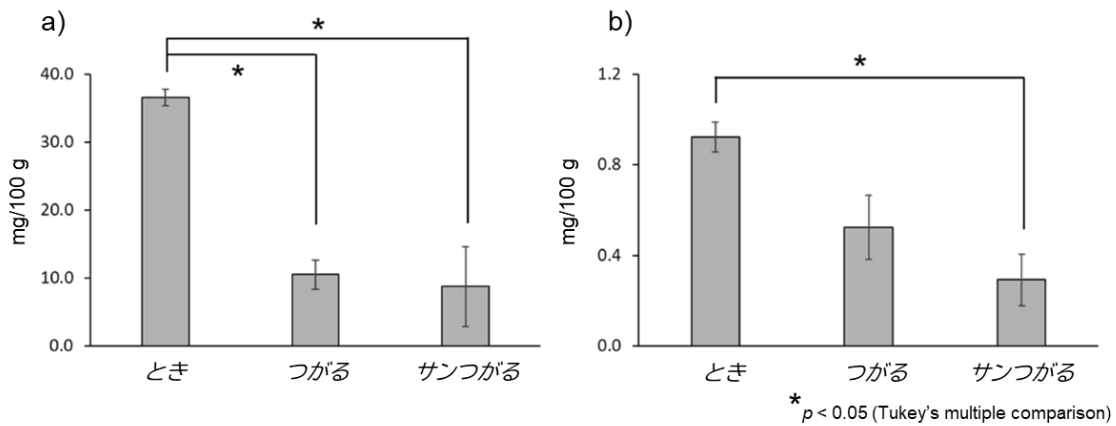


Fig. 5 リンゴの(R)-CMA含量 a) 果皮 b) 果実

第三章 生体試料への応用 -ヒト血清中有機酸の分析-

第三章では、生体試料の分析を目的として、CIM-C₂-NH₂ を使用してヒト血清中有機酸の分離検出を検討した (本学医学部倫理委員会承認番号 A17039-26012、薬学部生命倫理委員会承認番号 Y2021-001)。

文書による同意を得た健常人の血清 30 μL をサンプリングし、MeOH/MeCN で除タンパクした後、遠心分離した。この血清試料を CIM-C₂-NH₂ で誘導体化し、ODS カラムを装着した LC-MS/MS で分析を行った。測定条件は第一章で確立した方法を基に、ヒト血清の測定に適した条件検討を行い、移動相には 0.05% ギ酸 in H₂O / MeCN を用いた最適なグラジエント条件を見出した。

その結果、ヒト血清から L-Lac、D-3HB が良好に検出された (Fig. 6)^{対象論文3)}。

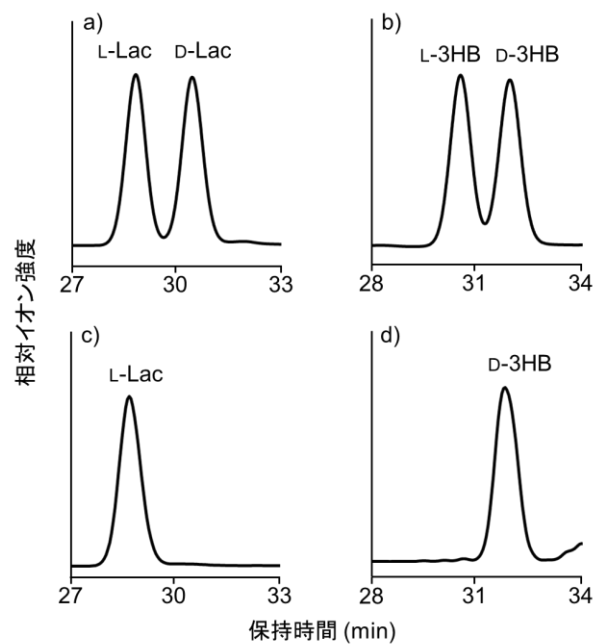


Fig. 6 標準品 (a, b) および血清 (c, d) Lac, 3HB のクロマトグラム

総括

本研究では、はじめに ODS カラムを用いて光学異性体分離を行うため、4 種類の新規カルボン酸誘導体化試薬を合成した。そのうち、CIM-C₂-NH₂ は光学活性有機酸の分離に最も優れており、さらに、モノカルボン酸とジカルボン酸誘導体で異なる特徴的な MS 開裂パターン (モノカルボン酸: $m/z=91$ 、ジカルボン酸: $m/z=278$) を示すことが分かった。これらの特徴を利用し、リンゴ中 CMA 分析に応用した。リンゴには (S)-CMA は含まれておらず、(R)-CMA のみが含まれていること、果実よりも果皮に多く含まれることを明らかにした。続いて、ヒト血清中有機酸の分析に取り組み、L-Lac、D-3HB を分離検出できた。本誘導体化試薬ならびに LC-MS/MS による分離検出法は、様々な食品分析や疾患の臨床診断等への応用が期待される。

対象論文

- 1) **Umino M**, Sakamoto T, Onozato M, Fukushima T: Preparation of imidazolidinone compounds as derivatization reagent for diastereomerization and chromatographic separation of chiral organic acids. *J Chromatogr A*. **1675**, 463159, 2022.
- 2) **Umino M**, Onozato M, Sakamoto T, Koishi M, Fukushima T: Analyzing citramalic acid enantiomers in apples and commercial fruit juice by liquid chromatography–tandem mass spectrometry with pre-column derivatization. *Molecules*. **28 (4)**: 1556, 2023.
- 3) **Umino M**, Koishi M, Onozato M, Sakamoto T, Fukushima T *et al.*, *in preparation*.

参考論文

- 1) Onozato M, **Umino M**, Shoji A, Ichiba H, Tsujino N, Funatogawa T, Tagata H, Nemoto T, Mizuno M, Fukushima T: Serum D- and L-lactate, pyruvate, and glucose levels in individuals with at-risk mental state and correlations with clinical symptoms. *Early Interv. Psychiatr.* **14**: 410-417, 2020.

学位論文審査報告書

報告書記載：2024年2月15日

学位申請者名	海野真帆
論文題目	キラルイミダゾリジノン環を有する新規カルボキシ基用誘導体化試薬の創製と高速液体クロマトグラフィー-タンデム型質量分析計を用いた分離検出への応用
審査委員名	主査 松尾 和廣 副査 宮内 正二 副査 李 巍

学位論文の審査結果の要旨：

高速液体クロマトグラフィー-タンデム型質量分析計（LC-MS/MS）は、様々な分野で利用されている分析機器である。一般的に汎用されている逆相型カラムを用いてカルボキシ基を有する化合物を分析対象とした場合、移動相を弱酸性のpHに調整するため質量分析計（MS）での検出感度が低下する。また、分析対象物質が光学活性体の場合、光学異性体の分別定量が必要となるが、キラルカラム法では費用が高額となる。申請者はこの2点に着目し、新規にLC-MS/MS用ジアステレオマー誘導体化試薬を創製し、更に汎用性の高い逆相型カラムであるオクタデシルシリル化シリカゲルカラムを用いて光学活性有機酸の分離分析が可能であることを明らかとした。また、創製した新規誘導体化試薬は、モノカルボン酸とジカルボン酸で異なるプロダクトイオンを生じるため、両者の識別が可能な特徴的な試薬であることが示された。また、この新規誘導体化試薬は食品試料及び生体試料の分離分析への応用が可能であり、今後の光学活性有機酸の分離分析において疾患の臨床診断や食品分析の分野等の応用性が示されたと判断される。

上述したように、本研究は光学活性有機酸の分離分析を通じて医療への貢献が期待される研究成果を含んでいる。研究の目的は明確であり、その目標に向けた研究計画を論理的に組み立て、適切に実施している。得られた結果は公正に判断され、それに基づいて応用性を検討するために、次なる実験を計画して研究成果を積み重ねてきたことが学位論文から判断される。審査委員との面談においても実験内容や結果の解釈についての説明は丁寧かつ科学的根拠に基づいており、自立した研究者としての期待感が伺えた。研究に対する姿勢は好感が持てるものであり、学術的な知識を含め審査委員全員が評価している。

海野真帆氏の研究成果は光学活性有機酸の分離分析に向けた新しい分離検出法に関する情報と知見を与え、社会に貢献することが期待できるものである。この学位論文の内容は既に2報の学術論文英文誌に公表されている。以上より、本審査論文は博士（薬学）の学位に十分に値するものと評価する。