

博士論文

キラリ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

令和5年度

東邦大学大学院 薬学研究科 医療薬学専攻

海野 真帆

指導教授 福島 健

1 序論	5
2 試薬及び装置	9
2.1 試薬	9
2.2 装置	11
3 実験	12
<u>第一章 新規カルボキシ基用誘導体化試薬の合成と評価</u>	12
1 新規カルボキシ基用誘導体化試薬の合成	12
1.1 Benzyl (S)-5-(aminomethyl)-3-methyl-4-oxoimidazolidine-1-carboxylate (CIM-C ₁ -NH ₂)の合成	12
1.2 Benzyl (S)-5-(2-amino)ethyl-3-methyl-4-oxoimidazolidine-1-carboxylate (CIM-C ₂ -NH ₂)の合成	15
1.3 Benzyl (3-amino-1-(methylamino)-1-oxopropan-2-yl)carbamate (CDA-C ₁ -NH ₂)の合成	19
1.4 Benzyl (4-amino-1-(methylamino)-1-oxobutan-2-yl)carbamate (CDA-C ₂ -NH ₂)の合成	21
2 新規カルボキシ基用誘導体化試薬の評価	23
2.1 目的	23
2.2 評価	23
2.2.1 光学異性体分離能	25
2.2.2 プロダクトイオンの特徴	29
2.3 小括	31
3 前処理ならびに分離分析条件の検討	31
3.1 誘導体化条件の検討	31
3.2 移動相の検討	34
3.3 一斉分離条件の検討	36
3.4 誘導体の安定性	38
3.5 検出限界 (LOD)	39
4 食品試料への応用-ワイン中有機酸の分析-	39
5 小括	41

第二章	食品試料への応用	42
1	背景・目的	42
2	前処理条件の検討	44
3	バリデーション	45
3.1	検量線	45
3.2	日内・日間変動	45
3.3	回収率	46
4	統計解析	46
5	リンゴ中シトラマル酸 (CMA) の定量	47
5.1	前処理	47
5.2	リンゴ中シトラマル酸 (CMA) の絶対配置の決定と定量	47
6	小括	49
第三章	生体試料への応用	50
1	背景・目的	50
2	検体の情報	50
3	前処理・測定方法	51
4	ヒト血清中有機酸の検出	52
5	ピルビン酸の定量	53
5.1	試薬・機器	53
5.2	実験操作	53
5.3	定量	54
6	グルコースの定量	54
6.1	試薬・機器等	54
6.2	実験操作	54
6.3	定量	55
7	統計解析	55
7.1	方法	55
7.2	結果	55
8	小括	57
4	総括	59
5	参考文献	61
6	謝辞	67

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.

DOI: 10.1016/j.chroma.2022.463159

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.

DOI: 10.3390/molecules28041556

本文中で用いる略語一覧

HPLC	High-performance liquid chromatography
MS	Mass-spectrometry または Mass-spectrometer
LC-MS/MS	HPLC- tandem quadrupole mass spectrometer
LC-TOF-MS	HPLC- time-of-flight mass spectrometer
IS	Internal standard (内標準物質)
S/N	Signal-to-noise ratio (シグナルノイズ比)
LOD	Limit of detection (検出限界)
k	Capacity factor (保持係数、または、質量分布比)
R_s	Resolution (分離度)
SCZ	Schizophrenia (統合失調症)
ARMS	At-risk mental state (精神病発症危険状態)
ave.	average (平均値)

有機酸を含む各試薬を示す略語は、本文中の該当ページに記載した。

1 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[1]、環境[2]分析領域等で利用される分析装置である。

LC-MS/MS は、高速液体クロマトグラフィー (LC) で分析対象物質を他の物質との分離を行い、その後、イオン源 (イオン化部) でポジティブ (+) イオン、またはネガティブ (-) イオンとなり、プリカーサーイオンとして質量分析部 (MS/MS) へ導入される。MS/MS では、プリカーサーイオンが一つ目の四重極を通り、衝突室 (コリジョンセル、CID 部) において、分析対象物質のプリカーサーイオンからプロダクトイオンが生成し、二つ目の四重極を通過後、イオン検出部でプロダクトイオンが検出される。

LC-MS/MS により、医療分野、食品、環境分析領域における大抵の低分子~ペプチドなどの中分子の定量分析が可能であるが、質量分析計の特性上、イオン化部でイオン化しづらい物質は全般的に検出感度が低くなる欠点がある。

分析対象となる物質がカルボキシ基を持つ場合、疎水性相互作用により分離がなされる逆相型カラムを用いた高速液体クロマトグラフィーでは、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 (-) 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、カルボキシ基を有する物質は分子形 (-COOH) となり、イオン形 (-COO⁻) になりづらくなるため、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エステル化またはアミド化など誘導體化することで検出感度の向上が期待できる。そのため、分析対象化合物のカルボキシ基を誘導體化する標識試薬は、これまでに報告があり、市販されている試薬も複数ある (<https://www.tcichemicals.com/JP/ja/c/11310>)。

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[3]

が、キラルカラムは光学活性分子で化学修飾されたシリカゲル粒子[4, 5]を充填しているため、市販のキラルカラムは高額である。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[3, 6]。

このような背景から、私は光学活性なカルボキシ基を有する分析対象物を、光学異性体毎の分離定量が可能な、カルボキシ基用のジアステレオマー誘導体化試薬に着目した。カルボキシ基用のジアステレオマー誘導体化試薬についても、すでいくつかの報告がある (Table 1) [7-9]。どの試薬も、カルボキシ基との反応部位を持ち合わせた光学活性な試薬であるが、これらの試薬はまだ市販されていないため、後述する応用研究を検討するには、それぞれを合成する必要がある。

ところで、統合失調症 (SCZ) をはじめとする精神疾患は古くから知られている重篤な疾患であるが、その病態の解明には未だ至っていない。近年、精神疾患を発症した患者の血液成分を分析し、患者特有の血液中分子の濃度変動が多く報告されるようになっており、統合失調症患者の血清中では、グルタミン酸[10, 11]、キヌレニン[12, 13]、トリプトファン等[14]の増加が報告されている[15]。

こうした精神疾患の患者の中には、精神疾患の発症と診断される前に精神病発症危険状態 (at-risk mental state; ARMS) と呼ばれる期間を経る場合がある[16]。ARMS はうつ状態や不眠、不安などを主訴とするため、一見軽症で、臨床医も注意深く診察しないと一般的うつ状態などと鑑別ができない。精神医療の現場では、ARMS の段階から適切な時期に専門医による適切な治療を受けられるかが治療成否のポイントとなっているため[17]、精神疾患の発症予測に役立つ客観的な指標となる有用なマーカーが囑望され

ている。このような背景から、当教室では以前より、東邦大・医・精神神経医学講座と共同で ARMS の時点における血清中分子の定量研究に取り組んでいる。

2018 年の *Nature Rev Neurosci.* に、脳内において L-乳酸が記憶と学習のシグナル分子として働くことが報告され[18]、精神科領域における L-乳酸に対する注目も高まっていること、一方、グルコースから D-乳酸生合成に関わる酵素である glyoxalase (GLO) I の活性の低下がカルボニルストレスを誘発し、統合失調症の発症に関与する可能性を示唆 [19-23]されていることから、乳酸の両光学異性体、すなわち D- および L-乳酸を含むグルコース代謝物に注目した。

当教室で開発されたカラムスイッチング HPLC [15, 24, 25] を用いて、ARMS 群及び健康人血清中 D, L-乳酸の定量を行い、比較解析したところ、ARMS 群において L-乳酸濃度の有意な減少が認められ、グルコース代謝に異常がある可能性が示唆された[26]。

そこで、本研究では第一章として、光学活性有機酸の分離検出を、高価な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、且つ、測定の自動化を可能にするための新規 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、第二章では食品試料について、第三章では生体試料の分析へ応用した。

Table 1 LC-MS/MSを用いたキララル誘導体化試薬の光学異性体分離の比較

Derivatization reagent	Chiral hydroxy acids	Sensitivity (LOD)	Derivatization		MS spectrometry	<i>R_s</i>	α	Ref.
			time	(Temperature)				
(S)-N-pyrrolidine-2-carboxylic acid N-(pyrrolidine-2-yl)amide (PCP2)	Lactate, 3-HB, Malate	0.032-0.14 fmol	60 min (60°C)	Xevo™ TQ-S triple quadrupole mass spectrometer	3.65 (Lactate) 1.48 (3-HB) 3.74 (MA)	1.08 (Lactate) 1.03 (3-HB) 1.05 (MA)	[7]	
(S)-1-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)pyrrolidin-3-amine (DMT-3(S)-Apy)	Lactate, 3-HB	11.5- 15.8 amol	90 min (60°C)	Xevo™ TQ-S triple quadrupole mass spectrometer	1.98 (lactate) 1.65 (3-HB)	1.1 (Lactate) 1.1 (3-HB)	[8]	
N-(p-toluenesulfonyl)-L-phenylalanyl chloride (TSPC)	2-Hydroxyglutarate	1.0-1.2 fmol	10 min (25°C)	LCMS-2010EV	—	—	[9]	
CIM-C ₂ -NH ₂	Lactate, 2-HB, 3-HB, Tartrate, Citramalate	1.31-131 fmol	120 min (Room temp.)	LCMS-8040	1.61 (Lactate) 1.95 (2-HB) 1.31 (3-HB) 1.95 (Tar) 2.19 (Cit)	1.06 (Lactate) 1.08 (2-HB) 1.05 (3-HB) 1.09 (Tar) 1.09 (Cit)	This study	

2 試薬及び装置

2.1 試薬

本研究では以下の試薬を購入し、使用した。

有機酸等

DL-Lactate (Lac), D-Lactate, L-Lactate, DL-3-Hydroxybutyric acid (3-HB), D-3-Hydroxybutyric acid, DL-Citramalate (CMA), D-Citramalate, Lithium acetoacetate; SIGMA-ALDRICH

Succinic acid (Suc), DL-Tartaric acid (Tar), L-Tartaric acid, DL-Malic acid (Mal), L-Malic acid

Dimethylformamide (DMF); 富士フイルム和光純薬工業株式会社

PBS; 日水製薬

Propionic acid; ナカライテスク株式会社

Glutaric acid, Hippuric acid; 東京化成工業株式会社

DL-2-Hydroxybutyric acid (2-HB), L-Citramalate; Toronto Research Chemicals

Sodium L-lactate-3,3,3- d_3 ; CDN Isotopes

Sodium D-lactate $^{13}C_3$; Cambridge Isotope Laboratories

縮合剤

2,2'-Dipyridyl disulfide (DPDS), Triphenylphosphine (TPP); 東京化成工業株式会社

移動相等

Formic acid (高速液体クロマトグラフィー用), Methanol (LC-MS 用), 2-Propanol (LC-MS 用), Tetrahydrofuran; 富士フイルム和光純薬工業株式会社

Acetonitrile (LC-MS 用); 関東化学株式会社

H₂O; Milli-Q Labo system (日本ミリポア株式会社) より採水して使用

合成用試薬

Methylamine (40% in H₂O), 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloride (DMT-MM), diphenylphosphoryl azide (DPPA), 5-tert-butyl *N*-benzyloxycarbonyl-L-glutamate (Cbz-L-Glu(OtBu)OH), tert-butanol (tBuOH), diisopropylethylamine (DIPEA), trifluoroacetic acid (TFA), methylamine (ca. 9% in Ethanol, ca. 2 mol/L), and di-tert-butyl dicarbonate (Boc₂O); 東京化成工業株式会社

Special-grade toluene, ethyl acetate (AcOEt), methanol (CH₃OH), 35% hydrochloric acid (HCl), sodium hydrogen carbonate (NaHCO₃), sodium chloride (Guaranteed Reagent), sodium sulfate (Wako 1st Grade), and *p*-toluenesulfonic acid monohydrate (*p*TsOH-H₂O); 富士フイルム和光純薬工業株式会社

HCl in ethyl acetate (HCl-AcOEt) (4 M); 国産化学株式会社

(*S*)-2-(((Benzyloxy)carbonyl)amino)-4-(tert-butoxy)-4-oxobutanoic acid monohydrate (Cbz-L-Asp(OtBu)OH), 4-amino-2-(((benzyloxy)carbonyl)amino)butanoic acid (*Z*-Dab-OH), and 3-amino-2-(((benzyloxy)carbonyl)amino)propanoic acid (*Z*-Dap-OH); 渡辺化学工業株式会社

(*2R*)-2-[1]-5-tert-Butoxy-5-oxopentanoic acid (Cbz-D-Glu(OtBu)OH); SIGMA-ALDRICH

Tetrahydrofuran (THF, Dehydrated, stabilizer free) and special-grade chloroform (CHCl₃); 関東化学株式会社

H₂O; Milli-Q Labo system (日本ミリポア株式会社) より採水して使用

2.2 装置

以下の機種を用いた。個別の測定条件は各実験項に記載した。

LC-MS/MS 装置

Pump;	Shimadzu LC-20AD ポンプ
MS;	Shimadzu LCMS-8040 タンデム四重極質量分析計
Ionization;	ESI
Column oven;	Shimadzu CTO-20A カラムオーブン
Auto-sampler;	Shimadzu SIL-20AC オートサンプラー
Software;	Shimadzu LabSolutions ver. 5.97

LC-TOF-MS 装置

LC;	Agilent 1200 series
TOF-MS;	日本電子 JMS-T100LP “Accu TOF LC-plus”
Interface;	ESI

NMR 装置

日本電子	JMS-ECS 400
------	-------------

3 実験

第一章 新規カルボキシ基用誘導体化試薬の合成と評価

1 新規カルボキシ基用誘導体化試薬の合成

1.1 Benzyl (S)-5-(aminomethyl)-3-methyl-4-oxoimidazolidine-1-carboxylate (CIM-C₁-NH₂) の合成

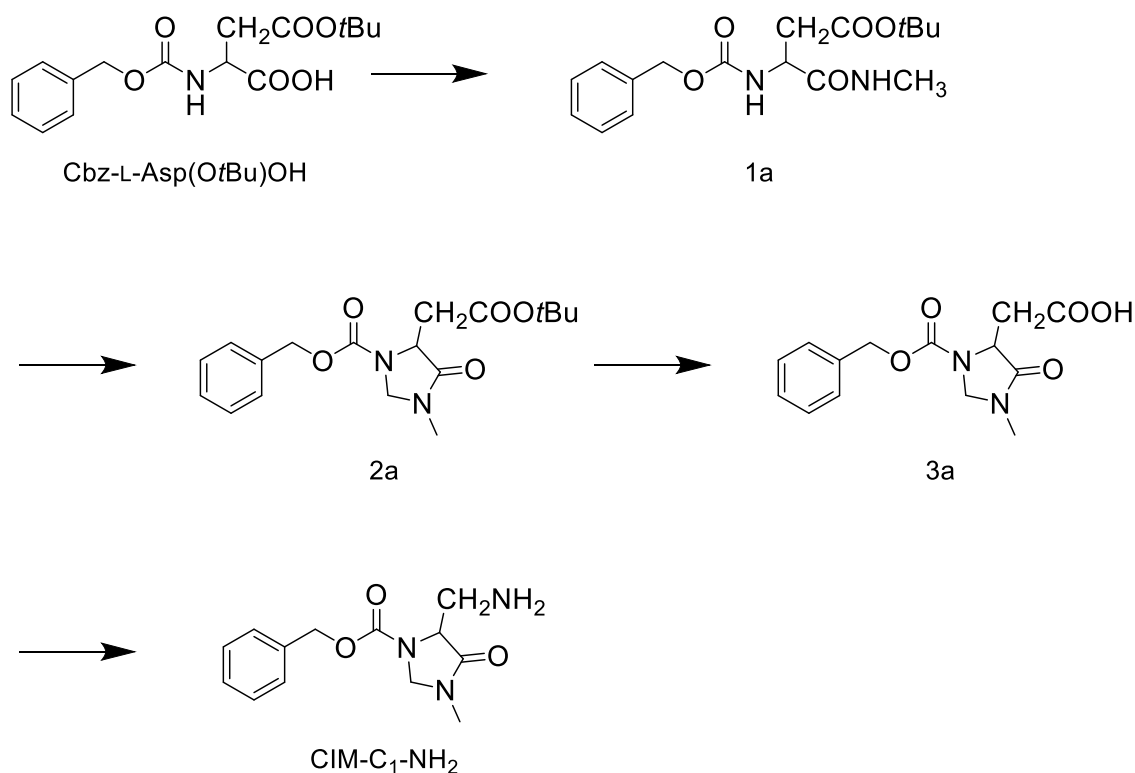


Fig. 1 CIM-C₁-NH₂ の合成経路

***tert*-Butyl (S)-3-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-4-(methylamino)-4-oxobutanoate (1a);**

Cbz-L-Asp(OtBu)OH (4.43 mmol) と 40%メチルアミン (6 mmol) を 25 mL の MeOH に溶解し、続いて 5.67 mmol の DMT-MM を混合物に添加した。得られた溶液を室温で 1 時間攪拌した。反応終了後、混合物を AcOEt (100 mL) および H₂O (100 mL) とともに分液漏斗に移し、液-液抽出を行った。有機層を回収し、続いて水層をさらに AcOEt 100 mL で抽出した。合わせた有機層を

0.5 M HCl、次いで飽和 NaHCO₃、ブライン (各 100 mL) で洗浄した。無水 Na₂SO₄ で乾燥した後、蒸発乾固した。メチルアミド中間体 1a を白色固体として得た (4.35 mmol, 98%)。精密質量測定には LC-TOF-MS (Agilent 1200 series および日本電子 JMS-T100LP “Accu TOF LC-plus”) を用いた。 m/z 337.17700 [M+H]⁺ (calcd. 337.17635); ¹H-NMR (400 MHz, CHLOROFORM-D) δ 7.37-7.33 (m, 5H, ArH), 6.33-6.58 (1H, NH), 5.84-6.08 (1H, NH), 5.13 (s, 2H, PhCH₂), 4.49 (d, J = 4.4 Hz, 1H, α -CH), 2.92 (dd, J = 17.1, 4.5 Hz, 1H, β -CH₂), 2.80 (d, J = 4.8 Hz, 3H, NCH₃), 2.60 (dd, J = 16.9, 6.4 Hz, 1H, β -CH₂), 1.43 (d, J = 3.2 Hz, 9H, *t*Bu).

Benzyl (S)-5-(2-(*tert*-butoxy)-2-oxoethyl)-3-methyl-4-oxoimidazolidine-1-carboxylate (2a)

パラホルムアルデヒド (6.27 mmol) と触媒量の *p*TsOH-H₂O を 1a (4.35 mmol) のトルエン懸濁液 (50 mL) に加えた。混合物を 1.5 時間還流した [27]。反応液を室温まで冷却し、分液漏斗に移した。有機層を飽和 NaHCO₃ (100 mL) で洗浄した。水層をさらに AcOEt (100 mL×2) で抽出した。合わせた有機層をブライン (100 mL) で洗浄した。無水 Na₂SO₄ で乾燥した後、前項に記載したのと同じ手順で抽出液を蒸発乾固した。その後、イミダゾリジノン化合物 2a を無色オイルとして得た (2.45 mmol, 56%)。 m/z 349.18526 [M+H]⁺ (calcd. 349.17635); ¹H-NMR (400 MHz, CHLOROFORM-D) δ 7.40-7.32 (m, 5H, ArH), 5.21-5.15 (m, 2H, PhCH₂), 4.85 (dd, J = 19.0, 4.8 Hz, 1H, α -CH), 4.66 (d, J = 9.4 Hz, 1H, NCH₂N), 4.25 (d, J = 17.2 Hz, 1H, NCH₂N), 3.13-2.87 (m, 5H, β -CH₂ and NCH₃), 1.43-1.39 (9H, *t*Bu).

Benzyl (S)-5-(aminomethyl)-3-methyl-4-oxoimidazolidine-1-carboxylate (CIM-C₁-NH₂)

2a (2.45 mmol) を 25 mL の AcOEt に溶解し、25 mL の 4 M HCl-AcOEt を溶液に加えた。混合物を 1.5 時間、室温で攪拌した [27]。その後、溶媒留去し残渣

を熱トルエンで再結晶し、イミダゾリジノンカルボン酸中間体 3a を得た。DIPEA (2 mmol) と DPPA (2 mmol) を 3a (1.09 mmol) のトルエン溶液 (20 mL) に加え、混合物を室温で 30 分間、加熱還流下 2 時間攪拌した。得られた溶液を室温まで冷却し、2.1 mmol の H₂O と 4 M HCl-AcOEt (4 mmol HCl) を加え、CIM-C₁-NH₂-HCl 塩を白色固体として得た。その後、HCl 塩を CHCl₃ および飽和 NaHCO₃ (それぞれ 100、50 mL) とともに分液漏斗に移した。有機層を回収し、水層を CHCl₃ (50 mL×2) で抽出した。合わせた有機層を無水 Na₂SO₄ で乾燥し、前項に記載したように蒸発乾固した。キラルイミダゾリジノン誘導体; CIM-C₁-NH₂ が無色オイルとして得られた (56.7 μmol, 5.2%); *m/z* 264.13543 [M+H]⁺ (calcd. 264.13482); ¹H-NMR (400 MHz, CHLOROFORM-D) δ 7.37 (s, 5H, ArH), 5.24-5.13 (m, 2H, PhCH₂), 4.85 (dd, *J* = 23.0, 5.4 Hz, 1H, NCH₂N), 4.72 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H, α-CH), 4.15 (d, *J* = 19.0 Hz, 1H, NCH₂N), 3.31-3.18 (m, 2H, β-CH₂), 2.94 (d, *J* = 9.6 Hz, 3H, NCH₃).

1.2 Benzyl (*S*)-5-(2-amino)ethyl)-3-methyl-4-oxoimidazolidine-1-carboxylate (CIM-C₂-NH₂) の合成

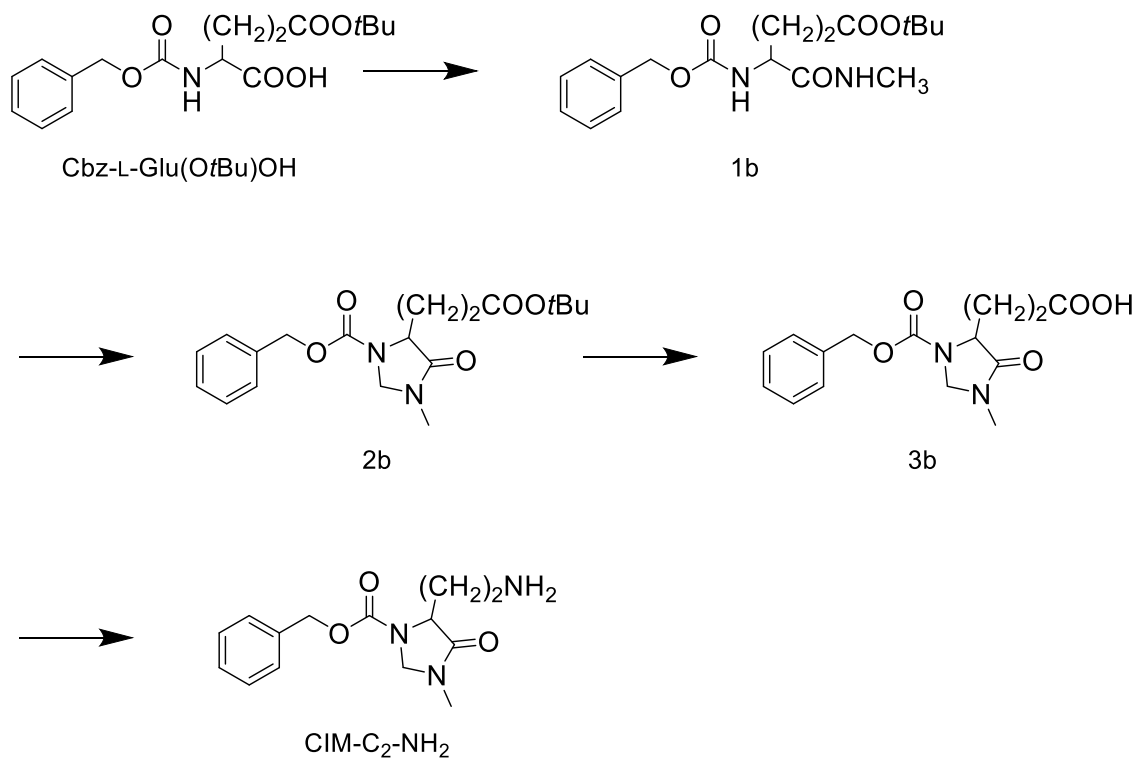


Fig. 2 CIM-C₂-NH₂ の合成経路

***tert*-Butyl (*S*)-4-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-5-(methylamino)-5-oxopentanoate (1b)**

Cbz-L-Glu(OtBu)OH (5.10 mmol) と 40%メチルアミン (6 mmol) を 20 mL の CH₃OH に溶解し、その後 6.50 mmol の DMT-MM を加えた。得られた溶液を室温 (22°C) で 1 時間攪拌した。反応完了後、混合物を AcOEt (100 mL) および H₂O (100 mL) とともに分液漏斗に移し、水層を除き、つづいて飽和 NaHCO₃ 水溶液 (100 mL) で洗浄した。有機層を無水 Na₂SO₄ を用いて乾燥し溶媒留去し、白色固体の化合物 1b (4.67 mmol, 92%) を得た。*m/z* 351.18807 [M+H]⁺ (calcd. 351.19200); ¹H-NMR (400 MHz, CHLOROFORM-D) δ 7.37-7.31 (m, 5H, ArH), 6.41 (s, 1H, NH), 5.77 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, NH), 5.10-5.06 (m, 2H, PhCH₂), 4.18 (d, *J* = 5.7 Hz, 1H, α-CH), 2.80 (d, *J* = 4.8 Hz, 3H, NHCH₃), 2.43-

2.25 (m, 2H, γ -CH₂), 2.10-1.88 (m, 2H, β -CH₂), 1.43 (s, 9H, *t*Bu)。出発物質として Cbz-D-Glu(O*t*Bu)OH を用いて、同様の手順で(*R*)-体も同様に合成した。

Benzyl (*S*)-5-(3-(tert-butoxy)-3-oxopropyl)-3-methyl-4-oxoimidazolidine-1-carboxylate (2b)

パラホルムアルデヒド (9.90 mmol) と触媒量の *p*TsOH-H₂O を 1b (4.67 mmol) のトルエン懸濁液 (50 mL) に加えた。混合物を 3.5 時間還流した。反応液を室温 (22°C) に冷却し、分液漏斗に移し、飽和 NaHCO₃ (100 mL) で洗浄した。水層をさらに AcOEt (100 mL×2) で抽出した。合わせた有機層をブライン (100 mL) で洗浄し、蒸発乾固した。残渣をカラムクロマトグラフィー (シリカゲル、AcOEt-*n*-へキサン (50:50, v/v)) で精製した。*m/z* 307.13340 [M+H]⁺ (calcd. 307.12940); ¹H-NMR (400 MHz, CHLOROFORM-D) δ 9.84 (s, 1H, CO₂H), 7.39-7.32 (m, 5H, ArH), 5.22-5.11 (m, 2H, PhCH₂), 4.84 (dd, *J* = 17.3, 5.6 Hz, 1H, NCH₂N), 4.65 (d, *J* = 5.7 Hz, 1H, α -CH), 4.32 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, NCH₂N), 2.92 (d, *J* = 10.5 Hz, 3H, NCH₃), 2.43-2.19 (m, 4H, β - and γ -CH₂). (*R*)-体も同様に合成した。

(*S*)-3-(3-((benzyloxy)carbonyl)-1-methyl-5-oxoimidazolidin-4-yl)propanoic acid (3b)

2b (2.36 mmol) に 5 mL の TFA を加え、1 時間攪拌し蒸発乾固後、化合物 3b (2.27 mmol, 96%) 透明油状物として得た。 *m/z* 307.13340 [M+H]⁺ (calcd. 307.12940); ¹H-NMR (400 MHz, CHLOROFORM-D) δ 9.84 (s, 1H, CO₂H), 7.39-7.32 (m, 5H, ArH), 5.22-5.11 (m, 2H, PhCH₂), 4.84 (dd, *J* = 17.3, 5.6 Hz, 1H, NCH₂N), 4.65 (d, *J* = 5.7 Hz, 1H, α -CH), 4.32 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, NCH₂N), 2.92 (d, *J* = 10.5 Hz, 3H, NCH₃), 2.43-2.19 (m, 4H, β - and γ -CH₂). (*R*)-体も同様に合成した。

Benzyl (*S*)-5-(2-amino)ethyl-3-methyl-4-oxoimidazolidine-1-carboxylate (CIM-C₂-NH₂)

DIPEA (4.5 mmol)、DPPA (1.0 mmol) および 3b (0.90 mmol) のトルエン溶液 (15 mL) を室温 (22°C) で 30 分間攪拌し、さらに 2 時間還流した。溶液を濃縮し、4 M HCl-AcOEt (20 mL) を加え、2 時間攪拌した。濃縮生成物を、27% アンモニア in H₂O-CH₃OH (1:50:50, v/v/v) 溶離液、続いて H₂O-CH₃OH-酢酸 (500:500:1, v/v/v) 溶離液を用いた ODS クロマトグラフィーで精製した。次に、濃縮した生成物を、5% K₂CO₃ (80 mL) とともに分液漏斗に移し、CHCl₃ (80 mL×3) で抽出した。有機層を蒸発乾固して、無色オイルの CIM-C₂-NH₂ (14.8 μmol, 1.6%) を得た。*m/z* 264.13543 [M+H]⁺ (calcd. 264.13482); ¹H-NMR (400 MHz, CHLOROFORM-D) δ 7.37 (s, 5H, ArH), 5.24-5.13 (m, 2H, PhCH₂), 4.85 (dd, *J* = 23.0, 5.4 Hz, 1H, NCH₂N), 4.72 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H, α-CH), 4.15 (d, *J* = 19.0 Hz, 1H, NCH₂N), 3.31-3.18 (m, 2H, β-CH₂), 2.94 (d, *J* = 9.6 Hz, 3H, NCH₃). (*R*)-体も同様に合成した。合成した CIM-C₂-NH₂ の (*R*)- と (*S*)-体の光学純度を、キラルカラム (セルロース型 CHIRALCEL OZ-RH[®]) で調べた結果、Fig. 3 に示すように光学純度は 99% 以上であった。

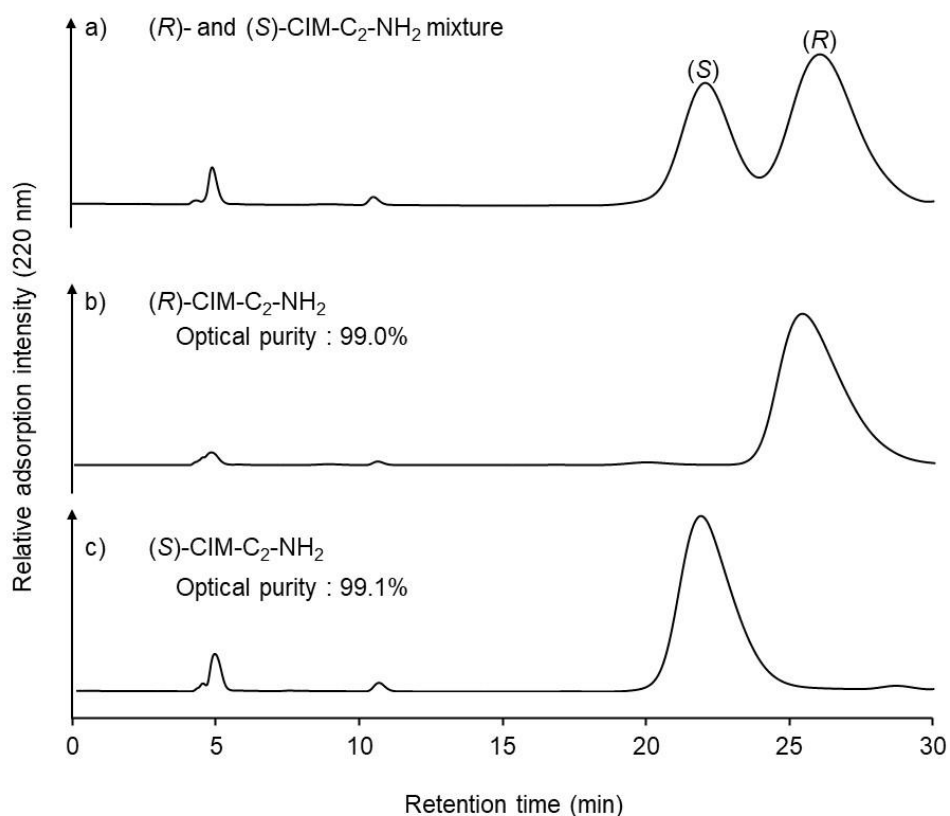


Fig. 3 キラルカラムを用いた b) (R)- CIM-C₂-NH₂ および c) (S)-CIM-C₂-NH₂ の光学純度の測定 [a] は、(R)-, (S)-CIM-C₂-NH₂, 当量混合物]
 Chiral column (Chiralcel OZ-RH[®], 4.6×150 mm),
 Mobile phase: 15% CH₃CN/1.0 M NaClO₄,
 Flow rate: 0.5 mL/min, Detection: UV 220 nm, Temperature: 45 °C,
 Injection volume: 5 μL (10 mM, in CH₃CN-H₂O (50:50, v/v))

1.3 Benzyl (3-amino-1-(methylamino)-1-oxopropan-2-yl)carbamate (CDA-C₁-NH₂)

の合成

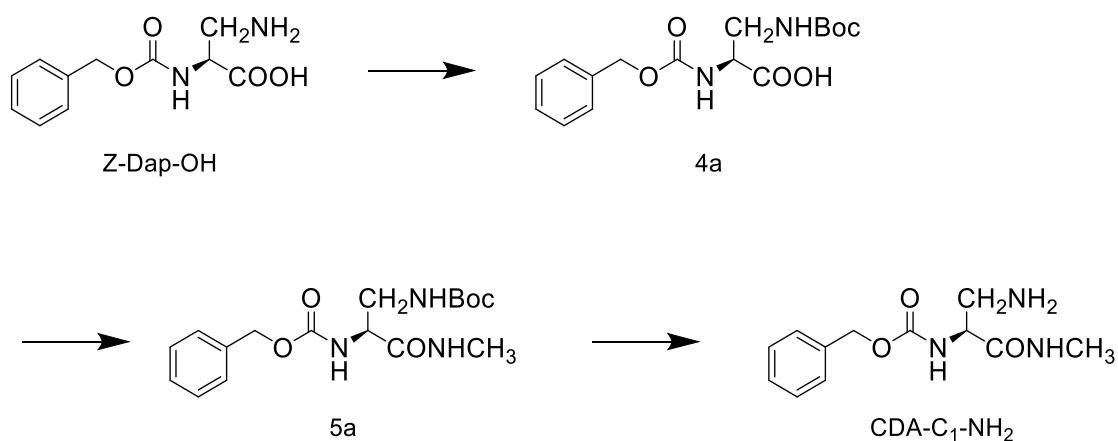


Fig. 4 CDA-C₁-NH₂ の合成経路

2-(((Benzyloxy)carbonyl)amino)-3-(((tert-butoxycarbonyl)amino)propanoic acid (4a)

Z-Dap-OH (2.0 mmol) および NaHCO₃ (4.0 mmol) を THF/H₂O (1/1) 20 mL に溶解し、混合物を室温 (22°C) で 5 分間攪拌した。その後、THF (20 mL) に溶解した Boc₂O (3.0 mmol) を滴下し、室温 (22°C) で 16 時間攪拌した。反応液を濃縮し、2 M 塩酸を加えて pH を約 2 に調整した後、混合物を分液漏斗に移した。水層を AcOEt (80 mL×3) で抽出した。合わせた有機層を H₂O (80 mL) で洗浄し、続いてブライン (50 mL) で洗浄した。抽出した溶媒を無水 Na₂SO₄ で乾燥した。乾燥剤を濾過し、濾液を蒸発乾固して白色固体を得た。その後、少量の AcOEt を加え、混合物を 4°C で一晩放置し、固体生成物を得た。溶媒を蒸発させた後、白色固体の化合物 4a (0.84 mmol, 42%) を得た。

benzyl tert-butyl (3-(methylamino)-3-oxopropane-1,2-diyl)dicarbamate (5a)

化合物 4a (0.84 mmol) と DMT-MM (1.68 mmol) を混合し、20 mL の CH₃OH に溶解した。その後、メチルアミン溶液 1.68 mL (in EtOH, 2 M) を混合物に添加した。得られた溶液を室温 (22°C) で 3 時間攪拌した。その後、混合物を分液漏斗に移し、AcOEt (80 mL×3) で抽出した。合わせた有機層を H₂O 中 5% NaHCO₃ で 3 回洗浄した (80 mL×3)。合わせた有機層を 1 M HCl (80 mL) で洗浄し、続いて H₂O (80 mL) で洗浄した。抽出した溶媒を無水 Na₂SO₄ で乾燥し、蒸発乾固して白色固体を得た。H₂O-CH₃OH (2:1, v/v) で再結晶した後、白色固体の化合物 5a (0.46 mmol, 55%) を得た。m/z 352.19317 [M+H]⁺ (calcd. 352.18725); ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.84 (d, *J* = 4.6 Hz, 1H, NH), 7.38-7.29 (m, 5H, PhH), 7.15 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, NH), 6.77-6.71 (m, 1H, NH), 5.01 (q, *J* = 12.5 Hz, 2H, PhCH₂), 4.00 (td, *J* = 7.8, 5.0 Hz, 1H, α-CH), 3.24-3.09 (m, 2H, CH₂), 2.55 (d, *J* = 4.4 Hz, 3H, N-CH₃), 1.34 (s, 9H, *t*BuH).

Benzyl (3-amino-1-(methylamino)-1-oxopropan-2-yl)carbamate (CDA-C₁-NH₂)

6 mL の TFA を化合物 5a (1.1 mmol) に加え、一晩攪拌した。TFA を蒸発させた後、残渣を 5% K₂CO₃ (80 mL) とともに分液漏斗に移した。水層を CHCl₃ (80 mL×3) で抽出し、有機層を蒸発乾固した。残渣をカラムクロマトグラフィ (シリカゲル、CHCl₃-CH₃OH (3:7, v/v)) で精製し、白色の CDA-C₁-NH₂ の固体 (0.23 mmol, 42%) を得た。m/z 252.13468 [M+H]⁺ (calcd. 252.13482); ¹H-NMR (400 MHz, CHLOROFORM-D) δ 7.56-7.29 (m, 5H, PhH), 7.19 (s, 1H, NH), 6.20-6.12 (m, 1H, NH), 5.14-5.08 (m, 2H, PhCH₂), 4.11 (dd, *J* = 11.0, 6.6 Hz, 1H, α-CH), 3.28 (dd, *J* = 12.6, 4.1 Hz, 1H, CH₂), 2.81 (t, *J* = 5.2 Hz, 3H, NCH₃), 2.06 (s, 3H, NH₂, CH₂).

1.4 Benzyl (4-amino-1-(methylamino)-1-oxobutan-2-yl)carbamate (CDA-C₂-NH₂) の合成

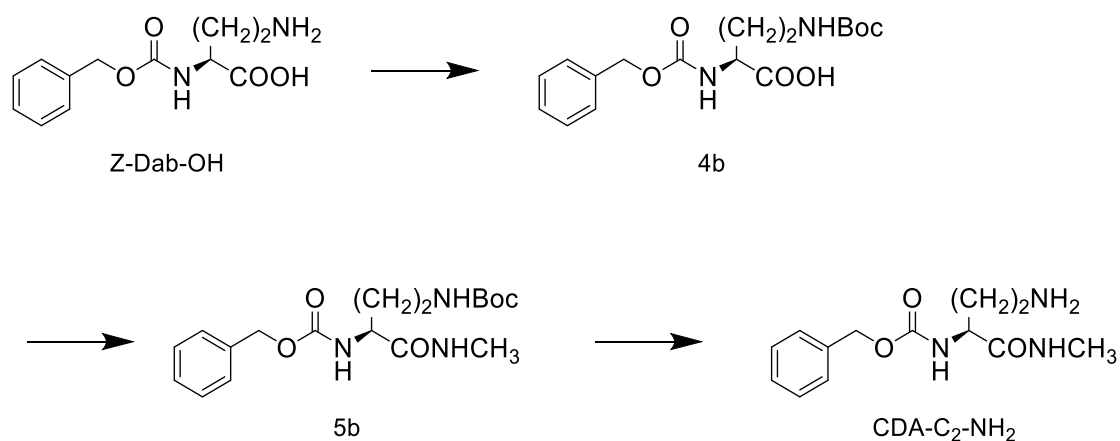


Fig. 5 CDA-C₂-NH₂ 合成経路

2-(((Benzyloxy)carbonyl)amino)-4-((tert-butoxycarbonyl)amino)butanoic acid (4b)

Z-Dab-OH (1.0 mmol) および NaHCO₃ (2.0 mmol) を THF-H₂O (1:1、*v/v*) 20 mL に溶解し、混合物を室温 (22°C) で 5 分間攪拌した。次に、THF (10 mL) に溶解した Boc₂O (1.5 mmol) を滴下添加した。得られた溶液を室温 (22°C) で 16 時間攪拌した。反応物溶液を、ロータリーエバポレーターを用いて濃縮し、pH を 2 M 塩酸の添加により 2 に調整した。その後、混合物を分液漏斗に移し、水層を AcOEt (80 mL×3) で抽出した。合わせた有機層を H₂O (80 mL) およびブライン (50 mL) で洗浄した。抽出した溶媒を無水 Na₂SO₄ で乾燥し、蒸発乾固した。真空中で蒸発乾固して、無色油の化合物 4b (0.88 mmol, 88%) を得た。¹H-NMR (400 MHz, CHLOROFORM-D) δ 10.35 (s, 1H, COOH), 7.53-7.11 (m, 5H, benzene-H), 6.62 (s, 1H, NH), 5.92-5.88 (m, 1H, NH), 5.10 (s, 2H, Ph-CH₂), 4.43-4.29 (m, 1H, α-CH), 3.40-3.03 (m, 2H, CH₂CH₂), 2.28-1.60 (m, 2H, CH₂CH₂), 1.45-1.36 (m, 9H, Boc-H).

Benzyl *tert*-butyl (4-(methylamino)-4-oxobutane-1,3-diyl)dicarbamate (5b)

化合物 4b (4.98 mmol) と DMT-MM (9.96 mmol) を CH₃OH 15 mL に溶解し、その後 2 M メチルアミン in EtOH 4.98 mL を加えた。得られた溶液を室温 (22°C) で 3 時間攪拌した。その後、混合物を分液漏斗に移し、水層を AcOEt (80 mL×3) で抽出した。合わせた有機層を H₂O-NaHCO₃ (50:50, v/v) (80 mL×3) で 3 回洗浄し、続いて 1 M HCl (80 mL) および H₂O (80 mL) で洗浄した。抽出した溶媒を無水 Na₂SO₄ で乾燥し、真空中で蒸発乾固して白色固体を得た。H₂O-CH₃OH (2:1, v/v) で再結晶後、化合物 5b (4.02 mmol, 80.7%) を白色固体として得た。 *m/z* 366.20890 [M+H]⁺ (calcd. 366.20290).

Benzyl (4-amino-1-(methylamino)-1-oxobutan-2-yl)carbamate (CDA-C₂-NH₂)

6 mL の TFA を化合物 5b (1.1 mmol) に加え、一晚攪拌した。過剰の TFA を蒸発させた後、混合物を 5% K₂CO₃ (80 mL) とともに分液漏斗に移した。水層を CHCl₃ (80 mL×3) で抽出した。有機層を真空中で蒸発乾固した。残渣 (76.6 μmol) をカラムクロマトグラフィー (シリカゲル、CHCl₃-CH₃OH (1:9, v/v)) で精製し、白色固体の CDA-C₁-NH₂ (1.88 μmol, 2.5%) を得た。¹H-NMR (400 MHz, CHLOROFORM-D) δ 7.48 (d, *J* = 33.9 Hz, 1H, *NH*), 7.39-7.30 (m, 5H, *PhH*), 6.36 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H, *NH*), 5.12 (d, *J* = 12.1 Hz, 2H, *PhCH*₂), 4.40 (s, 1H, α-*CH*), 2.95-2.79 (m, 5H, *CH*₃ and *CH*₂*CH*₂), 1.84 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H, *CH*₂*CH*₂), 1.29-1.13 (m, 2H, *NH*₂), 0.90-0.81 (m, 1H, *CH*₂*CH*₂).

2 新規カルボキシ基用誘導体化試薬の評価

2.1 目的

オリジナルの新規カルボキシ基用誘導体化試薬の合成を行った。新規カルボキシ基用誘導体化試薬のデザインは、当教室で既に公表しているアミノ基用のジアステレオマー誘導体化試薬 CIMA-OSu[28] (特開 2022-092263) の構造を基盤として、キラルイミダゾリジノン (CIM) 環の有無と不斉炭素原子から反応部位までの炭素数の違いが光学異性体分離に影響を与えるかどうかを評価した。CIM 環を持たない試薬は、Chiral di-amino alkane (CDA) で表した。また、不斉炭素原子から反応部位までの炭素数が 1 つのものを C₁、2 つのものを C₂ と表した。

光学活性な有機酸として、乳酸などのオキシ酸を対象として、合成した新規カルボキシ基用誘導体化試薬で誘導体化した。誘導体の光学異性体分離能と質量分析の際に生じるプロダクトイオンの特徴の点で評価した。

2.2 評価

Fig. 6 に示す有機酸について、光学異性体分離能の評価を行った。誘導体化反応 (Fig. 7) を含む前処理工程は Fig. 8 に示す方法で行い、新規に合成した新規カルボキシ基用誘導体化試薬 4 種類を使用した。測定機器は 2 試薬および装置 に示したものを扱い、条件は Fig. 8 に示した。また、各誘導体における移動相条件は結果の項目に示した。

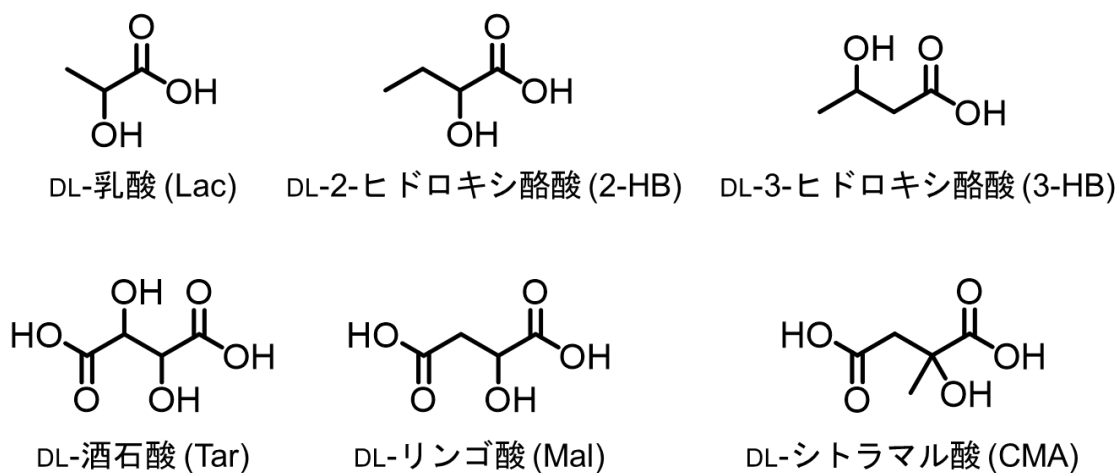


Fig. 6 光学活性有機酸の構造式

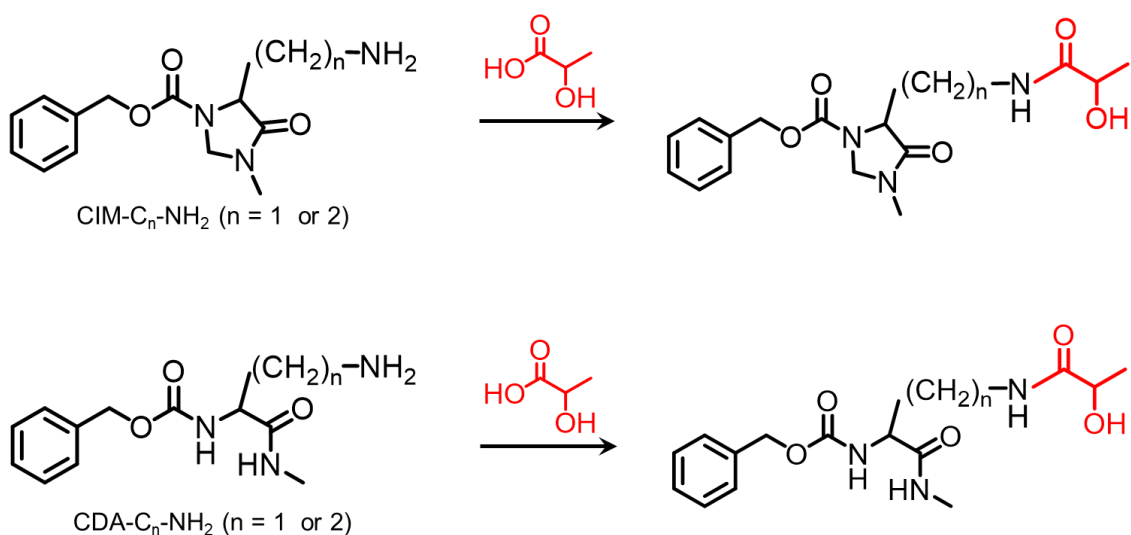


Fig. 7 誘導體化の反応式 (例; 乳酸)

1.0 mM D- and L-Organic acids in PBS	10 μ L	MS	Tandem-quadrupole mass-spectrometer
(S)-Reagent in DMF (10 mM)	10 μ L	Column	InertSustain® C18 (2.1 \times 150 mm, 3.0 μ m)
TPP in CH ₃ CN (250 mM)	10 μ L	Mobile phase	0.05% FA in H ₂ O/CH ₃ CN
DPDS in CH ₃ CN (250 mM)	10 μ L	(gradient elution)	0.05% FA in H ₂ O/CH ₃ OH
Vortex mix			0.05% FA in H ₂ O/THF
Stand for 120 min, r.t.			0.05% FA in H ₂ O/2-PrOH
0.05% Formic acid in CH ₃ CN / H ₂ O (20/80)	60 μ L	Detection	Multiple reaction monitoring (MRM)
Vortex mix			
LC-MS/MS (5.0 μ L injection)			

Fig. 8 誘導體化方法および LC-MS 条件

2.2.1 光学異性体分離能

新たに合成した試薬 4 種類について、CIM 環の有無と不斉炭素原子から反応部位までの炭素数が光学異性体分離能に寄与するかを調べた。Fig. 9 には光学異性体分離の比較クロマトグラムとして、DL-Lac の例を示した。CIM 環を持つ CIM-C₂-NH₂ と CIM 環を持たない CDA-C₂-NH₂ を比較すると、CIM 環を持つ CIM-C₂-NH₂ を使用したとき、光学異性体分離が良好であった。

また、不斉炭素原子から反応点までの炭素数が 1 の CIM-C₁-NH₂ と炭素数が 2 の CIM-C₂-NH₂ を比較すると、炭素数が 2 の CIM-C₂-NH₂ を使用したとき、光学異性体分離が良好であった。DL-3HB や DL-Tar などの有機酸についても検討を行ったが、CIM-C₂-NH₂ を使用したとき、光学異性体分離が最も良好であった (Table 2)。

以上の結果より、CIM 環が光学異性体分離能に寄与していることが示唆され、加えて、不斉炭素原子から反応部位までの炭素数が 2 であることも、光学異性体分離能に寄与していることが分かった。Otaki らは ¹H-NMR 分析と X 線結晶構造解析により、キラル第二級アルコールのジアステレオマー誘導体の HPLC 分離機構を示し、誘導体化試薬の芳香環とキラルアルコールのアルキル鎖の間の分子内 CH- π 相互作用が光学異性体分離に寄与していることを示している [29]。本研究の誘導体化試薬においても、同様の分子内相互作用が起きている可能性が考えられる (Fig. 10)。

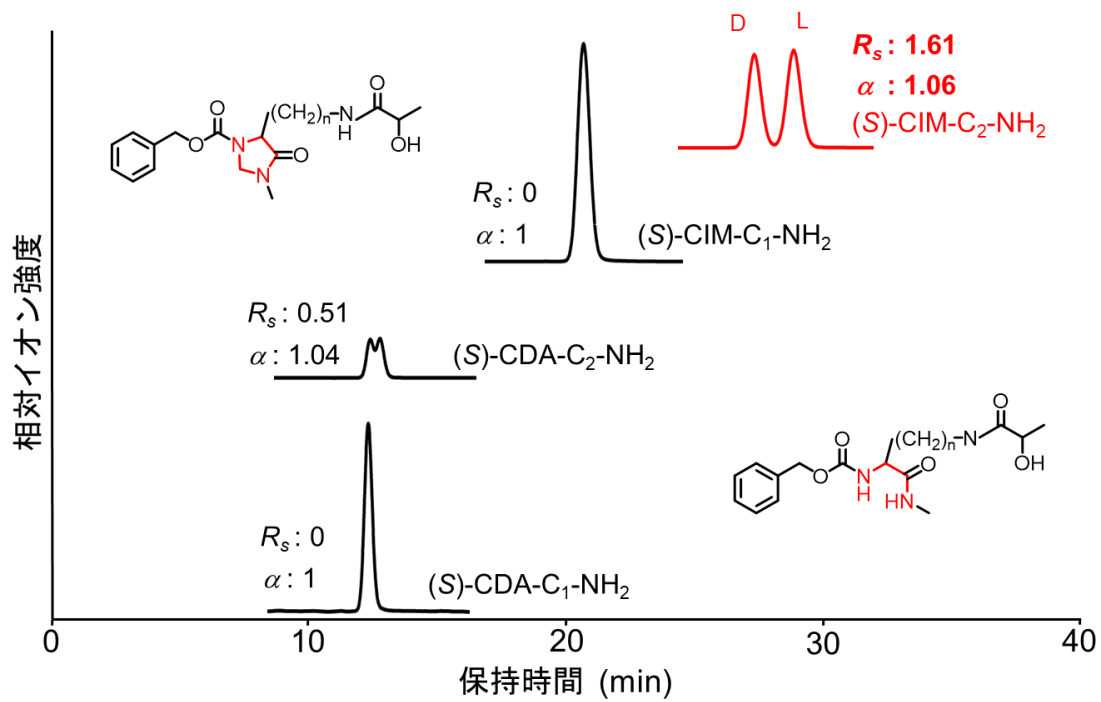


Fig. 9 各誘導体化試薬を用いた DL-Lac 誘導体の光学異性体分離の比較

(S)-CIM-C₂-NH₂-Lac

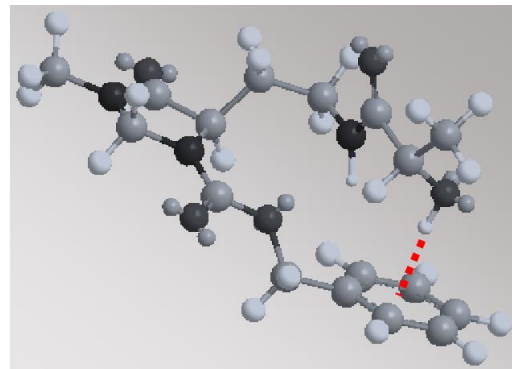
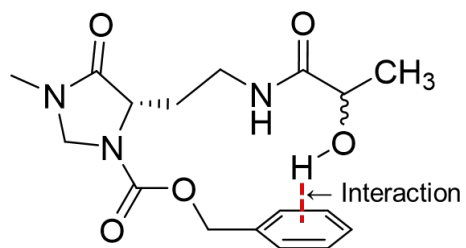


Fig. 10 推定される分子内相互作用

Table 2 a 光学活性有機酸 (モノカルボン酸) の光学異性体分離パラメーター
[分離係数 (α), 分離度(R_s)]

Synthesized reagent	Lac				
	W/O	k_1	first eluted enantiomer	α	R_s
CDA-C ₁ -NH ₂	90/10	17.0	-	1	0
CIM-C ₁ -NH ₂	85/15	12.1	-	1	0
CDA-C ₂ -NH ₂	85/15	6.63	D	1.04	0.51
CIM-C ₂ -NH ₂	85/15	16.3	D	1.06	1.61
	2-HB				
CDA-C ₁ -NH ₂	85/15	11.8	D	1.01	0.08
CIM-C ₁ -NH ₂	85/15	20.9	L	1.02	0.46
CDA-C ₂ -NH ₂	80/20	4.85	D	1.05	0.74
CIM-C ₂ -NH ₂	80/20	10.7	D	1.08	1.95
	3-HB				
CDA-C ₁ -NH ₂	90/10	18.4	-	1	0
CIM-C ₁ -NH ₂	85/15	12.4	L	1.02	0.15
CDA-C ₂ -NH ₂	85/15	7.38	D	1.02	0.07
CIM-C ₂ -NH ₂	85/15	17.3	D	1.05	1.31

k_1 : value of first eluted enantiomer

Mobile phase: H₂O (W)/CH₃CN (O)

Column temperature: 40°C

Table 2 b 光学活性有機酸 (ジカルボン酸) の光学異性体分離パラメーター
[分離係数 (α), 分離度 (R_s)]

Synthesized reagent	Mal				
	W/O	k_1	first eluted enantiomer	α	R_s
CIM-C ₁ -NH ₂	70/30	7.63	-	1	0
CIM-C ₂ -NH ₂	70/30	10.4	-	1	0
Tar					
CIM-C ₁ -NH ₂	70/30	6.44	-	1	0
CIM-C ₂ -NH ₂	70/30	8.87	D	1.09	1.95
CMA					
CIM-C ₁ -NH ₂	70/30	11.1	-	1	0
CIM-C ₂ -NH ₂	70/30	14.5	L	1.09	2.19

k_1 : value of first eluted enantiomer

Mobile phase: H₂O (W)/CH₃CN (O)

Column temperature: 40°C

2.2.2 プロダクトイオンの特徴

光学異性体分離能が最も優れていた CIM-C₂-NH₂ を用いて、質量分析の際に生じるプロダクトイオンの特徴を調べた。モノカルボン酸誘導体では、主にベンジルカチオンあるいはトロピニウムカチオンに由来すると考えられる $m/z = 91.1$ が検出された。この結果は、本誘導体化試薬の構造の基盤となった CIMA-OSu を用いて、アミノ酸誘導体を分析したときに生じるプロダクトイオンの特徴と同じであった。

一方で、モノカルボン酸とは異なり、ジカルボン酸誘導体では、主に $m/z = 278$ または $[M+H-277]$ のプロダクトイオンが検出された (Table 3)。モノカルボン酸とジカルボン酸誘導体の MS スペクトルとプロダクトイオン生成における推定開裂箇所を Fig. 11 に示した。以上のモノカルボン酸とジカルボン酸誘導体とで異なるプロダクトイオンを生成する特徴から、CIM-C₂-NH₂ はモノカルボン酸とジカルボン酸の識別が可能であることが示唆された。

ジカルボン酸誘導体におけるプロダクトイオンの生成メカニズムは Fig. 12 に示すように、2段階の反応が起きていると考えられる。

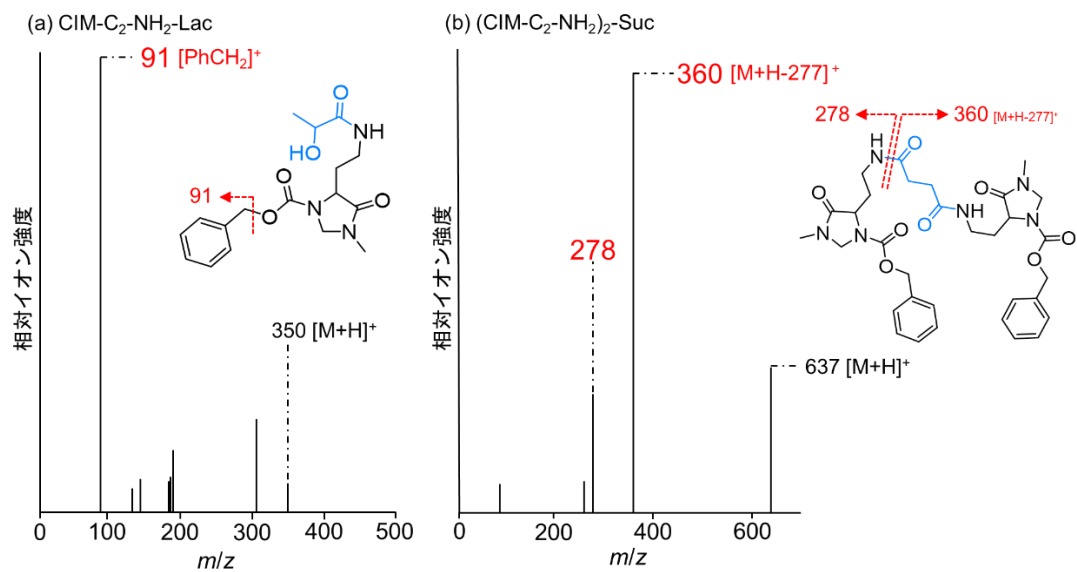


Fig. 11 CIM-C₂-NH₂を用いたカルボン酸誘導体のMSスペクトル

Table 3 質量分析の際に生じる主なプロダクトイオン

Mono-carboxylic acids	<i>m/z</i>	Di-carboxylic acids	<i>m/z</i>
Acetic acid	91	Suc	360 ([M+H-277]), 278
Propionic acid	91	Tar	392 ([M+H-277]), 278
Lac	91	Mal	376 ([M+H-277]), 91, 278
3-HB	91	Fumaric acid	91, 278
2-HB	91	CMA	390 ([M+H-277]), 91, 278
Glycolic acid	91		

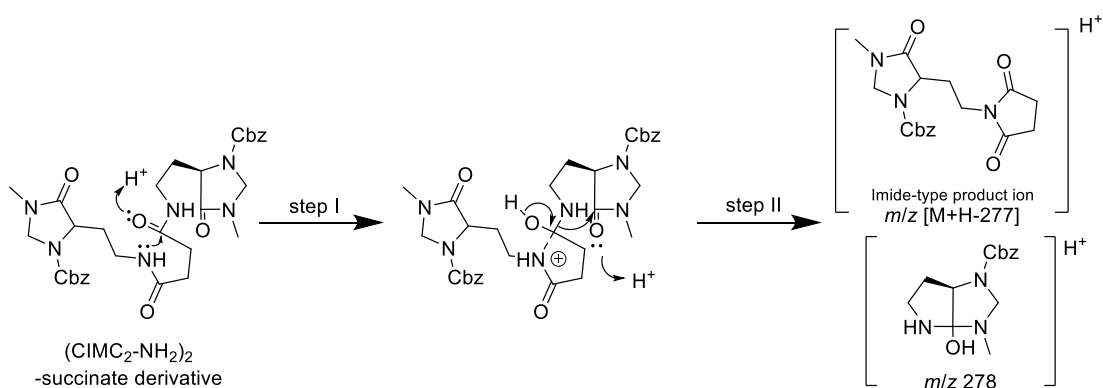


Fig. 12 ジカルボン酸誘導体におけるプロダクトイオン生成の推定メカニズム

2.3 小括

新規カルボキシ基用誘導体化試薬 4 種類を合成した。その中で CIM-C₂-NH₂ は光学異性体分離能が最も優れている誘導体化試薬であった。

また、質量分析において、CIM-C₂-NH₂ は、モノカルボン酸とジカルボン酸で異なる特徴的なプロダクトイオンが生じたことから、両者の識別が可能な試薬であることが示唆された。

これらの特徴は、血液検査などの臨床診断だけでなく将来、食品試料や生体試料中の未知のカルボキシ基を持つ物質が発見された場合、精密質量測定による元素組成の解明に加えて、マスマスペクトル上のプロダクトイオンを調べることで、その未知物質はモノカルボン酸か、ジカルボン酸かの識別に役立つことが期待される。

3 前処理ならびに分離分析条件の検討

3.1 誘導体化条件の検討

誘導体化の反応時間を検討した。0.5 mM の DL-Lac, DL-2HB, DL-3HB, DL-Tar, DL-Mal, DL-CMA, Suc と 50 μM Acetic acid の混合液を (*S*)-CIM-C₂-NH₂ で誘導体化した。縮合剤には、以前の研究で第一級アミノ基を持つ蛍光誘導体化試薬 4-(*N,N*-dimethylaminosulfonyl)-7-(2-aminoethylamino)-2,1,3-benzoxadiazole (DBD-ED) を使用して、Mal [30] などの有機酸または脂肪酸 [31] のカルボキシ基の誘導体化に成功したときに使用した縮合剤である TPP と DPDS を使用した。誘導体化法と LC-MS/MS 条件は Fig. 13 に示した。また、グラジエント条件は 3.3 一斉分離条件の検討 の項で確立したものを

いた。室温 (22°C) で 0、15、30、60、120、180 分間、誘導体化したときのピーク面積をプロットした (Fig. 14)。

検討したすべての有機酸において、誘導体化開始 120 分で、ピーク面積がほぼ一定となった。したがって、誘導体化時間は 120 分が最適であることが分かった。

Organic acids in PBS	10 μ L	MS	Tandem-quadrupole mass-spectrometer
(S)-Reagent in DMF (10 mM)	10 μ L	Column	InertSustain® C18 (2.1 \times 150 mm, 3.0 μ m)
TPP in CH ₃ CN (250 mM)	10 μ L	Mobile phase (gradient elution)	0.05% FA in H ₂ O/CH ₃ CN
DPDS in CH ₃ CN (250 mM)	10 μ L	Detection	Multiple reaction monitoring (MRM)
Vortex mix			
Stand for 120 min, r.t.			
0.05% Formic acid in CH ₃ CN / H ₂ O (20/80)	60 μ L		
Vortex mix			
LC-MS/MS (5.0 μ L injection)			

Fig. 13 誘導体化法および LC-MS/MS 条件

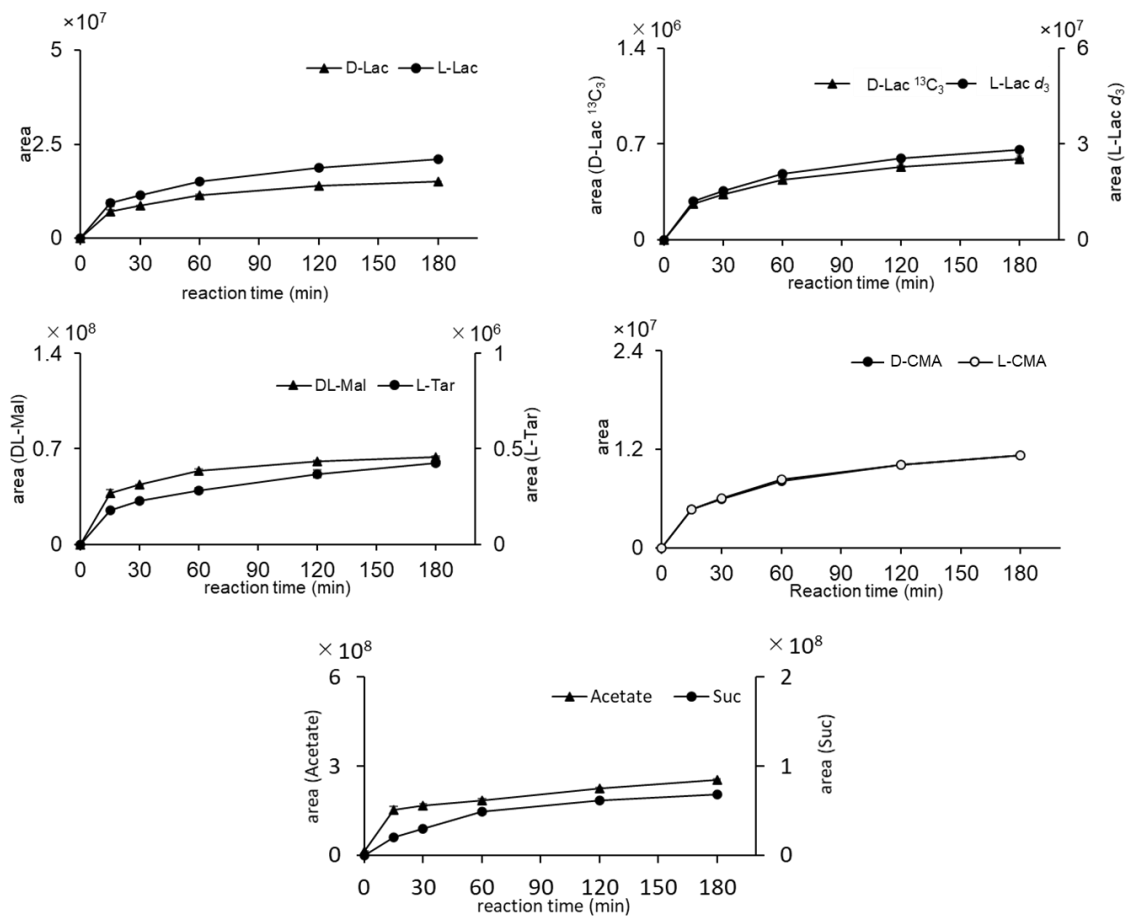


Fig. 14 誘導体化反応の時間-ピーク面積推移

3.2 移動相の検討

光学異性体分離能が最も優れていた誘導体化試薬 CIM-C₂-NH₂ を用いて、最適な移動相を検討した。CH₃CN、CH₃OH、THF、2-PrOH のいずれかを用いて、各有機酸の分離度および分離係数を比較した。誘導体化条件および測定条件は前項と同様である。

検討した 4 種類の溶媒の中で、THF では光学異性体分離が可能な有機酸は少なかったが、CH₃CN を用いたとき、検討したほぼすべての有機酸で光学異性体分離に成功した。一方で、DL-Mal は検討した溶媒すべてで、光学異性体分離が達成できなかった (Table 4)。

以上より、移動相条件は 0.05% Formic acid in H₂O/CH₃CN が最適であることが分かった。

Table 4 (S)-CIM-C₂-NH₂ を使用したときの光学活性有機酸の光学異性体分離パラメーター [H₂O (W), 有機溶媒 (O), 分離係数(α), 分離度 (R_s)]

Organic acid	H ₂ O - CH ₃ CN					H ₂ O - CH ₃ OH				
	W/O	k_1^*	first eluted enantiomer	α	R_s	W/O	k_1^*	first eluted enantiomer	α	R_s
Lactate	85/15	11.6	D	1.05	1.24	70/30	6.64	D	1.06	1.21
2-HB	80/20	8.3	D	1.07	1.54	70/30	12.4	D	1.10	2.76
3-HB	85/15	12.7	D	1.04	1.06	70/30	7.41	D	1.06	1.32
Tartrate	70/30	6.93	D	1.06	1.26	50/50	4.09	-	1	0
Malate	70/30	8.27	-	1	0	50/50	4.81	-	1	0
Citramalate	70/30	11.8	L	1.08	1.96	50/50	6.36	L	1.09	1.46

Organic acid	H ₂ O - 2-PrOH					H ₂ O - THF				
	W/O	k_1^*	first eluted enantiomer	α	R_s	W/O	k_1^*	first eluted enantiomer	α	R_s
Lactate	90/10	5.99	D	1.06	0.94	90/10	4.09	D	1.05	0.98
2-HB	90/10	10.6	D	1.12	2.62	90/10	7.33	D	1.10	1.80
3-HB	90/10	6.42	L	1.06	0.97	90/10	4.12	-	1	0
Tartrate	80/20	5.83	-	1	0	80/20	4.31	-	1	0
Malate	80/20	6.45	-	1	0	80/20	4.70	-	1	0
Citramalate	80/20	8.01	L	1.11	1.94	80/20	6.30	L	1.12	1.88

*: k_1 value of first eluted enantiomer

Column temperature: 60°C

3.3 一斉分離条件の検討

光学異性体分離に最適な移動相 ($\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$) を用いて、一斉分離条件の検討を行った。移動相は 0–30 min; B% = 15, 30.01–40 min; B% = 20, 40.01–70 min; B% = 30 の条件で測定を行った結果、有機酸の一斉分離検出に成功した (Fig. 15)。

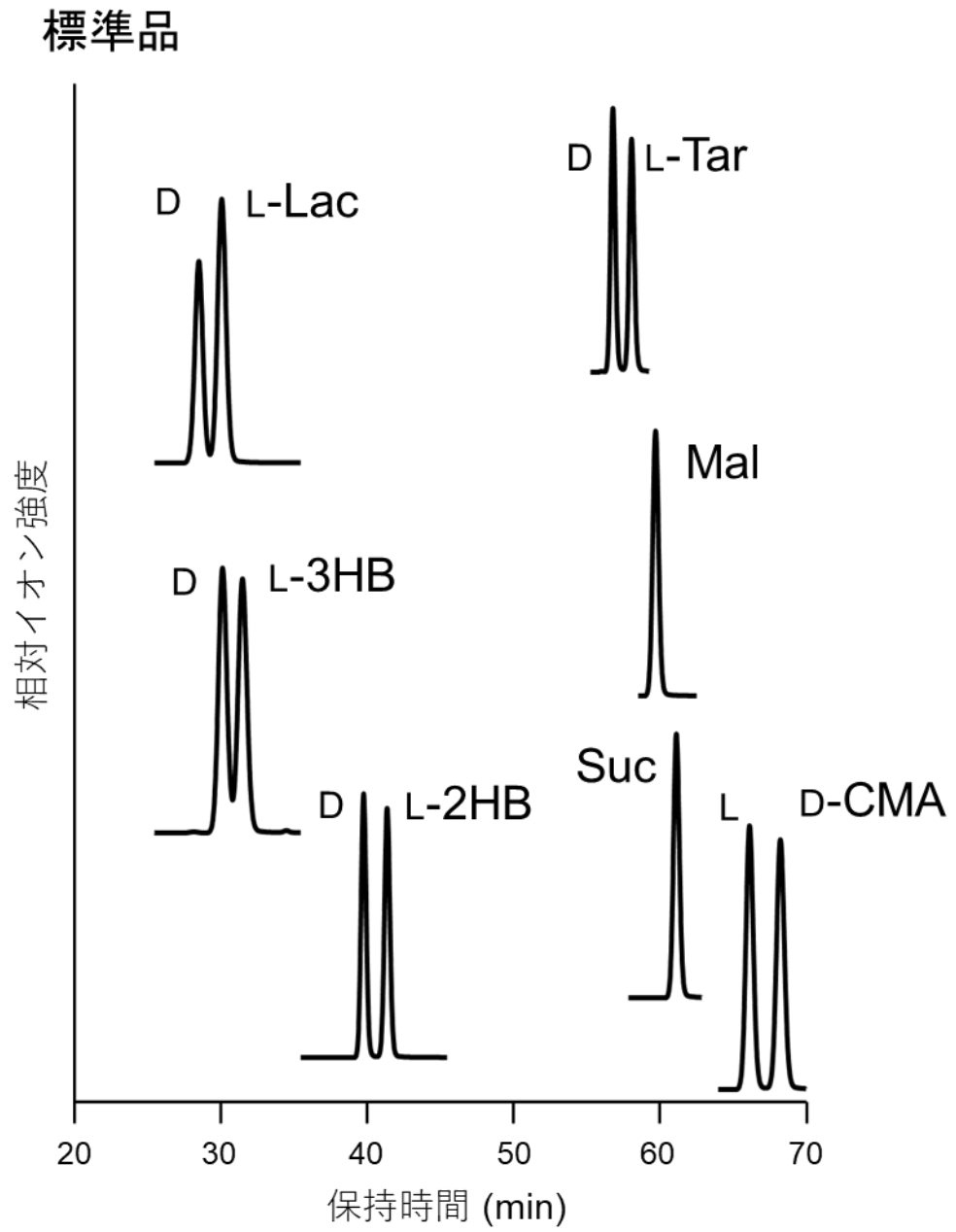


Fig. 15 有機酸標準品のクロマトグラム

3.4 誘導体の安定性

CIM-C₂-NH₂ による誘導体化反応後の有機酸誘導体の安定性を調べた。0.5 mM の DL-Lac, DL-2-HB, DL-3-HB, DL-Tar, DL-Mal, DL-CMA, Suc と 50 μM Acetic acid の混合液を (S)-CIM-C₂-NH₂ で誘導体化した。誘導体化方法および測定条件は Fig. 13 と同様の方法で行った。誘導体化後のサンプルは、4°C のオートサンプラー内で保存し、誘導体化後 0、6、12、48 時間後に分析を行った。

各誘導体のピーク面積は、誘導体化反応後、時間が経過してもほとんど減少しなかった (Fig. 16)。したがって、4°C において、誘導体は調製後 48 時間安定であることがわかった。

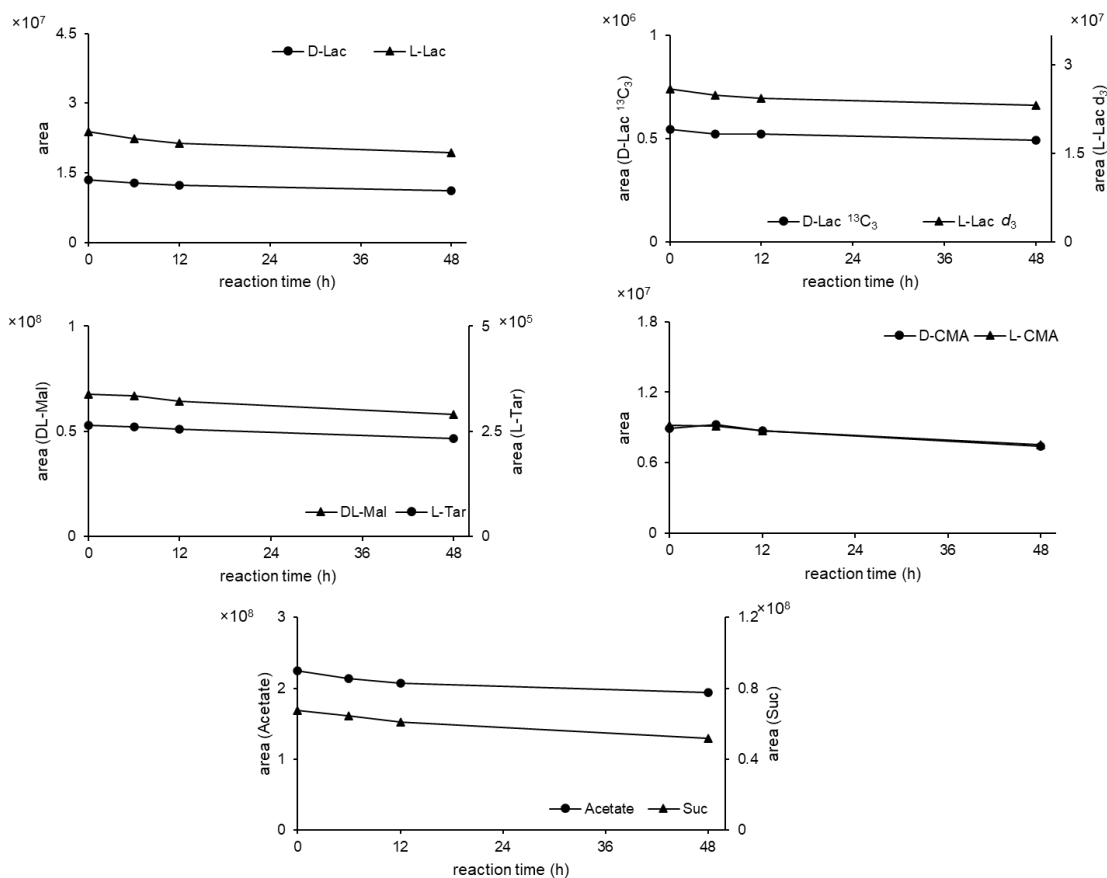


Fig. 16 CIM-C₂-NH₂ 誘導体の安定性

3.5 検出限界 (LOD)

50 μM DL-Lac, DL-2-HB, DL-3-HB, DL-Tar, DL-Mal, DL-CMA, Suc, Acetic acid in PBS を用いた。それぞれの有機酸溶液を 10 mM (S)-CIM-C₂-NH₂ で誘導体化・測定し、LOD (S/N = 3) を算出した。

各有機酸の LOD は Table 5 に示した。(S)-CIM-C₂-NH₂ で誘導体化した誘導体の LOD は、他の研究グループの報告 (Table 1) と比較して著しく低くはなかったが、後述する食品や生体試料への定量分析に十分適用する LOD が示された。

Table 5 各光学活性有機酸の検出限界

Organic acid	LOD (fmol)	Organic acid	LOD (fmol)
D-Lac	23.5	D-CMA	12.6
L-Lac	12.2	L-CMA	12.1
D-Tar	5.45	AA	1.31
L-Tar	6.08	Suc	3.54
		DL-Mal	131.8

4 食品試料への応用-ワイン中有機酸の分析-

市販の赤ワインを PBS で 10 倍に希釈し、IS として 10 μM sodium D-lactate (¹³C₃, 98%) in PBS + 1.0 mM L-Lac-3,3,3-*d*₃ in PBS (10 μL)、10 mM (S)-CIM-C₂-NH₂ in DMF、250 mM TPP in CH₃CN、250 mM DPDS in CH₃CN (各 10 μL) を加えた。得られた混合物を室温 (22°C) で 120 分間静置した。次に、50 μL の HCO₂H/H₂O/CH₃CN (0.05/80/20) を加えて誘導体化反応を停止させた。分析条件は Fig. 13 と同様の方法で行った。

市販の赤ワイン中有機酸を調べた結果、D および L-Lac や D-CMA が検出された (Fig. 17)。

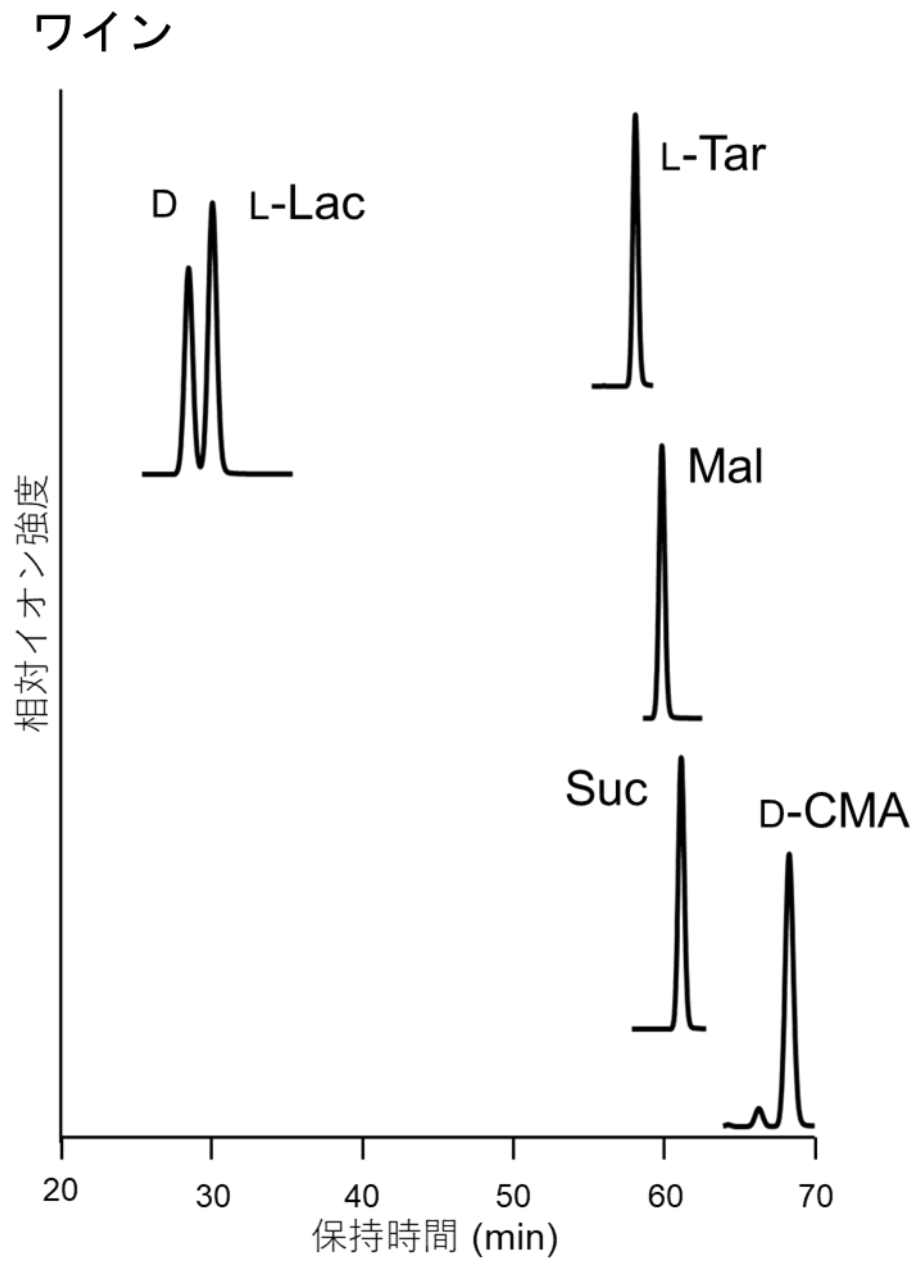


Fig. 17 標準品およびワイン中有機酸のクロマトグラム

5 小括

光学異性体分離能が最も優れた誘導体化試薬 CIM-C₂-NH₂ を用いて、有機酸の誘導体化及び測定条件の検討を行った。反応時間は 120 分、移動相は HCO₂H/H₂O/CH₃CN (0.05/80/20) が最適であった。また、有機酸の一斉分離条件を検討し、最適なグラジエント条件を見出した。

応用研究として、ワイン中有機酸の分析を行い、DL-Lac や D-CMA など 5 種類の有機酸の検出に成功した。ワインから D および L-Lac の両方が検出されたことは、以前の研究結果と一致していた[32]。

以上の結果より、本法は、ワインなど飲料のほか、さらに食品試料や生体試料への応用が期待される。そのため、第二章では食品（リンゴ）、第三章ではヒト血清中の有機酸分析を検討した。

第二章 食品試料への応用

1 背景・目的

第二章では、第一章で最も有機酸の光学異性体分離が良好であった、 $\text{CIM-C}_2\text{-NH}_2$ の実用性を調べる目的で、食品が含む有機酸の光学異性体に着目して、応用実験を行うことにした。

着目した有機酸はシトラマル酸 (CMA) で、これまでに乳酸や 3-HB に比べると、CMA に関する報告は多くはない。CMA は、不斉炭素を 1 つ有し D-体と L-体が存在するジカルボン酸であり、片方のカルボキシ基の α 位炭素にヒドロキシ基とメチル基が結合した不斉炭素をもつ構造上の特徴がある。しかしながら、天然物由来の CMA は D-体が主である報告[33] と L-体が主である報告[34]があり、また、D-体と L-体では合成経路、代謝経路や代謝物も異なっている (Fig. 18) [35-38]。本章では (R)- $\text{CIM-C}_2\text{-NH}_2$ を使用した応用実験として、日常、食する機会があるリンゴを取り上げ、リンゴに含有される CMA の絶対配置を明らかにすること、およびリンゴ中 CMA の定量を目的とした。

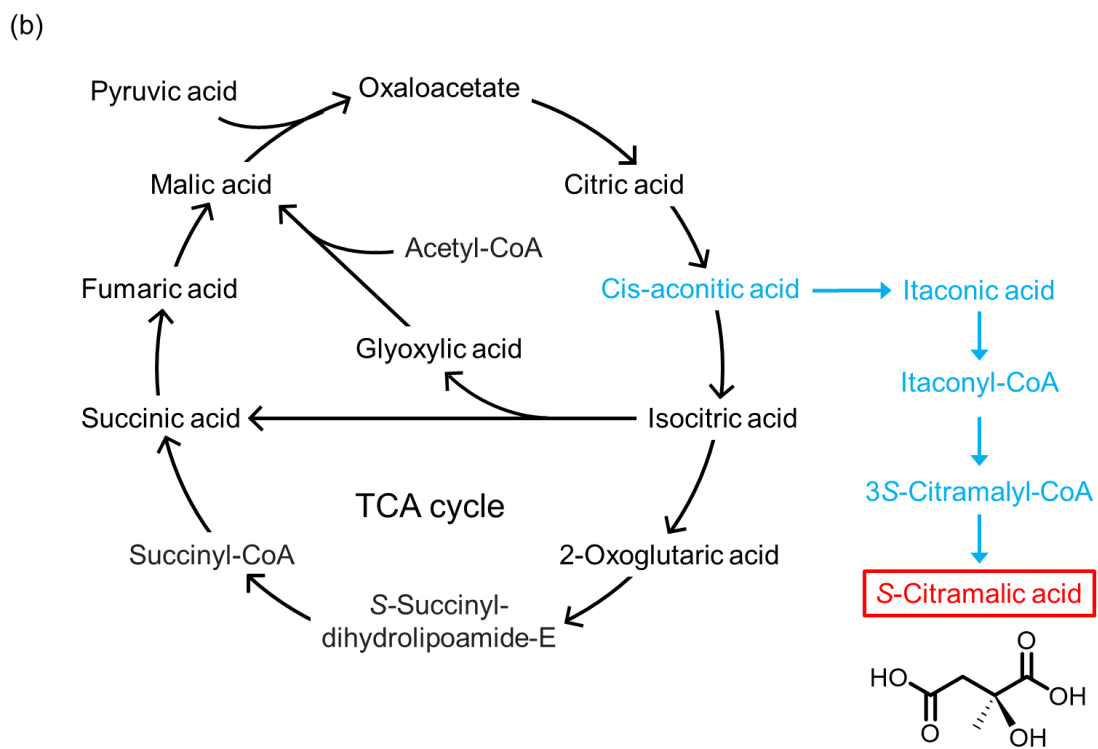
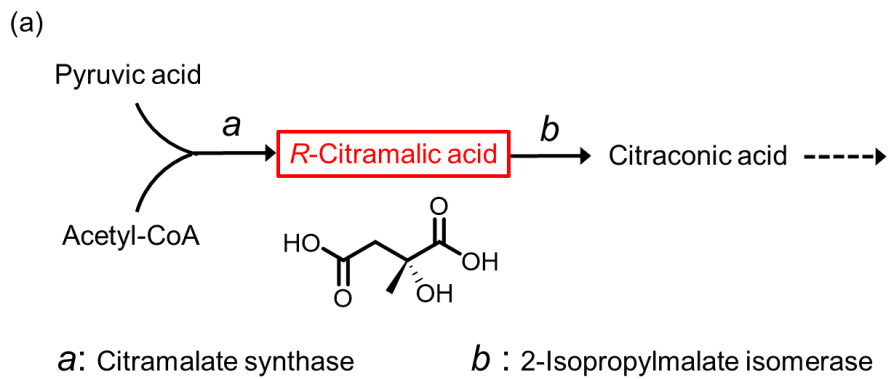


Fig. 18 CMA の生合成および代謝経路 (a) in plant, (b) in bacteria

2 前処理条件の検討

前処理条件の検討として、反応時間の検討を行った。100 μM DL-CMA in PBS を 60°C で誘導体化した。反応開始後 15, 30, 60, 120, 180 分後に 0–30 min; B% = 15, 30.01–40 min; B% = 20, 40.01–75 min; B% = 30 のグラジエント条件で測定を行い、ピーク面積をプロットした。

DL-CMA 誘導体のピーク面積は反応開始後 30 分後の時点で、ピーク面積がほぼ一定となった (Fig. 19)。したがって、誘導体化時間は 30 分が最適であることが分かった。

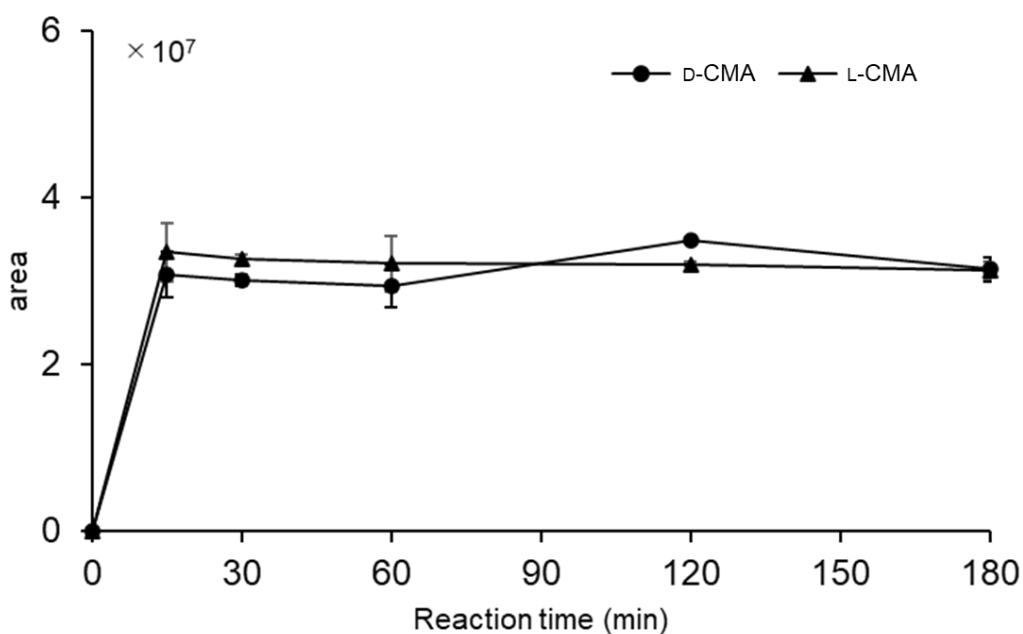


Fig. 19 誘導体化反応の時間-ピーク面積推移

3 バリデーション

3.1 検量線

果実は 5.0、10、25、50、100 μM 、果皮は 100、250、500、1000、2500 μM に濃度点を設定し、D-CMA のピーク面積比をプロットして作成した (各点 $n = 4$)。この標準溶液を 50 倍に希釈し、誘導体化した後、Fig. 20 に示す方法で測定を行ったところ、良好な直線性が得られた (Table 6)。

3.2 日内・日間変動

サンツがるを 4.1 前処理 に示す方法で実および皮に分け、リングサンプルを調製した。そのサンプルを Fig. 20 に示す方法で誘導体化、測定した。日内変動は 4 回 ($n = 4$)、日間変動は 4 日間 ($n = 4$) 測定した。結果は Table 6 に示した。

Apple sample	10 μL	MS	Tandem-quadrupole mass-spectrometer
IS	10 μL	Column	InertSustain® C18 (2.1 \times 150 mm, 3.0 μm)
(R)-CIM-C ₂ -NH ₂ in CH ₃ CN (10 mM)	10 μL	Mobile phase	0.05% FA in H ₂ O/CH ₃ CN
TPP in CH ₃ CN (250 mM)	10 μL	(gradient elution)	(0–30 min; B% = 15, 30.01–40 min; B% = 20, 40.01–75 min; B% = 30)
DPDS in CH ₃ CN (250 mM)	10 μL	Detection	Multiple reaction monitoring (MRM)
Vortex mix for 15 sec			
Stand for 30 min, 60°C			
0.05% Formic in CH ₃ CN / H ₂ O (20/80)	50 μL		
Vortex mix for 15 sec			
LC-MS/MS (5.0 μL injection)			

Fig. 20 誘導体化および測定方法

3.3 回収率

サンツがるの実および皮の試料溶液 (10 μ L) と D-CMA 標準品溶液 (実 : 25 μ M または 50 μ M、皮 : 500 μ M または 1000 μ M、各 10 μ L) を混合させた溶液に、H₂O 480 μ L を添加した。これらの試料 (10 μ L、 $n = 4$) を Fig. 20 に示す方法で誘導体化及び測定を行い、回収率を算出した。結果は Table 6 に示した。

Table 6 バリデーション

	Linearity		Sensitivity	Precision		Accuracy	
	Equation	R^2	LOD (fmol, S/N =3)	Intraday	Interday	Recovery (% , \pm SD)	
				RSD%	RSD%	low	high
D-CMA (Peel)	$7.52 \times 10^{-4} x + 0.0204$	0.9996	15.43	1.33	1.72	93 \pm 4.6	93 \pm 1.1
D-CMA (Fruit)	$8.83 \times 10^{-4} x + 0.000599$	0.9968		1.84	7.89	87 \pm 2.4	86 \pm 2.7

4 統計解析

3 種類のリンゴについて、D-CMA の含量を比較するため、統計解析を行った。統計解析には、Tukey's multiple comparison (<https://www.gen-info.osaka-u.ac.jp/MEPHAS/tukey.html>) を用いた。有意水準は $p < 0.05$ とした。

5 リンゴ中 CMA の定量

5.1 前処理

リンゴ（とき・つがる・サンつがる）はスーパーマーケットで購入した。リンゴは包丁で皮をむき、ミキサー（BM-FX08-GA, 象印マホービン株式会社）で皮と実を粉碎した。果実は 3,500 rpm で 15 分間遠心分離し、上清を 12,000 rpm、4°C で 15 分間遠心分離した。皮は 2 倍量の H₂O を混合し、ミキサーで粉碎した。3,500 rpm で 15 分間遠心した後、12,000 rpm で 15 分間、4°C で遠心した。皮と実を遠心分離した後に得られた上清を、50 倍希釈したもの（10 μL）を誘導体化した。誘導体化および測定方法は Fig. 20 に示す方法で行った。IS は 10 μM Sodium D-lactate (¹³C₃, 98%) および 1.0 mM Sodium L-lactate-3,3,3-*d*₃ in PBS (10 μL) を使用した。

5.2 リンゴ中 CMA の絶対配置の決定と定量

全てのリンゴの実と皮において、D-CMA と同一の保持時間にピークが確認された (Fig. 21)。D-CMA の含量はとき、つがる、サンつがるでそれぞれ、皮 ($n=3$) では 36.5 ± 1.21 、 10.5 ± 2.12 、 8.74 ± 5.87 mg/wet 100 g (mean \pm SE) であったのに対し、とき、つがる、サンつがるの果実 ($n=3$) ではそれぞれ 0.922 ± 0.066 、 0.522 ± 0.141 、 0.292 ± 0.114 mg/wet 100 g (mean \pm SE) であった (Fig. 22)。また、黄色品種（とき）のほうが、赤色品種（つがる、サンつがる）よりも多く D-CMA が含まれていた。

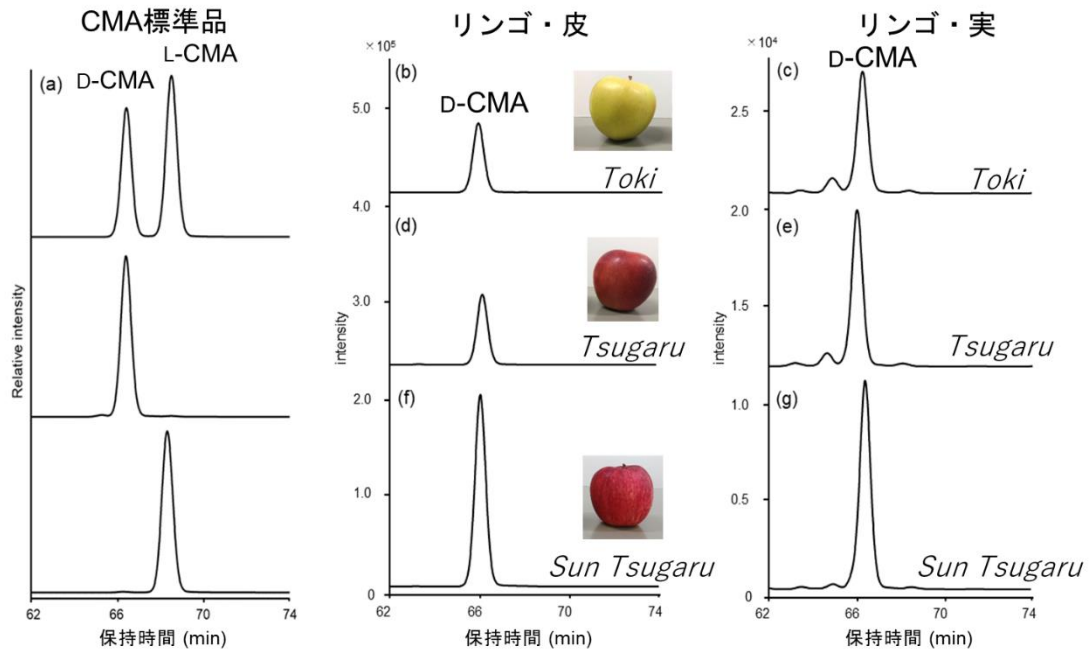


Fig. 21 CMA 標準品およびリンゴ中 CMA のクロマトグラム

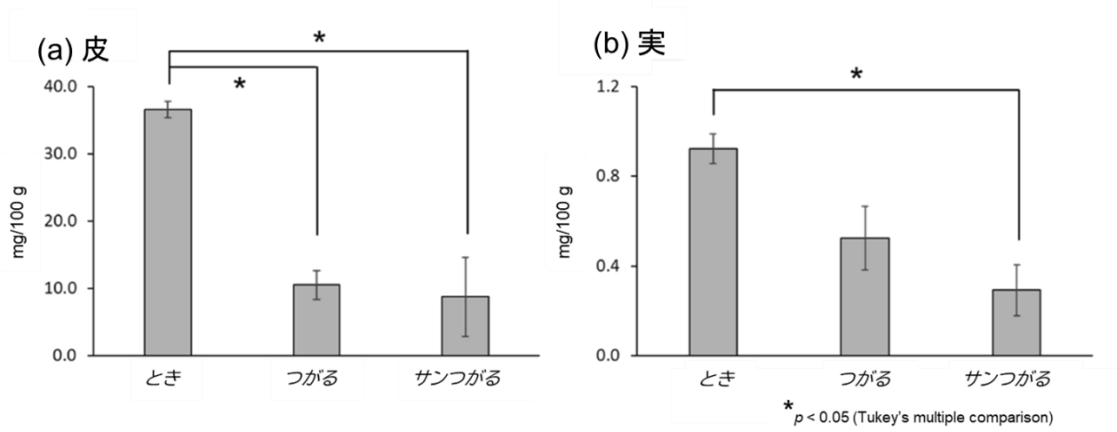


Fig. 22 リンゴ中 D-CMA の濃度

6 小括

CIM-C₂-NH₂を用いて、リンゴに含まれる CMA は D-体であることを明らかにした。また、リンゴ中 D-CMA は実よりも皮に多く含まれていることが分かった。この結果は、CMA は果実よりも皮に豊富に含まれることを報告した以前の研究と一致している[39]。しかしながら、これまでの報告では CMA の立体配置は、HPLC を用いた光学活性体の精密分離分析等、より信頼性の高い手法を用いては調べられておらず、本研究ではリンゴ中の CMA の立体配置を HPLC を使用して、新たに明らかにした。

さらに、皮の色による違いを比較したところ、黄色品種のほうが赤色品種よりも D-CMA を多く含んでいることが分かった。しかし、Noro らは、赤色品種の方が黄色品種よりも CMA を多く含んでおり、CMA がリンゴの皮のアントシアニン色素の生成に寄与している可能性を示唆した[40]。一方で、Di Matteo らは、果皮の色と CMA 含有量の関係は不明であると示した[41]。このように、現在では、リンゴの皮の色と CMA 含有量については未解明な点が残されている。今後、多種のリンゴの皮と CMA 含有量の詳細な調査が必要であるが、これらの調査に本 LC-MS 法は役立つことが期待される。

以上の結果より、本法は、実試料として食品（リンゴ）試料中の有機酸定量への応用が可能であることが示唆された。

第三章 生体試料への応用

1 背景・目的

第三章では、 $\text{CIM-C}_2\text{-NH}_2$ の生体試料への応用を目的として、 $\text{CIM-C}_2\text{-NH}_2$ を使用してヒト血清中有機酸の分離検出を検討した。序論にて記述したように、本研究・第三章では、生体試料として ARMS の血清を取り上げ、血清中から検出された有機酸の濃度を、健常者の血清中有機酸濃度に対して比較する。このようにして、ARMS と健常者で異なる濃度の有機酸を見出すことを目的とする。また、本章では、L-乳酸濃度に顕著な違いが見られたことから、解糖系の糖代謝に着目し、併せてグルコース、ピルビン酸の定量を酵素法により行った。

2 検体の情報

文書 (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) による同意を得た ARMS ($n=22$) および健常人 ($n=22$) の血清を使用した。本研究にご協力、参加して頂いた ARMS、健常者の内訳を Table 7 に示す。ARMS は、本学医療センター大森病院精神科医師による構造化面接により診断され、本研究の内容説明後、同意が得られた方に参加して頂いた。また、本研究では抗精神病薬を未服用の方のみに参加頂いた。

採血 (約 10 mL) は、前日の午後 9 時から飲食をせず、当日の朝食を採らずに午前 8 時～午前 9 時に腕の静脈から採血管 (Venject II AUTOSEP チューブ) を使って行った。血液を室温で 30 分間放置し、 $1,200 \times g$ で 15 分間遠心分離した後、得られた血清を 100 μL ずつ、スクリーキャップ付きのプラスチックチューブに小分けし、実験に使用するまで -80°C で保存した。

Table 7 患者情報

	ARMS (<i>n</i> = 22)		Control (<i>n</i> = 22)	
	Male	Female	Male	Female
<i>n</i>	10	12	10	12
Age (SD), yr	20.8 (5.5)	20.1 (4.8)	22.3 (1.3)	21.5 (3.5)

3 前処理・測定方法

前処理・測定条件は Fig. 23 に示した。グラジエント条件は 0–30 min; B% = 15, 30.01–40 min; B% = 20, 40.01–75 min; B% = 30 で行い、移動相には 0.05% Formic acid in H₂O/CH₃CN を使用した。

Human serum	30 μ L	MS	Tandem-quadrupole mass-spectrometer
IS	10 μ L	Column	InertSustain® C18 (2.1 \times 150 mm, 3.0 μ m)
H ₂ O	10 μ L	Mobile phase	0.05% FA in H ₂ O/CH ₃ CN
MeCN/MeOH (1/1)	150 μ L	(gradient elution)	(0–30 min; B% = 15, 30.01–40 min; B% = 20, 40.01–75 min; B% = 30)
Vortex mix		Detection	Multiple reaction monitoring (MRM)
Centrifuged			
Supernatant	150 μ L		
Evap.			
H ₂ O	10 μ L		
Vortex mix			
(<i>R</i>)-CIM-C ₂ -NH ₂ (25 mM)	10 μ L		
TPP (250 mM)	10 μ L		
DPDS (250 mM)	10 μ L		
Vortex mix			
Stand for 30 min, 60°C			
0.05% FA in MeCN / H ₂ O	60 μ L		
Vortex mix			
LC-MS/MS (5.0 μ L injection)			

Fig. 23 ヒト血清の誘導体化および測定方法

4 ヒト血清中有機酸の検出

ヒト血清中有機酸の検出を行い、L-Lac、D-3HBなどが検出された (Fig. 24)。

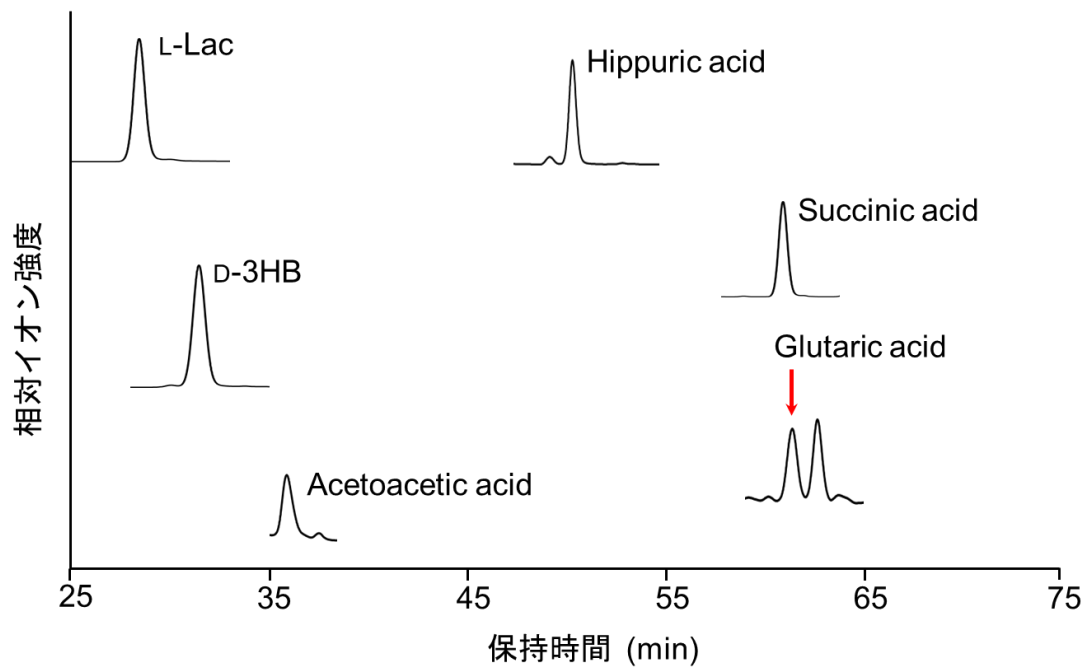


Fig. 24 ヒト血清中有機酸のクロマトグラム

5 ピルビン酸の定量

5.1 試薬・機器

測定には Pyruvate Assay Kit (Abcam) と True Line Cell Culture Plate TR5003 96 well を使用した。吸光度の測定には BECKMAN COULTER® DTX 800 Multimode Detector (分子生物学教室所有) を使用した。

5.2 実験操作

Assay buffer : Pyruvate probe : Enzyme mix = 46 : 2 : 2 の割合で混合し、Reaction mix を作成した。Pyruvate standard solution (100 nmol/mL) を 100 倍希釈し、1.0 mmol/L の標準液を調製した。調製した標準液 (1.0 mmol/L) を希釈し、検量線用の標準液を調製した (Table 8)。

Table 8 検量線用標準液の調製

No.	1	2	3	4	5	6	7
Std. (μL)	0	1	2	3	4	5	6
Buffer (μL)	50	49	48	47	46	45	44

Assay buffer (ブランク)、検量線用の標準液、またはヒト血清 50 μL をウェルに入れた。Reaction mix を各ウェルに 50 μL 加え、ピペッティングして混ぜ、室温で 30 min 静置した。ドライヤーで冷風を当て、気泡を取り除いた。プレートリーダー (分子生物学教室所有) で 570 nm の吸光度を測定し、切片を 0 とした検量線を作成した。作成した検量線をもとに、血清中ピルビン酸濃度を計算した。

$$\text{conc.} = \frac{\text{血清の吸光度 (ave.)}}{\text{検量線の傾き}}$$

5.3 定量

検量線からピルビン酸濃度を定量した結果を Table 9 に、次項のグルコースの定量結果と併せて示した。

6 グルコースの定量

6.1 試薬・機器等

グルコース CIIテストワコー (ムタロターゼ・GOD 法) : 富士フイルム和光純薬株式会社と H₂O、True Line Cell Culture Plate TR5003 96 well を使用した。吸光度の測定には BECKMAN COULTER® DTX 800 Multimode Detector (本学薬学部分子生物学教室所有) を使用した。

6.2 実験操作

発色剤を緩衝液で溶解し、発色試液とした。ブドウ糖標準液I (200 mg/dL) に H₂O を加え、検量線用の標準液 (25, 50, 80, 100, 120 mg/dL) を調製した。H₂O (ブランク)、検量線用の標準液、またはヒト血清を 3.0 μL をウェルに入れた。発色試液を各ウェルに 200 μL 加え、ピペッティングして混ぜ、37°C で 5 min 加温した。ドライヤーで冷風を当て、気泡を取り除いた。プレートリーダー (分子生物学教室所有) で 492 nm の吸光度を測定し、グルコース濃度を算出した。ブランクの吸光度の ave. を標準品の各濃度の吸光度の ave. から引き、切片を 0 とした検量線を作成し、血清中グルコース濃度を計算した。

$$\text{conc.} = \frac{\text{血清の吸光度 (ave.)}}{\text{検量線の傾き}}$$

6.3 定量

検量線からグルコース濃度を定量した結果を Table 9 に示す。

	ARMS (n = 22)		Control (n = 22)	
	Male	Female	Male	Female
Pyruvate (μM)	36.0 ± 2.84	42.5 ± 1.99	35.1 ± 4.36	36.2 ± 5.01
Glucose (mM)	5.42 ± 0.13	5.19 ± 0.10	4.79 ± 0.19	4.96 ± 0.10

7 統計解析

7.1 方法

ヒト血清から検出された各有機酸のピーク面積比を計算した。また、グルコースとピルビン酸は濃度を求め、統計解析を行った。統計解析には Mann-Whitney の *U* 検定 (Excel 統計 ver. 4.05, Microsoft) を使用し、 $p < 0.05$ を有意とした。 p 値はボンフェローニの方法により補正を行い、その値を補正 p 値とした (有意水準: 補正 p 値 < 0.05)。

7.2 結果

D-3HB や Suc では有意差が認められなかったが、ARMS において L-Lac の有意な減少、グルコース濃度の有意な増加が認められた (Fig. 25)。そこで、解糖系に着目し、L-Lac とグルコースおよびピルビン酸の比率を算出したところ、有意な差が認められた (Fig. 26)。

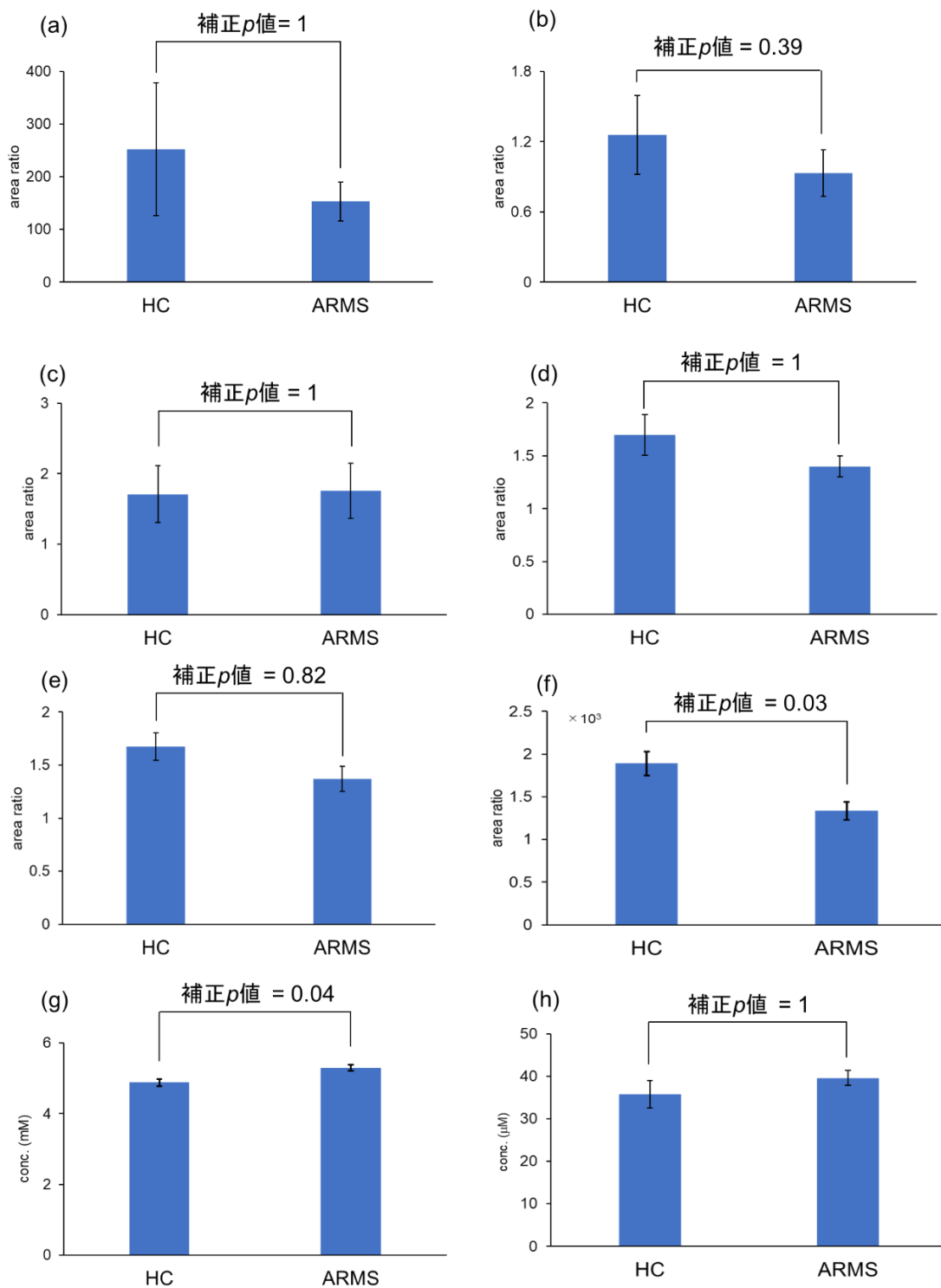


Fig. 25 各有機酸の面積比および濃度 (a) D-3-HB, (b) Acetoacetic acid, (c) Hippuric acid, (d) Suc, (e) Glutaric acid, (f) L-Lac, (g) Glucose, (h) Pyruvate [健常対象群; HC, ARMS 群; ARMS]

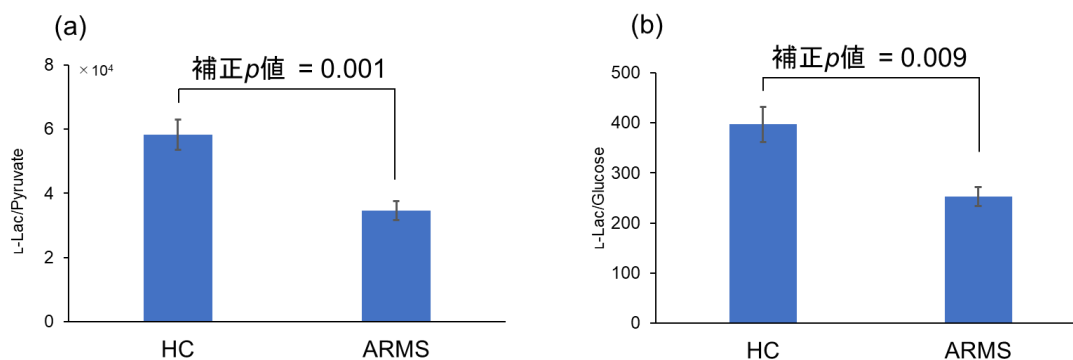


Fig. 26 (a) L-Lac / Pyruvate, (b) L-Lac / Glucose [健常対象群; HC, ARMS 群; ARMS]

8 小括

本章では、CIM-C₂-NH₂を使用して、ヒト血清中有機酸の分析を行った。D-3-HB、Acetoacetic acid、Hippuric acid、Suc、Glutaric acid、L-Lac が検出された。また、酵素法を用いて、グルコースとピルビン酸の定量を行った。

健常対象群と ARMS 群で比較解析を行ったところ、D-3-HB、Acetoacetic acid、Hippuric acid、Suc、Glutaric acid では有意差が認められなかったが、L-Lac とグルコースにおいて、有意な差が認められた。L-Lac の結果は、以前に、当教室でカラムスイッチング HPLC-蛍光検出法[26]で行った結果と同様であった。このことから、本研究で開発した誘導体化試薬 CIM-C₂-NH₂ ならびに LC-MS/MS 法による定量値の妥当性が支持された。また、解糖系に着目し、L-Lac とグルコースおよびピルビン酸の比率を算出したところ、有意差が認められた。これらの結果より、ARMS 群では解糖系に異常がある可能性が示唆された。解糖系 (Fig. 27) において、グルコースはグルコース-6-リン酸、フルクトース-6-リン酸、ホスホエノールピルビン酸を経てピルビン酸に異化される。その後、ピルビン酸はL-乳酸デヒドロゲナーゼによってL-乳酸に変換される[26]。そのため、ARMS では、これらの過程のいずれかに異常があることが示唆され、中でも、Fig. 26 (a) の結果より、L-乳

酸デヒドロゲナーゼの異常が関与していることが推察されるが、さらなる検証が必要である。

また、最近では、精神疾患と腸内細菌異常が着目されるようになった[42-44]。今後、精神疾患の機序解明には腸内細菌の関与なども明らかにする必要があり、本法は、腸内細菌が産生する有機酸の分析研究にも役立つことが期待される。本研究では、その他の検出された有機酸においては、ARMS と健常対照群では有意な差はなかったが、個体間でばらつきが多いものもあるため、今後、例数が増えることで有意差が付く可能性もある。

以上の結果より、本誘導体化試薬ならびに LC-MS/MS 法は、生体試料への応用が可能であることが示された。

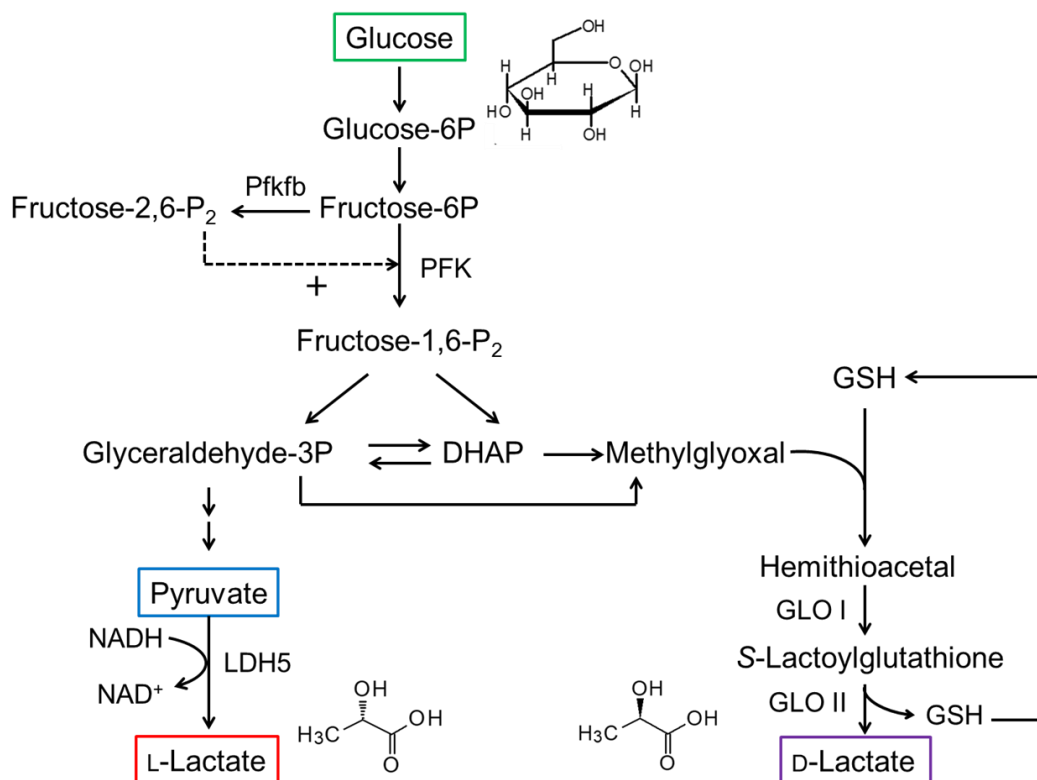


Fig. 27 グルコース代謝経路

4 総括

本研究は、新規カルボキシ基用誘導体化試薬の創製ならびに LC-MS/MS による有機酸の分離検出への応用を目的として、以下の検討を行った。

第一章では、新規カルボキシ基用誘導体化試薬 4 種類の創製を行った。そのうち、キラルイミダゾリジノン環構造を持つ CIM-C₂-NH₂ は光学異性体分離が最も優れており、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。また、応用研究として、ワイン中有機酸の分析を行い、DL-Lac などが検出された。これらの結果から、キラルイミダゾリジノン環構造を持つ CIM-C₂-NH₂ は飲料試料への応用が可能であることが示唆された。今後、CIM-C₂-NH₂ の光学異性体分離とプロダクトイオンの特徴は、LC-MS/MS 分析において、本研究のようなターゲット分析のみに留まらず、ノンターゲットメタボロミクスなどの手法による、未知のカルボキシ基を持つ物質の同定、解析研究に役立つ可能性があると考えられる。

第二章では、(R)-CIM-C₂-NH₂ を用いて、リンゴ中 CMA の絶対配置の決定と定量を行った。リンゴに含まれる CMA は D 体であることが分かり、D-CMA は実よりも皮に多く含まれていた。これらの結果から、CIM-C₂-NH₂ は食品試料への応用が可能であることが示唆された。

第三章では、生体試料への応用として、ヒト血清中有機酸の分析を行った。ヒト血清（健常人および ARMS）中から、L-Lac や D-3HB など、複数の有機物を同定した。また、健常対象群と ARMS 群の比較解析を行ったところ、L-Lac では ARMS 群において有意な減少、グルコースでは有意な増加が認められた。そこで、解糖系に着目し、L-Lac とグルコースおよびピルビン酸の比率を算出したところ、有意な差が認められた。以上より、ARMS 群では解糖系に異常がある可能性があることが示唆された。

このように、本研究により創出された誘導体化試薬ならびに LC-MS/MS による分離検出法は、食品分析や疾患の臨床診断において、役立つことが分かり、今後、更なる分析技術の進展とともに、本誘導体化試薬の様々な食品分析や疾患の臨床診断等への応用、展開が期待される。

5 参考文献

- [1] W. Xiong, C.H. Parker, C.C. Boo, K.L. Fiedler, Comparison of allergen quantification strategies for egg, milk, and peanut in food using targeted LC-MS/MS, *Anal Bioanal Chem.*, **413(23)** (2021) 5755-5766. <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03550-x>.
- [2] K. Goeury, S. Vo Duy, G. Munoz, M. Prévost, S. Sauvé, Assessment of automated off-line solid-phase extraction LC-MS/MS to monitor EPA priority endocrine disruptors in tap water, surface water, and wastewater, *Talanta*, **241** (2022) 123216. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.123216>.
- [3] É. Szökő, I. Vincze, T. Tábi, Chiral separations for D-amino acid analysis in biological samples, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **130** (2016) 100-109. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.06.054>.
- [4] C.V. Bui, T. Rosenau, H. Hettegger, Polysaccharide- and β -Cyclodextrin-Based Chiral Selectors for Enantiomer Resolution: Recent Developments and Applications, *Molecules*, **26(14)** (2021). <https://doi.org/10.3390/molecules26144322>.
- [5] M.A. Tantawy, H.Y. Aboul-Enein, A.M. Yehia, Resolving phenylephrine HCl and guaifenesin enantiomers on cellulose-based chiral stationary phases: Separation of four enantiomers on 50-mm column, *Chirality*, **35(12)** (2023) 1019-1028. <https://doi.org/10.1002/chir.23616>.
- [6] H. Shikanai, K. Ikimura, M. Miura, T. Shindo, A. Watarai, T. Izumi, Separation and detection of D-/L-serine by conventional HPLC, *MethodsX*, **9** (2022) 101752. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2022.101752>.
- [7] T. Kuwabara, T. Takayama, K. Todoroki, K. Inoue, J.Z. Min, T. Toyo'oka, Evaluation of a series of prolylamidopyridines as the chiral derivatization reagents for enantioseparation of carboxylic acids by LC-ESI-MS/MS and the application to human saliva, *Anal Bioanal Chem.*, **406(11)** (2014) 2641-9. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-7637-7>.
- [8] T. Takayama, T. Kuwabara, T. Maeda, I. Noge, Y. Kitagawa, K. Inoue, K. Todoroki, J.Z. Min, T. Toyo'oka, Profiling of chiral and achiral carboxylic acid metabolomics: synthesis and evaluation of triazine-type chiral derivatization reagents for carboxylic acids by LC-ESI-MS/MS and the application to saliva of healthy volunteers and diabetic patients, *Anal Bioanal Chem.*, **407(3)** (2015) 1003-1014. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-8275-9>.
- [9] Q.Y. Cheng, J. Xiong, W. Huang, Q. Ma, W. Ci, Y.Q. Feng, B.F. Yuan, Sensitive Determination of Onco-metabolites of D- and L-2-hydroxyglutarate Enantiomers

- by Chiral Derivatization Combined with Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Analysis, *Sci Rep.*, **5** (2015) 15217. <https://doi.org/10.1038/srep15217>.
- [10] A. Egerton, A.A. Grace, J. Stone, M.G. Bossong, M. Sand, P. McGuire, Glutamate in schizophrenia: Neurodevelopmental perspectives and drug development, *Schizophr Res.*, **223** (2020) 59-70. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2020.09.013>.
- [11] O. Howes, R. McCutcheon, J. Stone, Glutamate and dopamine in schizophrenia: an update for the 21st century, *J Psychopharmacol.*, **29(2)** (2015) 97-115. <https://doi.org/10.1177/0269881114563634>.
- [12] S. Erhardt, L. Schwieler, S. Imbeault, G. Engberg, The kynurenine pathway in schizophrenia and bipolar disorder, *Neuropharmacology*, **112(Pt B)** (2017) 297-306. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.05.020>.
- [13] J. Sapienza, M. Spangaro, G.J. Guillemin, S. Comai, M. Bosia, Importance of the dysregulation of the kynurenine pathway on cognition in schizophrenia: a systematic review of clinical studies, *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.*, **273(6)** (2023) 1317-1328. <https://doi.org/10.1007/s00406-022-01519-0>.
- [14] I. Cervenka, L.Z. Agudelo, J.L. Ruas, Kynurenines: Tryptophan's metabolites in exercise, inflammation, and mental health, *Science*, **357(6349)** (2017). <https://doi.org/10.1126/science.aaf9794>.
- [15] T. Fukushima, H. Iizuka, A. Yokota, T. Suzuki, C. Ohno, Y. Kono, M. Nishikiori, A. Seki, H. Ichiba, Y. Watanabe, S. Hongo, M. Utsunomiya, M. Nakatani, K. Sadamoto, T. Yoshio, Quantitative analyses of schizophrenia-associated metabolites in serum: serum D-lactate levels are negatively correlated with gamma-glutamylcysteine in medicated schizophrenia patients, *PLoS One*, **9(7)** (2014) e101652. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101652>.
- [16] 茅野 分, 精神科診療所における A R M S 診療, 予防精神医学, **1(1)** (2016) 37-47. https://doi.org/10.24591/jseip.1.1_37.
- [17] A. Comparelli, R. Tatarelli, P. Girardi, At-risk mental states: possible clinical and theoretical developments, *Riv Psichiatr.*, **47(2)** (2012) 73-75. <https://doi.org/10.1708/1069.11711>.
- [18] P.J. Magistretti, I. Allaman, Lactate in the brain: from metabolic end-product to signalling molecule, *Nat Rev Neurosci.*, **19(4)** (2018) 235-249. <https://doi.org/10.1038/nrn.2018.19>.
- [19] F.N. Bangel, K. Yamada, M. Arai, Y. Iwayama, S. Balan, T. Toyota, Y. Iwata, K. Suzuki, M. Kikuchi, T. Hashimoto, N. Kanahara, N. Mori, M. Itokawa, O.

- Stork, T. Yoshikawa, Genetic analysis of the glyoxalase system in schizophrenia, *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.*, **59** (2015) 105-110. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2015.01.014>.
- [20] K. Toriumi, S. Berto, S. Koike, N. Usui, T. Dan, K. Suzuki, M. Miyashita, Y. Horiuchi, A. Yoshikawa, M. Asakura, K. Nagahama, H.C. Lin, Y. Sugaya, T. Watanabe, M. Kano, Y. Ogasawara, T. Miyata, M. Itokawa, G. Konopka, M. Arai, Combined glyoxalase 1 dysfunction and vitamin B₆ deficiency in a schizophrenia model system causes mitochondrial dysfunction in the prefrontal cortex, *Redox Biol.*, **45** (2021) 102057. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.102057>.
- [21] J. Yin, G. Ma, S. Luo, X. Luo, B. He, C. Liang, X. Zuo, X. Xu, Q. Chen, S. Xiong, Z. Tan, J. Fu, D. Lv, Z. Dai, X. Wen, D. Zhu, X. Ye, Z. Lin, J. Lin, ..., Y. Wang, Glyoxalase 1 Confers Susceptibility to Schizophrenia: From Genetic Variants to Phenotypes of Neural Function, *Front Mol Neurosci.*, **14** (2021) 739526. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2021.739526>.
- [22] M. Arai, H. Yuzawa, I. Nohara, T. Ohnishi, N. Obata, Y. Iwayama, S. Haga, T. Toyota, H. Ujike, T. Ichikawa, A. Nishida, Y. Tanaka, A. Furukawa, Y. Aikawa, O. Kuroda, K. Niizato, R. Izawa, K. Nakamura, N. Mori, D. Matsuzawa, K. Hashimoto, M. Iyo, I. Sora, M. Matsushita, Y. Okazaki, T. Yoshikawa, T. Miyata, M. Itokawa, Enhanced carbonyl stress in a subpopulation of schizophrenia, *Arch Gen Psychiatry.*, **67(6)** (2010) 589-597. <https://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2010.62>.
- [23] M. Arai, M. Miyashita, A. Kobori, K. Toriumi, Y. Horiuchi, M. Itokawa, Carbonyl stress and schizophrenia, *Psychiatry Clin Neurosci.*, **68(9)** (2014) 655-665. <https://doi.org/10.1111/pcn.12216>.
- [24] H. Hasegawa, T. Fukushima, J.A. Lee, K. Tsukamoto, K. Moriya, Y. Ono, K. Imai, Determination of serum D-lactic and L-lactic acids in normal subjects and diabetic patients by column-switching HPLC with pre-column fluorescence derivatization, *Anal Bioanal Chem.*, **377(5)** (2003) 886-891. <https://doi.org/10.1007/s00216-003-2108-6>.
- [25] H. Ichihara, T. Fukushima, K. Imai, Enantiomeric determination of D- and L-lactate in rat serum using high-performance liquid chromatography with a cellulose-type chiral stationary phase and fluorescence detection, *Anal Biochem.*, **269(2)** (1999) 379-385. <https://doi.org/10.1006/abio.1999.4032>.
- [26] M. Onozato, M. Umino, A. Shoji, H. Ichiba, N. Tsujino, T. Funatogawa, H. Tagata, T. Nemoto, M. Mizuno, T. Fukushima, Serum D- and L-lactate, pyruvate and glucose levels in individuals with at-risk mental state and correlations with

- clinical symptoms, *Early Interv Psychiatry.*, **14(4)** (2020) 410-417. <https://doi.org/10.1111/eip.12866>.
- [27] T. Sakamoto, S. Furukawa, T. Nishizawa, M. Fukuda, M. Sasaki, M. Onozato, S. Uekusa, H. Ichiba, T. Fukushima, Succinimidyl (3-[(benzyloxy)carbonyl]-5-oxo-1,3-oxazolidin-4-yl) acetate on a triazole-bonded phase for the separation of DL-amino acid enantiomers and the mass-spectrometric determination of chiral amino acids in rat plasma, *J Chromatogr A.*, **1585** (2019) 131-137. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.11.061>.
- [28] T. Sakamoto, M. Onozato, S. Uekusa, H. Ichiba, M. Umino, M. Shirao, T. Fukushima, Development of derivatization reagents bearing chiral 4-imidazolidinone for distinguishing primary amines from other amino acids and application to the liquid chromatography-tandem mass spectrometric analysis of miso, *J Chromatogr A.*, **1652** (2021) 462341. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462341>.
- [29] T. Ohtaki, K. Akasaka, C. Kabuto, H. Ohru, Chiral discrimination of secondary alcohols by both ¹H-NMR and HPLC after labeling with a chiral derivatization reagent, 2-(2,3-anthracenedicarboximide)cyclohexane carboxylic acid, *Chirality*, **17** Suppl (2005) S171-176. <https://doi.org/10.1002/chir.20141>.
- [30] M. Onozato, R. Kanda, Y. Sato, T. Sakamoto, M. Umino, T. Fukushima, Column-switching high-performance liquid chromatography-fluorescence detection method for malic acid enantiomers in commercial wines, *Journal of Food Composition and Analysis*, **106** (2022) 104282. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.104282>.
- [31] M. Onozato, Y. Okanishi, M. Akutsu, I. Okumura, A. Nemoto, K. Takano, T. Sakamoto, H. Ichiba, T. Fukushima, Alteration in plasma docosahexaenoic acid levels following oral administration of ethyl icosapentate to rats, *Pract Lab Med.*, **18** (2020) e00143. <https://doi.org/10.1016/j.plabm.2019.e00143>.
- [32] T. Fukushima, S. Adachi, H. Ichihara, S. Al-Kindy, K. Imai, Fluorimetric determination of D- and L-lactate derivatized with 4-(N, N-dimethylaminosulfonyl)-7-piperazino-2,1,3-benzoxadiazole (DBD-PZ) by high-performance liquid chromatography, *Biomed Chromatogr.*, **13(6)** (1999) 418-424. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1099-0801\(199910\)13:6<418::aid-bmc903>3.0.co;2-e](https://doi.org/10.1002/(sici)1099-0801(199910)13:6<418::aid-bmc903>3.0.co;2-e).
- [33] T. Sai, M. Amaha, Accumulation of (-)-citramalic acid by respiration-deficient mutants of brewers' yeasts, *The Journal of General and Applied Microbiology*, **11(4)** (1965) 355-365. <https://doi.org/10.2323/jgam.11.355>.

- [34] Q.C. Yin, J.B. Ji, R.H. Zhang, Z.W. Duan, H. Xie, Z. Chen, F.C. Hu, H. Deng, Identification and verification of key taste components in wampee using widely targeted metabolomics, *Food Chem X*, **13** (2022) 100261. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2022.100261>.
- [35] N. Sugimoto, P. Engelgau, A.D. Jones, J. Song, R. Beaudry, Citramalate synthase yields a biosynthetic pathway for isoleucine and straight- and branched-chain ester formation in ripening apple fruit, *Proc Natl Acad Sci USA.*, **118**(3) (2021). <https://doi.org/10.1073/pnas.2009988118>.
- [36] A.H. Hossain, A. Hendrikx, P.J. Punt, Identification of novel citramalate biosynthesis pathways in *Aspergillus niger*, *Fungal Biol Biotechnol.*, **6** (2019) 19. <https://doi.org/10.1186/s40694-019-0084-7>.
- [37] B.F. He, T. Ozawa, T. Nakajima-Kambe, T. Nakahara, Efficient conversion of itaconic acid to (S)-(+)-citramalic acid by *Alcaligenes xylosoxydans* IL142, *J Biosci Bioeng.*, **89**(4) (2000) 388-391. [https://doi.org/10.1016/s1389-1723\(00\)88965-3](https://doi.org/10.1016/s1389-1723(00)88965-3).
- [38] A.H. Blair, H.A. Barker, Assay and purification of (+)-citramalate hydro-lyase components from *Clostridium tetanomorphum*, *J Biol Chem* **241**(2) (1966) 400-408.
- [39] A.C. Hulme, The isolation of L-citramalic acid from the peel of the apple fruit, *Biochim Biophys Acta.*, **14**(1) (1954) 36-43. [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(54\)90127-4](https://doi.org/10.1016/0006-3002(54)90127-4).
- [40] S. Noro, N. Kudo, T. Kitsuwawa, Differences in sugars and organic acids between red and yellow apple cultivars at time of coloring, and effect of citramalic acid on development of anthocyanin, *Engei Gakkai zasshi*, **57**(3) (1988) 381-389. <https://doi.org/10.2503/jjshs.57.381>.
- [41] G. Di Matteo, M. Spano, C. Esposito, C. Santarcangelo, A. Baldi, M. Daglia, L. Mannina, C. Ingallina, A.P. Sobolev, NMR Characterization of Ten Apple Cultivars from the Piedmont Region, *Foods*, **10**(2) (2021). <https://doi.org/10.3390/foods10020289>.
- [42] T.F.S. Bastiaanssen, C.S.M. Cowan, M.J. Claesson, T.G. Dinan, J.F. Cryan, Making Sense of ... the Microbiome in Psychiatry, *Int J Neuropsychopharmacol.*, **22**(1) (2019) 37-52. <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyy067>.
- [43] I.B. Nita, O.D. Ilie, A. Ciobica, L.D. Hritcu, I. Dobrin, B. Doroftei, R. Dobrin, Reviewing the Potential Therapeutic Approaches Targeting the Modulation of Gastrointestinal Microflora in Schizophrenia, *Int J Mol Sci.*, **23**(24) (2022). <https://doi.org/10.3390/ijms232416129>.

[44] S.G. Sorboni, H.S. Moghaddam, R. Jafarzadeh-Esfehani, S. Soleimanpour, A Comprehensive Review on the Role of the Gut Microbiome in Human Neurological Disorders, *Clin Microbiol Rev.*, **35(1)** (2022) e0033820. <https://doi.org/10.1128/cmr.00338-20>.

6 謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご指導・ご鞭撻賜りました東邦大学 薬学部 薬品分析学教室 (薬学研究科 分子病態解析学講座) 福島 健 教授、小野里磨優 講師、坂本達弥 助教、元講師 一場秀章 先生に感謝申し上げます。

本研究に関するご助言を頂きました薬学研究科 分子病態解析学講座 (薬品分析学教室) 博士課程学生の菅澤 寛 氏、技術的なご支援を頂きました薬品分析学教室 卒業研究学生の小石海琴 氏に感謝致します。

ヒト血清の分析においてご協力頂きました東邦大学 医学部 精神神経医学講座 根本隆洋 教授、片桐直之 准教授、舩渡川智之 講師、田形弘実 助教、今川 弘 医師、社会福祉法人恩賜財団 済生会 横浜市東部病院 辻野尚久 医師、地方独立行政法人 東京都立病院機構 東京都立松沢病院 水野雅文 院長、ならびに本研究にご協力頂いたボランティアの皆様感謝申し上げます。

本論文の審査において、貴重なご助言を賜りました東邦大学薬学部 臨床薬学研究室 松尾和廣 教授、薬物動態学教室 宮内正二 教授、生薬学教室 李 魏 教授、また、副指導教員である社会薬学研究室 高橋瑞穂 講師に心より御礼申し上げます。

また、本研究にご支援頂きました 2023 年度 日本薬学会長井記念薬学研究奨励支援事業 [N-231502] に深謝致します。

最後に、修学の機会を与えてくれ、日々、サポートしてくれた母に感謝致します。