胆汁酸ミセル動電クロマトグラフィーによる アミノ酸光学異性体分離機構の統計的解析

池永 裕^a、花木 美紗^a、隅本 倫徳^a、椎木 弘^b、長岡 勉^b、
堀 憲次^{a*}

^a 山口大学大学院理工学研究科 755-8611 山口県宇部市常盤台2-16-1

^b 大阪府立大学先端科学研究所 599-8570 大阪府堺市学園町1-2

(Received April 6, 2007; Accepted May 28, 2007)

キャピラリー電気泳動(Capillary Electrophoresis, CE)の分離モードの一つであるミセル動電クロマトグラフィー(Micellar Electrokinetic Chromatography, MEKC)は有機化合物の光学異性体分離を行うことが可能である。その分離機構には泳動液中のミセルと測定試料の疎水的相互作用の違いが関与していると考えられている。しかしながら、分離機構に関与しているパラメータを統計的手法を用いて解析し、分離に重要なパラメータを特定することは、これまで行われていない。本研究では、界面活性剤として4種類の胆汁酸類、コール酸(CA)、タウロコール酸(TCA)、ケノデオキシコール酸(CDCA)、デオキシコール酸(DCA)を用いて、MEKCによる11種類のアミノ酸の光学異性体分離を行い、得られた結果から分離度(R_s)を算出した。全ての胆汁酸類において、アミノ酸の物性値や実験条件などの6種類の値を説明変数とし、算出した R_s を目的変数とするGA-PLS解析を行い、 R_s に影響を与えるパラメータについて検討を行った。その結果、予想通り全ての系においてアミノ酸の疎水性度(H_i)が選択された。この結果は、疎水的相互作用が関与していることが統計的に証明されたことを示している。しかしながら、CDCA、DCAを用いた実験結果は、6変数から選択された4または3変数を用いることでモデル化可能であったが、CA、TCAにおいてはそれらの R_s を説明できなかった。これは、CDCA、DCAよりも親水性の官能基を多く持つCA、TCAでは、疎水的相互作用が弱く、6変数以外の他のパラメータの関与が大きいためであると考えられる。

キーワード: 胆汁酸、アミノ酸、ミセル動電クロマトグラフィー、GA-PLS、疎水的相互作用

* kenji@sparklx.chem.yamaguchi-u.ac.jp

1. 緒言

キャピラリー電気泳動(Capillary Electrophoresis, CE)は、高速、高分離、測定に必要なサンプル量が少ない等の特徴を有していることから、近年著しい発展を遂げた分析方法で、DNA解析や光学異性体分離の分野においては主要な分析法として確立されつつある。CEにはその分離原理により種々の分離モードが存在し、その分離モードの一つであるミセル動電クロマトグラフィー (Micellar Electrokinetic Chromatography, MEKC)はTerabeらによって報告された分離分析方法である[1]。この方法は、移動相である泳動液に臨界ミセル濃度(CMC)以上の界面活性剤を添加し、泳動液中にミセルを生成させることで擬似固定相を形成し、ミセルと測定試料との相互作用の違いに基づき試料を分離する方法である。そのため、電荷を持たない中性分子や光学異性体の分離を行うことができるため、有機化合物の分離に主に用いられている。MEKCによる光学異性体の分離は、これまで様々な研究例が報告されている[2,3]。その光学異性体分離機構には疎水の相互作用が関与していると考えられているが、分離機構に関与している因子の統計的手法を用いた解析はいままで行われていない。

本研究では、界面活性剤として4種類の胆汁酸類 (Fig.1)を用いて、MEKCによる11種類のアミノ酸の光学異性体分離を行い、得られた結果から

$$Rs = \frac{2(t_2 - t_1)}{(w_2 + w_1)} \quad (1)$$

(t_1 : ピーク 1 の泳動時間 t_2 : ピーク 2 の泳動時間)
(w_1 : ピーク 1 のピーク幅 w_2 : ピーク 2 のピーク幅)

(1)式を用いて分離能を表す値の1つである分離度(Rs)を算出した。算出されたRsを目的変数とし、アミノ酸の物性値や実験条件を説明変数とするGA-PLS法[4]による解析を行い、この解析により、Rsに影響を与えるパラメータを明らかにすることを目的とした。

Fig.1 Molecular structure of bile acid derivatives used for the Rs measurements.

2. 実験方法および計算方法

測定には、キャピラリー電気泳動装置(Agilent Technologies製)、スタンダードフューズドシリカキャピラリー(内径50 μ m、全長48.5 cm、有効長 40 cm、Agilent Technologies製)、ソフトウェアは3D-CE Chem Station Rev A, 08.01(Agilent Technologies製)を用いた。実験開始前にキャピラリーに対する前処理として、0.1 M NaOH 2分間、蒸留水 15分間、泳動液 10分間キャピラリー内部の洗浄を行った。試料注入は、0.01 M NaOHで1分間、蒸留水で2分間、泳動液で7分間注入してキャピラリー内部の洗浄を行った後、試料を加圧法(50 mbar、5 sec)で注入し、次に泳動液を注入(50 mbar、5 sec)して行った。印加電圧は入口側に+15 kVであり、測定温度20℃、試料の測定は紫外吸光光度計を用いて、測定波長334nmで行った。

アミノ酸溶液はAla、Arg、Asn、Asp、Glu、Ile、Lys、Val、Phe、Trp、TyrのL体およびD体をそれぞれ5 mMアミノ酸水溶液に調製し、この溶液からそれぞれD-250 μ M、L-500 μ Mになるようにアミノ酸混合溶液を調整した。アミノ酸誘導体化の溶液は、アセトニトリル1 mlにo-フタルアルデヒド(OPA)8 mg (0.06 M) と2,3,4,6-テトラ-O-アセチル-1-チオ- β -D-グルコピラノース(TATG) 44mg (0.12 M) を溶解させ、OPA/TATG溶液を調整した。アミノ酸混合溶液750 μ lにホウ酸緩衝液(pH=9.5)150 μ l、OPA/TATG溶液150 μ lを加えて攪拌し、室温で6分間静置することでアミノ酸の誘導体化を行った(Scheme 1)。

MEKCの泳動液には、60 mM胆汁酸(コール酸ナトリウム、ケノデオキシコール酸ナトリウム、デオキシコール酸ナトリウム、デヒドロコール酸ナトリウム)と4 vol%アセトニトリルを含むリン酸緩衝液 (pH=8.0, μ =50 mM)を用いた。

多変量解析には、船津らにより開発されたChemish version 3.03[5]を用いた。

Scheme1 Derivatization of amino acid with OPA/TATG.

GA-PLSの設定を以下に示す。

- ・ 遺伝的アルゴリズム(GA)の設定
世代数：1000，染色体数：30，
カットオフ率：30，生存率：30，
交差対数：5，突然変異率：1
- ・ PLS の設定
センタリング：有，スケーリング：有
クロスバリデーション：有

3. 結果と考察

3. 1 アミノ酸の疎水性度(Hydrophathy Index: Hi)とRsの関係

測定例として、コール酸(CA)を用いたMEKCによるAlaの光学異性体分離結果をFig.2に示す。また、測定された泳動時間($t = 7.25 \sim 14.82$ min)、測定ピーク幅(平均値0.12 min)から算出したRsと今回の解析に用いた全てのパラメータをTable 1にまとめた。

MEKCにおいては、ミセルとアミノ酸の疎水的相互作用が影響していることが一般的に広く認知されている。このことから、4種類の胆汁酸MEKCによるアミノ酸光学異性体分離に影響を与えるパラメータについて検討するため、Hi[6]とRsの相関を試みた(Fig.3)。CA、タウロコール酸(TCA)、ケノデオキシコール酸(CDCA)、デオキシコール酸(DCA)において、それぞれ $R^2 = 0.493, 0.489, 0.645, 0.679$ の弱い相関が認められたが、この結果はHiだけでは分離機構を完全には説明することができないこと示している。MEKCによる分離機構を説明するためにはHi以外のパラメータの影響を考慮する必要があると考えられる。

Fig.2 Separation of L,D-Ala by MEKC using sodium cholate.

Fig.3 Hi vs. Rs plot for bile acids.

Table1 Experimental values and physical properties used for GA-PLS analysis.

Surfactant	Amino acid	t_B [min]	ΔL [min]	ΔD [min]	Hi [-]	pI [-]	Mv [Å ³]	Rs [-]
Cholic acid	Ala	5.20	4.10	4.79	1.8	6.00	100.6	7.59
	Arg	3.89	4.14	4.30	-4.5	10.76	185.1	1.16
	Asn	5.16	3.13	3.32	-3.5	5.41	129.5	3.41
	Asp	6.73	5.60	5.60	-3.5	2.77	123.0	0.00
	Glu	6.67	4.78	4.85	-3.5	3.22	150.1	0.72
	Ile	4.86	9.05	9.96	4.5	6.02	178.5	3.68
	Lys	4.65	8.47	8.17	-3.9	9.74	180.1	1.84
	Phe	5.02	5.42	5.86	2.8	5.48	201.4	4.49
	Trp	5.13	4.19	4.30	-0.9	5.89	239.2	1.51
	Tyr	5.18	3.93	4.33	-1.3	5.66	205.2	4.98
Taurocholic acid	Val	5.34	5.14	5.69	4.2	5.96	151.6	5.73
	Ala	5.20	4.92	5.49	1.8	6.00	100.6	3.94
	Arg	3.89	5.26	5.43	-4.5	10.76	185.1	1.18
	Asn	5.16	4.02	4.27	-3.5	5.41	129.5	2.77
	Asp	6.73	5.11	5.11	-3.5	2.77	123.0	0.00
	Glu	6.67	7.73	7.85	-3.5	3.22	150.1	0.72
	Ile	4.86	6.63	7.01	4.5	6.02	178.5	2.84
	Lys	4.65	9.12	8.84	-3.9	9.74	180.1	1.02
	Phe	5.02	6.66	7.07	2.8	5.48	201.4	2.44
	Trp	5.13	4.19	4.30	-0.9	5.89	239.2	1.51
Chenodeoxycholic acid	Tyr	5.18	6.04	6.46	-1.3	5.66	205.2	3.35
	Val	5.34	5.61	6.03	4.2	5.96	151.6	3.66
	Ala	5.20	2.30	2.94	1.8	6.00	100.6	6.99
	Arg	3.89	5.09	5.42	-4.5	10.76	185.1	2.46
	Asn	5.16	2.09	2.55	-3.5	5.41	129.5	5.29
	Asp	6.73	1.78	1.84	-3.5	2.77	123.0	0.43
	Glu	6.67	1.44	1.53	-3.5	3.22	150.1	0.97
	Ile	4.86	6.70	7.88	4.5	6.02	178.5	10.95
	Lys	4.65	6.86	6.65	-3.9	9.74	180.1	2.11
	Phe	5.02	6.95	8.55	2.8	5.48	201.4	10.15
Deoxycholic acid	Trp	5.13	3.02	3.67	-0.9	5.89	239.2	7.12
	Tyr	5.18	4.04	5.18	-1.3	5.66	205.2	8.89
	Val	5.34	2.74	3.39	4.2	5.96	151.6	6.70
	Ala	5.20	3.68	4.60	1.8	6.00	100.6	10.58
	Arg	3.89	5.54	6.23	-4.5	10.76	185.1	6.32
	Asn	5.16	2.94	3.35	-3.5	5.41	129.5	4.59
	Asp	6.73	3.27	3.27	-3.5	2.77	123.0	0.00
	Glu	6.67	3.19	3.29	-3.5	3.22	150.1	0.87
	Ile	4.86	5.40	6.37	4.5	6.02	178.5	11.56
	Lys	4.65	8.74	8.53	-3.9	9.74	180.1	1.74

Table2 Results of GA-PLS analysis for observed Rs's.

Structure	No.	parameters	Q ²	R ²	optimal number of components
Cholic acid	1	ΔL , Hi	0.425	0.576	1
	2	Hi	0.260	0.492	1
Taurocholic acid	1	ΔL , Hi	0.326	0.540	1
	2	Hi	0.283	0.489	1
Chenodeoxycholic acid	1	t_B , Hi, pI, Mv	0.827	0.948	4
	2	t_B , Hi, pI	0.775	0.924	3
	3	ΔD , Hi	0.582	0.715	1
	4	Hi	0.473	0.645	1
Deoxycholic acid	1	t_B , ΔL , ΔD , Hi	0.819	0.923	3
	2	t_B , ΔL , Hi	0.808	0.923	3
	3	t_B , Hi	0.793	0.867	1
	4	Hi	0.515	0.649	1

3. 2 GA-PLS法による解析

目的変数をRs、説明変数に t_B 、 ΔL 、 ΔD 、Hi、アミノ酸の等電点(pI)[7]、アミノ酸の分子体積(Mv)[8]の6変数を用い、Chemish 3.03を用いてGA-PLS法による解析を行った。 t_B は泳動液にリン酸緩衝液を用いてCEを行ったときのアミノ酸の泳動時間、 ΔL はMEKCを行ったときのL体の泳動時間(t_L)と t_B との差、 ΔD はD体の泳動時間(t_D)と t_B との差である。4種類の胆汁酸ミセルを用いたMEKCのGA-PLS法による解析結果をTable2にまとめた。

3. 2. 1 ケノデオキシコール酸(CDCA)

GA-PLS法による解析結果より、GAの変数選択によって t_B 、Hi、pI、Mvが主要な変数として選択され、高い Q^2 値を持つ相関式が得られた(No.1, $Q^2=0.827$, $R^2=0.948$, 最適成分数 4)。多変量解析において、多重共線性がある(説明変数間に強い相関や一次従属な変数関係がある)と相関式の信頼性が低下する。このことより、4変数間の多重共線性について検討するために、多重共線性を検出するための指標の一つであるVIF値(Variance Inflation Factor)を(2)式を用いて算出した[9]。(2)式における R_j^2 は説明変数jを目的変数とし、残りの説明変数を説明変数とした重回帰分析の決定係数である。

$$VIF_j = \frac{1}{1 - R_j^2} \quad (2)$$

4変数のVIF値を算出した結果、全ての変数の $VIF < 10$ であった。このことから、No.1の相関式はRsを記述する式として適当と考えられる。この相関式から得られた $Rs_{obs}-Rs_{calc}$ プロットをFig.4に示す。この式における標準回帰係数(b)は $t_B(-1.32) > pI(-1.19) > Hi(0.45) > Mv(0.18)$ であり、この結果から疎水性よりも溶質の移動度、電荷が分離機構に大きく関与していることがわかった。

また、Arg、Lysの2点(○内の値)は Y_{obs} と Y_{calc} の値の相関が弱かった。これは、この2つのアミノ酸が側鎖に $-NH_3^+$ を持っている、即ち正電荷を帯びている、ことが原因であると考えられる。この結果もアミノ酸の電荷が分離機構に大きく関与していることを裏付けている。

3. 2. 2 デオキシコール酸(DCA)

DCAの系におけるGA-PLS法による解析結果は、 t_B 、 ΔL 、 ΔD 、Hiを主要な変数として選択し、高い Q^2 値を持つ相関式が得られた(No.1, $Q^2=0.819$, $R^2=0.923$, 最適成分数 3)。しかしながら、選択された4変数に

おけるVIF値を算出した結果、多重共線性が存在した($VIF_{\Delta L}=125.0$, $VIF_{\Delta D}=142.9$)。この結果は、No.1の相関式がRsを記述する式として適当ではないことを示している。このことから、 t_B 、 ΔL 、Hiを主要な変数として選択したNo.2の相関式($R^2=0.923$, $Q^2=0.808$, 最適成分数 3)について検討を行った。選択された3変数のVIF値を算出した結果、全ての変数の $VIF < 10$ であったことから、No.2の相関式がRsを記述する式として適当と考えられる。No.2の相関式の $Rs_{obs}-Rs_{calc}$ プロットをFig.5に示す。この式における標準回帰係数(b)は、 $Hi(0.73) > t_B(-0.61) > \Delta L(-0.29)$ であった。この結果から、DCAにおいては疎水性の影響が一番大きく、次に溶質の移動度の関与が大きいと考えられる。

CDCAの場合と異なり、主要な変数に電荷的性質を表すパラメータであるpIは選択されなかった。このことから、CDCAとDCAは類似な構造、物性を持っているが、異なる分離機構を持っていることが推察される。また、 ΔL が変数に選択されたことから、L体と胆汁酸ミセルの相互作用の違いがRsに影響していることが示唆された。

Fig.4 $Rs_{obs}-Rs_{calc}$ plot for CDCA.

Fig.5 $Rs_{obs}-Rs_{calc}$ plot for DCA.

3. 2. 3 他の胆汁酸(CA、TCA)

CA、TCAの系においては、ともにGAの変数選択によって ΔL 、 H_i が主要な変数として選択された。しかしながら、最も高い Q^2 値はそれぞれ $Q^2=0.425$ 、 0.326 であり、今回用いた6変数では良好なモデル化を行うことができなかった。このことからCA、TCAの系においては実験値以外のパラメータ、例えば理論計算等から得られる分子間相互作用エネルギー等の値を考慮する必要があると考えられる

4. 結論

本研究では、GA-PLS法による解析を用いて胆汁酸ミセルによるMEKCのアミノ酸光学異性体分離機構に影響を与えるパラメータの検討を行った。全ての系において、GAの変数選択により H_i が選択され、アミノ酸の疎水的相互作用が関与していることが統計的に証明されたといえる。CDCA、DCAの系においては、 t_R 、 ΔL 、 ΔD 、 H_i 、 pI 、 M_v の6変数から選択された4または3変数を用いることでモデル化を行うことができたが、CA、TCAの系においてはこの6変数のみではそれらの R_s を説明できなかった。これは、CA、TCAがCDCA、DCAよりも親水性の官能基を多く持つため、疎水的相互作用が弱く、6変数以外の他のパラメータの関与が大きいためであると考えられる。全ての系のモデル化を可能にするパラメータについて検討するために、我々は現在、理論計算から得られる分子間相互作用エネルギーなどのパラメータを用いることを検討している。

5. 参考文献

- [1] S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchiya, *Anal. Chem.*, **56**, 111-113 (1984).
- [2] K. Tian, H. Chen, J. Tang, X. Chen, Z. Hu, *Journal of Chromatography A*, **1132**, 333-336(2006).
- [3] Z. Wang, Z. Tang, Z. Gu, Z. Hu, *Electrophoresis*, **26**, 1001-1006(2005).
- [4] K. Hasegawa, Y. Miyashita, K. Funatsu, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, **37**, 306-310(1997).
- [5] Chemish ver.3.03, ChemInfoNavi Home Page (URL=<http://www.cheminonavi.co.jp/index.html>)
- [6] J. Kyte and R. F. Doolittle, *J. Mol. Biol.*, **157**, 105-132(1982).
- [7] 日本化学会編, 化学便覧 基礎編改訂5版, 丸善, 611-614(2004).
- [8] A.A. Zamyatin, *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **24**, 107-123(1972).
- [9] 田中豊, 垂水共之, 脇本和昌 編, パソコン統計解析ハンドブック 多変量解析編, 共立出版, 1992.

A Chemoinformatics Approach for Enantioseparation Mechanism of Amino Acids by Micellar Electrokinetic Chromatography Using Bile Acids

Yutaka Ikenaga^a, Misa Hanaki^a, Michinori Sumimoto^a, Hiroshi Shigi^b,
Tsutomu Nagaoka^b, and Kenzi Hori^{a*}

^aGraduate School of Science and Engineering, Yamaguchi University, 2-16-1 Tokiwadai,
Ube 755-8611, Japan, ^bResearch Institute of Advanced Science and Technology, Osaka
Prefecture University, 1-2 Gakuencho, Sakai 599-8570, Japan

Micellar electrokinetic chromatography (MEKC) is one of the separation modes of capillary electrophoresis (CE) with high resolution. MEKC is useful for enantioseparations of organic compounds within a short analysis time even though sample volumes are very low. It has been considered that the hydrophobic interaction between solute and micelles is very important for enantioseparation of compounds. However, it has not been clearly understood what parameters are closely related to the separation mechanism of the MEKC. In the present study, The GA-PLS method was applied to find important parameters for the enantioseparations of amino acids using the MEKC with bile acids. For that purpose, the technique was used to enantioseparate eleven amino acids. Four bile acids such as cholic acid (CA), taurocholic acid (TCA), chenodeoxycholic acid (CDCA) and deoxycholic acid (DA) were adopted to make micellars interacting with the amino acids. The resolution values were calculated from the experimental results. The value is an index for the ability of the MEKC to enantioseparate the amino acids. Experimental values and physical properties such as hydrophobicity index of amino acids and isoelectric points of amino acids were used as explanatory variables for the statistical method. It was confirmed that three or four variables are enough to expect the experimental R_s values for CDCA and DCA while it is impossible to explain those for CA and TCA. It was considered that the difference of the hydrophilic property of the bile acids is the key to understanding the enantioseparations observed.

Keywords: bile acid, amino acid, micellar electrokinetic chromatography, GA-PLS, hydrophobic interaction

* kenji@sparklx.chem.yamaguchi-u.ac.jp