

高性能液体クロマトグラフィーによる光学異性体の分離と分取精製

科学機器事業部 クロマトグループ 西岡 亮太

1 はじめに

D-アミノ酸が哺乳動物の体内に見い出されたのは、ごく最近のことである¹⁾。従来、高等動物の生体中に存在するアミノ酸はL-アミノ酸のみであると考えられてきたが、最近の研究によってこの定説は修正され、生体内のD-アミノ酸の生理的役割及び老化や疾患との関係に大きな注目が集まっている¹⁾。生体中の微量のD-アミノ酸が検出できるようになった大きな理由の1つに、高性能液体クロマトグラフィー (HPLC) による光学分割技術の急速な進歩が挙げられる。

医薬・農薬等、我々の周りには化学物質には光学活性な化合物が多いが、これらの生理活性は光学異性体間で大きな差のあることが知られている。例えば、ピレスロイド系殺虫剤のフェンバレレートには4種類の光学異性体が存在するが、殺虫力は(SS)体が最も強い。また調味料のグルタミン酸は旨味を持つのはL体のみであり、抗パーキンソン病薬のドーパはD体の副作用が大きいためL体が医薬として利用される。このように光学活性体を医薬、農薬等に利用する場合、光学異性体の分離がきわめて重要な課題となる。

本号のテーマは「分離と分取」であるが、光学異性体はその物理化学的性質がほとんど同じであるため、一般に、分離するのが非常に難しい物質である。光学異性体の分離と分取のためには、キラル固定相を用いるHPLC法がきわめて優れた方法であり、当社ではこれまで、低分子系キラル固定相を中心に、多くのHPLC用キラル固定相を開発してきた²⁾⁻⁵⁾。本稿では、それらキラル固定相の開発経緯、特長ならび

に応用技術等について記述したい。

2 低分子系キラル固定相の開発⁵⁾

2.1 水素結合・電荷移動型キラル固定相

低分子系キラル固定相は、低分子の、不斉識別能を有する化合物(キラル識別子)を、シリカゲル等の担体に結合または担持させた固定相である。キラル識別子としてはアミノ酸誘導体がよく知られている。

原らが報告したN-アセチル-L-バリンを用いたキラル固定相CSP-1(図1)⁶⁾や、PirkleらのN-3,5-ジニトロベンゾイル-D-フェニルグリシンを用いたキラル固定相CSP-2(a)(図1)⁷⁾は、ジアステレオメリックな水素結合あるいは電荷移動による相互作用が不斉識別に寄与しているものと考えられる。これらの固定相は水素結合・電荷移動型の基本と言えるもので、その後のキラル固定相研究の端緒となった³⁾。CSP-2(a)の化学結合型固定相CSP-2(b)は、現在でもピレスロイド系殺虫剤の光学異性体比の測定に活用されている(図2)。またCSP-2(b)は、カルボン酸の光学異性体を逆相系移動相で分離する機能を有していることも示された⁸⁾。

大井らは、更に分離能の優れたキラル固定相の開発を目標に、CSP-2(b)の改良を試み、CSP-2(b)のフェニル基の代わりに1-ナフチル基を有する固定相CSP-3

(図1)及びCSP-2(b)のアミド結合の代わりに尿素結合を有する固定相CSP-4(図3)とその近似構造を有する固定相を開発した⁹⁾。これらは、N-アセチル、ベンゾイル、BOC、Z、ダンシル、FMOC等のアミノ酸N保護体やアリアルプロピオン酸系抗炎症薬等のカルボキシル基を持つ光学異性体を、酸や酢酸塩を含むメタノールを移動相として良好に分離することが認め

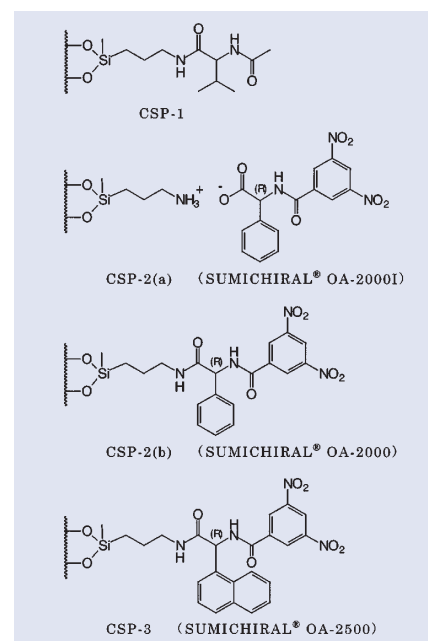


図1 水素結合・電荷移動型キラル固定相(アミド型)

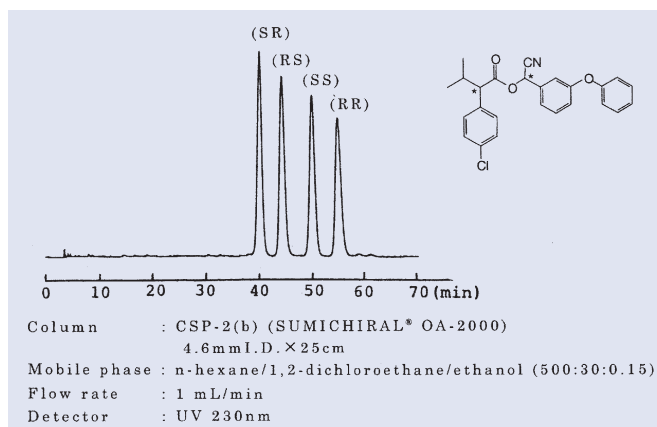


図2 ピレスロイド系殺虫剤フェンバレレートの光学異性分離

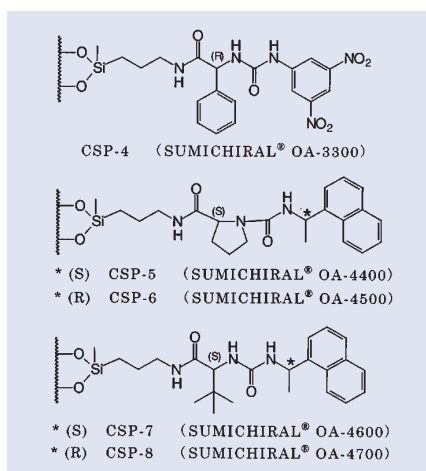


図3 水素結合・電荷移動型キラル固定相(尿素型)

られた¹⁰⁾。これらの固定相では不斉炭素に直結する1-ナフチル基や尿素結合が不斉識別に有効に寄与すると考えられる¹¹⁾。大井らはこの結果を更に発展させ、キラルなアミノ酸とキラルな1-(1-ナフチル)エチルアミンとからなる尿素誘導体型固定相を合成した。このタイプの固定相の例(CSP-5~CSP-8)を図3に示す。これらのキラル固定相を用いて、アルコール、エステル、カルボン酸、アミン、アミノアルコール等の光学異性体が、順相系移動相で良好に分離されることが示された^{12)~15)}。その際、アミノ酸残基の化学構造ならびにキラルなアミノ酸部分とナフチルエチルアミン部分の立体配置の組み合わせが、光学分割能に大きく影響することは興味深い。

2.2 配位子交換型キラル固定相

配位子交換型キラル固定相は、キラル配位子とキレート形成化合物との配位子交換相互作用により不斉識別を行うもので、DavankovらによるL-プロリンの銅錯体を用いた固定相¹⁶⁾に始まった。大井らは、N-S-ジアルキル-D-ペニシラミン、アミノアルコールのシッフ塩基ならびに(R,R)-酒石酸モノアミド誘導体を配位子とする銅錯体を使用した配位子交換型キラル固定相が、優れた性能を有することを報告した^{17)~20)}。これらの配位子は、オクタデ

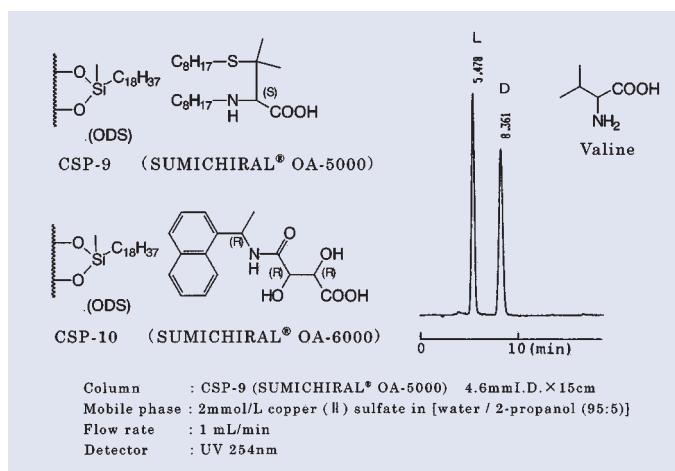


図4 配位子交換型キラル固定相と分離例

シル化シリカゲル上にコーティングし、銅イオンを配位させた後、銅イオンを含む逆相系移動相で光学異性体を分離する。主な固定相の構造と分離例を図4に示す。これらの固定相は、アミノ酸、オキシ酸、アミノアルコールばかりでなく、カルボン酸やアミン類の光学異性体についても直接分離が可能であった。

3 キラル固定相の光学分割機構

3.1 光学分割の基本原則

キラル固定相による光学分割機構に関して、Dalglieshは、「3点結合モデル」を提唱した²¹⁾。このモデルでは、キラル固定相と光学異性体が、3箇所の結合サイトで相互作用することによってジアステレオメリックな会合体を形成し、そのエネルギー差によって分離が達成されると考えられる。光学分割機構の解明のためには、実際にはより精密な立体化学的解析が必要であるが、この考え方は、クロマトグラフィーによる光学異性体分離の基本原則と考えられてきた。図5に、光学分割のモデルを模式的に示す。相互作用としては、水素結合形成、電荷移動錯体形成、イオン対形成、金属への配位結合、双極子-双極子会合等が考えられ、これらの相互作用が単独または複合的に光学分割に寄与しているものとみなされる²⁾。光学異性体の溶出順序は、それ

ぞれの光学異性体と固定相との相互作用の強弱によって決定するので、キラル選択子の立体配置が逆である固定相を使用すると、光学異性体の溶出順序を逆転させることが可能となる。

3.2 コンピュータケミストリーによる分離機構の解析

キラル固定相と光学異性体との相互作用及び溶出順序解析のため、我々はコンピュータケミストリーの手法を用いた検討を行った^{22),5)}。解析のモデルとして、CSP-3とその分離対象化合物の抗炎症薬ケトプロフェンを選定し、安定構造を模索した後、分子力学(MM)法または分子動力学(MD)法により複合体の構造を安定化させ、解析を実施した。^{注)}

モデルの構築にあたっては、実際の固定相表面の状態に近づくように、シラノール基やアミノ基を光学活性部位の周りに配置した。計算結果のモデルを図6に示す。CSP-3とケトプロフェ

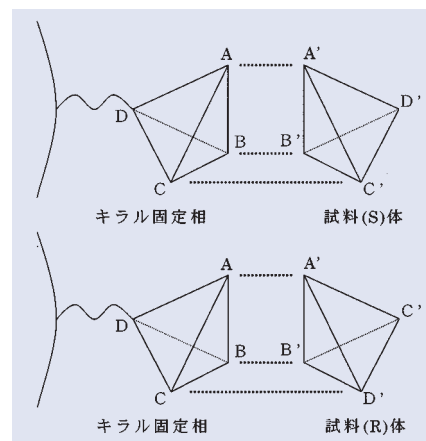


図5 光学分割機構のモデル

注) コンピュータケミストリーによる計算は、住友化学工業株式会社 筑波研究所、石飛昌光氏のご協力により実施した。

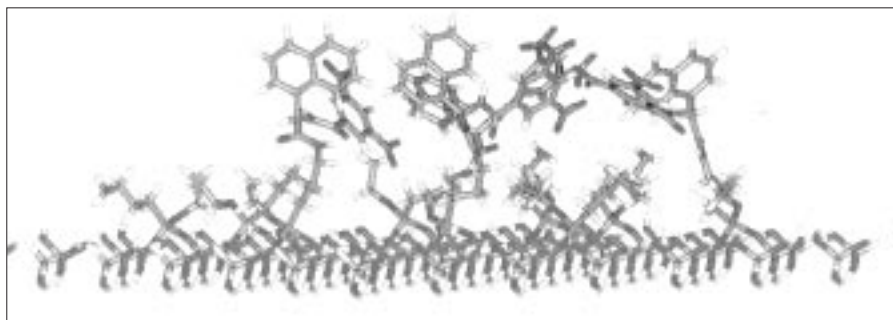


図6 コンピュータケミストリーによる計算結果のモデル
CSP-3 (SUMICHIRAL® OA-2500) とケトプロフェン

各光学異性体との安定化させた複合体のポテンシャルエネルギーは、CSP-3と(R)体の場合が -7666.71 kcal/mol, CSP-3と(S)体の場合が -7671.94 kcal/molとなり、CSP-3と(S)-ケトプロフェンの組み合わせの方がエネルギーが低く安定であった。これは、HPLCにおいて、(R)体が先に、(S)体が後に溶出することと一致する結果である。主な相互作用サイトは、CSP-3の3,5-ジニトロベンゾイル基のC=OとケトプロフェンのOHであった。また、(S)-ケトプロフェンがCSP-3に近づくと、CSP-3の3,5-ジニトロベンゾイル基側のアミド結合がトランス体からシス体に変化し、同時に相互作用サイトのC=OとOHの距離が急激に短くなり、さらに系のエネルギーが下がり安定化することが認められた。

この他、CSP-8とその分離対象化合物として 遮断薬のプロプラノロールについても解析を行ったが、この場合もHPLCの溶出順序を支持する計算結果が得られた^{22),5)}。以上の検討により、コンピュータケミストリーの手法が、固定相と光学異性体の相互作用の解析及び溶出順序の予測をある程度可能とし、光学分割機構の解明や新規なキラル固定相開発のための有用な知見を得る手段となり得ることが示された。

4 低分子キラル固定相の特長と応用

4.1 低分子系キラル固定相の特長

一般に、低分子系キラル固定相の特

長として、以下の点が挙げられる。

- (1) 固定相が化学的に安定であり、様々な移動相が使用可能である。
- (2) 理論段数の高いカラムが得られる。
- (3) 試料負荷量が大きく、分取に有利である。
- (4) 光学異性体の溶出順序を逆転させることが可能である。

特に、溶出順序の逆転は低分子系キラル固定相の最大の特長と言えるが、ここではその特長を有効に利用した応用例を示す。

4.2 微量D-アミノ酸の定量

今井らは、4-フルオロ-7-ニトロ-2,1,3-ベンゾキサジアゾール(NBD-F)でラベル化されたアミノ酸の光学異性体が、CSP-3、-7等を使用して、クエン酸含有メタノールを移動相として良好に分離されることを認め、この手法を用いて、生体中のD-アミノ酸に関する研究成果を報告した²³⁾⁻²⁷⁾。NBD-Fは今井らによって開発された蛍光誘導体化試薬である²⁸⁾が、これは試薬自身が無蛍光で、第一及び第二アミンと緩和な条件下で反応して、励起波長470nm、蛍光波長530nmという長波長に極大波長を有する誘導体を生成することから、内因

性妨害物質の影響を受けにくい高感度ラベル化剤として知られている。NBD化したアミノ酸の構造と分離例を図7に示す。

CSP-3はキラル選択子として、(R)-1-ナフチルグリシン誘導体を使用しているが、この対掌体である(S)-1-ナフチルグリシン誘導体を結合した固定相を用いると、ほとんどのNBD化アミノ酸でD体が先に溶出する。クロマトグラフィーによる光学異性体の微量分析においては、微量の異性体を先に溶出させた方が、感度・精度の面で好ましいので、逆転固定相が利用できることは、微量分析にきわめて有効である。また逆転固定相を用いて同一の試料を測定することにより、光学異性体のピークの同定が容易になることも大きな利点である。

4.3 光学異性体の分取精製

光学活性化合物を対象とする研究において、光学異性体の分離定量技術とともに、光学的に純粋な光学活性体をいかにして入手するかが重要な課題となる。光学活性体を得る方法として、

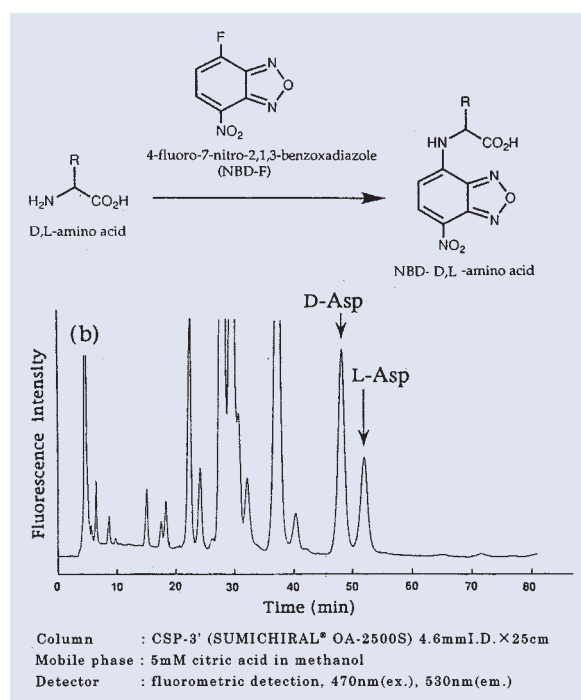


図7 NBD-Fによるアミノ酸の蛍光ラベル化反応とラット松果体中のDL-アスパラギン酸の測定²⁶⁾

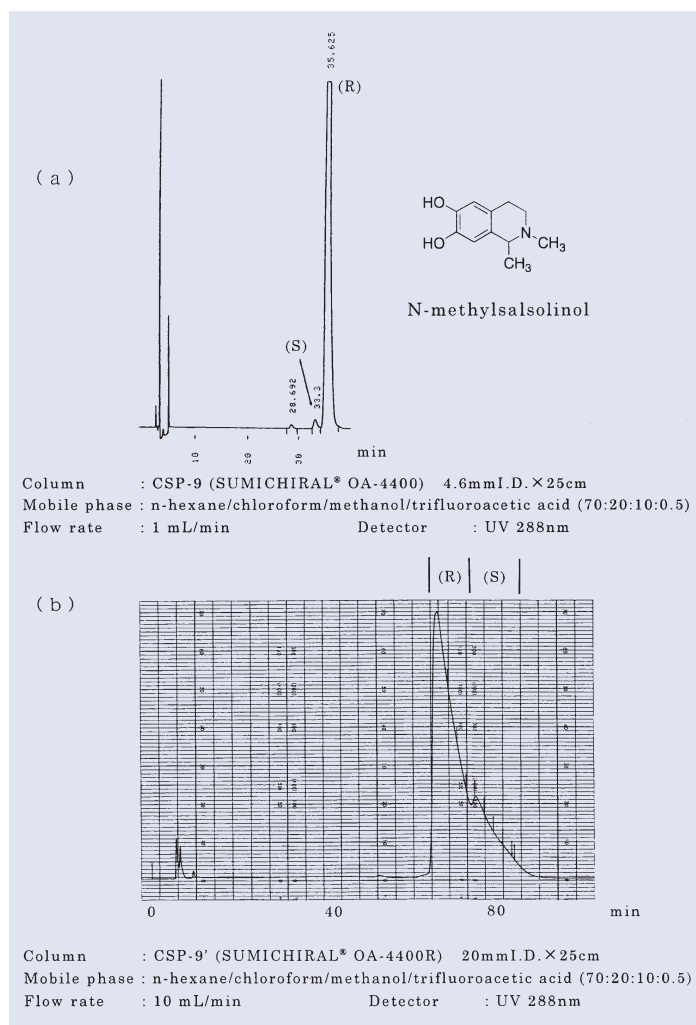


図8 光学異性体の分取精製
 (a)光学純度検定クロマトグラム (b)分取クロマトグラム 試料:サルソリノール代謝物

不斉合成法で直接光学活性体が得られる場合を除いて、何らかの方法でラセミ体を分割する必要があるが、その手法としては、結晶化法、酵素法、クロマトグラフィーによる分取等が挙げられる²⁹⁾。HPLCによる分取法は、目的成分を高純度で得ることのできる方法である³⁰⁾が、光学異性体の単離においても比較的簡便で実用的な手法として注目されている。HPLCの分取用カラムを使用して光学異性体を単離する場合、分離が不十分であると、後に溶出する光学異性体中に、先に溶出する光学異性体が混入しやすいので、光学純度の高い光学活性体を得るのが困難となる。このような場合、逆転固定相を利用して、分取したい光学異性体を先に溶出させることが非常に有効な方法

としては、(R)-サルソリノールのN位のメチル化が主要代謝経路と見なされ、その生理作用解明のために、代謝物である(R)-N-メチルサルソリノールの単離精製とその光学純度検定が重要となってきた。

我々は、N-[(R)-1-(β -ナフチル)エチルアミノカルボニル]-D-プロリンをキラル選択子とするCSP-9を用いて、順相系移動相で、N-メチルサルソリノールの光学分割が可能であることを認めたと、この場合、(S)体が先に、(R)体が後に溶出する。主成分である(R)体の光学純度検定のため、試料中の微量の(S)体を検出するにはこの溶出順が望ましい。一方、(R)体を純粋に分取精製するためには、先に述べた理由から(R)体が先に溶出するのが好

となる。

光学異性体の単離精製の実例として、サルソリノール代謝物として、サルソリノール代謝物として、サルソリノール(1-メチル-6,7-ジヒドロキシ-1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン)は、当初パーキンソン病患者の尿に見出されたドーパミン誘導体で、その光学異性体間の生理作用の差異に興味を持たれていたが、これまでの研究で、主として(R)体が生体中に存在することが示唆されている³²⁾。また、体内での代謝に関

都合であるため、CSP-9の対掌体であるN-[(S)-1-(β -ナフチル)エチルアミノカルボニル]-L-プロリンを固定化した逆転固定相(CSP-9')を利用して先に溶出する(R)体の分取を試みた。その結果、光学純度97% e.e.以上の(R)-N-メチルサルソリノールを得ることが可能となった。光学純度検定時ならびに分取時のクロマトグラムを図8に示す。これは逆転固定相の特長を利用して光学異性体の分取精製を行った好例といえる。

5 シクロデキストリンを導入した新しい固定相の開発

水素結合や電荷移動の相互作用を介して形成されるキラル固定相と各光学異性体とのジアステレオメリックな会合体の微少なエネルギー差は、一般に、水を含む溶媒中では識別されにくい。しかし最近、環境への配慮ならびに医薬や生体成分等の高極性試料の分析のため、水を含む逆相系移動相で優れた光学分割能を有するキラル固定相への要望が非常に強くなってきている。このような背景から、我々はキラル選択子としてのシクロデキストリンに着目した。シクロデキストリンは多くの機能特性を有しているが、ArmstrongらによってHPLCキラル固定相としてもその有用性が示された³³⁾。シクロデキストリンを用いたキラル固定相では、その疎水的な空洞内にゲストとして光学異性体分子を取り込んで不斉識別を行うので、逆相系の移動相で性能を有することが大きな利点である。

従来のシクロデキストリン固定相の多くは、担体としてのシリカゲルに、疎水性のアルキル鎖を介してシクロデキストリン誘導体を化学結合していた。我々はこのスペーサー部分の改良を試み、 β -シクロデキストリンを、糖鎖であるグルクロイルグルクノイル基とアミド結合を介してシリカゲルに化学結合した固定相CSP-11(図9)

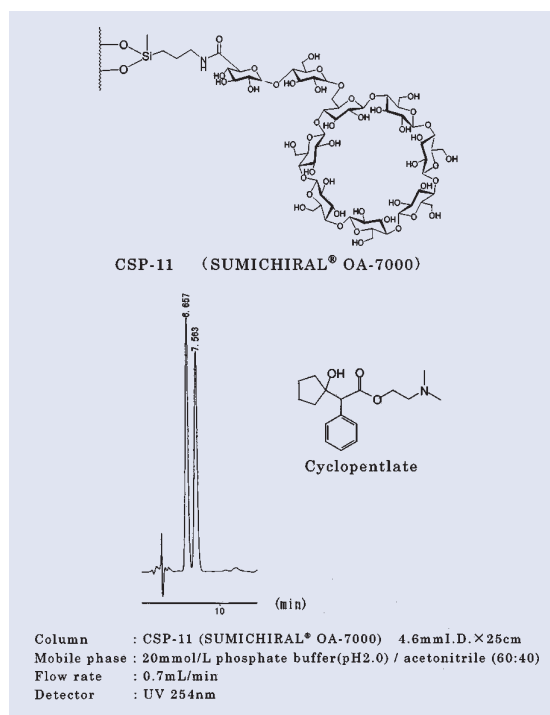


図9 シクロデキストリン型キラル固定相と分離例

を合成した³⁴⁾。この固定相を使用したクロマトグラムの例を図9に示すが、従来のシクロデキストリン固定相に比べて、理論段数が高く、非常にシャープなピーク形が得られた。これは、極性の高いスペーサー部が、試料と担体との間の不斉識別に関与しない副次的な相互作用を遮蔽しているためと推定された³⁵⁾。CSP-11は、酸性のリン酸緩衝液とアセトニトリル混液を用いて、芳香族のカルボン酸、ケトン、アミン等多くの光学異性体分離が可能で、実用的に優れていることが示された。以上の結果は、同じキラル選択子を用いた固定相でも、スペーサー部分が異なれば性能差が生じることを示唆していて、新規固定相をデザインする上で興味深い知見である。

6 おわりに

医薬、農薬、食品等、生理活性物質に関連した広い分野において、光学異性体分離の重要性はますます増大している。低分子系キラル固定相は多くの優れた特長を有しているため、これらの特長を生かした応用技術の発展なら

びにホストゲスト系キラル選択子等を用いた更に高性能なキラル固定相の開発が期待される。

HPLCキラル固定相の技術を基盤とした今後の展開としては、2つの方向が示唆される。1つは、工業規模での光学異性体の単離精製技術であり、特に疑似移動床法への適用が注目されている。もう1つは、環境負荷を考慮した分析のマイクロ化あるいは高速化、高理論段数化へのアプローチであり、マイクロHPLCやキャピラリー電気クロマトグラフィーの分離剤としての応用が期待される。

注) CSP : chiral stationary phase
キラル固定相

文献

- 1) 今井一洋 : ファルマシア, 32, 1214 (1996).
- 2) 大井尚文 : SCAS NEWS, 1, 6 (1995).
- 3) 大井尚文 : CHROMATOGRAPHY, 14, 61R (1993).
- 4) 青黄史子, 松田公昭 : CHROMATOGRAPHY, 17, 27 (1996).
- 5) 西岡亮太, 青黄史子, 木須直子, 中島久子, 松本米蔵 : 住友化学, 1999-, 49 (1999).
- 6) S.Hara and A.Dobashi : J.Liq.Chromatogr., 2(6), 883 (1979).
- 7) W.H.Pirkle and J.M.Finn : J.Org.Chem., 46, 2935 (1981).
- 8) 大井尚文, 松本米蔵, 北原一, 宮崎久子 : 分析化学, 35, 382 (1986).
- 9) N.Oi, H.Kitahara, Y.Matsumoto, H.Nakajima and Y. Horikawa : J.Chromatogr., 462, 382 (1989).
- 10) N.Oi, H.Kitahara, F.Aoki and N.Kisu : J.Chromatogr.A, 689, 195 (1995).
- 11) N.Oi, M.Nagase and T.Doi : J.Chromatogr., 257, 111 (1983).
- 12) N.Oi and H.Kitahara : J.Liq.Chromatogr., 9, 511 (1986).
- 13) N.Oi, H.Kitahara and R.Kira : J.Chromatogr., 515, 441 (1990).
- 14) N.Oi, H.Kitahara and R.Kira : J.Chromatogr., 535, 213 (1990).
- 15) N.Oi, H.Kitahara and F.Aoki : J.Chromatogr.A, 694, 129 (1995).

- 16) V.A.Davankov and S.V.Rogozhin : J.Chromatogr., 60, 280 (1971).
- 17) N.Oi, H.Kitahara and R.Kira : J.Chromatogr., 592, 291 (1992).
- 18) N.Oi, H.Kitahara, R.Kira and F.Aoki : Analytical Sci., 7 suppl. 151 (1991).
- 19) N.Oi, H.Kitahara and F.Aoki : J.Chromatogr., 631, 177 (1993).
- 20) N.Oi, H.Kitahara and F.Aoki : J.Liq.Chromatogr., 16, 893 (1993).
- 21) C.E.Dalglish : J.Chem.Soc., 1952, 3940.
- 22) 木須直子, 西岡亮太, 青黄史子, 上重哲郎, 松本米蔵 : シンポジウムモレキュラーキラリテイ 1999, 講演要旨集 145 (1999).
- 23) K.Imai, T.Fukushima and S.Uno : Biomed.Chromatogr., 7, 177 (1993).
- 24) K.Imai, T.Fukushima : Biomed.Chromatogr., 7, 275 (1993).
- 25) T.Fukushima, M.Kato, T.Santa and K.Imai : Biomed. Chromatogr., 9, 10 (1995).
- 26) K.Imai, T.Fukushima, T.Hagiwara and T.Santa : Biomed. Chromatogr., 9, 106 (1995).
- 27) M.Kato, T.Fukushima, T.Santa, K.Nakashima, R.Nishioka and K.Imai : Analyst, 123, 2877 (1998).
- 28) K.Imai and Y.Watanabe : Anal.Chim.Acta., 130, 377 (1981).
- 29) 日本化学会編 : "化学総説No.6「光学異性体の分離」", 学会出版センター (1989).
- 30) 中島久子 : SCAS NEWS, 1999-, 11 (1999).
- 31) 中島久子, 熊沢みどり : 未公表データ
- 32) Y.Deng, W.Maruyama, P.Dostert, T.Takahashi, M.Kawai and M.Naoi : J.Chromatogr.B, 670, 47 (1995).
- 33) D.M.Armstrong and W.DeMand : J.Chromatogr.Sci., Analyst, 22, 411 (1984).
- 34) 上重哲郎, 西岡亮太, 青黄史子, 木須直子, 松本米蔵, 市川修 : 日本薬学会第119年会, 講演要旨集, 4, 85 (1999).
- 35) 上重哲郎, 西岡亮太, 中村奈緒美, 青黄史子, 松本米蔵 : 日本薬学会第120年会, 講演要旨集, 4, 29 (2000).



西岡 亮太
(にしおか りょうた)
科学機器事業部