

岐阜薬科大学博士（薬学）学位論文

新規HPLCキラル固定相の開発とその
エナンチオ分離特性の評価に関する研究

令和3年（2021年）

西岡 亮太

目次

公表論文	1
略語・用語・表記等の説明	2

理論の部

第一章 序論	5
第一節 本研究の背景	5
第二節 本研究の目的と論文構成	8
第二章 パークル形キラル固定相におけるスペーサー部分の構造がエナンチオ分離特性に与える影響	9
第一節 緒言	9
第二節 スペーサー部分のアルキル鎖長が異なるキラル固定相の比較	9
第三節 スペーサー部分のアルキル鎖長の影響に関する考察	14
第四節 小括	15
第三章 擬 18-クラウン-6 エーテルを用いた新規化学結合形キラル固定相	16
第一節 緒言	16
第二節 クラウンエーテル化学結合形キラル固定相の設計	17
第三節 クラウンエーテル化学結合形キラル固定相のエナンチオ分離特性	18
第一項 逆相系移動相を用いたキラル化合物の分離	18
第二項 順相系移動相を用いたキラル化合物の分離	20
第四節 鏡像異性体の溶出順に関する考察	22
第五節 小括	23
第四章 スペーサーに糖鎖を有する新規シクロデキストリン形キラル固定相	24
第一節 緒言	24
第二節 スペーサー部分の構造がエナンチオ分離特性に与える影響	25
第三節 スペーサーに糖鎖を有するシクロデキストリン形キラル固定相を用いたアプリケーション	29
第一項 キラル医薬品の分離	29

第二項	アキラル化合物の分析	30
第四節	小括	31
第五章	水酸基をアセチル化した新規シクロデキストリン形キラル固定相	33
第一節	緒言	33
第二節	水酸基のアセチル化がエナンチオ分離特性に与える影響	34
第三節	水酸基アセチル化シクロデキストリン形キラル固定相を用いたアプリケーション	38
第一項	キラルアミン及びアミノアルコールの分離	38
第二項	移動相条件の影響	40
第三項	アキラルアミンの分析	41
第四節	1-アリアルエチルアミン類の分離におけるクラウンエーテル形とシクロデキストリン形キラル固定相のエナンチオ分離特性の比較	42
第五節	小括	47
第六章	コアシェルシリカを担体とする新規らせんポリマー形キラル固定相	48
第一節	緒言	48
第二節	試料の官能基に対するエナンチオ分離特性	49
第三節	らせんポリマー形キラル固定相を用いたアプリケーション	50
第一項	第二級キラルアルコールの分離	50
第二項	第三級及び第一級キラルアルコールの分離	52
第三項	アルコール以外のキラル化合物の分離	55
第四項	移動相の効果	56
第四節	らせんポリマー形キラル固定相の耐久性	57
第五節	小括	58
第七章	分離対象試料の官能基依存的キラル固定相選択法	60
第八章	結論	63
第一節	総括	63
第二節	成果の検証と展望	64
謝辞		66

実験の部

各章共通の実験	68
第二章第二節に関する実験	69
第三章第二節に関する実験	70
第三章第三節に関する実験	71
第三章第四節に関する実験	72
第四章第二節に関する実験	72
第四章第三節に関する実験	73
第五章第一節に関する実験	73
第五章第二節に関する実験	74
第五章第三節に関する実験	74
第五章第四節に関する実験	75
第六章第二節に関する実験	76
第六章第三節に関する実験	77
参考文献	79

公表論文

公表主論文

本学位論文の基礎となる主要部分の内容を、以下の学術誌に公表している。

- 1) Hirose K., Nakamura T., **Nishioka R.**, Ueshige T., Tobe Y. Preparation and evaluation of novel chiral stationary phases covalently bound with chiral pseudo-18-crown-6 ethers. *Tetrahedron Lett.*, **44**, 1549-1551 (2003)
- 2) **Nishioka R.**, Harada S. Enantiomeric separation of chiral amines and amino alcohols using acetylated β -cyclodextrin stationary phase by high-performance liquid chromatography. *Chromatography*, **37**, 65-71 (2016)
- 3) **Nishioka R.**, Harada S., Umehara K. Enantiomeric separation of chiral alcohols using novel core-shell type chiral stationary phase coated with helical poly(diphenylacetylene) derivative by high-performance liquid chromatography. *Chromatography*, **40**, 169-173 (2019)
- 4) **西岡亮太**. HPLC による 1-アリアルエチルアミン類の鏡像異性体分離におけるキラル固定相の性能比較. LC と LC/MS の知恵, **1**, 41-49 (2020)

注) 本学位論文中、著作権者から転載許可を得て、公表主論文 2)、3)、4)の図表等のデータを転載して作成した部分があり、本文中に出典を明記している。

略語・用語・表記等の説明

1. 略語

以下の略語は、表題及び本文中で説明なしで使用した。

略語		略語の意味
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	高速液体クロマトグラフィー
GC	Gas Chromatography	ガスクロマトグラフィー
LC/MS	Liquid Chromatography/Mass Spectrometry	液体クロマトグラフと質量分析計を接続した分析方法
ODS	octadecyl silyl	<i>n</i> -オクタデシルシリル基を共有結合させたシリカゲル

2. 用語

以下の用語は、表題及び本文中で以下の意味で使用した。

用語	用語の意味
化学結合形固定相：	担体とリガンドを共有結合した固定相 注) 「化学結合」には共有結合以外も含まれるが、HPLC 分野では一般に「共有結合形」の意味で用いられる用語であり、JIS 分析化学用語（クロマトグラフィー部門）でも、「化学結合形シリカゲル」が同様の意味で使用されている ¹⁾ 。
逆相系移動相	： 水及び極性有機溶媒を主体とする移動相
順相系移動相	： <i>n</i> -ヘキサン等の非極性有機溶媒を主体とする移動相 注) JIS において、順相は固定相よりも極性の高い移動相、逆相は極性の高い移動相を用いる分配液体クロマトグラフィーと定義されている ¹⁾ 。キラル固定相は、分離メカニズムが複雑で分配クロマトグラフィーにおける「逆相、順相」には厳密に当てはまらない場合があるが、HPLC 分野で慣用的に用いられる用語であるため、本学位論文中では上記の意味で用いた。
スぺーサー	： 担体とリガンドを共有結合した部分（の構造） 注) 主に、アフィニティクロマトグラフィーの分野で用いられるが、キラル固定相においても、上記の意味で用いた。

3. 構造式の表記

試料の構造式を記載する場合、不斉炭素を不斉源とするキラル化合物（ラセミ体）は、不斉炭素を「*」で示した。またキラルセクター等の光学活性なキラル化合物の一部は、「破線—くさび形表記」を用いて構造式を示した。

4. キラル固定相の番号

新規に開発したキラル固定相（Chiral Stationary phase）は、「CSP-1」、「CSP-2」、・・・の様に通し番号を付した。またそれらの性能を比較するために既存のキラル固定相を用いた場合、比較用のキラル固定相（Chiral stationary phase for performance comparison）には「CSP-1C」、「CSP-2C」・・・の様に番号を付した。

5. 移動相の表記

日本分析化学会・液体クロマトグラフィー研究懇談会の指針に従い、各測定モードにおける「強溶媒/弱溶媒/添加物」の順に記載した。

例：逆相系移動相の場合 methanol/20 mmol/L phosphate buffer (pH 3.0) (40/60, v/v)

順相系移動相の場合 ethanol/*n*-hexane/trifluoroacetic acid (30/70/0.5, v/v/v)

6. 図表

英文表記とした。

理論の部

第一章 序 論

第一節 本研究の背景

医薬、農薬、香料、食品、液晶等の様々な分野において、キラル化合物の重要性が広く認識され、キラル化合物の分離分析法は必要且つ不可欠な技術となっている^{2),3)}。とりわけ医薬分野では、今日開発されている合成低分子系医薬品の約70%がキラリティをもつ化合物である事から光学活性医薬品が注目されている⁴⁾。鏡像異性体は、薬理活性の点では全く別の化合物と言っても過言ではない。そのため、医薬品の研究開発においては、鏡像異性体比の正確な分析法の開発が重要な課題である。

医薬分野でキラリティと生理活性の関連が注目される様になったのは、サリドマイド薬害の影響が大きい⁵⁾。サリドマイドは1950年代に催眠薬として発売されたが、胎児に悲惨な奇形を誘発した事から重大な社会問題となり発売中止になった薬剤である。サリドマイドには、(R)体と(S)体の鏡像異性体 (Fig. 1-1) が存在するが、当初市販されていた薬剤はラセミ体であった。

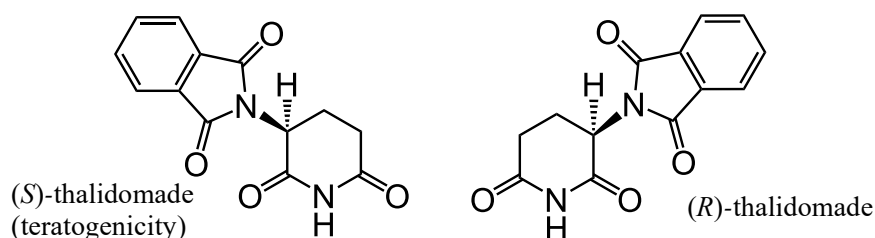


Fig. 1-1 Structure of thalidomide

Blaschke らは、独自に開発したキラル分離剤を用いてサリドマイドを光学分割し、催奇形性を示すのは(S)体のみで(R)体は全く催奇形性を示さないと報告した⁶⁾。この事から、当時、光学活性な(R)体のみを医薬品として使用していればサリドマイド薬害は防ぐ事ができたと推察され、ラセミ医薬品の使用に警鐘を鳴らすきっかけとなった。しかしその後、サリドマイドは溶液中や生体内で急速にラセミ化が進行する事から、(R)体だけの製剤を投与したとしても薬害を防げなかったという報告がなされ^{7),8)}、所謂「サリドマイドパラドックス」という問題が提起された。この問題の解明のため、サリドマイドの催奇形性と光学活性に関して、現在まで様々な研究報告がなされている⁵⁾。サリドマイドの薬害事件は、鏡像異性体と生理活性の関連や生体内におけるキラルコンバージョンという問題を認識する契機となった。これらの研究過程で、キラル化合物の分離分析技術、特にクロマトグラ

フィーによるキラル分析の先駆けとなるテクノロジーが、重要な役割を果たしてきた事は言うまでもない。

鏡像異性体の分離分析技術の中でも、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）は特に重要な技術と位置付けられている。日本産業規格 JIS : 0214（分析化学用語 クロマトグラフィー部門）において、キラル分離とは「鏡像異性体の光学分割を目的としたクロマトグラフィーによる分離」と定義され¹⁾、キラル分離には、キラル固定相法とキラル移動相法の直接法及びキラル誘導体化法の間接法がある¹⁾。間接光学分割は、キラル誘導体化によって目的光学対掌体をジアステレオマーとした後、カラム分離する手法であるが、直接法は、キラル固定相あるいはキラル移動相を用いて誘導体化せずに光学分割する方法である。そのうち、キラル固定相（Chiral Stationary Phase : CSP）を用いる直接法は精度が高く迅速な分析法として、キラル分離の中で現在最も汎用されている方法である。

キラル固定相は、キラル識別能を有する化合物（キラルセクター）を、担体のシリカゲル等に担持又は化学（共有）結合させたものである。これまでに様々なタイプのキラル固定相が報告され実用化されてきた⁹⁾。汎用されている代表的なキラル固定相を Table 1-1 に示す。

Table 1-1 Commonly used chiral stationary phases (CSP)

Type of CSP	Typical chiral selector	References
Low molecular weight CSP		
Pirkle type	3,5-dinitrobenzoylphenylglycine	10) - 16)
Ligand exchange type	copper complex of amino acid	17) - 19)
Host-guest type	cyclodextrin, crown ether	20) - 29)
Glycopeptide type	teicoplanin, vancomycin	30), 31)
High molecular weight CSP		
Polysaccharide type	cellulose or amylose derivative	32) - 39)
Protein type	α_1 -acid glycoprotein	40), 41)

キラル固定相はキラルセクターの種類によって、大きく低分子系と高分子系に分類できる。低分子系の主なキラル固定相として、代表例は、パークル形（Pirkle type）、配位子交換形（Ligand exchange type）、ホストゲスト形（Host-guest type）及びグリコペプチド形（Glycopeptide type）が挙げられる。Pirkle らは 3,5-ジニトロベンゾイルフェニルグリシンをキラルセクターとするキラル固定相を報告したが¹⁰⁾、これは水素結合や電荷移動等のジアステレオメリックな相互作用に基づいてキラル識別が達成されると考えられている。このキラルセクターの化学構造を変化させた固定相が多数報告されていて¹¹⁾⁻¹⁶⁾、これらを総称してパークル形キラル固定相と呼ぶ。配位子交換形キラル固定相は、キラルな配位

子をキラルセクターとして、ジアステレオメリックな錯体形成を分離メカニズムとしている。このタイプは、アミノ酸や乳酸等の直接キラル分離に特に有用である。キラル配位子として、プロリンの銅錯体^{17),18)} やペニシラミン誘導体の銅錯体¹⁹⁾ 等が報告されている。ホストゲスト形キラル固定相は、キラルなホストゲスト相互作用に基づいてキラル分離を行うもので、キラルセクターとして、シクロデキストリン誘導体²⁰⁾⁻²⁵⁾ やキラルなクラウンエーテル誘導体²⁶⁾⁻²⁹⁾ が知られている。また、グリコペプチド形はバンコマイシン^{30),31)} 等の大環状グリコペプチド系抗生物質をキラルセクターとするキラル固定相である。このタイプは、水素結合やホストゲスト等の複数の相互作用が分離メカニズムに関与していると考えられている。

高分子系の主なキラル固定相には、多糖類やタンパク質が用いられている。多糖形は、セルロースやアミロース等の多糖類誘導体をキラルセクターとするキラル固定相である³²⁾⁻³⁹⁾。糖の水酸基の化学修飾の違いにより、数多くの固定相が報告されている。このタイプは汎用性が高く、分離できるキラル化合物が多いため、現在、キラル固定相の主流となっている。また、タンパク形キラル固定相として、 α_1 -酸性糖タンパク⁴⁰⁾ やオボムコイド⁴¹⁾ を用いる固定相が報告されている。

この様に、キラル固定相の技術進歩は目覚ましく、多くの固定相が市販され医薬品を始め様々な分野の研究に活用されている⁴²⁾。しかし、高度化とともに効率性が要求される産業界の研究ニーズに必ずしも応えられている訳ではない。その理由は以下の通りである。

1. 現在までに開発されている多くのキラル固定相を使用しても直接分離が困難なキラル化合物が残されている。
2. キラル固定相は分離対象とする試料の化学構造に対する特異性が高い。これだけ多様なキラル固定相が用いられている事実は、言い換えると、万能のキラル固定相は存在せず1種類だけで多くのキラル化合物が分離できる訳ではない事を示している。そのため、キラル分離メソッドの開発では、多くのキラル固定相の中から対象化合物に応じた最適のものを選択する必要がある。
3. 移動相が一般カラムとは異なる事が多く、また移動相組成に制約がかかる場合もあるので、分離メソッドの開発に時間を要する。
4. 従来キラル固定相は順相系移動相を使用する事が多く、逆相系移動相では分離が困難な場合が多かった。そのため、医薬分析で汎用され、環境負荷の低い逆相系移動相でのキラル分離が望まれている。

このような背景から筆者は、新規キラル固定相の開発とそのエナンチオ分離特性を明らかにするための研究に長年従事してきた。

第二節 本研究の目的と論文構成

本研究では、前節で述べた従来のキラル固定相の問題点の克服を目指して、以下の点を主要な目的とした。

1. 既に知られているキラルセクターの化学構造を変化させた新規キラル固定相を設計して適用化合物を拡大する。
2. 医薬中間体や生理活性物質であるキラルアミンやアミノアルコール化合物はキラル分離ニーズが高いため、これらの化合物の分離対象を広げ逆相系移動相でキラル分離を達成する。
3. 開発したキラル固定相のエナンチオ分離特性を明らかにし、キラル分離メソッドの開発の指標となる基礎データを提供する。

第二章では、パークル形キラル固定相を例として、化学結合形キラル固定相を設計する上で重要となるキラルセクターと担体を結合するスペーサーの構造が、エナンチオ分離特性に与える効果を検討した。また第三章では、クラウンエーテル誘導体をキラルセクターとする新規化学結合形キラル固定相の開発とその分離特性についてまとめたが、クラウンエーテルを担体に共有結合させたキラル固定相として初めての製品化成功例である。第四章では第二章の知見を基に、シクロデキストリン誘導体をキラルセクターとして、スペーサー部分に糖鎖をもつ新規キラル固定相を設計し、スペーサーの構造が分離特性に与える効果を考察した。更に第五章では、シクロデキストリン水酸基部分の化学修飾の違いがエナンチオ分離特性に及ぼす効果を考察した。その結果、シクロデキストリンの水酸基をアセチル化すると幅広いキラルアミンの分離が可能となる事を明らかにした。また、キラルアミンの分離におけるクラウンエーテル形固定相とシクロデキストリン形固定相の性能比較を行った。第六章では、ポリジフェニルアセチレン誘導体をコアシェルシリカ担体にコーティングした新規キラル固定相を設計し、優れたキラルアルコール分離性能を有する事を示した。これらの新規キラル固定相の評価を進める過程で、特定の官能基をもつキラル化合物に対して、特定のキラル固定相が特異的に有効である事を見出した。この知見を基に、分離対象化合物の官能基依存的キラル固定相選択法を第七章で提示した。最後に第八章で本研究の総括と筆者の所見及び今後の展望を論述した。各章の実験方法は「実験の部」にまとめて記載した。以下、得られた知見を各章に分けて詳述する。

第二章 パークル形キラル固定相におけるスペーサー部分の構造がエナンチオ分離特性に与える影響

第一節 緒言

キラル固定相は、キラルセクターを固定化する方法で分類すると、共有結合させた化学結合形と吸着等により物理的に担体に担持させたコーティング形に分けられる。耐久性や頑健性の点では、一般に化学結合形の方が優れている。本研究では、実用的な耐久性を重視して化学結合形のキラル固定相の設計を目的の1つとした。

化学結合形キラル固定相を設計する上で、シリカゲル等の担体とキラルセクターを結合する部分（スペーサー）の構造を考慮に入れる必要がある。これまでに、スペーサー部分の構造が保持時間やエナンチオ分離能に与える影響を様々な観点から考察し、キラルセクターが同じでもスペーサーの構造が異なればエナンチオ分離特性も変化する事が報告されている⁴³⁾⁻⁴⁶⁾。キラル固定相のエナンチオ分離能がそのキラルセクターに依存する事は当然であるが、同じキラルセクターを有する固定相であっても、担体に導入する化学反応やスペーサー部分の構造の違いがエナンチオ分離能に影響を与える事も考慮に入れる必要がある。本章では、スペーサー部分の影響を考察するため、従来から知られているパークル形キラル固定相を用いて、キラルセクターの構造が同じでスペーサー部位のアルキル鎖長が異なる複数の固定相を作製し、そのエナンチオ分離特性を比較した。

第二節 スペーサー部分のアルキル鎖長が異なるキラル固定相の比較

本章で設計したキラル固定相の構造を Fig. 2-1 に、その性能評価に用いたキラル化合物の構造式を Fig. 2-2 に示す。CSP-1 は、*N*-((*R*)-1-(α -ナフチル)エチルアミノカルボニル)-*L*-*tert*-ロイシンを、CSP-2 は *N*-3,5-ジニトロベンゾイル-(*R*)-ナフチルグリシンをキラルセクターとするパークル形キラル固定相の一種であり、担体のアミノプロピルシリカゲルとキラルセクターの間に、アミド結合を介して炭素数 10 個のアルキル鎖を有する構造となっている。それぞれのキラルセクターは、アミノプロピルシリカゲルを担体とする市販カラムの CSP-1C 及び CSP-2C と同じである。即ち、CSP-1 と CSP-1C 及び CSP-2 と CSP-2C は、それぞれキラルセクターの構造が同じで、スペーサーのアルキル鎖長のみが異なるキラル固定相である。

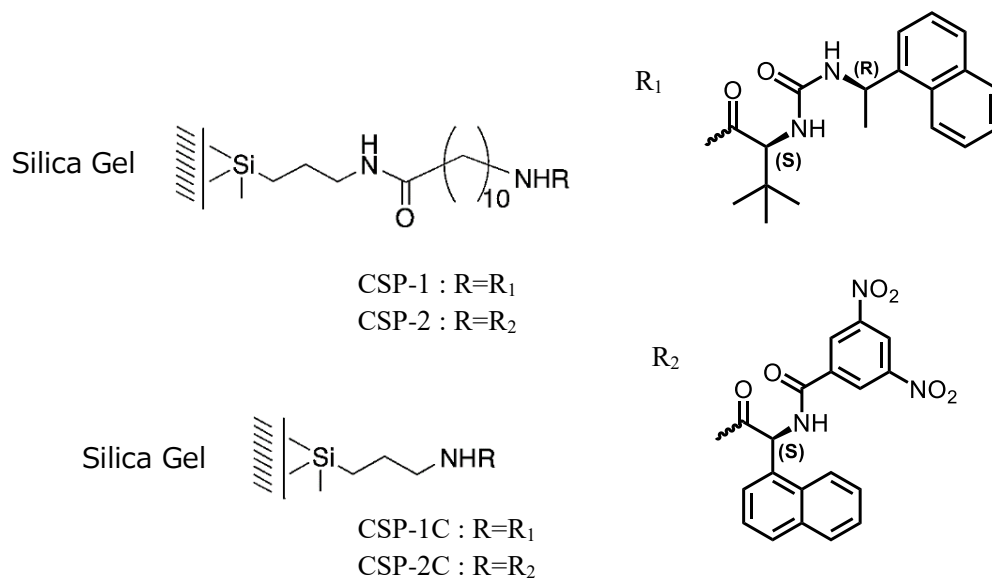


Fig. 2-1 Structure of CSP-1, CSP-1C, CSP-2 and CSP-2C

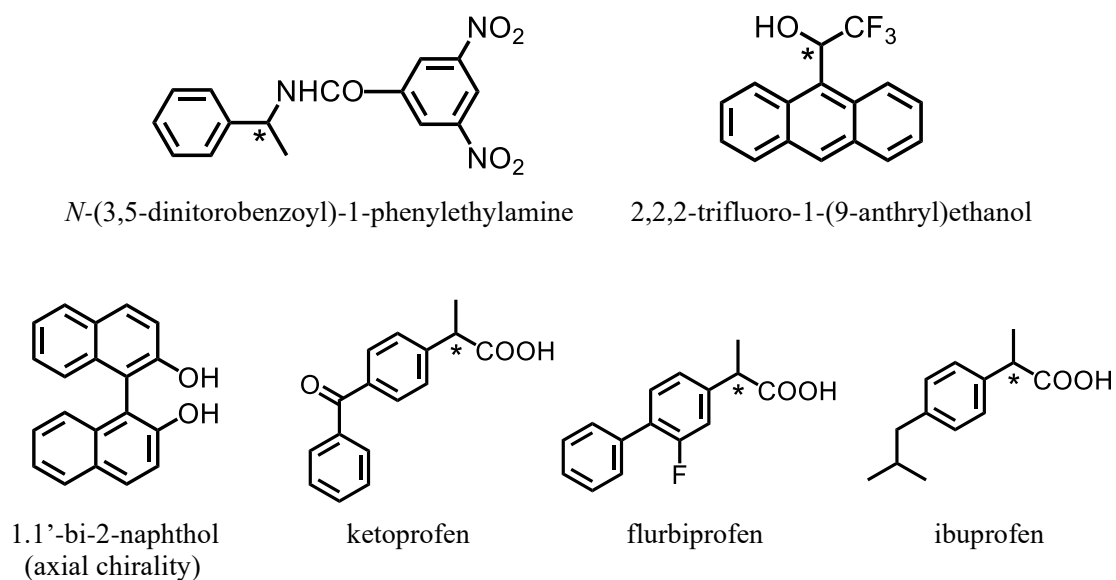


Fig. 2-2 Structure of racemates as analyte

先ず、3種のキラル化合物、*N*-(3,5-ジニトロベンゾイル)-1-フェニルエチルアミン、1,1'-ビ-2-ナフトール及び2,2,2-トリフルオロ-1-(9-アンスリル)エタノールを用いてCSP-1とCSP-1Cのエナンチオ分離特性を比較した。得られた保持係数と分離係数をTable 2-1に示す。3,5-ジニトロベンゾイル-1-フェニルアラニンを順相系移動相(a)で評価したところ、スペーサーのアルキル鎖長を延長したCSP-1は、CSP-1Cに比べて分離係数がやや低下した。一方、逆相系移動相(b~c)の場合は、逆に分離係数が増加し、保持時間はやや長くなった。順相系と逆相系移動相におけるクロマトグラムの比較例をそれぞれ、Fig 2-3、Fig. 2-4に示す。

その他の2種の化合物について、逆相系移動相(d~e)を用いてエナンチオ分離能を比較したところ、何れの化合物も同じ組成のアセトニトリル/水の混合液を用いた場合に、CSP-1Cに比べてCSP-1の保持係数及び分離係数がともに大きくなる傾向を示した。また両者の保持時間がほぼ同じになる様に移動相組成を調整して比較した場合は、CSP-1の分離係数が有意に大きくなった。この時の1,1'-ビ-2-ナフトールのクロマトグラム例をFig. 2-5に示す。Fig. 2-5において、(a)と(c)は同じ組成の移動相、(b)と(c)は保持時間がほぼ同じになる様に組成を調整した移動相で比較したクロマトグラムである。

Table 2-1 Comparison of enantiomeric separation ability between CSP-1 and CSP-1C

Compound	CSP-1			CSP-1C		
	k_I	α	mobile phase	k_I	α	mobile phase
<i>N</i> -(3,5-dinitrobenzoyl)-1-phenylethylamine	0.38	2.62	a	0.44	3.08	a
	3.20	1.24	b	2.30	1.19	b
				3.11	1.18	c
1,1'-bi-2-naphthol	12.55	1.05	d	9.96	1.00	d
				12.65	1.00	e
2,2,2-trifluoro-1-(9-anthryl)ethanol	15.39	1.04	d	7.13	1.00	d
				14.87	1.00	e

Mobile phase : a) ethanol/1,2-dichloroethane/*n*-hexane (10/30/60, v/v), b) acetonitrile/water (50/50, v/v) containing 5 mmol/L citric acid, c) acetonitrile/water (45/55, v/v) containing 5 mmol/L citric acid, d) acetonitrile/water (40/60, v/v), e) acetonitrile/water (35/65, v/v)

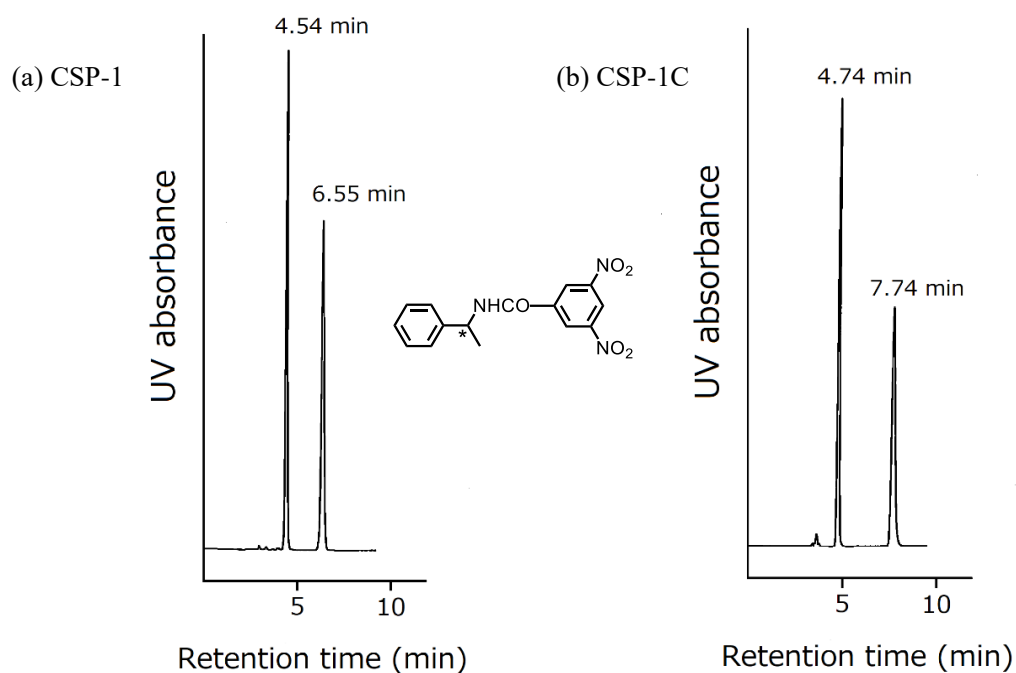


Fig. 2-3 Chromatograms of *N*-(3,5-dinitrobenzoyl)-1-phenylethylamine using CSP-1 and CSP-1C in normal phase mode
 Mobile phase : ethanol/1,2-dichloroethane/hexane (10/30/60, v/v).

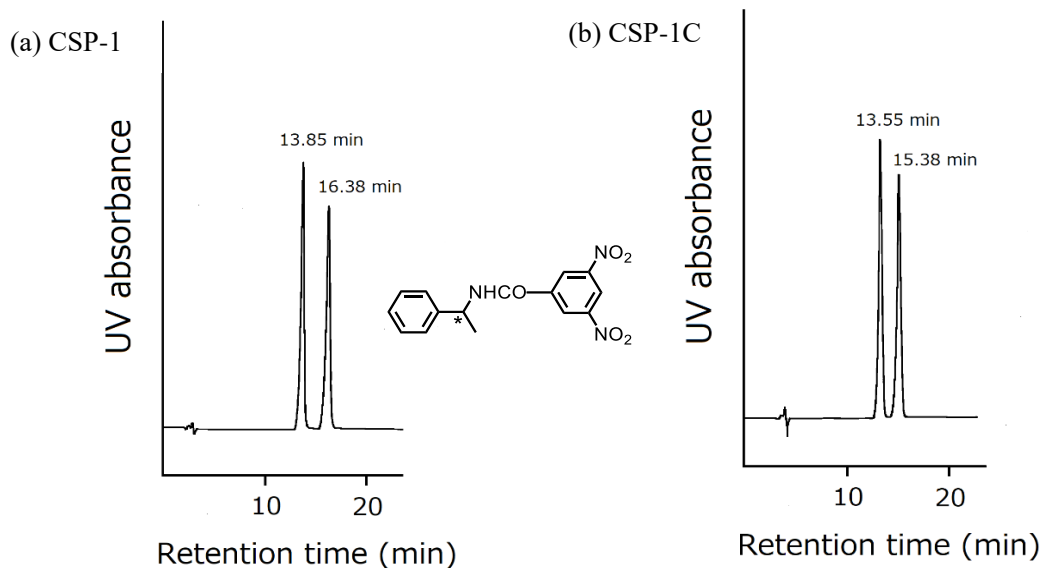


Fig. 2-4 Chromatograms of *N*-(3,5-dinitrobenzoyl)-phenylethylamine using CSP-1 and CSP-1C in reversed phase mode
 Mobile phase : (a) acetonitrile/water (50/50, v/v) containing 5 mmol/L citric acid, (b) acetonitrile/water (45/55, v/v) containing 5 mmol/L citric acid.

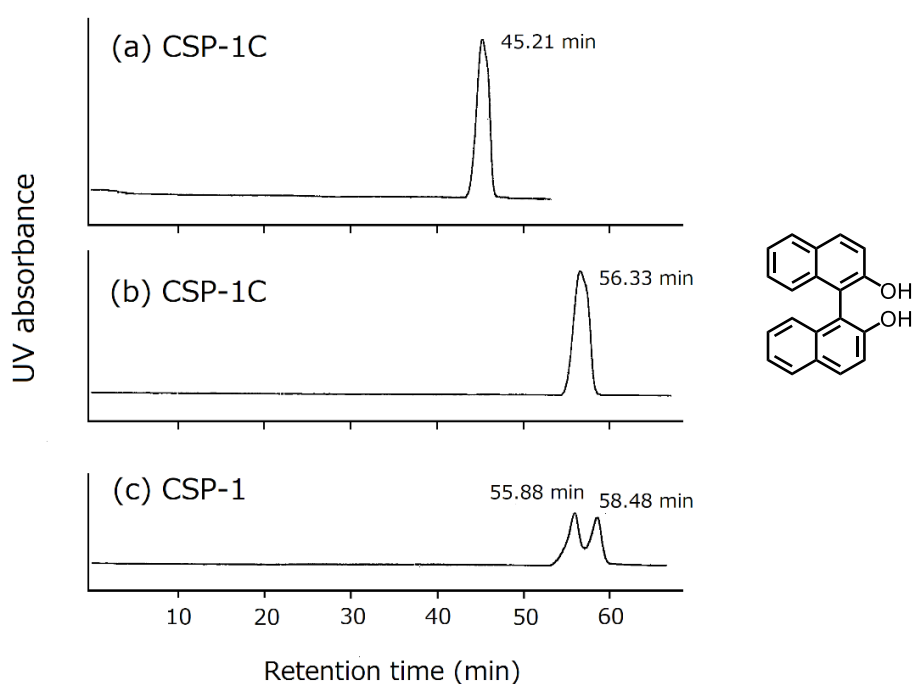


Fig. 2-5 Chromatograms of 1,1'-bi-2-naphthol using CSP-1 and CSP-1C
 Mobile phase : (a) and (c) acetonitrile/water (40/60, v/v), (b) acetonitrile/water (35/65, v/v).

次に、CSP 2 と CSP-2C を比較した結果を Table 2-2 に示す。CSP 2C は、分子内にカルボキシル基を有するキラル化合物の分離に有効である事が示されているため³⁾、評価用サンプルとして不斉炭素に直結したカルボキシル基を有するプロフェン系抗炎症薬、ケトプロフェン、フルルビプロフェン、イブプロフェンの 3 化合物を含めた。

Table 2-2 Comparison of enantiomeric separation ability between CSP-2 and CSP-2C

Compound	CSP-2			CSP-2C		
	k_1	α	mobile phase	k_1	α	mobile phase
1,1'-bi-2-naphthol	9.72	1.03	f	9.85	1.05	g
2,2,2-trifluoro-1-(9-anthryl)ethanol	5.92	1.10	h	5.27	1.11	f
ketoprofen	2.43	1.08	i	2.60	1.15	i
flurbiprofen	2.35	1.07	i	2.37	1.11	i
ibuprofen	1.33	1.05	i	1.63	1.07	i

Mobile phase : f) acetonitrile/water (40/60, v/v), g) acetonitrile/water (30/70, v/v), h) acetonitrile/water (50/50, v/v), i) 0.03 mol/L ammonium acetate in methanol

CSP-2 と CSP-2C の場合、逆相系移動相 (f~h) では CSP-2 における分離係数の有意な増加は認められなかった。この結果は CSP-1 の場合と傾向が異なる。この条件での 2,2,2-トリフルオロ-1-(9-アンズリル)エタノールのクロマトグラム比較例を Fig. 2-6 に示す。また水を含まない酢酸アンモニウム含有メタノール系の移動相 (i) では、CSP-2 の分離係数が逆に低下する傾向が認められた。

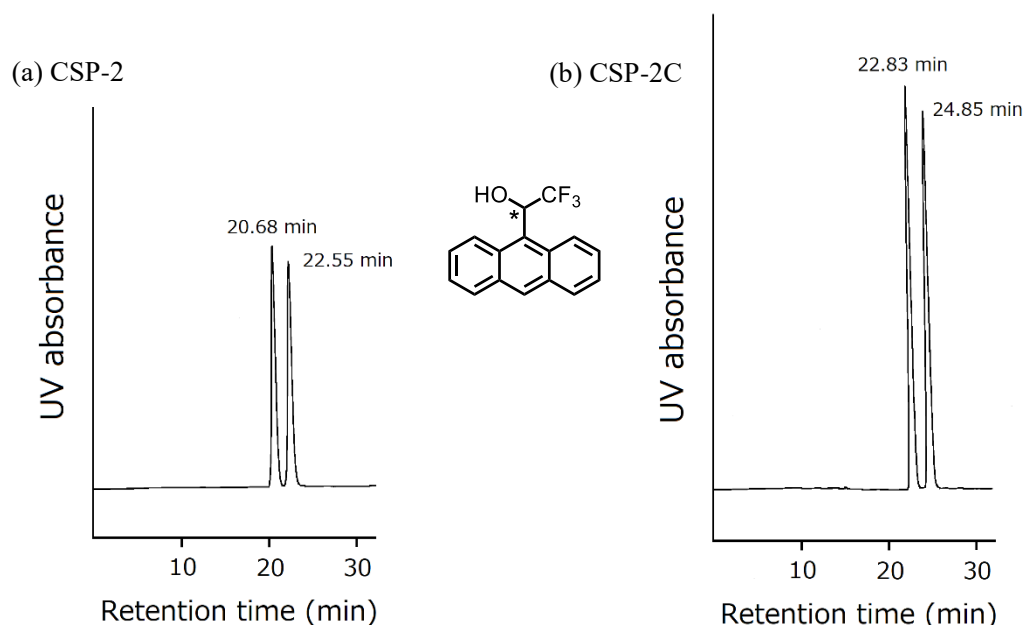


Fig. 2-6 Chromatograms of 2,2,2-trifluoro-1-(9-anthryl)ethanol using CSP-2 and CSP-2C
Mobile phase : (a) acetonitrile/water (50/50, v/v), (b) acetonitrile/water (40/60, v/v).

第三節 スペーサー部分のアルキル鎖長の影響に関する考察

以上の結果をまとめると、キラルセクターの種類や移動相によって効果に違いがあるものの、スペーサーのアルキル鎖を延長した固定相では、保持時間の増大ばかりでなく、光学分割能自体が向上するケースも認められた。順相系移動相では、その効果は認められなかったので、逆相系移動相を用いた場合に分離係数が増加する傾向が発現する可能性がある」と結論した。

逆相系移動相において保持時間が増加する要因は、延長されたアルキル鎖によってキラル固定相に疎水性相互作用が追加された効果と推察される。これにより、例えば、アミノ酸混合物のキラル分離において、アミノ酸相互の分離が改善される効果等が期待できる。

一方、逆相系移動相において分離係数が増加した要因は、今回の結果だけでは明確な考察はできない。しかし、パークル形キラル固定相は、固定相のキラルセクターと試料と

の間のジアステレオメリックな水素結合や電荷移動相互作用が分離に寄与すると考えられているので、逆相系移動相の場合、鎖長の長いアルキル鎖をスペーサーとして導入する事で、固定相表面に疎水的環境が創出され、水素結合による鏡像異性体間のジアステレオメリックな相互作用の差が発現しやすくなり、光学認識能が向上したと考えれば合理的である。

第四節 小括

パークル形キラル固定相において、長いアルキル鎖をスペーサーとすると、保持時間だけでなくエナンチオ分離能も向上する場合が認められた。この効果はキラルセクターの種類や移動相によって異なり、キラルセクター部分の構造が同じであっても、キラルセクターと担体とを結合するスペーサー部分の構造が違えば、限定的ではあるが、エナンチオ分離能に有意差が生じる可能性がある。この知見は、化学結合形キラル固定相において、キラルセクターと担体を結合する方法及びスペーサーの構造が重要であることを示している。次章以降の新規キラル固定相の設計において、この知見を考慮に入れた。

第三章 擬 18-クラウン-6-エーテルを用いた新規化学結合形キラル固定相

第一節 緒 言

キラルアミンには医薬品に関連した重要な化合物が多く、キラル分離の必要性が高い。アミノ酸等の第一級アミノ基を有するキラル化合物の分離にはクラウンエーテル誘導体をキラルセクターとする固定相が有効である事が知られている^{26),29)}。Fig. 3-1(a) に 18-クラウン-6 エーテルの基本構造を示す。クラウンエーテルは大環状ポリエーテルで、その空孔に金属カチオンや一級アンモニウムカチオンを包接する特性を示す。その置換基に何らかのキラルユニットを導入した光学活性クラウンエーテルはエナンチオ認識能を持ち、光学分割に応用できる。

1970 年代に、Cram らは光学活性クラウンエーテルを合成し、それを担体に共有結合させた HPLC キラル固定相を報告した^{28),29)}。Cram は、それらの業績により 1987 年にノーベル化学賞を受賞している。その他にも、早くから化学結合形のキラルクラウンエーテル固定相の報告はあったが⁴⁷⁾、当初は研究報告のみで製品化されなかった。量産化や製造コスト的な課題もあったと推察される。Shinbo らは、ビナフチルを不斉源とするキラルクラウンエーテルを ODS 固定相にダイナミックコーティングしてアミノ酸のキラル分離を達成している⁴⁸⁾。この固定相は製品化され、キラル第一級アミンの分離に有用である事が示されているが、キラルセクターを共有結合ではなくコーティングで吸着させているため、移動相として使用可能な溶媒に制約があった。クラウンエーテルを用いたキラル固定相では、通常、メタノール等の有機溶媒と過塩素酸水溶液の混合液が移動相として用いられるが、移動相中の有機溶媒濃度を約 15%以上にすると、クラウンエーテルが溶出してカラムが劣化する⁴⁹⁾。そのため、例えばナフチル基等の疎水性基をもつアミン化合物は保持が強く移動相中の有機溶媒の濃度を大きくする必要があるので、コーティング形のクラウンエーテルキラル固定相では測定が困難な事が多かった。

Naemura らは、クラウンエーテルの環の一部にベンゼン環を含むキラル擬 18-クラウン-6-エーテル誘導体を合成し、第一級アミンに対してキラル識別能を示す事を報告した⁵⁰⁾⁻⁵²⁾。この擬 18-クラウン-6-エーテルの基本構造を Fig. 3-1(b) に示す。これは比較的少量生産し易い合成ルートで製造できるが、HPLC キラル固定相への応用は報告されていなかった。本章では、このキラル擬 18-クラウン-6-エーテル誘導体をキラルセクターとして、これを担体のシリカゲルに共有結合させた新規キラル固定相 (CSP-3) を設計した。更にそのエナンチオ分離特性を評価して、従来のコーティングタイプでは測定が困難であった疎水性アミン類への適用や順相系移動相の使用を試みた。

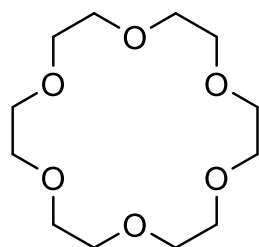


Fig. 3-1(a) Basic structure of 18-crown-6-ether

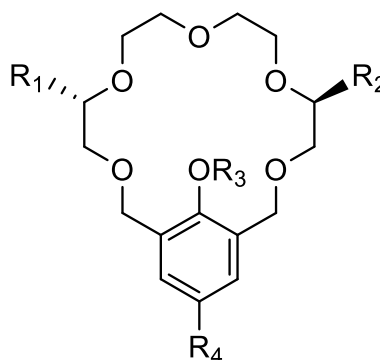


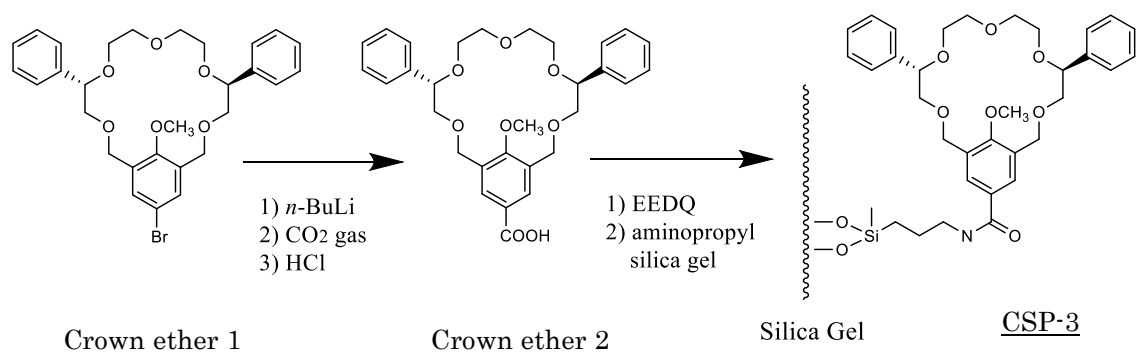
Fig. 3-1(b) Basic structure of chiral pseudo-18-crown-6-ether

第二節 クラウンエーテル化学結合形キラル固定相の設計

第二章で述べた様に、化学結合形キラル固定相を設計する場合、担体とキラルセクターを結合するスペーサー部分の構造が重要となる。パークル形キラル固定相においては、アミド結合を介してキラルセクターを担体に共有結合する方法がよく知られている。担体への固定化法としてアミド結合が用いられる理由は、逆相 HPLC でよく使用される酸性移動相中での安定性が高い事、そして固定相と試料との相互作用としての水素結合サイトとなり得る事が主たる要因であると考えられる。今回、このアミド結合による固定化法をクラウンエーテル形キラル固定相に応用した。

CSP-3 の合成スキームを Fig. 3-2 に示す。CSP-3 充填剤の作製では、先ず、Naemura らが報告しているキラル擬 18-クラウン-6-エーテル (crown ether 1) に、リンカーとしてのカルボキシル基を導入し (crown ether 2)、それを担体のアミノプロピルシリカゲルのアミノ基とアミドカップリングしてシリカゲルに固定化した (CSP-3)。キラルセクターをアミド結合で固定化した結果、HPLC でよく使用するメタノールやアセトニトリル等の有機溶媒は、濃度の制約なく使用できる事が明らかになった。

CSP-3 の耐溶媒性確認のため、1-(1-ナフチル) エチルアミンを試料として 30%アセトニトリルを含有する過塩素酸水溶液 (pH 2.0) を連続通液したところ、少なくとも 150 時間まで保持時間及び分離係数の変化は認められなかった。クラウンエーテルを担体に共有結合させた事により、実用的に十分な耐久性を付与する事ができた。



Crown ether 2 :
 (5*S*,13*S*)-(+)-21-Methoxy-5,13-diphenyl-3,6,9,12,15-pentaoxabicyclo
 [15.3.1]henicosa-1(20),17(21),18-triene-19-carboxylic acid

Fig. 3-2 Preparation scheme of CSP-3

第三節 クラウンエーテル化学結合形キラル固定相のエナンチオ分離特性

第一項 逆相系移動相を用いたキラル化合物の分離

キラルセクターを担体に共有結合した事で、移動相中の有機溶媒濃度の制約が無くなったが、そのメリットの1つは、保持の強い疎水性キラルアミンの分離が可能になる事である。クラウンエーテルを用いるキラル固定相では、逆相系移動相として、通常、有機溶媒と過塩素酸水溶液の混合液が用いられる。移動相に添加する酸として、過塩素酸以外の酸、例えばトリフルオロ酢酸、リン酸、酢酸を用いた場合は、酸濃度を上げてても保持が弱く、結果として分離が困難であった。1-(1-ナフチル)エチルアミンのキラル分離における移動相中の過塩素酸水溶液の pH 値と、保持係数及び分離係数の関係を Fig. 3-3 に示す。保持係数は pH に大きく依存し、pH が低いほど保持が大きくなり、pH を 2 以上にすると保持時間が急激に減少した。担体のシリカゲルとアミド結合は酸性中で比較的安定なので、移動相中の過塩素酸水溶液の pH は 1.5~2.0 の範囲が適当であると考えられる。なお、Fig. 3-3 において、過塩素酸水溶液の pH が 2.5 以上の場合は、殆ど保持せず分離しなかったため、分離係数のプロットは省略している。

疎水性キラルアミンの例として、1-(1-ナフチル)エチルアミン及びアラニン-β-ナフチルアミドのクロマトグラム例を Fig. 3-4 に示す。CSP-3 を使用すると、このような疎水性の高い化合物でも、移動相の有機溶媒濃度を最適化して適度な保持時間に調整する事によって、キラル分離メソッドの作成が可能であった。

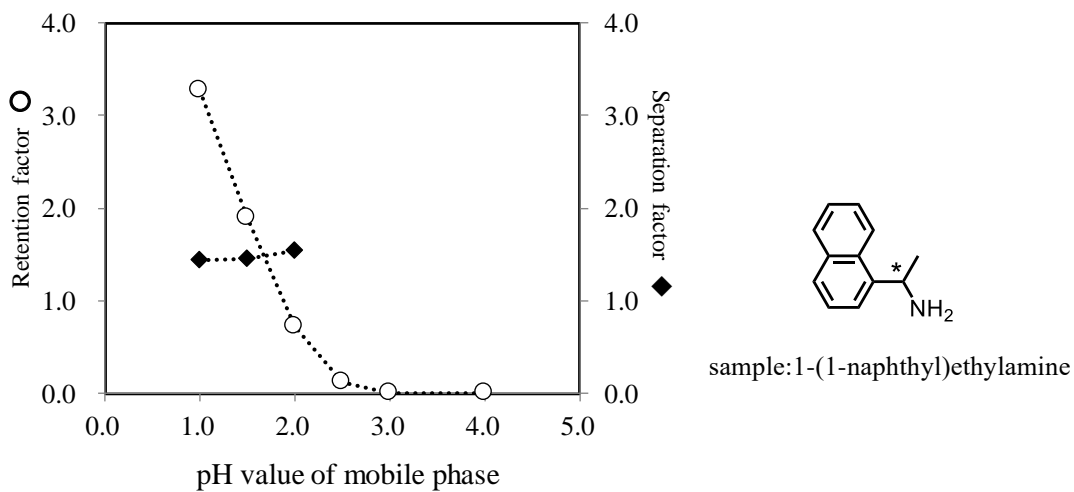


Fig. 3-3 Influence of pH value of mobile phase using CSP-3
 Mobile phase: acetonitrile/perchloric acid aq. (40/60, v/v). The pH was adjusted by changing the concentration of perchloric acid.

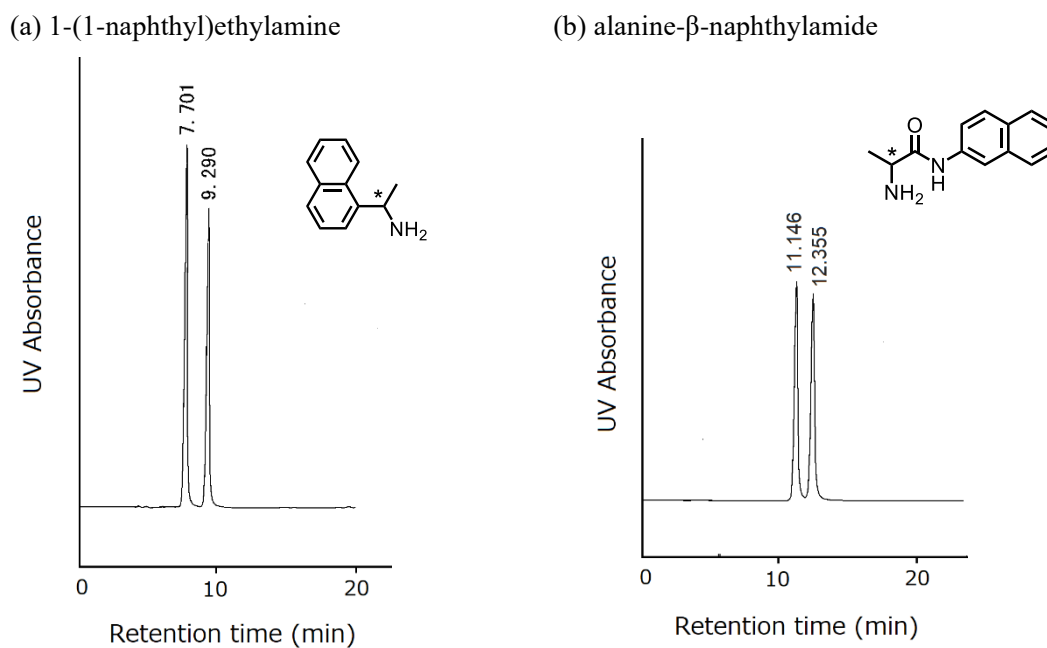


Fig. 3-4 Chromatograms of 1-(1-naphthyl)ethylamine and alanine-β-naphthylamide using CSP-3
 Mobile phase : (a) acetonitrile/perchloric acid aq. (pH 2.0) (30/70, v/v), (b) acetonitrile/perchloric acid aq. (pH 2.0) (20/80, v/v).

第二項 順相系移動相を用いたキラル化合物の分離

キラルセクターを担体に共有結合を介して導入するもう1つのメリットは、順相系移動相が使用できる事である。Fig. 3-5 に、エタノール/*n*-ヘキサン混合液にトリフルオロ酢酸を添加した溶液を移動相とした場合の1-(1-ナフチル)エチルアミン、(*RS/SR*)-ノルエフェドリン (フェニルプロパノールアミン) 及び3,4-ジヒドロキシフェニルアラニン (DOPA) の分離クロマトグラムを示す。また、同じ試料をアセトニトリル/過塩素酸水溶液の逆相系移動相と比較した結果を Table 3-1 に示す。

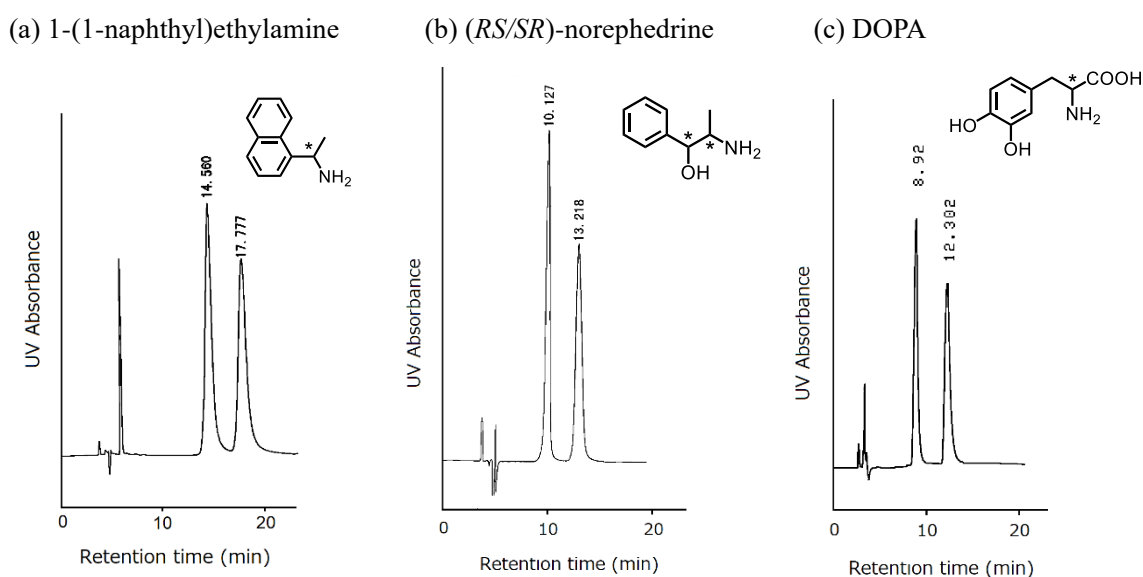


Fig. 3-5 Chromatograms of 1-(1-naphthyl)ethylamine, norephedrine and DOPA using CSP-3 in normal phase mode
 Mobile phase : (a) and (b) ethanol/*n*-hexane/trifluoroacetic acid (30/70/0.5, v/v/v), (c) ethanol/*n*-hexane/trifluoroacetic acid (35/65/1, v/v/v).

Table 3-1 Comparison of enantiomeric separation ability by reversed phase mode using CSP-3

Compound	normal phase mode			reversed phase mode		
	k_1	α	mobile phase	k_1	α	mobile phase
1-(1-naphthyl)ethylamine	2.09	1.33	a)	0.86	1.44	c)
norephedrine	1.15	1.57	a)	0.57	1.17	d)
DOPA	0.89	1.80	b)	1.18	1.13	e)

Mobile phase : a) and b) are shown in Fig. 3-5. c) acetonitrile/perchloric acid aq. (pH 2.0) (30/70, v/v), d) acetonitrile/perchloric acid aq. (pH 1.3) (5/95, v/v), e) acetonitrile/perchloric acid aq. (pH 1.3) (10/90, v/v),

順相系と逆相系の移動相を比較した場合、1-(1-ナフチル)エチルアミンでは逆相系の方が分離係数が大きく、順相系ではややピークのテーリングが認められた。このような疎水性の高いアミン類に対しては、逆相系移動相の方が適していると考えられる。一方、アミノアルコール誘導体であるノルエフェドリンやアミノ酸の DOPA は、順相系ではかなり大きな分離係数が得られたが、逆相系では移動相組成を調整して長めに保持させても分離係数が小さくなる傾向が認められた。比較的極性の高いアミン類には順相系移動相の方がより適している。試料によって移動相の使い分けが必要になると考えられる。

アミノ酸を誘導体化する事なく直接キラル分離するためには、配位子交換形キラル固定相、様々な方法があるが、クラウンエーテル形キラル固定相も有力な選択肢である。CSP-3 で順相系移動相を用いたアミノ酸とそのエステルのエナンチオ分離能を Table 3-2 に、分離クロマトグラムの一例を Fig. 3-6 に示す。順相系移動相を使用する場合、エタノール/*n*-ヘキサン/トリフルオロ酢酸にごく少量の水を添加すると、ピーク形がシャープになる効果が認められた。

Table 3-2 Enantiomeric separation ability by CSP-3 using normal phase mode

Compound	k_1	α	Mobile phase
tryptophan	2.09	1.31	30/70/0.5/0.5
phenylalanine	1.66	1.26	25/75/0.5/1
tyrosine	2.33	1.47	30/70/0.5/0.5
phenylalanine methyl ester	0.90	1.31	30/70/0.5/0.5

Mobile phase : ethanol/*n*-hexane/trifluoroacetic acid/water (v/v/v/v)

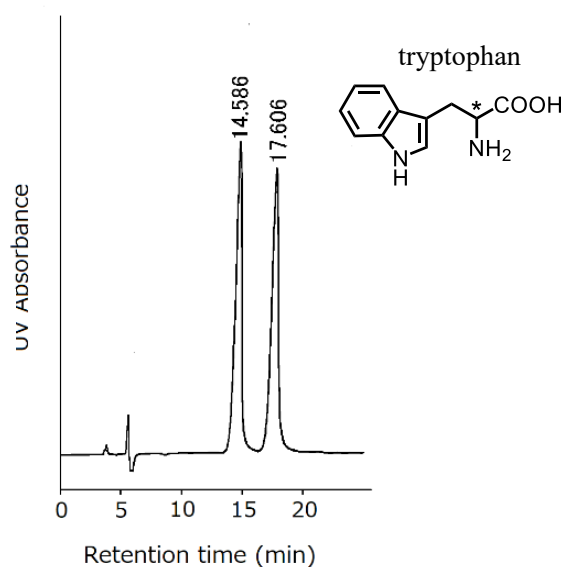


Fig. 3-6 Chromatograms of tryptophan using CSP-3.
Mobile phase :
ethanol/*n*-hexane/trifluoroacetic acid/water
(30/70/0.5/0.5, v/v/v/v)

以上の様に CSP-3 は、キラルセクターのクラウンエーテルを担体と共有結合を介して連結して耐久性を向上させた事により、移動相中の有機溶媒濃度の制約が無くなり、順相系移動相も使用可能となった。その結果、適用化合物の範囲や使用条件が広がった。順相系移動相を使用する実用的な利点として、分取目的や超臨界流体クロマトグラフィーへの適用が挙げられる。

第四節 鏡像異性体の溶出順に関する考察

キラル固定相を用いて分析メソッドを設計する場合、異性体の溶出順序を考慮する必要が生じる場合がある。例えば、微量分析では微量の対掌体が、分取の場合は分取したい対掌体が先に溶出する方が望ましい。光学活性体が市販されているいくつかのサンプルを用いて CSP-3 における溶出順を確認した結果を Table 3-3 に示す。

Table 3-3 Elution order of enantiomer in CSP-3

Compound	Elution order	IR/IS-d3 ⁵²⁾
1-(1-naphthyl)ethylamine	(<i>S</i>) → (<i>R</i>)	1.54
norephedrin	(<i>1S,2R</i>)(+) → (<i>1R,2S</i>)(-)	—
tryptophan	D → L	—

キラル固定相の構造や試料の物理化学的情報から溶出順を推察するのは一般に困難であり、実際に HPLC で測定しないと溶出順が判らない事が多い。クラウンエーテル形のキラル固定相の場合、ゲストのアミノ基がクラウンエーテルに包接されるので、固定相と試料との相互作用のメカニズムが比較的シンプルであり、HPLC の溶出順を予測できる可能性がある。澤田らは、クラウンエーテルのアミン類の認識能を定量的に評価する方法として、エナンチオマーの一方 ((*S*)体) を重水素標識したラセミゲストを用い、高速原子衝撃質量分析法 (FABMS) におけるホストゲストコンプレックスイオンのピーク強度比 (IR/IS-d3) をエナンチオ認識能の尺度とする方法 (FABMS/EL-ゲスト法) を報告した ^{53),54)}。IR/IS-d3 の値が 1.0 以上の場合、ホストがゲストの(*R*)体とより強く結合する事を意味するとされている ^{53),54)}。その報告によると、CSP-3 と同じ構造の擬 18-クラウン-6-エーテルをキラルホストとした場合、1-(1-ナフチル)エチルアミンの IR/IS-d3 は 1.54 とされていて ⁵³⁾、(*R*)体の方がクラウンエーテルとのホストゲストコンプレックスイオンのピーク強度比が大きい、即ち親和性が大きい事を示している。CSP-3 を用いた場合、1-(1-ナフチル)エチルアミンは、逆相系、順相系ともに(*S*)体が先に溶出し(*R*)体の保持が大きい。これは(*R*)体の

方が固定相のクラウンエーテルとの親和性が大きい事を示していて、FABMS/EL-ゲスト法の値と相関性がある。今回、この相関性を検証したのは 1-(1-ナフチル)エチルアミンの 1 化合物のみであるが、クラウンエーテル形キラル固定相の場合、HPLC 以外の物理化学的情報から溶出順の推察が可能である事を示唆している。

第五節 小 括

クラウンエーテル誘導体をキラルセクターとするキラル固定相において、リンカーにアミド基を有する新規化学結合形キラル固定相を設計して性能を評価した。共有結合を介して結合した結果、移動相の制約が少なくなり、従来のコーティング形固定相では分析が困難であった疎水性の高いキラルアミンにも対象が広がった。また、順相系移動相も使用可能となった。CSP-3 は製品化し市場に提供したが、クラウンエーテルを担体に共有結合させたキラル固定相を製品化したのはこれが最初である。製品化後、CSP-3 は他の文献にも引用されている⁵⁵⁾。

第四章 スペーサーに糖鎖を有する新規シクロデキストリン形キラル固定相

第一節 緒言

シクロデキストリンは数分子の D-グルコースが、 α -1,4 グリコシド結合した環状オリゴ糖の一種である。シクロデキストリン分子は、片方の端が少し狭くなった円筒形で、外部が親水性、内部が疎水性を示す (Fig. 4-1)。分子の内側の空孔に疎水性の分子を取り込む包接能を持ち、可溶化、徐放化、マスキング等の目的で、医薬、食品、化粧品等の分野で活用されている。また、シクロデキストリン分子そのものが光学活性体であるため、キラルなゲスト分子の各鏡像異性体に対する包接親和性が異なる。キラルユニットを導入していない未修飾のシクロデキストリンやその誘導体をキラル分離剤として利用できる。

シクロデキストリン誘導体をキラルセクターとするキラル固定相は、古くから GC 固定相として利用されてきたが、HPLC の固定相としても有用である²⁰⁾⁻²⁵⁾。シクロデキストリンは、環を構成するグルコースの個数によって、 α -、 β -、 γ -等のタイプに分類できるが (Fig. 4-1)、その中でも、グルコース 7 個から成る β -シクロデキストリンは、ベンゼン環 1~2 個に相当するサイズの低分子芳香族化合物をゲストとして包接し易いため、HPLC 固定相として繁用されている。HPLC 用のシクロデキストリン形キラル固定相は、逆相系の移動相を使用して分離できる点が特長の 1 つであり、特に医薬品原体やその中間体の分析に有用である。

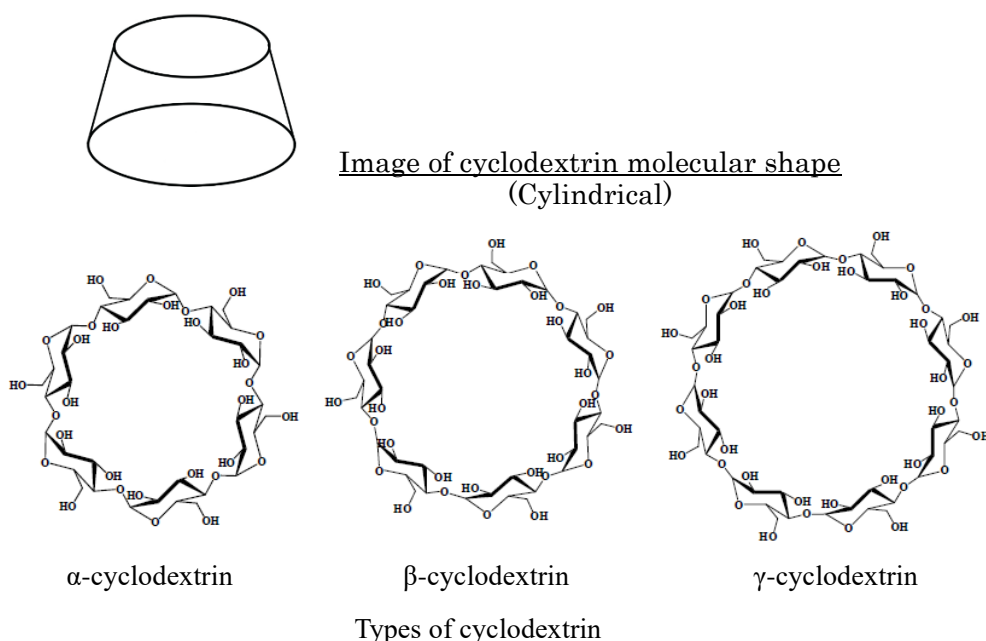


Fig. 4-1 Structure of cyclodextrins

第二節 スペーサー部分の構造がエナンチオ分離特性に与える影響

第二章で、キラルセクター部分の構造が同じであっても、キラルセクターと担体とを結合するスペーサーの構造が異なれば、エナンチオ分離能に有意差が生じる可能性がある事を示した。シクロデキストリン形キラル固定相においても、スペーサーの構造がエナンチオ分離能に影響を与えるという報告がなされている^{45),46)}。従って、新規キラル固定相の設計において、キラルセクターとしてのシクロデキストリン誘導体と担体とを結合するスペーサー部分の構造を変えれば、分離性能の更なる向上も期待できる。

本章では、分岐鎖 β -シクロデキストリンを用いて、スペーサー部分に糖鎖を使用した新たなキラル固定相の設計を試みた。分岐鎖 β -シクロデキストリンは、複数のグルコースが α -1,6グリコシド結合を介してシクロデキストリン環に結合した分岐構造を持ち、水溶性が高く水に溶解し難い成分を溶解する能力を示すため、マスキング等の用途に用いられている⁵⁶⁾。末端にカルボキシル基を有する分岐鎖 β -シクロデキストリン（グルクロニルグルコニック- β -シクロデキストリン）をキラルセクターとして、これをアミノプロピルシリカゲルのアミノ基にアミド結合で連結させたキラル固定相（CSP-4、Fig. 4-2）を作製した。CSP-4はスペーサー部分に糖鎖をもつが、このような構造のシクロデキストリン形固定相は報告例がないので、その分離特性を従来型の固定相と比較・評価した。

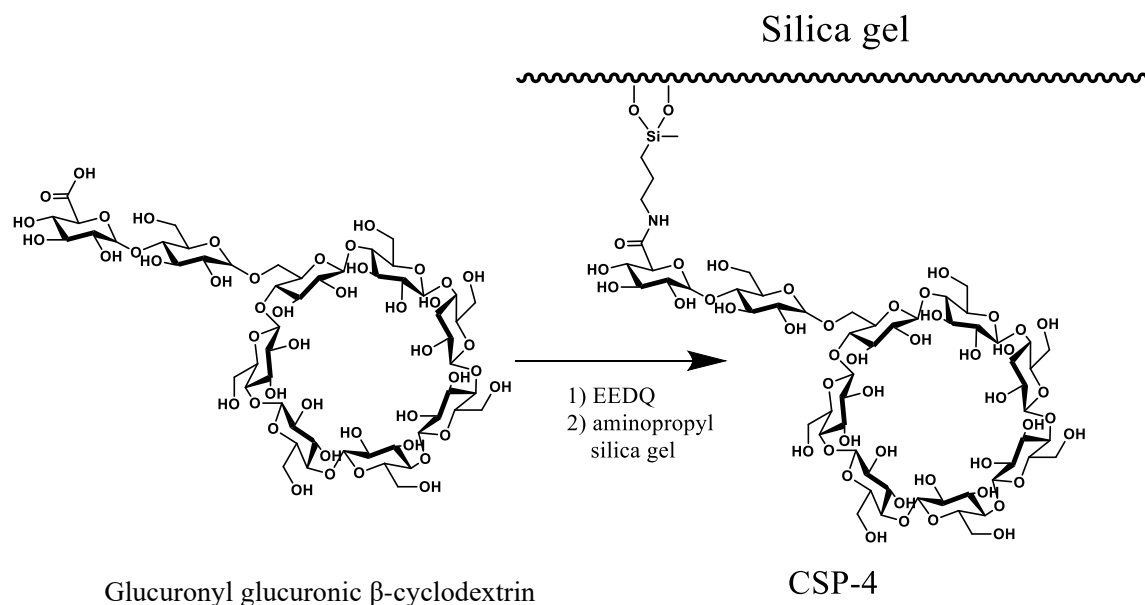


Fig. 4-2 Preparation scheme of CSP-4

CSP-4 と性能を比較するためにアルキル鎖をスペーサーとした市販のシクロデキストリン形固定相 (CSP-4C) を用いた。糖鎖をスペーサーとした CSP-4 とアルキルスペーサーの CSP-4C は、 β -シクロデキストリンの構造は同じで、スペーサー部分の構造のみが異なる。そのため、両者のエナンチオ分離特性を比較すればスペーサー部分の影響が考察できる。Fig. 4-3 に示す 5 種のキラル化合物を試料として、CSP-4 及び CSP-4C の分離能を比較した結果を Table 4-1 に示す。また、*N*-ダンシルバリン、フラバノン、シクロペントラートの比較クロマトグラムを Fig. 4-4 に示す。

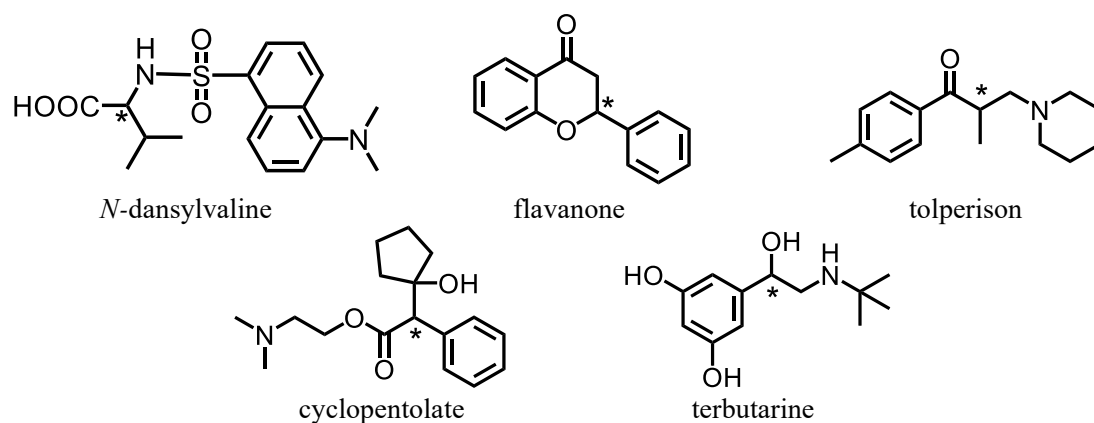


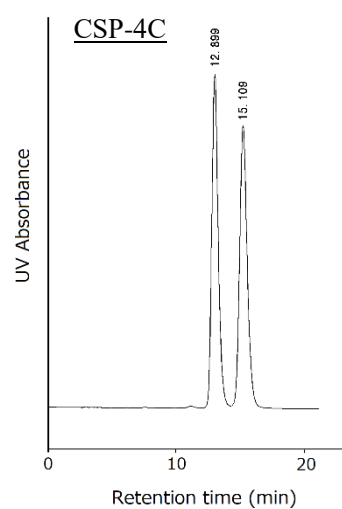
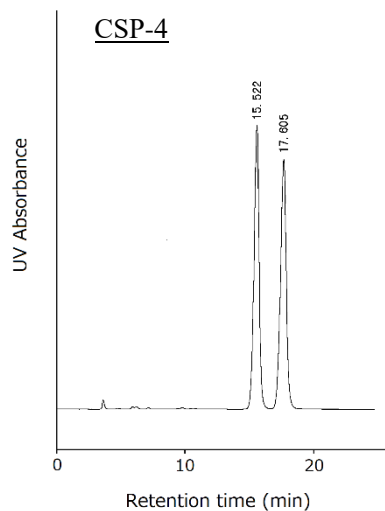
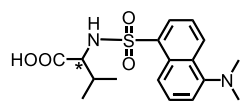
Fig. 4-3 Structure of racemates as analyte

Table 4-1 Comparison of enantiomeric separation ability between CSP-4 and CSP-4C

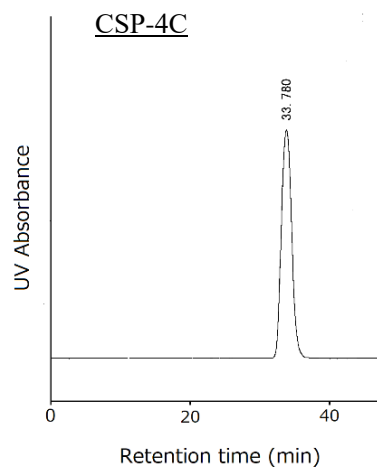
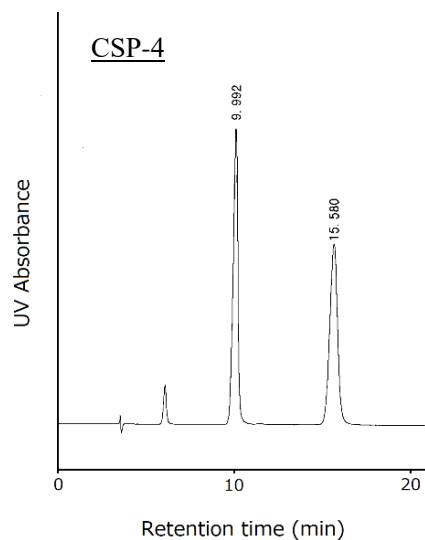
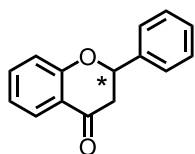
Compounds	CSP-4		CSP-4C	
	k_1	α	k_1	α
<i>N</i> -dansylvaline	2.29	1.19	2.91	1.23
flavanone	1.73	1.88	9.24	1.00
torperison	1.45	1.15	2.37	1.17
cyclopentolate	0.94	1.33	4.47	1.21
terbutaline	2.11	1.17	10.85	1.19

Mobile phase : acetonitrile/20 mmol/L KH_2PO_4 in water (30/70, v/v)

(a) *N*-dansylvaline



(b) flavanone



(c) cyclopentolate

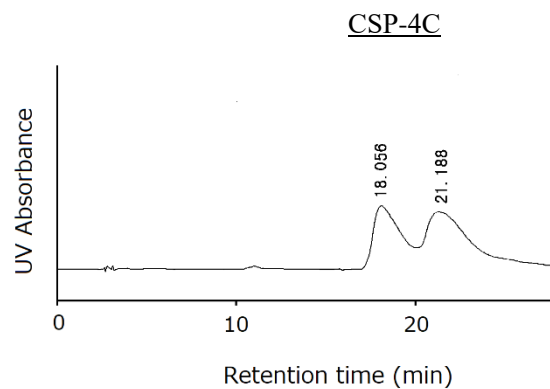
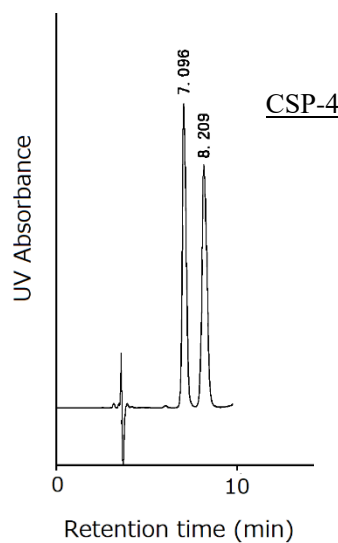
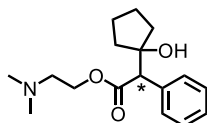


Fig. 4-4 Comparison of chromatograms between CSP-4 and CSP-4C
Mobile phase : acetonitrile/20 mmol/L KH_2PO_4 in water (30/70, v/v).

中性化合物のフラバノンの場合には、CSP-4 では非常に大きな分離係数が得られたが、CSP-4C では分離できず、両者の間でエナンチオ分離能に大きな差が認められた。分子内にカルボキシル基をもつ *N*-ダンシルバリンや第三級アミノ基を有するトルペリゾン、シクロペントラート及びテルブタリンでは、両者で同等の分離係数が得られた。しかし、Fig. 4-4 のシクロペントラートのクロマトグラムを比較すると、CSP-4 は良好なピーク形状であるが、CSP-4C の場合はテーリングが大きくなった。トルペリゾンとテルブタリンのクロマトグラムも同様であった。また何れの化合物も、同じ組成の移動相で測定すると、CSP-4C より CSP-4 の方が保持時間は短かかった。CSP-4 と CSP-4C のキラルセクターは β -シクロデキストリンであるが、担体と結合するスペーサー部分の構造のみが異なるので、エナンチオ分離能やピーク形状の差異はスペーサー部分の構造に起因すると考えられる。その要因は以下の様に考察される。

まず、エナンチオ分離能自体が向上する点に関しては、スペーサーの糖鎖部分がキラル識別に関与しているためと推察される。但し、その効果は、対象化合物の構造によって異なり、分離能の向上が顕著に認められる場合と、有意の差が無い場合があった。

次に塩基性化合物のテーリングが抑えられる点であるが、その要因の 1 つとして、極性の高い糖鎖スペーサーが、サンプルと担体シリカゲルのシラノール基との相互作用（水素結合）を抑制している可能性が考えられる。類似の現象として極性基内包形（embed 形）の逆相固定相の例が挙げられる。逆相固定相を使用した場合には、塩基性化合物と担体シラノール基との相互作用によりしばしばテーリングする。極性基内包形固定相は、担体シリカゲルと疎水性アルキル鎖の間にアミド結合等の極性基を挿入した固定相であるが、通常の逆相カラムと比べて塩基性化合物のテーリングが抑制されるという報告がある⁵⁷⁾。これは、担体近傍の極性基効果と考えられるが、CSP-4 におけるスペーサーの糖鎖が、これと同様の効果を発現していると推察している。

この様に、シクロデキストリン形キラル固定相においても、スペーサー部分の構造に依存してエナンチオ分離特性やピーク形状が変化する事が確認できた。これは第二章の知見と相関性がある。スペーサーに糖鎖を導入する事で、従来から知られている β -シクロデキストリン形キラル固定相の性能を向上させ、実用的に優れたキラル固定相を設計する事ができた。

第三節 スペーサーに糖鎖を有するシクロデキストリン形キラル固定相を用いたアプリケーション

第一項 キラル医薬品の分離

一般に、シクロデキストリン形キラル固定相は、逆相系の移動相と組み合わせたキラル分離が可能である。逆相系移動相は順相系に比べて環境負荷が低く、高極性化合物が多い医薬品の分離に適している。CSP-4も標準的な移動相として、酸性リン酸緩衝液とアセトニトリル又はメタノールの混合液を使用する。前項で示した様に、CSP-4は骨格筋弛緩剤として使用されるトルペリゾンや散瞳薬シクロペントラートのキラル分離に有効であるが、他にも様々なキラル医薬品の分析に適用できる。例えば、血圧降下薬・利尿薬として使用されるクロルタリドン、抗ヒスタミン薬のクロルフェニラミン、非ステロイド系抗炎症薬のイブプロフェン、クリダナク、ナプロキセン等である。CSP-4は分子内に芳香環を有する多くのキラル薬物の分離に有効であるが、分離したキラル化合物の構造から考察すると、カルボキシル基を持った酸性化合物や中性の芳香族化合物のキラル分離に適している。CSP-4を用いたクロルタリドンとクリダナクのクロマトグラムをFig. 4-5に示す。

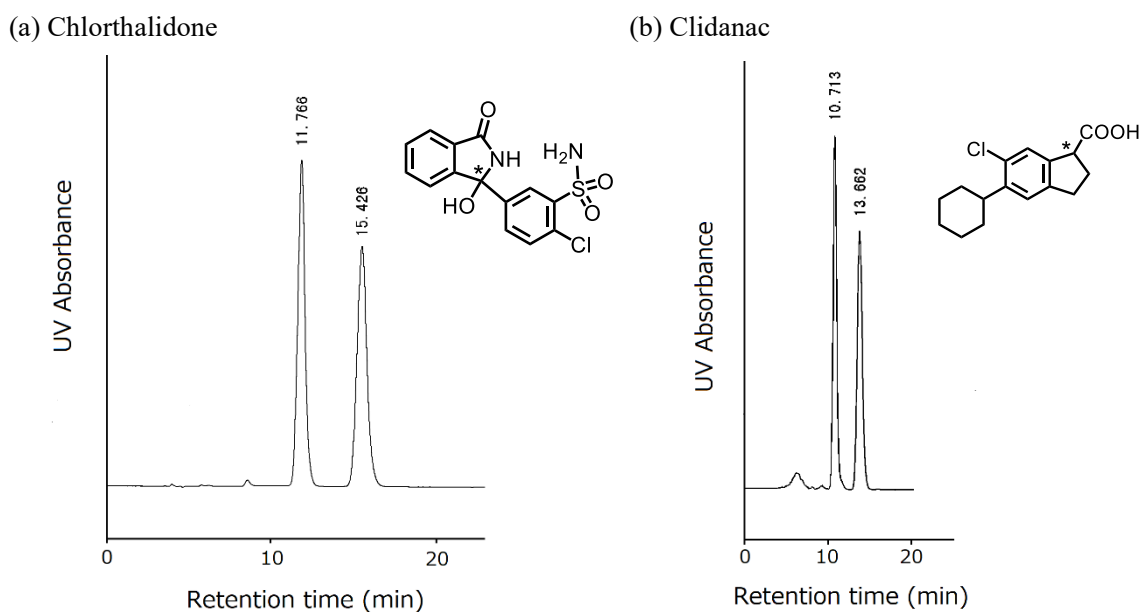


Fig. 4-5 Chromatograms of chlorthalidone and clidanac using CSP-4

Mobile phase : (a) acetonitrile/20 mmol/L phosphate buffer (pH 3.0) (20/80, v/v), (b) acetonitrile/20 mmol/L phosphate buffer (pH 3.5) (70/30, v/v).

CSP-4 は市場に提供しているが、既に CSP-4 を使用したキラル及びアキラル分析法が多数報告されている。例えば、イソフラボン誘導体⁵⁸⁾、エピカテキン⁵⁹⁾、グラブリジン⁶⁰⁾、エピセサミン⁶¹⁾、等の分析である。これらのうち、エピカテキンは、フラボノイドの一種で茶の渋み成分であるカテキンの異性体、グラブリジンはメラニン合成抑制効果があると言われる甘草由来のイソフラボン誘導体である。前項で、CSP-4 はフラバノンの分離において非常に大きな分離係数が得られる事を示したが、このような文献報告例から考察すると、CSP-4 はフラボノイド系のキラル化合物に対して特異的に優れたエナンチオ分離能を示すと考えられる。フラボノイドは、Fig. 4-6 に示すフラバンを基本骨格とする植物二次代謝物の総称で、これがフェノール性水酸基で修飾された化合物はポリフェノールの一種である。フラボノイド類には、抗炎症、抗酸化、抗アレルギー、アンチエイジング等の多彩な生物活性が認められているが、不斉炭素をもつキラル化合物が多く、その立体異性体間の生理物性の違いに関する研究も行なわれている。

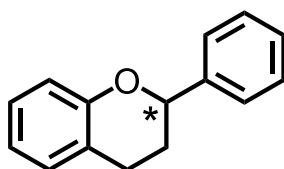


Fig. 4-6 Basic chemical structure of flavonoids (flavan)

第二項 アキラル化合物の分析

シクロデキストリンは様々な化合物をその空孔に包接する特性を示す事から、クロマトグラフィーのリガンドとして、キラル分析ばかりでなくアキラル分析にも活用されてきた。シクロデキストリン形固定相をアキラル分析に使用する場合は、逆相系の固定相として汎用される ODS カラムとは分離の選択性が異なるため、ODS が不得意とする構造異性体等の分離に利用されている。

CSP-4 もベンゼン二置換体等の位置異性体分離に有効である。Fig. 4-7 に CSP-4 を用いた馬尿酸とその *o*-、*m*-、*p*-メチル置換体の分離例を示す。メチル馬尿酸の異性体は ODS カラムでも分離できる⁶²⁾ が、シクロデキストリン形固定相と ODS では分離選択性が異なり、異性体の溶出順が変化する。また ODS では、*m*-体と *p*-体の保持時間が近く分離が不十分となる場合があるが、CSP-4 では各異性体が均等な保持時間で分離される。従って CSP-4 はアキラルな分析において、ODS カラムで分離不十分な場合の選択肢として有効である。

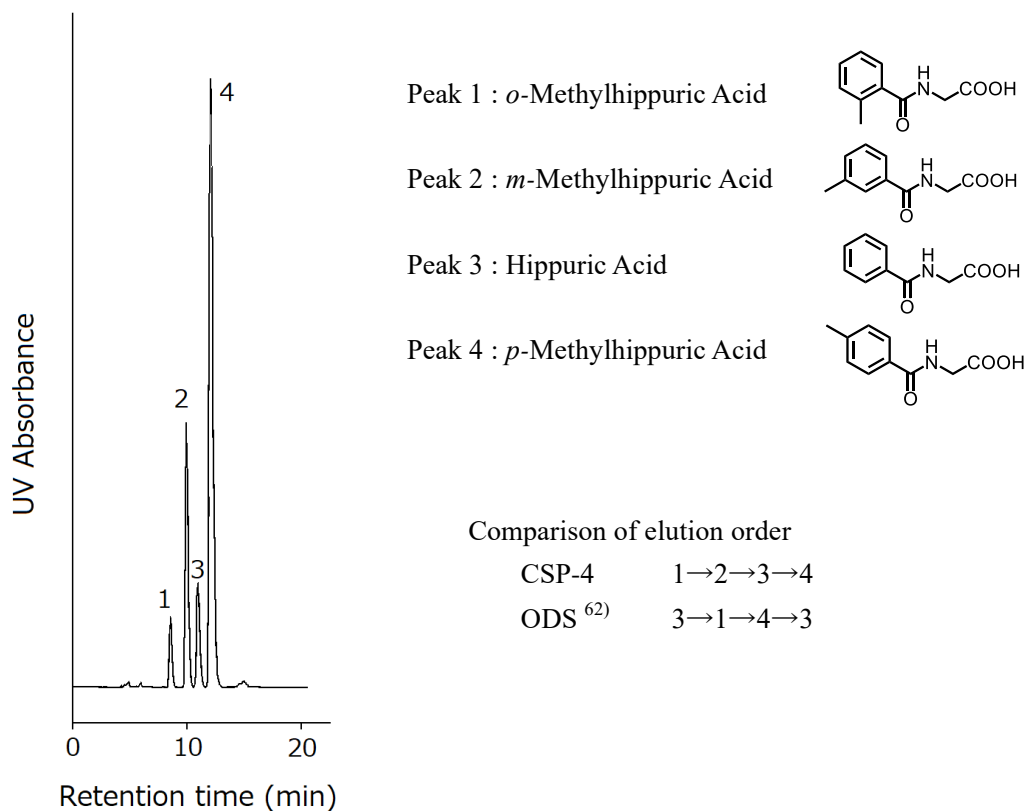


Fig. 4-7 Chromatograms of hippuric acid and methyl hippuric acids using CSP-4
Mobile phase : methanol/water/acetic acid (70/30/1.5, v/v/v).

CSP-4 のアキラル分析への応用例として、フルオラスタグ化合物の分離も挙げる事ができる^{63),64)}。フルオラスケミストリーは、コンビナトリアルケミストリーの分野で注目されている技術の1つで、フッ素を含む置換基（フルオラスタグ）を導入した化合物が、フッ素系溶媒に選択的に溶解・抽出される事を利用して反応・精製する手法である。CSP-4 を使用すれば、鎖長の異なるフルオラスタグを導入した化合物を、良好に分離・分析できる事も報告されている^{63),64)}。

第四節 小 括

β -シクロデキストリン誘導体をキラルセクターとするキラル固定相において、スペーサー部位に糖鎖を導入した新規化学結合形キラル固定相（CSP-4）を設計し、そのエナンチオ分離特性を評価した。その結果、従来のアルキル鎖スペーサーで連結された β -シクロ

デキストリン形固定相と比べて、ピーク形の向上の他、エナンチオ分離能自体の向上が認められる場合が確認できた。これは、スペーサー部分の糖鎖の効果と考察している。CSP-4は、キラルなフラボノイド類に対して、特に優れた分離能を示した。その他、酸性から中性の様々な芳香族キラル医薬品分離への適用も可能であった。またアキラルな分析法への適用例も示した。

第五章 水酸基をアセチル化した新規シクロデキストリン形キラル固定相

第一節 緒言

前章で、 β -シクロデキストリンをキラルセクターとしてスペーサー部分と糖鎖で連結した CSP-4 が、従来のシクロデキストリン形キラル固定相とは分離特性が異なる事を示した。一方で、第一級及び第二級キラルアミンの場合には十分な分離能が得られない場合もあった。

シクロデキストリン形キラル固定相では、シクロデキストリン環水酸基を化学修飾すればエナンチオ分離能が変化する事が知られていて、水酸基をメチル化やフェニルカーバメート化したタイプの固定相が市販されている⁶⁵⁾。水酸基をアセチル化した固定相も報告されており^{66),67)}、一部のアミン化合物の分離例もある。しかし、多くのキラルアミン類に対する系統的な分離特性は報告されていない。キラルアミンには、医薬品やその中間体、カテコールアミン等の生物活性物質、光学分割剤等多くの重要な化合物が含まれている。本章では、分離対象化合物の範囲の拡大、特にキラルアミン化合物を分離対象として、CSP-4 と基本骨格は同じでシクロデキストリンの水酸基をアセチル化した新規キラル固定相 CSP-5 (Fig. 5-1) を設計し、両者のエナンチオ分離特性を比較した。更に、第一級キラルアミンに対する分離特性を、クラウンエーテル形キラル固定相 (CSP-3) と比較した。

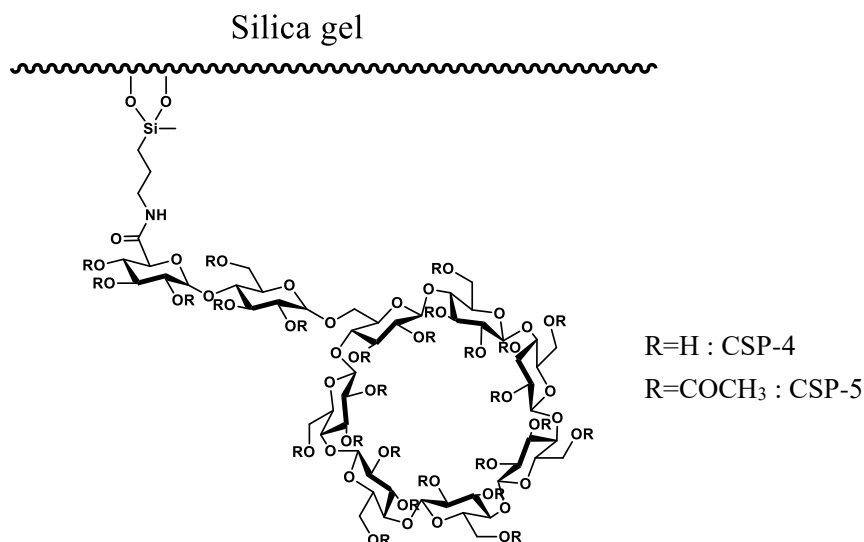


Fig. 5-1 Structure of acetylated β -cyclodextrin chiral stationary phase (CSP-5)

第二節 水酸基のアセチル化がエナンチオ分離特性に与える影響

性能評価に用いた化合物の構造を Fig. 5-2 に示す。化合物 **1**~**11** が第一級アミンとアミノアルコール、化合物 **12**~**15** が第二級アミンとアミノアルコール、化合物 **16**~**18** がアミノ酸、そして化合物 **19**~**22** が中性化合物（第三級アミンを含む）である。

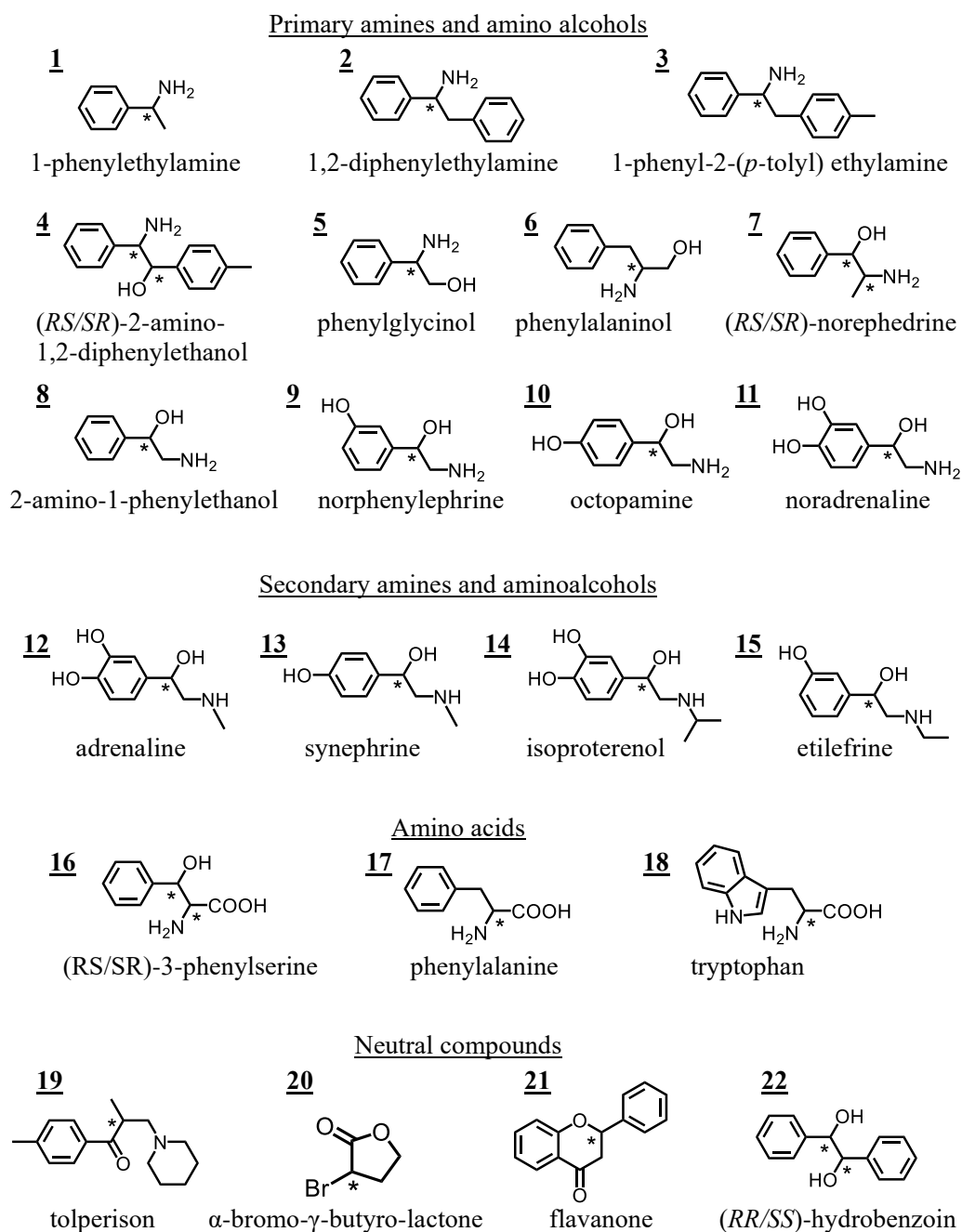


Fig. 5-2 Structure of racemates as analyte

これらのキラル化合物を、同じ移動相を用いて CSP-4 と CSP-5 の保持係数と分離係数を比較した結果を Table 5-1 に示す。また化合物群ごとに、分離係数 1.1 以上で分離した化合物の割合を Table 5-2 にまとめて示す。

Table 5-1 Comparison of enantiomeric separation ability between CSP-4 and CSP-5

No	Compounds	CSP-4		CSP-5		Mobile phase
		k_I	α	k_I	α	
(Primary amine and aminoalcohol)						
1	1-phenylethylamine	0.07	1.00	1.31	1.21	a
2	1,2-diphenylethylamine	0.44	1.18	2.98	1.64	c
3	1-phenyl-2-(<i>p</i> -tolyl)ethylamine	0.77	1.10	3.50	1.34	c
4	(RS/SR)-2-amino-1,2-diphenylethanol	0.59	1.20	3.68	1.81	b
5	phenylglycinol	0.03	1.00	0.67	1.29	d
6	phenylalaninol	0.68	1.00	5.18	1.11	d
7	(RS/SR)-norephedrine	0.58	1.00	3.52	1.24	a
8	2-amino-1-phenylethanol	0.27	1.00	2.16	1.23	d
9	norphenylephrine	0.57	1.00	2.71	1.43	e
10	octopamine	0.78	1.00	1.53	1.21	e
11	noradrenaline	0.35	1.00	0.69	1.38	e
(Secondary amine and aminoalcohol)						
12	adrenaline	0.48	1.00	0.98	1.32	e
13	synephrine	0.94	1.00	2.05	1.21	e
14	isoproterenol	0.62	1.00	1.23	1.27	e
15	etilefrine	2.03	1.05	4.27	1.49	e
(Amino acid)						
16	(RS/SR)-3-phenylserine	0.44	1.00	0.85	1.00	e
17	phenylalanine	0.92	1.00	2.94	1.07	e
18	tryptophan	1.29	1.00	5.03	1.13	e
(Neutral compound)						
19	tolperison	2.00	1.26	3.83	1.00	f
20	α -bromo- γ -butyrolactone	0.58	1.00	4.37	1.06	g
21	flavanone	0.64	2.22	1.39	1.00	i
22	(RR/SS)-hydrobenzoin	4.58	1.28	6.29	1.40	h

Mobile phase : a) methanol/ 20 mmol/L phosphate buffer (pH 3.0) (2/98, v/v), b) methanol/ 20 mmol/L phosphate buffer (pH 3.0) (5/95, v/v), c) methanol/ 20 mmol/L phosphate buffer (pH 3.0) (40/60, v/v), d) 20 mmol/L phosphate buffer (pH 3.0) , e) 20 mmol/L KH₂PO₄, f) methanol/20 mmol/L ammonium acetate (60/40, v/v), g) methanol/water (50/50, v/v), h) methanol/water (30/70), i) acetonitrile/water (40/60, v/v).

Table 5-2 Summary of comparison of enantiomeric separation ability between CSP-4 and CSP-5

	Number of investigated compounds	Number of separated compounds at $\alpha > 1.07$	
		CSP-4	CSP-5
Primary amine and aminoalcohol	11 (No. 1 - No. 11)	3 (27 %)	11 (100 %)
Secondary amine and aminoalcohol	4 (No. 12 - No. 15)	0 (0 %)	4 (100 %)
Amino acid	3 (No. 16 - No. 18)	0 (0 %)	2 (67 %)
Neutral compound	4 (No. 19 - No. 22)	3 (75 %)	1 (25 %)

The mobile phase of each sample is shown in the Table 5-1.

※ Table 5-1 及び Table 5-2 は、公表主論文 2) Nishioka R., et al., *Chromatography*, **37**, 65-71 (2016)からデータを転載した。

CSP-5 では評価した 15 化合物すべての第一級及び第二級アミンの分離係数は 1.07 以上であったが、CSP-4 の場合は分離係数 1.07 以上を示した化合物は 3 化合物のみであった。アミノ酸も同様の傾向を示した。しかし中性キラル化合物は逆の傾向を示し、CSP-4 の方が分離係数の高い化合物が多かった。両者のエナンチオ分離特性の違いが明確な典型的クロマトグラムを Fig. 5-3 に示す。

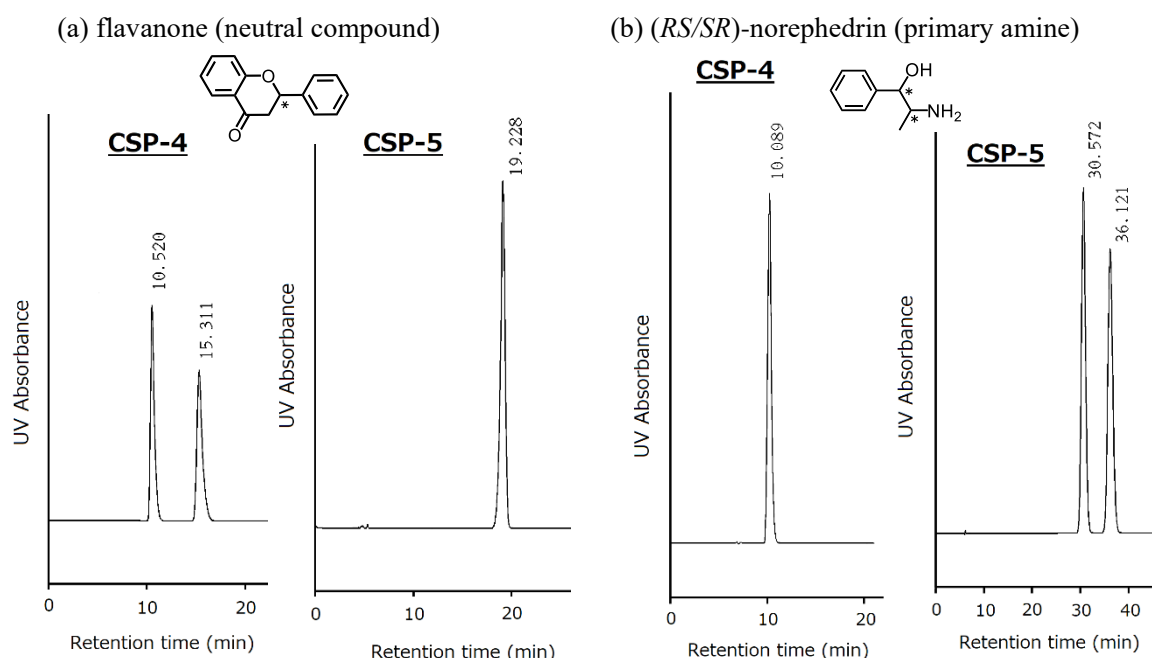


Fig. 5-3 Comparison of chromatograms between CSP-4 and CSP-5

Mobile phase : (a) acetonitrile/water (40/60, v/v), (b) methanol/20 mmol/L phosphate buffer (pH 3.0) (2/98, v/v).

CSP-4 と CSP-5 の固定相の化学構造の違いは、シクロデキストリン環水酸基のアセチル化の有無のみであるにも関わらずエナンチオ分離特性は大きく相違していた。CSP-5 は CSP-4 に比べて、キラルアミンに対して汎用的に優れた分離能を示す。またキラルアミンに対する保持時間を比較すると、CSP-4 より CSP-5 の方が保持が強くなる傾向が認められた。従って固定相と試料のキラルアミンとの間の相互作用は CSP-5 の方が強いと考えられる。シクロデキストリン形キラル固定相の分離メカニズムは、試料とのエナンチオメリックなホストゲスト相互作用に依存するが、シクロデキストリン環表面と試料との水素結合が保持とエナンチオ分離に関与していると考察した。水酸基やアミノ基は水素結合のドナーとなるため、シクロデキストリン環の表面に多くの水酸基が存在すると、試料アミノ基との水素結合は強く発現しない。一方、水酸基がアセチル化されると水素結合のアクセプターが増加するため、アミノ基との間で水素結合が強く発現して保持・分離に関与し、シクロデキストリンとのホストゲスト相互作用を増強していると考えている。

これらの結果は、シクロデキストリン水酸基の化学修飾がエナンチオ分離特性に大きな影響を与える事を示している。対象化合物の構造によって、最適のキラル固定相を選択する事が重要である。

更に、試料として使用したアミノアルコールの化学構造と CSP-5 のエナンチオ分離特性について考察した。構造の類似した 4 種のキラルアミノアルコール誘導体に対する CSP-5 の分離係数を Fig. 5-4 に再掲する。

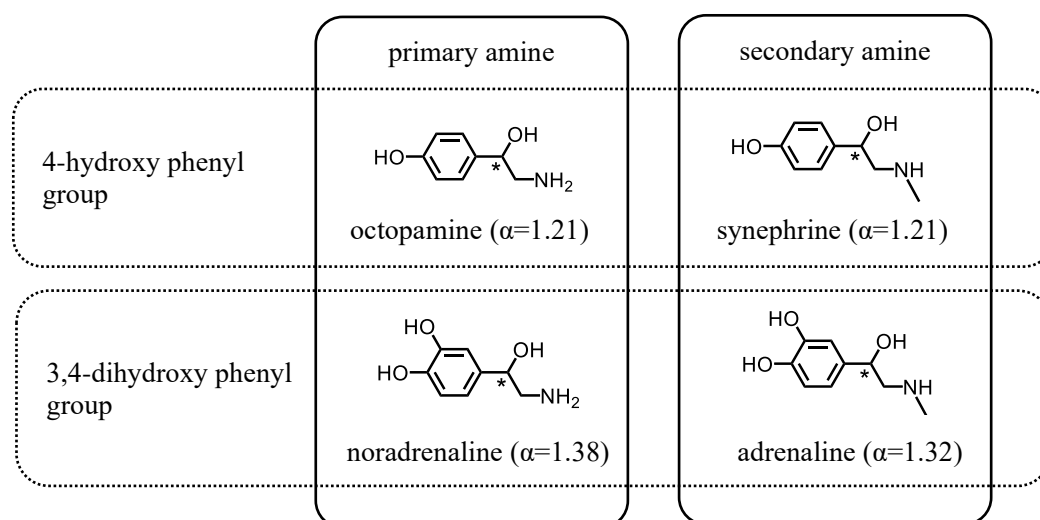


Fig. 5-4 Enantiomeric separation ability of CSP-5 for amino alcohols of similar structure
Mobile phase : 20 mmol/L KH_2PO_4 (same data as Table 5-1).

オクトパミンとシネフリンは、他の部分の構造が同じ第一級アミンと第二級アミンであるが分離係数は同じであった。ノルアドレナリンとアドレナリンも同様の関係で分離係数に大きな差は認められなかった。これらの結果から、キラルアミノアルコールにおいて、アミノ基が第一級か第二級であるかは、CSP-5 のエナンチオ分離能に大きくは影響しないと考えられる。一方、オクトパミンとノルアドレナリンはともに第一級アミンであるが、フェニル基に置換した水酸基を複数もつカテコール構造 (3,4-ジヒドロキシ体) を有するノルアドレナリンの分離係数が有意に大きくなった。同様に第二級アミンのシネフリンとアドレナリンの比較でもカテコールアミンであるアドレナリンの分離係数が大きかった。キラルアミノアルコールにおいては、フェニル基の置換基がエナンチオ分離能に影響する事が示唆される。シクロデキストリン形固定相では、ゲストのフェニル基部分がホストのシクロデキストリン空孔に包接されると考えられているが、今回の実験結果もこれを支持している。

第三節 水酸基アセチル化シクロデキストリン形キラル固定相を用いたアプリケーション

第一項 キラルアミン及びアミノアルコールの分離

CSP-5 は不斉炭素近傍にアミノ基を持った芳香族キラルアミンやアミノアルコール化合物に対して、汎用的に優れた分離能を示す事が明らかになった。アミン類には、キラル分離の必要性の高い重要な化合物が多く、CSP-5 はその分析法開発の手段として有用である。

Table 5-1 に示した化合物 **1**~**3** はキラル第一級アミン、化合物 **4**~**11** は第一級アミノ基を含むキラルアミノアルコールであるが、CSP-5 はこれら全ての化合物に対して良好なエナンチオ分離能を示した。第三章で述べた様に、キラル第一級アミンの分離には、クラウンエーテル形キラル固定相である CSP-3 も有効である。しかし、CSP-3 の場合、アミノアルコールの分離は順相系移動相を使用する必要があり、逆相系移動相では保持力が弱く分離が難しい場合が多い。それに対して CSP-5 は、逆相系移動相でキラル分離が可能であるため、分析設計が容易で環境負荷が低い条件を使って測定できる。

キラル第一級アミンのうち、1-フェニル-2-(*p*-トリル)エチルアミン (PTE) の光学活性体は、ジアステレオマー塩法による菊酸の光学分割用アミンとして使用される⁶⁸⁾。ピレスロイド系殺虫剤の酸成分である菊酸には複数の鏡像異性体が存在するが、異性体間でその効力が異なる。菊酸の光学分割剤である PTE は試薬としての光学純度検定が必要で、CSP-5

はその目的で使用できる。またノルエフェドリンは覚せい剤原料に指定されており、合成法の違いにより鏡像異性体比が異なるため、科学捜査分析では流通経路特定等の目的で光学純度が測定されている。ノルエフェドリンのキラル分離分析法としては、例えば、GC法⁶⁹⁾、キャピラリー電気泳動法⁷⁰⁾、順相 HPLC 法^{71),72)} 等多くの報告例がある。キラル HPLC 法で CSP-5 を使用するメリットとして、一般的によく用いられる逆相系移動相を使用できる点が挙げられる。逆相 HPLC 分析で汎用される ODS カラムと同様に、リン酸緩衝液とメタノールの混合液を移動相として使用するので分析操作が容易である。Fig. 5-5 に CSP-5 を用いたキラル第一級アミンとアミノアルコールのクロマトグラム例を示す。

(a) 1,2-diphenylethylamine (b) 1-phenyl-2-(*p*-tolyl)ethylamine (c) (*RS/SR*)-norephedrine

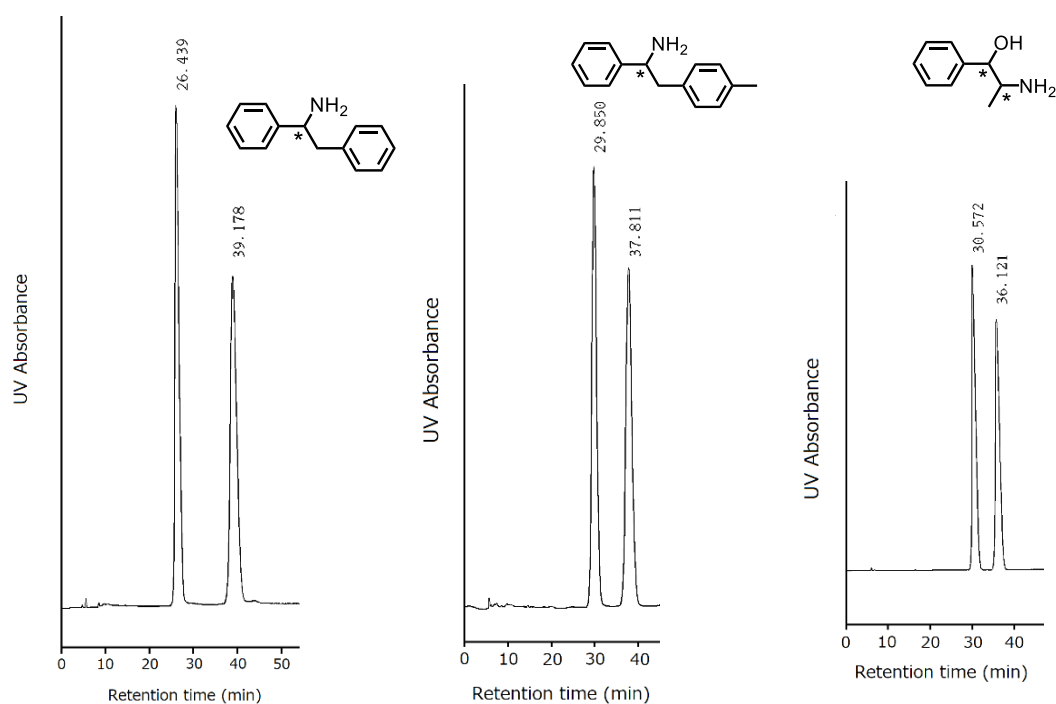


Fig. 5-5 Chromatograms of chiral primary amines using CSP-5

Mobile phase : (a)(b) methanol/ 20 mmol/L phosphate buffer (pH 3.0) (40/60, v/v), (c) methanol/ 20 mmol/L phosphate buffer (pH 3.0) (2/98, v/v).

CSP-5 は、第二級アミノ基を含むキラルアミノアルコールに対しても良好なエナンチオ分離能を示した。例えば、血管収縮薬や気管支拡張薬として用いられるアドレナリン、その関連化合物でβ作動薬のイソプロテレノールやメタプロテレノール、血管収縮剤のエチレフリン等のキラル分離に有効である。キラル第二級アミンは、クラウンエーテル形キラ

ル固定相では分離する事はできないので、CSP-5 はキラル第二級アミンのキラル分離メソッドを作成するための有力な選択肢となる。Fig. 5-6 に、アドレナリンとイソプロテレノールの分離クロマトグラム例を示す。

アミノアルコールのキラル分離には、シクロデキストリン形固定相以外に配位子交換型キラル固定相も有用であり、多くのキラル 2-アミノエタノール誘導体の直接分離が達成されている。しかし配位子交換型キラル固定相では、移動相に硫酸銅を添加するの必要があり、LC/MS に直接接続するには不向きである。シクロデキストリン形固定相は逆相系移動相が使用できるので、LC/MS への適用の観点で実用的に使いやすい。

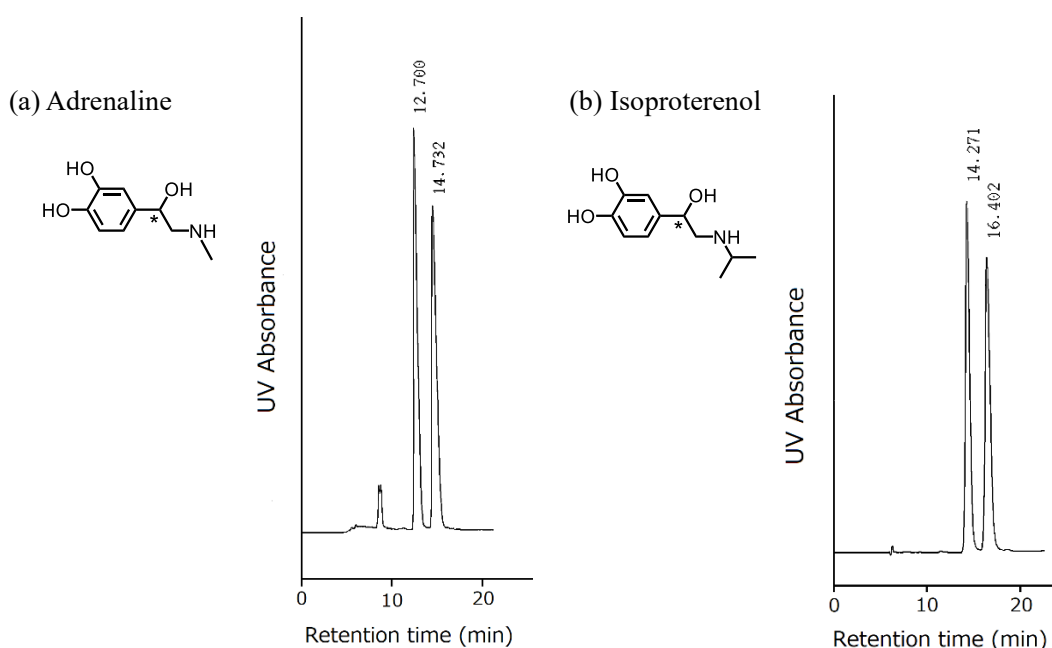


Fig. 5-6 Chromatograms of adrenaline and isoproterenol using CSP-5
Mobile phase : (a)(b) 20 mmol/L KH_2PO_4 .

第二項 移動相条件の影響

CSP-5 は、メタノールとリン酸緩衝液の混合液を標準的移動相として使用するが、ノルエフェドリンのキラル分離を例にして、移動相の最適条件を検討した。リン酸緩衝液の pH を変化させた時の保持係数と分離係数の変化を Fig. 5-7 に示す。

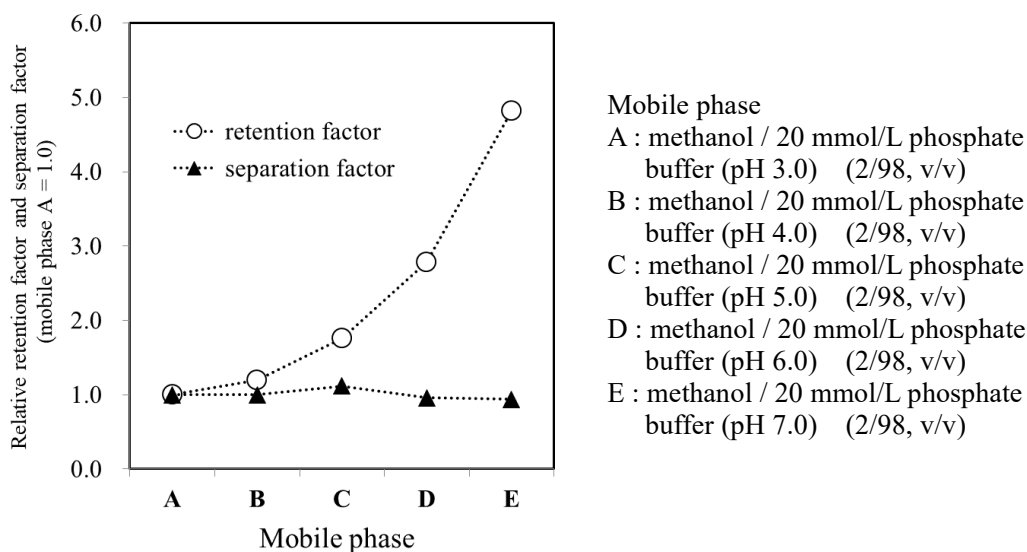


Fig. 5-7 Effect of pH in mobile phase on the separation of norephedrin using CSP-5

※ Fig. 5-7 は、公表主論文 2) Nishioka R., et al., *Chromatography*, **37**, 65-71 (2016)からデータを転載した。

Fig. 5-7 では、移動相 A (pH 3.0) の保持係数と分離係数を 1.0 とした時の各移動相における相対値をプロットした。その結果 pH 値の上昇に伴い保持時間が長くなったが、分離係数に大きな違いは見られなかった。pH 3.0 の酸性緩衝液の使用により、適度な保持時間と良好な形状ピークが得られた。またリン酸緩衝液の代わりに、酢酸アンモニウム水溶液を用いた場合も同等の分離が得られたため、CSP-5 は LC/MS に直結した分析にも適用できると考えている。

第三項 アキラルアミンの分析

シクロデキストリン形キラル固定相である CSP-5 は、CSP-4 と同様にキラル分離だけでなくアキラル分析にも利用できる。アキラルアミンの測定例として、不揮発性腐敗アミンのクロマトグラムを Fig. 5-8 に示す。不揮発性腐敗アミンは、食品が腐敗する際に微生物がアミノ酸から脱炭酸して生成するアミン類で、食中毒の諸症状を引き起こす可能性があるため迅速に分析する必要がある。CSP-5 を用いると不揮発性腐敗アミン 4 化合物（ヒスタミン、チラミン、2-フェネチルアミン、トリプタミン）が良好に分離された事から、高極性アミン化合物等のアキラル分析においてもカラム選択肢の 1 つとなる事が示唆された。

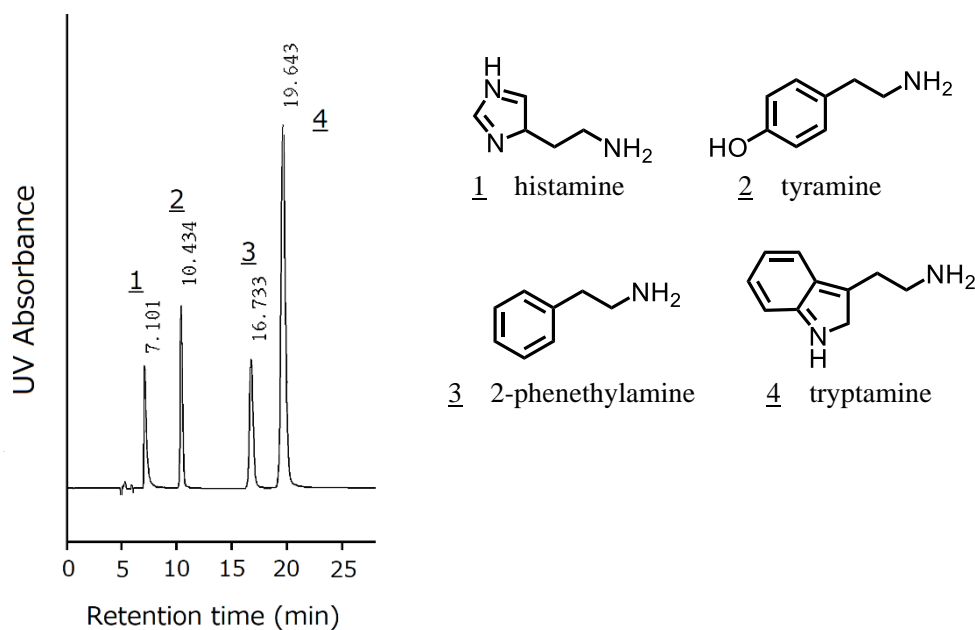


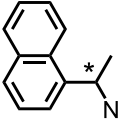
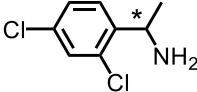
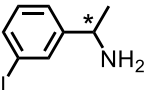
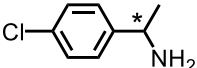
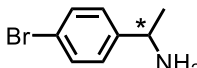
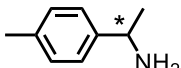
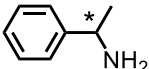
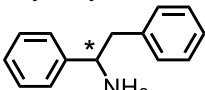
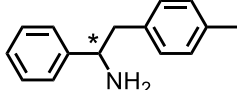
Fig. 5-8 Chromatogram of achiral putrefactive non-volatile amines using CSP-5
 Mobile phase : acetonitrile/20 mmol/L ammonium acetate aq. (75/25, v/v).

第四節 1-アリアルエチルアミン類の分離におけるクラウンエーテル形とシクロデキストリン形キラル固定相のエナンチオ分離特性の比較

第三章で述べたクラウンエーテル形キラル固定相 (CSP-3) と本章のアセチル化シクロデキストリン形キラル固定相 (CSP-5) は、何れも第一級アミノ基を有するキラルアミン類の分離に有効である。どちらも、ゲストアミンとキラルセクターの間のホストゲスト相互作用に基づいてキラル識別が達成されるが、その分離メカニズムは異なり使用する移動相の条件も変化する。キラルアミン類の分離メソッド開発の際に、分離対象化合物に適したキラル固定相を選択するための指標とする目的で、代表的なキラル第一級アミンである 1-アリアルエチルアミン類を使用してエナンチオ分離特性を比較した。Table 5-3 に試料とした 9 種類の 1-アリアルエチルアミン類の構造式と CSP-3 あるいは CSP-5 におけるそれぞれの分離係数と保持係数を示す。

※ Table 5-3 は、公表主論文 4) 西岡亮太. LC と LC/MS の知恵, 1, 41-49 (2020)からデータを転載した。

Table 5-3 Comparison of enantiomeric separation ability between CSP-3 and CSP-5

Compounds	CSP	k_1	α	Mobile phase	Elution order
1-(1-naphthyl)ethylamine	CSP-3	1.18	1.56	a	(S) – (R)
	CSP-5	1.15	1.00	d	
1-(2,4-dichlorophenyl)ethylamine	CSP-3	1.89	1.24	b	
	CSP-5	1.33	1.00	d	
1-(3-chlorophenyl)ethylamine	CSP-3	1.31	1.04	b	
	CSP-5	1.10	1.22	d	
1-(4-chlorophenyl)ethylamine	CSP-3	1.29	1.07	b	
	CSP-5	2.64	1.14	d	
1-(4-bromophenyl)ethylamine	CSP-3	1.86	1.05	b	
	CSP-5	4.75	1.11	d	
1-(<i>p</i> -tolyl)ethylamine	CSP-3	1.40	1.09	c	(S) – (R)
	CSP-5	0.92	1.11	d	(S) – (R)
1-phenylethylamine	CSP-3	0.76	1.09	c	(S) – (R)
	CSP-5	1.15	1.17	e	(S) – (R)
1,2-diphenylethylamine	CSP-3	1.29	1.00	a	
	CSP-5	1.58	1.78	f	
1-phenyl-2-(<i>p</i> -tolyl)ethylamine	CSP-3	2.12	1.00	a	
	CSP-5	1.84	1.42	f	(S) – (R)

Mobile phase : a) methanol/HClO₄ aq. (pH 1.8) (40/60, v/v), b) methanol/HClO₄ aq. (pH 1.8) (20/80, v/v), c) methanol/HClO₄ aq. (pH 1.8) (5/95, v/v), "HClO₄ aq" means perchloric acid aqueous solution adjusted to pH 1.8. d) methanol/phos aq. (pH 3.0) (30/70, v/v), e) methanol/phos aq. (pH 3.0) (4/96, v/v), f) methanol/phos aq. (pH 3.0) (50/50, v/v), "phos aq." means 20 mmol/L NaH₂PO₄ aqueous solution adjusted to pH 3.0 by adding H₃PO₄

CSP-3 と CSP-5 を比較すると、ゲストとなる 1-アリールエチルアミン類の置換基の違いで両者のエナンチオ分離特性は大きく異なる。CSP-3 は、1-(1-ナフチル)エチルアミンと 1-(2,4-ジクロロフェニル)エチルアミンに対して分離係数が 1.2 以上の優れた分離能を示したが、CSP-5 ではこれらの化合物は分子量の大きさの割に保持特性が小さくなり両者の分離能には大きな差が生じた。1-フェニルエチルアミンとそのモノ置換誘導体の場合は CSP-3 の分離係数は 1.1 未満で、1-アリールエチルアミンの 1 位置換基がモノクロロフェニル基とジクロロフェニル基で分離能に大きな差が認められた。逆に CSP-5 はこれらのアミン類で良好な分離能を示した。また、1-アリールエチルアミンの 2 位に更にアリール基を導入した 1,2-ジフェニルエチルアミンと 1-フェニル-2-(*p*-トリル)エチルアミンの場合は、CSP-3 では保持時間は長くなるが、この条件下でキラル分離は達成されず、1-アリールエチルアミン類 2 位への置換基導入は分離能の向上に寄与しないと考察される。しかし 1,2-ジフェニルエチルアミンと 1-フェニル-2-(*p*-トリル)エチルアミンを CSP-5 で分離すると、CSP-3 の結果とは逆に分離係数が 1.4 以上に達し、顕著に優れたエナンチオ分離能が示された。

CSP-3 と CSP-5 のエナンチオ分離特性の違いは、ホストゲスト相互作用の相違に起因すると考えられる。Fig. 5-9 にクラウンエーテルとシクロデキストリンの空孔サイズとゲスト分子の大きさのイメージ図を同縮尺で示した。18-クラウン-6 の空孔径は約 0.26~0.32 nm⁷³⁾ であり、CSP-3 のキラルセクターである擬 18-クラウン-6 も同程度と考えられる。クラウンエーテルはゲストのアンモニウム塩部位を包接してホストゲスト錯体を形成するが、CSP-3 では 1-アリールエチルアミン 1 位不斉炭素にジクロロフェニル基やナフチル基のような嵩高いアリール基が結合するゲストは、ホスト側フェニル基との立体障害により、鏡像異性体間でホストゲスト錯体の安定性に差異が生じ、その結果大きなエナンチオ分離能を示すと考えている。一方シクロデキストリン形固定相では、Fig. 5-4 のアミノアルコールの分離特性でも考察した様に、ゲストのアリール基を包接してホストゲスト錯体を形成すると考えられる。β-シクロデキストリンの空孔径は約 0.6~0.7 nm⁷⁴⁾ であるため、CSP-5 では、1-アリールエチルアミン 1 位の平面上に広がった芳香環の立体障害により、シクロデキストリン空孔にゲストを十分に取り込む事ができず、保持能力が低下するため十分なエナンチオ分離能が得られないと推察している。CSP-5 の場合、同じ移動相で 1-フェニルエチルアミン芳香環上に塩素を導入すると、1-(4-クロロフェニル)エチルアミンより 1-(2,4-ジクロロフェニル)エチルアミンの方が保持時間が短くなる事実もその根拠である。

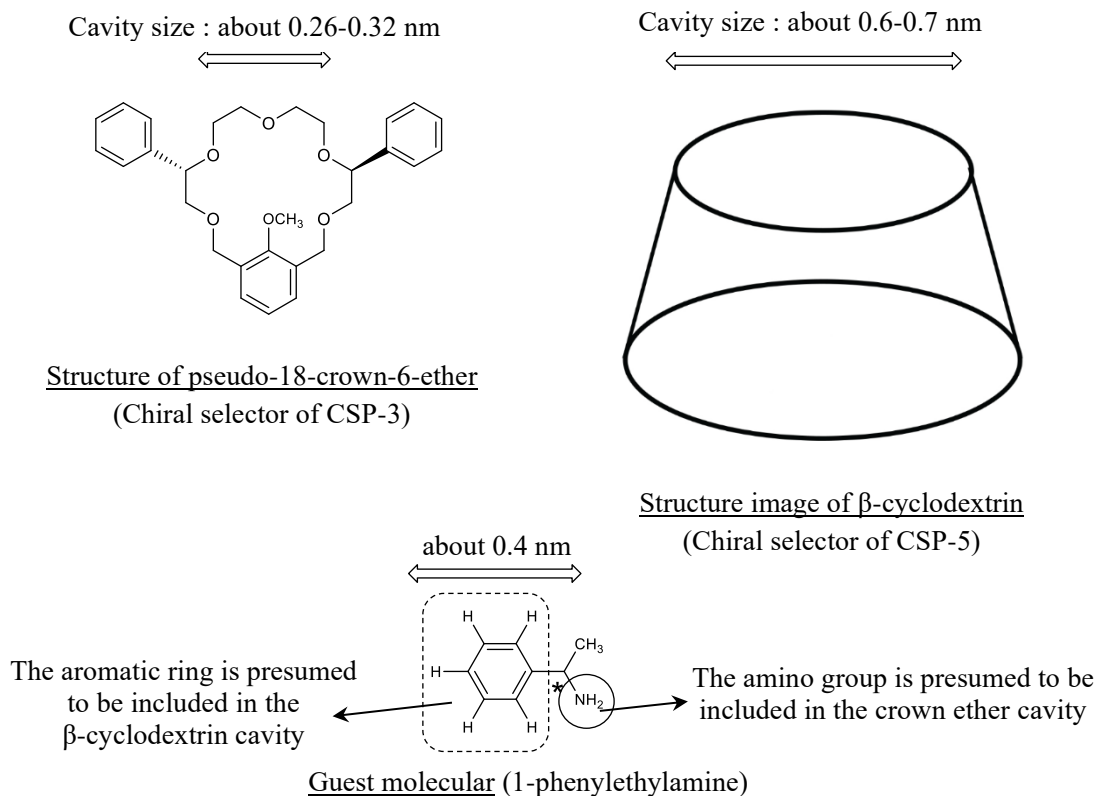


Fig. 5-9 Comparison of cavity size of 18-crown-6 ether and β -cyclodextrin and image of guest molecule size (described at the same scale)

次に光学活性体が市販されている化合物を用いて鏡像異性体の溶出順を確認した。CSP-3 と CSP-5 何れも 1-フェニルエチルアミンと 1-(*p*-トリル)エチルアミンは(*S*)体(*R*)体の順で溶出した。また、CSP-3 における 1-(1-ナフチル)エチルアミンと CSP-5 における 1-フェニル-2-(*p*-トリル)エチルアミンも(*S*)体が先に溶出した。これらの結果から、キラルアミン類の分離における鏡像異性体溶出順はともに同じ傾向を示すと考えられる。

以上 1-アリールエチルアミン類のキラル分離では、同じ化合物に対する CSP-3 と CSP-5 のエナンチオ分離特性に顕著な差が認められ、互いに相補的な分離能を示した。これはホストゲスト相互作用の相違に起因すると考えられる。前節までに述べた様に、CSP-5 は、カテコールアミン等のキラルアミノアルコールや第二級アミンのキラル分離も可能で、分離対象となるアミン化合物の種類が多くキラルアミン分離メソッド開発における主要な選択肢となる。しかし、第一級アミンでは対象化合物の化学構造に依存して CSP-3 の方が分離しやすい場合があるので、固定相の特性を考慮して選択する事で分離対象となるアミン

化合物範囲の拡大が期待される。それぞれの固定相を用いたキラル分離クロマトグラムを Fig. 5-10 に示す。

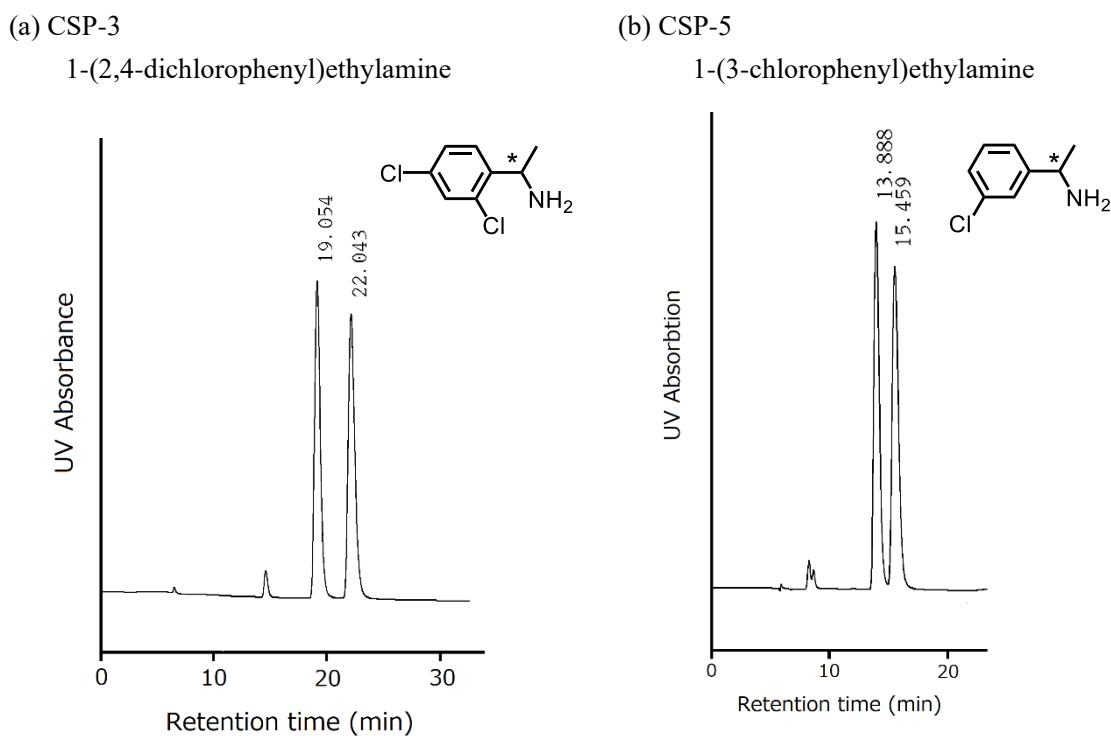


Fig. 5-10 Chromatogram of chiral 1-arylethylamines using CSP-3 and CSP-5

The mobile phases are shown in Table 5-3.

※ Fig. 5-10 は、公表主論文 4) 西岡亮太. LC と LC/MS の知恵, 1, 41-49 (2020)からデータを転載した。

第五節 小 括

β -シクロデキストリン誘導体をキラルセクターとするキラル固定相では、シクロデキストリンの水酸基の修飾の有無がエナンチオ分離特性に大きく影響を及ぼす事を見出した。未修飾(遊離水酸基をもつ)の固定相 CSP-4 は酸性から中性化合物の分離に有効であるが、アセチル化した固定相 CSP-5 はキラルアミンの分離に優れた性能を示す事が明らかになった。CSP-5 は、第一級、第二級アミンやアミノアルコール、アミノ酸等、分離対象となるアミン化合物の種類が多く、キラルアミンの分離メソッド開発におけるキラル固定相の主要な選択肢であると考えている。

1-アリアルエチルアミン類を試料とした、CSP-5 とクラウンエーテル形キラル固定相 CSP-3 のエナンチオ分離特性を比較したところ、試料置換基の違いにより分離特性も異なり、相補的な分離能を示す事が判った。これは両者ホストゲスト相互作用の違いに起因すると考えられるが、これらのキラル固定相分離特性を考慮して選択・使用する事で、キラルアミンの効果的分離メソッドの開発が可能となる。

第六章 コアシェルシリカを担体とする新規らせんポリマー形キラル固定相

第一節 緒言

前章までに様々な新規キラル固定相の開発と評価を行い、その結果、不斉炭素付近にアミノ基が導入された芳香族キラル化合物の多くは、その化学構造に依存する事なく、CSP-3あるいはCSP-5の何れかを用いればキラル分離できる事が明らかとなった。また、分子内にアミノ酸やカルボキシル基をもつキラル化合物は、その多くが既存のキラル固定相で分離できるが、アミノ基やカルボキシル基が共存しないキラル化合物は分離が難しい事が多い。本章では、アミノ基やカルボキシル基を持たない分離成功率が低いキラル化合物の分離を目的とした新規キラル固定相の設計を目指し、従来とは異なるキラルセクターとしてらせん状ポリ(ジフェニルアセチレン)誘導体に着目して検討した。

同時にコアシェルシリカを担体として適用した。コアシェルシリカとは、中心部に無孔性のコアがあり表面のみが多孔性素材の表面多孔性シリカ粒子で、HPLCカラムの優れた担体として注目されている^{75),76)}。その粒子構造のイメージをFig. 6-1に示す。

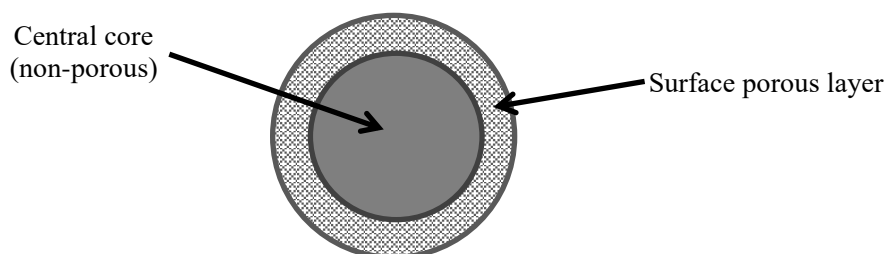


Fig. 6-1 Image diagram of core-shell silica support

コアシェル粒子は表面の多孔質層が薄いため、試料成分が粒子内に入り込み再び出てくるときの拡散距離が短くなる。その結果、全多孔性粒子よりもピークがシャープになり分離に要する時間を短縮できる。HPLCで分析時間を短縮する手法としては、粒径 $2\ \mu\text{m}$ 以下の微粒子担体を用いる超高速液体クロマトグラフィー(UHPLC)が実用化されている。しかし、粒径の2乗に反比例してカラム圧が上昇するため、微粒子担体を用いる場合は抗耐圧性専用装置が必要となる。コアシェル担体は、一般のHPLC装置で使用される程度の粒径($3\sim 5\ \mu\text{m}$)で分析時間を短縮できるため移動相溶媒の量も削減される。ODSカラム等の汎用カラムでは既にコアシェル担体が広く実用化され^{75),76)}、キラル固定相への適用も報告されている^{77),78)}が市販されているコアシェル形キラル固定相は少ない。本章では、

コアシェルシリカを担体とするらせんポリマー形キラル固定相の開発と評価について述べる。

第二節 試料の官能基に対するエナンチオ分離特性

らせん状ポリジフェニルアセチレン誘導体はMaedaらが開発した新しいタイプのキラルセクターで、HPLC用のキラル固定相として様々なキラル化合物の分離例が報告されている⁷⁹⁾⁻⁸⁰⁾。一方巻きのらせんポリマーそのものがエナンチオ分離能を示すが、らせんポリマーのペンダント分子の構成成分であるフェニル基に置換基を導入すると、置換基の構造によって分離特性が大きく変化する事が報告されている⁷⁹⁾。今回検討したのは、ポリジフェニルアセチレンのペンダントフェニル基 *p* 位のカルボキシル基を(*R*)-ナフチルエチルアミド誘導体に変換した新規キラルセクター (Fig. 6-2) である。このポリマーをコアシェルシリカ担体にコーティングしてキラル充填剤を調製した。

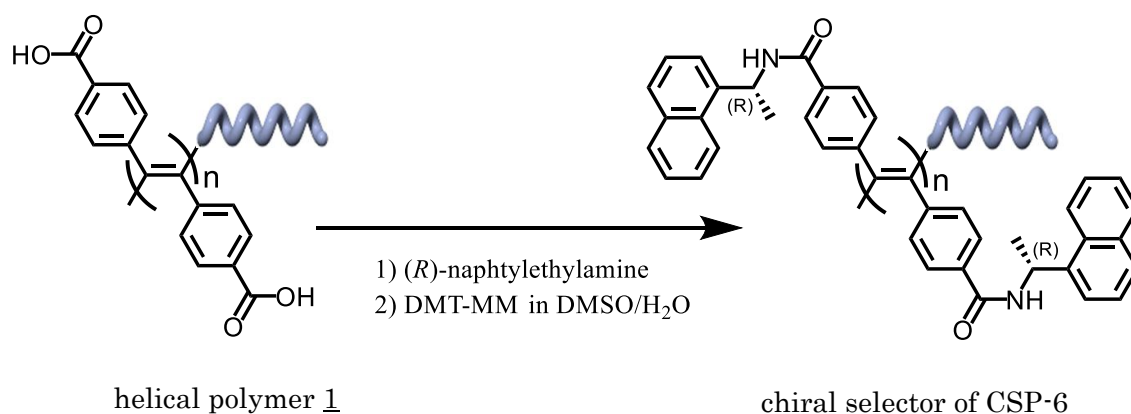


Fig. 6-2 Structure of chiral selector of CSP-6

ペンダント分子上の置換基が、(*R*)-ナフチルエチルアミドであるらせんポリマーのエナンチオ分離特性は報告されていないので、まず、試料の不斉炭素原子に結合した官能基のエナンチオ分離特性を、*n*-ヘキサン/2-プロパノール系の順相系移動相を用いて評価する事とした (Fig. 6-3)。

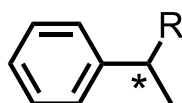


Fig. 6-3. The basic structure of ethylbenzene derivatives as analyte

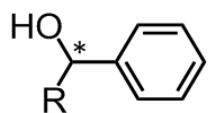
その結果、R = OH (1-フェニルエタノール) の場合に、 $\alpha = 1.60$ と大きな分離係数が得られ、R = COOH (2-フェニルプロピオン酸) でも分離係数は 1.24 を示した。しかし R がエステル基やニトリル基の場合には保持が十分ではなくキラル分離は不十分であった。また R が一級アミノ基の場合は、保持時間が非常に長くなり、1 本のブロードピークが観察された。これらの結果から、CSP-6 は試料官能基に対する特異性が高く、不斉炭素付近に水酸基をもつキラルアルコールに対して特に優れたエナンチオ分離能を示す事が示唆された。

第三節 らせんポリマー形キラル固定相を用いたアプリケーション

第一項 第二級キラルアルコールの分離

CSP-6 のキラルアルコールに対するエナンチオ分離特性を、置換基の異なる様々な構造の芳香族キラルアルコールを試料として評価した。先ず、不斉炭素上に水酸基をもつ芳香族第二級アルコールに対する分離特性を検討した。1-フェニルエタノールとその誘導体に対するエナンチオ分離能を Table 6-1 に、1-フェニルエタノールのフェニル基に置換基を導入した化合物に対する分離能を Table 6-2 に示した。

Table 6-1 Enantiomeric separation ability of CSP-6 toward aromatic secondary alcohols (1)

	Compound name	R	k_1	α
	1-phenylethanol	-CH ₃	1.58	1.60
	1-phenyl-1-propanol	-CH ₂ CH ₃	1.51	1.62
	1-phenyl-1-butanol	-CH ₂ CH ₂ CH ₃	1.65	1.17
	1-phenyl-1-pentanol	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	1.40	1.25

Mobile phase : 2-propanol/*n*-hexane (5/95, v/v)

※ Table 6-1 は、公表主論文 3) Nishioka R., et al., *Chromatography*, 40, 169-173 (2019) からデータを転載した。

Table 6-2 Enantiomeric separation ability of CSP-6 toward aromatic secondary alcohols (2)

	Compound name	R	k_I	α
	1-phenylethanol		1.58	1.60
	1-phenyl-2-propanol		1.24	1.44
	1-(<i>p</i> -tolyl)ethanol		1.14	1.21
	1-(4-chlorophenyl)ethanol		1.70	1.25
	1-(2-chlorophenyl)ethanol		1.35	1.42
	1-(3-chlorophenyl)ethanol		1.87	1.87
	1-(1-naphthyl)ethanol		2.03	1.30

Mobile phase : 2-propanol/*n*-hexane (5/95, v/v)

※ Table 6-2 は、公表主論文 3) Nishioka R., et al., *Chromatography*, **40**, 169-173 (2019)からデータを転載した。

CSP-6 は様々な芳香族第二級アルコールに対して、概ね分離係数 1.2 以上の優れた分離能を示す事が認められた。試料の化学構造とエナンチオ分離特性との関係を考察すると、1-フェニルエタノールに対しては非常に大きな分離係数を示したが、不斉炭素に結合するアルキル基の鎖長が長くなる程、あるいは、1-フェニルエタノールのフェニル基に置換基が導入されると、分離能が低下する傾向が認められた。但し、1-(3-クロロフェニル)エタノールは、例外的に 1-フェニルエタノールを上回る大きな分離係数が得られた。クロロフェニルエタノールは塩素原子の置換位置によって分離係数が大きく異なり、官能基の種類だけでなくその立体配置や配向性もエナンチオ分離特性に寄与すると考えられる。Table 6-1 と 6-2 に示した化合物以外では、シクロヘキサン環に水酸基を導入した第二級アルコールである *trans*-2-フェニル-1-シクロヘキサノールも大きな分離係数を示した。第二級キラルアルコールの分離クロマトグラム例を Fig. 6-4 に示す。

(a) 1-phenyl-1-propanol

(b) 1-phenyl-2-propanol

(c) 1-(3-chlorophenyl)ethanol

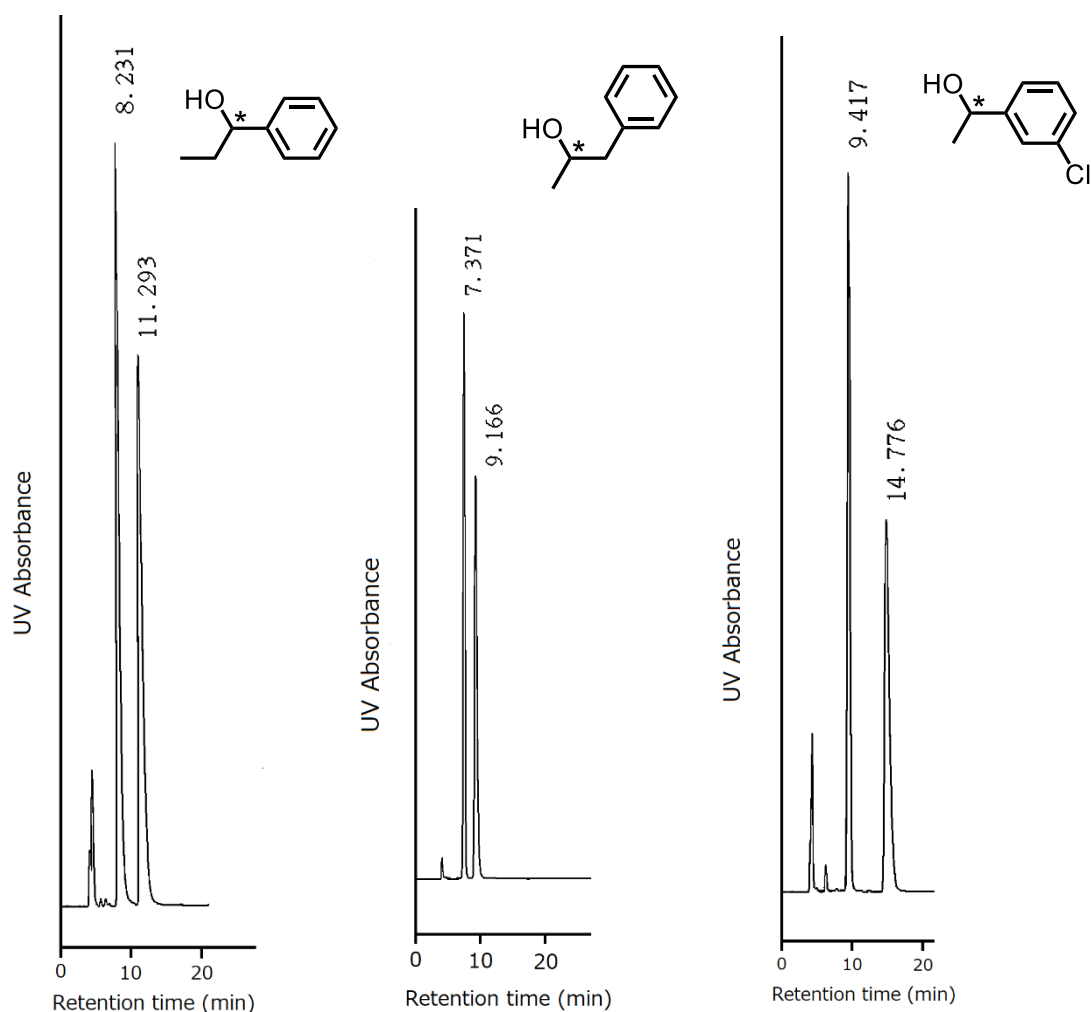


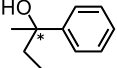
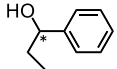
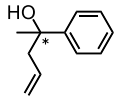
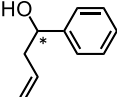
Fig. 6-4 Chromatograms of chiral aromatic secondary alcohols using CSP-6.
Mobile phase : 2-propanol/n-hexane (5/95, v/v), same conditions for (a), (b), (c).

第二項 第三級及び第一級キラルアルコールの分離

芳香族第二級アルコールと第三級アルコールに対する CSP-6 のエナンチオ分離能を Table 6-3 に示す。第三級アルコールは第二級アルコールと同様、不斉炭素に水酸基が直結している。芳香族第二級アルコールと、その不斉炭素に結合する水素をメチル基に変換した第三級アルコール2組の化合物(2-フェニル-2-ブタノールと1-フェニル-1-プロパノール、及び2-フェニル-4-ペンテン-2-オールと1-フェニル-3-ブテン-1-オール) に対する分離能を比較した結果、分離係数は第二級アルコールの方が大きくなった。これら2組の化合物は、

化学構造的には不斉炭素上にメチル基があるか無いかの相違だけでありメチル基の導入により分離能の変化が発現している。

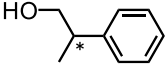
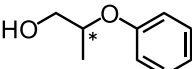
Table 6-3 Comparison of enantiomeric separation ability of CSP-6 between aromatic tertiary and secondary alcohols

Compound name	Structure	k_I	α
2-phenyl-2-butanol		1.14	1.42
1-phenyl-1-propanol		1.51	1.62
2-phenyl-4-pentene-2-ol		0.81	1.26
1-phenyl-3-butene-1-ol		1.89	1.55

Mobile phase : 2-propanol/*n*-hexane (5/95, v/v)

次に、芳香族第一級アルコールに対する CSP-6 のエナンチオ分離能を Table 6-4 に示す。第一級アルコールは、不斉炭素に隣接する β -炭素に水酸基が結合しているが、ここに示す 2 種の第一級アルコール(2-フェニル-1-プロパノール及び2-フェノキシプロパノール)では、何れも分離係数 1.4 以上の十分大きな分離能が認められた。水酸基が不斉炭素に直結していないキララルアルコールも、CSP-6 で分離できる事が明らかになった。

Table 6-4 Enantiomeric separation ability of CSP-6 toward aromatic primary alcohols

Compound name	Structure	k_I	α
2-phenyl-1-propanol		1.51	1.62
2-phenoxypropanol		1.14	1.42

Mobile phase : 2-propanol/*n*-hexane (5/95, v/v)

※ Table 6-3 及び Table 6-4 は、公表主論文 3) Nishioka R., et al., *Chromatography*, **40**, 169-173 (2019)からデータを転載した。

以上、CSP-6 の様々な芳香族キラルアルコールに対するエナンチオ分離能が確認された。但し、不斉炭素付近の置換基に依存してその分離能には差が生じ、特に、不斉炭素に 1 個の水素が結合している第二級アルコールに対して優れた分離能を示す傾向が認められた。

移動相の影響については第四項で述べるが、中性化合物であるアルコールの分離における移動相は、2-プロパノールと *n*-ヘキサン混合液で他の添加剤を加える必要はなかった。そのため、移動相の条件設定が容易である。CSP-6 を用いた芳香族キラル第三級及び第二級アルコールのクロマトグラム例を Fig. 6-5 に示す。

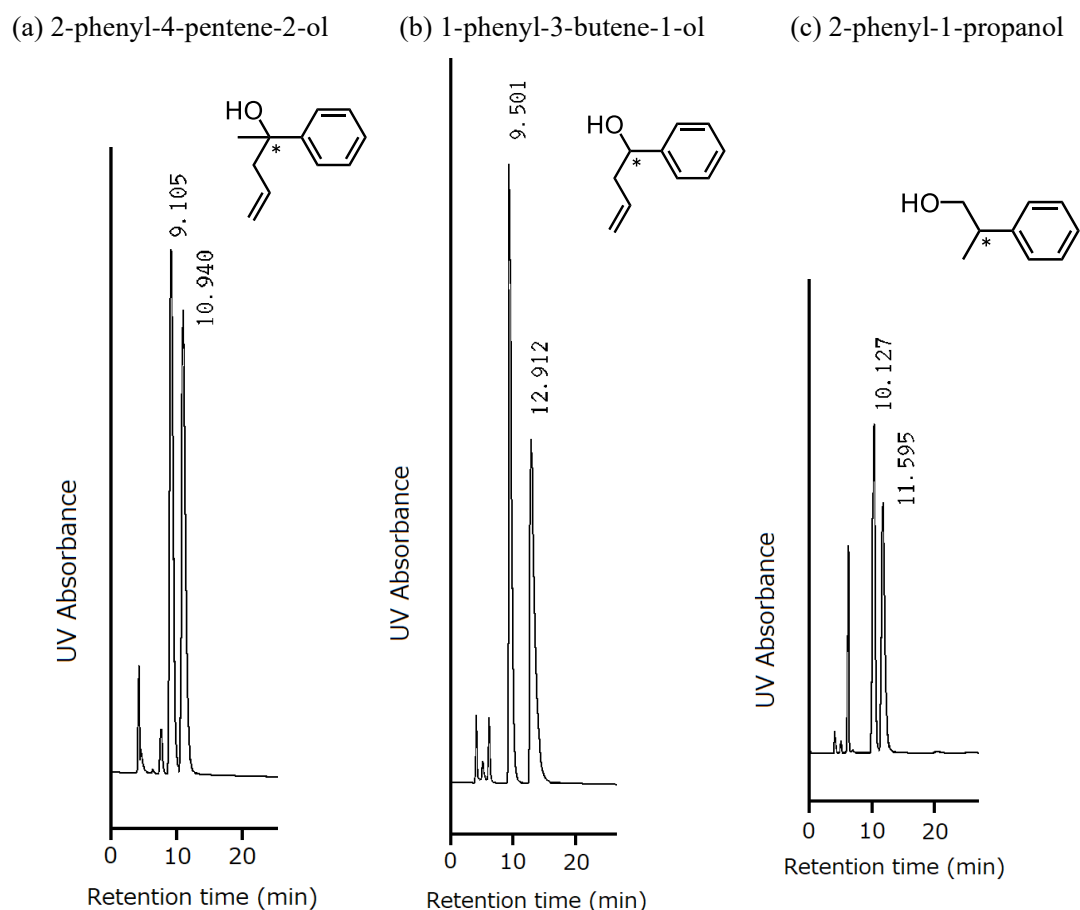


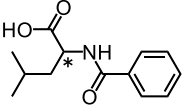
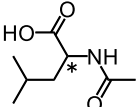
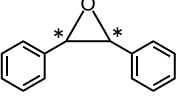
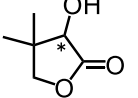
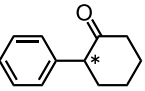
Fig. 6-5 Chromatograms of chiral aromatic tertiary and primary alcohols using CSP-6
Mobile phase : 2-propanol/*n*-hexane (5/95), same conditions for (a), (b), (c).

第三項 アルコール以外のキラル化合物の分離

アルコール以外の化合物に対する CSP-6 のエナンチオ分離能を Table 6-5 に示す。第二節で示した通り、CSP-6 には水酸基以外に分子内にカルボキシル基をもつ芳香族キラル化合物の分離能も認められる。不斉炭素にカルボキシル基が結合した *N*-ベンゾイル体、*N*-アセチル体等、アミノ酸の *N* 保護体に対して、CSP-6 は優れた分離能を示した。その他、1-フェノキシシクロヘキサノンやパントイルラクトン等、ケトンやラクトン類に対してもエナンチオ分離能が認められた。使用する移動相は、中性化合物の場合にエタノールと *n*-ヘキサンの混合液が適していたが、分子内にカルボキシル基をもつ酸性化合物の分離では、エタノールと *n*-ヘキサン混合液に少量のトリフルオロ酢酸を添加する必要がある。

キラル化合物の中でも、アミノ基やカルボキシル基のような塩基性あるいは酸性官能基を持たない化合物は、従来のキラル固定相では分離成功率が低い事が多い。しかし CSP-6 はこのようなキラル化合物に対しても有効な選択肢になると考えられる。CSP-6 を用いたアルコール以外の化合物のクロマトグラム例を Fig. 6-6 に示す。

Table 6-5 Enantiomeric separation ability of CSP-6 toward chiral compounds other than alcohol

Compound name	Structure	k_I	α	Mobile phase (v/v/v)
N-benzoylleucine		1.27	1.49	E/H/TFA (10/90/0.1)
N-acetylleucine		4.29	1.22	E/H/TFA (5/95/0.02)
<i>trans</i> -styibenoxide		4.24	1.35	2-PA/H (0.02/100)
pantolactone		4.22	1.34	2-PA/H (5/95)
2-phenylcyclohexanone		2.31	1.53	2-PA/H (0.02/100)

Mobile phase abbreviation : E ethanol, 2-PA 2-propanol, H *n*-hexane, TFA trifluoroacetic acid

※ Table 6-5 は、公表主論文 3) Nishioka R., et al., *Chromatography*, **40**, 169-173 (2019)からデータを転載した。

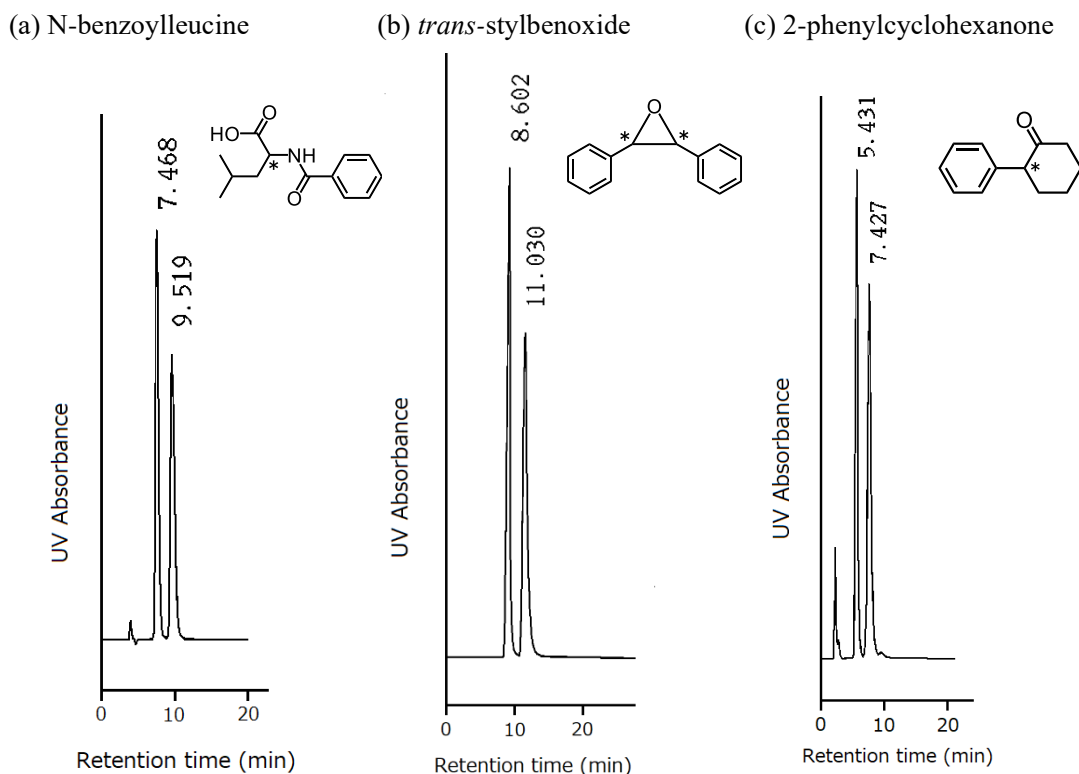


Fig. 6-6 Chromatograms of chiral compounds other than alcohol using CSP-6.

Mobile phase : (a) ethanol/*n*-hexane/trifluoroacetic acid (10/90/0.1, v/v), (b) 2-propanol/*n*-hexane (0.02/100, v/v), (c) 2-propanol/*n*-hexane (1/99, v/v).

第四項 移動相の効果

CSP-6は2-プロパノール/*n*-ヘキサン系の順相系移動相を用いてキラル分離を行う事ができる。芳香族アルコール等の中性化合物に対する標準的移動相組成は2-プロパノール/*n*-ヘキサン (5/95, v/v) で、中性化合物を測定・分離する場合にも、2-プロパノール/*n*-ヘキサン混合液の他に酸等の添加剤を加える必要は原則として無かった。2-プロパノールの濃度を調整して保持時間を最適化すればメソッド作成が可能となる。なお分離係数が大きい化合物、例えば、*trans*-2-フェニル-1-シクロヘキサノール等ではピークがテーリングする事があった (Fig. 6-7 (a))。このような場合は、2-プロパノールをエタノールに変更すると、分離係数はやや低下するもののピーク形状は大きく改善された (Fig. 6-7 (b))。

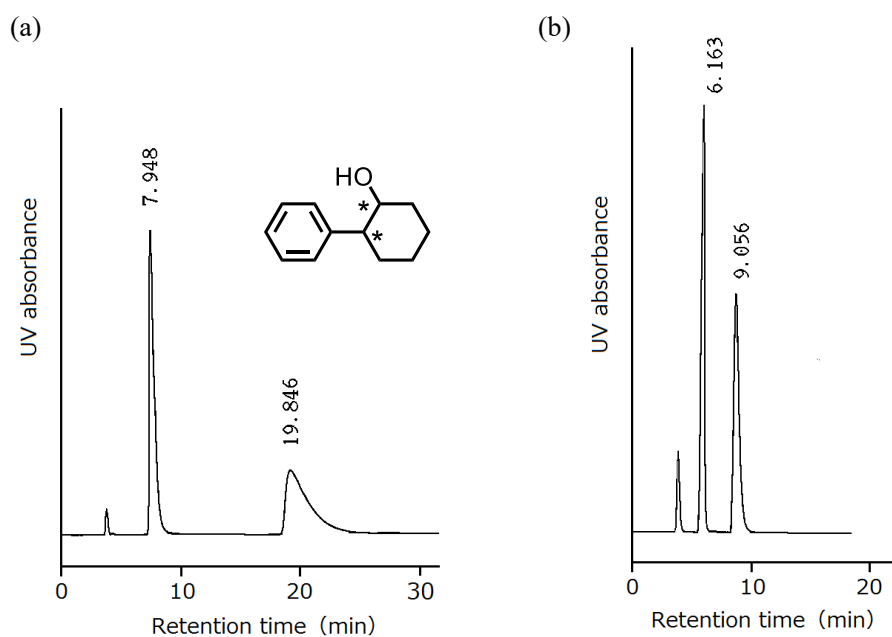


Fig. 6-7 Comparative chromatograms of mobile phase in the chiral separation of *trans*-2-phenyl-1-cyclohexanol using CSP-6.

Mobile phases ; (a) 2-propanol/*n*-hexane (5/95, v/v), (b) ethanol/*n*-hexane (5/95, v/v).

※ Fig. 6-7 は、公表主論文 3) Nishioka R., et al., *Chromatography*, **40**, 169-173 (2019)からデータを転載した。

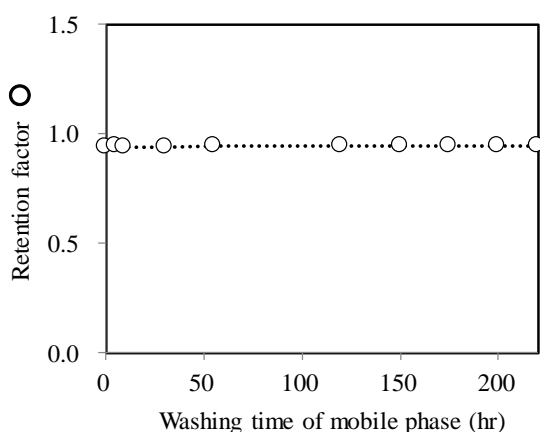
保持時間は、移動相中の 2-プロパノールあるいはエタノール濃度を変えて調整するが、CSP-6 はコアシェルシリカ担体を用いているので、一般的な粒子型担体を用いたキラル固定相と比較すると分析時間を短くすることができる。キラル分析は通常 20 分以上を要する事が多いが、CSP-6 の場合には保持時間を 10 分～15 分程度に調整すれば、多くの化合物でベースライン分離が達成された。分析時間短縮も CSP-6 の実用的な特長である。

第四節 らせんポリマー形キラル固定相の耐久性

通常使用する移動相は 2-プロパノールと *n*-ヘキサン混合液であるが、2-プロパノールよりも溶出力の強いエタノールを添加した移動相に対する CSP-6 の耐久性を評価した。*trans*-2-フェニル-1-シクロヘキサノールをテストサンプルとして、エタノール/*n*-ヘキサン (5/95, v/v) を 0.2 mL/min の流速でカラムに連続通液し、適当な間隔でテストサンプルを

分析して分離能の変化を観察した (Fig. 6-8)。その結果、通液 220 時間まで、試料の *trans*-2-フェニル-1-シクロヘキサノールの分離係数と保持時間に変化は見られなかった。また、カラム圧とピーク形状にも変化は認められなかった。CSP-6 は化学結合形ではなく、キラルセクターであるらせんポリマーを担体のコアシェルシリカにコーティングしているため、移動相中のアルコール濃度が高いとポリマーが溶出する可能性があるが、少なくともエタノールを 5 % 混合しても十分な耐久性を示した。CSP-6 は、分析対象とする多くの化合物は、移動相中に 2 プロパノールまたはエタノールを 5 % 以下の濃度で混合する事で保持時間の調整が可能であり、実用的な分離条件下十分な耐久性を備えている事が確認された。ポリマーを溶解するテトラヒドロフランやクロロホルムは使用できないが、通常これらの溶媒は移動相として使用する事はないので問題は生じない。

(a) Change of retention factor over time



(b) Change of separation factor over time

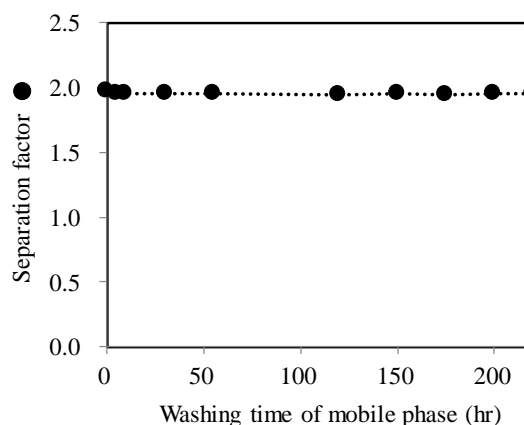


Fig. 6-8 Durability test of CSP-6

Test sample : *trans*-2-phenyl-1-cyclohexanol, Mobile phase : ethanol/*n*-hexane (5/95, v/v).

※ Fig. 6-8 は、公表主論文 3) Nishioka R., et al., *Chromatography*, **40**, 169-173 (2019)からデータを転載した。

第五節 小括

CSP-6 は、芳香族キラルアルコールに対して、その化学構造によらず汎用的に優れた分離能を示す事が明らかになった。そのエナンチオ分離特性は、従来のキラル固定相とは異なり、不斉炭素に結合する置換基が大きくなると、分離係数が低下する傾向を示した (例外は存在する)。CSP-6 は、多くのアルコールを、他の添加剤を含まない 2-プロパノールと

n-ヘキサン混合液を移動相としてキラル分離できるため、分離メソッドの開発が容易である。ケトンやラクトン化合物の分離も可能であり、従来の固定相で分離成功率の低い化合物に対する有効な選択肢になると考えられる。

キラルアルコールは、医薬品や農薬等の開発におけるキラル前駆体として重要であり、キラルビルディングブロックとしても供給されている。官能基が水酸基のみの単純なアルコールは、従来のキラル固定相では分離困難な事も多く、水酸基を誘導体化してキラル分離する方法等が用いられてきた。CSP-6 は、多くのキラルアルコールの直接分離が可能であり、研究開発への大きな寄与が期待される。

第七章 分離対象試料の官能基依存的キラル固定相選択法

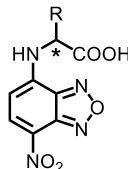
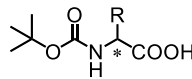
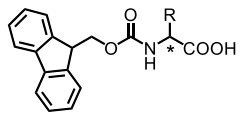
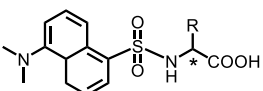
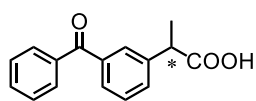
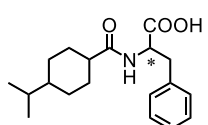
キラル固定相は、試料と固定相との間のジアステレオメリックな相互作用に基づいてキラル分離を達成する。相互作用はキラルセクターの種類によって異なるが、試料化学構造に特異的であり、1つの固定相だけで多くのキラル化合物の分離ができる訳ではない。あるキラル固定相で分離できた化合物と構造が類似したキラル化合物であっても、化学的な部分構造が少し違うだけで分離が困難となる例も少なくない。そのため、キラル分離メソッド開発においては、多くのキラル固定相の中から目的の分離に最も適する固定相を選択する必要がある。キラル固定相選択のためには、文献を調査したり、類似構造化合物の分離データを検索する必要がある。しかし、分離条件が報告されていない新規化合物の場合は、多くのキラル固定相をスクリーニングして試行錯誤しながらメソッドを最適化しなくてはならない。序論でも述べた通り、この点がキラル分離工程を含む研究開発効率の障害となっている。

本研究で開発したキラル固定相は、特定の官能基をもつキラル化合物に対して特異的に優れた分離能を示す事を論述した。クラウンエーテル形 CSP-3 は、第一級アミノ基をもつキラル化合物を分離対象とする。アセチル化シクロデキストリン形 CSP-5 は芳香族第一級及び第二級アミンに対して、また、らせんポリマー形 CSP-6 は芳香族アルコールに対して特に優れたエナンチオ分離能を示す事を明らかにした。水酸基を修飾していないシクロデキストリン形 CSP-4 は、特定の官能基をもつキラル化合物に特異的に高い分離能を示す訳ではないが、フラボノイドを基本骨格とする化合物等、中性のキラル化合物全般に有効であった。

従来の低分子系キラル固定相の場合も、試料官能基に対する特異性が高く、特定の固定相が特定の官能基をもつキラル化合物の分離に有効である事が知られている。例えば、配位子交換形キラル固定相は、キラルな配位子をキラルセクターとしてジアステレオメリックな銅錯体形成を分離メカニズムとするため、アミノ酸やヒドロキシ酸の様に、分子内に2個以上の官能基をもち銅錯体形成が可能な、即ち、バイデンテートなキラル化合物を分離対象とする¹⁷⁾⁻¹⁹⁾。またパークル形キラル固定相¹⁰⁾⁻¹⁶⁾は、試料と固定相との間の水素結合や電荷移動等の相互作用を分離メカニズムとするため、原理的に特定の官能基を保有するキラル化合物を分離対象とする訳ではない。しかしこれまでに報告されているアプリケーション⁸¹⁾⁻⁸⁸⁾からアミノ酸誘導体やプロフェン系の非ステロイド系抗炎症薬等の様に不斉炭素付近にカルボキシル基を有する化合物のキラル分離に有効な事が多い事が判る。この応用として、アミノ酸のアミノ基に4-フルオロ-7-ニトロベンゾフラザン (NBD-F) を導入して蛍光ラベルした後、パークル形キラル固定相で分離する方法が、D-アミノ酸の微

量分析法として知られている。パークル形キラル固定相を用いたキラル分離の報告を Table 7-1 にまとめる⁸¹⁾⁻⁸⁸⁾。

Table 7-1 Previously reported chiral separation methods using Pirkle-type chiral stationary phase

Category of analytes	Structure	References
Amino acid N-derivative	NBD-amino acid 	81)-83)
Amino acid N-derivative	Boc-amino acid  FMOC-amino acid 	84)
Amino acid N-derivative	Dansyl-amino acid 	
Non-steroidal anti-inflammatory drug	Ketoprofen 	85),86)
Antidiabetic drug	Nateglyside 	87),88)

本研究では、新たに設計したキラル固定相の官能基に対するエナンチオ分離特性を詳細に評価した。上述の様に、従来から知られているキラル固定相も試料官能基に対して特異性を示す場合がある。言い換えると、分離対象化合物の官能基に着目する事が、固定相選択の效果的指標となる事は明白である。これらの知見を基に考案した、官能基依存的キラル固定相選択法のスキームを Fig. 7-1 に示す。全ての化合物がこのスキームの通りになる訳ではないが、キラル固定相を選択するための目安の1つとして有効である。キラル分離メソッド作成では複数のキラル固定相をスクリーニングして最適の固定相を選択するトライアンドエラーが必要であるが、候補となるキラル固定相のエナンチオ分離特性を把握できれば、より効率的に分離メソッドを作成できる。

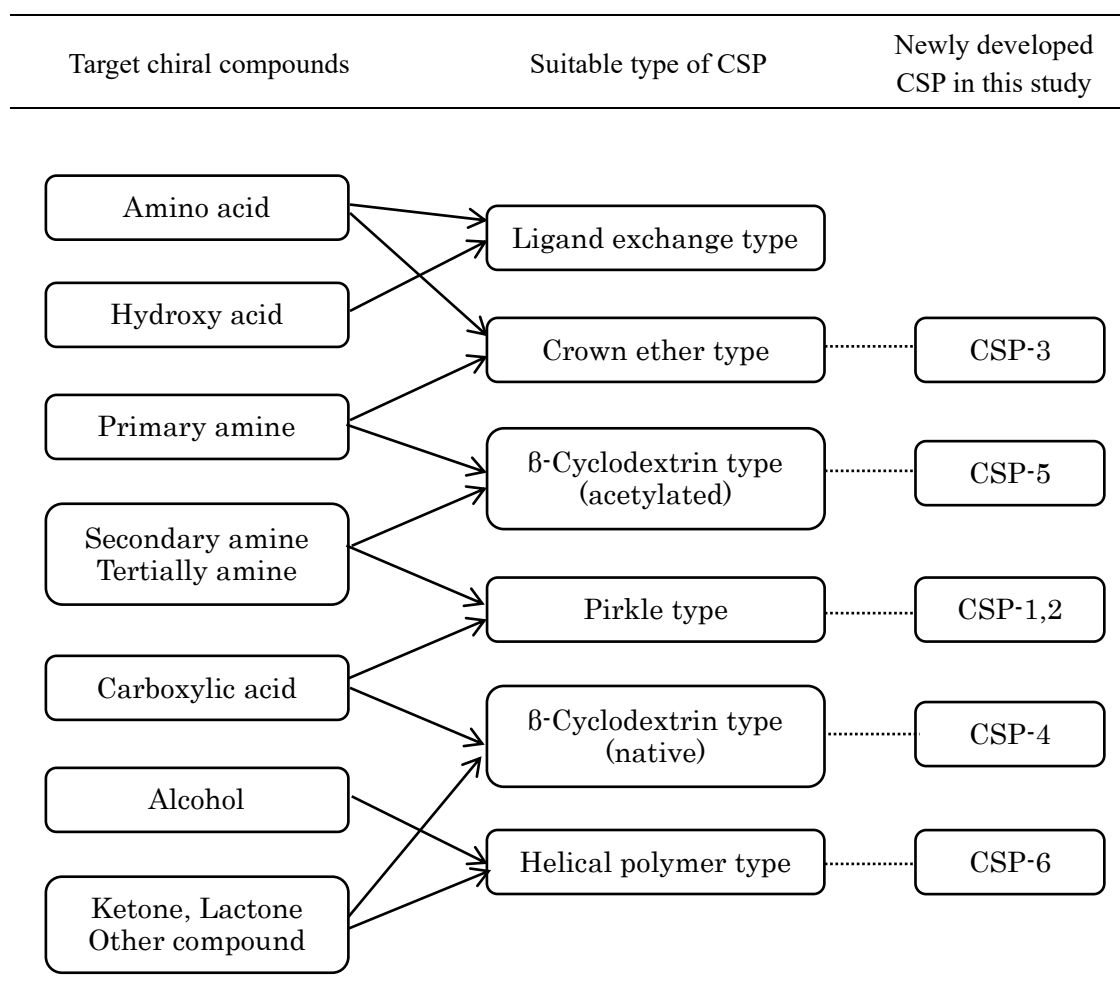


Fig. 7-1. Chiral stationary phase selection scheme dependent on the functional groups of analytes

第八章 結 論

第一節 総 括

筆者は複数の新規キラル固定相を開発し、多くのキラル化合物を試料としてそのエナンチオ分離特性を詳細に解明した。本研究の学術的・実用的成果を以下に要約する。

1. 化学（共有）結合形キラル固定相におけるスペーサーの効果を考察し、パークル形キラル固定相（CSP-1・CSP-2）とシクロデキストリン形キラル固定相（CSP-4）において、キラルセクターが同じであっても、スペーサー部分の化学構造の相違がエナンチオ分離特性に影響する事を示した。
2. キラル擬 18-クラウン-6-エーテル誘導体を、アミド結合を介してシリカゲルに共有結合させた新規キラル固定相（CSP-3）を設計した。共有結合とした事で移動相組成の制約がなくなり、疎水性の大きなアミン類にも分離対象が広がり順相系の移動相も使用可能となった。
3. スペーサーに糖鎖を使用した新規シクロデキストリン形キラル固定相（CSP-4）を設計し、従来のアルキル鎖スペーサーと比較して、ピーク形状やエナンチオ分離能が向上する事を確認した。シクロデキストリン水酸基の化学修飾によりエナンチオ分離特性が大きく異なる事を示し、その要因を考察した。水酸基をアセチル化したキラル固定相（CSP-5）は、多くのキラルアミンに対して優れたエナンチオ分離能を示した。
4. キラル第一級アミンの分離において、クラウンエーテル形キラル固定相（CSP-3）とアセチル化シクロデキストリン形キラル固定相（CSP-5）が、ゲスト化合物の置換基の違いに対して相補的なエナンチオ分離能を有する事を見出し、その要因をホストゲスト相互作用に基づいて説明した。
5. らせん状ポリフェニルアセチレン誘導体を新規キラル固定相（CSP-6）に導入し、芳香族キラルアルコールに対して汎用的に優れたエナンチオ分離能を発揮する事を明らかにした。また、表面多孔性シリカ担体が適用できる事も示した。
6. 本研究で開発した新規キラル固定相が、多くのキラル医薬品の分離に適用できる事を示した。特にキラルアミンやアミノアルコールの多くが、CSP-3 あるいは CSP-5 を用いて逆相系移動相で分離できる事を示した。
7. 様々なキラル固定相のエナンチオ分離特性の考察を基に、分離対象化合物の官能基依存的キラル固定相選択法を提示した。

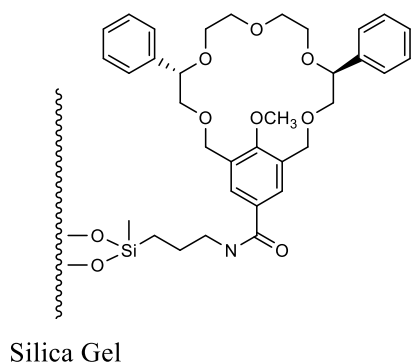
第二節 成果の検証と展望

本研究の目的である直接分離可能なキラル化合物種の拡大に関しては、一定の成果を挙げることができた。特に、医薬中間体や生物活性物質等の構成成分や基本骨格として汎用されるキラルアミンやアミノアルコール誘導体の多くが、逆相系移動相で分離できる事を示した。また開発したキラル固定相のエナンチオ分離特性を明らかにし、キラル分離メソッド開発の指標となる基礎データを提供するという目的に関しては、新規キラル固定相の評価を進める過程で、特定の官能基を有するキラル化合物に対して、特定のキラル固定相が特異的に優れたエナンチオ分離能を示す事を見出した。これらの知見及び既に報告されている文献情報を基に、試料の官能基依存的キラル固定相選択法を提示できた事は、キラル分離メソッド開発の効率化に寄与すると考えている。

エナンチオ分離特性の評価の際に、担体とキラルセクターを結合するスパーサー部分の構造の影響、シクロデキストリン形固定相における水酸基修飾の効果、そしてクラウンエーテルとシクロデキストリンのホストゲスト相互作用の相違に関して、それらのメカニズムの観点から考察した。これらの結果は、キラル分離メソッド開発におけるキラル固定相の選択の指標になるとともに、新規キラル固定相を設計する際にも有用な知見になる。

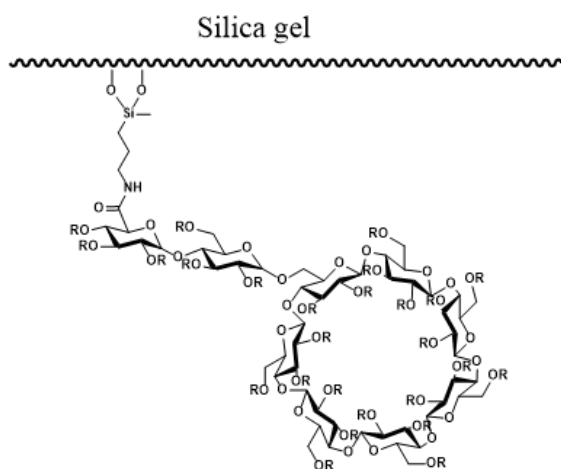
本研究で開発した新規キラル固定相のうち、CSP-3、CSP-4、CSP-5 及び CSP-6 は製品化して市場に供給し、医薬品等の研究開発に利用されている。市販しているキラル固定相の構造を Fig. 8-1 に再掲する。特に CSP-4 は様々な分析法に採用され、多くの研究者から研究報告されている^{58)-61),63)-64),89)}。CSP-3 は他の研究者の報告に引用されるとともに⁵⁵⁾、米国薬局方の LC カラムリスト (USP L-127) にも掲載された⁹⁰⁾。

本研究の成果を含めたキラル固定相による HPLC 分析法が、医薬品の研究開発や製造工程における品質管理に貢献するものと期待している。例えば、日本薬局方には多数のキラル薬物が収載されているが、その光学純度試験法の多くは旋光度法である⁹¹⁾。アドレナリンやイソプロテレノールの光学純度試験にも旋光度法が用いられているが、これらは CSP-5 を使用した逆相系移動相で分離可能であり (第五章 Fig. 5-6)、高精度なキラル分離メソッドを容易に設定できる。キラル固定相による HPLC 法は精度が高く簡便であるため、旋光度に替わる光学純度試験法としての展開が期待される。



CSP-3

Brand name : SUMICHIRAL[®] OA-8000

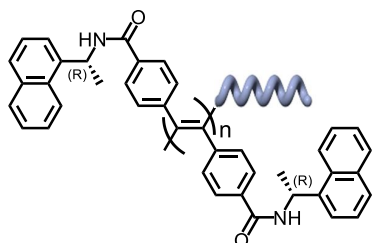


CSP-4 (R=H)

Brand name : SUMICHIRAL[®] OA-7000

CSP-5 (R=CH₃)

Brand name : SUMICHIRAL[®] OA-7700



CSP-6

Brand name : SUMICHIRAL[®] OA-SHELL P1

Fig. 8-1 Commercially available chiral stationary phase developed in this study

本研究では官能基に着目したキラル固定相の選択法を提示したが、最近ではキラル分離メソッド開発において、カラムスイッチング装置を利用して複数のキラル固定相やその分離条件を網羅的にスクリーニングするシステムが実用化されている。更に近い将来、人工知能 (AI) に膨大なキラル分離データを学習させ、AI によるキラル固定相選択法も実用化されるはずである。そのような新しいシステムの活用段階でも、キラル固定相のエナンチオ分離特性を把握する分析化学的考察が分離メソッド開発のために重要な基礎となる事は言うまでも無い。

謝 辞

本学位論文の作成にあたり、終始懇篤なご指導・ご助言を賜りました、岐阜薬科大学創薬化学大講座薬品化学研究室、佐治木弘尚教授に深く感謝申し上げます。

また、様々なご指導ご協力を頂いた公表論文の共著者・共同研究者の皆様、学位論文申請の機会を賜りご協力頂いた株式会社住化分析センターの上司及び関係者の皆様、その他、お世話になった方々に深く感謝いたします。

実験の部

各章共通の実験

試薬・溶媒

移動相調製及び充填剤合成等に用いる溶媒・試薬として、メタノール、エタノール、2-プロパノール、アセトニトリル、*n*-ヘキサン、テトラヒドロフラン、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、1,2-ジクロロエタン、クエン酸、酢酸、酢酸アンモニウム、トリフルオロ酢酸、リン酸、リン酸二水素カリウム、リン酸水素ニカリウム、過塩素酸は、富士フィルム和光純薬（※）の試薬特級を用いた。水は、蒸留水（富士フィルム和光純薬試薬特級）又はミリQ水を用いた。キラルケミカルスを固定化する際の縮合剤として、東京化成製の1-エトキシカルボニル-2-エトキシ-1,2-ジヒドロキノリン（EEDQ）を用いた。その他、合成用試薬や性能評価用のキラル化合物は、特に記載しない限り、市販の試薬を使用し、精製する事なく使用した。

リン酸緩衝液は、一定濃度のリン酸水素二ナトリウム水溶液とリン酸二水素ナトリウム水溶液を調製して混合し、その比率を変えて目的のpHに調整した。pH 5以下にする場合は、更にリン酸を加えた。過塩素酸水溶液は、水に過塩素酸を加えて調製したが、その際、過塩素酸の添加量を変えて目的のpHに調整した。クエン酸水溶液、リン酸二水素カリウム水溶液、酢酸アンモニウム水溶液は、それぞれの試薬を水に溶解し、所定の濃度になる様に調製した。

注※）実験当時は「和光純薬工業」であったが社名変更した。現社名を記載した。

HPLC 装置

第二章の実験では（1）、第三章以降の実験では（2）のシステムを用いた。

- (1) 島津製作所製 HPLC ポンプ（LC-6A）、紫外分光光度検出器（SPD-6A）
- (2) 島津製作所製 HPLC ポンプ（LC-10AT）、デガッサー（GDU-14A）、紫外分光光度検出器（SPD-10A）

データ処理装置は、島津製作所製 C-R6A 又は CLASS10、試料注入装置はレオダイン製サンプルインジェクター（7725i 及びその相当品）を用いた。

HPLC 測定とパラメータの算出

移動相組成、流速及び試料溶解溶媒は、各章の実験の部又は総論の部の図表のキャプションに記載した。移動相は、調製後、超音波洗浄機で約5分間、脱気してから使用した。特に記載しない限り、カラム温度は室温（25℃付近の一定温度）とし、紫外分光光度検出器の波長は254 nmとした。試料は約1~5 mg/mLの濃度に調製し、その1~2 µLをHPLC装置に注入して、各成分の保持時間を求めた。キラル固定相の分離性能評価値として、日本産業規格 JIS K 0214 : 2013（分析化学用語（クロマトグラフィー部門））¹⁾に従って、(1)

式より保持係数 k を、(2)式より分離係数 α を求めた。

$$k = (t_R - t_0) / t_0 \quad \cdots (1)$$

$$\alpha = k_2 / k_1 \quad \cdots (2)$$

式中の t_R は各成分の保持時間、 t_0 はホールドアップ時間、 k_1 及び k_2 は、それぞれ、鏡像異性体の前出及び後出成分の保持係数を表す。ホールドアップ時間は、試料導入時からカラムに保持されない成分のピークの頂点が現れるまでの時間の事で、溶媒ピークの保持時間の実測平均値を用いた。鏡像異性体が分離しない場合は、 $k_1 = k_2$ となる。

第二章第二節に関する実験

Fig. 2-1 に関する実験

スパーサーのアルキル鎖を延長したキラル固定相 CSP-1 及び CSP-2 は、以下の様に調製した。市販のアミノプロピルシリカゲル（平均粒径 5 μm 、平均細孔径 12 nm）に、11-アミノウンデカン酸のアミノ基を常法によりベンジルオキシカルボニル化して得られる 11-(*N*-ベンジルオキシカルボニルアミノ)ウンデカン酸を反応させ、次いで、ベンジルオキシカルボニル部を加水分解する事により、11-アミノウンデカン酸により修飾されたアミノプロピル化シリカゲル (APS-11AmUA) を得た。キラルセクターである *N*-[(*R*)-1-(α -ナフチル)エチルアミノカルボニル]-*L*-*tert*-ロイシン及び *N*-(3,5-ジニトロフェニルアミノカルボニル)-*L*-バリンは、既に報告されている方法¹²⁾⁻¹³⁾に従って住化分析センターにて合成された化合物を用いた。これらのキラルセクターを、縮合剤として EEDQ を用い、既報の方法¹²⁾⁻¹³⁾に準じて、それぞれ APS-11AmUA と縮合させた後、洗浄、乾燥する事により CSP-1 及び CSP-2 の充填剤を得た。元素分析値は、C 8.4 %、N 1.7 % (APS-11AmUA)、C 17.5 %、N 2.6 % (CSP-1)、C 14.6 %、N 2.5 % (CSP-2) であった。得られた充填剤をそれぞれ、内径 4.6 mm、長さ 250 mm のステンレス製カラムにスラリー充填した。

比較用のキラル固定相として、市販のパークル形キラル固定相である CSP-1a (商品名：SUMICHIRAL[®] OA-4700、住化分析センター製) 及び CSP-2a (商品名：SUMICHIRAL[®] OA-2500S、住化分析センター製) の、内径 4.6mm、長さ 250 mm、粒径 5 μm のカラムを用いた。CSP-1 と CSP-1C 及び CSP-2 と CSP-2C は、それぞれキラルセクターの構造が同じで、スパーサーのアルキル鎖長が異なる。

Fig. 2-2 に関する説明

CSP-1 及び CSP-2 を評価するための試料の構造式を示した。3,5-ジニトロベンゾイル-1-フェニルグリシンは、1-フェニルグリシン (ラセミ体) に、3,5-ジニトロベンゾイルクロリドを常法により反応させて調製した。他の化合物は市販試薬のラセミ体を用いた。

Table 2-1、Fig. 2-3、Fig. 2-4 及び Fig. 2-5 に関する実験

CSP-1 及び CSP-1C を充填したカラムを用いて、HPLC 測定を行った。試料は、*N*-(3,5-ジニトロベンゾイル)-1-フェニルエチルアミン、1,1'-ビ-2-ナフトール及び 2,2,2-トリフルオロ-1-(9-アンズリル)エタノールの各ラセミ体を約 2 mg/ml のメタノール溶液とし、その約 2 μ L を HPLC に注入してクロマトグラムを採取した。順相系移動相としてエタノール/1,2-ジクロロエタン/*n*-ヘキサン混合液、逆相系移動相としてアセトニトリルと水又はクエン酸水溶液の混合液を使用した。移動相の組成は Table 2-1 に記載した。流速は、1,1'-ビ-2-ナフトールの場合 0.8 mL/min、その他の試料は 1.0 mL/min とした。Table 2-1 にはクロマトグラムから算出した分離係数と保持係数を、Fig. 2-3、Fig. 2-4 及び Fig. 2-5 には、得られたクロマトグラムを示した。

Table 2-2 及び Fig. 2-6 に関する実験

CSP-2 及び CSP-2C を充填したカラムを用いて、HPLC 測定を行った。試料は、1,1'-ビ-2-ナフトール、2,2,2-トリフルオロ-1-(9-アンズリル)エタノール、ケトプロフェン、フルルビプロフェン及びイブプロフェンの各ラセミ体を各約 2 mg/mL のメタノール溶液とし、その約 2 μ L を HPLC に注入してクロマトグラムを採取した。移動相はアセトニトリルと水又は酢酸アンモニウム水溶液の混合液を使用し、その組成は Table 2-2 に記載した。流速は 1 mL/min とした。Table 2-2 には、クロマトグラムから算出した分離係数と保持係数を、Fig. 2-6 には、得られたクロマトグラムを示した。

第三章第二節に関する実験

Fig. 3-2 に関する実験

キラル固定相 CSP-3 は、以下の方法で調製した。キラル擬 18-クラウン-6-エーテルのブROMO体 (Crown ether 1) は、既に報告されている方法⁵⁰⁾⁻⁵²⁾ に準拠して、住化分析センターにて合成された化合物を用いた。この Crown ether 1 約 0.8 g を窒素気流下、脱水テトラヒドロピラン約 25 mL に溶解し、ドライアイス/エタノールで、約 70 °C に冷却した。これに *n*-ブチルリチウム/*n*-ヘキサン溶液 3.2 mmol 相当を滴下し、約 2 時間攪拌した後、二酸化炭素を導入して更に 2 時間攪拌した。室温まで上昇させて、20 時間攪拌を続けた。1 mol/L 塩酸約 3 mL を滴下した後、有機溶媒で抽出した。有機層を乾燥、濃縮した後、粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、カルボキシル基を導入した Crown ether 2 を得た (融点 75-76 °C、旋光度 $[\alpha]_D^{22} = +105.2$)。次に、Crown ether 2 約 0.9 g を脱水テトラヒドロフラン約 40 mL に溶解し、氷冷下に攪拌しながら EEDQ 約 0.85 g を加え、氷冷下 1 時間攪拌した。これにアミノプロピルシリカゲル (平均粒径 5 μ m、平均細孔径 12 nm) 2.5 g を加えて懸濁させ、室温で 18 時間攪拌した。濾過して得られた固体をテトラヒドロフランで洗浄後、乾燥して CSP-3 の充填剤を得た。CSP-3 の元素分析

値は C 12.5 %、N 1.0 %であった。得られた充填剤を内径 4.6 mm、長さ 20 mm のステンレス製カラムにスラリー充填した。

第三章第三節に関する実験

Fig. 3-3 に関する実験

CSP-3 を充填したカラムを用いて HPLC 測定を行った。試料は、1-(1-ナフチル)エチルアミンのラセミ体を約 2 mg/mL のメタノール溶液とし、その約 1 μ L を HPLC に注入した。移動相として、アセトニトリル/水 (40/60, v/v) 混合液に過塩素酸を適量加え、pH を 1.0、2.0、3.0 及び 4.0 に調整した溶液を用い、流速は 0.8 mL/min とした。得られたクロマトグラムから分離係数と保持係数を算出し、図にプロットした。pH が 2.5 以上の場合は、殆ど保持しなかったため、分離係数のプロットは省略した。

Fig. 3-4 に関する実験

CSP-3 を充填したカラムを用いて HPLC 測定を行った。試料は、(a) 1-(1-ナフチル)エチルアミン及び(b) アラニン- β -ナフチルアミドの各ラセミ体を用いた。試料は、(a) 約 1 mg/mL 及び (b) 約 5 mL/ml のメタノール溶液とし、その約 1 μ L を HPLC に注入してクロマトグラムを採取した。移動相は、アセトニトリルと過塩素酸水溶液 (pH 2.0) の混合液を使用し、その組成は Fig. 3-4 に記載した。流速は (a) 0.8 mL/min、(b) 0.7 mL/min とした。

Fig. 3-5 に関する実験

CSP-3 を充填したカラムを用いて HPLC 測定を行った。試料は、1-(1-ナフチル)エチルアミン及び DOPA (3,4-ジヒドロキシフェニルアラニン) の各ラセミ体及びノルエフェドリンの(*RS/SR*)混合物を用いた。それぞれ、約 2 mg/ml のメタノール溶液とし、その約 2 μ L を HPLC に注入して、クロマトグラムを採取した。移動相はエタノール/*n*-ヘキサン/トリフルオロ酢酸の混合液を使用し、その組成は Fig. 3-5 に記載した。流速は 0.7 mL/min とした。

なお、ノルエフェドリン (フェニルプロパノールアミン) は、覚醒剤取締法で覚醒剤原料に指定されているため、覚醒剤研究者の指定を受けて実験を行った (以下同様)。

Table 3-1 に関する実験

Fig. 3-5 の実験で採取したクロマトグラムから、それぞれ、分離係数と保持係数を算出した。また、Fig. 3-5 と同じ試料を、Table 3-1 に記載する逆相系移動相 (c~e) を用いて HPLC 測定し、同様に分離係数と保持係数を算出した。その際、1-(1-ナフチル)エチルアミンの場合、流速 0.8 mL/min、他の試料は 0.7 mL/min とした。

Table 3-2 及び Fig. 3-6 に関する実験

CSP-3 を充填したカラムを用いて HPLC 測定を行った。試料は、トリプトファン、フェニルアラニン、チロシン及びフェニルアラニンメチルエステルの各ラセミ体を用いた。それぞれ、約 5 mg/mL のエタノール (0.5 % トリフルオロ酢酸含有) 溶液とし、その約 2 μ L を HPLC に注入してクロマトグラムを採取し、分離係数と保持係数を算出した。移動相はエタノール/*n*-ヘキサン/トリフルオロ酢酸の混合液を使用し、その組成は Table 3-2 中に記載した。流速はフェニルアラニンの場合 1 mL/min、他の試料は 0.7 mL/min とした。Table 3-2 にはクロマトグラムから算出した各試料の分離係数と保持係数を、Fig. 3-6 にはトリプトファンのクロマトグラムを示した。

第三章第四節に関する実験

Table 3-3 に関する実験

Fig. 3-5 及び Fig. 3-6 の実験で HPLC 測定を行った試料のうち、3 種の光学活性体、(*R*)-1-(1-ナフチル)エチルアミン、(*1R,2S*)-ノルエフェドリン及び L-トリプトファンを HPLC 測定し、保持時間によりピークを同定して鏡像異性体の溶出順を確認した。HPLC 条件は、Fig. 3-5 及び Fig. 3-6 と同様に設定した。

第四章第二節に関する実験

Fig. 4-2 に関する実験

スパーサーに糖鎖を有するシクロデキストリン形キラル固定相 CSP-4 は、以下の方法で調製した。市販のグルクロニルグルコニック- β -シクロデキストリン約 1.8 g を、脱水ジメチルホルムアミド 40 mL に溶解し、氷冷下に攪拌しながら EEDQ 約 0.4 g を加え、氷冷下に 1 時間攪拌した。これに、アミノプロピルシリカゲル (平均粒径 5 μ m、平均細孔径 12 nm) 約 2.5 g を加えて 18 時間攪拌し、テトラヒドロフランで洗浄した後、乾燥して、CSP-4 の充填剤を得た。グルクロニルグルコニック- β -シクロデキストリンの融点は 199.8 $^{\circ}$ C、旋光度 $[\alpha]_D^{25} = +166.8$ であった。得られた充填剤を内径 4.6 mm、長さ 250 mm のステンレス製カラムにスラリー充填した。

CSP-4 と性能比較するためのキラル固定相として、Necleodex β -PM (Merchary Nagel 製、平均粒径 5 μ m、平均細孔径 12 nm) を同様に充填して用いた (CSP-4C)。CSP-4C は、キラルセクターである β -シクロデキストリンが、担体のシリカゲルにアルキル鎖を介して共有結合している構造で、CSP-4 とスパーサー部分の構造が異なる。

Fig. 4-3 に関する説明

CSP-4 を評価するための試料の構造式を示した。N-ダンシルバリン、フラバノン、トルペリゾン、シクロペントラート及びテルブタリンの各ラセミ体を使用した。

Table 4-1 及び Fig. 4-4 に関する実験

CSP-4 及び CSP-4C を充填したカラムを用いて、HPLC 測定を行った。試料は、*N*-ダンシルバリン、フラバノン、トルペリゾン、シクロペントラート及びテルブタリンの各ラセミ体を各約 2~4 mg/mL のメタノール溶液とし、その約 2 μ L を HPLC に注入して、クロマトグラムを採取した。移動相はアセトニトリル/20 mmol/L リン酸二水素カリウム水溶液の混合液 (30/70, v/v) を使用した。流速は、CSP-4 を使用した *N*-ダンシルバリンの場合 0.7 mL/min、フラバノン、シクロペントラート及びテルブタリンの場合 0.9 mL/min、トルペリゾンと CSP-4C を用いたすべての試料の場合 1 mL/min とした。Table 4-1 には、クロマトグラムから算出した各試料の分離係数と保持係数を、Fig. 4-4 には、*N*-ダンシルバリン、フラバノン及びシクロペントラートクロマトグラムの比較を示した。

第四章第三節に関する実験

Fig. 4-5 に関する実験

CSP-4 を充填したカラムを用いて HPLC 測定を行った。試料は、クロルタリドン及びクリダナクのラセミ体を各約 2 mg/ml のメタノール溶液とし、その約 2 μ L を HPLC に注入して、クロマトグラムを採取した。移動相は、アセトニトリル/20 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 3.0 又は 3.5) を使用し、その組成は Fig. 4-5 に記載した。流速はクロルタリドンの場合 0.5 mL/min、クリダナクの場合 0.7 mL/min とした。

Fig. 4-7 に関する実験

CSP-4 を充填したカラムを用いて、HPLC 測定を行った。試料は、馬尿酸、*o*-メチル馬尿酸、*m*-メチル馬尿酸及び *p*-メチル馬尿酸を各約 2 mg/mL のメタノール溶液とし、その約 2 μ L を HPLC に注入して、クロマトグラムを採取した。移動相はメタノール/水/酢酸の混合液 (70/30/1.5, v/v/v) を使用し、流速は 0.8 mL/min とした。各試料をそれぞれ単独で測定して溶出順を確認した。Fig. 4-7 には 4 成分混合のクロマトグラムを示した。

第五章第一節に関する実験

Fig. 5-1 に関する実験

水酸基をアセチル化したシクロデキストリン形キラル固定相 CSP-5 は、以下の方法で調製した。CSP-4 の充填剤約 12 g に、ピリジン 240 mL を加え懸濁させ、無水酢酸 60 mL を加えて攪拌した。反応液を濾過し、濾上物をテトラヒドロフランで洗浄した。得られた固体にメタノール 300 mL を加え懸濁させ攪拌した。反応液を濾過した後、乾燥して CSP-5 の充填剤を得た。得られた充填剤を内径 4.6 mm、長さ 250 mm のステンレス製カラムにスラリー充填した。

第五章第二節に関する実験

Fig. 5-2 に関する説明

CSP-5 を評価するための試料 22 化合物の構造式を示した。1-フェニルエチルアミン、1,2-ジフェニルエチルアミン、1-フェニル-2-(*p*-トリル)エチルアミン、2-アミノ-1,2-ジフェニルエタノール、フェニルグリシノール、フェニルアラニノール、ノルエフェドリン、2-アミノ-1-フェニルエタノール、ノルフェニレフリン、オクトパミン、ノルアドレナリン、アドレナリン、シネフリン、イソプロテレノール、エチレフリン、3-フェニルセリン、フェニルアラニン、トリプトファン、トルペリゾン、 α -ブromo- γ -ブチロラクトン、フラバノン及びヒドロベンゾインは、何れも市販試薬のラセミ体を用いた。

Table 5-1 及び Table 5-2 に関する実験

CSP-4 及び CSP-4C を充填したカラムを用いて、HPLC 測定を行った。試料は、Fig. 5-2 に示す化合物をそれぞれ約 1~10 mg/mL のメタノール溶液とし、その約 2 μ L を HPLC に注入して、クロマトグラムを採取した。移動相は、メタノール/20 mmol/L リン酸緩衝液の混合液 (pH 3.0)、20 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 3.0) 単独、20 mmol/L リン二水素カリウム水溶液単独、メタノール/20 mmol/L 酢酸アンモニウム水溶液の混合液、メタノール/水の混合液、アセトニトリル/水の混合液の何れかを使用し、その組成は Table 5-1 に記載した。流速は何れも 0.5 mL/min とした。Table 5-1 には、クロマトグラムから算出した各試料の分離係数と保持係数を示した。Table 5-2 には、4 種の化合物群ごと (第一級アミンとアミノアルコール、第二級アミンとアミノアルコール、アミノ酸及び中性化合物) に、分離係数 1.07 以上で分離した化合物の割合を示した。

Fig. 5-3 に関する実験

CSP-4 及び CSP-5 を充填したカラムを用いて、HPLC 測定を行い、両者のクロマトグラムを比較した。試料は、(a)フラバノンのラセミ体及び(b)ノルエフェドリンの(*RS/SR*)の混合物をそれぞれ、2 mg/mL のメタノール溶液とし、その約 1 μ L を HPLC に注入して、クロマトグラムを採取した。移動相は、(a) アセトニトリル/水の混合液 (40/60, v/v)、(b) メタノール/20 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 3.0)混合液 (2/98, v/v)、紫外分光光度検出器の波長は、(a) 254 nm、(b) 210 nm、流速は何れも 0.5 mL/min とした。

Fig. 5-4 に関する説明

Table 5-2 に記載した結果のうち、オクトパミン、シネフリン、ノルアドレナリン及びアドレナリンの構造式と分離係数を再掲した。

第五章第三節に関する実験

Fig. 5-5 に関する実験

CSP-5 を充填したカラムを用いて、HPLC 測定を行った。試料は、(a)1,2-ジフェニルエチルアミン、(b)1-フェニル-2-(*p*-トリルエチル) アミンのラセミ体、及び(c)ノルエフェドリンの(*RS/SR*)混合物をメタノール溶液とし、クロマトグラムを採取した。移動相はメタノール/20 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 3.0)混合液を使用し、その組成は Fig. 5-5 に記載した。流速は 0.5mL/min とした。試料濃度、注入量及び紫外分光光度検出器の波長は、それぞれ、次の様に設定した、(a) 2 mg/mL、1 μ L、254 nm、(b) 10 mg/mL、1 μ L、210 nm、(c) 2 mg/mL、1 μ L、210 nm。

Fig. 5-6 に関する実験

CSP-5 を充填したカラムを用いて、HPLC 測定を行った。試料は、アドレナリン及びイソプロテレノールの各ラセミ体をそれぞれ約 2 mg/mL のメタノール溶液とし、その約 2 μ L を HPLC に注入して、クロマトグラムを採取した。移動相は 20 mmol/L リン酸二水素カリウム水溶液を使用し、流速は 0.5 mL/min とした。

Fig. 5-7 に関する実験

CSP-5 を充填したカラムを用いて、HPLC 測定を行った。メタノールとリン酸緩衝液の混合液 (2/98, v/v) において、リン酸緩衝液の pH を 3.0、4.0、5.0、6.0 及び 7.0 とした 5 種類の移動相を使用し、流速は 0.5 mL/min とした。試料は、ノルエフェドリンの(*RS/SR*)混合物を約 2 mg/ml のメタノール溶液とし、その約 1 μ L を HPLC に注入して、クロマトグラムを採取した。各移動相で得られた分離係数及び保持係数 (後出成分) を図にプロットした。

Fig. 5-8 に関する実験

CSP-4 を充填したカラムを用いて、HPLC 測定を行い、得られたクロマトグラムを示した。試料は、ヒスタミン、チラミン、2-フェネチルアミン及びトリプタミンを約 0.25 mg/mL のメタノール溶液とし、その約 2 μ L を HPLC に注入して、クロマトグラムを採取した。移動相はアセトニトリル/20 mmol/L 酢酸アンモニウム水溶液の混合液 (75/25, v/v)を使用し、流速は 0.5 mL/min、紫外分光光度検出器の波長は 210 nm とした。4 成分混合試料とそれぞれ単独で HPLC 測定を実施し、溶出順を確認した。

第五章第四節に関する実験

Table 5-3 に関する実験

CSP-3 及び CSP-5 を充填したカラムを用いて、HPLC 測定を行った。試料は、1-(1-ナフチル)エチルアミン、1-(2,4-ジクロロフェニル)エチルアミン、1-(3-クロロフェニル)エチ

ルアミン、1-(4-クロロフェニル)エチルアミン、1-(4-ブロモフェニル)エチルアミン、1-(*p*-トリル)エチルアミン、1-フェニルエチルアミン、1,2-ジフェニルエチルアミン及び1-フェニル-2-(*p*-トリル)エチルアミンの各ラセミ体を、それぞれ約 2 mg/mL のメタノール溶液とし、その約 1 μ L を HPLC に注入して得られたクロマトグラムから算出した各化合物の分離係数と保持係数を示した。移動相はメタノール/過塩素酸水溶液の混合液 (pH 1.7)、又はメタノール/20 mmol/L リン酸二水素ナトリウム水溶液の混合液を使用し、その組成は Table 5-3 に記載した。流速は何れも 0.5 mL/min とした。測定した試料のうち、3 種の化合物の光学活性体、(*R*)-1-フェニルエチルアミン及び(*S*)-1-フェニル-2-(*p*-トリル)エチルアミン、(*R*)-1-(*p*-トリル)エチルアミン及び(*R*)-1-(1-ナフチル)エチルアミンを用いて、同じ HPLC 条件下で測定を実施し、保持時間からピークを同定して鏡像異性体の溶出順を確認した。

Fig. 5-9 に関する説明

CSP-3 のキラルセクターである擬 18-クラウン-6-エーテルの構造式及び CSP-5 のキラルセクターである β -シクロデキストリンの構造イメージを示し、それらの空孔サイズを記載した。また、ゲストの 1-フェニルエチルアミンの構造式をほぼ同縮尺で示した。

Fig. 5-10 に関する実験

Table 5-3 で測定した化合物のうち、CSP-3 を用いた 1-(2,4-ジクロロフェニル)エチルアミン及び CSP-5 を用いた 1-(3-クロロフェニル)エチルアミンのクロマトグラムを示した。

第六章第二節に関する実験

Fig. 6-2 に関する実験

キラル固定相 CSP-6 は、以下の方法で調製した。ポリジフェニルアセチレン誘導体の一方巻きらせんポリマー $\underline{1}$ は、既に報告されている方法^{79),80)} に準拠して、住化分析センターにて合成された化合物を用いた (分子量 $M_n = 1.7 \times 10^4$ 、 $M_w/M_n = 4.5 \times 10^4$ 、CD (circular dichroism) スペクトル $\Delta\epsilon = -22.2$ ($\lambda_{ex} 396 \text{ nm}$))。次に側鎖のカルボキシル基を以下の方法で、(*R*)-ナフチルエチルアミド化した。らせんポリマー $\underline{1}$ 約 1.9 g をジメチルスルホキシド/水 (5/1) 約 380 mL に溶解し、(*R*)-ナフチルエチルアミン 4.5 mL 及び 4-(4,6-ジメトキシ-1,3,5-トリアジン-2-イル)-4-メチルモルホリニウムクロリド (DMT-MM) 約 12 g を加え、室温で 24 時間攪拌した。析出した固体を遠心分離により回収した後、洗浄する事により化合物 (CSP-6 のキラルセクター $\underline{2}$) の黄褐色固体約 3.5 g を得た。

次に、得られた光学活性らせんポリマー $\underline{2}$ を、表面多孔性 (コアシェル) シリカゲル (粒子径 2.6 μm 、平均細孔径 28.5 nm、比表面積 39.2 m^2/g) に、以下の方法で物理的に吸着させた。まず、 $\underline{2}$ の約 0.25 g をテトラヒドロフラン 7 mL に溶解させた。この液の数滴を

コアシェルシリカゲル 1 g に滴下し、激しく振り混ぜた。この操作を数回繰り返す、エバポレーターにてテトラヒドロフランを留去した。この滴下、振り混ぜ、留去の操作を繰り返す、先に調製したテトラヒドロフラン溶液を全量コーティングした。これを乾燥して、CSP-6 の充填剤を得た。これを、内径 3.0 mm、長さ 150 mm のステンレス管に湿式スラリー法により充填した。

Fig. 6-3 に関する実験

CSP-6 を評価するための試料として、2 位に置換基を有するエチルベンゼン誘導体の基本構造式を示した。使用した試料は、(a) 1-フェニルエタノール (R=OH)、(b) 2-フェニルプロピオン酸 (R=COOH)、(c) 酢酸 α -メチルベンジル (R=OCOCH₃)、(d) 2-フェニルプロピオニトリル (R-CN)、(e) 1-フェニルエチルアミン (R=NH₂) の各ラセミ体で、それぞれ約 2 mg/mL のメタノール溶液とし、その約 2 μ L を HPLC に注入して、分離係数と保持係数を算出した。移動相は、(a) 2-プロパノール/*n*-ヘキサン混合液 (5/95, v/v)、(b) 2-プロパノール/*n*-ヘキサン/トリフルオロ酢酸混合液 (1/99/0.1, v/v/v)、(c) 及び (d) 2-プロパノール/*n*-ヘキサン混合液 (1/99, v/v)、(e) 2-プロパノール/*n*-ヘキサン/トリフルオロ酢酸混合液 (10/90/0.1, v/v) を使用し、流速は 0.2 mL/min とした。

第六章第三節に関する実験

Table 6-1、Table 6-2 及び Fig. 6-4 に関する実験

CSP-6 を充填したカラムを用いて、HPLC 測定を行った。試料は、1-フェニルエタノール、1-フェニル-1-プロパノール、1-フェニル-1-ブタノール、1-フェニル-1-ペンタノール、1-フェニル-2-プロパノール、1-(*p*-トリル)エタノール、1-(4-クロロフェニル)エタノール、1-(2-クロロフェニル)エタノール、1-(3-クロロフェニル)エタノール及び 1-(1-ナフチル)エタノールの各ラセミ体をそれぞれ約 2 mg/mL の 2-プロパノール溶液とし、その約 2 μ L を HPLC に注入してクロマトグラムを採取した。移動相は 2-プロパノール/*n*-ヘキサン混合液 (5/95, v/v) を使用し、流速は 0.2 mL/min とした。Table 6-1、Table 6-2 に各化合物の分離係数及び保持係数を、Fig. 6-4 にそのうち 3 化合物のクロマトグラムを示した。

Table 6-3、Table 6-4 及び Fig. 6-5 に関する実験

CSP-6 を充填したカラムを用いて、HPLC 測定を行った。試料は、2-フェニル-2-ブタノール、1-フェニル-1-プロパノール、2-フェニル-4-ペンテン-2-オール、1-フェニル-3-ブテン-1-オール、2-フェニル-1-プロパノール及び 2-フェノキシプロパノールの各ラセミ体をそれぞれ約 2 mg/ml の 2-プロパノール溶液とし、その約 2 μ L を HPLC に注入してクロマトグラムを採取した。移動相は 2-プロパノール/*n*-ヘキサン (5/95, v/v) 混合液を使用し、流速は 0.2 mL/min とした。Table 6-3、Table 6-4 に各化合物の分離係数及び保持係数を、

Fig. 6-5 にそのうち 3 化合物のクロマトグラムを示した。

Table 6-5 及び Fig. 6-6 に関する実験

CSP-6 を充填したカラムを用いて、HPLC 測定を行った。試料は、*N*-ベンズイルロイシン、*N*-アセチルロイシン、*trans*-スチルベンオキシド、パントラクトン及び 2-フェニルシクロヘキサノンの各ラセミ体をそれぞれ約 2 mg/mL の 2-プロパノール溶液とし、その約 2 μ L を HPLC に注入して、クロマトグラムを採取した。移動相はエタノール/*n*-ヘキサン/トリフルオロ酢酸の混合液、又は 2-プロパノール/*n*-ヘキサンの混合液を使用し、その組成は Table 6-5 に記載した。流速は 0.2 mL/min とした。Table 6-5 に各化合物の分離係数及び保持係数を、Fig. 6-6 にそのうち 3 化合物のクロマトグラムを示した。

Fig. 6-7 に関する実験

CSP-6 を充填したカラムを用いて、HPLC 測定を行った。移動相として、2-プロパノール/*n*-ヘキサン (5/95, v/v) 及びエタノール/*n*-ヘキサン混合液 (5/95, v/v) を使用して両者の比較を行った。流速は 0.2 mL/min とした。試料は、*trans*-2-フェニル-1-シクロヘキサノールのラセミ体約 2 mg/mL の 2-プロパノール溶液とし、その約 2 μ L を HPLC に注入してクロマトグラムを採取した。

Fig. 6-8 に関する実験

CSP-6 を充填したカラムを用いて、HPLC 測定を行い、カラムの耐久性を確認した。移動相としてエタノール/*n*-ヘキサン混合液 (5/95, v/v) を用い、流速を 0.2 mL/min とし、約 200 時間経過するまで連続して通液した。試料は、*trans*-2-フェニル-1-シクロヘキサノールのラセミ体を約 2 mg/mL の 2-プロパノール溶液とし、通液時間 0~200 時間の間に数回、試料溶液の 2 μ L を HPLC に注入してクロマトグラムを採取した。それぞれ、測定時間ごとにクロマトグラムから算出した分離係数及び保持係数を図にプロットした。

参考文献

- 1) 日本産業規格. JIS G 0214, 分析化学用語 (クロマトグラフィー部門) . (2013)
- 2) 大井尚文. キラル化合物の分析. 丸善 (2001)
- 3) 今井一洋, 津田孝雄, 後藤順一 (監修) . キラル分離の理論と実際—分離例集 データリスト. 学会出版センター (2002)
- 4) 吉岡龍藏 (監修) . 光学活性医薬品開発とキラルプロセス化学技術—法規制・特許・品質管理・工業化の留意点—. サイエンス&テクノロジー (2011)
- 5) 徳永恵津子, 柴田哲男. サリドマイド研究のパラドックス 光学異性体の自己不均一化現象. *ファルマシア*, **56**, 330-334 (2020)
- 6) Blaschke G., Kraft. H. P., Fickentscher K., Köhler F. Chromatographic separation of racemic thalidomide and teratogenic activity of its enantiomers. *Arzneim. Forsch.*, **29**, 1640-1642 (1979)
- 7) 橋本祐一. サリドマイドの過去・現在・未来. *ファルマシア*, **39**, 315-319 (2003)
- 8) Nishimura K., Hashimoto Y., Iwasaki S. (*S*)-Form of α -methy-N(α)- phthalimidoglutarimide, but not its (*R*)-form, enhanced phorbol ester-induced tumor necrosis factor- α production by human leukemia cell HL-60. implication of optical resolution of thalidomidal effects. *Chem. Pharm. Bull.*, **42**, 1157-1159 (1994)
- 9) 大井尚文. キラルクロマトグラフィーのあゆみ. 丸善 (2001)
- 10) Pirkle W. H., House D. W., Finn J.M. Broad spectrum resolution of optical isomers using chiral high-performance liquid chromatographic bonded phases. *J. Chromatogr.*, **192**, 143-158 (1980)
- 11) 大井尚文, 北原一, 土井侃, 山本征也. 高速液体クロマトグラフィーによる光学異性体分離用の新しい固定相としての光学活性アミノ酸及びアミンの尿素誘導体. *分析化学*, **32**, 345-346 (1980)
- 12) Oi N., Kitahara H. Enantiomer separation by HPLC with some urea derivatives of L-valine as novel chiral stationary phases. *J. Liq. Chromatogr.*, **9**, 511-517 (1986)
- 13) Oi N., Kitahara H., Matsumoto Y., Nakajima H., Horikawa Y. (*R*)-N-(3,5-dinitrobenzoyl)-1-naphthylglycine as achiral stationary phase for the separation of enantiomers by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **462**, 382-386 (1989)
- 14) Oi N., Kitahara H., Kira R. Enantiomer separation of pyrethroid insecticides by high-performance liquid chromatography with chiral stationary phases. *J. Chromatogr.*, **515**, 441-450 (1990)
- 15) Oi N., Kitahara H., Kira R. Elution orders in the separation of enantiomers by high-performance liquid chromatography with some chiral stationary phases. *J. Chromatogr.*, **535**, 213-227 (1990)
- 16) 大井尚文. 低分子系キラル固定相を用いる HPLC による光学異性体分離.

- Chromatography*, **14**, 61R-70R (1993)
- 17) Davankov V. A., Rogozhin S. V. Ligand chromatography as a novel method for the investigation of mixed complexes: stereoselective effects in α -amino acid copper(II) complexes. *J. Chromatogr.*, **60**, 280-283 (1971)
 - 18) Davankov V. A., Bochkov A. S., Kurganov A. A., Roumeliotis P., Unger K. K. Separation of unmodified α -amino acid enantiomers by reverse phase HPLC. *Chromatographia*, **13**, 677-685 (1980)
 - 19) Oi N., Kitahara H., Kira R. Direct separation of enantiomers by highperformance liquid chromatography on a new chiral ligand-exchange phase. *J. Chromatogr.*, **592**, 291-296 (1992)
 - 20) Armstrong D. W., DeMond W. Cyclodextrin bonded phases for the liquid chromatographic separation of optical, geometrical, and structural isomers. *J. Chromatogr. Sci.*, **22**, 411-415 (1984)
 - 21) Hinze W. L., Riehl T. E., Armstrong D. W., DeMond W., Alak A., Ward T. Liquid chromatographic separation of enantiomers using a chiral beta.-cyclodextrin- bonded stationary phase and conventional aqueous-organic mobile phases. *Anal. Chem.* **57**, 237-242 (1985)
 - 22) Armstrong D. W., DeMond W., Czech B.P. Separation of metallocene enantiomers by liquid chromatography: chiral recognition via cyclodextrin bonded phases. *Anal. Chem.*, **57**, 481-484 (1985)
 - 23) Armstrong D. W., Stalcup A. M., Hilton, M. L. Duncan J. D., Faulkner J. R., Chang S. C. Derivatized cyclodextrins for normal-phase liquid chromatographic separation of enantiomers. *Anal. Chem.*, **62**, 1610-1615 (1990)
 - 24) Stalcup A. M., Chang S.C., Armstrong D.W. (*S*)-2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin, a new chiral stationary phase for reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **513**, 181-194 (1990)
 - 25) Berthod A., Jin H. L., Beesley T. E., Duncan J. D., Armstrong D. W. Cyclodextrin chiral stationary phases for liquid chromatographic separations of drug stereoisomers. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **8**, 123-130 (1990)
 - 26) Kyba E. B., Koga K., Sousa L. R., Siegel M. G., Cram D. J. Chiral recognition in molecular complexing. *J. Am. Chem. Soc.*, **95**, 2692-2693 (1973)
 - 27) Sogah G. D. Y., Cram D. J. Total chromatographic optical resolutions of α -amino acid and ester salts through chiral recognition by a host covalently bound to polystyrene resin. *J. Am. Chem. Soc.*, **98**, 3038-3041 (1976)
 - 28) Sousa L. R., Sogah G. D. Y., Hofmann D. H., Cram D. J. Host-guest complexation. 12. Total optical resolution of amine and amino ester salts by chromatography. *J. Am. Chem. Soc.*, **100**, 4569-4576 (1978)

- 29) Sogah G. D. Y., Cram D. J. Host-guest complexation. 14. Host covalently bound to polystyrene resin for chromatographic resolution of enantiomers of amino acid and ester salts *J. Am. Chem. Soc.* **101**, 3035-3042 (1979)
- 30) Armstrong D.W., Liu Y., Ekborgott K.H. A covalently bonded teicoplanin chiral stationary phase for HPLC enantioseparations. *Chirality*, **7**, 474-497 (1995)
- 31) Berthod A., Nair U. B., Bagwill C., Armstrong D. W. Derivatized vancomycin stationary phases for LC chiral separations. *Talanta*, **43**, 1767-1782 (1996)
- 32) Hesse G., Hegel R. Eine vollständige recemattennung durch eluitons-chromagographie an cellulose-tri-acetat. *Chromatographia*, **6**, 277-280 (1973)
- 33) Okamoto Y., Kawashima M., Yamamoto K., Hatada K. Useful chiral packing materials for high-performance liquid chromatographic resolution. Cellulose triacetate and tribenzoate coated on macroporous silica gel. *Chem. Lett.*, **1984**, 739-742 (1984)
- 34) Okamoto Y., Kawashima M., Hatada K. Useful chiral packing materials for high-performance liquid chromatographic resolution of enantiomers: phenylcarbamates of polysaccharides coated on silica gel. *J. Am. Chem. Soc.* **106**, 5357-5359 (1984)
- 35) Okamoto Y., Aburatani R., Fukumoto T, Hatada K. Useful chiral stationary phases for HPLC. Amylose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) and tris(3,5-dichlorophenyl- carbamate) supported on silica gel, *Chem. Lett.*, **16**, 1857-1860 (1987)
- 36) Okamoto Y, Ikai T. Chiral HPLC for efficient resolution of enantiomers. *Chem. Soc. Rev.* **37**, 2593-2608 (2008)
- 37) Ikai T., Okamoto Y. Structure control of polysaccharide derivatives for efficient separation of enantiomers by chromatography. *Chem. Rev.*, **109**, 6077-6101 (2009)
- 38) Shen J., Okamoto Y. Efficient separation of enantiomers using stereoregular chiral polymers. *Chem. Rev.*, **116**, 1094-1138 (2016)
- 39) Tachibana T., Ohnishi A. Reversed-phase liquid chromatographic separation of enantiomers on polysaccharide type chiral stationary phases. *J. Chromatogr. A.*, **906**, 127-154 (2001)
- 40) Hermansson J. Direct liquid chromatographic resolution of racemic drugs using α_1 -acid glycoprotein as the chiral stationary phase, *J. Chromatogr.*, **269**, 71-80 (1983)
- 41) Miwa T., Ichikawa M, Tsuno M, Hattori T, Miyakawa T, Kayano M, Miyake Y. Direct liquid chromatographic resolution of racemic compounds. Use of ovomucoid as a column ligand. *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 682-686 (1987)
- 42) Felix G., Berthod A. Commercial chiral stationary phases for the separations of clinical racemic drugs. *Sep. Purif. Rev.*, **36**, 285-481 (2007)
- 43) Leyder N. B., Truffert J.-C., Tambuté A., Caude M. Evaluation of Pirkle-type chiral stationary phases by liquid and supercritical fluid chromatography. Influence of the spacer length and the

- steric hindrance in the vicinity of the stereogenic centre. *J. Chromatogr. A.*, **666**, 27-40 (1994)
- 44) Hyun M.H., Kim D.H. Spacer length effect of a chiral stationary phase based on (+)-(18-crown-6)-2,3,11,12-tetracarboxylic acid. *Chirality*, **16**, 294-301 (2004)
- 45) Berthod A., Chang C-D., Armstrong D.W. β -Cyclodextrin chiral stationary phases for liquid chromatography. Effect of the spacer arm on chiral recognition. *Talanta*, **40**, 1367-1373 (1993)
- 46) Lai X., Tang W., Ng S-C. Novel β -cyclodextrin chiral stationary phases with different length spacers for normal-phase high performance liquid chromatography enantioseparation. *J. Chromatogr. A.*, **1218**, 3496-3501 (2011)
- 47) Machida Y., Nishi H., Nakamura K., Nakai H., Sato T. Enantiomer separation of amino compounds by a novel chiral stationary phase derived from crown ether. *J. Chromatogr. A.*, **805**, 85-92 (1998)
- 48) Shinbo T., Yamaguchi T., Nishimura K., Sugiura M. Chromatographic separation of racemic amino acids by use of chiral crown ether-coated reversed-phase packings. *J. Chromatogr.*, **405**, 145-153 (1987)
- 49) ダイセル株式会社. CROWNPAK[®] CR(+)/CR(-) カラム取扱説明書.
<https://www.daicelchiral.com/img/mainpage/column/data/manual/ab042c9e01be1dbb8029b8d7783f4d92.pdf>
- 50) Naemura K., Nishioka K., Ogasahara K., Nishikawa Y., Hirose K., Tobe Y. Preparation and temperature-dependent enantioselectivities of homochiral phenolic crown ethers having aryl chiral barriers: thermodynamic parameters for enantioselective complexation with chiral amines. *Tetrahedron Asymmetry*, **9**, 563-574 (1998)
- 51) Naemura K., Nishikawa Y., Fuji J., Hirose K., Tobe Y. Preparation of homochiral phenolic crown ethers containing *para*-substituted phenol moiety and chiral subunits derived from (*S*)-1-phenylethane-1,2-diol: their chiral recognition behaviour in complexation with neutral amines. *Tetrahedron Asymmetry*, **8**, 873-882 (1998)
- 52) Naemura K., Matsunaga K., Fuji J., Ogasahara K., Nishikawa Y., Hirose K., Tobe Y. Temperature dependence of enantioselectivity in complexations of optically active phenolic crown ethers with chiral amines in solution. *Anal. Sci.*, **14**, 175-182 (1998)
- 53) 澤田正實, 萩田耕司, 今村浩之, 田淵啓之, 淀谷真也, 梅田真記, 高井嘉雄, 山田等, 山岡寛史, 広瀬敬治, 戸部義人, 田中嘉一, 高橋成年. 有機アミン塩類に対するクラウンエーテル類のキラル認識能: エナンチオマー標識ゲスト法を用いる FAB マススペクトロメトリー. *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **48**, 323-332 (2000)
- 54) 澤田正實. FAB マススペクトロメトリーを用いるキラル分子認識の研究. *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **45**, 439-458 (1997)

- 55) Hyun M.H. Development and application of crown ether-based HPLC chiral stationary phases. *Bull. Korean Chem. Soc.*, **26**, 1153-1163 (2005).
- 56) 三國克彦. サイクロデキストリン・分岐サイクロデキストリン. *食品と容器*, **52**, 264-273 (2011)
- 57) Kirkland J. J., Henderson J. W., Martosella J. D., Bidlingmeyer B. A., Vista-Russell J., Adams J. B. A highly stable alkyl-amide silica-based column packing for reversed-phase HPLC of polar and ionizable compounds. *LC GC*, **17**, 634-639 (1999)
- 58) Kim M., Kim S-I., Han J., Wang X-L., Song D.G., Kim S-U. Stereospecific Biotransformation of Dihydrodaidzein into (3S)-Equol by the Human Intestinal Bacterium Eggerthella Strain Julong 732. *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**, 3062-3068 (2009).
- 59) Tzounis I. X., Vulevic J., Kuhnle G.G.C., George T., Leonczak J., Gibson G. R., Kwik-Uribe C., Spencer J. P. E. Flavanol monomer-induced changes to the human faecal microflora. *Br. J. Nutr.*, **99**, 782-792 (2008)
- 60) Kim M., Kim S-U., Kim Y., Han J. Absolute Configurations of (±)-Glabridin Enantiomers. *Bull. Korean Chem. Soc.*, **30**, 415-418 (2009)
- 61) Yasuda K., Ikushiro S., Wakayama S., Itoh T., Yamamoto K., Kamakura M., Munetsuna E., Ohta M., Sakaki T. Comparison of metabolism of sesamin and episesamin by drug-metabolizing enzymes in human liver. *Drug. Metab. Dispos.* **40**, 1917-1926 (2012)
- 62) ジーエルサイエンス株式会社. LC Technical Note, LT084.
<https://www.gls.co.jp/viewfile/?p=LT084>
- 63) Matsuzawa H., Mikami K. Highly efficient discrimination of fluorous tags by β -cyclodextrin columns: new isolation method for fluorous mixture synthesis. *Synlett.*, **10**, 1607-1612 (2002)
- 64) Matsuzawa H., Mikami K. Efficient enantiomeric resolution via introduction of a fluorous tag as a resolving reagent with β -cyclodextrin columns: model study on fluorinated O-acetylmandelate and ibuprofen amide. *Tetrahedron Lett.*, **44**, 6227-6230 (2003)
- 65) シグマアルドリッチジャパン. CYCLOBOND、キラル分離と高選択的なアキラル分離のためのシクロデキストリン固定相.
<https://www.sigmaaldrich.com/japan/analytical-chromatography/hplc/chiral-astec/cyclobond.html>
- 66) Grüner B., Holub J., Plešek J., Vaněk T., Votavová H. High-performance liquid chromatographic enantiomeric resolution in the ten-vertex carboraneseries: comparison of acetyl- and native β -cyclodextrin bonded chiral stationary phases. *J. Chromatogr. A*, **793**, 249-256, (1998)
- 67) Han X., Yao T., Liu Y., Larock R. C., Armstrong D. W. Separation of chiral furan derivatives by liquid chromatography using cyclodextrin-based chiral stationary phases. *J. Chromatogr. A*, **1063**, 111-120 (2005)
- 68) 吉岡宏輔, 宮本純之. 合成ピレスロイド. *化学と生物*, **14**, 427-434 (1976)

- 69) Wang S.-M., Lewis R.J., Canfield D., Li T.-L., Chen C.-Y., Liu R.H. Enantiomeric determination of ephedrine and norephedrine by chiral derivatization gas chromatography–mass spectrometry approaches. *J. Chromatogr. B*, **825**, 88-95 (2005)
- 70) 宮武ノリエ、三宅啓文、長嶋真知子、高橋美佐子、安田和男、安田一郎. キャピラリー電気泳動による「脱法ドラッグ」中のエフェドリン類の光学異性体分離分析. *薬学雑誌*, **124**, 333-339 (2004)
- 71) Zhang X.H., Ouyang J., Yang Y.P. A simple method for chiral separation of ephedrine using (*R*)-1-naphthylglycine and 3,5-dinitrobenzoic acid as stationary phase. *Anal. Lett.* **34**, 1851-1864 (2001)
- 72) Zhang T., Franco P., Hamasaki R., Miyamoto S., Ohnishi A., Murakami T. Complementary enantioselective recognition patterns and specific method optimization aspects on immobilized polysaccharide-derived chiral stationary phases. *J. Chromatogr. A*, **1269**, 178-188 (2012)
- 73) 中村博, 濱弘哉. クラウンエーテルを用いる分子認識化学. *化学と教育*, **56**, 60-63 (2008)
- 74) 桑原哲夫. シクロデキストリンと無機イオンとの相互作用. *日本イオン交換学会誌*, **24**, 82-86 (2013)
- 75) 長江徳和. コアシェルカラム. *ぶんせき*, **2018-2**, 60-66 (2018)
- 76) Bell D. S., Majors R.E. Current state of superficially porous particle technology in liquid chromatography. *LCGC North America*, **33**, 386-395 (2015)
- 77) Lomsadze K., Jibuti G., Farkas T., Chankvetadze B. Comparative high-performance liquid chromatography enantioseparations on polysaccharide based chiral stationary phases prepared by coating totally porous and core-shell silica particles. *J. Chromatogr. A*, **1234**, 50-55 (2012)
- 78) Ismail O.H., Pasti L., Ciogli A., Villani C., Kocergin J., Anderson S., Gasparrini F., Cavazzini A., Catani M. Pirkle-type chiral stationary phase on core-shell and fully porous particles: Are superficially porous particles always the better choice toward ultrafast high-performance enantioseparations?. *J. Chromatogr. A*, **1466**, 96-104 (2016)
- 79) Maeda K., Maruta M., Sakai Y., Ikai T., Kanoh S. Synthesis of optically active poly(diphenylacetylene)s using polymer reactions and an evaluation of their chiral recognition abilities as chiral stationary phases for HPLC. *Molecules*, **21**, 1487(1-14) (2016)
- 80) Maeda K., Maruta M., Shimomura K., Ikai T., Kanoh S. Chiral recognition ability of an optically active poly(diphenylacetylene) as a chiral stationary phase for HPLC. *Chem. Lett.* **45**, 1063-1065 (2016)
- 81) Hamase K., Morikawa A., Etoh S., Tojo Y., Miyoshi Y., Zaitsev K. Analysis of small amounts of D-amino acids and the study of their physiological functions in mammals. *Anal. Sci.*, **25**, 961-968 (2009)

- 82) Hamase K., Miyoshi Y., Ueno K., Han H., Hirano J., Morikawa A., Mita M., Kaneko T., Lindner W., Zaitu K. Simultaneous determination of hydrophilic amino acid enantiomers in mammalian tissues and physiological fluids applying a fully automated micro-two-dimensional high-performance liquid chromatographic concept. *J. Chromatogr. A*, **1217**, 1056-1062 (2010)
- 83) 浜瀬健司. 実試料における微量 D-アミノ酸の二次元 HPLC 精密分析法. *生化学*, **82**, 150-154 (2010)
- 84) 株式会社住化分析センター. 技術資料、ようこそスミキラル OA へ (第 5 版) (2007). <https://www.scas.co.jp/instruments-products-synthesis/hplc-column/sumichiral-database/>
- 85) Yagi M., Shibukawa A., Nakagawa T. Direct injection analysis of ketoprofen enantiomers in plasma using column-switching high-performance liquid chromatography system. *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 2513-2517 (1990)
- 86) Mohri K., Okada K., Benet L.Z. Stereoselective metabolism of benoxaprofen in rats. Biliary Excretion of Benoxaprofen Taurine Conjugate and Glucuronide. *Drug Metab Dispos.*, **26**, 332-337 (1998)
- 87) Yang G., Li Z., Wang D., Zhang Z., Liu E., Chen Y. Chiral separation of N-(trans-4-isopropylcyclohexylcarbonyl)-D,L-phenylalanine isomers by high performance liquid chromatography. *Chromatographia*, **56**, 515-518 (2002)
- 88) Sangaraju S., Rao B. M., Srinivas T., Rao N. S. A validated chiral LC method for the enantiomeric separation of nateglinide and the quantitative determination of its l-enantiomer. *Chromatographia*, **69**, 1123-1127 (2009)
- 89) Kiuchi M., Adachi K., Tomatsu A., Chino M., Takeda S., Tanaka Y., Maeda Y., Sato N., Mitsutomi N., Sugahara K., Chiba K. Asymmetric synthesis and biological evaluation of the enantiomeric isomers of the immunosuppressive FTY720-phosphate. *Bioorg. Med. Chem.*, **13**, 425-432 (2005)
- 90) U.S. Pharmacopeial Convention. The United States Pharmacopeia and The National Formulary, (2021). <https://www.usp.org/>
- 91) 厚生労働省. 第 17 改正日本薬局方. (2016) <https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000066530.html>