

HPLC用低分子型キラル固定相
における分離機構の解析

加藤 大

①

HPLC用低分子型キラル固定相における 分離機構の解析

加藤 大

【目次】

	page
略語表	1
第1章 緒言	3
第2章 HPLC用低分子型キラル固定相による光学分割機構の解析	6
2-1 序	6
2-2 SUMICHIRAL OA-2500(S)による光学分割機構	11
2-2-1 NBD-アミノ酸の光学分割	11
2-2-2 NBD-イミノ酸（アミノプロトンを持たない溶質）の光学分割	22
2-2-3 その他のアミン類の光学分割	24
2-2-4 移動相の影響についての検討	25
2-2-5 ¹ H-NMRスペクトルを利用した光学分割機構の解析	26
2-2-6 小括	37
2-3 SUMICHIRAL OA-3100による光学分割機構	39
2-3-1 NBD-アミノ酸の光学分割	39
2-3-2 その他のアミン類のNBD誘導体の光学分割	43
2-3-3 小括	43
2-4 SUMICHIRAL OA-4700による光学分割機構	45
2-4-1 NBD-アミノ酸の光学分割	45
2-4-2 その他のアミン類のNBD誘導体の光学分割	49
2-4-3 小括	49
第3章 HPLC用低分子型キラル固定相による相互分離機構の解析	50
3-1 序	50
3-2 アミノ基の効果	52
3-3 カルボキシ基の効果	52
3-4 ベンゾフラザン骨格の効果	54
3-5 2種類のアミノプロピルシリカカラムによる保持機構の比較	54
3-6 アルキル直鎖を導入した固定相によるNBD-アミノ酸の相互分離	55
第4章 アルキル直鎖を導入したキラル固定相の分離特性	58
4-1 序	58
4-2 アルキル直鎖を導入したキラル固定相によるNBD-アミノ酸の分離機構	60
4-3 アルキル直鎖を導入したキラル固定相による光学分割機構	68

4-4 光学活性部位の構造が異なったアルキル直鎖を導入した
キラル固定相による分離特性 74

4-5 アルキル直鎖を導入したキラル固定相の光学分割機構についての考察 77

第5章 総括 80

実験の部 81

引用文献 89

謝辞 91

【略語表】

本論文では、以下の略語を使用した。

ABD-	ABD (4-Aminosulfonyl-2,1,3-benzoxadiazole)の7位誘導体
Ala	アラニン (Alanine)
APCI	大気圧化学イオン化 (Atmospheric pressure chemical ionization)
aq	水溶液 (Aqua)
Arg	アルギニン (Arginine)
Asn	アスパラギン (Asparagine)
Asp	アスパラギン酸 (Aspartic acid)
Boc	ターシャリープトキシカルボニル (Tertiary butoxycarbonyl)
Ce	セリウム (Cerium)
d	重水素 (Deuterium)
DBD-	DBD (4-(<i>N,N</i> -Dimethylaminosulfonyl)-2,1,3-benzoxadiazole)の7位誘導体
DCC	<i>N,N</i> -Dicyclohexylcarbodiimide
DMAP	4-Dimethylaminopyridine
DNS-	ダンシル (1-(Dimethylamino)naphthalene-5-sulfonyl)誘導体
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride
EDTA · 2Na	エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム塩 (Disodium dihydrogen ethylenediamine tetraacetate dihydrate)
ESI	エレクトロスプレーイオン化 (Electrospray ionization)
GABOB	4-Amino-3-hydroxybutanoic acid
Gd	ガドリニウム (Gadolinium)
Gln	グルタミン (Glutamine)
Glu	グルタミン酸 (Glutamic acid)
Gly	グリシン (Glycine)
HBD-	HBD (2,1,3-Benzoxadiazole)の4位誘導体
His	ヒスチジン (Histidine)
Ho	ホルミウム (Holmium)
HOHAHA	Homonuclear Hartmann-Harn spectroscopy
HONB	<i>N</i> -Hydroxy-5-norbornene-2,3-dicarboxyimide
HPLC	高速液体クロマトグラフィー (High performance liquid chromatography)
Ile	イソロイシン (Isoleucine)
k	保持係数 (Capacity factor)
Leu	ロイシン (Leucine)
Lu	ルテチウム (Lutetium)
Lys	リジン (Lysine)
MeCN	アセトニトリル (Acetonitrile)
MeOH	メタノール (Methanol)
Met	メチオニン (Methionine)
N	理論段数 (Theoretical plate number)

<i>n</i> -	直鎖 (Normal)
Nagly	ナフチルグリシン (Naphthylglycine)
NBD-	NBD (7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazole) の 4 位誘導体
N(CH ₃) ₂	ジメチルアミド (Dimethylamide)
NH ₂	アミド (Amide)
NMR	核磁気共鳴 (Nuclear magnetic resonance)
NOESY	Nuclear Overhauser effect spectroscopy
NSAID	非ステロイド系抗炎症薬 (Non-steroidal anti-inflammatory drug)
OEt	エチルエステル (Ethylester)
OMe	メチルエステル (Methylester)
OOc	オクチルエステル (Octylester)
OPe	ペンチルエステル (Penthylester)
OtBu	ターシャリーブチルエステル (Tertiary butylester)
Phe	フェニルアラニン (Phenylalanine)
Phgly	フェニルグリシン (Phenylglycine)
Pro	プロリン (Proline)
R	気体定数 (Gas constant)
ROESY	Rotating frame nuclear Overhauser effect spectroscopy
S	Symmetry 係数
Ser	セリン (Serine)
Sm	サマリウム (Samarium)
T	絶対温度 (Absolute temperature)
TFA	トリフルオロ酢酸 (Trifluoroacetic acid)
THF	テトラヒドロフラン (Tetrahydrofuran)
Thr	トレオニン (Threonine)
Trp	トリプトファン (Tryptophan)
Tyr	チロシン (Tyrosine)
Val	バリン (Valine)
α	分離係数 (Separation factor)
λ_{em}	蛍光波長 (Emission)
λ_{ex}	励起波長 (Excitation)
σ_p	ハメット定数 (Hammett constant)

第1章 緒言

生体の構成成分や薬物などの生理活性物質の多くは、光学活性体であるため、それらの分布や動態を理解するには、光学活性体の高感度かつ高選択的な分離定量法が必要である。しかしながら光学活性体の物理的性質は、偏光面の回転方向を除けばまったく同一であり、光学活性体に対する化学反応性のみが異なる。従って、光学活性体の分離は、結晶形の相違（自然分晶）で区別できる化合物を除いては、光学活性な試薬や空間を使用することで初めて可能となる。実際にHPLCによって光学活性体を分離するには、光学活性な試薬と反応させて物理的、化学的性質の異なるジアステレオマーに変換し、通常の光学活性でない固定相を使用する（ジアステレオマー誘導体化法）か、光学活性な固定相（キラル固定相法）または光学活性な試薬を添加した移動相（キラル移動相法）を用いる[1-3]。当研究室に於いて、HPLC-キラル固定相法と蛍光検出を組み合わせた、高感度で簡便な生体試料中のDL-アミノ酸の定量法が開発された[4-6]。本法では、キラル固定相には、(S)-N-3,5-dinitrobenzoyl-1-Naglyを固定化したキラル固定相（SUMICHIRAL OA-2500(S)[7, 8] (CSP 1: Fig 1-1)）を使用している。CSP 1は、 π -acceptorとして3,5-dinitrobenzoyl基を有しており、このように3,5-dinitrobenzoyl chlorideとアミノ酸を縮合させた構造を有するキラル固定相は、Pirkle型キラル固定相と呼ばれ[9-11]、多くの光学異性体の光学分割に応用されている。そして特に π -donorを有するアミン、アルコール、アミノ酸、スルフォキシド等の化合物の光学分割に有効であることが報告されている[12-14]。

開発したDL-アミノ酸の定量法の移動相には、5 mMクエン酸メタノール溶液を、アミノ酸の蛍光誘導体化試薬には、NBD-F (4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole : Fig 1-2) [15]が使用されていた。NBD-Fは、試薬自身には蛍光が無く、アミノ酸と反応することで蛍光波長が530 nmの蛍光を発する。また生体内に存在する蛍光物質の励起波長と比較して、誘導体化されたNBD-アミノ酸の励起波長（470 nm）は長波長であることが知られている。これらを組み合わせたDL-アミノ酸の定量法の特徴としては、

- (1) キラル固定相の光学活性部位の立体配置を逆転することで、アミノ酸のDL体の溶出順が逆転するため、ピークの同定が容易である。
- (2) 溶出されるピークの理論段数が、他のキラル固定相（セルロースや蛋白質を固定化したキラル固定相）より高い。
- (3) 生体試料をメタノールで除蛋白し、蛍光誘導体化することでHPLCに注入できる。
- (4) 蛍光誘導体化条件が温和であり、NBD-アミノ酸は検出感度が高い。

が、挙げられる。しかしながら、幾つかの問題点も残されていた。

- (1) DL-アミノ酸の混合試料を分析した場合、光学分割されたNBD-アミノ酸のピークが別のNBD-アミノ酸のピークと重なるため、限られたアミノ酸の定量しかできない。
- (2) NBD-Cysは、その誘導体化によってアミノ基に加えてチオール基までも標識化されるため、2種類のピークが溶出する。
- (3) NBD-Trpは、蛍光物質でないため蛍光検出できない。

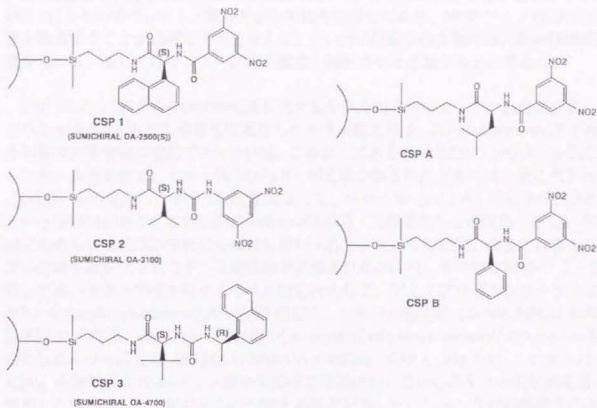


Fig. 1-1 Chemical structures of chiral stationary phases

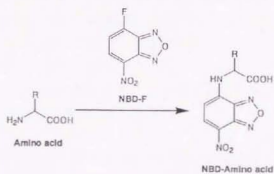


Fig. 1-2 Derivatization scheme of amino acids with NBD-F

(1)の問題点の克服には、CSP 1によるNBD-DL-アミノ酸の分離機構を明らかにし、CSP 1によるNBD-DL-アミノ酸の光学分割能を維持したまま、NBD-アミノ酸の相互の分離を改善することが必要であると考えた。(2),(3)の問題点の克服には、別の誘導体化試薬を用いる、もしくはインドール環を酸化し開裂させる必要があると考えた。

CSP 1のような3,5-dinitrobenzoyl基を有するキラル固定相によって、良好に光学分割された π -donorを有する溶質を固定化したキラル固定相は、3,5-dinitrobenzoyl基を有する溶質の光学分割に有効であった[16]。このようにある光学活性体((+)-A)を固定化したキラル固定相で、ラセミ体((+/-)-B)が光学分割されたときには、逆に光学活性な((+)-B)を固定化したキラル固定相によって、ラセミ体((+/-)-A)は光学分割されるという経験則があり、この法則はreciprocity[17]（互恵概念）と呼ばれ、新しいキラル固定相のための光学活性部位の探索に用いられてきた。その結果、今までに様々な光学活性体を固定化されたキラル固定相が開発されたが[1-3]、その中でNBD-アミノ酸に対して高い光学分割能を有するキラル固定相として、アミノプロピルシリカゲルに(S)-N-3,5-dinitrophenylaminocarbonyl-Valを固定化したキラル固定相(SUMICHIRAL-OA-3100[7, 8], CSP 2: Fig. 1-1)とN-[(R)-1-(α -naphthyl)ethylaminocarbonyl]-(S)-tert-Leuを固定化したキラル固定相(SUMICHIRAL-OA-4700[18] (CSP 3: Fig. 1-1))が知られていた[6]。生体試料中のDL-アミノ酸をNBD-Fで標識化し、これらのキラル固定相を用いて定量した場合でも、上記に示した特徴と問題点があった。しかしながら問題点の(1)については、ピークの重なるNBD-アミノ酸の種類が異なるため、定量可能なNBD-アミノ酸の種類が、CSP 1のときとは異なっていた[19]。そこで本論文の第2章では、これらのキラル固定相によるNBD-DL-アミノ酸の光学分割機構について検討し、第3章ではNBD-アミノ酸の相互分離の機構を検討した。第2、3章の検討からキラル固定相にアルキル直鎖を導入することで、NBD-DL-アミノ酸の分離が向上することが予想されたので、第4章において、アルキル直鎖を導入したキラル固定相を作製し、その分離特性を調べた。

第2章 HPLC用低分子型キラル固定相 による光学分割機構の解析

2-1 序

現在、数多くのHPLC用キラル固定相が市販されているが[2]、キラル固定相による光学分割機構の詳細は、良く分かっていないものが多い。そのため目的化合物の光学分割に適したキラル固定相を、市販のキラル固定相の中から選択するには、経験と類似化合物を分離している報告例が、頼りとなっている。従って各キラル固定相の光学分割機構を明らかにし、分離可能な溶質の構造を明らかにすることは、目的化合物の光学分割に適したキラル固定相の選択に役立つと考えられる。さらに光学分割機構の解明は、目的化合物の光学分割に適するようにキラル固定相の構造を設計する一助になると推測された。

本章では、当教室で開発したDL-アミノ酸分析法[4-6]に使用しているCSP 1, CSP 2, CSP 3による、NBD-アミノ酸を始めとした多くの溶質に対する光学分割機構について記す。

キラル固定相による光学異性体の光学分割機構は、1952年にDalglishによって提唱された『3点認識モデル (three-point interaction model)』[20]が、その基本原理として考えられている。Dalglishによる3点認識モデルでは、固定相と溶質それぞれの不斉炭素に結合する4つの単結合のうち、3つの異なる単結合に存在する構造が同時に相互作用することで、形成される複合体の安定化エネルギーが、溶質の光学異性体間で異なるため、光学分割が達成されると考えられていた(Fig. 2-1)。その後、複合体形成に関与する構造は、必ずしも不斉炭素から異なる単結合に存在する必要はなく、同じ単結合に存在する複数の構造が、相互作用することでも、複合体形成に同時に3つ以上の相互作用が関与していれば、光学分割されると考えられている[21-25]。従って、キラル固定相による溶質の光学分割機構を解明するには、光学分割に関与する固定相の光学活性部位と溶質との複合体構造、あるいは複合体形成に必要な相互作用を明らかにすることが必要であると考えられる。そして今までに数多くの研究グループによって、幾つかのキラル固定相については、下記の1~9の方法を用いて、溶質との間に形成される複合体構造が検討されている[26]。

- (1) 溶質の構造を変化させ、分離挙動に与える影響の解析[27]
- (2) 固定相の構造を変化させ、分離挙動に与える影響の解析[28]
- (3) 計算化学を用いた安定構造の解明[29]
- (4) QSERR(Quantitative Structure-Enantioselective Retention Relationships)による相互作用に必要な構造の解析[30]
- (5) ラマン分光ロメトリーによる水素結合部位の同定[31]
- (6) UVや蛍光分光ロメトリーによる π - π 相互作用部位の同定[26]
- (7) NMR分光ロメトリーによる水素結合部位および π - π 相互作用部位の同定[32]
- (8) X線結晶構造解析による複合体構造の解析[33]
- (9) MS分光ロメトリーによる相互作用に必要な構造の解析[34]

(1, 2)は、HPLCを用いて、固定相や溶質の構造を変化させ、構造の変化が溶質の分離係数に与える影響を調べることで、複合体形成に必要な構造を明らかにする方法である。

(3)の分子軌道計算では、固定相と溶質それぞれの分子軌道を、分子軌道計算に基づいて最適化し、最初に各分子についてエネルギー的に安定な立体構造を求める。その後、固定相と溶質の分子同士を接近させ、エネルギー的に安定な位置関係を明らかにすることで、固定相と溶質との複合体構造を明らかにしている。

(4)は、溶質の各構造を数値に変換し、その値と溶質の分離係数との間の関係を Neural Networksを用いて明らかにし、溶質の中で光学分割に必要な構造を明らかにする方法である。

(5-7)は、溶液状態で固定相と溶質との相互作用を明らかにする試みである。

(7)については、固体状態での固定相と溶質との相互作用の検討にも用いられている。

(8)は、固定相と溶質との混合試料の結晶構造を明らかにし、複合体構造の解明に役立てる。

(9)では、イオンの生成量の差異で、相互作用の形成のしやすさを見積もる。

以上の方法の中で今までに、CSP 1による光学分割機構の検討に使用されたのは、(1, 2)であった[5]。その報告によると、NBD-アミノ酸の光学分割には、NBD-アミノ酸のカルボキシ基やベンゾフラザン骨格が、CSP 1の光学活性部位との間に生じる相互作用が関与していた。CSP 1と構造が類似したキラル固定相の光学分割機構については他のグループが、(1-8)を用いて、検討している。例えばCSP 1のアミノ酸部位であるNaglyをLeu (CSP A)やPhgly (CSP B)に置換した構造を有するキラル固定相による、 π -donorを有する溶質の光学分割機構については、数多く報告されていた[26, 35, 36]。その結果(S)-N-3,5-dinitrobenzoyl-Leuを固定化したキラル固定相(CSP A)によるN-(2-naphthyl)-(S)-alanine methyl esterの光学分割には、Fig. 2-2で示すような複合体が関与していると考えられている[26]。複合体は、CSP Aの不斉炭素に結合したアミドプロトンと溶質のカルボニル酸素およびCSP Aの不斉炭素に結合したカルボニル酸素と溶質のアミノプロトンとの間のそれぞれの水素結合と、さらにCSP Aの3,5-dinitrophenyl基と溶質のナフタレン環との間のface to faceな π - π 相互作用によって形成されていた。さらにCSP Aによる π -donorを有する溶質の分離係数が1.0~1.5の間であることから、これらの溶質がCSP Aの光学活性部位との間に複合体を形成することで生じる安定化エネルギーの差は、0.5 kcal/mol以下 ($\Delta(\Delta G) = -RT \ln \alpha$, $\Delta \Delta G$: 光学異性体間での結合エネルギーの差, R: 気体定数, T: 絶対温度, α : 分離係数) [21]であると計算された。溶質の光学異性体間で、このような僅かなエネルギー差しか生じていないことから、Fig. 2-2に示したS体のキラル固定相とS体の溶質との間で形成される複合体(ホモキラルな複合体)と、S体のキラル固定相とR体の溶質との間で形成される複合体(ヘテロキラルな複合体)の構造は類似していると考えられた[29]。そしてホモキラルな複合体とヘテロキラルな複合体とは、複合体形成に関与する相互作用(水素結合や π - π 相互作用)の距離が僅かに異なるため、安定化エネルギーに差が生じ、その僅かなエネルギー差でN-(2-naphthyl)-(S)-alanine methyl esterは光学分割されていると推測されている[22]。

またCSP Bについても、その光学活性部位とN-ethyl-N-(1-naphthyl)acetamideは、上記

の複合体と共通の基本構造を持つ複合体を形成し、その最も安定な複合体が溶質の分離係数や溶出順を決定していることが、計算化学の結果から示された[37]。従ってキラル固定相による溶質の光学分割機構を解明するには、その光学分割に最も関与する複合体構造を明らかにする必要があると考えた。

その他にもCSP AやCSP Bによる光学分割機構について多くの検討が行われているが、溶質には π -donorを持つ光学異性体がい用いられてきたため、それらの報告ではCSP AやCSP Bの π -acceptorである3,5-dinitrophenyl基と溶質の π -donorとの間にface to faceな π - π 相互作用が生じていた。しかしながらCSP 1には、 π -acceptorである3,5-dinitrophenyl基と π -donorであるナフタレン環が存在している。さらにNBD-アミノ酸のNBD骨格は π -acceptorである。従ってCSP 1とNBD-アミノ酸の間には、CSP AやCSP Bと π -donorを持つ溶質との間に生じたface to faceな π - π 相互作用とは、異なった相互作用が予想された。以上のような、CSP AやCSP Bによる π -donorを有する溶質の光学分割機構に加えて、CSP 1やNBD-アミノ酸の構造的な特徴を踏まえて、CSP 1による各種溶質に対する光学分割機構をHPLCやNMRを用いて検討した結果を以下に記す。また、CSP 1によって光学分割される溶質の構造的な共通点を明らかにすることも目指した。HPLCの検討では、溶質の構造を様々に変化した化合物 (Fig. 2-3) の分離係数や溶出順を比較することで、複合体形成に必要な相互作用を予想した。NMRの検討では、CSP 1の光学活性部位とNBD-AlaあるいはNBD-Proの混合試料の¹H-NMRスペクトルを測定し、生じるスペクトルの変化から、複合体形成に必要な相互作用を推測した。

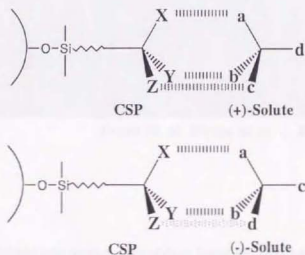
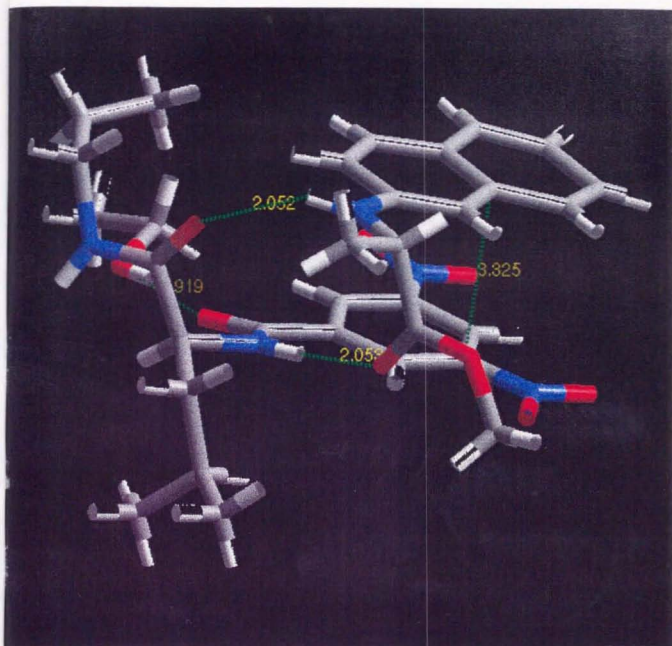
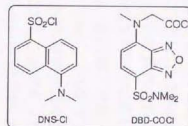
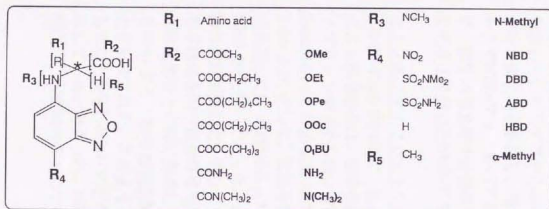


Fig. 2-1 Three-point interaction model proposed by Dalgliesh



From W. H. Pirkle et al. J. Am. Chem. Soc., 111 (1989) 9222

Fig. 2-2 A diastereomeric complex model between 3,5-dinitrobenzoyl-*(S)*-Leu *n*-propylamide and *N*-(2-naphthyl)-*(S)*-alanine methylester



Derivatization reagents

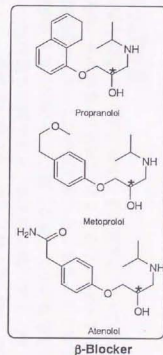
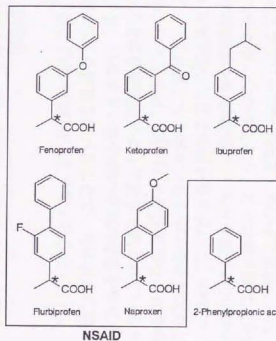
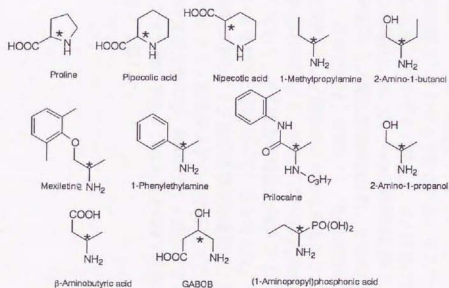


Fig. 2-3 Chemical structures of solute

2-2 CSP 1 (SUMICHIRAL OA-2500(S)) による光学分割機構

2-2-1 NBD-アミノ酸の光学分割

CSP 1によるNBD-アミノ酸とNBD-Proの溶出順や分離係数等については、既に福島らによって報告されているが^[6]、その結果をTable 2-1にまとめた。NBD-アミノ酸の溶出順はD体が先に溶出し、分離係数が1.06~1.24の間であった。またイミノ酸であるProは、溶出順が逆転し、分離係数も他のNBD-アミノ酸と比較して小さな値を示した(1.04)。NBD-アミノ酸の分離係数を比較すると、親水性の高いアミノ酸(Ser, Thr)のNBD誘導体は小さな値を示し、逆に疎水性の高いアミノ酸(Tyr, Phe)のNBD誘導体は大きな値であった。Tyrはそのフェノール性水酸基もNBD-Fで標識化されるため、TyrのNBD誘導体は極めて疎水性が高い化合物となり、その分離係数は大きいと考えられる。各NBD-アミノ酸の光学異性体の溶出順が同一であり分離係数の差が小さいことから、NBD-アミノ酸とCSP 1の光学活性部位との複合体形成には、NBD-アミノ酸のアルキル側鎖は関わっておらず、アミノ基、カルボキシ基やNBD骨格が関与していると推測した。そしてこれらのNBD-アミノ酸は、CSP 1の光学活性部位と共通の基本構造を持つ複合体を形成し、同一の光学分割機構によって光学分割されていると考えた。そこでNBD-アミノ酸のアミノ基、カルボキシ基やNBD骨格の構造を変化させたときに、溶質の溶出順や分離係数に与える影響を調べることで、光学分割に関与するCSP 1の光学活性部位とNBD-アミノ酸との複合体の構造を予想することにした。

アミノ基(アミノプロトン)の影響

NBD-Proの溶出順が、他のNBD-アミノ酸とは異なっていることからアミノプロトンによる水素結合は、複合体形成に関与していると予想された。そこでアミノ酸のアミノプロトンをメチル基に置換した*N*-メチル-アミノ酸と、Proと同様に環状構造を有するpipecolic acid (Fig. 2-3)のNBD誘導体について、その分離挙動を調べ、その結果をTable 2-2に示した。これらのNBD-イミノ酸は光学分割され、その光学異性体の溶出順は共通してL, Dの順であった。この溶出順は、NBD-アミノ酸の溶出順とは異なり、NBD-Proと同一であった。またNBD-アミノ酸を*N*-メチル化することによって、その分離係数は減少した。従ってこれらのNBD-イミノ酸は、CSP 1の光学活性部位と共通な基本構造を持つ複合体を形成しており、その複合体構造はNBD-アミノ酸がCSP 1の光学活性部位との間に形成している複合体とは異なっていると考えた。つまりCSP 1によるNBD-アミノ酸の光学分割機構とNBD-イミノ酸の光学分割機構は、異なっていることが示唆された。このようにNBD-アミノ酸を*N*-メチル化することで、分離挙動が変化したことから、NBD-アミノ酸の光学分割には、NBD-アミノ酸のアミノプロトンが関与していると考えられ、NBD-アミノ酸のアミノプロトンとCSP 1の光学活性部位との間には、水素結合が生じていると予想した。

Table 2-1 Chromatographic results for NBD-amino acids on CSP 1

Amino acid	k for D Form	k for L Form	Separation factor (α)	Elution order
Ala	3.29	3.70	1.12	D, L
Asn	4.84	5.44	1.13	D, L
Asp	8.94	9.81	1.10	D, L
Gln	5.01	5.38	1.07	D, L
Glu	6.29	6.89	1.10	D, L
Gly		4.96		-
Ile	2.41	2.73	1.13	D, L
Leu	2.02	2.27	1.12	D, L
Lys	10.98	11.66	1.06	D, L
Met	4.38	5.08	1.16	D, L
Phe	5.03	6.00	1.19	D, L
Pro	6.10	6.39	1.04	L, D
Ser	5.02	5.51	1.10	D, L
Thr	3.70	4.07	1.10	D, L
Tyr	14.82	18.31	1.24	D, L
Val	2.57	2.89	1.13	D, L

Mobile phase: 5mM citric acid in MeOH

Table 2-2 Chromatographic results for NBD-imino acids and -amino acids on CSP 1

Solute	$k^{\#}$	α	Elution order	Solute	$k^{\#}$	α	Elution order	Mobile phase*
Imino acids				Amino acid				
<i>N</i> -Methyl-Ala	3.08	1.07	L, D	Ala	3.29	1.12	D, L	a
<i>N</i> -Methyl-Phe	4.20	1.02	L, D	Phe	5.03	1.19	D, L	a
<i>N</i> -Methyl-Asp	10.39	1.04	L, D	Asp	9.66	1.11	D, L	b
(Cyclic compound)								
Pro	6.10	1.04	L, D					a
Pipecolic acid	9.00	1.19	L, D					a

$k^{\#}$: Capacity factor for first eluted enantiomer

Mobile phase*: a: 5 mM citric acid in methanol, b: 10 mM citric acid in methanol

カルボキシ基の影響

CSP 1の光学活性部位とNBD-アミノ酸との複合体形成に、NBD-アミノ酸のカルボキシ基が関与しているかどうかを調べるために、カルボキシ基の構造を様々に変化させた溶質 (Fig. 2-3) の分離挙動を調べることにした。これらのカルボキシ基を持たない化合物は、従来の移動相条件である、5mM クエン酸メタノール溶液を用いると殆ど保持されないため、CSP 1では光学分割されないと考えられてきた[6]。そこで水とメタノールの混合溶液を用いることにした。移動相を5mMクエン酸メタノール溶液から、5mMクエン酸を溶解させたメタノールと水の等量混合溶液に交換することで、NBD-Alaの分離係数が僅かに増加したものの溶出順は変わらなかった (Table 2-3)。従って2つの移動相条件において、CSP 1の光学活性部位とNBD-Alaとの間で形成される複合体構造は、共通の基本構造を持つことが示唆された。そこで水とメタノールの混合溶液を移動相に用いて、カルボキシ基の構造を変化させた溶質の分離挙動を調べることで、NBD-アミノ酸の光学分割にカルボキシ基が与える影響が明らかになると考えた。NBD-Alaの分離係数が、移動相条件によって僅かに変化した理由は、溶媒の変化によって、複合体を形成する場 (極性、空間の体積) が変化したためと予想した。

NBD-Alaのカルボキシ基の構造を変化させた溶質として、エステル体としてNBD-Alaのメチルエステル、アミド体としてNBD-Alaのアミドとジメチルアミド、アルコール体としてNBD-2-アミノ-1-プロパノール、アルキル構造を持つ化合物としてNBD-1-メチルプロピルアミンを用いた。そして移動相に、5mMクエン酸を溶解させたメタノールと水の等量混合溶液を用いたときの、各溶質の保持係数、分離係数と溶出順等をTable 2-4に示した。その結果、今まではCSP 1によって光学分割されないと考えられてきた溶質の中で、NBD-1-メチルプロピルアミンを除いた、これらカルボキシ基を置換した溶質は、光学分割された。光学分割されなかったNBD-1-メチルプロピルアミンと比較して、これら光学分割された溶質の共通の特徴として、不斉炭素から β 位に酸素原子が存在することが挙げられる。従ってCSP 1によるNBD-アミノ酸の光学分割には、カルボキシ基は必須でなく、不斉炭素から β 位に酸素原子が存在することで十分であり、その酸素原子のローンペアーがCSP 1の光学活性部位との間に水素結合を生じていると考えた。光学分割された全ての溶質の溶出順は、D, LもしくはR, Sの順であり、分離係数はメチルエステル体、2-アミノ-1-プロパノール、アミド体、ジメチルアミド体の順に増加した。分離係数の差異は、各溶質の水素結合に関与する酸素原子による水素結合の生じやすさに関係があると予想した。そこで酸素原子による水素結合の生じやすさの指標として、カルボニル酸素の共役酸の酸解離指数 (pK_a) の値に注目した[38]。本来、 pK_a はH⁺に対する電子の授受のしやすさの指標であるため、水素結合の直接的な指標ではないが、水素結合とは電子が関与したプロトンの授受であるため、 pK_a の値から水素結合のしやすさが見積もれると考えた。 pK_a と各溶質の分離係数との間には、大小関係の一致が見られ、酸素原子による水素結合が強いほど、分離係数が大きくなる傾向が見られた。酸素原子による水素結合が強くなるほど、複合体構造が安定化され、その結果ジアステレオメリックな複合体 (ホモキラルとヘテロキラルな複合体) 間での安定化エネルギーの差も生じやすくなり、分離係数が大きくなったと予想した。以上の結果からCSP 1によるNBD-アミノ酸の光学分割には、NBD-アミノ酸のカルボニル酸素による水素結合も寄与していることが示された。

Table 2-3 Chromatographic results for NBD-Ala on CSP 1

Mobile phase	k for D Form	k for L Form	Separation factor (α)	Elution order
Methanol	3.29	3.70	1.12	D, L
Mixture of methanol and water	37.24	43.36	1.16	D, L

Table 2-4 Chromatographic results for NBD-Ala derivatives and the related compounds on CSP 1

	k for First eluted enantiomer	Separation factor (α)	Elution order	Mobile phase *	pKa Value of oxygen (conjugate acid)
Ester (COOCH ₃)	4.17	1.01	D, L (R, S)	a	-6.5
Amide (CONH ₂)	2.45	1.10	D, L (R, S)	a	-0.5
Dimethylamide (CON(CH ₃) ₂)	3.89	1.19	D, L (R, S)	a	>-0.5
Alcohol (2-Amino-1-propanol)	17.11	1.03	R, S	b	-2.0
Alkyl (1-Methylpropylamine)	5.80	-	-	a	-

Mobile phase*: a: 5 mM citric acid in mixture of methanol and water (1/1, V/V),
b: 5 mM citric acid in mixture of methanol and water (1/9, V/V)

またPirkleらによると(*R*)-*N*-(10-undecenoyl)- α -(6,7-dimethyl-1-naphthyl)-isobutyramideを固定化したキラル固定相(CSP C)において、溶質に*N*-(3,5-dinitrobenzoyl)-1-aryl-1-aminoalkaneを用いたときに、溶質のアルキル鎖長によって、分離係数や光学異性体の溶出順が変化した[39-41]。その報告によると溶質のアルキル鎖長が短いときは、*R*体の方が強く保持され、鎖長を延長すると逆に*S*体の方が強く保持された。溶出順が変化した理由としてCSP Cには、双極子過程(dipole-stacking process)と水素結合過程(hydrogen-bonding process)という2種類の光学分割機構が存在しており、その光学分割機構によって安定な複合体をつくる溶質の立体配置が異なることが示されていた。そして溶質のアルキル鎖長によって、その光学分割機構が変化すると考えられていた。そこでCSP 1においても複数の光学分割機構が存在するかを調べるために、エステル体のアルキル鎖の構造を変化させた溶質について、その分離挙動を調べた。アルキル鎖の構造を変化させたエステル体として、NBD-Alaと-Pheのメチルエステル、エチルエステル、ベンチルエステル、オクチルエステル、*tert*-ブチルエステル(NBD-Alaのみ)を使用し、これらの結果をTable 2-5にまとめた。CSP Cの結果とは異なり、CSP 1ではエステルのアルキル鎖の構造に関わらず、分離係数や溶出順は変化しなかった。この原因を、CSP 1には複数の光学分割機構が存在しない、あるいは溶質の構造が異なったため光学分割機構が1つになったためと考えた。また分離係数がこれらエステル体のアルキル鎖の構造によって変化しなかったことから、アルキル鎖の構造は溶質とCSP 1の光学活性部位とが形成する複合体構造に、全く関与していないと考えられる。従ってその他のNBD-アミノ酸のエステルやアミド体もエステルやアミド体のアルキル鎖の構造に関わらず、CSP 1によって光学分割されることが示唆された。

そこでAlaのアミド体であるprilocaine (propitocaine) (Fig. 2-3)のNBD誘導体の光学分割を試みた(Table 2-6)。Prilocaineは、局所麻酔薬として使用されており、その活性に光学異性体間で差異はないものの、代謝速度は*R*体が*S*体よりも速いことが知られている[42]。そしてNBD-prilocaineは、予想通り、CSP 1によって光学分割された。このようにCSP 1は、アミノ酸のエステルやアミド体の高感度な光学分割分離定量に使用できると予想された。

次に β -アミノ酸である β -aminobutyric acid, nipecotic acid (Fig. 2-3)のNBD誘導体の光学分割を試みた(Table 2-6)。 β -aminobutyric acidは、Alaの不斉炭素とカルボキシ基の間にメチレン基を導入した化合物であり、NBD-Fで標識化した β -aminobutyric acidはCSP 1によって光学分割された。その溶出順は、光学活性な市販品がなかったため決定できなかったが、分離係数は1.21であり、NBD- α -アミノ酸よりも大きな値であった。NBD- β -aminobutyric acidが光学分割されたことから、CSP 1によって光学分割されるには、電子供与体である酸素原子が、必ずしも不斉炭素の β 位に存在するの必要はなく、 γ 位に存在しても光学分割されることが分かった。しかしながら不斉炭素から β 位にカルボニル基(酸素原子は γ 位)を有する溶質でも、NBD-nipecotic acidのように光学分割されない溶質も存在した。このようにNBD- β -アミノ酸の中で光学分割されたり、光学分割されない溶質が存在する理由として、NBD- β -aminobutyric acidは直鎖状の構造であるため、そのカルボキシ基の運動自由度は大きいが、NBD-nipecotic acidは環状構造であるため、そのカルボキシ基の運動自由度は、 β -aminobutyric acidと比較し

て小さいためと考えた。その結果、カルボニル酸素による水素結合の生じやすさに違いが起きていると思われる。

以上の検討からCSP 1によるNBD-アミノ酸の光学分割には、NBD-アミノ酸のカルボニル酸素による水素結合が関与していることが示唆された。またCSP 1によって光学分割される溶質には、共通して不斉炭素の β もしくは γ 位に電子供与体である酸素原子が存在した。

Table 2-5 Chromatographic results for NBD-amino acid esters on CSP 1

Ester	k for D Form	k for L Form	Separation factor (α)	Elution order
Ala-OMe	1.22	1.23	1.01	D, L
Ala-OEt	1.47	1.49	1.01	D, L
Ala-OPe	2.51	2.55	1.02	D, L
Ala-OOc	4.01	4.05	1.01	D, L
Ala-OtBu	2.01	2.06	1.02	D, L
				-
Phe-OMe	2.66	2.73	1.03	D, L
Phe-OEt	3.11	3.21	1.03	D, L
Phe-OPe	5.13	5.28	1.03	D, L
Phe-OOc	7.90	8.16	1.03	D, L

Mobile phase: mixture of water, acetonitrile and TFA (50/50/0.015)

Table 2-6 Chromatographic results for NBD-derivatives on CSP 1

Solute	k for First eluted enantiomer	Separation factor (α)	Elution order	Mobile phase*
Prilocaine	7.76	1.05	N. I.	a
β -Aminobutyric acid	0.75	1.21	N. I.	b
Nipecotic acid	0.65	1.00	-	c

N. I.: Not identified

Mobile phase*: a: 5 mM citric acid in mixture of methanol and water (60:40),

b: 2 mM citric acid in methanol, c: 5 mM citric acid in methanol

ベンゾフラザン骨格の影響

キラル固定相内で生じる π - π 相互作用には、CSP A等の3,5-dinitrobenzoyl基と溶質の π -donorとの間に生じる、電荷移動錯体の形成を伴う、face to faceな π - π 相互作用とbicyclo[2.2.2]octane構造を有する(1R,2R,4S,9R,10S)(+)-1,4-ethano-2-endo-(3,5-dinitrobenzamido)-N- ω -undecenyl-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene-9,10-endo-dicarboximideを固定化したキラル固定相と溶質の π -donorとの間に生じる、電荷移動錯体の形成を伴わない、face to edgeな π - π 相互作用が知られている[43-45]。そしてこれらの π - π 相互作用は、水素結合に加えてキラル固定相における光学分割に重要な役割を果たしていると報告されていた[46, 47]。従ってCSP 1によるNBD-アミノ酸の光学分割においても π - π 相互作用が関与していることが推測された。そこでNBD-アミノ酸の構造で π - π 相互作用部位であるベンゾフラザン骨格の構造が、光学分割に与える影響を調べることにした。まず始めにナフタレン環を有するDNS-Clで標識化したDNS-アミノ酸とNBD-アミノ酸の分離挙動を比較した。ナフタレン環は π -donorであるため、 π -acidであるベンゾフラザン骨格とは異なる π - π 相互作用をCSP 1の光学活性部位との間に生じていると考えられるため、NBD-アミノ酸とDNS-アミノ酸とでは、その分離挙動が変化すると予想した。DNS-Ala, -Leu, -Pheの溶出挙動を調べた結果をTable 2-7に示した。DNS-LeuとPheは、NBD-Leuや-Pheと比較して分離係数が減少し、溶出順が逆転した。またDNS-Leuは光学分割されなかった。従って、NBD-アミノ酸の芳香環をナフタレン環に変化させることで、分離挙動が大きく変化したことから、CSP 1によるNBD-アミノ酸の光学分割には、NBD骨格による π - π 相互作用が重要な役割を果たしていると考えられた。

π - π 相互作用は、芳香環の π 電子同士の相互作用[48]であるため、NBD-アミノ酸のベンゾフラザン骨格の置換基を変化させ、ベンゾフラザン骨格の π 電子雲を変化させることで、CSP 1の光学活性部位との間に生じる π - π 相互作用に変化が生じ、溶質の分離挙動に影響が現れると考えた。そこでベンゾフラザン骨格の7位置換基を変化させた、4種類のAla誘導体の分離挙動を比較した(Table 2-8)。溶質には、電子求引性の置換基であるニトロ基やアミノスルホニル基などを有するNBD, ABD, DBD誘導体と水素のみを有するHBD誘導体を用いた。これらの溶質は、共通してD, Lの順に溶出し、分離係数は電子求引性の置換基を有するNBD, DBD, ABD誘導体の方がHBD誘導体より大きな値であった。

π - π 相互作用の強さを見積もるパラメーターとして、7位置換基のハメット定数、ベンゾフラザン骨格のHOMOおよびLUMOエネルギーと電荷に注目した。ハメット定数は、ベンゼン環のメタおよびパラ位置換基が、ベンゼン誘導体の反応速度または平衡に及ぼす置換基の影響を経験的に数値化したものである[49]。従ってハメット定数を用いることで、ベンゾフラザン骨格の7位の置換基の効果を見積もれると考えた。実際にWainerらは、CSP Bを用いて、2-アミノ-ヘプタンとパラ位に各種置換基を導入した安息香酸との縮合体の分離係数を比較していた[27]。その結果、ハメット定数が小さい置換基(メチル基(σ_p =0.13)、メトキシ基(σ =0.11)、水素(σ =0.00))を有する溶質は大きな分離係数(α =1.06-1.08)を示し、逆にハメット定数が高い置換基(クロロ基(σ_p =0.24)、シアノ基(σ =0.67)、ニトロ基(σ =0.78))を有する溶質の分離係数は、小さな値(α =1.04)を示す傾向は認められたが、置換基のハメット定数と分離係数との間には相関

関係は見られなかった。今回の実験結果においては、逆にハメット定数が大きい置換基を持つ溶質の分離係数の方が大きな値を示す傾向が見られたが、分離係数と7置換基のハメット定数との間には、相関関係は存在しなかった。

Table 2-7 Chromatographic results for DNS- or NBD-amino acids on CSP 1

Solute	DNS-Amino acid				NBD-Amino acid			
	k [#]	α	Elution order	Mobile phase*	k [#]	α	Elution order	Mobile phase*
	Ala	2.44	1.04	L, D	a	3.29	1.12	D, L
Leu	1.09	1.00	-	a	2.02	1.12	D, L	b
Phe	2.92	1.04	L, D	a	5.03	1.19	D, L	b

k[#]: Capacity factor for first eluted enantiomer

Mobile phase*: a: 2 mM citric acid in methanol, b: 5 mM citric acid in methanol

Table 2-8 Chromatographic results for benzofurazan derivatives of Ala on CSP 1

Solute	k for First eluted enantiomer	α	Elution order	Mobile phase*	Hammett constant (σ _p)	Sum of atomic charge (e)	
NBD-Ala	NO ₂	3.29	1.12	D, L	a	0.78	-0.352
DBD-Ala	SO ₂ NMe ₂	3.53	1.17	D, L	b	0.65	-0.963
ABD-Ala	SO ₂ NH ₂	2.93	1.16	D, L	b	0.60	-0.960
HBD-Ala	H	2.81	1.06	D, L	c	0.00	-0.522

Mobile phase*: a: 5 mM citric acid in methanol, b: 2 mM citric acid in methanol, c: 1 mM citric acid in methanol

次にベンゾフラザン骨格のHOMOおよびLUMOエネルギーの値に注目した。 π -Donorと π -acceptorとの間に電荷移動錯体を形成する場合、 π -donorのHOMOエネルギーレベルと π -acceptorのLUMOエネルギーレベルが近接すると、その間で電荷移動錯体が形成されやすく、face to faceな π - π 相互作用も生じやすいと考えられている[50]。そこでAlaの各ベンゾフラザン誘導体とCSP 1の芳香環のHOMOおよびLUMOエネルギーの計算結果を、Table 2-9に示した。ベンゾフラザン骨格は π -acceptorとして働くこと予想されたが、これら4種類のベンゾフラザン誘導体のLUMOエネルギーレベルは、CSP 1の芳香環のHOMOエネルギーレベルとはかなり異なっていた。またAla誘導体の π 電子のエネルギー（HOMO, LUMOエネルギー）の値とその溶質の分離係数との間にも相関関係は見られなかった。

最後にベンゾフラザン骨格の π 電子の電荷の和（6個の炭素、2個の窒素、1個の酸素原子それぞれの電荷の和）に注目した。4種類のベンゾフラザン誘導体の電荷の値をTable 2-8に示した。しかしながら電荷と分離係数の間にも相関関係は、見られなかった。

CSP Bによる光学分割において3,5-dinitrobenzoyl基は、 π -acceptorとして働き、溶質の π -donorとの間にface to faceな π - π 相互作用を生じていると考えられていた。そこでKipらは、3,5-dinitrophenyl基をpentafluorophenyl基に置換することで、芳香環の π -acceptorの性質を強めたキラル固定相を作製したが、作製したキラル固定相は、CSP Bと比較して π -donorを有する溶質（1,1'-bi-2-naphthol, 2,2,2-trifluoro-1-(9-anthryl)ethanol）の光学分割能を悪化した[42]。このように固定相の π -donorや π -acceptorの性質を強くすることで、光学分割能が改善されないことから、逆に互斥概念より、溶質の π -donorや π -acceptorの性質を強くしても、必ずしもその溶質の分離係数には反映されないと考えられる。その理由として π - π 相互作用は、点同士の相互作用ではなく面同士の相互作用であり、置換基が変化することで相互作用している面の構造も変化するため、 π - π 相互作用の強さには、電気的な因子と構造的な因子が競合的に関与していると予想される。従ってベンゾフラザン誘導体の分離係数は、ベンゾフラザン骨格の π 電子の状態（密度、電荷等）のみならず、そのベンゾフラザン骨格の置換基による構造の変化にも影響されると考えた。以上の検討より、CSP 1の光学活性部位とNBD-アミノ酸との複合体形成に、NBD-アミノ酸のベンゾフラザン骨格による π - π 相互作用が関与していることが示唆された。

Table 2-9 HOMO and LUMO Energy of aromatic group

Compound		HOMO Energy (eV)	LUMO Energy (eV)
NBD-NMe	NO ₂	-9.234	-1.931
DBD-NMe	SO ₂ NMe ₂	-9.076	-1.571
ABD-NMe	SO ₂ NH ₂	-9.086	-1.585
HBD-NMe	H	-8.715	-1.502
CSP 1 (Naphthalene)		-8.964	-0.657
CSP 1 (3,5-Dinitrophenyl)		-10.145	-2.100

α -プロトンの影響

最後にNBD-アミノ酸の α -プロトンが、CSP 1の光学活性部位との複合体形成に関与しているかどうかを調べるために、Tyrと α -メチル-TyrのNBD誘導体の分離挙動を比較した (Table 2-10)。 α -メチル化によって、光学異性体の溶出順は変化しなかったものの、分離係数が1.22から1.04に大きく減少した。今までの検討より、CSP 1の光学活性部位とNBD-アミノ酸との複合体形成には、NBD-アミノ酸のアミノプロトン、カルボニル酸素とベンゾフラザン骨格の計3つの構造が関与していた。その3つの構造でNBD-アミノ酸が、CSP 1の光学活性部位との間に複合体を形成しているときには、NBD-アミノ酸の α -プロトンやアルキル側鎖は、CSP 1の光学活性部位とは逆の方向を向いていると推測される (Fig. 2-4)。それにも関わらず α -メチル化によって、分離係数が大きく減少した理由として、以下の2つを推測した。溶質はCSP 1の光学活性部位と相互作用を生じた結果、溶質の3次元構造が変化すると予想されるが、各結合の回転障壁の小さい溶質の方が構造変化が起こり易いため、形成される複合体構造が安定化され、ホモキラルな複合体とヘテロキラルな複合体との安定化エネルギーの差が、生じやすいと考えられる。そしてNBD- α -メチル-Tyrと比較してNBD-Tyrは、不斉炭素とアミノ基の間の単結合に回転障壁が小さいため、分離係数が大きいと考えられる。2つ目は、NBD-TyrあるいはNBD- α -メチル-TyrがCSP 1の光学活性部位と形成するジアステレオメリックな複合体の安定性は、その複合体の外部表面に存在する構造 (Fig. 2-4のe'とf) に依存すると考えた。ジアステレオメリックな複合体を形成しているときに、溶質の光学異性体間でe'とf'の方向が異なるため、e'とf'が周囲の環境 (溶媒や固定相の隣接した光学活性体) と形成する相互作用の形態 (距離や方向) が変化し、その結果複合体の安定化エネルギーに差異が生じると考えられる。そしてNBD-TyrやNBD- α -メチル-Tyrによって形成される複合体の場合、そのアルキル側鎖 (Fig. 2-4 f') や α -プロトンもしくは α -メチル基 (Fig. 2-4 e') の構造によって安定化エネルギーが変化するため、 α -メチル化によって分離係数が変化すると予想した。この推測では、ジアステレオメリックな複合体の外部表面に存在する構造 (e'とf') が類似するほど、その構造に由来するエネルギー差が生じづらくなり、溶質の分離係数が減少すると考えられる。つまりNBD-Tyrを α -メチル化することで、水素がメチル基に変化するため、外部表面に存在するアルキル側鎖 (Fig. 2-4 f') との構造の違いが少なくなり、分離係数が減少したと考えた。この推測から、外部表面に存在する構造の差異が大きいほど、分離係数も大きくなると予想され、アルキル側鎖の構造が高高いNBD-Tyrや-Pheの分離係数が、NBD-Ala等のアルキル側鎖の構造が小さいNBD-アミノ酸の分離係数と比較して、大きいという現象も説明できる。

以上の結果から、CSP 1によるNBD-アミノ酸の光学分割には、NBD-アミノ酸のアミノプロトン、カルボニル酸素およびベンゾフラザン骨格が関与していることが示唆された。次に、NBD-アミノ酸とは異なった分離機構で光学分割されていると予想されたNBD-イミノ酸の光学分割機構について考察する。

Table 2-10 Chromatographic results for NBD-Tyr and α -methyl-Tyr on CSP 1

Amino acid	k for D Form	k for L Form	Separation factor (α)	Elution order
Tyr	10.51	12.83	1.22	D, L
α -Methyl-Tyr	14.22	14.78	1.04	D, L

-20- Mobile phase: 10 mM citric acid in MeOH

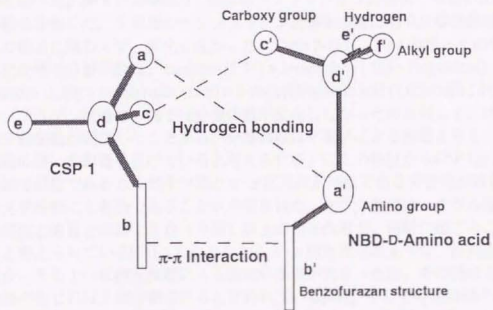
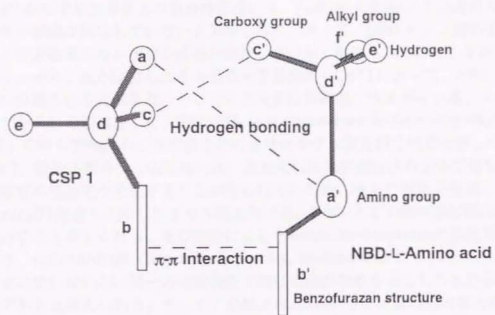


Fig. 2-4 Schematic representation of the primary interactions in the SS and SR complexes of CSP 1 and NBD-DL-amino acid

2-2-2 NBD-イミノ酸（アミノプロトンを持たない溶質）の光学分割

上記の「アミノ基（アミノプロトン）の影響」の検討から、NBD-*N*-メチル-アミノ酸とCSP 1の光学活性部位との複合体形成には、NBD-*N*-メチル-アミノ酸の*N*-メチル基やアルキル側鎖は関与していないと予想された。従って、NBD-イミノ酸の光学分割には、その芳香環とカルボキシル基が関与していると推測されたので、不斉炭素に芳香環とカルボキシル基が結合したその他の光学異性体もCSP 1によって、NBD-イミノ酸と同様に分離されると考えた。そこで不斉炭素に芳香環、カルボキシ基、メチル基とプロトンがそれぞれ結合した、NSAID類（non-steroidal anti-inflammatory drugs）（Fig. 2-3）を、CSP 1のNaglyの立体配置を逆転させたキラル固定相で光学分割した報告に注目した[7]。低分子型キラル固定相では、固定化した光学活性体の立体配置を逆転させると、溶質の溶出順が逆転することが知られていたため、彼らの実験で使用したCSP 1のNaglyの立体配置を逆転したキラル固定相では、NBD-イミノ酸の溶出順はD,L (R,S)の順に溶出すると考えられる。その報告によるとketoprofenやnaproxenの溶出順は、R,Sの順であり、他のNSAID類（ibuprofen, fenoprofen, flurbiprofen）についても、その溶出順は確認されていないが、同一の分離条件で類似の溶出挙動を示したことから、溶出順は同一であると考えられる。そしてこの溶出順はNBD-イミノ酸の溶出順と同一であることから、アミノプロトンを持たないこれらの溶質とCSP 1の光学活性部位との複合体形成には、溶質の芳香環とカルボキシ基が関与していると考えられる。

次にこれらアミノプロトンを持たない溶質の光学分割に π - π 相互作用が関与しているかを調べた。*N*-メチル-Alaの3種類のベンゾフラザン誘導体と前述のNSAID類の溶出挙動を比較した。3種類のベンゾフラザン誘導体の溶出順や分離係数は、7位の置換基の構造に関わらず、変化しなかった（Table 2-11）。NSAID類とその類似構造を有する化合物の分離係数は、naproxen (1.55) > ketoprofen (1.15) > ibuprofen (1.11) > fenoprofen (1.10) > flurbiprofen (1.09) > 2-phenylpropionic acid (1.05)の順に小さくなった。ベンゾフラザン誘導体の間では分離係数が変化しなかったのに対して、NSAID類の間では分離係数が変化したことから、分離係数は π 電子による影響よりも、芳香環自身の構造の違いの影響を受けていると考えられる。以上の検討からCSP 1は、不斉炭素に水素結合部位であるカルボキシ基と π - π 相互作用部位である芳香環が結合している溶質の光学分割にも有効であることが示唆された。光学分割には、キラル固定相の光学活性部位と溶質との間に3点（カ所）以上の相互作用が、同時に起こることが必要であると考えられている[25]。しかしながら π - π 相互作用のような、面同士の相互作用の場合、その1つの相互作用による固定化効果が大きいので、その他にもう1点の相互作用が生じれば光学分割されると言われている[21]。そして今回のCSP 1によるアミノプロトンを持たない溶質（NBD-イミノ酸、NSAID）の場合は、そのもう1点が、カルボニル酸素による水素結合であった。

Table 2-11 Chromatographic results for benzofurazan derivatives of *N*-methyl-Ala on CSP 1

Solute		k for D Form	k for L Form	α	Elution order	Mobile phase*
NBD- <i>N</i> -Methyl-Ala	NO ₂	3.31	3.08	1.07	L, D	a
DBD- <i>N</i> -Methyl-Ala	SO ₂ NMe ₂	2.24	2.08	1.07	L, D	b
ABD- <i>N</i> -Methyl-Ala	SO ₂ NH ₂	1.95	1.85	1.05	L, D	b

Mobile phase*: a: 5 mM citric acid in methanol, b: 2 mM citric acid in methanol

2-2-3 その他のアミン類の光学分割

最後に、(1-aminopropyl)phosphonic acid, 2-amino-1-butanol, 1-phenylethylamine, 4-amino-3-hydroxybutanoic acid (GABOB: てんかん抑制薬), 1-(2,6-dimethylphenoxy)-2-propamine (mexiletine: 抗不整脈薬)のNBD誘導体とDBD-COClで誘導体化した β -blocker類 (propranolol, metoprolol, atenolol)の光学分割を試みた。その結果をTable 2-12に示した。(1-Aminopropyl)phosphonic acidは、溶質のリン酸基が、CSP 1の未修飾なアミノプロピル基との間に、強いイオン結合を形成するため溶出しなかった。NBD-2-Amino-1-butanolは、前述のNBD-2-amino-1-propanolの不斉炭素に結合したメチル基をエチル基に置換した化合物であり、水を含む移動相条件を用いることで光学分割された。NBD-2-Amino-1-propanolと比較して、NBD-2-amino-1-butanolは分離係数が僅かに増加し、溶出順は変化しなかった。NBD-1-Phenylethylamineは、分離係数が小さな値であったが光学分割された。分離係数が小さい値ながら、カルボキシ基を持たない溶質が光学分割されたのは、非常に興味深い結果である。溶出順はNBD-イミノ酸と同じS, Rの順であり、この光学分割機構には、フェニル基やベンゾフラザン骨格やアミノプロトンが関わっていると予想されるが、その詳細は分からなかった。NBD誘導体化したGABOB, mexiletineやDBD誘導体化した β -blocker類は、光学分割されなかった。これら光学分割されなかった溶質は、 π - π 相互作用部位として重要なベンゾフラザン骨格と不斉炭素との距離が、光学分割された溶質よりも離れていたため分離されなかったと考えられる。従って、CSP 1によって光学分割される溶質の構造として、芳香環は少なくとも不斉炭素の α 位の原子に結合する必要があると推測した。

Table 2-12 Chromatographic results for benzofurazan derivatives on CSP 1

	Derivatization reagent	k for First eluted enantiomer	k for Second eluted enantiomer	Separation factor (α)	Elution order	Mobile phase*
(1-Aminopropyl) phosphonic acid	NBD-F	-	-	-	-	a
2-Amino-1-butanol	NBD-F	13.36	14.00	1.05	R, S	b
1-Phenylethylamine	NBD-F	5.53	5.85	1.06	S, R	c
GABOB	NBD-F	2.95	-	1.00	-	d
Mexiletine	NBD-F	26.73	-	1.00	-	e
Propranolol	DBD-COCl	7.93	-	1.00	-	f
Metoprolol	DBD-COCl	4.02	-	1.00	-	f
Atenolol	DBD-COCl	1.63	-	1.00	-	f

Mobile phase*: a: 20 mM citric acid in methanol,
 b: 5 mM citric acid in mixture of methanol and water (20/80),
 c: 5 mM citric acid in mixture of methanol and water (70/30),
 d: mixture of water, acetonitrile and TFA (60/40/0.013),
 e: 5 mM citric acid in mixture of methanol and water (50/50),
 f: Eluent A, mixture of water, acetonitrile and TFA (50/50/0.02); B, acetonitrile. Gradient, liner gradient eluent from 0 to 90 min (B, 0-100 %)

2-2-4 移動相の影響についての検討

光学分割に関与する水素結合が、移動相に添加したアセトンによって阻害され、溶質の分離係数が減少する報告があったので[51, 52]、移動相にアセトンを添加することでNBD-アミノ酸の分離係数が減少すると予想された。そこでメタノールに対して、5%および10%のアセトンを混合した溶液に5 mMクエン酸を溶解させた移動相を用いたときの、各NBD-アミノ酸の分離係数と溶出順をTable 2-13に示した。5%のアセトンを添加することで、各NBD-アミノ酸の分離係数が減少したが、アセトンの添加量を10%に増加させても、NBD-アミノ酸の分離係数は殆ど変化しなかった。この現象は、イミノ酸であるProのNBD誘導体においても観察された。これらのNBD誘導体の分離係数が、移動相にアセトンを添加することで減少したことから、NBD-アミノ酸やNBD-イミノ酸とCSP 1の光学活性部位との複合体形成には、水素結合が関与していることが示唆された。またアセトンを添加した移動相においても、これらのNBD誘導体の分離係数が減少したが、光学分割されたことから、この移動相条件に於いても水素結合による溶質とCSP 1の光学活性部位との複合体は形成されていると考えられる。

Table 2-13 Effect of acetone concentration on chromatographic results on CSP 1

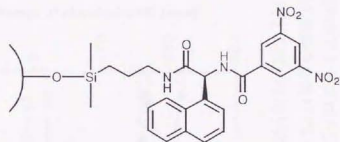
Amino acid	5 mM citric acid in methanol		+5% acetone		+10% acetone	
	k for D Form	α	k for D Form	α	k for D Form	α
Ala	4.30	1.16	4.17	1.14	3.36	1.14
Asn	6.39	1.16	5.89	1.15	4.56	1.14
Glu	8.97	1.12	8.50	1.10	6.58	1.10
Gly	6.69	-	6.40	-	5.17	-
Pro	7.53	1.08	7.09	1.07	5.10	1.06
Phe	6.32	1.23	6.18	1.21	4.75	1.20

2-2-5 ¹H-NMRスペクトルを利用した光学分割機構の解析

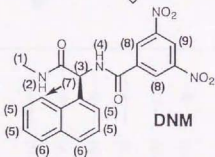
次にNMRを用いて、CSP 1の光学活性部位とNBD-アミノ酸との相互作用の解析を行った。¹H-NMRスペクトルは、プロトンの周囲の電子密度を反映するため、分子間や分子内相互作用の解析にも利用されている。CSP 1の光学活性部位としてFig. 2-5に示したDNMを用い、NBD-アミノ酸にはその代表としてNBD-Alaを、さらに比較のためにNBD-イミノ酸であるNBD-Proを検討に用いた。まず始めに、それぞれの単体のみでの各シグナルの帰属を行い、次に試料濃度がスペクトルに与える影響を調べた。その後、DNMとNBD-AlaもしくはNBD-Proの混合試料のスペクトルを測定し、各試料単体のときのスペクトルと比較することで、DNMとNBD-AlaもしくはNBD-Proとの間に生じる相互作用を予想した。

シグナルの帰属

DNMとNBD-Ala、-Proの各プロトンシグナルの帰属した結果をFig. 2-5に示した。測定溶媒にd₄-メタノールを用いることで、(2)と(4)のアミドプロトンのシグナルが消失した。また(2)と(4)のアミドプロトンのシグナルは、測定溶媒にd₄-メタノールを用い、試料濃度を減少させた時に、(4)のプロトンのシグナルの消失に伴い、(3)のプロトンのシグナルが、ダブルレットからシングレットへと変化したことから同定した。NMRの測定時間と比較して、NBD-Alaのアミノプロトンと溶媒プロトンとの交換速度が速いため、NBD-Alaのアミノプロトンは、今回の測定条件では検出されなかった。またこれらの帰属結果を、2D-NMR(NOESY)を利用して確認した。



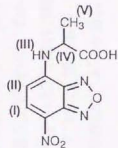
Chiral stationary phase for HPLC
(SUMICHIRAL OA-2500(S))



Model compound of chiral stationary phase for NMR study

[3,5-Dinitrophenylamido-(S)-1-naphthylglycine]-N-methylamide

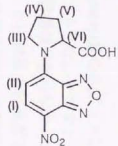
- (1) 2.83, 2.84 (d)
- (2) 8.31 (s)
- (3) 6.49 (s)
- (4) Not detected
- (5) 7.5-7.6 (m)
- (6) 7.91, 7.92 (d)
- (7) 8.10, 8.12 (d)
- (8) 9.08 (s)
- (9) 9.08 (s)



NBD-Ala

- (I) 8.48, 8.51 (d)
- (II) 6.30, 6.32 (d)
- (III) Not detected
- (IV) 4.2 (q)
- (V) 1.64, 1.66 (d)

(ppm)



NBD-Pro

- (I) 8.50, 8.52 (d)
- (II) 6.31 (s)
- (III) 3.77-3.84 (m)
- (IV) 2.03-2.33 (m)
- (V) 2.49-2.53 (m)
- (VI) 5.4-5.6 (m)

(ppm)

Fig. 2-5 Chemical structures of NMR samples and their $^1\text{H-NMR}$ chemical shift

Measured with GSX-400

試料濃度の検討

分子の相互作用には、同一分子内の相互作用（分子内相互作用）と他の分子との相互作用（分子間相互作用）が存在し、さらに分子間相互作用には、同一分子同士の相互作用と異なった分子間の相互作用が存在すると考えられる。そしてNBD-AlaとDNMとの相互作用を明らかにするには、まず分子内相互作用や同一分子同士の相互作用について調べる必要があると考えた。そこでDNMとNBD-Alaそれぞれ、単体の各濃度（40-0.2 μM ）でのスペクトルの変化を調べ、その結果をFig. 2-6にまとめた。NBD-Alaの場合、8 μM 以上の濃度範囲では、ベンゾフラザン骨格の5および6位のプロトンのシグナルは、濃度の低下に伴って、低磁場シフトした。しかしそれ以下の濃度では、他のプロトンも含め、濃度に依存するケミカルシフトの変化は、僅かであった。従って8 μM 以上の濃度のときに、NBD-Alaは同一分子同士の π - π 相互作用を生じていると考えた。

次にDNMの結果を記す。DNMの3,5-dinitrophenyl基の各プロトンのシグナルも5 μM 以上の濃度では、濃度の低下に伴い、低磁場シフトした。ナフトレン環の各プロトンのシグナルは複雑に分裂しているため、濃度の影響は分からなかった。(4)のアミドプロトンのシグナルは、10 μM 以下で微弱になり、2.5 μM 以下の濃度では消失したのに対して、(2)のアミドプロトンのシグナルは濃度の低下に伴い、低磁場シフトをしたものの、シグナル強度には変化が見られなかった。以上よりDNMも高濃度では、同一分子同士の π - π 相互作用が生じていると考えられる。また(2)のアミドプロトンのシグナルが、(4)のアミドプロトンのシグナルとは異なり、低濃度でも観測されたことから、分子内水素結合を生じている可能性が示唆された。以上の結果より、以後の検討を同一分子同士の相互作用が無視できる試料濃度（1.6 μM ）で行うことにした。

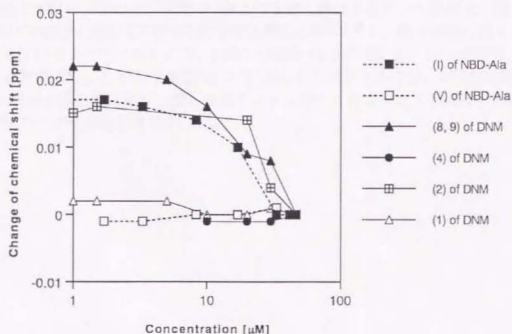


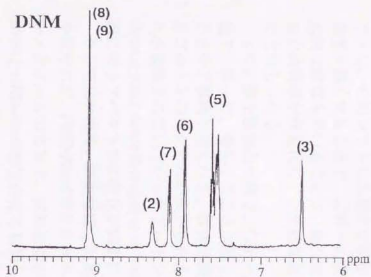
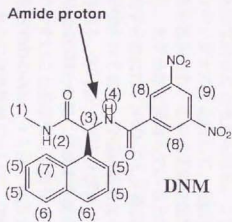
Fig. 2-6 Effect of concentration on chemical shift of each proton

DNMとNBD-Alaとの相互作用についての検討

まずDNMとNBD-Alaの混合溶液の¹H-NMRスペクトルを測定した。DNM (1.6 μM) に対して、等量のNBD-D-AlaあるいはNBD-L-Alaを添加したスペクトルをFig. 2-7に示した。NBD-L-Ala添加時のみ、9.5 ppm付近にシグナルが観測され、このシグナルは、NBD-D-Alaを大過剰に添加しても観測されなかった。またDNMのみを-20度で測定すると、溶媒プロトンとの交換速度が速いため観測されなかった。(4)のアミドプロトンのシグナル(d)が、9.79 ppmに観測された。DNMとNBD-L-Alaとの等量混合溶液の測定温度を変化させても(10、0、-20度)、9から10 ppmの間に観測されたシグナルは、このシグナルのみであった。さらにd-メタノールによって同シグナルが消失したことから、同シグナルはDNMの(4)のシグナルであると帰属した。またこのシグナルは、一般のアミドプロトンと比較して、低磁場側にシフトしており、温度を変化させてもそのケミカルシフトは殆ど変化しなかったことから、(4)のアミドプロトンは水素結合を生じていると考えた。そして同一条件でNBD-D-Alaを添加しても、同シグナルが観測されなかったことから、この水素結合はDNMによるNBD-Alaの不斉認識に関与していると予想した。

DNMの(4)のアミドプロトンの水素結合の相手は、NBD-L-Alaの構造の中で電子供与体であるカルボニル酸素であると推測した。HPLCの実験からCSP 1によるNBD-アミノ酸の光学分割には、このカルボニル酸素による水素結合が、重要な役割を果たしていることは既に明らかである。従ってDNMの(4)のアミドプロトンの水素結合の相手として、NBD-L-Alaのカルボニル酸素が適当であると考えた。またNBD-L-Alaを添加時のみ、(4)のアミドプロトンのシグナルが検出されたことから、NBD-L-AlaがDNMとの間に水素結合を生じ、その結果複合体が形成されていることが示唆された。一方、NBD-D-Alaでは、スペクトルの変化が観測されなかったことから、NBD-L-Alaと比較して、DNMとの間に複合体を形成しづらいと推測された。この推測は、CSP 1を用いたHPLCの実験でNBD-L-Alaの方がNBD-D-Alaよりも遅く溶出するという結果と一致している。

HPLCの実験においてCSP 1の光学活性部位とNBD-アミノ酸の間には π - π 相互作用が生じていると予想されたので、DNMとNBD-Alaとの間にも、 π - π 相互作用が生じていると推測した。しかしながらFig. 2-7に示したスペクトルでは、DNMの芳香環(3,5-dinitrophenyl基とナフタレン環)の各プロトンのケミカルシフトの値は、NBD-Alaの添加に関わらず変化を示さなかった。



-30-

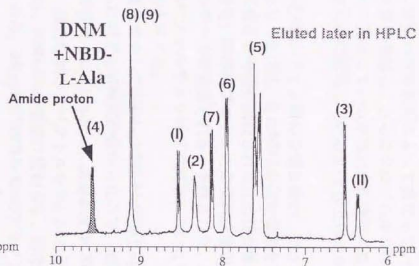
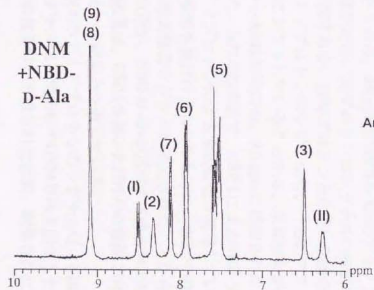


Fig. 2-7 NMR spectra of mixture (1:1) of DNM and NBD-D-Ala or -L-Ala

今回¹H-NMRスペクトルを測定した条件は、NMRを用いてキラル固定相の光学活性部位と溶質との相互作用を解析した他のグループの報告[53-55]と比較して、溶質や固定相の光学活性部位の濃度が薄く、測定溶媒が異なっていた。それらの報告では、今回検討した濃度の約10倍量の溶質及び固定相の光学活性部位を使用し、測定溶媒にはHPLCの移動相とは異なる、クロロホルム (d-クロロホルム) を使用していた。その結果、固定相の光学活性部位の芳香環のプロトンのシグナルが、溶質の添加によってシフトし、そのシフトした割合が添加した溶質の立体配置によって異なっていた。試料濃度を濃くすることで、試料中の複合体量が増加し、さらにクロロホルムのような疎水的な溶媒を用いることで、複合体形成に関与している水素結合が強固になるため、複合体構造が安定化し、その結果複合体形成に関与している π - π 相互作用が観測されたと考えられる。

さらに修士課程の実験で、CSP 1によるNBD-アミノ酸の分離係数が、カラム温度の低下に伴って、増加することが明らかとなった[56]。またNMRの測定温度を低温にすると分子運動が遅くなり、複合体構造に留まる時間が延長されるため複合体に由来するプロトンのシグナルが検出される、あるいは溶媒プロトンとの交換速度が速かったため観測されていなかったプロトンのシグナルが観測されると予想された。従ってDNMとNBD-Alaの混合溶液の¹H-NMRスペクトルをより低温で測定することで、不斉認識に伴うスペクトルの変化が顕著になると考えた。

そこで試料濃度、測定溶媒、測定温度を変更してDNMとNBD-Alaの相互作用の解析を試みたが、NBD-Alaは重クロロホルムに対する溶解度が低かったので、測定溶媒はd-メタノールのままで、試料濃度を約10倍濃くし (17 μ M)、測定温度を-20度としてDNMとNBD-Alaの相互作用を解析した。混合試料のスペクトルをFig. 2-8に示したが、DNMの芳香環の各プロトンのシグナルは、NBD-Alaの添加に関わらず、変化しなかったが、NBD-L-Alaを添加したスペクトルのみ、9.0 ppmにNBD-L-Alaのアミノプロトンのシグナルが検出された。NBD-D-Ala添加時の、同プロトンのシグナルの帰属は行っていないが、9.0 ppmよりは高磁場側に存在するか、溶媒プロトンとの速い交換のため観測されなかったと考えられる。このアミノプロトンのシグナルも、一般のアミノプロトンのシグナルと比較して、低磁場側にシフトしていることから、水素結合が生じていると推測され、この水素結合はNBD-L-Ala添加時のみ、9.0 ppmに観測されたことから、光学分割に関与していると考えた。HPLCの実験で、CSP 1によるNBD-アミノ酸の光学分割には、NBD-アミノ酸のアミノプロトンによる水素結合が関与していることが示唆されており、今回の結果はその推測を裏付けるものであった。またNBD-L-Ala添加時のみ、9.0 ppmにアミノプロトンの水素結合シグナルが検出されたことから、NBD-L-AlaがDNMとの間に形成する複合体の方が、NBD-D-Alaが形成する複合体よりも形成されやすいことを示唆しており、この結果は、CSP 1を用いたHPLCの実験でNBD-L-Alaの方がNBD-D-Alaよりも遅く溶出するという結果と一致している。

さらに低温状態において、DNM(4)のアミノプロトンのシグナルは、NBD-D-Ala添加時にも観測された。しかしこのシグナルは、同条件でDNM単体を測定したときも観測されるため、NBD-D-AlaとDNMとの複合体が形成された結果、観測されたシグナルではないかもしれない。

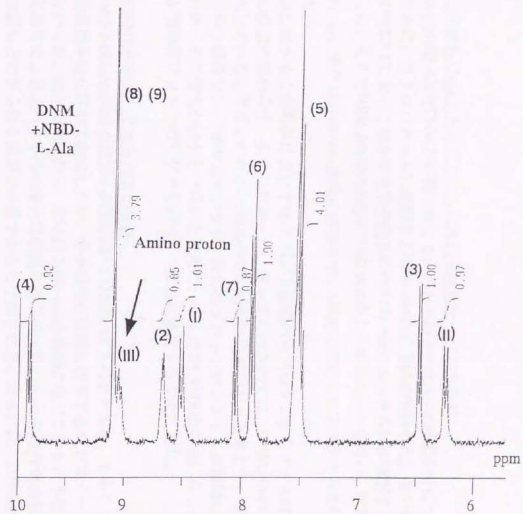
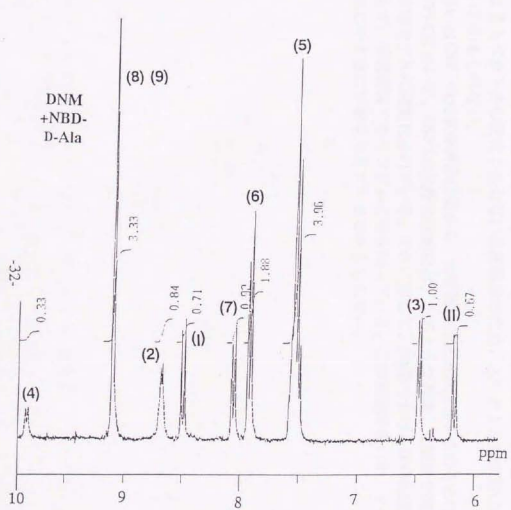


Fig. 2-8 NMR spectra of mixture (1:1) of DNM and NBD-D-Ala or -L-Ala
Temperature: -20°C , Solvent: CD_3OH

DNMとNBD-Alaのメチルエステルとの相互作用についての検討

さらにNBD-AlaとDNMとの間に生じていると予想された π - π 相互作用について解析するために、重クロロホルムに溶解するNBD-Alaの誘導体を検索した。その結果、HPLCでCSP 1によって僅かに光学分割されたNBD-Alaのエステル体が溶解することが分かった。そこでNBD-Alaの代わりにNBD-Alaのメチルエステルを用い、試料濃度を17 μ Mとし、重クロロホルム溶液に溶解させ、-20度で測定したスペクトルをFig. 2-9に示した。

しかしながらこの条件においてもDNMの芳香環の各プロトンのシグナルは、エステル体の添加に関わらず、変化しなかった。従ってこの条件では、DNMとNBD-Alaとの間に生じていると予想された π - π 相互作用の解析は困難であると考えた。¹H-NMRスペクトルの解析では、DNMのナフタレン環の各プロトンのシグナルが複雑に分裂しているため、その変化が分かりづらいたと考えた。そこで2D-NMR法を用いることで、ナフタレン環の各プロトンのシグナルについて詳細に検討することにした。

2次元NMRを利用した相互作用の解析

DNMとNBD-Alaの混合試料のNOESYおよびROESYスペクトルを、ミキシングタイムや測定温度を変化させて測定したが、分子間相互作用に由来するクロスピークは観測されなかった。以上の検討から、DNMとNBD-Alaとの間に生じていると予想された π - π 相互作用によるスペクトルの変化は観測されなかった。 π - π 相互作用の解析には、測定溶媒などのさらなる変更が必要であると予想される。あるいは、DNMとNBD-Alaとの間に π - π 相互作用は生じているが、その芳香環の位置関係が各芳香環の環電流効果によるスペクトルの変化を生じない位置関係のため、スペクトルには変化が生じていないのかもしれない。

あるいはCSP 1の元素分析の結果から、光学活性部位間の距離を求めると11.3 Åになる。HPLCにおいて、CSP 1の光学活性部位は、このような近接した距離で同方向を向いた状態でゲルに固定化されている。それに対して、NMRにおけるDNMは固定化されておらず、測定溶媒中をランダムに動き回っている。この環境の違いが、 π - π 相互作用の生じやすさに影響を与えているのかもしれない。

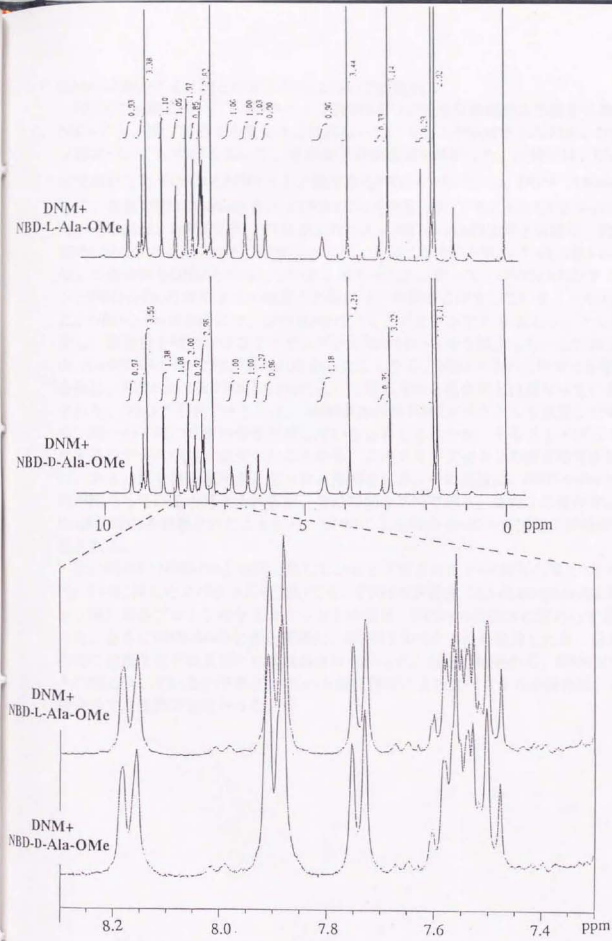
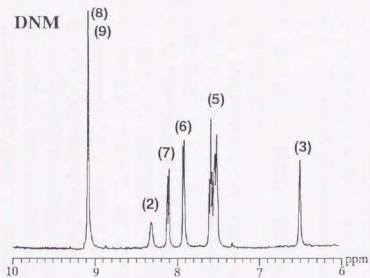
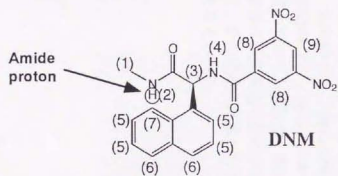


Fig. 2-9 NMR spectra of mixture (1:1) of DNM and NBD-D-Ala-OMe or -L-Ala-OMe
 Temperature: -20°C, Solvent: CDCl₃

DNMとNBD-イミノ酸との相互作用についての検討

HPLCの実験において、NBD-イミノ酸がCSP 1の光学活性部位と形成する複合体は、NBD-アミノ酸が形成する複合体とは異なっていることが示唆されたため、NBD-イミノ酸についてもNMRを用いて、その光学分割機構を解析した。試料には、CSP 1の光学活性部位であるDNMとNBD-イミノ酸であるNBD-Proを用いた。DNM (1.6 μ M) に対して、等量のNBD-D-ProあるいはNBD-L-Proを添加したスペクトルをFig. 2-10に示した。その結果、DNMに対してL体添加時のみ、NBD-L-Ala添加時と同様に、約9.5 ppmにDNMの(4)のアミドプロトンが検出された。このことからNBD-L-ProもNBD-L-Alaと類似した複合体をDNMと形成していると考えられた。従って、DNMの(4)のアミドプロトンとNBD-L-Proのカルボニル酸素との間には、水素結合が生じていることが示唆された。NBD-D-Pro添加時には、DNMの他のアミドプロトンである(2)のシグナル強度が減少し、添加量を増加させることでシグナル強度はいっそう減少した。この減少はNBD-DL-AlaやNBD-L-Proでは、見られなかったことから、NBD-D-ProとDNMとが形成する複合体は、NBD-DL-AlaやNBD-L-Proによって形成される複合体とは異なっていると推測された。(2)のアミドプロトンは、DNM単体の¹H-NMRスペクトルを測定した実験から、同一分子内に水素結合を形成していると考えられたが、そのアミドプロトンに由来するシグナル強度が減少したことから、このアミドプロトンの緩和時間が延長した、あるいは交換速度が遅くなったと推測される。その原因に、NBD-D-Proとの相互作用が関与していると考えられるが、その詳細は不明である。またこの変化が、NBD-D-Pro添加時のみ観察されたことから、DNMによるNBD-Proの不斉認識に関係があると予想される。

次にDNMとNBD-Proとの間で生じていると予想された π - π 相互作用について記す。Fig. 2-10に示したスペクトルにおいても、DNMの芳香環 (3,5-dinitrophenyl基とナフタレン環) の各プロトンのケミカルシフトの値は、NBD-Proの添加に関わらず変化しなかった。さらにNBD-Alaのときと同様に、ROESYスペクトルを測定したが、分子間相互作用に由来するクロスピークは観測されなかった。以上の結果から、DNMとNBD-Proとの間に生じていると予想された π - π 相互作用によるスペクトルの変化は、今回の実験条件では観測できなかった。



Eluted later in HPLC

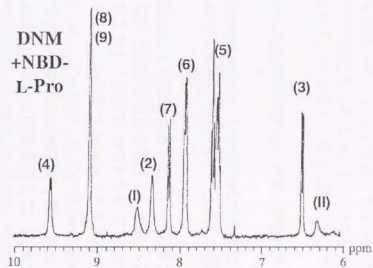
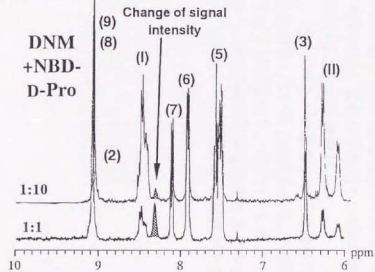


Fig. 2-10 NMR spectra of mixture of DNM and NBD-D-Pro or -L-Pro

2-2-6 小括

以上のHPLCとNMRの検討により、NBD-アミノ酸とCSP 1の光学活性部位との複合体は、NBD-アミノ酸のアミノプロトンとCSP 1の不斉炭素に結合したカルボニル酸素との間に生じる水素結合、NBD-アミノ酸のカルボニル酸素とCSP 1の不斉炭素に結合したアミドプロトンとの間に生じる水素結合とNBD-アミノ酸のベンゾフラザン骨格とCSP 1のナフタレン環との間に生じる π - π 相互作用によって形成されていると考えた。 π - π 相互作用については、その詳細はまだ不明な点もあるが、以下のような実験結果によって、CSP 1の3,5-dinitrophenyl基ではなく、ナフタレン環との間に生じていると考えた。

- 1 CSP 1のアミノ酸部位の構造をNaglyからPhglyに置換することで、NBD-アミノ酸の分離係数が減少した。
- 2 π -Donorを有するため、CSP 1の3,5-dinitrophenyl基と π - π 相互作用を生じていると予想されるDNS-アミノ酸と π -acceptorを有するNBD-アミノ酸とでは、光学異性体の溶出順が逆転していた。
- 3 3,5-Dinitrophenyl基と π - π 相互作用を形成していると考えられている溶質とNBD-アミノ酸とでは、溶質の置換基のハメット定数と分離係数との関係が、異なっていた。
- 4 NMRを用いた検討で、類似構造を有するキラル固定相(CSP A, CSP B)の3,5-dinitrophenyl基との π - π 相互作用によるスペクトルの変化が観測される条件を用いても、CSP 1の3,5-dinitrophenyl基の各プロトンのシグナルに、変化が見られなかった。

上記の分子間の3つの相互作用に加えて、さらにNMRの検討で示唆された、CSP 1の光学活性部位に分子内水素結合が形成されているという仮定を加えて、計算化学(MOPAC/AM1)を用いて、CSP 1の光学活性部位とNBD-L-Alaとの複合体の構造を最適化した結果をFig. 2-11に示した。Fig. 2-11において、NBD-L-Alaのアルキル側鎖であるメチル基は、複合体形成に関与していないため、最初の予想通り、他のNBD-アミノ酸も同様な複合体によって光学分割されていることが示唆された。

各NBD-アミノ酸の分離係数の違いは、「 α -プロトンの影響」の項で述べたように、各NBD-アミノ酸のアルキル側鎖の嵩高さが関与していると考えられる。NBD-アミノ酸のアルキル側鎖が、嵩高くなることでFig. 2-11に示した、ジアステレオメリックな複合体の外部表面に存在するアルキル側鎖が、周囲の環境と相互作用を生じやすくなり、その構造に由来したエネルギー差も生じやすくなるため、分離係数が大きくなると考えられる。

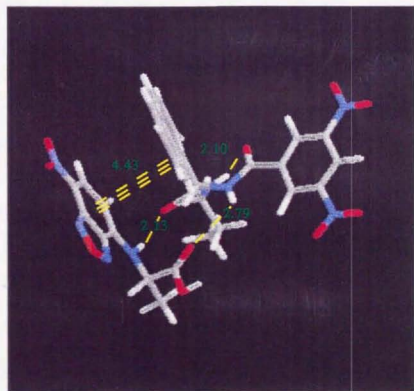
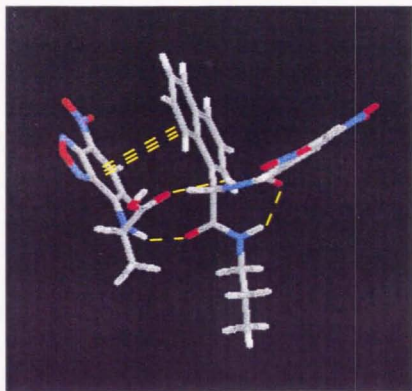


Fig. 2-11 A complex structure formed between the chiral moiety of CSP 1 and NBD-L-Ala

2-3 CSP 2 (SUMICHIRAL OA-3100) による光学分割機構

次にCSP 2 (Fig. 1-1)によるNBD-アミノ酸の光学分割機構の解明を目指し、類似構造を有する溶質の溶出挙動を比較した。各NBD-アミノ酸の光学分割の分離係数は、CSP 2の方がCSP 1と比較して大きいため[6]、CSP 2はNBD-アミノ酸の光学分割に優れたキラル固定相であった。CSP 2は、3,5-dinitrophenyl基とアミノ酸(Val)部位との結合構造がウレア結合であるという特徴を有していた。このようなウレア結合を有するキラル固定相は、原や大井[7]等によって数多く作製されており、CSP Bの3,5-dinitrophenyl基とアミノ酸(Phgly)部位との結合構造をアミド基からウレア基に変化させることで、キラル固定相によるDNS-アミノ酸などに対する光学分割能が向上するという報告もあった[8]。従ってウレア結合を有するキラル固定相は、アミド結合を有するキラル固定相とは異なった光学分割機構によって溶質を光学分割していると考えられ、CSP 2によるNBD-アミノ酸の光学分割機構に興味がひかれた。

2-3-1 NBD-アミノ酸の光学分割

CSP 2による各NBD-アミノ酸とNBD-Proの分離係数や溶出順等をTable 2-14にまとめた。CSP 2では、NBD-アミノ酸とNBD-Proは良好に光学分割され、その溶出順は共通してD, Lの順であった。NBD-Proの分離係数は低い値であったが(1.07)、NBD-アミノ酸の分離係数は1.27~1.67の間であった。CSP 2においても、CSP 1のときと同様に疎水性の高いアミノ酸のNBD誘導体の方が、大きな分離係数を示す傾向が見られた。このようにNBD誘導体の分離係数の差が小さく、溶出順に変化が見られないことから、光学分割に関与するCSP 2の光学活性部位とNBD-アミノ酸との複合体形成には、NBD-アミノ酸のアルキル側鎖は関与していないと考えられた。そしてCSP 2によるNBD-アミノ酸の光学分割は、全て同一の機構によって達成されていると予想された。またNBD-Proの溶出順が、NBD-アミノ酸の溶出順と同一であることから、光学分割に関与する複合体形成に、NBD-アミノ酸のアミノプロトンは関与していない可能性が示唆された。

アミノ基(アミノプロトン)の影響

NBD-アミノ酸のアミノプロトンがCSP 2の光学活性部位との複合体形成に関与しているかどうかを調べるために、CSP 1のときと同様に、NBD-イミノ酸の分離挙動を検討した結果をTable 2-15にまとめた。CSP 2では、イミノ酸である*N*-メチル-アミノ酸、Pro、pipercolic acidのNBD誘導体はNBD-アミノ酸と同じ溶出順で溶出された。アミノ酸と*N*-メチル-アミノ酸の分離係数を比較すると、*N*-メチル化によって分離係数が減少した。アミノプロトンが存在しないNBD-イミノ酸も、CSP 2によってNBD-アミノ酸と同じ溶出順で溶出されたことから、NBD-アミノ酸のアミノプロトンはCSP 2の光学活性部位との複合体形成に必ずしも必要でないと考えられる。しかしながら*N*-メチル化によって分離係数が減少したことから、NBD-アミノ酸のアミノプロトンは複合体形成を何らかの形で補助していると考えられた。

Table 2-14 Chromatographic results for NBD-amino acids on CSP 2

Amino acid	k for D Form	k for L Form	Separation factor (α)	Elution order	Mobile phase*
Ala	2.16	3.11	1.44	D, L	a
Asn	3.70	5.65	1.53	D, L	a
Asp	5.63	7.43	1.32	D, L	a
Gln	3.07	4.08	1.33	D, L	a
Glu	3.32	4.26	1.29	D, L	a
Gly		3.86		-	a
Ile	1.42	1.89	1.33	D, L	a
Leu	1.20	2.01	1.67	D, L	a
Lys	9.55	13.05	1.37	D, L	a
Met	2.48	3.82	1.54	D, L	a
Phe	2.53	3.85	1.52	D, L	a
Pro	5.69	6.11	1.07	D, L	a
Ser	3.29	4.72	1.43	D, L	a
Thr	2.32	3.40	1.46	D, L	a
Tyr	5.40	6.88	1.27	D, L	b
Val	1.45	1.90	1.31	D, L	a

Mobile phase: 5 mM citric acid in MeOH, b: 10 mM citric acid in MeOH

Table 2-15 Chromatographic results for NBD-imino acids and -amino acids on CSP 2

Solute	k [#]	α	Elution order	Solute	k [#]	α	Elution order	Mobile phase*
Imino acids			Amino acid					
N-Methyl-Ala	2.75	1.12	D, L	Ala	2.16	1.44	D, L	a
N-Methyl-Phe	1.87	1.28	D, L	Phe	1.72	1.38	D, L	b
(Cyclic compound)								
Pro	5.69	1.07	D, L					a
Pipecolic acid	18.74	1.03	D, L					c

k[#]: Capacity factor for first eluted enantiomer

Mobile phase*: a: 5 mM citric acid in methanol, b: 10 mM citric acid in methanol, c: 0.2 mM citric acid in methanol

カルボキシ基の影響

CSP 2の光学活性部位とNBD-アミノ酸との複合体形成に、NBD-アミノ酸のカルボキシ基が関与しているかどうかを調べるために、カルボキシ基の構造を様々に変化させた溶質 (Fig. 2-3) の分離挙動を調べた結果を、Table 2-16にまとめた。NBD-Alaのカルボキシ基をアルキル直鎖とエステル体、アミド体、アルコールに置換したこれら溶質の中で、アルキル直鎖に置換したNBD-1-メチルプロピルアミンを除いた溶質は光学分割された。溶出順は、全てD, L(R, S)の順であった。以上の結果から、溶質とCSP 2の光学活性部位との複合体形成には、溶質の不斉炭素から β 位に存在する酸素原子による水素結合が、関与していると考えられた。そしてNBD-アミノ酸の場合には、NBD-アミノ酸のカルボニル酸素による水素結合が関与していると予想した。各溶質の分離係数はCSP 1のときと同様に、ジメチルアミド体が一番大きく、アミド体、アルコール体、エステル体の順に減少し、CSP 2においても、溶質の酸素原子の共役酸の pK_a の値と、分離係数の間には大小関係の一致が見られた。

ベンゾフラザン骨格の影響

CSP 2の3,5-dinitrophenyl基を*tert*-ブチル基に置換したキラル固定相では、殆どのNBD-アミノ酸が光学分割されなかったことから[6]、CSP 2によるNBD-アミノ酸の光学分割にも、水素結合に加えて π - π 相互作用が関与していると考えた。従ってCSP 2の光学活性部位とNBD-アミノ酸との間に複合体が形成されているときには、CSP 2の3,5-dinitrophenyl基とNBD-アミノ酸のベンゾフラザン骨格との間に π - π 相互作用が生じていると予想した。そこでまず、CSP 1のときと同様に、DNS-アミノ酸とNBD-アミノ酸の溶出挙動を比較した結果をTable 2-17にまとめた。DNS基は π -donorであるナフタレン構造を有するため、 π -acceptorである3,5-dinitrophenyl基との間には π - π 相互作用を生じやすいと予想されたが、DNS-アミノ酸は、NBD-アミノ酸と比較して、溶出順には変化が見られなかったものの、分離係数は減少した。さらにベンゾフラザン骨格の7位の置換基を変化させた、4種類のAla誘導体の分離挙動を比較した結果 (Table 2-18)、溶出順には変化が見られなかったものの、分離係数は変化し、NBD-Alaの分離係数が最も大きな値を示した。NBD, ABD, DBD-Alaの分離係数の方が、HBD-AlaやDNS-アミノ酸の分離係数より大きいことから、 π -acceptorの性質が大きい溶質の方が、CSP 2によって良好に光学分割される傾向があった。従って溶質がCSP 2の3,5-dinitrophenyl基との相互作用によって生じる安定化エネルギーの差は、 π -acceptorを有する溶質の方が大きかった。

π - π 相互作用が生じる要因として、電荷移動型相互作用よりは、静電的相互作用の寄与が大きいという考えもある[57]。そしてナフタレン環の1,8位にフェニル基を固定化させて、フェニル基の置換基とフェニル基の回転障壁の関係を調べた結果、電子求引性の置換基を有したフェニル基 (π -acceptor) 同士のとくに、その回転障壁が最も大きかった[58]。この結果は、 π -acceptor同士の π - π 相互作用が最も強力であることを示しており、 π -acceptorを有する溶質がCSP 2によって良好に光学分割されたという今回の実験結果を説明できる。

Table 2-16 Chromatographic results for NBD-Ala derivatives and the related compounds on CSP 2

	k for First eluted enantiomer	Separation factor (α)	Elution order	Mobile phase*	pKa Value of oxygen (conjugate acid)
Ester (COOCH ₃)	5.11	1.02	D, L (R, S)	a	-6.5
Amide (CONH ₂)	3.06	1.14	D, L (R, S)	a	-0.5
Dimethylamide (CON(CH ₃) ₂)	5.57	1.20	D, L (R, S)	a	>-0.5
Alcohol (2-Amino-1-propanol)	15.76	1.05	R, S	b	-2.0
Alkyl (1-Methylpropylamine)	6.74	-	-	c	-

Mobile phase*: a: 2 mM citric acid in mixture of methanol and water (1/1, V/V),
 b: 5 mM citric acid in mixture of methanol and water (1/4, V/V),
 c: 5 mM citric acid in mixture of methanol and water (1/1, V/V)

Table 2-17 Chromatographic results for DNS- or NBD-amino acids on CSP 2

Amino acid	DNS-Amino acid				NBD-Amino acid			
	k [#]	α	Elution order	Mobile phase*	k [#]	α	Elution order	Mobile phase*
Ala	1.03	1.11	D, L	a	2.16	1.44	D, L	b
Leu	0.33	1.40	D, L	a	1.20	1.67	D, L	b
Phe	1.08	1.22	D, L	a	2.53	1.52	D, L	b

k[#]: Capacity factor for first eluted enantiomer
 Mobile phase*: a: 2 mM citric acid in methanol, b: 5 mM citric acid in methanol

Table 2-18 Chromatographic results for benzofurazan derivatives of Ala on CSP 2

Solute	k for First eluted enantiomer	α	Elution order	Mobile phase*	Hammett constant (σ_p)	LUMO Energy (eV)	Sum of atomic charge (e)	
NBD-Ala	NO ₂	2.16	1.44	D, L	a	0.78	-1.931	-0.352
DBD-Ala	SO ₂ NMe ₂	2.13	1.23	D, L	b	0.65	-1.571	-0.963
ABD-Ala	SO ₂ NH ₂	1.34	1.31	D, L	b	0.60	-1.585	-0.960
HBD-Ala	H	1.44	1.17	D, L	c	0.00	-1.503	-0.522

Mobile phase*: a: 5 mM citric acid in methanol, b: 2 mM citric acid in methanol,
 c: 1 mM citric acid in methanol

α -プロトンの影響

CSP 2においても、NBD-TyrとNBD- α -メチル-Tyrの溶出挙動を比較した (Table 2-19)。その結果CSP 1のときと同様に、 α -メチル化により溶出順には変化が見られなかったものの、分離係数が大きく減少した。その原因は、CSP 1のときと同様にNBD- α -メチル-Tyrの単結合の回転障壁による最安定構造の変化、あるいは複合体の外部表面に存在する構造が影響を与えていると考えた。

2-3-2 その他のアミン類のNBD誘導体の光学分割

最後に β -aminobutyric acid, prilocaine, 1-phenylethylamineのNBD誘導体の光学分割を試みた結果、NBD- β -aminobutyric acidのみが光学分割された (Table 2-20)。しかしながらその溶出順は、光学活性体が入手できなかったため確定できなかった。CSP 1で光学分割されたNBD-prilocaineや1-phenylethylamineが、CSP 2によって光学分割されなかった理由として、CSP 1によるこれら溶質の分離係数が小さな値であることから、これらの溶質は構造的に光学分割されづらいと考えた。

Table 2-19 Chromatographic results for NBD-Tyr and α -methyl-Tyr on CSP 2

Amino acid	k for D Form	k for L Form	Separation factor (α)	Elution order
Tyr	5.40	6.88	1.27	D, L
α -Methyl-Tyr	8.21	8.59	1.05	D, L

Mobile phase: 10 mM citric acid in MeOH

Table 2-20 Chromatographic results for NBD-amines on CSP 2

Solute	k for First eluted enantiomer	k for Second eluted enantiomer	Separation factor (α)	Elution order	Mobile phase*
β -Aminobutyric acid	1.59	1.67	1.07	N. I.	a
Prilocaine	11.91	-	1.00	-	b
1-Phenylethylamine	7.04	-	1.00	-	c

Mobile phase*: a: 0.2 mM citric acid in MeOH

b: 5 mM citric acid in mixture of methanol and water (60/40),

c: 5 mM citric acid in mixture of methanol and water (50/50)

2-3-3 小括

以上の結果より、CSP 2の光学活性部位とNBD-アミノ酸との複合体形成には、NBD-アミノ酸のアミノプロトンとカルボニル酸素それぞれによる水素結合と、ベンゾフラザン骨格による π - π 相互作用が関与していることが示唆された。そのアミノプロトンによる水素結合は、複合体形成に必須ではなく、複合体形成を補助していると考えられた。そしてFig. 2-12に光学分割に関与していると予想された複合体構造を示した。

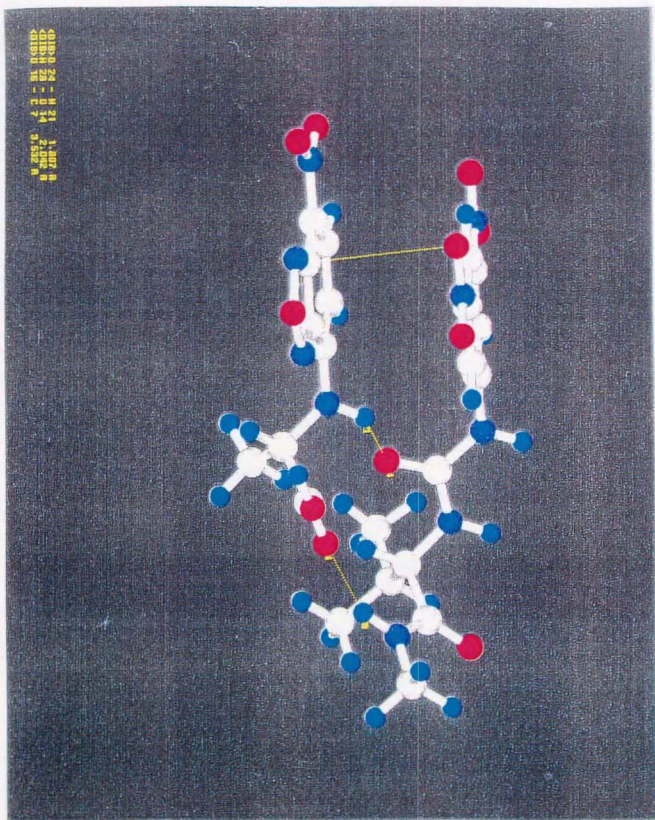


Fig. 2-12 A complex structure formed between the chiral moiety of CSP 2 and NBD-L-Ala

2-4 CSP 3 (SUMICHRAL OA-4700) による光学分割機構

つぎに、CSP 3によるNBD-アミノ酸の光学分割機構の解明を目指し、類似構造を有する溶質の溶出挙動を比較した。光学活性なナフチルエチルアミンを有するキラル固定相の多くは、大井等によって開発されており[59-61]、中でもCSP 3はNBD-アミノ酸に対して高い光学分割能を有していた[6]。またCSP 3の光学活性部位には、2つの不斉炭素が存在しており、それぞれの立体配置は、*tert*-LeuはS体で、ナフチルエチルアミンはR体であった。

2-4-1 NBD-アミノ酸の光学分割

CSP 3によるNBD-アミノ酸とNBD-Proの分離係数や溶出順等をTable 2-21にまとめた。CSP 3によって、NBD-アミノ酸とNBD-Proは良好に光学分割され、その溶出順は共通してD, Lの順であった。NBD-アミノ酸の分離係数は1.10~1.33の範囲であり、NBD-Proの分離係数はそれより小さい値を示した(1.03)。このようにNBD誘導体の分離係数の差が小さく、溶出順に変化が見られないことから、光学分割に関与するCSP 3の光学活性部位とNBD-アミノ酸との複合体形成には、NBD-アミノ酸のアルキル側鎖は関与していないと考えられた。つまりCSP 3によるNBD-アミノ酸の光学分割は、全て同一の機構によって達成されていると予想された。またNBD-Proの溶出順が、NBD-アミノ酸の溶出順と同一であることから、光学分割に関与する複合体形成に、NBD-アミノ酸のアミノプロトンは関与していない可能性が示唆された。

アミノ基(アミノプロトン)の影響

NBD-アミノ酸のアミノプロトンが、CSP 3の光学活性部位との複合体形成に関与しているかどうかを調べるために、CSP 1やCSP 2のときと同様に、NBD-イミノ酸の分離挙動を検討した(Table 2-22)。NBD-イミノ酸の中でNBD-Pro、-pipecolic acidの様な環状構造を有するNBD-イミノ酸は光学分割されたが、NBD-N-メチル-アミノ酸は光学分割されなかった。この結果から、CSP 3によるNBD-アミノ酸の光学分割には、NBD-アミノ酸のアミノプロトンによる水素結合が関与していると考えられる。またNBD-Pro、-pipecolic acidが光学分割されたことから、溶質のアミノプロトンによる水素結合を必要としない光学分割機構も存在することが示唆されたが、その光学分割機構によって、NBD-N-メチル-アミノ酸が光学分割されない理由は、不明である。

Table 2-21 Chromatographic results for NBD-amino acids on CSP 3

Amino acid	k for D Form	k for L Form	Separation factor (α)	Elution order
Ala	3.77	4.38	1.16	D, L
Asn	4.43	5.46	1.23	D, L
Asp	11.26	12.39	1.10	D, L
Gln	3.86	4.49	1.16	D, L
Glu	6.82	7.73	1.13	D, L
Gly		5.99		-
Ile	2.58	2.98	1.15	D, L
Leu	1.96	2.61	1.33	D, L
Lys	9.32	11.31	1.21	D, L
Met	4.44	5.62	1.26	D, L
Phe	5.34	6.73	1.26	D, L
Pro	4.47	4.59	1.03	D, L
Ser	5.75	6.51	1.13	D, L
Thr	3.86	4.57	1.18	D, L
Tyr	11.04	14.61	1.32	D, L
Val	2.72	3.01	1.11	D, L

Mobile phase: 5 mM citric acid in MeOH

Table 2-22 Chromatographic results for NBD-imino acids and -amino acids on CSP 3

Solute	k [#]	α	Elution order	Solute	k [#]	α	Elution order	Mobile phase ^a
Imino acids				Amino acid				
N-Methyl-Ala	3.09	1.00	-	Ala	3.78	1.15	D, L	a
N-Methyl-Phe	2.34	1.00	-	Phe	2.79	1.19	D, L	b
N-Methyl-Asp	10.02	1.00	-	Asp	9.75	1.14	D, L	a
(Cyclic compound)								
Pro	6.99	1.15	D, L					a
Pipecolic acid	2.68	1.07	D, L					a

k[#]: Capacity factor for first eluted enantiomer

Mobile phase^a: a: 5 mM citric acid in methanol, b: 10 mM citric acid in methanol

カルボキシ基の影響

CSP 3の光学活性部位とNBD-アミノ酸との複合体形成に、NBD-アミノ酸のカルボキシ基が関与しているかどうかを調べるために、カルボキシ基の構造を様々に変化させた溶質 (Fig. 2-3) の分離挙動を調べた (Table 2-23)。その結果、1-メチル-プロピルアミンに加えて、2-アミノ-1-プロパノールのNBD誘導体も光学分割されなかった。光学分割された溶質の溶出順は、全てD, Lの順であった。以上の結果から、CSP 3による光学分割にも溶質の不斉炭素から β 位の酸素原子による水素結合が、関与していると考えられる。そしてNBD-アミノ酸の場合には、NBD-アミノ酸のカルボニル酸素による水素結合が関与していると予想した。CSP 3の光学活性部位には2つの不斉炭素が存在するため、その光学分割機構がCSP 1やCSP 2とは異なっていると予想され、その結果CSP 1やCSP 2では光学分割されたアルコール構造を有するNBD-2-アミノ-1-プロパノールが、CSP 3では光学分割されなかったと考えた。各溶質の分離係数は、ジメチルアミド体が一番大きく、アミド体、エステル体の順に減少し、光学分割された溶質の酸素原子の共役酸のpKaの値と分離係数との間には大小関係の一致が見られた。

ベンゾフラザン骨格の影響

CSP 3によるNBD-アミノ酸の光学分割にも、水素結合に加えて π - π 相互作用が関与していると考えられた。従ってCSP 3の光学活性部位とNBD-アミノ酸との間に複合体が形成されているときは、CSP 3のナフタレン環とNBD-アミノ酸のベンゾフラザン骨格との間に π - π 相互作用が生じていると予想された。そこでまず、DNS-アミノ酸とNBD-アミノ酸の溶出挙動を比較した結果をTable 2-24にまとめた。今回検討した条件では、DNS-アミノ酸は光学分割されなかった。DNS-アミノ酸は、 π -donorであるナフタレン環を有するため、 π -donorであるCSP 3のナフタレン環との間には電荷移動錯体による π - π 相互作用を生じにくいと考えられ、その結果DNS-アミノ酸は光学分割されなくなったと予想した。さらにベンゾフラザン骨格の7位の置換基を変化させた、4種類のAla誘導体の分離挙動を比較した結果をTable 2-25にまとめた。HBD-Alaのピーク形状が、正規分布をしていなかったため分離係数を計算しなかった。その他のベンゾフラザン誘導体については、溶出順には変化が見られなかったものの、分離係数は変化し、NBD-Alaの分離係数が最も大きな値を示した。NBD-Alaは検討した溶質の中で π -acceptorの性質が最も大きいため、CSP 3のナフタレン環との間に π - π 相互作用を生じやすく、その結果NBD-Alaは良好に光学分割されたと考えた。従って、CSP 3の光学活性部位とNBD-アミノ酸との複合体形成には、NBD-アミノ酸のベンゾフラザン骨格による π - π 相互作用が関与していると考えられる。

Table 2-23 Chromatographic results for NBD-Ala derivatives and the related compounds on CSP 3

	k for First eluted enantiomer	Separation factor (α)	Elution order	Mobile phase*	pKa Value of oxygen (conjugate acid)
Ester (COOCH ₃)	2.34	1.03	D, L (R, S)	a	-6.5
Amide (CONH ₂)	1.37	1.14	D, L (R, S)	a	-0.5
Dimethylamide (CON(CH ₃) ₂)	1.82	1.19	D, L (R, S)	a	>-0.5
Alcohol (2-Amino-1-propanol)	7.01	-	-	b	-2.0
Alkyl (1-Methylpropylamine)	3.11	-	-	c	-

Mobile phase*: a: 2 mM citric acid in mixture of methanol and water (1/1, V/V),
 b: 5 mM citric acid in mixture of methanol and water (1/4, V/V),
 c: 5 mM citric acid in mixture of methanol and water (1/1, V/V)

Table 2-24 Chromatographic results for DNS- or NBD-amino acids on CSP 3

Solute	DNS-Amino acid				NBD-Amino acid			
	k [#]	α	Elution order	Mobile phase*	k [#]	α	Elution order	Mobile phase*
Ala	1.68	1.00	-	a	3.77	1.16	D, L	b
Leu	0.79	1.00	-	a	1.96	1.33	D, L	b
Phe	1.83	1.00	-	a	5.34	1.26	D, L	b

k[#]: Capacity factor for first eluted enantiomer

Mobile phase*: a: 2 mM citric acid in methanol, b: 5 mM citric acid in methanol

Table 2-25 Chromatographic results for benzofurazan derivatives of Ala on CSP 3

Solute	k for First eluted enantiomer	α	Elution order	Mobile phase*	Hammett constant (σ_p)	LUMO Energy (eV)	Sum of atomic charge (e)	
NBD-Ala	NO ₂	3.78	1.15	D, L	a	0.78	-1.931	-0.352
DBD-Ala	SO ₂ NMe ₂	3.16	1.05	D, L	b	0.65	-1.571	-0.963
ABD-Ala	SO ₂ NH ₂	2.62	1.07	D, L	b	0.60	-1.585	-0.960
HBD-Ala	H	2.70	-	D, L	c	0.00	-1.503	-0.522

Mobile phase*: a: 5 mM citric acid in methanol, b: 2 mM citric acid in methanol,
 c: 1 mM citric acid in methanol

α -プロトンの影響

NBD-アミノ酸の α -プロトンが、CSP 3の光学活性部位との複合体形成に関与しているかどうかを調べるために、NBD-TyrとNBD- α -メチル-Tyrの分離挙動を比較した (Table 2-26)。その結果、NBD- α -メチル-Tyrは光学分割されなかった。 α -メチル化によって、光学分割されなくなった理由は、CSP 1やCSP 2においてNBD-Tyrの α -メチル化によって分離係数が減少した理由と同一であると考えた。CSP 3によるNBD-Tyrの分離係数が、CSP 1やCSP 2による分離係数よりも小さいため、NBD- α -メチル-TyrはCSP 3によって光学分割されなかったと考えた。

2-4-2 その他のアミン類のNBD誘導体の光学分割

最後に β -aminobutyric acid, prilocaine, 1-phenylethylamine, GABOB, 1-methyl propylamineのNBD誘導体の光学分割を試みた結果、これらの溶質はCSP 3によって光学分割されなかった (Table 2-27)。

Table 2-26 Chromatographic results for NBD-Tyr and α -methyl-Tyr on CSP 3

Amino acid	k for D Form	k for L Form	Separation factor (α)	Elution order
Tyr	5.47	6.48	1.18	D, L
α -Methyl-Tyr	8.56	8.56	1.00	-

Mobile phase: 10 mM citric acid in MeOH

Table 2-27 Chromatographic results for NBD-amines on CSP 3

Solute	k for First eluted enantiomer	Separation factor (α)	Elution order	Mobile phase*
β -Aminobutyric acid	2.67	1.00	-	a
Prilocaine	6.37	1.00	-	b
1-Phenyl ethylamine	3.08	1.00	-	c
GABOB	0.29	1.00	-	d
1-Methylpropylamine	3.11	1.00	-	e

Mobile phase*: a: 0.2 mM citric acid in methanol,
b: 5 mM citric acid in mixture of methanol and water (60/40),
c: 5 mM citric acid in mixture of methanol and water (70/30),
d: 0.5 mM citric acid in methanol,
e: 5 mM citric acid in mixture of methanol and water (50/50)

2-4-3 小括

以上の結果より、CSP 3の光学活性部位とNBD-アミノ酸との複合体形成には、NBD-アミノ酸のアミノプロトンとカルボニル酸素それぞれによる水素結合と、ベンゾフラザン骨格による π - π 相互作用が関与していた。 π - π 相互作用は、CSP 3のナフタレン環との間に形成されると考えられるが、CSP 3の水素結合部位の同定は行えなかった。複合体構造の解明には、NMRを用いた相互作用の解析などが必要であると考えられる。

第3章 HPLC用低分子型キラル固定相による

相互分離機構の解析

3-1 序

CSP 1, CSP 2, CSP 3を生体試料中のDL-アミノ酸分析に応用した場合、光学分割されたNBD-アミノ酸のピークが別のNBD-アミノ酸のピークと重なるため、限られたアミノ酸の定量しかできないという問題があった[62]。そこで前章までの光学分割機構の検討に加えて、本章ではCSP 1, CSP 2, CSP 3によるNBD-アミノ酸の相互分離の機構について調べた。CSP 1, CSP 2, CSP 3によるNBD-アミノ酸の溶出順は類似していたため、これらキラル固定相によるNBD-アミノ酸の相互分離の機構は類似していると予想された。従ってCSP 1によるNBD-アミノ酸の相互分離の機構を調べることで、これらキラル固定相によるNBD-アミノ酸の相互分離の機構は解明されると考えた。修士課程の研究で、ラセミ体のN-3,5-dinitrobenzoyl-1-Nagly (CSP 1の光学活性部位)をアミノプロピルシリカに修飾した固定相 (CSP 1(ラセミ))を作製し、NBD-アミノ酸の分離挙動を調べた結果、その溶出順は、アミノプロピルシリカゲルのみを充填した固定相 (APS)によるNBD-アミノ酸の溶出順と類似していた (Fig. 3-1) [56]。各NBD-アミノ酸の保持係数を比較すると、CSP 1(ラセミ)による保持係数の方が、APSによる保持係数よりも大きな値を示したことから、CSP 1の基材に用いているアミノプロピルシリカゲルがNBD-アミノ酸の溶出順を決定し、CSP 1のN-3,5-dinitrobenzoyl-1-Nagly部位はNBD-アミノ酸の溶出順には影響を与えず、保持のみを増加させていると推測した。この推測は、第2章で示されたCSP 1の光学活性部位とNBD-アミノ酸との複合体形成に、NBD-アミノ酸のアルキル側鎖が直接は関与していなかったことから支持される。保持係数の増加には、NBD-アミノ酸のベンゾフラザン骨格とCSP 1の芳香環との間の π - π 相互作用が関わっていると予想した。NBD-Lysの保持係数の増加が他のNBD-アミノ酸より大きい理由は、Lysは ϵ 位のアミノ基もNBD-Fで標識化されるため、 π - π 相互作用の影響を受けやすいと考えられる。

さらにCSP 1によるNBD-アミノ酸の相互分離機構を解明するために、その溶出順を決定しているアミノプロピルシリカゲルのみを充填した固定相 (APS)によるNBD-アミノ酸の分離機構について考察した。APSによるNBD-アミノ酸の溶出順に注目すると、塩基性アミノ酸が先に溶出し、続いて中性、酸性アミノ酸の順に溶出したことから、アミノプロピルシリカによる、陰イオン交換作用が関与していると考えた。陰イオン交換作用によってNBD-アミノ酸を分離した場合、塩基性アミノ酸のなかでもグアニジル基を持つArgやイミダゾール環を持つHis等は、イオニックな反発を受けやすいため保持が弱い。それに対してカルボキシ基を2つ有するAsp, Gluは、イオン結合を生じやすいため強く保持され、中性アミノ酸はその塩基性アミノ酸と酸性アミノ酸の間に溶出すると予想され、APSによるNBD-アミノ酸の溶出順と一致する。以上より、APSによるNBD-アミノ酸の相互分離には、APSのアミノ基とNBD-アミノ酸のアルキル側鎖との間に生じるイオン結合の強さの違いが関与していた。そこでさらにNBD-アミノ酸のアルキル側鎖以外の構造が、APSによるNBD-アミノ酸の相互分離に与える影響について調べるために、類似構造を有する溶質の溶出挙動を比較した。

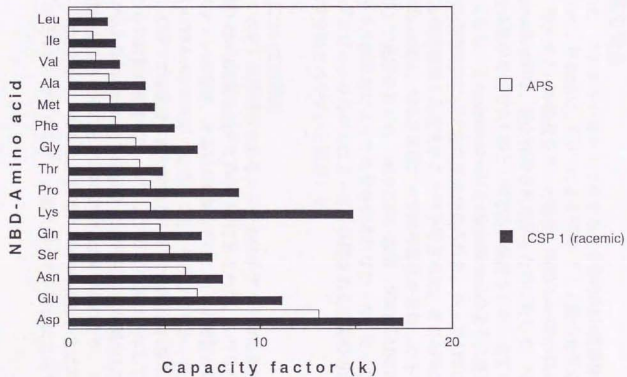


Fig. 3-1 Capacity factors for NBD-L-amino acids obtained on APS and CSP1 (racemic)

3-2 アミノ基の効果

APSによるNBD-アミノ酸とNBD-N-メチル-アミノ酸の保持係数をTable 3-1にまとめた。NBD-Ala、-Aspの保持係数について、そのN-メチル体と比較した結果、N-メチル化によってNBD-Alaの場合は保持係数が僅かに減少したが、逆にNBD-Aspの場合は僅かに増加した。NBD-アミノ酸の種類によって、そのN-メチル化が保持係数に与える影響が異なり、その影響が僅かであることから、NBD-アミノ酸のアミノ基の構造は、APSによるNBD-アミノ酸の保持係数に大きな影響は与えていないと考えられる。

3-3 カルボキシ基の効果

α -アミノ酸を含めた、カルボキシ基を1つ有する化合物のNBD誘導体の保持係数を、Table 3-2にまとめた。移動相に、CSP 1によるNBD-アミノ酸の光学分割に用いられている、5 mMクエン酸メタノール溶液を用いた場合、NBD-Leu-Gly、-GABOB、- β -aminobutyric acid、-nipecotic acidは、殆ど保持されなかったのに対して、NBD-Leu、-pipecolic acidは、保持係数がそれぞれ1.20と1.69であり保持された。全ての溶質がカルボキシ基を1つ有しており、またpipecolic acidとnipecotic acidのように構造が類似している溶質間でも、その保持係数には大きな差異が見られた。従ってAPSには、これらの構造の差異を認識する保持機構も存在することが予想された。またAPSによって保持されるNBD-Leu、-pipecolic acidは、APSの末端に光学活性部位を修飾したキラル固定相(CSP 1, CSP 2, CSP 3)で光学分割され、保持の弱い溶質(NBD-GABOB、-nipecotic acid)の多くはそのキラル固定相によって光学分割されなかった。従ってキラル固定相の基材であるアミノプロピルシリカゲルによって、保持される溶質の方が、そのキラル固定相によって光学分割されやすいと推測した。

カルボキシ基誘導体についての検討

次にAPSによるカルボキシ基誘導体であるエステル体やアミド体の保持係数を調べた。比較のためにNBD-Pheの結果を加えてTable 3-3にまとめた。これらの溶質は、移動相に5 mMクエン酸メタノール溶液、あるいはCSP 1ではこれらの溶質が保持された溶液(水/アセトニトリル/TFA=60/40/0.05)を用いても、保持されなかった。同一の移動相条件にも関わらず、CSP 1では保持された溶質がAPSでは保持されなかったことから、CSP 1によるこれらの溶質の保持には、アミノプロピル基は関与しておらず、修飾した光学活性部位(N-3,5-dinitrobenzoyl-1-Nagly)との相互作用が関与していた。

移動相中のTFA濃度を減少させることで、NBD-Pheは保持されたが、カルボキシ基誘導体は保持されなかったことから、APSによるNBD-Pheの保持は、主にNBD-Pheのカルボキシ基とアミノプロピルシリカゲルのアミノ基とのイオン結合によって生じていた。

Table 3-1 Chromatographic results for NBD-imino acids and -amino acids on APS

Solute	Capacity factors (k)	Solute	Capacity factors (k)
<i>N</i> -Methyl-Ala	1.90	Ala	2.23
<i>N</i> -Methyl-Asp	12.76	Phe	12.56

Table 3-2 Chromatographic results for NBD-derivatives on APS

Solute	Capacity factor (k)
Leu	1.20
Leu-Gly	0.69
GABOB	0.37
β -Aminobutyric acid	0.31
Pipecolic acid	1.69
Nipecotic acid	0.26

Table 3-3 Capacity factors for NBD-amino acid ester or amide on APS

Mobile phase	APS			CSP 1
	5 mM citric acid in methanol	H ₂ O/MeCN/TFA= 60/40/0.05	H ₂ O/MeCN/TFA= 60/40/0.01	H ₂ O/MeCN/TFA= 60/40/0.05
Phe-OMe	0	0	0	8.21
Phe-NH ₂	0	0	0	3.57
Phe	2.47	0.63	10.61	8.06

3-4 ベンゾフラザン骨格の効果

溶質のベンゾフラザン骨格の7位置換基の構造の差異が、APSによる溶質の保持係数に与える影響を調べた。4種類のAlaのベンゾフラザン誘導体について調べた結果をTable 3-4にまとめた。その結果、NBD-Alaが最も強く保持され、DBD-AlaやABD-Alaは同程度保持され、HBD-Alaはあまり保持されなかった。NBD誘導体のニトロ基の酸素やDBD, ABD誘導体のアミノスルホニル基の酸素は、アミノプロピル基の水素との間に水素結合を生じるが、HBD誘導体の水素はアミノプロピル基との間に水素結合を生じないため、その違いが溶質の保持係数の差に現れたと推測している。従ってAPSによる溶質の保持には、アミノプロピル基による水素結合も関与していることが示唆された。しかしながらNBD-アミノ酸の7位置換基による水素結合は、全てのNBD-アミノ酸に対して同程度生じていると考えられるため、APSによるNBD-アミノ酸の相互分離には、関与していないと考えられる。

3-5 2種類のアミノプロピルシリカカラムによる保持機構の比較

今回の検討では、充填したアミノプロピルシリカゲルの製造メーカーが異なる2種類のAPSを使用した。その2種類のAPSの間で溶質の保持係数の差異は、僅かであり、その差異は同一の充填剤のロット間の差異と同程度であると考えたので、以後の実験では、同一のAPSとして使用した。

Table 3-4 Capacity factors for benzofurazan derivatives of Ala on APS

Solute		k
NBD-Ala	NO ₂	3.88
DBD-Ala	SO ₂ NMe ₂	2.27
ABD-Ala	SO ₂ NH ₂	2.72
HBD-Ala	H	1.17

3-6 アルキル直鎖を導入した固定相によるNBD-アミノ酸の相互分離

以上の検討から、APSによる溶質の保持には、溶質のカルボキシ基が重要であり、その保持機構には、APSのアミノプロピル基によるイオン結合や水素結合が関与していた。従ってNBD-アミノ酸の相互分離は、APSのアミノプロピル基とNBD-アミノ酸のアルキル側鎖との間に生じるイオン結合や水素結合の強さの差異によって行われており、CSP 1でもこの分離機構によってNBD-アミノ酸は相互分離されていることが示唆された。そこでCSP 1によるNBD-アミノ酸の相互分離を改善するには、その他の分離機構によってNBD-アミノ酸のアルキル側鎖を認識する必要があると考えた。HPLCによるアミノ酸の分離機構として、イオン交換モードと逆相分配モードが汎用されているが、既にイオン交換モードはCSP 1によるNBD-アミノ酸の相互分離に使用されていたため、新たに逆相分配モードの性質をCSP 1に持たせることにした。逆相分配モードは、NBD-アミノ酸のアルキル側鎖の極性の差異を認識するため、CSP 1では分離困難であった中性アミノ酸のNBD誘導体の分離が容易になると予想された。そこでCSP 1に逆相分配モードの性質を持たせるためには、疎水的な構造をCSP 1に導入する必要があると考え、アルキル直鎖を導入することにした。

最初にNBD-アミノ酸の相互分離に適した、アルキル直鎖の鎖長を求めするためにアルキル鎖長の異なった2種類の固定相(APS-6-AmHA, APS-11-AmUA (Fig. 3-2))を作製した。APS-6-AmHAとAPS-11-AmUAには、それぞれアミノプロピルシリカゲルに6-aminohexanoic acidあるいは11-aminoundecanoic acidを修飾した充填剤を充填した。移動相に5 mMクエン酸メタノール溶液を用いて、APSを加えた3種類の固定相によるNBD-アミノ酸を分離したときのクロマトグラムをFig. 3-2に、各NBD-アミノ酸の保持係数をFig. 3-3にまとめた。各NBD-アミノ酸の保持係数が、APS < APS-6-AmHA < APS-11-AmUAの順に増加したことから、アルキル直鎖を導入することで、各NBD-アミノ酸の保持係数が増加した。この結果は、アルキル直鎖による疎水的相互作用が保持の増加に有効であることを示している。また3種類の固定相の間でNBD-アミノ酸の溶出順は、類似していた。NBD-アミノ酸の相互分離を比較すると、APS-11-AmUAでは、NBD-Gln, -Proを除いたNBD-アミノ酸のピークトップは分離されたが、APS-6-AmHAではGlyとGlnもしくはSer, AsnとLysのNBD誘導体のピークトップがそれぞれ重なり、APSではArgとHis, GlyとThr, ProとLysのNBD誘導体のピークトップがそれぞれ重なった。移動相中のクエン酸濃度を変化させても、NBD-アミノ酸の相互分離は改善しなかった。従ってAPS-11-AmUAが、3種類の固定相の中で最もNBD-アミノ酸の相互分離に適していると結論づけた。APS-11-AmUAでは、従来のアミノプロピル基による分離に加えて、導入したアルキル直鎖による分離が加わったため、NBD-アミノ酸の相互分離が改善したと考えられる。そしてNBD-アミノ酸の相互分離に適したAPS-11-AmUAの末端に、光学活性部位を修飾したキラル固定相は、NBD-アミノ酸の相互分離に適したキラル固定相であると期待された。

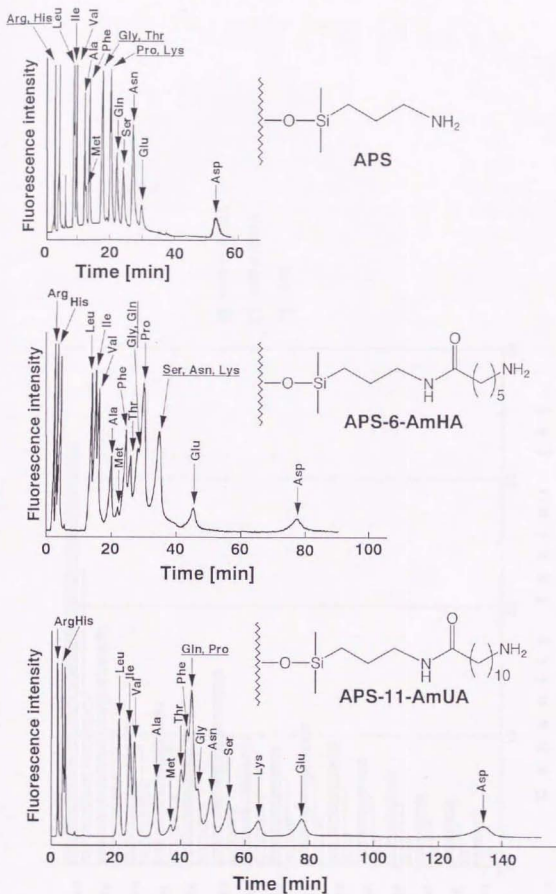


Fig. 3-2 Chromatograms for 16 NBD-L-amino acids and NBD-Gly.

Mobile phase, 5.0 mM citric acid in methanol; temperature, ambient; flow rate, 1.0 ml min⁻¹; detection, λ_{ex} 470 nm, λ_{em} 530 nm.

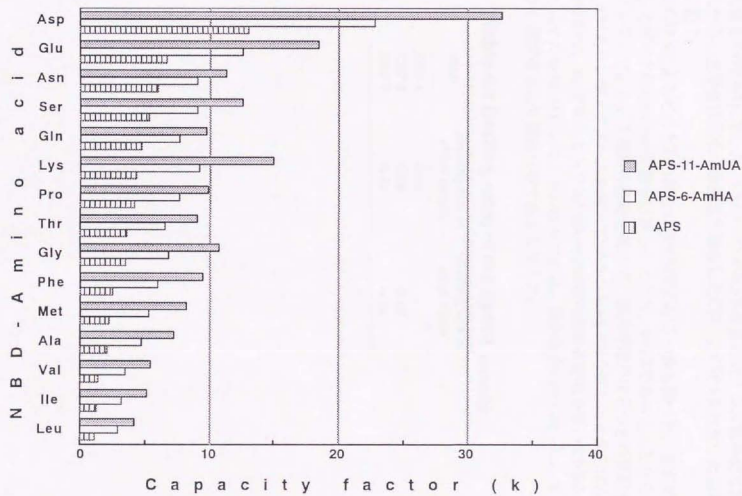


Fig. 3-3 Effect of alkyl chain length on capacity factors for NBD-amino acids

第4章 アルキル直鎖を導入したキラル固定相 の分離特性

4-1 序

APS-11-AmUAの末端に、光学活性部位としてCSP 1の光学活性部位である(S)-N-3,5-dinitrobenzoyl-1-Naglyを修飾したキラル固定相(CSP 4)を、Fig. 4-1に示す方法で作製した。導入するアルキル直鎖と光学活性部位の量を変化させた2種類のキラル固定相(CSP 4, CSP 7)を作製し、元素分析の結果から計算されたアルキル直鎖と光学活性部位の修飾量をTable 4-1に示した。CSP 4とCSP 7の各溶質に対する分離挙動は類似していたことから、光学活性部位の修飾量が類似したCSP 1とCSP 4を比較した結果を中心に以後、記す。

最初にCSP 4によるピークの対称性や溶出時間のばらつきを調べた。まずピークの対称性としてピークのsymmetry係数を計算したところ、 $S=1.3$ であったことから、ピークはテーリングしていた。2種類の移動相条件で、溶出時間のばらつきの検討を行った結果、5 mMクエン酸メタノールを用いてNBD-L-Alaを7回分析したときのばらつきは、標準偏差0.13で、水/アセトニトリル/TFA=40/60/0.01の混合溶液を用いてNBD-L-Pheのオクチルエステルを7回分析したときのばらつきは、標準偏差0.09であった。従ってCSP 4は、キラル固定相として使用可能であると考えた。

Table 4-1 Grafting rates of the ligand (mmol/g)

CSP	Grafting rate of chiral moiety	Grafting rate of alkyl chain
CSP 1	0.40	-
CSP 4	0.36	0.40
CSP 7	0.21	0.62

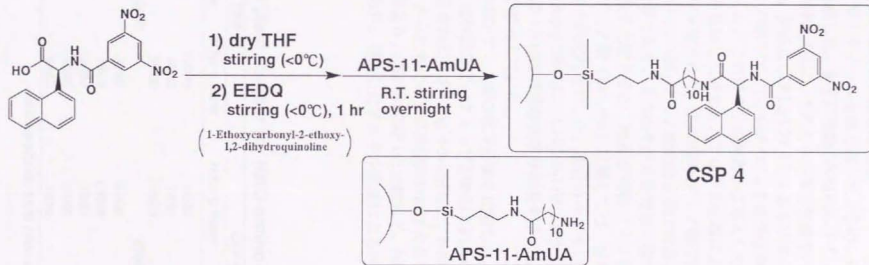


Fig. 4-1 Preparation procedure for CSP 4

4-2 アルキル直鎖を導入したキラル固定相によるNBD-アミノ酸の分離 移動相に5 mMクエン酸メタノールを用いたときの比較

最初に移動相に5 mMクエン酸メタノール溶液を用いたときの、CSP 4とCSP 1によるNBD-アミノ酸の分離挙動を比較した。まず13種類のNBD-DL-アミノ酸とNBD-Glyを分離したときのクロマトグラムをFig. 4-2に、そのときの保持係数をバーの長さで、分離係数を数値でFig. 4-3に示した。始めにCSP 1とCSP 4による各NBD-アミノ酸の保持係数を比較した。全てのNBD-アミノ酸について、CSP 4による保持係数の方がCSP 1による保持係数よりも大きな値を示した。これはキラル固定相に導入したアルキル直鎖の効果と考えられ、光学活性部位を修飾した後も、アルキル直鎖による疎水の相互作用による保持が有効であることが示唆された。次にNBD-アミノ酸に対する光学分割能を比較した。CSP 1とCSP 4において、NBD-アミノ酸の溶出順は共通してD, Lの順であり、NBD-Proの溶出順はL, Dの順であり、2つのキラル固定相の間で溶出順が異なる溶質は存在しなかった。分離係数を比較すると、殆どのNBD-アミノ酸で変化が見られなかった。ただし疎水性の高いアミノ酸 (Leu, Phe) に関しては、分離係数がLeuで1.12から1.18に、Pheで1.19から1.22にそれぞれ増加した。逆にカルボキシ基を2つ有するAspやGluに関しては、分離係数がAspとGlu共に、1.10から1.08に減少した。従ってCSP 4は、NBD-アミノ酸に対してCSP 1とほぼ同様な光学分割能を示すものの、一部のNBD-アミノ酸に対しては分離係数が変化していた。

次にCSP 4とCSP 1による、NBD-アミノ酸の相互分離を比較した。Fig. 4-2に示したクロマトグラムにおいてCSP 1では19個のピークトップが検出されたのに対して、CSP 4では22個のピークトップが検出された。またFig. 4-3に示した、NBD-アミノ酸の保持係数の差もCSP 4の方が大きく、さらに各ピークの理論段数には大きな差異が見られなかった (Table 4-2)。以上の結果より、CSP 4はCSP 1と比較して、NBD-アミノ酸の相互分離に適したキラル固定相であり、導入したアルキル直鎖によるNBD-アミノ酸の相互分離の改善が認められた。

Table 4-2 Theoretical plate number for NBD-amino acids

Amino acid	CSP 1		CSP 4	
	N for D Form	N for L Form	N for D Form	N for L Form
Ala	10000	11000	9000	9500
Asn	6100	6200	7400	7200
Glu	2900	5500	4900	5100
Gly	5600		6500	
Met	11000	7700	10000	10000
Phe	12000	7900	10000	11000
Pro	6400	12000	8200	8000
Ser	8900	6800	7100	7400
Thr	9400	9500	8400	8200

Mobile phase: 5mM citric acid in MeOH

1: D-Leu, 2: L-Leu, 3: D-Ile, 4: L-Ile,
 5: D-Val, 6: L-Val, 7: D-Ala, 8: L-Ala,
 9: D-Thr, 10: L-Thr, 11: D-Met, 12: L-Met, 13: D-Phe,
 14: L-Phe, 15: Gly, 16: D-Ser,
 17: L-Ser, 18: D-Gln, 19: L-Gln, 20: D-Asn,
 21: L-Asn, 22: D-Pro, 23: L-Pro, 24: D-Glu, 25: L-Glu,
 26: D-Asp, 27: L-Asp

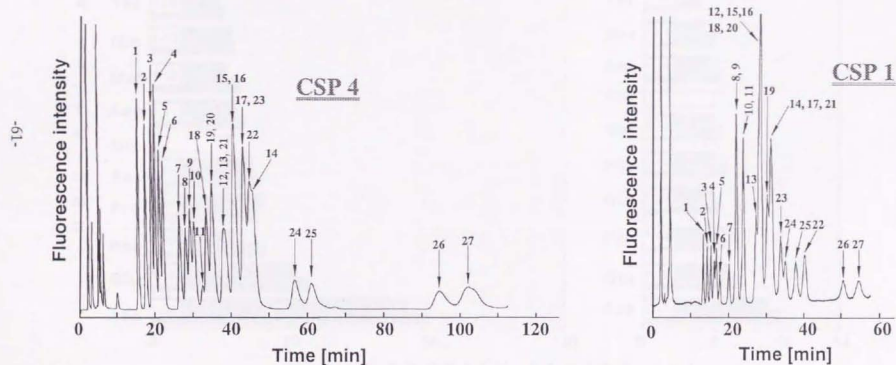


Fig. 4-2 Chromatograms for 13 NBD-DL-amino acids and NBD-Gly

Mobile phase, 5.0 mM citric acid in methanol; temperature, ambient; flow rate, 1.0 ml min⁻¹; detection, λ_{ex} 470 nm, λ_{em} 530 nm.

Mobile phase: 5 mM citric acid in MeOH

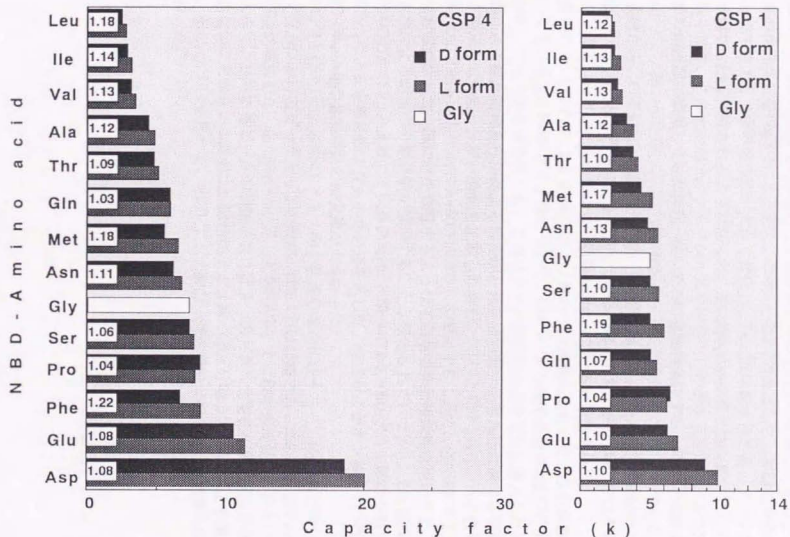


Fig. 4-3 Capacity and separation factors for NBD-amino acids obtained on CSP 1 and CSP 4

水を含有した移動相条件での比較

アルキル直鎖によるNBD-アミノ酸の相互分離は、CSP 1のアルキル直鎖とNBD-アミノ酸のアルキル側鎖との間に形成される疎水的相互作用に起因している（逆相分配モード）。そこで逆相分配モードによる分離の影響が大きくなる、水を含有した移動相条件での各NBD-アミノ酸の相互分離を比較することにした。

移動相に水/アセトニトリル/TFA=60/40/0.025を用いたときの、NBD-DL-アミノ酸とNBD-GlyをCSP 4とCSP 1で分離したクロマトグラムをFig. 4-4に示し、そのときの分離係数や保持係数をFig. 4-5にまとめた。CSP 4とCSP 1で共通して、移動相条件の変化によって中性アミノ酸の溶出順が大きく変化し、Leu, Ile等疎水性の高いアミノ酸のNBD誘導体が、強く保持されるようになった。逆にGln, Asn等親水性の高いアミノ酸の保持は弱くなり、この溶出順はオクタデシル基を固定化した逆相用固定相によるNBD-アミノ酸の溶出順に類似していた[63]。従ってこの移動相条件での、CSP 4とCSP 1によるNBD-アミノ酸の溶出順は、主に逆相分配モードによる分離で決定されていた。第3章の検討から、CSP 1による逆相分配モードの分離は、主に(S)-N-3,5-dinitrobenzoyl-1-Naglyとの疎水的相互作用によって生じていると考えられたが、CSP 4ではその構造に加えて導入したアルキル直鎖による効果も加わっていると予想された。

次にCSP 1とCSP 4による各NBD-アミノ酸の保持係数を比較した。この移動相条件においても、全てのNBD-アミノ酸について、CSP 4による保持係数の方がCSP 1による保持係数よりも大きな値を示した。これはキラル固定相の基材部位に導入したアルキル直鎖による疎水的相互作用による保持が、光学活性部位を導入した後でも有効であることを示している。光学分割能を比較した場合、CSP 4とCSP 1共に、水を含有した移動相（水/アセトニトリル/TFA=60/40/0.025）を使用することで、各NBD-アミノ酸の分離係数は減少した。既に水を含有するような逆相系の移動相条件を用いると、キラル固定相による溶質の分離係数が減少することは報告されていた[64]。その減少量が、CSP 4の方がCSP 1と比較して大きいと、CSP 4によるNBD-アミノ酸の分離係数の方がCSP 1による分離係数よりも小さい値を示した。特にカルボキシ基を2つ有するNBD-Glu, -Aspの分離係数の減少量が大きかった。

CSP 4とCSP 1によるNBD-アミノ酸の相互分離を比較すると、Fig. 4-4に示したクロマトグラムにおいてピークトップの数が、CSP 1では15個であったのに対して、CSP 4では18個に増加した。またFig. 4-5に示した各NBD-アミノ酸の保持係数の差もCSP 4の方が大きく、さらに各ピークの理論段数には2つのキラル固定相の間で大きな差異が見られないことから、CSP 4によるNBD-アミノ酸の相互分離の方がCSP 1より優れていた。そこでCSP 4を用いて、NBD-アミノ酸の一斉分析を目指して、分離条件の最適化を行った。

1: D-Gln, 2: L-Gln, 3: D-Asn, 4: L-Asn,
 5: D-Thr, 6: L-Thr, 7: D-Ser, 8: L-Ser,
 9: D-Ala, 10: L-Ala, 11: Gly, 12: D-Pro, 13: L-Pro,
 14: D-Val, 15: L-Val, 16: D-Leu,
 17: L-Leu, 18: D-Ile, 19: L-Ile, 20: D-Met,
 21: L-Met, 22: D-Glu, 23: L-Glu

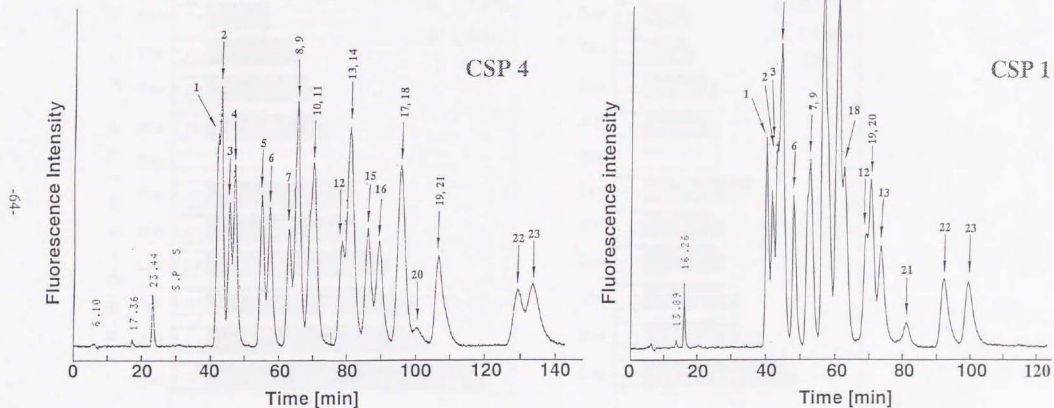


Fig. 4-4 Chromatograms for 11 NBD-DL-amino acids and NBD-Gly

Mobile phase, Mixture of water, acetonitrile and TFA (60/40/0.025); temperature, ambient; flow rate, 0.5 ml/min⁻¹; detection, λ_{ex} 470 nm, λ_{em} 530 nm.

Mobile phase: water/MeCN/TFA=60/40/0.025

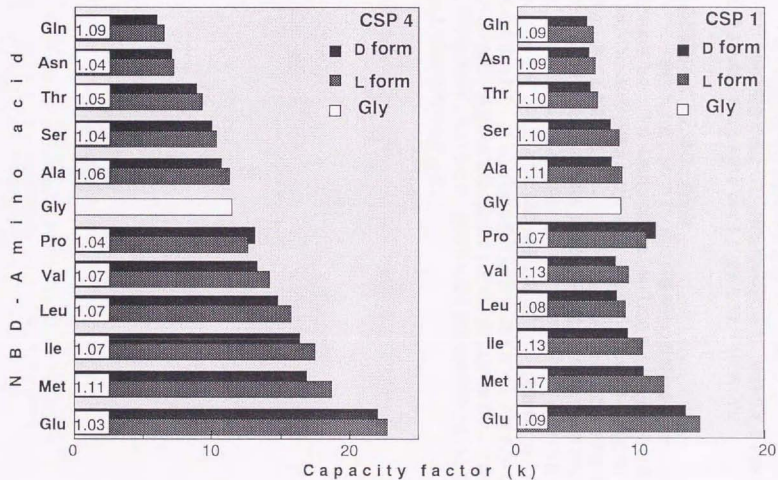


Fig. 4-5 Capacity and separation factors for NBD-amino acids obtained on CSP 1 and CSP 4

CSP 4によるNBD-L-アミノ酸の相互分離

始めにCSP 4を用いて、アミノ酸の中で分離が困難であった、中性アミノ酸の相互分離を移動相組成を変化させることで最適化した。移動相中の水およびTFAの濃度が増加するほど各NBD-アミノ酸の保持時間は延長し、NBD-Gln、-Asnを除く、NBD-アミノ酸は良好に相互分離された。そこでNBD-GlnとNBD-Asnが分離される条件で、その他のNBD-アミノ酸も相互分離される移動相組成を検討した結果、水：アセトニトリル：TFAを70：30：0.04の割合で混合した溶液を用いることで、中性のアミノ酸のNBD誘導体は相互分離された。そのときのクロマトグラムをFig. 4-6に示した。

CSP 4によるNBD-DL-アミノ酸の一斉分離

つぎにD-アミノ酸を加えた、DL-アミノ酸の分離条件の最適化を行った。DL-Gln、-Asnは、移動相中のアセトニトリル濃度が高いほど良好に分離されたが、その条件ではGlyおよびDL-Ser、-Thr、-Alaが分離されなかった。そこでグラジエント溶離を用いて、最初にDL-Gln等が分離する移動相を用い、途中からDL-Ser等が分離する移動相組成に変化させることで、DL-アミノ酸の一斉分離を試みた。その結果、Glyと11種類のDL-アミノ酸を分析したときに、L-Leu、D-Ile、D-Metを除くアミノ酸のピークトップが分離する条件を見つけた（Fig. 4-6）。このようにCSP 4を用いることで、分離困難であった中性アミノ酸の多くが分離された。さらに詳細な検討を行い、塩基性アミノ酸やTyrなどを含めた全てのアミノ酸の一斉分析法の確立が望まれたが、既に12種類のアミノ酸の分析に100分近くの時間がかかっているため、開発される分析法は実用的でないと考えたので、これ以上の検討は行わなかった。

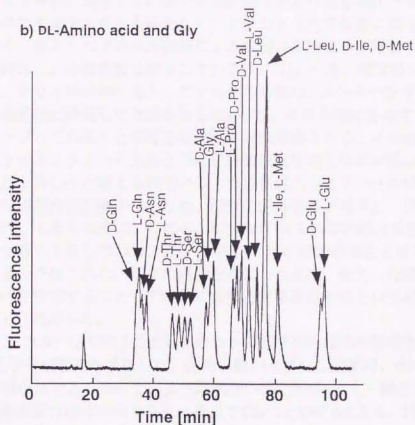
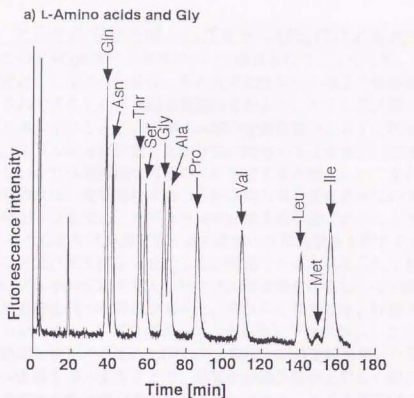


Fig. 4-6 Chromatograms for NBD-amino acids on CSP 4

Mobile phase, a) Mixture of water, acetonitrile and TFA (70/30/0.04), b) mixture of water, acetonitrile and TFA, Eluent A 67.5/32.5/0.025, B 50/50/0.0125, C 50/50/0.025, Gradient, isocratic elution until 45 min (B 0 %, C 0 %), linear gradient elution from 45 to 60 min (B 0-70 %, C 0 %), linear gradient elution from 60 to 90 min (B 70-0 %, C 0-100 %), isocratic elution from 90 to 120 min (B 0 %, C 100 %)

4-3 アルキル直鎖を導入したキラル固定相による光学分割

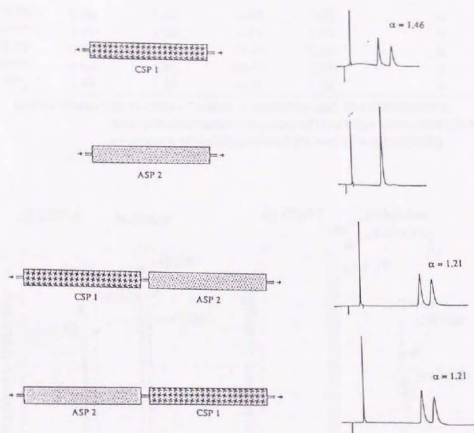
次にCSP 4の光学分割機構について検討を行うことにした。従来の報告では、キラル固定相による光学分割能は、その光学活性部位の構造や修飾量によって決定されると考えられてきたため、今回の実験結果のようにキラル固定相に光学不活性なアルキル直鎖を導入することで、NBD-Leu等の分離係数が上昇する現象は興味深く思われた。本来、キラル固定相には、光学分割に関与する立体選択的な相互作用と光学分割に関与しない非立体選択的な相互作用が存在すると考えられてきた。そして非立体選択的な相互作用は、光学異性体間の保持係数の差を変化させないまま、両異性体の保持係数を増加させるため、光学異性体の分離係数を減少させるとされてきた (Fig. 4-7) [65]。そのためキラル固定相による溶質の分離係数を上昇させるには、余分な非立体選択的な相互作用を減少させることが重要であると考えられてきた[11, 66-68]。

既にアルキル直鎖を導入したキラル固定相を作製し、その鎖長の差異が光学分割に与える影響を調べた報告があった。それらの報告では、移動相に*n*-ヘキサンと極性溶媒 (クロロホルム、2-ブタノール、テトラヒドロフラン) との混合溶液、つまり順相系の移動相が使用されていた[58, 69]。順相系の移動相を用いた場合、キラル固定相にアルキル直鎖を導入することで、溶質の分離係数が上昇した報告と減少した報告があった。溶質の分離係数が減少した報告によると、キラル固定相に導入したアルキル直鎖は、光学分割に関与しない非立体選択的な相互作用を増加させるため、光学異性体の分離係数を減少させると報告している。つまり光学分割に関与する相互作用には変化がなく、導入したアルキル直鎖による溶質の保持のみが増加するため、溶質の保持係数が増加し、分離係数は減少している[70, 71]。一方、溶質の分離係数が増加した報告では、キラル固定相に導入したアルキル直鎖は、*n*-ヘキサンを含有する移動相を用いると、直線状に伸張した構造をとるため[72]、その内部に存在する構造 (シラノール基、アミノプロピル基) と溶質との相互作用は阻害される。その結果、溶質の分離係数を減少させるシラノール基等との非立体選択的な相互作用が減少するため、溶質の分離係数が上昇したと考えられている。つまり導入したアルキル直鎖によって、非立体選択的な相互作用が減少したため、溶質の保持係数が減少し、分離係数が上昇している[40, 65]。しかしながら、CSP 4によるNBD-DL-Leu等の溶出挙動は、分離係数と共に、保持係数も上昇している。従ってCSP 4では、従来の報告とは異なった分離機構が生じていると予想された。従来の報告と異なった点は、使用した移動相条件であり、移動相条件が変化することでアルキル直鎖と光学活性部位とが形成する高次構造が変化していると推測した。

そこでCSP 4とCSP 1による、幾つかの光学異性体の分離係数を比較することで、CSP 4の光学分割機構を予想した。分離係数が上昇した溶質は、疎水性の高いアミノ酸のNBD誘導体であったので、より疎水性の高いNBD-アミノ酸のアミドおよびエステル体の分離挙動に興味を持たれた。そこでCSP 1とCSP 4による、NBD-AlaとPheのアミドおよびエステル体の分離挙動を調べ、Table 4-3にまとめた。またNBD-Pheのアミドとメチルエステルを分離したときのクロマトグラムをFig. 4-8に示した。2つのクロマトグラムでは、溶質の溶出時間が同一になるように、移動相条件を調整した。

CSP 4によるアミド体やエステル体の分離係数は、共通してCSP 1による分離係数よりも大きな値を示した。またCSP 4によるこれらアミド体やエステル体の溶出順は、全てD, Lの順であり、CSP 1による溶出順と同一であった。また2つのキラル固定相で共

通して、Phe誘導体の分離係数の方が、Ala誘導体の分離係数より大きく、アミド体の分離係数の方がエステル体の分離係数より大きな値を示した。さらにCSP 4においても、メチル、エチル、ペンチル、オクチル、*tert*-ブチルエステルの分離係数がほぼ同一の値であったことから、エステル体のアルキル鎖の構造は分離係数に影響を与えないと考えた。以上の結果から、これら2つのキラル固定相において、キラル固定相の光学活性部位とアミド体やエステル体との間で形成される複合体は、共通の基本構造を持っていると予想した。



From W.H. Pirkle and C.J. Welch, *J. Chromatogr.*, 589 (1992) 45

Fig. 4-7 Tandem column experiment illustrating decrease in enantioselectivity due to achiral retention

CSP 1 : Resin (*R*)-DNB-phenylglycine; APS 2 : DNB-aminobutyl;
mobile phase : 2-propanol-hexane (5+95); flow rate : 2.00 ml/min;
void volume indicator : tri-*tert*-butylbenzene

Table 4-3 Chromatographic results for NBD-amino acid esters and amides

Solute	CSP 1		CSP 4		Mobile Phase*
	k for D Form	Separation Factor (α)	k for D Form	Separation Factor (α)	
Ala-OMe	1.22	1.01	1.98	1.04	a
Ala-OEt	1.47	1.01	2.49	1.05	a
Ala-OPe	2.51	1.02	4.98	1.06	a
Ala-OOC	4.01	1.01	9.49	1.06	a
Ala-OBu	2.01	1.02	3.60	1.07	a
Ala-NH ₂	2.45	1.10	5.18	1.15	b
Ala-N(CH ₃) ₂	3.89	1.19	8.43	1.35	b
Phe-OMe	2.66	1.03	4.98	1.09	a
Phe-OEt	3.11	1.03	6.12	1.10	a
Phe-OPe	5.13	1.03	11.56	1.10	a
Phe-OOC	7.90	1.03	21.47	1.11	a
Phe-NH ₂	1.44	1.10	4.07	1.18	c

Mobile phase*: a: mixture of water, acetonitrile and TFA (50/50/0.015),
 b: 5 mM citric acid in mixture of methanol and water (50/50),
 c: mixture of water, acetonitrile and TFA (50/50/0.05)

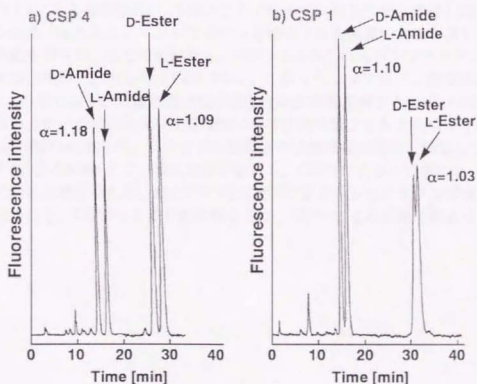


Fig. 4-8 Chromatograms for methylester or amide of NBD-DL-Phe

Column: a) CSP 4, b) CSP 1; ambient; mobile phase: H₂O/MeCN/TFA a)50/50/0.05, b)60/40/0.05;

flow rate: 1.0 ml min⁻¹; detection, λ_{ex} 470 nm, λ_{em} 530 nm.

アミノ基（アミノプロトン）の影響

次にCSP 4による光学分割に、NBD-アミノ酸のアミノプロトンが関与しているかどうかを調べるために、NBD-イミノ酸の分離挙動を調べた。またその結果を、CSP 1による分離係数および溶出順と比較した（Table 4-4）。CSP 1とCSP 4との間で、環状イミノ酸（Pro, pipecolic acid）のNBD誘導体の分離挙動は類似していたが、NBD-N-メチル-アミノ酸の分離挙動は異なった。CSP 1によるNBD-N-メチル-アミノ酸の溶出順は、L, Dの順であったのに対して、CSP 4ではNBD-N-メチル-Alaや-Aspは光学分割されず、光学分割されたNBD-N-メチル-Pheの溶出順はD, Lの順であった。CSP 4によるNBD-アミノ酸の溶出順（D, L）とNBD-イミノ酸の溶出順（D, L, L, Dもしくは分離しない）が異なることから、CSP 4においてもNBD-イミノ酸の光学分割機構とNBD-アミノ酸の光学分割機構とは異なっていると考えられた。またNBD-アミノ酸のアミノプロトンをメチル基に置換することで、光学分割機構が変化したことから、CSP 4によるNBD-アミノ酸の光学分割にも、NBD-アミノ酸のアミノプロトンによる水素結合が関与していた。CSP 4による環状イミノ酸とN-メチル-アミノ酸のNBD誘導体で、その溶出挙動が異なったことから、CSP 4によるNBD-イミノ酸の光学分割機構には興味を持たれたが、その詳細は不明である。またCSP 4による、今回検討した全てのNBD-イミノ酸の分離係数の方が、CSP 1による分離係数よりも小さな値を示したことから、これらNBD-イミノ酸の光学分割には、CSP 1の方がCSP 4よりも適していた。

ベンゾフラザン骨格の影響

次にCSP 4による光学分割に、NBD-アミノ酸のベンゾフラザン骨格が関与しているかどうかを調べるために、ベンゾフラザン骨格の7位置換基の構造が異なるAla誘導体の溶出挙動を調べた。またその結果を、CSP 1によるこれらベンゾフラザン誘導体の分離係数や溶出順等と比較した（Table 4-5）。これらベンゾフラザン誘導体の溶出順は共通してD, Lの順であり、分離係数は電子求引性の置換基を有するNBD, ABD, DBD-Alaの分離係数の方が、水素のみを有するHBD-Alaの分離係数よりも大きな値を示した。この結果は、CSP 1によるベンゾフラザン誘導体の分離係数の関係と類似していたことから、CSP 4によるNBD-アミノ酸の光学分割にも、CSP 1のときと同様に π - π 相互作用が関与していると考えられる。またCSP 4とCSP 1によるベンゾフラザン誘導体の分離係数を比較すると、CSP 4による分離係数の方が、CSP 1による分離係数より小さい値であった。

Table 4-4 Chromatographic results for NBD-imino acids

Solute	CSP 1				CSP 4			
	$k^{\#}$	α	Elution order	Mobile phase*	$k^{\#}$	α	Elution order	Mobile phase*
(N-Methyl-amino acid)								
<i>N</i> -Methyl-Ala	3.08	1.07	L, D	a	2.89	1.00	-	b
<i>N</i> -Methyl-Phe	4.20	1.02	L, D	a	4.17	1.01	D, L	b
<i>N</i> -Methyl-Asp	10.39	1.04	L, D	b	10.84	1.11	-	b
(Cyclic compound)								
Pro	6.10	1.04	L, D	a	7.82	1.04	L, D	a
Pipecolic acid	9.00	1.19	L, D	a	2.75	1.09	L, D	b

$k^{\#}$: Capacity factor for first eluted enantiomer

Mobile phase*: a: 5 mM citric acid in methanol, b: 10 mM citric acid in methanol

Table 4-5 Chromatographic results for benzofurazan derivatives of Ala

Solute		CSP 1			CSP 4			Mobile phase*
		k for First eluted enantiomer	α	Elution order	k for First eluted enantiomer	α	Elution order	
NBD-Ala	NO ₂	3.29	1.12	D, L	3.03	1.11	D, L	a
DBD-Ala	SO ₂ NMe ₂	3.53	1.17	D, L	3.72	1.11	D, L	b
ABD-Ala	SO ₂ NH ₂	2.93	1.16	D, L	3.03	1.10	D, L	b
HBD-Ala	H	2.81	1.06	D, L	3.10	1.03	D, L	c

Mobile phase*: a: 5 mM citric acid in methanol, b: 2 mM citric acid in methanol, c: 1 mM citric acid in methanol

その他の光学異性体の分離の比較

その他の溶質として、prilocaine, Leu-Gly, 2-amino-1-butanol, β -aminobutyric acidのNBD誘導体の分離挙動を、CSP 1とCSP 4との間で比較した (Table 4-6)。NBD-prolocaïne, -Leu-Glyの分離係数はCSP 4の方が大きく、NBD-2-amino-1-butanolの分離係数はCSP 1とCSP 4との間で差がなく、NBD- β -aminobutyric acidの分離係数はCSP 1の方が大きな値を示した。また住化分析センターの西岡らによると、NSAID類の光学分割にはCSP 1の方が優れているが、1, 1'-bi-2-naphtholの光学分割にはCSP 4の方が優れていた[73]。以上、CSP 4とCSP 1の光学分割能の比較から、CSP 4はカルボキシ基を持たず、疎水性の高い溶質の光学分割に適していた。

このようにCSP 1のアミノプロピルシリカゲルと光学活性部位との間にアルキル直鎖を導入したキラル固定相 (CSP 4) は、CSP 1と比較してNBD-アミノ酸の相互分離や疎水性の高い溶質の光学分割を改善した。この分離の改善は、同一の光学活性体をAPS-11-AmUAに修飾し、その修飾量の異なったCSP 7でも見られたことから、アルキル直鎖を導入した後、光学活性な3,5-dinitrobenzoyl-1-Naglyを修飾したキラル固定相の共通した特徴と考えられる。CSP 4とCSP 7による溶質の分離係数を比較した場合、光学活性体の修飾量が多い、CSP 4の方が僅かに光学分割能が優れていた。各溶質に対する保持係数を比較すると、移動相に5 mM クエン酸メタノールを使用した場合、CSP 7の方が大きな値を示したが、水を含有する移動相を用いた場合は、CSP 4の方が大きな値を示した。CSP 7では、多量のアルキル直鎖が導入されているため、水を含有した移動相を用いたときにはアルキル直鎖が凝集し、導入したアルキル直鎖が溶質の保持に有効に働いていないと考えられる。

次にAPS-11-AmUAの末端に異なった光学活性部位を修飾したキラル固定相においても、相互および光学分割の改善が起こるかを調べた。

Table 4-6 Chromatographic results for NBD-amines

Solute	CSP 1		CSP 4		CSP 1, CSP 4	
	k for First eluted enantiomer	Separation factor (α)	k for First eluted enantiomer	Separation factor (α)	Elution order	Mobile phase*
Prilocaine	7.76	1.05	18.56	1.09	N. I.	a
Leu-Gly	0.98	1.09	0.97	1.18	D, L	b
2-Amino-1-butanol	13.36	1.05	14.63	1.05	R, S	c
β -Aminobutyric acid	0.75	1.21	3.75	1.06	N. I.	d

N. I.: Not identified

Mobile phase*: a: 5 mM citric acid in mixture of methanol and water (60/40),

b: 5 mM citric acid in methanol,

c: 5 mM citric acid in mixture of methanol and water (20/80),

d: 2 mM citric acid in methanol

4-4 光学活性部位の構造が異なったアルキル直鎖を導入したキラル固定相による分離特性

APS-11-AmUAの末端に光学活性部位として、CSP 2の光学活性部位である(S)-N-3,5-dinitrophenylaminocarbonyl-Valを修飾したCSP 5と、CSP 3の光学活性部位であるN-[(R)-1-(α -naphthyl)ethylaminocarbonyl]-(S)-tert-Leuを修飾したCSP 6を調製した。CSP 5については、充填剤が均一に充填されなかったため、ピークの形状がCSP 4やCSP 6と比較して劣っていた。最初にこれらのキラル固定相による、NBD-アミノ酸の相互分離について調べた。

CSP 2とCSP 5によるNBD-アミノ酸の相互分離の比較

CSP 2とCSP 5を用いて、NBD-アミノ酸を分離したときの保持係数と分離係数をまとめたグラフをFig. 4-9に示した。各NBD-アミノ酸の保持係数を比較すると、CSP 5による保持係数の方が、CSP 2による保持係数よりも全てのNBD-アミノ酸において大きな値を示した。NBD-アミノ酸の光学分割について比較すると、全てのNBD-アミノ酸の溶出順は共通してD, Lの順であり、CSP 2による分離係数の方が、CSP 5による分離係数よりも大きな値を示した。

NBD-アミノ酸の相互分離については、Fig. 4-9が示すように各NBD-アミノ酸の保持係数の差がCSP 5の方がCSP 2と比較して大きく、さらに各ピークの理論段数に差異が見られないことから、CSP 5の方がNBD-アミノ酸の相互分離に適していると考えた。従って、CSP 5においても導入したアルキル直鎖によるNBD-アミノ酸の相互分離の改善が認められた。しかしながらCSP 5は、各NBD-アミノ酸の保持が弱いため、CSP 4と比較してNBD-アミノ酸の相互分離に適していなかった。

CSP 3とCSP 6によるNBD-アミノ酸の相互分離の比較

同様な検討をCSP 6についても行った。NBD-アミノ酸を分離したときの保持係数と分離係数をまとめたグラフをFig. 4-10に示した。各NBD-アミノ酸の保持係数を比較すると、CSP 6による保持係数の方が、CSP 3による保持係数より全てのNBD-アミノ酸において大きな値を示した。NBD-アミノ酸の光学分割について比較すると、全てのNBD-アミノ酸の溶出順は共通しD, Lの順であった。分離係数を比較すると殆どのNBD-アミノ酸において、CSP 6の方がCSP 3よりも大きな値を示した。分離係数が減少したのは、NBD-Pro, -Ser, -Aspの3種類のNBD-アミノ酸であった。

NBD-アミノ酸の相互分離については、Fig. 4-10が示すように各NBD-アミノ酸の保持係数の差が、CSP 6の方がCSP 3と比較して大きく、さらにCSP 4のときと同様に、各ピークの理論段数に差異が見られないことから、CSP 6の方がNBD-アミノ酸の相互分離に適していると考えた。従って、CSP 6においても導入したアルキル直鎖によるNBD-アミノ酸の相互分離の改善が認められた。以上の検討より、キラル固定相に導入したアルキル直鎖は、その光学活性部位の構造に依らず、キラル固定相によるNBD-アミノ酸の相互分離を改善することが明らかとなった。水を含有した移動相を用いることで、導入したアルキル直鎖による疎水的相互作用の影響が強くなり、NBD-アミノ酸の相互分離がより一層改善されると予想されたが、今回は、時間の関係で検討を行わなかった。

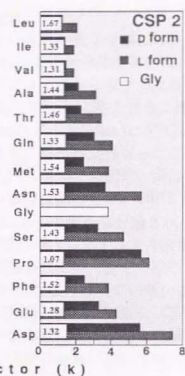
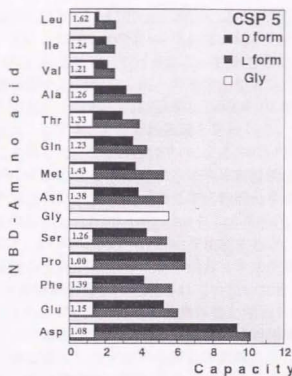


Fig. 4-9 Capacity and separation factors for NBD-amino acids obtained on CSP 2 and CSP 5

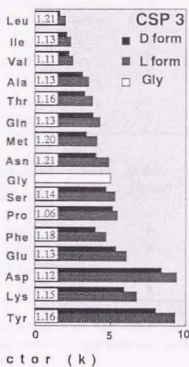
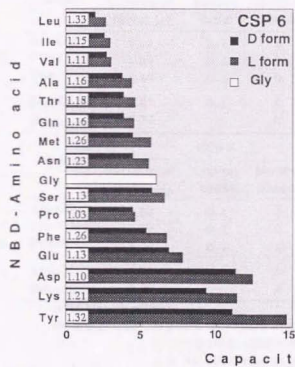


Fig. 4-10 Capacity and separation factors for NBD-amino acids obtained on CSP 3 and CSP 6

CSP 2、CSP 3とCSP 5、CSP 6による光学分割の比較

次に、CSP 5とCSP 6を用いて、導入したアルキル直鎖が光学分割に与える影響を調べた。溶質には、CSP 4によって分離係数が上昇した光学異性体を用いた。各溶質の分離係数や溶出順を、同一の光学活性部位をアミノプロピルシリカゲルに修飾したキラル固定相と比較した結果を、Table 4-7にまとめた。CSP 6によるこれらの溶質の分離係数は、CSP 3による分離係数と比較して、NBD-Pheのアミドを除いた全ての溶質において上昇した。CSP 3とCSP 6によるNBD-Pheのアミドの溶出順が異なったことから、NBD-Pheのアミドに対する光学分割機構は、CSP 3とCSP 6との間で、異なっていると予想された。また同一の光学活性部位を有しているのに関わらず、CSP 3では光学分割されなかったNBD-prilocaineや-Leu-Glyが、CSP 6によって僅かに分離された。ところがCSP 5とCSP 2の光学分割能を比較すると、CSP 5では導入したアルキル直鎖による分離係数の上昇が、いくつかの溶質（エステル体）に限られていた。その原因として、CSP 5は充填剤が均一に充填されていないため、分離が良好な行われていないと考えた。以上より、CSP 4によって分離係数が増加した多くの溶質の分離係数が、CSP 5やCSP 6によっても増加した。従って溶質の分離係数は、キラル固定相の基材と光学活性部位との間に導入したアルキル直鎖の影響を受け、いくつかの溶質については、その影響によって分離係数が増加することが明らかになった。

Table 4-7 Chromatographic results for NBD-derivatives

Solute	CSP 2			CSP 5		
	Separation factor (α)	Elution order	Mobile phase*	Separation factor (α)	Elution order	Mobile phase*
Ala-OMe	1.02	D, L	a	1.03	D, L	b
Phe-OMe	1.02	D, L	b	1.04	D, L	b
Phe-NH ₂	1.16	D, L	b	1.14	D, L	b
Leu-Gly	1.61	D, L	c	1.45	D, L	c
Prilocaine	1.00	-	b	1.00	-	b

Solute	CSP 3			CSP 6		
	Separation factor (α)	Elution order	Mobile phase*	Separation factor (α)	Elution order	Mobile phase*
Ala-OMe	1.02	D, L	d	1.07	D, L	b
Phe-OMe	1.02	D, L	d	1.09	D, L	b
Phe-NH ₂	1.04	D, L	a	1.04	L, D	e
Leu-Gly	1.00	-	c	1.18	D, L	c
Prilocaine	1.00	-	d	1.03	N. I.	e

N. I.: Not identified,

- Mobile phase*: a: 2 mM citric acid in mixture of acetonitrile and water (50:50),
 b: 5 mM citric acid in mixture of acetonitrile and water (60:40),
 c: 5 mM citric acid in methanol,
 d: 5 mM citric acid in mixture of methanol and water (60:40),
 e: 5 mM citric acid in mixture of acetonitrile and water (50:50)

4-5 アルキル直鎖を導入したキラル固定相の光学分割機構

についての考察

アルキル直鎖を導入したキラル固定相によって、幾つかの溶質の分離係数が増加した機構に興味がかかれた。既に、アルキル直鎖を導入したキラル固定相によって、溶質の分離係数が上昇した報告はあったが、その報告の全てにおいて溶質の保持係数が減少していた[40, 65]。しかしながら今回作製したキラル固定相では、溶質の分離係数の増加と共に、保持係数も増加していた。これら分離係数が上昇した溶質の構造的な特徴として、以下の3点が挙げられる。

- 1 疎水性が高い
- 2 アミノプロトンを持つ
- 3 カルボキシ基を持たない

逆にアルキル直鎖を導入したキラル固定相によって、分離係数が減少した溶質は、一般のアミノ酸より親水性である酸性アミノ酸やイミノ酸のNBD誘導体であった。また光学分割の改善した溶質では、光学異性体の溶出順に変化が見られなかったことから、アルキル直鎖の導入によって、光学分割に関する複合体の基本構造が変化したとは考えづらい。そこで複合体構造が変化していないのに関わらず、幾つかの溶質の光学分割が改善した理由を推測した。

まずアルキル直鎖を導入したキラル固定相には、アルキル直鎖と光学活性部位とが形成する疎水空間とアミノプロピル基が形成する親水空間が存在すると考えた (Fig. 4-11)。この疎水空間と親水空間の存在は、逆相用固定相においてその存在が確認されている[74]。アルキル直鎖を導入したキラル固定相において、分離係数が増加した溶質は疎水性の高い溶質であるため、その疎水空間に取り込まれやすい。そしてその空間に存在するキラル固定相の光学活性部位との間に複合体を形成しやすく、光学分割されやすいと考えられる。また疎水空間に光学活性部位が存在するため、複合体形成に関与する水素結合の強度が、親水空間に存在するときと比較して増加するため、複合体構造は安定であると考えられる。次に、アルキル直鎖を導入したキラル固定相において、分離係数が減少した溶質について考察した。これらの分離係数の減少した溶質も、その保持係数は増加していることから、固定相との相互作用は増加していると考えられる。それにも関わらず分離係数が減少した理由は、その保持の増加にアミノプロピル基が形成する親水空間が関与しており、光学活性部位とアルキル直鎖が形成する疎水空間は、あまり関与していないと考えた。その結果、固定相との相互作用が増加しても、光学活性部位との相互作用が増加しないため、分離係数は上昇しなかったと考えられる。それに対して従来のアミノプロピルシリカゲルに光学活性部位を修飾したキラル固定相では、光学活性部位は均等に散らばっており、そのような疎水空間は存在しないと考えられる (Fig. 4-11)。

またイオンクロマトグラフィーの分野に於いて、アルキル直鎖を導入した固定相について、最近興味深い報告がなされた[75]。金属を認識する部位として、iminodiacetic acidを用い、その認識部位を固定化するアルキル鎖長 (0, 3, 8) が異なった3種類の固定相を作製し、希土類の金属 (Ce, Sm, Gd, Ho, Lu) に対する認識能の違いを比較した。その結果、アルキル鎖が8である最長の固定相が、上記の金属類の分離に適しており、(固定化していない) iminodiacetic acid自身の各金属との会合定数に近い、保持強度を示していた。その結果について筆者らは、認識部位のflexibility (自由度)



Chiral moiety



(+)-Solute



(-)-Solute

-78-

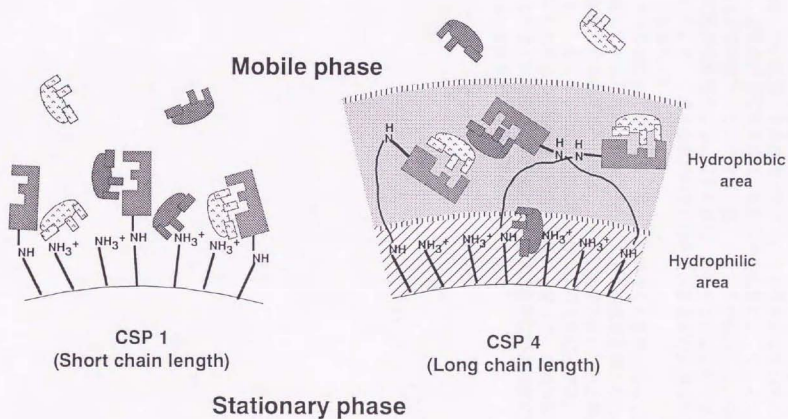


Fig. 4-11 Proposed chiral recognition models on CSP 1 and CSP 4

が、認識能に影響を与えていると論じている。そして認識部位を固定化するアルキル鎖長が短い固定相では、認識部位の自由度が低いため、金属との複合体形成が困難となり認識能が低い、逆に固定化するアルキル鎖長が十分長いと認識部位の自由度が高いため、金属との複合体形成が容易になり認識能が高いと考えている。また認識部位の自由度の重要性については、キラル固定相についても研究がなされていた[76]。その研究では、キラル固定相の光学活性部位の修飾法や修飾量によって、キラル固定相の不斉認識能が変化する理由として、光学活性部位の自由度が関与していると推測し、計算化学を用いて光学活性部位の自由度を計算し、そのキラル固定相の光学分割能との関係を調べていた。そして光学分割能の優れたキラル固定相の光学活性部位の自由度が、大きいことを示していた。

今回作製したキラル固定相においても、導入したアルキル直鎖によって光学活性部位の自由度が上昇していると考えられる。そしてアルキル直鎖を導入したキラル固定相による光学分割能の向上の原因の一部は、光学活性部位の自由度の上昇が関与していると考えられる。しかしながら光学活性部位の自由度の上昇だけでは、一部の溶質の分離係数が減少した今回の実験結果を説明できない。従って、今回作製したアルキル直鎖を導入したキラル固定相の光学分割には、光学活性部位の自由度に加えて、アルキル直鎖が形成する疎水空間が重要であると考えた。

第5章 総括

第2章では、市販のHPLC用低分子型キラル固定相の中で、NBD-アミノ酸に対して優れた光学分割能を示す3種類のキラル固定相について、その光学分割機構を検討した。その結果、光学分割に関与するCSP 1やCSP 2の光学活性部位とNBD-アミノ酸との複合体は、Fig. 2-11, -12に示す構造であった。Fig. 2-11に示された複合体構造から、CSP 1によるNBD-アミノ酸の光学分割を改善するには、CSP 1のナフタレン環による π - π 相互作用をより強固にする必要があると予想した。しかしながら第2章で論じたように π - π 相互作用の強さは、芳香環の π -電子のみではなく、構造的な要因によっても左右されるため、最適構造の決定には更なる検討が必要である。またこれらのキラル固定相は、カルボキシ基誘導体の光学分割にも有効であることを示した。さらにCSP 1は、カルボニル酸素を有さない溶質の光学分割にも有効であった。

第3章では、アミノプロピルシリカゲルに光学活性部位を固定化したキラル固定相では、その溶質同士の相互分離に、基材部分のアミノプロピル基が関与していることを明らかにした。また移動相に有機溶媒100% (5 mMクエン酸メタノール) の溶液を用いても、アルキル直鎖による疎水的相互作用が溶質の分離に有効であり、アルキル鎖長を延長することでNBD-アミノ酸の相互分離が改善した。

第4章では、アルキル直鎖を導入したキラル固定相を作製し、市販のキラル固定相とその分離特性を比較した。その結果、作製したキラル固定相は、疎水的相互作用によってNBD-アミノ酸の相互分離を改善した。また導入したアルキル直鎖が形成する疎水空間は、疎水性の高い溶質の光学分割を向上した。さらに固定化するキラル固定相の構造や修飾量に関わらず、アルキル直鎖を導入したキラル固定相では、相互分離や光学分割能の改善が見られた。

本研究によって、キラル固定相の光学分割能は、その認識部位が存在する環境によって変化することが示唆された。本研究で得られた知見は、同一の光学活性部位を用いたキラル固定相であっても、その光学活性部位が存在する環境を変化させることで、光学分割能が向上することを提示している。今後は、キラル固定相に溶質の構造をより特異的に認識する構造を持たせることで、目的物質の光学分割に適したキラル固定相の設計を行いたいと考えている。またこの知見は、キラル固定相の設計のみならず、多くの分子認識に基づいた、分離手段の分離の改善や、検出手段の感度の向上に应用できると推測されるので、さらなる展開を期待したい。

実験の部

【試薬・装置】

本研究では、以下に示した試薬を使用した。

試薬名	製造会社	Lot number
Acetic acid	関東化学	
Acetonitrile (HPLC用)	関東化学	
D-Ala <i>tert</i> -butyl ester	国産化学	L558193
L-Ala <i>tert</i> -butyl ester	国産化学	C558396
DL-Amino acid	協和発酵	
(+/-)-2-Amino-1-butanol	ナカライテスク	M8K4663
(R)-(-)-2-Amino-1-bttanol	ナカライテスク	M7T5090
DL-2-Amino-1-propanol	東京化成工業	GF01
(S)(+)-2-Amino-1-propanol	Acros	A011001201
(1-Aminopropyl)phosphonic acid	Aldrich	07826AG
4-Aminosulfonyl-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole (ABD-F)	同仁化学研究所	AU119
Ammonia solution (29% in water)	関東化学	
Ammonium acetate	関東化学	
Boric acid (アミノ酸分析用)	和光純薬工業	
Chloroform	ナカライテスク	
d-Chloroform (NMR用 99.8%)	Merck	
4-Chloro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD-Cl)	東京化成工業	
Citric acid monohydrate	関東化学	
Dichloromethane	関東化学	
<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimide (一級)	和光純薬工業	CAJ 1770
Dimethylamine solution (40% in water)	関東化学	
4-Dimethylaminopyridine (DMAP)	東京化成工業	
4-(<i>N,N</i> -Dimethylaminosulfonyl)-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole (DBD-F)	東京化成工業	IC01
(S)- <i>N</i> -(3,5-Dinitrobenzoyl)-1-naphthylglycine 住化分析センター		
Disodium dihydrogen ethylenediamine tetraacetate dihydrate (EDTA · 2Na)	ナカライテスク	
DNS-Ala	東京化成工業	
DNS-DL-Leu	Sigma	25F0009
DNS-L-Leu	Sigma	48F0600
DNS-DL-Phe	Sigma	55F-0209
DNS-L-Phe	Sigma	30H0047
Dioxane (HPLC用)	関東化学	
Ethanol (HPLC用)	関東化学	
Ethyl acetate (特級)	関東化学	
1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (EDC)		

4-Fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD-F)	東京化成工業	GF02
Hexane (特級)	東京化成工業	
Hydrochloric acid	関東化学	
N-Hydroxy-5-norbornene-2,3-dicarboxyimide (HONB)(ペプチド合成用)	ナカライテスク	
DL-Leu-Gly	和光純薬工業	PTP9948
L-Leu-Gly	Sigma	124H0856
Methanol (HPLC用)	Peptide Instiute	370424
d-Methanol (NMR用 99.8%)	関東化学	
d-Methanol (NMR用 99.5%)	Euriso-top	R2481
N-Methyl-DL-Ala	Merck	
N-Methyl-L-Ala	東京化成工業	FCX01
Methylamine (40% in water)	国産化学	
N-Methyl-D-Asp	東京化成工業	AJ01
N-Methyl-L-Asp	Sigma	
N-Methyl-D-Phe	Sigma	83H5850
N-Methyl-L-Phe	Sigma	101H5855
(+/-)-1-Methylpropylamine	和光純薬工業	LEQ5554
α -Methyl-DL-Tyr	Sigma	122H7707
α -Methyl-L-Tyr	Sigma	23H0088
Nipecotic acid	東京化成工業	
n-Octyl alcohol (一級)	関東化学	707S1571
n-Pentyl alcohol (特級)	関東化学	108D1433
DL-Phenylethylamine	ナカライテスク	M8P6489
(R)-(+)-1-Phenylethylamine	Merck	S19166 810
DL-Pipecolic acid	東京化成工業	
Prilocaine	Sigma	
Silicagel 60 (70-230 mesh ASTM)	Merck	
Sodium hydrogen carbonate (特級)	和光純薬工業	
Sodium hydroxide	和光純薬工業	
Sodium sulfate (特級)	関東化学	
Tetrahydrofuran (HPLC用)	関東化学	
Triethylamine (特級)	関東化学	
Trifluoroacetic acid (HPLC用)	関東化学	
アミノ酸標準液 AN型(アミノ酸分析用)	和光純薬工業	DCJ803
Water Milli-Q reagent system (Millipore (Bedford, MA, USA))により精製したMilli-Q水 (比抵抗>18M Ω cm)を使用した		

Aminopropylsilica gel

本研究には、Merck社製のLiChrosorb NH₂とダイソー株式会社のAPS-SP-120-HPを用いた。これらの基本的な物性は、同等であり、球型の粒子径 5 μm、比表面積 300 m²/g、細孔容量 1.0 ml/g、炭素含有率 4.2 %C、修飾率 4.2 μmol/m²であった。

本研究では、以下に示した装置を使用した。

HPLC関連装置

Proportioning valve:	655 proportioning valve (Hitachi, Tokyo, Japan)
Pump:	655 liquid chromatograph (Hitachi) L-6200 (Hitachi)
Auto sampler:	AS-4000 (Hitachi)
Manual injector:	Rheodyne model 7125 injector (20 μl) (Cotati, CS, USA)
Precolumn:	TSKgel ODS-80Tm TSKgel CN-80Ts (3.2 mm i.d. × 15 mm, Tosoh, Tokyo, Japan)
Analytical column:	SUMICHIRAL OA-2500(S) (CSP 1) SUMICHIRAL OA-3100 (CSP 2) SUMICHIRAL OA-4700 (CSP 3) (4.6 mm i.d. × 250 mm, 5 μm, 住化分析センター) APS APS-6-AmHA APS-11-AmUA APS-11-AmUA-OA-2500(S) (CSP 4, 7) APS-11-AmUA-OA-3100 (CSP 5) APS-11-AmUA-OA-4700 (CSO 6) (4.6 mm i.d. × 250 mm, 5 μm, 住化分析センターおよび長崎大学)
FL detector:	F1000 fluorescence spectrophotometer (Hitachi)
UV detector:	L-4000H (Hitachi)
Data processor:	655-60 processor D-2500 Chromato-Integrator

LC/MS関連装置

MS	M-1200H (Hitachi)
Pump	L-6200 (Hitachi)
Manual injector	Rheodyne model 7125 injector

NMR関連装置

GSX-400 (JEOL, Tokyo, Japan)

計算化学関連

Computer	PC-9821 Ls13 (NEC, Tokyo, Japan)
Software	WinMOPAC ver 1.0 package (Fujitsu, Chiba, Japan)

【実験方法】

【NBD誘導体の調製】

4mMのEDTA・2Naを含む、0.2Mのほう酸緩衝液(pH 8.0)溶液に、試料が100 μ Mになるように標準溶液を調製した。10 μ lの標準溶液にアセトニトリルに溶解させた50mM NBD-F溶液を30 μ l加え、60°Cで5分間加熱する。その後、960 μ lの1% 酢酸/メタノール溶液を加え、その一部をHPLCの試料として注入した。

【ABD誘導体の調製】

0.2Mのほう酸緩衝液(pH 9.3)に、試料が100 μ Mになるように標準溶液を調製した。10 μ lの標準溶液にアセトニトリルに溶解させた50mM ABD-F溶液を30 μ l加え、60°Cで60分間加熱する。その後、960 μ lの1% 酢酸/メタノール溶液を加え、その一部をHPLCの試料として注入した。

【DBD誘導体の調製】

0.2Mのほう酸緩衝液(pH 9.3)に、試料が100 μ Mになるように標準溶液を調製した。10 μ lの標準溶液にアセトニトリルに溶解させた50mM DBD-F溶液を30 μ l加え、60°Cで30分間加熱する。その後、960 μ lの1% 酢酸/メタノール溶液を加え、その一部をHPLCの試料として注入した。

【DNS誘導体の調製】

0.2Mのほう酸緩衝液(pH 9.3)に、試料が100 μ Mになるように標準溶液を調製した。10 μ lの標準溶液にアセトニトリルに溶解させた50mM DNS-Cl溶液を30 μ l加え、室温で1時間反応させる。その後、960 μ lの1% 酢酸/メタノール溶液を加え、その一部をHPLCの試料として注入した。

【DNMの合成】

(S)-N-3,5-Dinitrobenzoyl-1-naphthylglycineを酢酸エチルとTHFの混合液に溶かしHONBを加えて氷冷した後、EDCを加え氷冷化30分、室温下20分攪拌した。攪拌後、減圧乾固し得られた残渣をジオキサンに溶解させ、不溶物を除去した後、濾液にメチルアミン水溶液を加え攪拌した。4時間後、濃縮乾固し残渣を1N塩酸水溶液と塩化メチレンの混合液に溶かし、有機相を抽出し1N水酸化ナトリウム水溶液を加えた。再び有機相を抽出し濃縮乾固し、得られた残渣を酢酸エチルで再結晶した。

【NBD-アミノ酸の合成】

アミノ酸を5% 酢酸アンモニウム水溶液に溶かし、NBD-Clのエタノール溶液を加え10分間還流した。還流後、氷冷し、4N塩酸水溶液で反応液を中和し、減圧濃縮する。濃縮液を水と塩化メチレンの混合液と混ぜ、有機相を抽出し、減圧乾固した。その後オープンカラムによる精製を行なった。

【NBD-アミノ酸のエステルおよびアミド体の合成】

上記の方法で合成されたNBD-アミノ酸 50 mgを30 mlの酢酸エチルに溶解させ、0°C

で100 mgのDCCと50 mgのDMAPを加える。100 μ lの乾燥したアルコールもしくはアミンを添加後、50°Cで1時間反応をさせた。減圧乾固後、シリカゲルで精製（移動相 酢酸エチル：ヘキサン=1：1）し、合成品の確認はLC/MSおよび¹H-NMRで行った。

【HBD-Alaの合成】

333 mgのHBD-Fと1.1 gのAlaをアセトニトリル（2 ml）、メタノール（4 ml）と水（4 ml）の混合液に溶解させ、1 mlのトリエチルアミンを添加後、80°Cで3時間反応させた。反応終了後、減圧乾固し、シリカゲルで精製（酢酸エチル/メタノール=7/3）することでHBD-Ala（3.7 mg, 0.8%）を得た。 δ ppm: 6.83 (1H, d, *J* 9.16 Hz), 7.17 (1H, dd, *J* 7.33, 8.80 Hz), 6.01 (1H, d, *J* 7.33 Hz), 3.97 (1H, m), 1.42 (3H, d, *J* 6.8 Hz); ESI-MS: *m/z* 206 ((M-H))。

【APS-6-AmHA, APS-11-AmUAの作製】

Boc-6-aminoheptanoic acid (10 mmol)をジオキサン（20 ml）、水（10 ml）と1M NaOHaq（10 ml）に溶解させ、氷冷する。di-*tert*-butyldicarbonate（11 mmol）を加えた後、室温で90分間攪拌を行う。反応液をクエン酸でpH3-4にした後、酢酸エチルで抽出を行った。その後、減圧乾固して得られた、オイル状物質をアミノプロピルシリカとの縮合反応に用いた。Boc-11-aminoundecanoic acidも同様な、反応手順で、合成を行った。その後、Boc-6-aminoheptanoic acidあるいはBoc-11-aminoundecanoic acidそれぞれを、アミノプロピルシリカ（APS-SP-120-HP）が溶解している、ジオキサンとジクロロメタンの等量混合液に混合する。そこにDCCとトリエチルアミンを加え、2-3°Cで2時間攪拌した後、1晩放置する。修飾したシリカゲルをTFA/ジクロロメタン=1/5の混合液で、1時間加水分解した。反応後、シリカゲルをジクロロメタンで満たしたフラスコに空けた。フラスコに*N*-エチルジイソプロピルアミンを加え、よく洗浄を行った。その後、ジクロロメタンとメタノールで洗浄をした後、スラリー法でステンレス管に充填した。充填剤の元素分析を行った結果、それぞれC 8.48, H 1.72, N 1.94 % (APS-6-AmHA), C 8.36, H 1.68, N 1.68 % (APS-11-AmUA)であった。

【アルキル直鎖を導入したキラル固定相の作製】

修飾する光学活性部位を*N*-ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydroquinolineを含む、APS-11-AmUAと乾燥したTHF溶液に添加し、室温で1晩攪拌する。その後、修飾したシリカゲルをTHF、メタノール、ジエチルエーテルで、順次洗浄後、乾固させた。その後、スラリー法でステンレス管に充填した。CSP 4およびCSP 5のアミノプロピルシリカゲルにはAPS-SP-120-HPを使用し、CSP 6およびCSP 7にはLiChrosorb NH₂を使用した。充填剤の元素分析を行った結果、それぞれC 14.61 % (CSP 4), C 17.5 % (CSP 6), C 14.28 % (CSP 7)であった。

【各溶質のHPLC条件】

検出条件

NBD誘導体

蛍光検出： λ_{ex} 470 nm, λ_{em} 530 nm

DBD, ABD誘導体

蛍光検出： λ_{ex} 450 nm, λ_{em} 590 nm

DNS誘導体
HBD誘導体

蛍光検出: λ_{ex} 350 nm, λ_{em} 530 nm
UV検出: 269 nm

移動相条件

移動相には、メタノール、アセトニトリル、水の混合溶液に酸を添加した溶液を主に使用した。移動相中のクエン酸濃度が2 mM以下もしくは、TFA濃度が0.05%以下の時は、酸濃度が濃い移動相を、分析用移動相を流す前に10分程度流し、カラムの安定化に要する時間を短縮した。またCSP 6では、水を含有する移動相を用いると、カラム圧が高いため流速を0.8 ml/minとして実験を行った。

【void volumeの測定】

各キラル固定相のvoid volumeは、アセトニトリルをインゼクションし、UV(250 nm)で検出を行い、溶媒のピークが溶出した時間から計算した。

【HPLC実験に用いたパラメータの計算】

保持係数 (k)

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

t: 溶質の保持時間
t₀: アセトニトリルの保持時間

分離係数 (α)

$$\alpha = \frac{k_1}{k_2}$$

k₁: 先に溶出した光学活性体の保持係数
k₂: 後に溶出した光学活性体の保持係数

理論段数 (N)

$$N = 5.54 \left(\frac{t}{W_{0.5}} \right)^2$$

t: 溶質の保持時間
W_{0.5}: ピークの半分の高さにおけるピーク幅

Symmetry係数 (S)

$$S = \frac{W_{0.05h}}{2f}$$

W_{0.05h}: ピークの1/20の高さにおけるピーク幅
f: W_{0.05h}におけるピーク頂点から下ろした垂線で2分されたピークの立ち上がり側の距離

修飾量 (N: 基材1gあたりに修飾されたリガンドのモル数)

$$N = \frac{Pc - P_0}{1200n_r - Pc(W-1)}$$

Pc: 修飾後の炭素含量 (%)
P₀: 修飾前の炭素含量 (%)
n_r: リガンド中の炭素の数
W: リガンドの質量

【LCMSによる合成品の確認】

APCI法

移動相にはメタノールを用い、流速は1 ml/minで、フローイジェクション分析を行った。設定の詳細は以下に示す。

Drift voltage: 40V, Focus voltage: 120 V, Multiplier voltage: 1800V, Vaporizer temperature: 180 °C, Desolvation temperature: 400 °C

ESI法

移動相には、水とメタノールの等量混合液を用い、流速は0.05 ml/minでフローイジェクション分析を行った。設定の詳細は以下に示す。

Drift voltage: 50V, Focus voltage: 120 V, Multiplier voltage: 1800V, Nebuliser temperature: 200 °C

【HOMO, LUMOエネルギー、電荷の計算】

最安定構造を求めるために、いくつかの初期構造を用い、半経験的分子軌道法AM1法を行うにあたってキーワードとしてPRECISE, EFを使用した。アミド結合を有する化合物の計算には、上記の2つのキーワードに加えてMMOKを使用した。Alaのベンゾフラザン誘導体の計算にはメチルアミンのベンゾフラザン誘導体を用い、CSP 1の3,5-dinitrophenyl基には3,5-dinitrobenzoylamineを用い、naphthaleneにはDNMの3,5-dinitrophenyl基を水素に置換した構造を計算に用いた。

【NMRの測定】

測定温度には、30、10、0、-20°Cの4種を用い、測定溶媒には、d-メタノール、d-メタノール、d-クロロフォルムを使用した。測定溶媒にd-メタノールを使用したときは、homo gate decouplingにより、水由来のシグナル強度を減少させた。基準ピークには、測定溶媒にメタノールを用いたときはメタノールのメチル基のプロトンのシグナルを3.3 ppmとし、クロロフォルムを用いたときはTMSのメチル基のプロトンのシグナルを0.0 ppmとした。設定の詳細は以下に示す。

観測のポイント数: 32768、パルス幅: 50 μ s、取り込み時間: 2.73 s、繰り返し時間: 5.7 s、積算回数: 16または32回

【2D-NMR】

各測定法の設定の詳細は以下に示す。

HOHAHA (GSX-500を使用)

f₁軸のポイント数: 2000、f₂軸のポイント数: 512、パルス幅: 25 μ s、スピロック時間: 45 ms、積算回数: 32回、測定温度: 30 °C

NOESY

f₁軸のポイント数: 2000、f₂軸のポイント数: 512、パルス幅: 9.5 μ s、混合時間: 150, 500または700 ms、積算回数: 32回、測定温度: 30, 0または-20 °C

ROESY

f₁軸のポイント数: 2000、f₂軸のポイント数: 512、パルス幅: 15 μ s、混合時間: 150, 500または700 ms、積算回数: 32回、測定温度: 30, 0または-20 °C

【引用文献】

- [1] A.M. Krstulovic, *Chiral separation by HPLC*. A.M. Krstulovic, (1989), Chichester: Ellis Horwood. 1.
- [2] S. Ahuja, *Chiral Separations by Liquid Chromatography*. S. Ahuja, Vol. 471. (1991), Washington: American Chemical Society. 1.
- [3] G. Subramanian, *A Practical Approach to Chiral Separation by Liquid Chromatography*. G. Subramanian, (1994), Weinheim: VCH. 1.
- [4] K. Imai, T. Fukushima and S. Uzu, *Biomed. Chromatogr.*, 7 (1993) 177.
- [5] K. Imai and T. Fukushima, *Biomed. Chromatogr.*, 7 (1993) 275.
- [6] T. Fukushima, M. Kato, T. Santa and K. Imai, *Biomed. Chromatogr.*, 9 (1995) 10.
- [7] N. Ōi, H. Kitahara, F. Aoki and N. Kisu, *J. Chromatogr. A.*, 689 (1995) 195.
- [8] N. Ōi, H. Kitahara and N. Kisu, *Bunseki Kagaku*, 44 (1995) 301.
- [9] W.H. Pirkle, J.M. Finn, J.L. Schreiner and B.C. Hamper, *J. Am. Chem. Soc.*, 103 (1981) 3964.
- [10] W.H. Pirkle and J.L. Schreiner, *J. Org. Chem.*, 1981 (1981) 4988.
- [11] C.J. Welch, *J. Chromatogr. A*, 666 (1994) 3.
- [12] W.H. Pirkle and C.J. Welch, *J. Org. Chem.*, 49 (1984) 138.
- [13] W.H. Pirkle and R. Dappen, *J. Chromatogr.*, 404 (1987) 107.
- [14] W.H. Pirkle and J.E. McCune, *J. Chromatogr.*, 479 (1989) 419.
- [15] K. Imai and Y. Watanabe, *Anal. Chim. Acta*, 130 (1981) 377.
- [16] W.H. Pirkle and T.C. Pochapsky, *Adv. Chromatogr.*, 27 (1987) 73.
- [17] W.H. Pirkle, D.W. House and J.M. Fin, *J. Chromatogr.*, 192 (1980) 143.
- [18] N. Ōi, H. Kitahara and R. Kira, *J. Chromatogr.*, 515 (1990) 441.
- [19] M. Kato, T. Fukushima, T. Santa, H. Homma and K. Imai, *Biomed. Chromatogr.*, 9 (1995) 193.
- [20] C.E. Dalglish, *J. Chem. Soc.*, (1952) 3940.
- [21] W.H. Pirkle and T.C. Pochapsky, *Chem. Rev.*, 89 (1989) 347.
- [22] S. Topiol and M. Sabio, *J. Chromatogr.*, 461 (1989) 129.
- [23] T.D. Booth, D. Wahnon and I.W. Wainer, *Chirality*, 9 (1997) 96.
- [24] V.A. Davankov, *Chirality*, 9 (1997) 99.
- [25] W.H. Pirkle, *Chirality*, 9 (1997) 103.
- [26] W.H. Pirkle and T.C. Pochapsky, *J. Am. Chem. Soc.*, 109 (1987) 5975.
- [27] I.W. Wainer and M.C. Alembik, *J. Chromatogr.*, 367 (1986) 59.
- [28] L. Oliveros, C. Minguillón, B. Desmazière s and P.L. Desbène, *J. Chromatogr.*, 543 (1991) 277.
- [29] S. Topiol, M. Sabio, J. Moroz and W.B. Caldwell, *J. Am. Chem. Soc.*, 110 (1988) 8367.
- [30] T.D. Booth and I.W. Wainer, *J. Chromatogr. A*, 737 (1996) 157.
- [31] E. Horvóth, L. Kocsis, R.L. Frost, B. Hren and L.P. Szabó, *Anal. Chem.*, 70 (1998) 2766.
- [32] W.H. Pirkle and C.J. Welch, *J. Chromatogr. A*, 683 (1994) 347.
- [33] W.H. Pirkle, J.A. Burke and S.R. Wilson, *J. Am. Chem. Soc.*, 111 (1989) 9222.
- [34] K. Okamura, Y. Sumida, Y. Fujiwara, S. Terada, H. Kim and K. Hashimoto, *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, 43 (1995) 97.
- [35] K.B. Lipkowitz, D.A. Demeter, R. Zegarra, R. Larter and T. Darden, *J. Am. Chem. Soc.*, 110 (1988) 3446.
- [36] K. Sato, H. Nakano and T. Hobo, *J. Chromatogr. A*, 666 (1994) 463.
- [37] K.B. Lipkowitz and B. Baker, *Anal. Chem.*, 62 (1990) 770.
- [38] J. March, *Advanced Organic Chemistry*, 4 ed. (1992), New York: John Wiley & Sons.

- [39] W.H. Pirkle, M.H. Hyun and B. Bank, *J. Chromatogr.*, 316 (1984) 585.
- [40] W.H. Pirkle and M.H. Hyun, *J. Chromatogr.*, 328 (1985) 1.
- [41] W.H. Pirkle and M.H. Hyun, *J. Chromatogr.*, 322 (1985) 295.
- [42] G.T. Tucker, L.E. Mather, M.S. Lennard and A. Gregory, *Br. J. Anaesth.*, 65 (1990) 333.
- [43] W.H. Pirkle, C.J. Welch and M.H. Hyun, *J. Chromatogr.*, 607 (1992) 126.
- [44] W.H. Pirkle and Y. Liu, *J. Org. Chem.*, 59 (1994) 6911.
- [45] W.H. Pirkle and Y. Liu, *J. Chromatogr. A*, 749 (1996) 19.
- [46] J. Kip, P. Van Haperen and J.C. Kraak, *J. Chromatogr.*, (1986) 423.
- [47] P. Macaudière, M. Lienne, M. Caude, R. Rosset and A. Tambuté, *J. Chromatogr.*, 467 (1989) 357.
- [48] C.A. Hunter, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 32 (1993) 1584.
- [49] C. Hansch, A. Leo and R.W. Taft, *Chem. Rev.*, 91 (1991) 165.
- [50] R.E. Merrifield and W.D. Phillips, *J. Am. Chem. Soc.*, 80 (1958) 2779.
- [51] Y. Okamoto, M. Kawashima and K. Hatada, *J. Chromatogr.*, 363 (1986) 173.
- [52] T. Fukushima, T. Santa, H. Homma, S.M. Al-kindy and K. Imai, *Anal. Chem.*, 69 (1997) 1793.
- [53] G. Uccello-Barretta, C. Rosini, D. Pini and P. Salvadori, *J. Am. Chem. Soc.*, 112 (1990) 2707.
- [54] K. Okamura, T. Da-te, Y. Fujiwara, Y. Sumida, S. Terada and K. Hashimoto, *Anal. Sci.*, 11 (1995) 563.
- [55] W.H. Pirkle, P.G. Murray, D.J. Rausch and S.T. McKenna, *J. Org. Chem.*, 61 (1996) 4769.
- [56] M. Kato, 修士論文, *Pirkle型キラル固定相によるNBD-D,L-アミノ酸の分離分析研究* 1997, The University of Tokyo.
- [57] C.A. Hunter and J.K.M. Sanders, *J. Am. Chem. Soc.*, 112 (1990) 5525.
- [58] F. Cozzi, M. Cinquini, R. Annuziata and J.S. Siegel, *J. Am. Chem. Soc.*, 115 (1993) 5330.
- [59] N. Ôi, and H. Kitahara, *J. Liq. Chromatogr.*, 9 (1986) 511.
- [60] N. Ôi, H. Kitahara and R. Kira, *J. Chromatogr.*, 535 (1990) 213.
- [61] N. Ôi, H. Kitahara and F. Aoki, *J. Chromatogr. A*, 666 (1994) 457.
- [62] K. Hamase, H. Homma, Y. Takigawa, T. Fukushima, T. Santa and K. Imai, *Biochim. Biophys. Acta*, 1334 (1997) 214.
- [63] Y. Watanabe and K. Imai, *J. Chromatogr.*, 239 (1982) 723.
- [64] W.H. Pirkle and C.J. Welch, *J. Liq. Chromatogr.*, 14 (1991) 2027.
- [65] W.H. Pirkle and C.J. Welch, *J. Chromatogr.*, 589 (1992) 45.
- [66] W.H. Pirkle and R.S. Readnour, *Chromatographia*, 31 (1991) 129.
- [67] T. Ihara, K. Murata, Y. Sugimoto, T. Nakagama and T. Hobo, *Bunseki Kagaku*, 44 (1995) 397.
- [68] K. Lewandowski, P. Murer, F. Svec and L.M.J. Fréchet, *Anal. Chem.*, 70 (1998) 1629.
- [69] N. Bargmann-Leyder, J.C. Truffert, A. Tambuté and M. Caude, *J. Chromatogr. A*, 666 (1994) 27.
- [70] N.M. Maier and G. Uray, *J. Chromatogr. A*, 732 (1996) 215.
- [71] W.H. Pirkle and P.G. Murray, *J. Chromatogr. A*, 719 (1996) 299.
- [72] Y. Dobashi and S. Hara, *J. Org. Chem.*, 52 (1987) 2490.
- [73] R. Nishioka, M. Kato, T. Fukushima, K. Imai and K. Nakashima, *Chromatography*, 19 (1998) 302.
- [74] P. Shieh, K. Kallury, M. Sarker, K. Kozminski, M. Ye, M. Huang, L. Yin, R. Paschal and N. Cooke, *Chromatography*, 19 (1998) 118.
- [75] H. Kumagai, Y. Inoue, T. Yokoyama, T.M. Suzuki and T. Suzuki, *Anal. Chem.*, 70 (1998) 4070.
- [76] T. Ihara, A. Nomura, T. Nakagama and T. Hobo, *Bunseki Kagaku*, 47 (1998) 1085.

【謝 辞】

本研究を行なうに際して多大なる御指導、御助言を賜りました東京大学大学院薬学系研究科分子薬学専攻生物有機化学講座生体分析化学教室の今井 一洋教授に謹んで感謝致します。

また貴重な御指導ならびに御助言を賜りました同教室の本間 浩助教授、三田 智文博士、福島 健博士に深く感謝致します。

本研究に使用した、HPLC用固定相や試薬を提供して頂き、さらにカラムの作製に便宜を計って頂きました住化分析センター西岡 亮太氏に深く感謝いたします。またカラムの作製をに際しては、長崎大学薬学部 衛生化学教室の中島 憲一郎教授に大変お世話になり、深く感謝します。

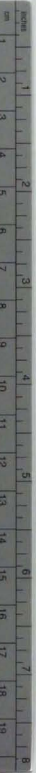
NMRを用いた研究において便宜を計って頂きました東京大学大学院薬学系研究科機能薬学専攻生体分子機能学講座生命物理化学教室の嶋田 一夫教授、榛葉 信久博士、坂倉 正義氏に深く感謝いたします。

計算化学による溶質とキラル固定相との相互作用についての研究で、大変お世話になり、貴重な御助言を下された、エーザイ株式会社の川上 善之博士に深く感謝いたします。

終始御助言と御協力を頂いた東京大学大学院薬学系研究科分子薬学専攻生物有機化学講座生体分析化学教室の教室員の皆様に深く感謝いたします。

最後に、日々お世話になりました皆様に深く感謝いたします。





Kodak Color Control Patches

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

