

氏 名 (本籍) 後 藤 信 治

学 位 の 種 類 薬 学 博 士

学 位 記 番 号 薬 博 第 132 号

学 位 授 与 年 月 日 昭 和 58 年 3 月 25 日

学 位 授 与 の 要 件 学 位 規 則 第 5 条 第 1 項 該 当

研 究 科 専 門 課 程 東 北 大 学 大 学 院 薬 学 研 究 科
(博 士 課 程) 薬 学 専 攻

学 位 論 文 題 目 高 速 液 体 ク ロ マ ト グ ラ フ ィ ー に よ る 光 学
異 性 薬 物 の 分 離 分 析 に 関 す る 研 究

(主 査)

論 文 審 査 委 員 教 授 南 原 利 夫 教 授 長 哲 郎

教 授 鈴 木 康 男

論文内容要旨

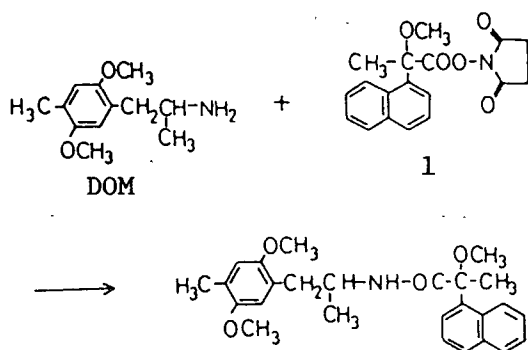
疾病の治療に薬物療法の果たしている役割はきわめて大きいものがあり、今日多岐にわたる医薬品が開発されている。薬物には分子内に不斉中心を持つものも少なくないが、薬理活性を代表する光学活性体の調製が生産規模では困難なため、ラセミ体として臨床に提供されている例が少なくない。しかしながら、光学異性体は通常吸収、代謝、排泄が同一ではない。体内動態の正確な把握は、優れた医薬品の開発、合理的な投与計画の設定上きわめて重要であり、信頼度の高い分析法の確立が緊急の課題となっている。しかし、光学異性体は物理的、化学的性質が相互に酷似するため両者の分離は一般に容易ではない。とりわけ体液中に存在する微量の光学異性体を分離定量することはすこぶる困難な問題である。

光学異性体の分離には各種クロマトグラフィーが用いられ、光学活性試薬による diastereomer への誘導、光学活性固定相あるいは移動相の利用など、近年その分離手段の進歩には目ざましいものがある。HPLCは、揮発性、熱安定性に乏しい化合物の分析にとりわけ威力を発揮し、検出感度においても優れた分離分析法である。しかしながら、光学異性体の分離定量についてはほとんど検討がなされておらず、生体内ラセミ型薬物への応用は未だ見るべき成果に乏しい。

そこで、分離、感度に優れるばかりか、測定対象の広い diastereomer 法を用い、生体試料中光学異性薬物を HPLC で分離定量する方法の開発を企てた。まずアミノ基、カルボキシル基並びに水酸基を有する光学異性体を対象とする HPLC 用光学活性誘導体化剤として α -methoxy- α -methyl-1-naphthaleneacetic acid N-succinimidyl ester (1), 1-(4-dimethylamino-1-naphthyl) ethylamine (2) 並びに 2-methyl-1,1'-binaphthalene-2'-carbonyl nitrile (4) を合成した。これら誘導体化剤を適用する光学異性体としては 2,5-dimethoxy-4-methylamphetamine (DOM), N-アセチルアミノ酸並びに α -アリルプロピオン酸, β -ヒドロキシ脂肪酸並びにプロプラノロールを取り上げ、これら diastereomer の分離に影響する種々の因子を解析すると共に分離条件を確立した。さらにこれらの方法を DOM, α -アリルプロピオン酸の血中濃度測定に応用した。

1. 2,5-Dimethoxy-4-methylamphetamine 光学異性体の HPLC 分離

まず光学活性誘導体化剤 **1** を、対応するカルボン酸と N-hydroxysuccinimide を DCC 法で縮合させることにより異性化を伴わずに好収率で得た。**1** は温和な条件下アミノ基と容易に反応するうえ、UV 検出器 (波長 280 nm) による検出限界は 5 ng と高感度であり、誘導体化剤として優れることが明らかとなった。DOM と **1** より生成する diastereomer は、カラムに順相型の μ Porasil を、移動相にシクロヘキサン/酢酸エチル (3:1) を用いるとき完全なベースライン分

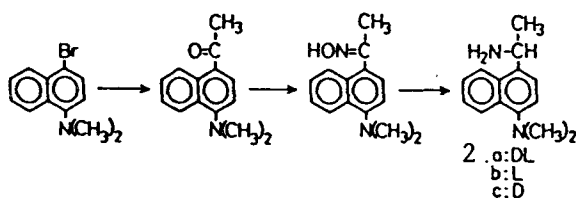


離 ($R > 1$) を示した。

ついで血漿中薬物のクリーンアップを検討した。これには Sep-pak C₁₈ カートリッジと弱酸性疎水性陽イオン交換ゲル carboxymethyl Sephadex LH-20 を組み合わせる操作が最も効果的であった。クロマトグラム上妨害ピークはほとんど認められず、添加回収率もほぼ満足すべき成績が得られた。ついで dl-DOM を家兔に投与後、経時的に採血し、光学異性体の血中濃度を測定した。その結果、両者はほぼ同様の推移を示すものの、半減期は 1 体の方が d 体よりやや長いことが判明した。

2. 抗炎症薬 Naproxen 光学異性体の HPLC による分離定量

まず光学活性誘導体化剤 1-(4-dimethylamino-1-naphthyl) ethylamine (2) の合成を行った。1-Dimethylaminonaphthalene を出発原料に用い、N-bromosuccinimide により 4 位をブロム化後無水エーテル中金属



Mg と反応させ、アセトニトリルとの Grignard 反応に付してメチルケトン体とした。つぎにヒドロキシルアミンを縮合させオキシム体とした後、Raney Ni 還元により 2 をラセミ体として得た。ついで光学分割に付し、d 体、1 体をととも 99% 以上の光学純度で得た。

つぎに N-アセチルアミノ酸および α -アシルプロピオン酸光学異性体の HPLC 分離を検討した。2c を N-アセチルアミノ酸並びに代表的な抗炎症薬 ibuprofen, indoprofen, naproxen とそれぞれ縮合させ、カラムに順相型の μ Porasil を、移動相にヘキサン/酢酸エチル、ヘキサン/テトラヒドロフランを用いてクロマトグラフ的挙動を精査した。また α -methylbenzylamine, 1-(1-naphthyl) ethylamine, 1-(1-anthryl) ethylamine についても同様、naproxen との diastereomer に誘導し、その分離の様相を 2c の場合と比較検討した。N-アセチルアミノ酸では

L体がD体より先に溶出し、 α 位アルキル基がかさ高くなるにつれて k' 値の減少、分離度(R)の増大を来たし、置換基の大きさと分離度の間に相関性が認められた。また3種の薬物はいずれも

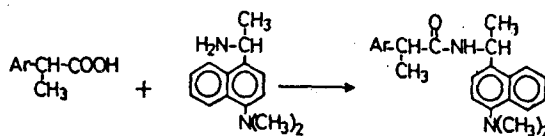
Separation of diastereoisomeric amide derivatives of DL- α -arylpropionic acids
(Column, μ Porasil. Mobile phase, (A) hexane/ethyl acetate (10:3), (B) hexane/tetrahydrofuran (5:1). Flow rate, 1.0 ml min⁻¹, t_0 = 2.5 min)

Drug	k'		α	R	Mobile phase
	D	L			
Ibuprofen	1.36	2.05	1.51	4.30	A
	1.32	1.98	1.50	3.80	B
Indoprofen	19.10	24.70	1.30	3.65	A
	15.40	18.30	1.18	3.00	B
Naproxen	3.04	4.37	1.44	3.60	A
	2.79	3.80	1.36	3.14	B

$R > 3$ と完全な分離を示した。さらに類似の光学活性試薬3種について比較したところ、アリル基がかさ高くなるにつれ分離度の減少する傾向が見られた。蛍光検出器 (Ex 320 nm, Em 410 nm) を用いる時、これらの検出限界は 0.1 ng であり、従来の分離試薬のほぼ10倍の検出感度が得られた。

つぎに 1-ethyl-3-(3-dimethyl-1-aminopropyl) carbodiimide (WSC) を用い、naproxen と 2c の定量的縮合条件を検討し

た。1-Hydroxybenzotriazole を添加すると、反応は 4°C, 45min で完結し、異性化やクロマトグラム上妨害するピーク

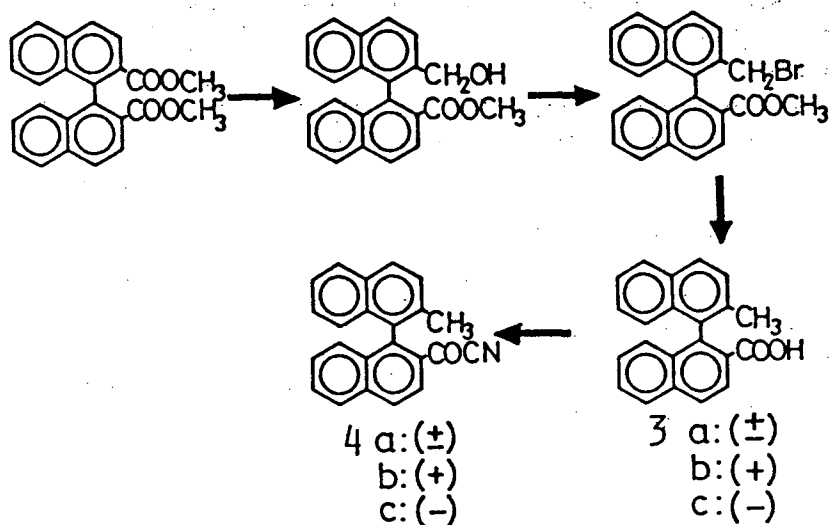


は認められなかった。また検量線も 25-2000 ng の範囲で良好な直線性を示した。本法を用い naproxen 光学異性体の血中濃度を測定した。血中 naproxen は Sep-pak C₁₈ カートリッジと逆抽出操作を組み合わせる時、最も効果的かつ定量的に抽出することができた。ひき続き、d 体、l 体並びに dl 体を家兔に投与後、経時的に採血し、それらの血中濃度を測定したところ、生体内において l 体が一方的に d 体に異性化することが判明した。

3. 光学活性ヒドロキシ化合物の HPLC 分離

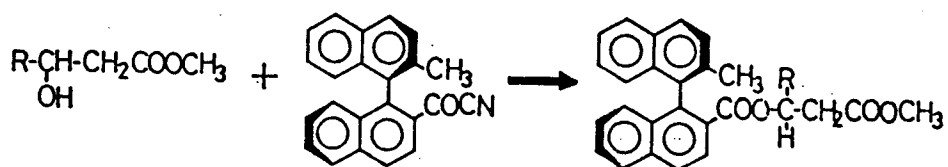
アルコール性水酸基に対する反応活性基としてカルボニル・ニトリルを配した HPLC 用発蛍光ラベル化剤 4-dimethylamino-1-naphthoyl nitrile を合成した。ステロイドをモデル化合物に用い各種水酸基に対する反応を検討したところ、アシルニトリルは優れた反応性、立体選択性を示した。試薬それ自身は無蛍光性であるのに対して、反応成績体は強い蛍光 (Ex 350 nm, Em 530 nm) を発し、その検出限界は 0.2 ng と高感度であった。

ついで光学活性誘導体化剤 2-methyl-1, 1'-binaphthalene-2'-carbonyl nitrile の合成を



行った。Dimethyl 1, 1'-binaphthalene-2, 2'-dicarboxylate を出発原料に用い、まず $\text{LiAl}-(\text{tert-BuO})_3\text{H}$ により 2 位を還元後、臭化水素酸にてブロム化、ついでジメチルスルホキシド中 NaBH_4 還元、さらに加水分解に付し、**3** を得た。1-ブルシンにて光学分割後、酸クロリドとし、trimethylsilyl cyanide との交換反応により、**4b, c** を 99% 以上の光学純度で得た。

最後に本誘導体化剤を光学活性ヒドロキシカルボン酸エステル並びにプロプラノロールの HPLC 分離に応用した。生成するエステルは、カラムに順相型の Cosmosil 5 SL を、移動相にペンタン/



酢酸エチルを用いる時、いずれも完全に分離した ($R > 1.9$)。また、**4b** は全く無蛍光性であるのに対し、生成する diastereomer は強い蛍光 ($\text{Ex } 342\text{nm}$, $\text{Em } 420\text{nm}$) を発し、その検出限界は 0.2 ng ($\text{S/N} = 5$) と高感度であった。今回、開発した光学活性誘導体化剤は、binaphthalene を基本骨格とする軸不斉を利用した新しい型のものであり、今後多岐にわたる β 遮断薬の体液中濃度測定などへの応用が期待される。

High-Performance Liquid Chromatographic Separation of
Diastereomeric Esters Derived from Hydroxyl Compounds
with (+)-2-Methyl-1,1'-binaphthalene-2'-carbonyl Nitrile

Compound	k'		α	R
Methyl 3-hydroxyoctanoate	7.83	9.25	1.18	3.09
Methyl 3-hydroxydecanoate	6.25	7.50	1.20	2.59
Methyl 3-hydroxylaurate	4.50	5.20	1.16	2.20
Methyl 3-hydroxystearate	3.67	4.25	1.16	1.89
Methyl mandelate	4.54	5.08	1.12	1.91

Condition: column, Cosmosil 5SL; mobile phase, n-pentane/ethyl acetate; flow rate, 1.0 ml/min.

審査結果の要旨

近年、医薬品の有効性、安全性確保の一環として光学異性薬物の体内動態を的確に把握することがつよくもとめられている。光学異性薬物は、物理的性質が相互に酷似し、通常体液中に微量しか存在しないため両者の分離定量はすこぶる困難な問題である。本研究は、このような観点から、これらをジアステレオマーに変える新規光学活性誘導体化剤を開発し、けい光検出高速液体クロマトグラフィー（HPLC）により分離定量する方法の確立を試みたものである。

まずアミノ基をもつ光学異性体用の誘導体化剤として、 α -methoxy- α -methyl-1-naphthaleneacetic acid N-succinimidyl esterを開発し、これを用いるプレカラム標識HPLCにより、2,5-dimethoxy-4-methylamphetamine 投与時における血中光学異性体を分離定量し得ることを示した。

つぎに光学活性カルボン酸類を対象とする誘導体化剤として、1-(4-dimethylamino-1-naphthyl)ethylamine をジメチルアミノナフタレンから数工程で合成した。本法をN-アセチルアミノ酸並びに α -アシルプロピオン酸系抗炎症薬に適用し、生成するジアステレオマーのHPLC分離を検討した。さらにこの誘導体化、分離条件をナプロキセンの動態解析に適用し、光学異性体の血中濃度推移を追跡した結果、生体内でl体が一方向的にd体に異性化することが証明された。

また水酸基をもつ薬物への応用を究極の目標として、発けい光団にカルボニルニトリルを配した誘導体化剤の開発を企て、まず4-dimethylamino-1-naphthoyl nitrileを調製した。各種水酸化ステロイドをモデル化合物としてその特性を系統的に吟味し、反応性、感度共に優れることを見い出した。ついでビナフタレンの軸不斉を利用した新規光学活性誘導体化剤として2-methyl-1,1'-binaphthalene-2'-carbonyl nitrileをデザインし、その合成に成功した。これを光学活性ヒドロキシ酸エステル、プロプラノロールのHPLC分離に応用したところ、生成するエステルは順相系カラムを用い、ペンタン/酢酸エチルを移動相とするとき完全な分離を示した。本誘導体化剤は、それ自身無けい光性であるのに対し、エステルはつよけい光を発し、その検出限界も0.2 ngと高感度な応答を与えた。

以上本論文は、ジアステレオマー法による光学異性薬物のHPLC分離に有用な光学活性誘導体化剤を開発し、生体試料への応用を図ったものであり、動態解析の新たな方法論を提供した意義は大きく学位論文として価値ある内容と認める。