

論文内容要旨

ガスクロマトグラフィー (GC) による光学異性体の分離は 1961 年 Casanova らが初めて camphor 誘導体に応用して以来、種々の試みがなされている。アミノ酸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るが、GC は高感度であるばかりか簡便、迅速性にすぐれるため、とりわけ多くの研究がなされている。GC による光学異性体の分離は方法論的につぎの 2 つに大別される。すなわち、(1) 光学活性試薬と反応させて diastereomer に誘導し、光学不活性な通常の固定液相で分離する方法と、(2) 光学活性固定液相を用いて不整の場合における溶解または吸着の差異を利用して分離する方法である。

光学活性化合物を取り扱うにあたってはその化学純度のみならず、光学純度もきわめて重要な問題であることはいうまでもない。アミノ酸は種々の条件下ラセミ化することが知られており、またある種の抗生物質、菌体および昆虫類には D-アミノ酸が含有されている。このように、合成品あるいは天然物中に含まれるアミノ酸の量を知るためアミノ酸光学異性体分析法を確立することは研究の進展上不可欠な課題といわなければならない。

以上の観点から、著者は GC によるアミノ酸光学異性体分析法の研究に着手した。すなわち、L-proline および *l*-menthol をそれぞれアミノ基、カルボキシル基に導入して diastereomer に誘導する方法と、新しい光学活性固定液相 (polyglutamate, N-lauroyl-L-valyl-L-valine lauryl ester) を用いる方法の 2 者について検討することを企て、在来の方法よりすぐれた分離を得るため、新しい分離試薬の開発、誘導體生成および GC の条件を各種アミノ酸について詳細に吟味した。またこれらの結果にもとづいて DL-アミノ酸の溶出順序、分離係数と化学構造の関係に考察を加えた。さらにガスクロマトグラフィー-マススペクトロメトリー (GC-MS) により各種アミノ酸誘導體のマススペクトルを測定し、fragmentation を解析して、マスフラグメントグラフィー (MF) およびマスクロマトグラフィー (MC) による超微量分析法の基礎的検討をもあわせて行なった。

1. プロリン誘導体による diastereomer 生成を利用する分離

第 1 章ではアミノ酸をエステル化後、N-トリフルオロアセチル-L-プロリルクロリド (N-TFA-L-pc) を縮合させて diastereomer による分離を検討した。まず、誘導體の調製にはアミノ酸を常法によりエステル化後、トリエチルアミンおよび N-TFA-L-pc を加え、約 15 分室温放置の条件が適切なることが明らかとなった (Chart 1)。ヒドロキシルアミノ酸および tryptophan については良好な分離を得るため、さらにトリメチルシリル (TMS) 誘導體に導いた。ついで GC 分離を固定液相 2 2 種について検討した結果、一般に、中性および塩基性アミノ酸は OV-1 などの無極性液相を、酸性アミノ酸は polyethylene glycol adipate (PEGA)

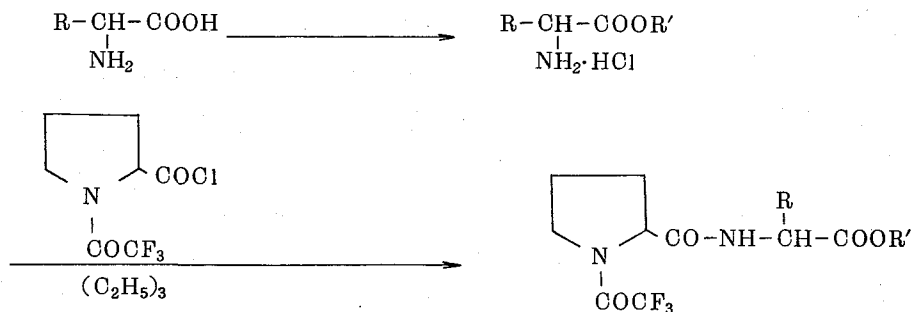


Chart 1

などの極性液相を用いると DL-アミノ酸は明確に分離することが明らかとなった。つぎに、alanine, valine, leucine および proline を対象とし、エステル基 (methyl, ethyl, isopropyl, n-butyl, tert-butyl, cyclopentyl および l-menthyl) および N-perfluoroacyl 基 (trifluoroacetyl (TFA), pentafluoropropionyl (PFP), heptafluorobutyryl (HFB) および pentadecafluorooctanonyl (PDFO) をかえ、それらが保持時間および分離係数におよぼす影響を考察した。保持時間はいずれの N-perfluoroacyl 誘導体においても、methyl < ethyl < isopropyl < tert-butyl < n-propyl < n-butyl < cyclopentyl < l-menthyl の順に長くなった。一方、いずれのエステル誘導体においても、N-perfluoroacyl 基は PFP < TFA < HFB < PDFO の順に保持値は大きくなり、N-PDFO 誘導体は N-TFA 誘導体の約 2 倍の値を示した。1 級アルコールのエステルは 2 級、3 級アルコールのエステルより分離が良く、さらに 1 級アルコールでも分子量の大きいほど良好な分離が得られた。N-perfluoroacyl 基については proline を除くいずれのエステル誘導体でも、顕著な差ではないが TFA < PFP < HFB < PDFO の順に分離係数は大きくなっている。さらにすぐれた分離試薬を開発するため、Chart 2 に示す proline アナログについて検討した。その結果 hydroxyproline および 4-thiazolidinecarboxylic acid は proline と同様分離試薬として使用できるが、pyroglutamic acid は適切でないことが判明した。これら試薬を用いてアミノ酸の GC 分離を検討したところ、proline < 4-thiazolidinecarboxylic acid < hydroxyproline の順に保持値は大きくなり、hydroxyproline は proline に比し約 2 倍の保持時間を示した。一方、分離係数は 4-thiazolidinecarboxylic acid < proline < hydroxyproline の順に大きくなった。以上の結

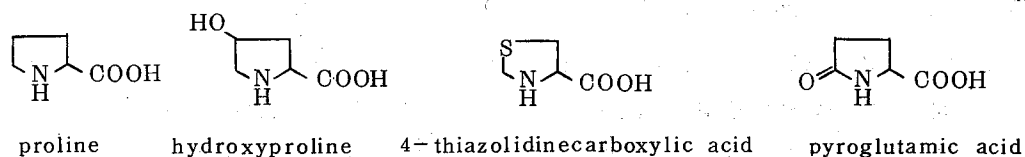


Chart 2

果からみて、分離試薬としては適当な保持時間とすぐれた分離係数を示す proline が最も有利と考えられる。構造と保持時間に関して興味深いのは同一炭素数のアミノ酸では側鎖の分枝した方が直鎖のものよりもはやく溶出することである。また分子量の大きい α -メチルアミノ酸 (isovaline, α -methyl-DOPA) は対応する α -アミノ酸 (α -amino-n-butyric acid, DOPA) よりすべて保持値が小さい。これは前者のアミノ酸では分子の形がやや球状となるうえ、液相との相互作用が α 位置換により弱められるためと考えられる。DL-アミノ酸を diastereomer に導いて GC に付すとき、光学活性な L-prolyl 基がアミノ基に導入されると、alkyl ester でも l-menthyl ester でも、さきに D 体が、ついで L 体が溶出した。この溶出順序は固定相に光学活性な poly-r-methyl-D-glutamate (D-PMG) および poly-r-ethyl-L-glutamate (L-PEG) を用いた場合も同様であった。アミノ酸の構造と分離係数の関係をみるに alanine, α -amino-n-butyric acid, norvaline, norleucine および α -amino-n-caprylic acid では OV-1 カラムを用いた場合、分子量の大きいアミノ酸の方が分離係数は小さかった。この関係は valine と leucine でも同様に観察された。また同一炭素数のアミノ酸 (isovaline, norvaline および valine, leucine, isoleucine, norleucine および tert-leucine) では側鎖が分枝したアミノ酸の方が分離係数は大であった。不整炭素につく置換基の分離におよぼす効果を α -amino-n-butyric acid, DOPA とそれらの α -メチルアミノ酸で検討した。その結果、 α -メチルアミノ酸はまったく分離せず、不整炭素上の水素原子が分離にきわめて大きな影響を与えるものと推測される。アミノ基の位置が保持時間および分離係数におよぼす影響についても吟味したところ、 β -アミノ酸の保持時間は対応する α -アミノ酸のそれよりも大きく、また光学異性体はまったく分離しなかった。つぎに、GC-MS を用いて N-TFA-L-prolylamino acid n-butyl ester のマススペクトルを測定し、fragmentation を解析して超微量分析法の基礎的研究を行なった。本誘導体では m/e 166 $\left(\begin{array}{c} \text{N}^+ \\ | \\ \text{COOC}_2\text{F}_5 \end{array} \right)$ が各アミノ酸に共通し、しかも基準ピークあるいはそれに準ずる強度で認められた。そこで m/e 166 で MF を行なった結果、約 10^{-10} g オーダー ($S/N = 2$) の超微量でアミノ酸の一斉分析が可能なることが明らかとなった。その他、各アミノ酸にそれぞれ特徴的なフラグメントイオン ($M-101$, $R+29$, $R+43$) が観察されたが、これらでモニターして MC を行なえば、高い信頼度でアミノ酸を同定できることが判明した。

2. l-メントール誘導体による diastereomer 生成を利用する分離

第 2 章ではアミノ酸を l-menthyl ester 誘導体に通じ、GC 分離の条件、アミノ酸の構造と保持時間および分離係数の関係、Chart 3 に示す分離試薬の検討および GC-MS による超微量分析の基礎的研究を行なった。GC は充填カラムでは良好な分離が得られなかったため、support coated open tubular カラムを用いることとし、極性の異なる 7 種のカラムについて検討

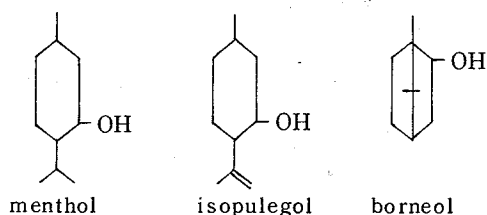


Chart 3

した結果、分離の様相およびピークの対称性を考え合わせて Apiezon L を選択した。保持値に関しては第 1 章で述べたのと同じ結果であったが、分離係数は α -amino-n-butyric acid, norvaline, norleucine の 3 者においては側鎖が長くなるほど大きくなった。さらに第 1 章で述べた結果と同様、 β -アミノ酸は分離しなかった。つぎに *l*-isopulegol および *l*-borneol が *l*-menthol と同様エステル化による光学異性体の分離試薬として使用し得るか否かを検討した。両者のうち *l*-borneol は誘導体試薬として有用であり、生成する ester は対応する *l*-menthyl ester に比較して保持時間が長く分離係数も小さいことが判明した。また N-perfluoroacyl 基については炭素数が少ない誘導体の方が分離係数は大きくなる傾向がみられた。アミノ酸の溶出順序は L-prolyl 誘導体を分離試薬に用い N-acyl 体とした時とは逆で、さきに L 体が、ついで D 体が溶出した。さらに N-TFA amino acid *l*-menthyl ester のマスペクトルを測定し、fragmentation を解析して超微量分析法の基礎的検討も行なった。m/e 83 に共通して基準ピークあるいは強度の高いピークが認められたほか、特徴的なフラグメントイオン、M-183 (menthyl ester) が観察された。*l*-menthyl ester 誘導体は N-TFA-L-prolyl 誘導体と比較し誘導体調製上簡便、迅速性にやや劣り、超微量分析の目的には後者の方がすぐれていることが判明した。

3. 新しい光学活性固定液相を用いる分離

第 3 章では新しい光学活性固定液相を用い不整の場で光学対掌体を分離する方法について検討した。D-PMG (または L-PEG) はアミノ酸を diastereomer に導くと分離することができたが、光学活性基を導入しないと分離不可能であった。つぎに、酸無水物法で合成した N-lauroyl-L-valyl-L-valine lauryl ester をステンレス製キャピラリーカラムにコーティングして光学異性体の分離を試みた。直鎖アミノ酸と分枝アミノ酸、 α -アミノ酸と β -アミノ酸および α -アミノ酸と α -メチルアミノ酸の各組合せについてそれぞれ保持時間を比較したところ、第 1 章および第 2 章で得られたのと同じ結果であった。またエステル基 (isopropyl, n-propyl, isobutyl, n-butyl) の分離におよぼす効果を考察したところ、n-butyl ester が最も分離係数を大きくした。diastereomer に誘導して GC に付した場合は、側鎖が分枝したアミノ酸ほど分離係数は大きかったが、光学活性固定液相を用いたときは逆の関係がみられ、直鎖ア

ミノ酸の方が分枝アミノ酸よりも大きな分離係数を示した。また α -アミノ酸は β -アミノ酸よりも大きな分離係数を示した。さらにN-TFA amino acid n-butyl esterのマススペクトルについても検討を試みたが、本誘導体はアミノ酸により基準ピークが異なるため、一斉分析には必ずしも適切でないことが判明した。

審査結果の要旨

光学異性体のガスクロマトグラフ分離は光学活性試薬と反応させ diastereomer に誘導して通常の固定相で行なう方法と、光学活性固定相を用い不整の場合における分配、吸着の差異を利用する方法とに大別される。本研究はアミノ酸光学異性体を対象にすぐれた分離を得るため誘導体調製試薬、光学活性固定相、ガスクロマトグラフィ条件を詳細に吟味するとともに、マスフラグメントグラフィ（MF）およびマスクロマトグラフィ（MC）による超微量分析法の基礎的検討を行なったものである。

まず、diastereomer 生成に用いる光学活性試薬として一連の *N*-perfluoroacyl-*L*-prolyl chloride をとりあげ、アミノ酸の各種エステルについて構造と分離係数ならびに保持時間との関係を考察した。その結果、*N*-perfluoroacyl 基には顕著な差はみられないがエステル基としては分子量の大きい 1 級アルコールが良好な分離を与えること、アミノ酸は側鎖が分枝した方が直鎖のものよりすぐれた分離を示し、 α -置換アミノ酸、 β -アミノ酸は分離困難であることなどが明らかにされた。また、*N*-トリフルオロアセチル-*L*-プロリルアミノ酸ブチルエステルのフラグメンテーションの解析から各アミノ酸に共通し、しかも基準ピークかそれに準ずる強度でみられる m/e 166 で MF を行なうとき一斉分析の可能なことが示された。

一方、カルボン酸部に光学活性基を導入する方法として *l*-メントールエステルを取りあげ、アミノ酸の構造と代表的な固定相における保持時間、分離係数との関係について考察を加えた。また、共通してみられる m/e 83 のピークをモニターして MF を行なえば前者とほぼ同程度の感度でアミノ酸が一斉分析できることを認めた。

つぎに光学活性固定相として *N*-lauroyl-*L*-valyl-*L*-valine lauryl ester を調製し、ステンレス製キャピラリーカラムにコーティングして *N*-トリフルオロアミノ酸光学異性体の分離を試み、アミノ酸の構造、エステル基の種類と分離係数との関係を明らかにした。

以上のごとく本論文はアミノ酸光学異性体のガスクロマトグラフ分離を誘導体調製試薬、光学活性固定相の観点から系統的に検討して数々の新知見を知るとともにアミノ酸の MF および MC による超微量分析法の基礎を確立したものであり、学位論文として価値あるものと認める。