

氏名	數崎正人
生年月日	
本籍	和歌山県
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	博甲第599号
学位授与の日付	平成15年9月30日
学位授与の要件	課程博士(学位規則第4条第1項)
学位授与の題目	逆相系糖誘導体カラムにおける光学異性体分離機構の解明
論文審査委員(主査)	島田 和武(薬学部・教授)
論文審査委員(副査)	中垣 良一(自然科学研究科・教授) 宮部 寛志(名古屋工業大学大学院・助教授) 徳村 邦弘(自然科学研究科・助教授) 木津 良一(自然科学研究科・助教授)

学位論文要旨

Summary

A reversed-phase HPLC method was investigated for the separation of enantiomers, the newly synthesized potential drug substance and corresponding optical impurity, employing polysaccharide-based chiral stationary phases (CHIRALCEL OD-RH and CHIRALPAK AD-RH). On the CHIRALCEL OD-RH column chiral recognition was completely enthalpy-driven with a negative entropic contribution. The cavity formation effect was the major factor that governs the solute distribution between the mobile and stationary phases for acetonitrile-rich mobile phase, while the effect of solvation due to acid-base equilibrium became significant in highly aqueous mobile phase. On the CHIRALPAK AD-RH column the enantio-selectivity is exclusively driven by enthalpy above about 20°C, whereas below about 20°C enantio-separation was achieved by the combination of enthalpy and entropy. Conformational change of the stationary phase of the CHIRALPAK AD-RH column is observed at about 20°C. Enthalpy-entropy compensation concerning enantio-separation on both columns indicates that enthalpic gain/loss was substantially cancelled out by the entropic loss/gain. The CHIRALPAK AD-RH column was used for the determination of enantiomer (optical impurity). The low level quantification (0.05%) of the minor enantiomer is achieved. The analytical procedure was validated and successfully applied to the detection of the optical impurity in potential drug substance.

1.はじめに

多くの医薬品はその構造中に不斉炭素を有しており、光学異性体が存在する。個々の光学異性体は *in vivo* 及び *in vitro* において異なった生理活性を示す場合があることから、光学活性体として製造される医薬品の開発には各々の光学異性体についての吸収、分布、代謝、排泄に関する検討が必要である。また、医薬品の品質管理の面からも光学異性体を分離測定する技術は必須のものとなりつつある。近年、光学分割にはセルロース等の光学活性物質をキ

ラルな認識基とする高分子型固定相が汎用されている。しかし、これら糖誘導体からなるキラルな認識基と光学異性体との相互作用，特に逆相系でのそれについては解明されていない点が多い。そこで，光学活性体として糖尿病合併症治療薬として開発中の AS-3201 (*R*-enantiomer) 及びその光学異性体 (*S*-enantiomer) を用い，糖誘導体カラムとの相互作用を検討した。対象とした光学活性体 AS-3201 の構造を Fig. 1 に示す。

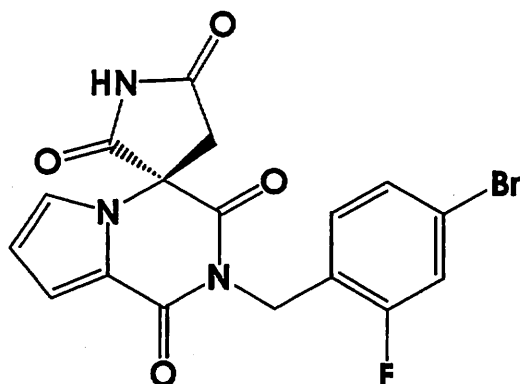


Fig. 1. Chemical structure of AS-3201 (*R*-enantiomer)

一方，光学分割に用いるカラムには逆相系で使用可能であり，様々な光学活性化合物の分離に汎用されている光学活性カラム (CHIRALCEL OD-RH, CHIRALPAK AD-RH) を用いた。これらは各々セルローストリス (3,5-ジメチルフェニルカルバメート) 及びアミローストリス (3,5-ジメチルフェニルカルバメート) をキラルな認識基として用いている。CHIRALCEL OD-RH 及び CHIRALPAK AD-RH のキラルな認識基の構造を Fig. 2 に示す。

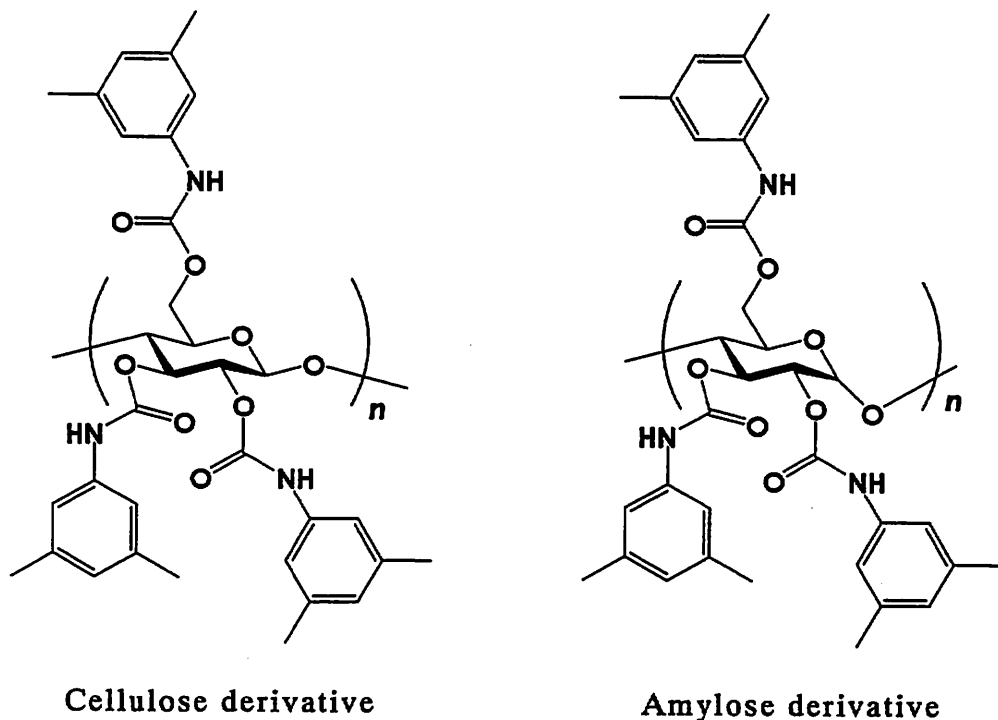


Fig. 2. Chemical structures of chiral selectors

エンタルピー，エントロピーは，下記に示す van't Hoff の式から求めた。

$$\ln k' = -(\Delta H^\circ / RT) + (\Delta S^\circ / R) + \ln \Phi$$

$$\ln \alpha = \ln k_2' / k_1' = -(\Delta \Delta H^\circ / RT) + (\Delta \Delta S^\circ / R)$$

熱力学的パラメーターであるエンタルピー変化とエントロピー変化との間には平衡系において、強い相関が認められることが例証されている。このようなエンタルピー変化とエントロピー変化の間の相関は、比例定数 (β) を用いて下記の式で表される。

$$T \Delta (\Delta S^\circ) = \beta \Delta (\Delta H^\circ)$$

Gibbs-Helmholtz 式の微分形に上記式を代入することにより、

$$\Delta (\Delta G^\circ) = (1 - \beta) \Delta (\Delta H^\circ)$$

が導かれる。つまり、溶媒や反応に関与する物質をエンタルピー的に有利になるように変えたとき、自由エネルギー変化にはその一部 ($1 - \beta$) が反映される。つまり、比例定数 β は、エンタルピー的利得がどの程度エントロピー的に失われるかを表す。この関係を用いて光学異性体間の分離に及ぼすエンタルピー、エントロピーの影響を検討した。

2. セルロース誘導体固定相における挙動解析

光学活性カラムとしてセルロース誘導体カラム (CHIRALCEL OD-RH) を用い、*R*-enantiomer 及び *S*-enantiomer の保持を検討した。

セルロース誘導体カラムを用いた系で、カラム温度を変化させて得られた van't Hoff プロットは、相関係数 0.999 以上と良好な直線性を示した。したがって、溶質と固定相との相互作用の程度は一定であり、溶質の保持機構は 12 ~ 40°C の温度範囲において変化しないことが示された。

この系では、移動相中のアセトニトリル量によってエンタルピー変化 ($-\Delta H^\circ$) の程度は影響された。移動相中のアセトニトリル量が 60% の場合、エンタルピー変化は最大値を示した。移動相中のアセトニトリル量が 60% 以上の場合には、アセトニトリル量の増加に伴い *R*-enantiomer 及び *S*-enantiomer のエンタルピー変化は減少した。これは、移動相内での有機溶媒量の増加により *R*-enantiomer 及び *S*-enantiomer と移動相との親和性が増加し、固定相への吸着に伴う発熱量が減少したためである。一般的に、カラム内での物質輸送には溶質分子と移動相溶媒との溶媒和及び脱離、溶媒和していない溶質分子と移動相及び固定相との相互作用、保持に関わる物質の立体構造の変化等の様々な平衡関係が関与し、それらが組み合わされてカラム内での保持がなされるのに対し、エンタルピー変化として観測されるのはその総和としてのエネルギー差のみである。溶質分子と移動相溶媒、固定相との相互作用の観点から、溶質分子が極性な化合物であれば逆相系 HPLC においては固定相よりも移動相への親和性が大きくなる。以上のことから、移動相中のアセトニトリル量が 60% 以上の領域で *R*-enantiomer 及び *S*-enantiomer の移動相及び固定相に対する親和性が変化し、エンタルピー変化が減少したと考えられる。

移動相中でのアセトニトリル量が 60% より少ない系での *R*-enantiomer 及び *S*-enantiomer の移動相及び固定相との相互作用の変化を調べるために、エントロピー変化を検討した。エントロピー変化と移動相中のアセトニトリル量との関係は、前節に示したエンタルピー変化とアセトニトリル量とのそれと同様であった。*R*-enantiomer 及び *S*-enantiomer の構造中にはスクシンイミド基が存在するため、酸解離定数は約 4.7 と考えられる。しかし、有機溶媒の存在下では有機溶媒量の増加とともに酸解離定数も増大する。緩衝液は弱酸性 (pH 4.7) であることから、緩衝液中では約 50% がイオン型として存在する。しかし、アセトニトリル-緩衝液混液中では、移動相中のアセトニトリル量の増加に伴い、*R*-enantiomer 及び *S*-enantiomer の脱プロトン化によるイオン化が抑制される。逆に、アセトニトリルが豊富な系から緩衝液が豊富な系へと移動相組成を変化させた場合には、移動相中のアセトニトリル量の減少に伴いイミドプロトンの脱離が促進され、イオン化したスクシンイミド基の周りに水分子が配列し、アセトニトリルが豊富な系と比較した場合、運動の自由度が減少する。このように、移動相内で溶質分子が移動相溶媒に

取り囲まれている場合、移動相中での乱雑さの程度は小さくなるために移動相から固定相への移動に伴うエンタルピー変化の程度は、運動が制限されていない場合に比べてより小さな値を示す。移動相中のアセトニトリル量が60%の際にエントロピー変化の程度は最大値を示した。アセトニトリルが豊富な系では、移動相自体が準順相的になり移動相内でアセトニトリル分子に取り囲まれているためエントロピー変化の程度も小さくなる。アセトニトリル量が60%以下の場合では、*R*-enantiomer 及び *S*-enantiomer のイミドプロトンの脱離によりイオン化したスクシンイミド基の周りに嵩高い水分子の集合体が形成され、エントロピー変化が減少した。

R-enantiomer と *S*-enantiomer は物理化学的性質が同じであるため、移動相中での酸塩基平衡は同一のものとなる。したがって、移動相組成の変化は光学分割能には影響を及ぼさなかった。検討した温度範囲では、エンタルピー主導で光学分割が行われていた。しかし、カラム温度 126℃ 以上ではエントロピー主導で光学分割が行われる可能性があることを明らかにした。

光学分割に関するエンタルピー項及びエントロピー項の寄与の程度を明らかにするために、25℃ における光学異性体間のエンタルピー変化の差及びエントロピー変化の差を調べた。得られた回帰直線（エンタルピー—エントロピー補償プロット）は、相関係数 1.000 と良好な直線性を示した。この系における 25℃ でのエンタルピー—エントロピー補償プロットの傾きは 0.96 であり、光学分割に関してエンタルピー的に得た利得はあまり反映されていなかった。したがって、この系では移動相組成を変化させ *R*-enantiomer 及び *S*-enantiomer をより長くカラムに保持させても、その大部分をエントロピー的損失が打ち消してしまうため、光学分割能はほぼ一定に保たれることになる。

3. アミロース誘導体固定相における挙動解析

アミロース誘導体を固定相とする光学活性カラム CHIRALPAK AD-RH 上での *R*-enantiomer と *S*-enantiomer の保持を検討した。*R*-enantiomer 及び *S*-enantiomer の溶出順序はセルロース誘導体カラムを用いた場合のそれと逆転していた。

カラム温度を 11℃ から 45℃ まで変化させ、*R*-enantiomer と *S*-enantiomer の保持を検討した。得られた van't Hoff プロットは 20℃ 付近に交点を持つ 2 本の直線として表わされ、11 ~ 45℃ の温度範囲において溶質の移動相から固定相への移動に関するエンタルピー変化、エントロピー変化は一定ではないことが示された。したがって、*R*-enantiomer と *S*-enantiomer の保持には 2 種類の保持機構が存在していることが明らかとなった。

光学分割に関する光学異性体間のエンタルピー変化の差 ($\Delta \Delta H^\circ$)、エントロピー変化の差 ($\Delta \Delta S^\circ$) を調べた。得られた van't Hoff プロットは 20℃ 付近に交点を持つ 2 本の直線であり、光学分割は 2 種類の機構によって行われていた。

光学分割に関するエンタルピー項及びエントロピー項の寄与の程度を明らかにするために、25℃ における光学異性体間のエンタルピー変化の差及びエントロピー変化の差を調べた。得られた回帰直線（エンタルピー—エントロピー補償プロット）は、相関係数 1.000 と、良好な直線性を示した。25℃ におけるエンタルピー—エントロピー補償プロットの傾きは 1.03 であり、自由エネルギー変化に対してエンタルピー項は影響を与えていなかった。つまり、光学分割に関してエンタルピー的に得た利得がすべてエントロピー的に失われることを示した。つまり、*R*-enantiomer 及び *S*-enantiomer をより長くカラムに保持させるために相互作用を大きくしても、そのすべてをエントロピー的損失が打ち消してしまい、結果的に光学分割能は一定となる。逆に、*R*-enantiomer 及び *S*-enantiomer と固定相との相互作用の差が減少して

もエントロピー変化の差が増大するために光学分割は一定に保たれることが判明した。

4. 実試料への適用

本検討においてモデル化合物として用いた AS-3201 (*R*-enantiomer) は現在、臨床試験が行われている。治験原薬として製造された AS-3201 中に微量の不純物として混在する光学異性体 (*S*-enantiomer) を検出、定量する試験方法を設定した。前記の知見より、使用するカラムは CHIRALPAK AD-RH とし、治験原薬中に含まれる不純物の分離定量に関する分析能パラメーターとして、定量限界、直線性、真度、精度を検討した。

定量限界は、AS-3201 の量に対し 0.05% であった。この値は、光学異性体を不純物として取り扱った場合に求められる定量限界を満たすものである。

定量限界から混存量 0.25% 相当量の範囲において AS-3201 及び光学異性体 (*S*-enantiomer) の注入量とピーク面積は良好な直線関係を示した。真度 (既知の添加量と回収率の差) は 0.2%、精度 (相対標準偏差) は 2.7% と、不純物の定量試験として十分な真度、精度を示した。この試験法により臨床試験に用いる治験原薬として製造された AS-3201 を分析した結果、不純物として含まれる光学異性体の存在量は定量限界未満であった。

4. 結論

セルロース誘導体をキラルな認識基とする光学活性カラム CHIRALCEL OD-RH を用いて、光学異性体間の分離を検討した。*R*-enantiomer 及び *S*-enantiomer の存在様式 (分子形、イオン形) は移動相組成により影響されるものの、光学分割能には影響を及ぼさないことを見出した。また、エンタルピー—エントロピー補償により、この系では移動相組成を変化させ *R*-enantiomer 及び *S*-enantiomer と固定相との相互作用を変化させても光学分割能は一定に保たれていた。

アミロース誘導体をキラルな認識基とする光学活性カラム CHIRALPAK AD-RH を用いた検討から、*R*-enantiomer 及び *S*-enantiomer と固定相との相互作用が 20℃ 付近を境として変化していることを見出した。この変化に伴い 40℃ 付近ではエンタルピー変化の差によって成されていた光学分割も 20℃ 以下の温度範囲ではエントロピー変化の差による寄与が大きくなることを見出した。検討した系では、エンタルピー—エントロピー補償により、移動相組成の変化により、*R*-enantiomer 及び *S*-enantiomer をカラムにより長く保持させても光学分割能は一定に保たれることを明らかにした。

治験原薬及び試製品として製造された AS-3201 の分析を行った。分析用カラムとしては、AS-3201 の光学異性体 (*S*-enantiomer) が AS-3201 よりも早く溶出される CHIRALPAK AD-RH を用いた。設定した試験法は ICH ガイドラインに示される基準を満足するものであった。設定した試験法を適用したところ、現在臨床試験に使用されている薬剤の品質は満足すべきものであった。

学位論文審査結果の要旨

本論文は以下のような内容より構成されている。

現在、医薬品の開発には各々の光学異性体についての吸収、分布、代謝、排泄に関する検討が必要であり、光学異性体を分離測定する技術は必要不可欠である。近年、光学分割には糖誘導体等の光学活性物質をキラルな認識基とする高分子型固定相が汎用されているが、これら認識基と光学異性体との相互作用、特に逆相系でのそれについては不明な点が多い。そこで、本研究はモデル化合物として糖尿病合併症治療薬として開発中の AS-3201 (*R*-enantiomer) 及びその光学異性体 (*S*-enantiomer)、カラムには逆相系で様々な光学活性化合物の分離に汎用されている CHIRALPAK AD-RH、CHIRALCEL OD-RH、相互作用の指標としてエンタルピー、エントロピーを用いて、これらの解明を企てた。

まず、セルロース誘導体をキラルな認識基とする光学活性カラムとして CHIRALCEL OD-RH を用いて検討したところ、*R*-enantiomer 及び *S*-enantiomer の存在様式 (分子形、イオン形) が移動相組成により影響されるものの、光学分割能には影響を及ぼさないことを見出した。一方、アミロース誘導体を固定相とする光学活性カラム (CHIRALPAK AD-RH) を用いた検討から、固定相上での保持及び光学分割は、20℃付近を境に2種類の機構によって行われていることを明らかにした。エンタルピーとエントロピーとの関係から、これらのカラムでは移動相組成の変化により、*R*-enantiomer 及び *S*-enantiomer をカラムにより長く保持させても光学分割能は一定に保たれることを明らかにした。

ついで、今回得られた検討結果をもとに、治験原薬として製造された AS-3201 中に微量の不純物として混在する *S*-enantiomer の検出法を設定した。検出用カラムとしては、*S*-enantiomer 体が先に溶出する CHIRALPAK AD-RH を用いた。本法は定量限界、直線性、真度、精度共に満足すべきものであり、実試料へ適用した結果いずれも規格内の値を示すものであった。

上記の内容及び最終試験を基に5名の審査員による審査の結果、博士 (薬学) に該当するものと認める。