

総合論文***ボロン酸の分子認識能に基づく高選択的
高感度分析法に関する研究**

蒲 生 啓 司**

Study of a highly selective and sensitive analytical method based on the
molecular recognition ability of boronic acid derivatives

Keiji GAMOH**

** Faculty of Education, Kochi University, 2-5-1, Akebono-cho, Kochi 780

(Received 20 July 1995)

Many organic compounds of biological importance possess two or more polar function groups in close proximity. In chromatographic analysis, a suitable derivatization of the bifunctional groups has sometimes been used to enhance the sensitivity and selectivity for detection. Transforming 1,2-diol compounds to the corresponding cyclic boronate derivatives has been more extensively used as a suitable derivatization method for gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. Although applications to liquid chromatography have been comparably limited due to the susceptibility of the cyclic boronates to solvolysis, we have been demonstrated some instances in which such derivatives show considerable stability. In this paper we describe the utility of the boronate ester function as a derivative group for the characterization of 1,2-diol compounds by reversed-phase liquid chromatography, and briefly survey the reactivity of boronic acid derivatives with a variety of 1,2-diols. The present review covers the following: 1. synthesis of novel boronic acid derivatives and the development of highly selective and sensitive detection methods for diol compounds, 2. chromatographic optical resolution of enantiomeric diol compounds by optically active boronic acid derivatives, 3. molecular orbital methodological approach to prove the relationship between the stability and the molecular structures of boronates, 4. highly selective solid extraction for the chromatographic determination of diol compounds using phenylboronic acid-bonded gel. Several boronic acids, including naphthaleneboronic acid, phenanthreneboronic acid, 1-cyanoisindole-2-*m*-phenyl-boronic acid, dansylaminophenylboronic acid and ferroceneboronic acid have been successfully applied to the boronate formation of diol compounds chromatography. It has been confirmed that some diol boronate derivatives are remarkably stable, even under acidic aqueous conditions. A satisfactory gas chromatographic separation of the diastereomeric 2-(*N,N*-dimethylaminomethyl)ferroceneboronates derived from enantiomeric diols could be performed in the achiral stationary phase. In order to prove the relationship between the stability and the molecular structures of boronates, optimized structures of the boronates were calculated by the molecular orbital methodological approach. It has been confirmed that the C-C bond distances of the "stable" boronates are longer than those of the "unstable" boronates. The steroids, brassinolide and casta-

* 関東支部創立 40 周年記念

** 高知大学教育学部化学教室: 780 高知県高知市曙町
2-5-1

sterone, were retained as their cyclic boronates formed on immobilized phenylboronic acid gel in a mixed solvent of pyridine and acetonitrile. After removal of impurities in the sample, parent steroids could easily be released from their boronates by a mixed solution of hydrogen peroxide and acetonitrile. The present method is the first time phenylboronic acid-gel has been used in the purification method of brassinosteroids in plants. The liquid chromatographic analytical method for cyclic boronates may contribute to identification studies on diol components with conformational rigidity or stereochemical hindrance in biological and pharmaceutical samples, and also to their screening in unknown compounds.

Keywords : selective and sensitive detection of stable boronates; LC/MS of brassinolide; optical resolution of enantiomeric diols; optimized structures of boronates; solid-phase extraction by immobilized phenylboronic acid-gel.

1 緒 言

現在ボロン酸を用いた研究は、一つにはポリマーや機能性分子中にボロン酸残基を導入して、糖由来のシスジオール基を認識する糖質インターフェースとしての機能開発^{1)~3)}、他の一つはボロンの同位体効果を直接利用するための医学的利用、すなわち標的のがん細胞へボロンの導入された有機物を取り込ませておいて、そこを低エネルギー中性子で照射することによって、特異的に細胞を致死させる、いわばボロンもしくはボロン酸を内蔵したキャリアー分子の開発^{4)~6)}等が挙げられ、先端技術の一翼を担っている。これらの研究において共通するところは、いずれもボロン酸の持つボロネート形成能に基づいている点である。

一方、天然に微量に存在する生理活性物質を分離・定量することは、化合物の単離・同定のみならず、その生理作用発現機構解明上も極めて重要であることは今更言うまでもない。そのために、クロマトグラフィーを中心に高感度かつ高選択的分析法の開発が今なお積極的に行われている。これら生理活性物質の中には、部分構造として、1,2-あるいは1,3-ジオール構造を有し、それが生理活性発現に重要な役割を果たしている場合が多い。

ところで、サイクリックボロネート（環状ボロン酸エステル）は、ジオール、ヒドロキシ酸、あるいはヒドロキシルアミン類等の二官能基を有する化合物のボロン酸誘導体として、主として GC 及び GC/MS 法において広範囲に用いられてきた。これは、質量スペクトル上で分子イオンピークが得やすくなるばかりでなく、¹⁰B による同位体パターンが観察されることから、化合物の同定をより確実にする利点を有すること等によるが、本誘導体を HPLC 法に適用した例は極めて少ない。

その理由として、はん用されている逆相系 HPLC においては、用いる水系移動相によりボロネートが容易に加水分解されると考えられていたことに基づいているが、この点については、ボロネートの被加水分解性、あるいはボロネート環の立体化学的安定性とボロネートの化学構造との関係等、今なお十分な検討がなされていない。

著者がサイクリックボロネート形成に基づく誘導体化に着目した理由は、それが、液体クロマトグラフィーにおいてなぜラベル化（誘導体化）を行うのかという根本的命題に答え得る内容を含んでいると考えたからである。すなわち、部分構造をどれだけ選択性高く認識できるかという、ラベル化の官能基選択性という点で高い選択性を追求できること。これはジオール構造を二つの水酸基としてではなく、ジオール基として認識するほうが選択性としては高いことを意味する。

又、質量分析計との連結を考えた場合に、ラベル化することによって、特異的なフラグメントをどれだけ優先的に生成できるか、という問題に答え得るものであること。これは前述したように、分子ピークの同定をより確実にするというだけではなく、ラベル化に用いるホウ素の同位体パターンが反映されることに基づいている。

更には、逆相 HPLC を用いることで、誘導体を水溶液中での安定化学種として検出することが可能であることを示している。

本研究は、これまでその容易な加水分解性のために取り上げられてこなかった、サイクリックボロネートの形成に着目した高選択的高感度微量分析法への提言に関する内容である。すなわち、

1. 新規ボロン酸誘導体の合成と、それらを用いるジオール系化合物の逆相系 HPLC による高選択的・

高感度検出法の開発

2. 光学活性ボロン酸誘導体を用いるジオール対掌体の光学分割法の開発
 3. 分子軌道法を用いるボロネートの安定性と分子構造との相関説明
 4. ボロン酸固定化ゲルを用いるジオール系化合物の高選択的抽出法の開発
- について記述する。

2 実 験

本研究で使用した装置は、標準的な液体クロマトグラフ一式であり、送液ポンプ、カラムオープン、サンプルインジェクター、紫外・可視分光光度計検出器、分光蛍光光度計検出器、電気化学検出器、及びデータ処理装置からなる。分析用カラムには、いずれも市販の逆相分配用 ODS カラムを用い、移動相は、いずれも定組成、定流量で用いた。

従来ボロン酸誘導体を用いるボロネートの形成反応においては、主として無水ピリジン中加熱条件下で行われてきたが、逆相分配モードの HPLC 分析においては、溶媒としてピリジンが多量にカラムに注入されることは、カラムへの負担から考えて好ましくない。本誘導体化反応の条件検討の段階で、ボロネート形成反応は、触媒量のピリジン存在下で進行し、必ずしも無水で行う必要のないことが判明した。すなわち、ボロン酸試薬をピリジンで溶解し、アセトニトリルを加えて最終的に 1~5% (v/v) ピリジン-アセトニトリル中 1 mg/ml の濃度となるようにラベル化試薬を調製した。これを反応試薬として、ジオール標品、又は天然物試料に一定量（通常は大過剰）加えて、特に記す以外は、70~80°C で 10~20 分間加熱することでプレラベル化が完了する。その後、反応液をそのまま分析カラムに注入する。

生成したボロネート誘導体は、いずれも比較的安定であり、ラベル化試薬溶液中でも、暗所で冷蔵保存すれば少なくとも 6 か月間は安定であった。

3 結果及び考察

3・1 新規ボロン酸誘導体の合成と、それらを用いるジオール系化合物の逆相系 HPLC による高選択的・高感度検出法の開発

3・1・1 ボロネートの逆相 HPLC これまで知られている、あるいは新たに合成した各種ボロン酸誘導体を Fig. 1 に示した。ナフタレンボロン酸、フェナントレンボロン酸、及びフェロセンボロン酸は市販品であり、それ以外は *m*-アミノフェニルボロン酸を原料とし

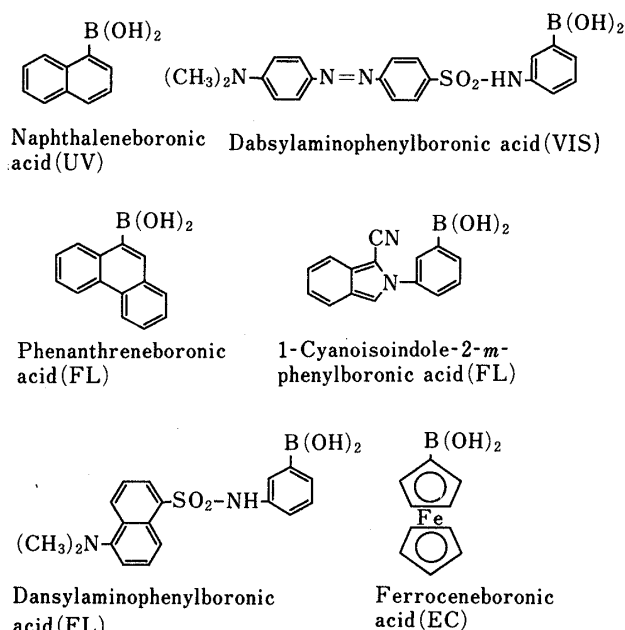


Fig. 1 Boronic acid derivatives for prelabeling of diol compounds detection method

UV: ultraviolet; VIS: visible; FL: fluorimetric; EC: electrochemical

て合成したものである。従って、誘導体化に用いるボロン酸の種類によって紫外・可視、蛍光、及び電気化学の各検出法が選択可能である。ナフタレンボロン酸を用いたときの、種々のジオール系化合物に対するボロネート形成を、逆相系 HPLC により検討した。既に、種々の 1,2-ジオール系化合物の逆相 HPLC については報告してある⁷⁾ので、ここでは、類似の結果ではあるが、最も簡単な 1,3-ジオール構造を有するプロパンジオール類縁体の、ナフタレンボロネートに対する逆相 HPLC の分析結果を Fig. 2 に示した。併せて、そのときに検出できたクロマトグラムを Fig. 3 に示した。又、分子構造のより複雑な化合物の例として、rifampicin 及び ryanodine を用いたときの分析例を Fig. 4 及び 5 に示した。これらのボロネート形成においては、その質量分析 (LC/MS) の結果、クロマトグラム上のピークはいずれもモノボロネートとして検出されていることを確認した。約 20 種のジオール化合物に対し、ボロネート形成反応と逆相 HPLC による分析を行った結果、非加水分解性安定ボロネートを形成する 1,2-ジオール構造が存在し、それには分子の大きさにかかわらず、少なくとも三級-三級、三級-二級及び二級-二級の各アルコールの組み合わせが必要であることが分かった。この結果から、ボロネート形成能において、ジオール周辺の分子環境の

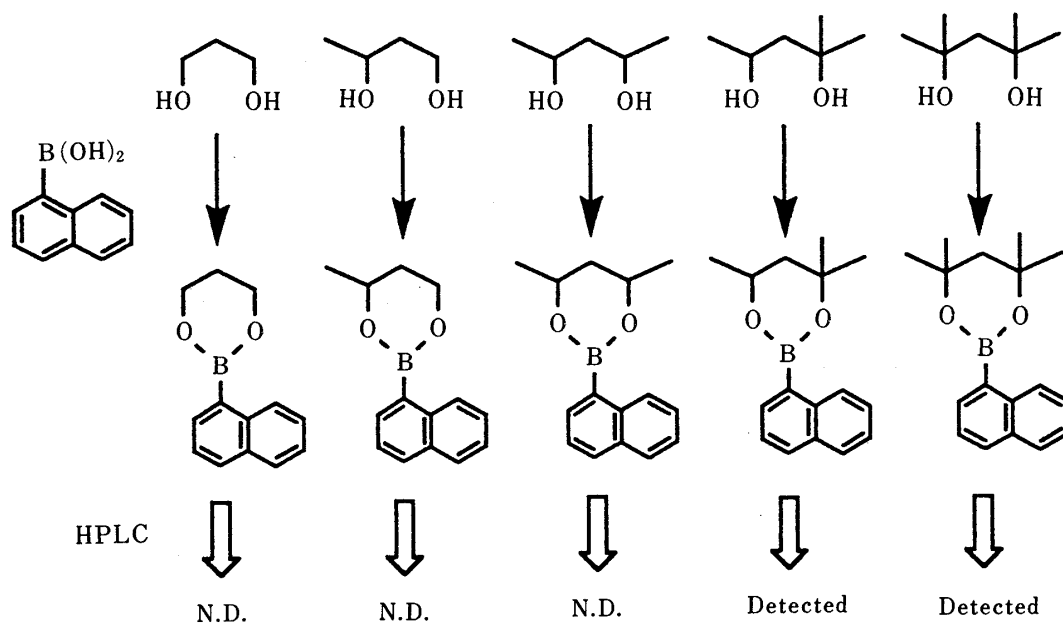


Fig. 2 Reversed-phase liquid chromatographic detection of 1,3-diol compounds as the naphthaleneboronates

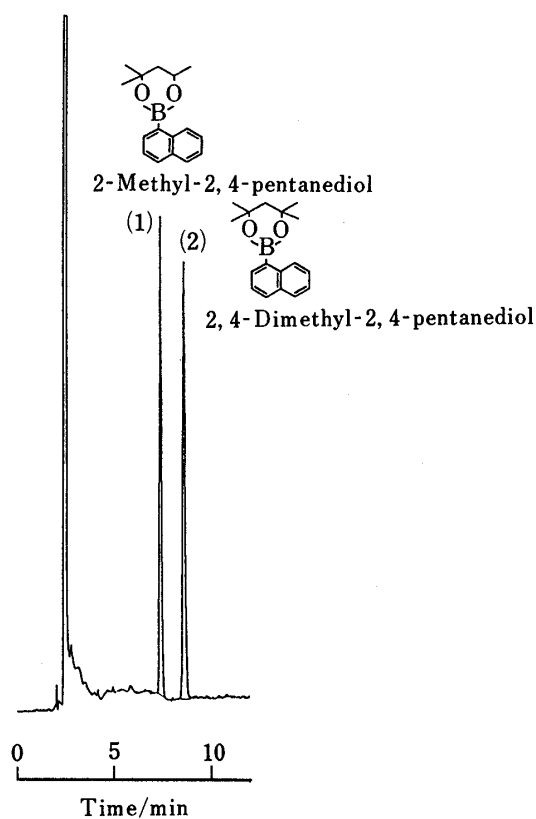


Fig. 3 Chromatogram of naphthaleneboronates of 2-methyl-2,4-pentandiol (1) and 2,4-dimethyl-2,4-pentandiol (2)

HPLC conditions: column, Capcell Pak C18 UG120 (2.0 mm i.d. $\times$ 250 mm L); mobile phase, acetonitrile/20 mM phosphate buffer (pH 4.5) (8 : 2); flow rate, 0.2 ml/min; column temperature, 40°C; detection, 280 nm

違いが巧みに認識されていることが判明した。又その際、誘導体化試薬としてのボロン酸誘導体において、反応性の差は観察されなかった。

3・1・2 ステロイド側鎖のボロネート形成と逆相 HPLC

ボロネート形成と逆相 HPLC との関連において、非常に興味ある結果がステロイド化合物において観察された。Fig. 6 に示したように、テトラオール体は、骨格部と側鎖部にシスジオール構造を有しているが、この際ボロネートは、A 環部の 2,3-(OH)₂ と側鎖部の 22,23-(OH)₂ の両部位にいったん形成される（ビスボロネート）が、逆相系 HPLC 分析に供されると、A 環部のボロネートのみが容易に加水分解を受けて、側鎖部由来のボロネート（モノボロネート）として検出されることが判明した。安定ボロネートを形成するのは、側鎖部の 22,23-ジオール基であり、クロマトグラム上のピークはモノボロネートとして検出されている。この結果は、後述するブラシノステロイド類において観察された結果と一致する。更に 23,25- 及び 24,25-ジヒドロキシコレステロールのボロネート形成反応においては、いずれも定量的にボロネートを生成し、Fig. 7 に示したように、23 及び 24 位のエピマーを容易に分離することに成功した。この分離化学的結果は、ビタミン D₃ の側鎖部水酸化反応において注目されてきた、立体選択性の解明に役立つものと考えられる。すなわち、血液や組織中の微量ビタミン D₃ 代謝成分の選択的検出法として本法が極めて有効な方法として利用できると考え

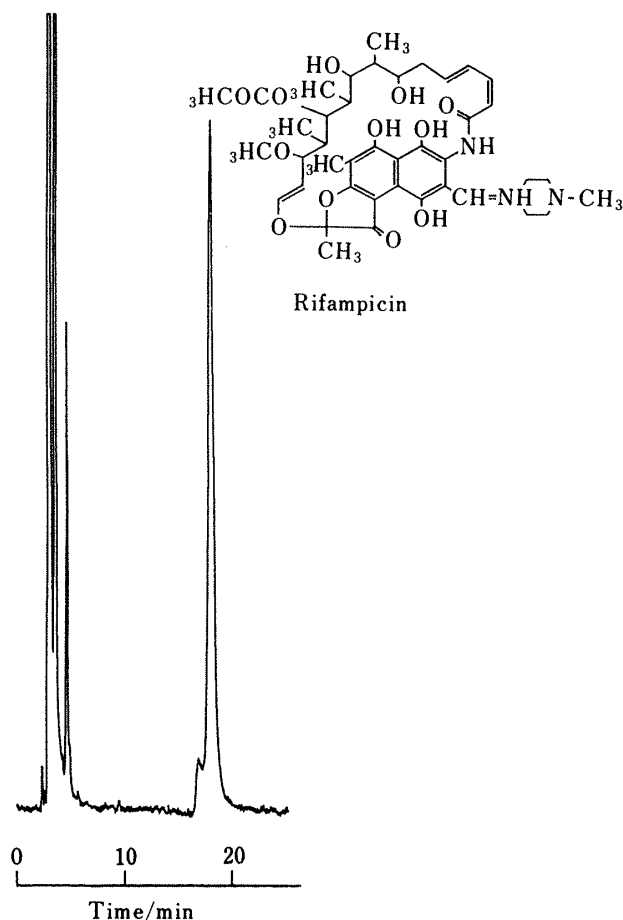


Fig. 4 Chromatogram of naphthaleneboronate of rifampicin

HPLC conditions: column, Capcell Pak C18 UG120 (1.5 mm i.d. × 250 mm L); mobile phase, acetonitrile/20 mM phosphate buffer (pH 4.5) (6 : 4); flow rate, 0.1 ml/min; column temperature, 40°C; detection, 280 nm

られる。同様の結果が、A 環部に 2,3-(OH)₂、側鎖部に 20,22-(OH)₂ を有するエクジステロイド類でも観察され、エクジステロンの場合においても側鎖部の 20,22-モノボロネートとして検出された⁷⁾。このようにステロイド側鎖においては 20,22-(OH)₂、22,23-(OH)₂、24,25-(OH)₂、及び 23,25-(OH)₂ のジオール構造に対して、いずれも極めて安定なボロネートが形成され、メタノールやアセトニトリル等を含む酸性溶液中でも加水分解を受けないことが明らかとなった。

3・1・3 ブラシノステロイドのボロネートと逆相 HPLC 上述の知見を基に、検出器に高感度な応答を示す各種蛍光団や電気化学活性基を配した、種々のボロン酸誘導体を用いるブラシノステロイド類の微量定量法を開発した。植物成長促進物質として知られるブラシノ

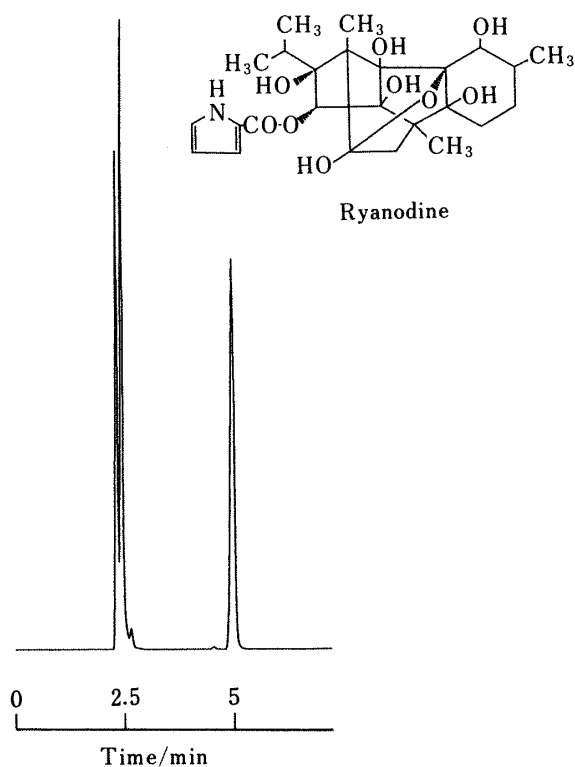


Fig. 5 Chromatogram of naphthaleneboronate of ryanodine

HPLC conditions: column, Capcell Pak C18 UG120 (2.0 mm i.d. × 250 mm L); mobile phase, acetonitrile/20 mM phosphate buffer (pH 4.5) (7 : 3); flow rate, 0.2 ml/min; column temperature, 40°C; detection, 280 nm

ステロイド類の分析においては、様々な観点から微量生理活性物質の基本的かつ典型的な分析手法が求められている。すなわち、植物体中の含有量が極めて少ないために、高感度分析が要求されるばかりではなく、種々の同族体が存在することから、それらを選択的に分離しなければならず、極めて高度な分析法の開発が望まれてきた。ブラシノライド⁸⁾及びカステステロン⁹⁾の発見以来、ブラシノステロイド類の単離・構造決定、及び植物界における分布調査が、主に日本の科学者によって精力的に行われている。その多様性と植物界における分布が解明されつつある今日、植物の成長現象と内生ブラシノステロイド類との量的質的關係に関する研究が重要なテーマとなっている。ブラシノステロイド類の微量分析法の開発は、これまで Takatsuto らによるメタンボロネート-TMS 誘導体による GC/MS 法¹⁰⁾¹¹⁾が報告されており、一応の確立を見たが分析試料の精製純度を上げなければならず、検出感度の向上とともにいまだ問題点が残されている。一方、より簡便かつ高感度分析が期待される

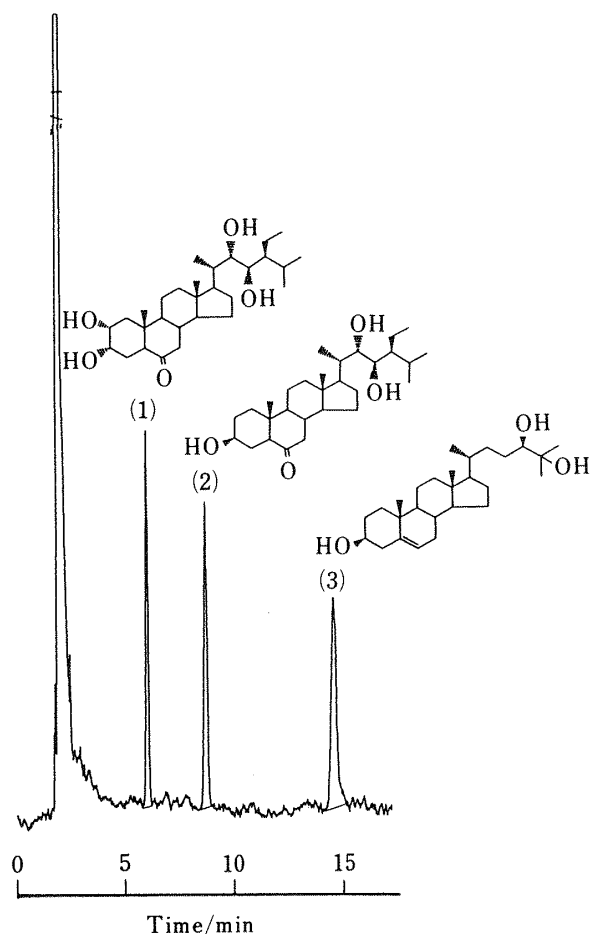


Fig. 6 Chromatogram of naphthaleneboronates of 2,3,22S,23S-tetrahydroxy-24S-ethylcholestan-6-one(1), 3,22S,23S-trihydroxy-24S-ethylcholestan-6-one(2), and 24R,25-dihydroxycholesterol(3)

HPLC conditions: column, Capcell Pak C18 UG120 (2.0 mm i.d.×250 mm L); mobile phase, acetonitrile/water (95 : 5); flow rate, 0.25 ml/min; column temperature, 40°C; detection, 280 nm

HPLC 分析法については、ブラシノステロイド類の植物体からの分離・精製過程に用いられ、その有用性は実証されてはいるが¹²⁾、ブラシノステロイド自身適当なクロモフォアがないことから、微量分析に用いられるには至っていなかった。従って、HPLC による微量分析を達成するためには、検出の高選択性と高感度化、及び分離の高選択性と高性能化が要求される。その要求にこたえたのが本ボロネート形成反応であり、これによって側鎖部由来のモノボロネートとして、いずれも ODS-カラムと水-アセトニトリル移動相を用いる逆相分配モードによる分離・検出を初めて可能にした^{13)~21)}。分析例は既に総説²²⁾²³⁾などでも報告してあるので、ここでは前述したように、この種のステロイド化合物において、

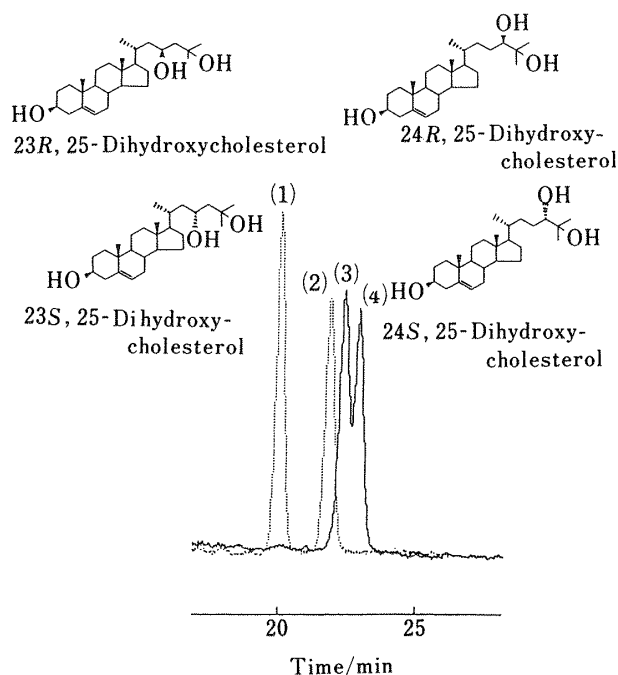


Fig. 7 Chromatogram of naphthaleneboronates of 23R,25-dihydroxycholesterol(1), 23S,25-dihydroxycholesterol(2), 24R,25-dihydroxycholesterol(3) and 24S,25-dihydroxycholesterol(4)

HPLC conditions: column, Capcell Pak C18 UG120 (2.0 mm i.d.×250 mm L); mobile phase, acetonitrile/water (9 : 1); flow rate, 0.25 ml/min; column temperature, 40°C; detection, 280 nm

A 環部の 2,3-(OH)₂ と側鎖部の 22,23-(OH)₂ の両部位にいったん形成されるビスボロネートと、逆相系 HPLC 分析に供された後、A 環部のボロネートのみが容易に加水分解を受けて、側鎖部由来のモノボロネートとして検出されることを、GC/MS と LC/MS の分析結果から確認したい。Brassinolide にナフタレンボロン酸を作用させて得られる反応液を、一方は GC/MS (EI 法) で、もう一方は LC/MS (大気イオン化法) で分析した。それぞれ Fig. 8 及び Fig. 9 に質量スペクトルの結果を示したが、GC/MS 法ではビスボロネートとして分子ピーク (M^+ 752) を得ることができるのに対して、LC/MS 法では側鎖部由来のモノボロネートとして分子ピーク (MH^+ 617.4) が得られている。同じ二級-二級のアルコールにもかかわらず、ステロイド側鎖上でのボロネート安定性の強さは、極めて特異的と言わざるを得ない。更に、この種のステロイド化合物において生物化学的に重要なことは、側鎖上で酸素官能基を持たないエピマーの存在であり、生合成の研究上、その存在的意義には極めて興味深いものがある。これは又、分離化学的

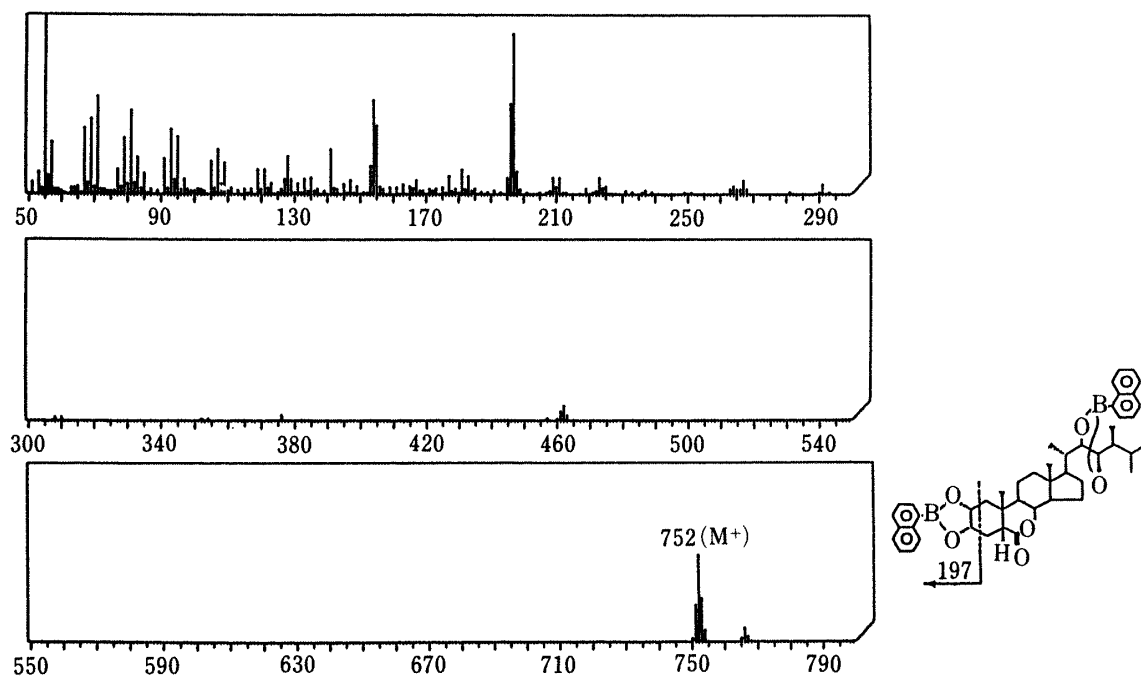


Fig. 8 Gas chromatographic mass spectrum of bis-naphthalene-boronate of brassinolide

Electron impact spectrum was at 70 eV.

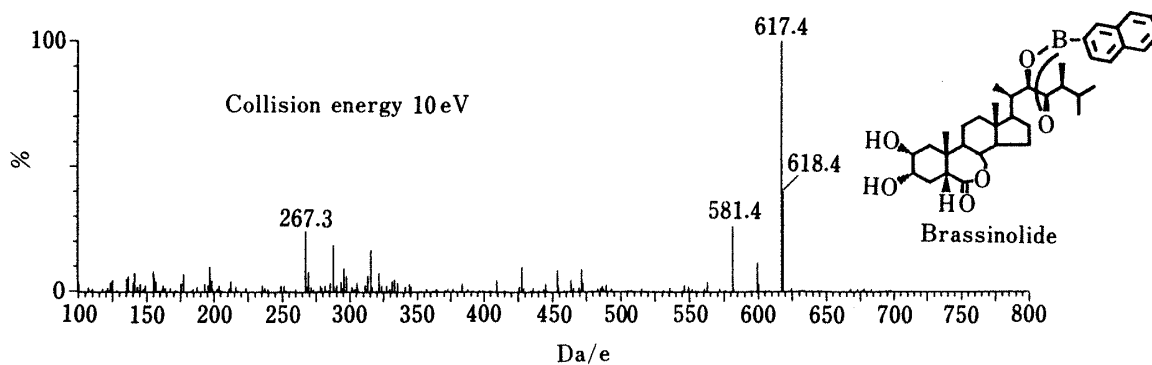


Fig. 9 Liquid chromatographic mass spectrum of mono-naphthalene-boronate of brassinolide

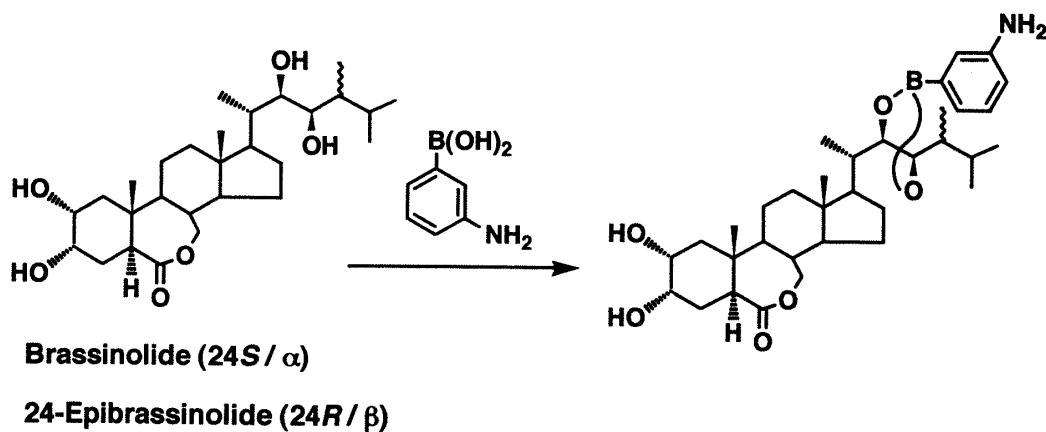


Fig. 10 Formation of *m*-aminophenylboronates of brassinolide and 24-epibrassinolide

にも興味のある問題でもあり、アルキル基由来のエピマーのクロマトグラフ的分離は今日でもたいへん難しい課題であるとされている。Brassinolide には、24 位の立体配置の逆転した epibrassinolide が存在するが、本ボロネート形成反応を利用することによって、その相互分離に成功した²⁴⁾。すなわち、Fig. 10 に示したように、ブラシノステロイドを *m*-アミノフェニルボロネートに誘導し、導入されたアミノ基を手がかりに、ODS-カラムと、クラウンエーテルを含む酢酸-アセトニトリル系の移動相を用いることによって、brassinolide と epibrassinolide、及び castasterone と epicasterone を、それぞれ分離係数 1.07 及び 1.08、分離度 1.18 及び 1.48 をもって分離することができた。HPLC によるエピマーの分離としては初めての分析例として注目されている。又、本 *m*-アミノフェニルボロネートの検出にあたっては、アミノ基との発蛍光反応を利用したポストラベル法によって、蛍光検出する方法を用いており、十分高感度分析が可能である。

3・2 光学活性ボロン酸誘導体を用いるジオール対掌体の光学分割法

光学分割を目的としたキラル誘導体化法は、ジアステレオマーを形成することでアキラルな固定相上での分離を容易にする方法として古くから知られているが、ここでは、エナンチオメリックジオールを対象とした、光学活性ボロン酸の光学分割への有用性を明らかにした。

Fig. 11 には光学活性ボロン酸の例として、*p*-ボロノフェニルアラニン⁴⁾と、*N,N*-ジメチルアミノメチルフェロセンボロン酸²⁵⁾を示した。このうち、*N,N*-ジメチルアミノメチルフェロセンボロン酸を用いて、(±)-pinanediol (ピナンジオール)に対する光学分割能を検討したところ、生成するジアステレオメリックボロネートは、GC のアキラルなカラム上で容易に分離できることが初めて明らかになった (Fig. 12)²⁶⁾。光学活性ボロン酸の光学分割への応用としては初めての例であり、極めて興味深い結果であるが、逆相 HPLC での分析では光学分割は達成されておらず、現在も更に検討中である。

そもそも *N,N*-ジメチルアミノメチルフェロセンボロン酸を用いた理由は、ジメチルアミノ基の寄与によるボロン酸の安定化、ひいてはボロネートの安定性の向上を期待したわけであったが、逆相 HPLC の結果からは、ボロネートの安定性、すなわち加水分解に対する抵抗性は観察されなかった。又、対応するフェロセンボロネートとの比較においては、ジメチルアミノ基の存在によって大きく親水性が増すために、疎水性の大きなジオール

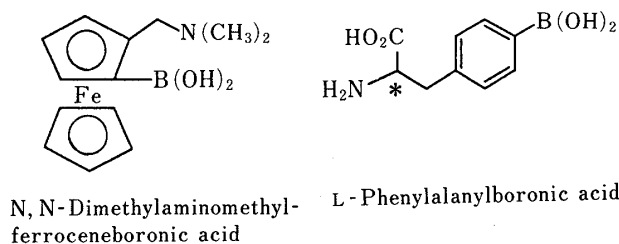


Fig. 11 Chemical structures of chiral boronic derivatives.

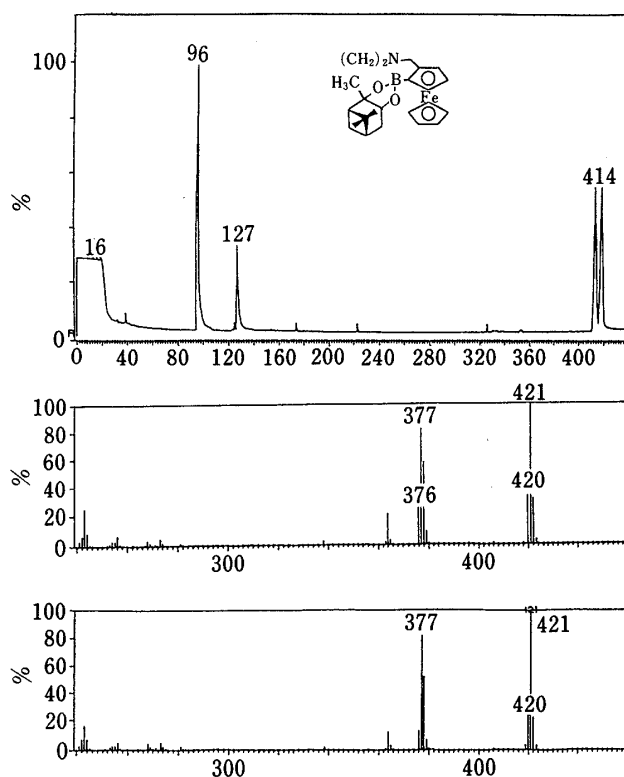


Fig. 12 Gas chromatographic resolution and mass spectrometric (electron impact, 70 eV) data of diastereomeric 2-(*N,N*-dimethylaminomethyl)ferroceneboronates of (±)-pinane-2,3-diol

GC conditions: column, CP Sil5 CB fused silica capillary (25 m×0.32 mm i.d.×0.12 μm); column temperature, programmed from 80°C (2 min) to 200°C (1 min) at 30°C/min, and then at 2°C/min to 230°C; helium flow rate, 3 ml/min

化合物に対するボロネートとしては有効であった。

3・3 分子軌道法を用いるボロネートの安定性と分子構造との相関解明

ボロン酸誘導体をプレラベル化剤として用いる 1,2-ジ

オール類の微量分析において、生成するサイクリックボロネートを、逆相分配 HPLC 法によって分析できることを報告してきたが、それらボロネートの被加水分解性、あるいはボロネート環の立体化学的安定性等、化学構造との関係については、いまだ明確な説明がなされていない。ここでは、構造の簡単なジオール化合物を対象として、形成するボロネートの安定性（非加水分解性）に寄与する要因、すなわち安定ボロネートの形成と分子構造との関係を考察すべく、分子軌道法を用いたボロネート分子の構造解析を行った。

Table 1 に示す 15 種のジオール化合物を対象として、各々のベンゼンボロネートに対して、分子軌道法には MOPAC ver 6.01, AM1 法²⁷⁾を、構造最適化には EF 法²⁸⁾を、局在化分子軌道の計算には Perkins²⁹⁾の方法をそれぞれ条件として計算を行った。その際、構造最適化後、C-C、O-C 及び B-O などの原子間距離、及び結合次数、C、O 及び B の電荷、分子軌道 (NHOMO, HOMO, LUMO, NLUMO) の各エネルギー、あるいは O-B-O のなす角度等を求めて比較した。ブラシノステロイドを例に、側鎖部 22,23-(OH)₂ のベンゼンボロネートの最適化構造を Fig. 13 に示した。

その結果、種々のパラメーターにおいて安定ボロネートと非安定ボロネートとの間に若干の差が観察されたが、その中でも、ジオールを形成する炭素-炭素間の結合距離において顕著な有意差を観察することができた。例えば、ステロイドの A 環部 2,3-(OH)₂ のボロネート形成においては、かなりゆがみがかかっているように考えられるが、C2-C3 間の炭素-炭素間の結合距離は比較

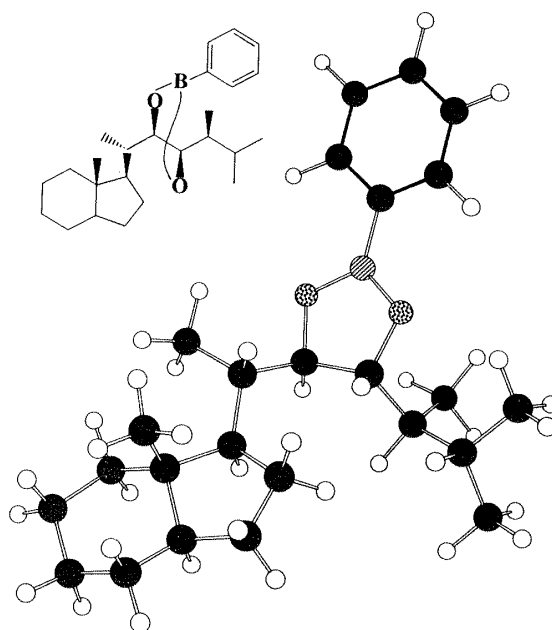


Fig. 13 Optimized structure of the benzeneboronate of brassinolide side chain 22,23-diol

的短く、一方フリーローテーションの容易と思われる側鎖ボロネートでは、C22-C23 間の炭素-炭素間の結合距離が長いことが明らかとなった。15 種のジオール化合物についてまとめた結果を Table 1 に示した。

この表から明らかなように、octane-*cis*-4,5-diol の C-C 結合距離 1.548 Å を基準として、ボロネートの安定性との間に相関が観察された。すなわち、これ以上結

Table 1 C-C Bond distances of 1,2-diol benzeneboronates and the balances from the C-C bond distance of *cis*-4,5-octanediol benzeneboronate

1,2-diol compound	Type of alcohol	C-C bond distance/Å	balances/Å	stability
Acenaphthene- <i>cis</i> -1,2-diol	<i>sec.</i> + <i>sec.</i>	1.587	+0.039	stable
22-Epiecdysterone	<i>tert.</i> + <i>sec.</i>	1.568	+0.020	stable
Ecdysterone	<i>tert.</i> + <i>sec.</i>	1.565	+0.017	stable
Pinacol	<i>tert.</i> + <i>tert.</i>	1.564	+0.016	stable
2-Methylbutane-2,3-diol	<i>tert.</i> + <i>sec.</i>	1.555	+0.007	stable
Brassinolide, 22,23-diol	<i>sec.</i> + <i>sec.</i>	1.550	+0.002	stable
Octane- <i>cis</i> -4,5-diol	<i>sec.</i> + <i>sec.</i>	1.548	0.00	unstable
Octane- <i>trans</i> -4,5-diol	<i>sec.</i> + <i>sec.</i>	1.547	-0.001	unstable
Tetrahydroanthracene- <i>cis</i> -1,2-diol	<i>sec.</i> + <i>sec.</i>	1.547	-0.001	unstable
Butane- <i>cis</i> -2,3-diol	<i>sec.</i> + <i>sec.</i>	1.547	-0.001	unstable
Tetrahydroanthracene- <i>trans</i> -1,2-diol	<i>sec.</i> + <i>sec.</i>	1.546	-0.002	unstable
Butane- <i>trans</i> -2,3-diol	<i>sec.</i> + <i>sec.</i>	1.546	-0.002	unstable
Brassinolide, 2,3-diol	<i>sec.</i> + <i>sec.</i>	1.545	-0.003	unstable
Propane-1,2-diol	<i>sec.</i> + <i>prim.</i>	1.540	-0.008	unstable
Ethylene glycol	<i>prim.</i> + <i>prim.</i>	1.533	-0.015	unstable

合距離の長いジオールは安定ボロネートの生成を可能にし、これ以下のジオールでは、安定ボロネートの生成が極めて困難であることを示している。この結果は、ボロネート分子の分子軌道法に基づく C-C 結合距離の計算結果から、非加水分解性安定ボロネートの形成を予測し得ることを可能としたばかりでなく、サイクリックボロネート形成が、ジオール周辺の分子環境を反映した構造認識能の極めて高い反応であることを理論的に裏づけたものであると考えられる。

3・4 ボロン酸固定化ゲルを用いるジオール系化合物の高選択的抽出法の開発

続いて本ボロネート形成反応を、ボロン酸固定化ゲルを用いるブラシノステロイドの高選択的抽出法の開発に応用した³⁰⁾。すなわち、安定ボロネートを形成するジオール類を対象として、フェニルボロン酸固定化ゲルを用いる一連の固相抽出法を検討した結果、ブラシノステロイドの植物組織からの抽出適用を初めて可能にした。

通常、固相抽出の際には、固定化ゲルの充てんされたカートリッジカラム等を用いて行われるが、本反応、すなわち固定化ゲルへの結合の際には加熱を要するため、その方式を使うことができない。従ってこの場合にはゲルを粉末のままひょう量して用いることになる。

まず、被測定物質としてのブラシノステロイドを含む試料をアセトニトリル/ピリジン溶液で溶解し、ここにフェニルボロン酸固定化ゲルを加えた後、5～10 分程度加熱する。反応終了後、小容積のカートリッジを用いて反応物を減圧下で濾過する。ついで酸性緩衝液、メタノール水溶液等でゲルを洗浄し、被結合性の不純物を除去する。次に、ゲルに結合したブラシノステロイドをリリースさせるため適当な溶媒系で流してやればよいが、比較的強度な結合のために、溶媒系の選択に難儀した。

すなわち、リン酸、塩酸、酢酸、乳酸等の酸と、アルコール、アセトニトリル、テトラヒドロフラン等の有機溶媒との組み合わせ、及び濃度比などを種々検討したところ、いずれも回収率が 50～80% 程度でしか得られなかった。更に検討の結果、過酸化水素水-アセトニトリル混合溶液を用いた場合に、最も回収率の高い結果が得られた。以上、ボロン酸固定化ゲルを用いるブラシノステロイドの固相抽出法における最適条件は、ゲルへの結合条件として 80℃ 10 分、ゲルからの回収条件として 5% 過酸化水素水-アセトニトリル (1:1) を用いて 45℃ 10 分であった。なお、この一連の固相抽出における基質の結合率、及び回収率は、いずれのジオールについても 95% 以上であった。

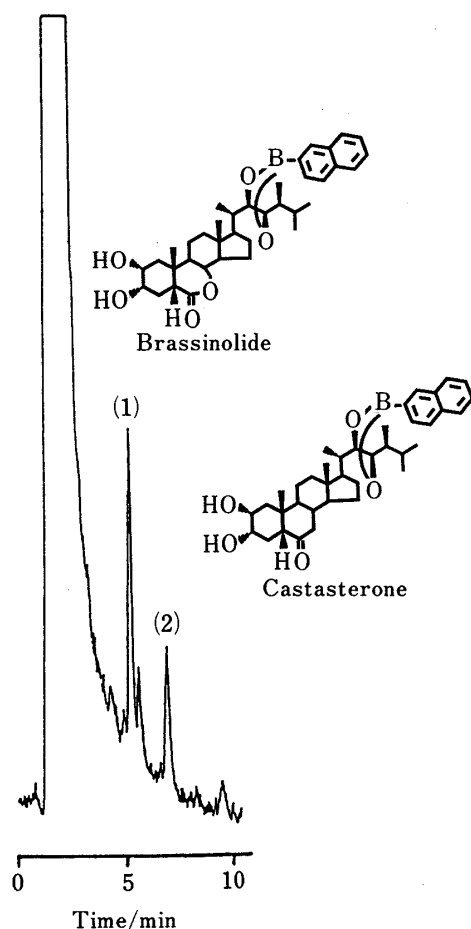


Fig. 14 Chromatogram of the final eluent fraction of plant extract obtained from the phenylboronic acid gel after derivatization with naphthaleneboronic acid

Peaks: (1) brassinolide, (2) castasterone. HPLC conditions: column, Capcell Pak C18 UG 120 (1.5 mm i.d.×250 mm L); mobile phase, acetonitrile/water (9:1); flow rate, 0.16 ml/min; column temperature, 45°C; detection, 280 nm

本固定化ゲルを用いる前処理法は、安定ボロネートを形成するジオール系化合物に対して極めて高い選択性を有するが故に、きょう雑成分の多い複雑なサンプルの前処理に極めて有効であった。本法を、ソラマメの花粉からのブラシノステロイド活性画分の選択的抽出に応用した結果、Fig. 14 に示したように、22,23-(OH)₂ を有するブラシノステロイドをほぼ定量的に回収できることを初めて可能にした。

4 結 言

逆相系 HPLC 法による分離・検出は、同時に水溶液中での安定化学種の検出を可能にするものであり、安定ボロネートの形成は選択性と感度の点において、極めて優れた誘導体化法の一つであると言える。又、現在開発が進んでいる LC/MS への適用も十分期待される。このことから、例えば未知物質の構造解析において、ボロネート形成に基づく誘導体化法を用いれば、高い選択性を持って 1,2-あるいは 1,3-ジオール構造に関する部分構造の認識が可能になるものと思われる。

以上本研究は、ボロン酸の持つ特異的な反応様式に注目したものであり、非加水分解性安定化学種としてのサイクリックボロネートの存在と逆相系 HPLC への応用、及びボロネート形成における高い分子認識能と固相リガンドとしての有用性を利用した、ブラシノステロイドの定量法を確立した点で、微量分析化学と天然物化学への貢献を果たしたものと考えられる。

終わりに、本研究を推進していく上でご協力、ご指導賜りました上越教育大学高津戸 秀助教授、東京工業大学理学部原 典行助手、新潟薬科大学池川信夫学長、及び Glasgow 大学 C. J. W. Brooks 教授に深謝致します。

文 献

- 1) T. D. James, K. R. A. S. Sandanayake, S. Shinkai: *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1994**, 477.
- 2) K. R. A. S. Sandanayake, S. Shinkai: *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1994**, 1083.
- 3) T. D. James, K. R. A. S. Sandanayake, S. Shinkai: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **33**, 2207 (1994).
- 4) Y. Mori, A. Suzuki, K. Yoshino, H. Kakihana: *Pigment Cell Res.*, **2**, 273 (1989).
- 5) Y. Yamamoto, T. Seko, F.-G. Rong, H. Nemoto: *Tetrahedron Lett.*, **30**, 7191 (1989).
- 6) Y. Yamamoto, T. Seko, H. Nemoto: *J. Org. Chem.*, **54**, 4734 (1989).
- 7) K. Gamoh, C. J. W. Brooks: *Anal. Sci.*, **9**, 549 (1993).
- 8) M. D. Grove, G. F. Spencer, W. K. Rohwedder, N. Mandava, J. F. Worley, J. D. Warthen, Jr., G. L. Steffens, J. L. Flippen-Anderson, J. C. Cook, Jr.: *Nature* (London), **281**, 216 (1979).
- 9) T. Yokota, M. Arima, N. Takahashi: *Tetrahedron Lett.*, **23**, 1275 (1982).
- 10) S. Takatsuto, B. Ying, M. Morisaki, N. Ikekawa: *J. Chromatogr.*, **239**, 233 (1982).
- 11) N. Ikekawa, S. Takatsuto, T. Kitsuwu, H. Saito, T. Morishita, H. Abe: *J. Chromatogr.*, **290**, 289 (1984).
- 12) T. Yokota, J. Baba, S. Koba, N. Takahashi: *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 2529 (1984).
- 13) K. Gamoh, T. Kitsuwu, S. Takatsuto, Y. Fujimoto, N. Ikekawa: *Anal. Sci.*, **4**, 533 (1988).
- 14) K. Gamoh, K. Omote, N. Okamoto, S. Takatsuto: *J. Chromatogr.*, **469**, 424 (1989).
- 15) K. Gamoh, S. Takatsuto: *Anal. Chim. Acta*, **222**, 201 (1989).
- 16) S. Takatsuto, T. Yokota, K. Omote, K. Gamoh, N. Takahashi: *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 2177 (1989).
- 17) K. Gamoh, N. Okamoto, S. Takatsuto, I. Tejima: *Anal. Chim. Acta*, **228**, 101 (1990).
- 18) S. Takatsuto, K. Omote, K. Gamoh: *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 757 (1990).
- 19) S. Takatsuto, H. Abe, K. Gamoh: *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 1057 (1990).
- 20) K. Gamoh, S. Takatsuto, M. Watabe, H. Arimoto, H. Sawamoto: *J. Chromatogr.*, **515**, 227 (1990).
- 21) C. Motegi, S. Takatsuto, K. Gamoh: *J. Chromatogr. A*, **658**, 27 (1994).
- 22) 高津戸 秀, 蒲生啓司: 植物の化学調節, **25**, 114 (1991).
- 23) K. Gamoh, S. Takatsuto: *J. Chromatogr. A*, **658**, 17 (1994).
- 24) K. Gamoh, S. Takatsuto, N. Ikekawa: *Anal. Chim. Acta*, **256**, 319 (1992).
- 25) G. Marr, R. E. Moore, B. W. Rockett: *J. Chem. Soc.*, (C), 24 (1968).
- 26) K. Gamoh, K. A. Ketuly, W. J. Cole, C. J. W. Brooks, R. A. Anderson: *Anal. Sci.*, **10**, 705 (1994).
- 27) M. J. S. Dewar, E. G. Zebisch, E. F. Healy, J. J. P. Stewart: *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 3902 (1985).
- 28) J. Baker: *J. Comp. Chem.*, **7**, 385 (1986).
- 29) P. G. Perkins, J. J. P. Stewart: *J. Chem. Soc., Faraday Trans. II*, **77**, 875 (1981).
- 30) K. Gamoh, I. Yamaguchi, S. Takatsuto: *Anal. Sci.*, **10**, 913 (1994).

要 旨

本論文では、その容易な被加水分解性のために、誘導体化法としてこれまでほとんど取り上げられてこなかったサイクリックボロネートに着目した、主として HPLC 法による高選択的高感度分析法の提言について記述した。すなわち、水系において安定に存在する非加水分解性ボロネートの分離・検出法を見いだしたことにより、取り分けジオール構造を有する化合物の、迅速かつ高感度検出の可能な新しい分離・分析法を確立するに至った。ここでは 1) 新規ボロン酸誘導体を用いるジオール系化合物の逆相系 HPLC による高選択的高感度検出法、2) 光学活性ボロン酸誘導体を用いるジオール対掌体の光学分割法、3) ボロン酸固定化ゲルを用いるブラシノステロイド類の高選択的抽出法、4) 分子軌道法に基づく分子構造とボロネートの安定性との相関に関する定量的扱い、について未発表データを含めて記述した。