

博士論文要録

アセチルカルニチン関連化合物の光学識別法の開発及び
品質管理への応用に関する研究

香川 美由紀

学位授与：武庫川女子大学（2006年3月19日）

本論文は、脳代謝改善薬として欧州で市販され、日本でも開発継続中である光学活性医薬品アセチル-L-カルニチン (L-AC) の光学識別法の開発及びその品質管理への応用についてまとめたものである。L-AC 中には、その光学異性体で薬理活性を持たないアセチル-D-カルニチン (D-AC) が混入する可能性があるため、その含量を規制・評価する必要がある。これまでも幾つかの手法が報告されているが、既報の高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は、いずれも操作性、再現性、検出限界等の面で品質管理法として適用するには不十分であった。また、核磁気共鳴法 (NMR) もキラルシフト試薬の種類や濃度の影響については詳細に検討されておらず、品質管理法として不十分であった。

そこで、本研究では実用的な L-AC の品質管理法の開発を目的とし、HPLC によるアセチルカルニチン (AC) とその加水分解物であるカルニチン (C) の光学識別法、及び NMR による AC とその関連化合物の光学識別法について詳細に検討した。更に、開発した方法を L-AC の品質管理のための光学純度測定に適用し、その有用性を実証した。

“序論”では、L-AC の光学識別法の開発を行う背景や意義を概説した。以下に本論文の構成を示す。

第1章 “液体クロマトグラフ法によるアセチルカルニチンの光学識別及び光学純度測定への応用”では、AC と C をキラル誘導体化法とキラル固定相法により HPLC で分離定量する方法を開発し、L-AC の品質管理のための光学純度測定へ適用した。

第1節では、AC と C を光学活性なアミノ化合物を用いて誘導体 (ジアステレオマー) とし、ODS (octadecyl silica) カラムを用いた逆相 HPLC により分離する方法について述べた。誘導体化に用いる試薬は、254 nm で検出可能で、比較的大きな分離係数 (α) を与えた L-アラニン- β -ナフチルアミド (L-Ala- β -NA) を選択した。誘導体化反応に用いる L-Ala- β -NA、クロロギ酸エチル、トリエチルアミンの濃度は、AC 1 mmol/L に対し、AC 誘導体の生成量が最大となった 20, 20, 50 mmol/L とした。反応時間は、誘導体の生成量が一定となった 10 分とした。HPLC 移動相として、50 mmol/L リン酸塩緩衝液 (pH 2.5)/アセトニトリル/テトラヒドロフラン混液 (85:9:6) を用いることに

より、DL-AC と不純物である DL-C の4種の誘導体を25分以内に一斉に分析することができた。また、50 mmol/L リン酸塩緩衝液 (pH 2.5)/アセトニトリル混液 (77:23) を用いると、DL-C 誘導体は分離しないものの、DL-AC 誘導体を10分以内に迅速に分離することができた [分離度 (R_s) = 1.94]。設定した試験法における特異性、直線性、真度及び精度はいずれも良好で、D-AC の検出限界は 0.05% と、品質管理法として実用に耐え得るものであった。

第2節では、市販のキラルカラムを用いた逆相 HPLC により、DL-AC を誘導体化することなく直接分離する方法について述べた。様々な市販キラルカラムを検討した結果、(*R,R*)-tartaric acid mono-L-valine-(*S*)-1-(α -naphthyl)ethylamide を固定相とする配位子交換型カラム SUMICHIRAL OA-6100 において、硫酸銅溶液にカオトロピック塩を添加した移動相を用いることにより、DL-AC を直接分離できることを見いだした。移動相に添加する塩は、大きな α 及び R_s を与えた過塩素酸ナトリウムを選択した。HPLC 条件は、移動相、0.5 mol/L 過塩素酸ナトリウムを含む 2 mmol/L 硫酸銅溶液; カラム, SUMICHIRAL OA-6100 (内径 4.6 mm $\times$ 長さ 150 mm $\times$ 2 本); 流量, 0.7 mL/min; 検出波長, 254 nm; 注入量, 5 μ L とした。この条件における R_s は 2.23 であった。設定した試験法は極めて簡便であり、特異性及び直線性ともに良好で、D-AC の定量限界は 0.15%, 検出限界は 0.1% であった。

第3節では、開発した光学識別法の L-AC 光学純度測定への適用について述べた。いずれも、L-AC の品質管理のための光学純度測定に応用可能であることが分かった。

第2章 “核磁気共鳴スペクトル法による光学識別及び光学純度測定への応用”では、アミノ化合物に対して高い光学識別能を持つ (+)-(*R*)-18-クラウン-6-テトラカルボン酸 (18C6H₄) をキラルシフト試薬とした NMR によるアミノ化合物の光学純度測定法とランタノイド誘導体をキラルシフト試薬とした NMR による AC の光学識別法を開発し、L-AC の品質管理のための光学純度測定へ適用した。

第1節では、18C6H₄ の特性 (アミノ化合物に対する光学識別能に及ぼす 18C6H₄ の添加濃度及び重水素化溶媒の影響) と 18C6H₄ を用いた NMR による光学純度測定法の設定の可能性について述べた。化学シフト変化 ($\Delta\delta$) が一定となる 18C6H₄ の濃度は測定対象物の5倍量であり、また、 $\Delta\delta$ の差 ($\Delta\Delta\delta$) が最も大きくなる重水素化溶媒は

測定対象物によって異なり、選択する重水素化溶媒が光学異性体のシグナル分離に重要であることを見いだした。18C6H₄のアミノ化合物に対する光学識別能を検討した結果、以下の知見が得られた。1) アミノ酸のD体のシグナルはL体のシグナルより低磁場側へシフトする特徴があり、アミノ酸部位を持つ化合物の絶対配置の決定に応用可能であると考えられた。また、アミノ基付近に同じ構造部位のあるアミノ酸は $\Delta\Delta\delta$ が同じであり、 $\Delta\Delta\delta$ はアミノ基付近の構造に影響を受けていることが示唆された。2) アルキルアミンに対する18C6H₄の光学識別能は低かった。3) アミノアルコールに対する光学識別は、芳香環を持たない場合は不十分であったが、芳香環を持つ場合は比較的良好であった。4) 芳香環を持つアミノ化合物であるバクロフェン、1-(1-ナフチル)エチルアミン及びAla- β -NAのアミノ基に隣接したプロトンにおいても大きな $\Delta\delta$ が得られた。以上の結果を踏まえて設定したL-Ala- β -NAの光学純度測定法は、直線性が良好で、D-Ala- β -NAの検出限界は1.0%であった。

第2節では、キラルシフト試薬としてランタノイド試薬及びサマリウム試薬を用いたNMRによるACの光学識別法について詳細に検討した結果を述べた。ランタノイド試薬の添加によってDL-ACのN-CH₃基のシグナルが顕著に分離したことから、ACのシフト変化の検討や光学純度測定にはN-CH₃基が有用であることが分かった。N-CH₃基のシグナルは、ランタノイド試薬のランタノイド部位及びカンファー部位の違いにより、異なるシフト変化の傾向が認められた。いずれも、他のシグナル（特にL体のN-

CH₃基のシグナル）の影響を受けずに、測定対象であるD体のN-CH₃基のシグナルを評価することが可能であった。D体のN-CH₃基のシグナル変化を精査した結果、D体を定量的に測定するには、AC 2 mmol/Lに対し、ランタノイド試薬の一つであるPr[hfc]₃を5倍量（10 mmol/L）用いる条件が最適であった。また、サマリウム試薬の添加によってもDL-ACのN-CH₃基のシグナルは分離し、いずれも低磁場シフトした。D体のN-CH₃基のシグナルはL体より大きくシフトし、 $\Delta\delta$ 及び $\Delta\Delta\delta$ はサマリウム試薬の濃度の増加に伴って増加した。設定したキラルシフト試薬Pr[hfc]₃を用いたL-ACの光学純度測定法は直線性が良好で、D-ACの検出限界は0.5%であった。

第3節では、開発した光学識別法のL-Ala- β -NA及びL-AC光学純度測定への適用について述べた。いずれも、L-AC及びその関連化合物の品質管理のための光学純度測定に応用可能であった。

“総括”では、本研究を総括し、開発したHPLC及びNMRによるL-ACの光学識別法が品質管理のための光学純度測定法として有用であることを述べた。

公表論文

- 1) M. Kagawa, Y. Machida, H. Nishi: *J. Chromatogr. A*, **857**, 127 (1999).
- 2) Y. Machida, M. Kagawa, H. Nishi: *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **30**, 1929 (2003).
- 3) M. Kagawa, Y. Machida, H. Nishi, J. Haginaka: *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **38**, 918 (2005).
- 4) M. Kagawa, Y. Machida, H. Nishi, J. Haginaka: *Chromatographia*, **62**, 239 (2005).

☆

Digest of Doctoral Dissertation

Development of Enantiomeric Purity Determination Method for Acetylcarnitine and Related Compounds and Its Application to the Quality Control

Miyuki KAGAWA

Analytical Chemistry Department, CMC Research Laboratories, Tanabe Seiyaku Co., Ltd.,
3-16-89, Kashima, Yodogawa-ku, Osaka-shi, Osaka 532-8505
(Awarded by Mukogawa Woman's University dated March 19, 2006)

Acetyl-L-carnitine (L-AC) has an effect of cerebral metabolism improvement. However, the enantiomer, acetyl-D-carnitine (D-AC), does not show this effect. Several methods for the determination of D-AC in L-AC have been developed, but they were not sufficient for quality control. The author has developed an indirect HPLC enantioseparation method and a direct one for the determination of D-AC in L-AC and NMR enantioseparation methods with chiral shift reagents. 1) AC and C could be separated with an ODS column by reversed-phase HPLC after derivatization with L-alanine- β -naphthylamide. 2) AC could be separated directly by reversed-phase chiral HPLC using SUMICHIRAL OA-6100 with a mobile phase of 2 mmol/L aqueous CuSO₄ solution containing 500 mmol/L NaClO₄. 3) The NMR method with (+)-(R)-18-crown-6 tetracarboxylic acid as a chiral shift reagent was successfully applied for determining of the enantiomeric purity of L-alanine- β -naphthylamide. 4) Enantiomer signal separation of AC was obtained on the NMR analysis by diastereomeric interaction with Pr[hfc]₃ as a chiral lanthanide shift reagent. These four methods were found to be applicable as practical quality control methods for the enantiomeric excess determination.

(Received September 29, 2006)

Keywords : acetyl-L-carnitine; enantioseparation; chiral derivatization; chiral stationary phase; ligand-exchange; chiral crown ether; shift reagents; LC; NMR.