

超臨界流体クロマトグラフィーによる光学異性体の分割

宮澤 賢一郎

医薬開発現場で検討される合成化合物のなかに光学活性なものが含まれるケースは年々増えてきており、おのこの薬効や毒性を調べるため、研究者は早期に光学異性体の高純度試料を用意する必要に迫られている。光学異性体を得る方法はさまざまなものが知られているが、なかでもクロマトグラフィー法は迅速性と汎用性に優れる手法のひとつとして知られている。クロマトグラフィーによるキラル分割といえばHPLCが主流であったが、近年では、超臨界流体クロマトグラフィー (super-critical fluid chromatography, SFC) を適用したキラル分割が多く報告されるようになった¹⁻⁶⁾。本論では多糖誘導体系キラルカラムを用いた SFC 光学分割 (キラル SFC) について述べる。

SFCによる光学分割

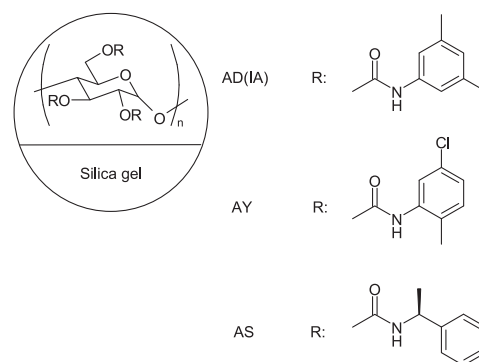
分離条件 キラルSFCに用いられる移動相は、他の超臨界技術でも汎用的に用いられる二酸化炭素が主であり、これに極性有機溶媒 (モディファイア) を添加して溶解性や極性を調節するのが一般的である。極性有機溶媒としてはメタノールやエタノールなどのアルコール類がよく用いられる。装置やカラムを侵さないことが条件になるが、試料の溶解性などを高めるために酢酸エチルやハロゲン化炭化水素といった溶媒を適用する場合もある (表1)。SFCに使われるキラル充填剤は、多くの場合順相HPLC用と同じものが使用可能である (図1)。

特に条件を示していないデータに関して、0.46 cm I.D. × 25 cmL分析カラムを使用し、流量2.5 ml/min、カラム温度25°C、圧力 (カラム背圧) 15MPa、UV検出波長230

nmにてSFC分析を実施した。分析試料はエタノールもしくはモディファイアに1 mg/ml濃度となるよう溶解し、10 μ l注入した。装置は日本分光製超臨界流体クロマトグラフシステムを使用した。

HPLCとの分離比較 多糖誘導体系キラルカラムによる化合物の分離例を示す (表2)。ここに示した化合物はHPLCでは順相、逆相どちらのモードにおいても分離が得られるが、SFCでもやはり同様の分離が確認された。また、いくつかの化合物でSFCが短時間で分離できているものや、分離度がHPLCに比べ良好となるケース

アミロース誘導体系



セルロース誘導体系

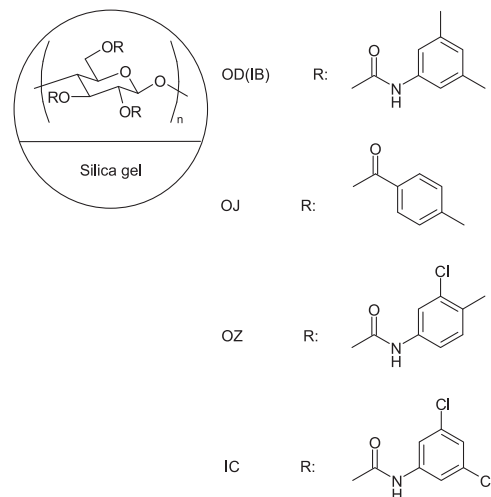


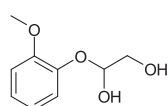
図1. 多糖誘導体系キラルカラムの充填剤

表1. SFC分離条件

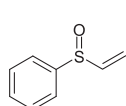
移動相	CO ₂ /モディファイア = 95/5 ~ 70/30 (v/v)
モディファイア	メタノール, エタノール, 2-プロパノール, アセトニトリル *耐溶剤型キラルカラムの場合は, THF, MTBE, 酢酸エチルなども使用可能
流速	2 ~ 5 ml/min
温度	25 ~ 40°C
背圧	8 ~ 20 MPa

表2. 多糖誘導体系キラルカラムによる化合物の分離^a

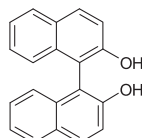
化合物名	モード ^b	カラム	移動相 ^c	k' ^l	α	Rs
Guiaifenesin	RP-HPLC	OD-RH	H ₂ O / AN = 80/20	1.47	1.26	2.51
	NP-HPLC	OD-H	<i>n</i> -Hex / IPA = 90/10	2.71	2.33	7.53
	SFC	OD-H	CO ₂ / IPA = 80/20	1.41	2.13	5.42
Phenyl vinyl sulfoxide	RP-HPLC	AS-RH	H ₂ O / AN = 60/40	1.01	1.30	2.58
	NP-HPLC	AS-H	<i>n</i> -Hex / EtOH = 70/30	0.89	1.38	4.64
	SFC	AS-H	CO ₂ / EtOH = 80/20	0.81	1.39	2.48
Binaphtol	RP-HPLC	AS-RH	H ₂ O / MeOH = 20/80	1.46	1.40	2.34
	NP-HPLC	AS-H	<i>n</i> -Hex / IPA = 90/10	1.65	1.76	5.53
	SFC	AS-H	CO ₂ / IPA = 80/20	2.90	1.65	5.66
	SFC	IC	CO ₂ / MeOH / AN = 80/16/4	1.06	2.21	5.71
Warfarin	RP-HPLC	AD-RH	H ₃ PO ₄ aq.(pH2) / AN = 50/50	0.73	1.79	2.08
	NP-HPLC	AD-H	<i>n</i> -Hex / EtOH / AcOH = 50/50/0.1	0.39	2.59	3.88
	SFC	AD-H	CO ₂ / EtOH = 80/20	2.42	3.44	6.95
Flurbiprofen	RP-HPLC	AD-RH	H ₃ PO ₄ aq.(pH2) / AN = 50/50	1.53	1.35	3.40
	NP-HPLC	AD-H	<i>n</i> -Hex / EtOH / TFA = 90/10/0.1	1.05	1.55	3.60
	SFC	AD-H	CO ₂ / EtOH = 90/10	1.36	1.58	5.45
Ibuprofen	RP-HPLC	OJ-RH	HClO ₄ aq.(pH2) / AN = 65/35	5.96	1.08	1.50
	NP-HPLC	OJ-H	<i>n</i> -Hex / IPA / TFA = 98/2/0.1	2.44	1.10	1.45
	SFC	OJ-H	CO ₂ / MeOH = 95/5	1.24	1.20	1.10
Ketoprofen	RP-HPLC	AD-RH	HClO ₄ aq.(pH2) / AN = 60/40	2.97	1.00	0.00
	NP-HPLC	AD-H	<i>n</i> -Hex / IPA / TFA = 90/10/0.1	3.66	1.28	4.67
	SFC	AD-H	CO ₂ / EtOH = 80/20	3.07	1.13	1.49
	SFC	AY-H	CO ₂ / EtOH = 80/20	1.47	1.44	3.42
Naproxen	RP-HPLC	AS-RH	HClO ₄ aq.(pH2) / AN = 60/40	2.55	1.21	2.80
	NP-HPLC	AS-H	<i>n</i> -Hex / IPA / TFA = 90/10/0.1	2.80	1.27	1.97
	SFC	AS-H	CO ₂ / AN = 80/20	1.39	1.39	1.12
	SFC	AY-H	CO ₂ / EtOH = 80/20	1.27	1.59	4.14
Metoprolol	RP-HPLC	OD-RH	20 mM Na ₂ B ₄ O ₇ -H ₃ BO ₃ aq.(pH9) / AN = 75/25	2.78	1.11	—
	NP-HPLC	OD-H	<i>n</i> -Hex / IPA / DEA = 80/20/0.1	0.58	3.21	9.81
	SFC	OD-H	CO ₂ / MeOH / DEA = 80/20/0.1	0.50	4.29	7.85
Oxprenolol	RP-HPLC	OD-RH	0.1M KPF ₆ aq. / AN = 60/40	1.00	1.18	1.23
	NP-HPLC	OD-H	<i>n</i> -Hex / IPA / DEA = 50/50/0.1	0.45	4.69	12.26
	SFC	OD-H	CO ₂ / IPA / DEA = 80/20/0.1	1.23	5.03	8.76
Pindolol	RP-HPLC	OD-RH	0.1M KPF ₆ aq. / AN = 60/40	1.16	2.00	4.91
	NP-HPLC	OD-H	<i>n</i> -Hex / EtOH / DEA = 50/50/0.1	0.34	5.07	10.48
	SFC	OD-H	CO ₂ / MeOH / DEA = 80/20/0.1	1.04	5.93	10.20

^a 逆相 HPLC では流速 0.5 ml/min, 順相 HPLC では 1.0 ml/min, SFC 条件では 2.5 ml/min に設定した。カラム温度はおのこの 25°C とした。^b RP-HPLC, 逆相 HPLC; NP-HPLC, 順相 HPLC。^c *n*-Hex, ノルマルヘキサン; MeOH, メタノール; EtOH, エタノール; IPA, 2-プロパノール; AN, アセトニトリル; AcOH, 酢酸; TFA, トリフルオロ酢酸; DEA, ジエチルアミン。

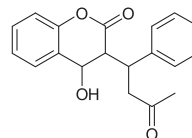
Guaifenesin



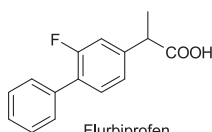
Phenyl vinyl sulfoxide



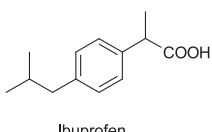
Binaphtol



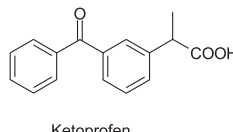
Warfarin



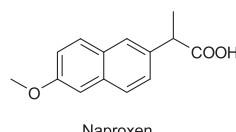
Flurbiprofen



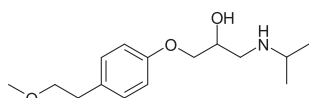
Ibuprofen



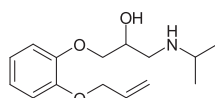
Ketoprofen



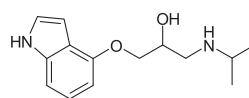
Naproxen



Metoprolol



Oxprenolol



Pindolol

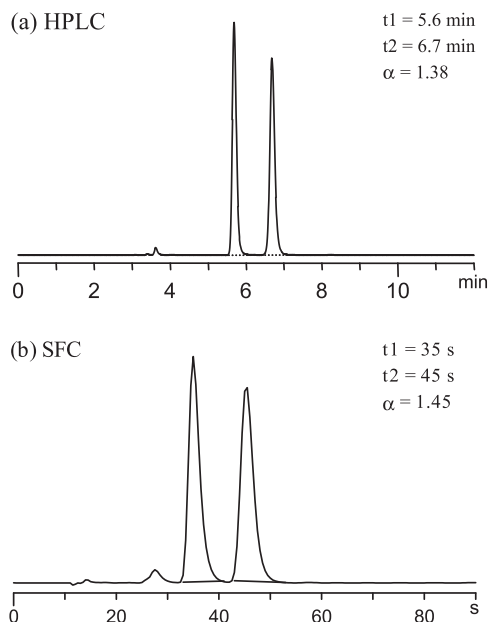


図2. フェニルビニルスルホキシドのSFC分離. (a) AS-H (0.46 cmI.D. × 25 cmL) による HPLC 分離クロマトグラム. 移動相, ノルマルヘキサン/エタノール=70/30; 流量, 1.0 ml/min; カラム温度, 25°C. (b) AS-3 (0.46 cmI.D. × 10 cmL) による SFC 分離クロマトグラム. 移動相, CO₂/エタノール=85/15; 流量, 8.0 ml/min; カラム温度, 25°C; 圧力, 15MPa.

がみられた. さらに, α -プロピオン酸誘導体のような酸性化合物の場合, 順相 HPLC では酢酸やトリフルオロ酢酸などの酸性添加剤を移動相に加えないと分離が得られないが, SFC では添加剤を加えることなく良好な分離が得られた.

小粒子径カラムを用いた分析時間の短縮 ここ数年間で充填剤の粒子径を小さくした高分離能カラムが数多く上市され, これを用いることで分析時間を大幅に縮めた分析が注目を集めている. キラルカラムもすでに HPLC 用として小粒径 (3 μ m) タイプが市販されているが, これを SFC に適用することで高速分析ができるかどうかを確認した. 分離対象化合物はフェニルビニルスルホキシドとし, CHIRALPAK AS-3 にて分離を確認した. この条件で, 1 分以内に完全分離クロマトを得ることができた (図2).

分取SFCによる光学異性体の取得

分取SFCの利点 SFC が持つ強みのひとつは先に示した分離の速さと良好な分離能であるが, 近年とくに欧米で急速な SFC の普及が進んでいる背景には, 「SFC は非常に効率よくクロマト分取ができる」という認識があると考えられる. 具体的に分取 SFC は, (1) 分析 SFC と

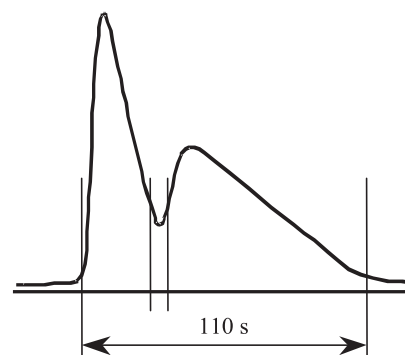


図3. Guaifenesin の SFC 分取クロマトグラム. カラム, Chiralcel OD (1.0 cmI.D. × 25 cmL); 移動相, ノルマルヘキサン/エタノール=80/20; 流量, 60 g/min; カラム温度, 25°C; 圧力, 15MPa; 注入量, 0.46 ml (200 g/l エタノール溶液).

表3. Guaifenesin の分取結果

	生産効率 (kg-en ^a /kgCSP ^b /d)	溶媒消費量 (l/kg-rac ^a)
HPLC	0.3	286
SFC	4.0	22

^akg-en, kg-enantiomer; kg-rac, kg-racemate.

^bCSP, Chiral stationary phase.

同様のスピードを期待できる, (2) カラム効率が高いため, 試料のロード量を多くできる, (3) 移動相の大半が二酸化炭素であるので, 消費される有機溶媒が少なく, 環境負荷の少ないプロセスが成立する, (4) SFC 系外に出た二酸化炭素は気化することから, 分画の濃縮が自動的に行われる, (5) 分画から気化分離した二酸化炭素の回収も比較的容易で, 移動相のリサイクルが行いやすいなどといった特長がある.

分取効率の検証 前述の分離例より, guaifenesin を用いて分取効率の検討を行った. セミ分取カラム (OD, 1 cmI.D. × 25 cmL) を用い, 実際に少量分取を実施した (図3). 注入間隔は110秒と非常に短く, 各光学異性体分画の光学純度は98% e.e. 以上となった. なお, この条件での分取効率 (単位充填剤量・時間あたりの光学異性体生産量) は HPLC の10倍以上と計算され, 同量のラセミ体分取に要する有機溶媒の消費量を比較してみると, SFC は HPLC の約1/9となった (表3).

分取SFCの実際 欧米諸国の主な製薬メーカーでは大型の分取 SFC 装置を導入し, 直径2~5 cm の分取用カラムを用いて多品種・マルチスケールの光学異性体分取を実施している. 筆者の所属室でも少量受託分取事業の一環として, 分取 SFC による光学異性体分取を数年に



図4. SFC分取装置

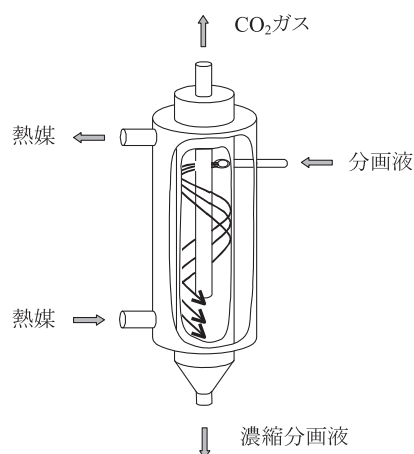


図5. SFC装置の気液分離機構

わたり行ってきた。使用している分取SFC（図4）は最大5 cm I.D.の分取カラムを装着でき、5成分までの分画採集を行えるようになっている。またサイクロン式の気液分離機構（図5）を備えており、移動相中の二酸化炭素を70～90%程度回収・再利用しながらの運転が可能である。

SFCを導入した2003年以降、SFCとHPLC双方の光学分割検討を行った123化合物の分取効率について数値比較を行ってみた（表4）。結果、HPLCよりもSFCの方が単位充填剤あたりの光学異性体取得効率が高くなったのは115例にのぼり、90%以上の割合となった。このうちSFC分取効率が5倍以上となったのは38例（30.9%）であった。以上は分析カラムによる机上効率計算であるが、多くの化合物は実際に委託を受けてSFC分取を実施し成果を上げている。

表4. SFC-HPLCの分取効率比較。

分取効率の比 (SFC/HPLC)	件数	%
1 以下	8	6.5
1 ～ 2	23	18.7
2 ～ 5	54	43.9
5 ～ 10	20	16.3
10 ～ 20	12	9.8
20 ～ 50	4	3.3
50 ～	2	1.6
Total	123	100.0

今後の課題

このように、SFCはHPLCよりも迅速かつ効率的に光学異性体の分離を行うことができる。特に分取クロマトグラフィーとしての適性は高いといえる。SFCは1960年代に開発された古い技術であるが、しばらくの間、高極性化合物の分離に適した技法が見いだされず、同時期に開発されたHPLCに一步も二歩も遅れを取ったという経緯がある。現在は極性有機溶媒の添加により順相HPLCと同等にまで適用範囲を広げている。その結果、もともと順相系の適用例が多かったキラルクロマトグラフィーの分野を中心にSFCが普及しているとも考えられる。しかしながら、やはり一部の高極性化合物に対しては逆相HPLC（あるいは、100%アルコール移動相などを用いた“高極性な”順相HPLC）に及ばず、分取もむずかしいという課題も残されている。より広範な適用範囲、高生産性をめざして、キラルSFCの技術開発を進めていきたい。

文 献

- 1) Terfloth, G.: *J. Chromatogr. A*, **906**, 301 (2001).
- 2) 宮澤賢一郎：ファインケミカル, **36** (1), 30 (2007).
- 3) Stingham, R. W. *et al.*: *J. Chromatogr. A*, **1175**, 112 (2007).
- 4) Gahm, K. H. *et al.*: *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **46**, 831 (2008).
- 5) Taylor, L. T.: *J. Supercritical Fluids*, **47**, 566 (2009).
- 6) 宮澤賢一郎：有機合成化学協会誌, **68**, 661 (2010).