

光学活性物質の新たな検出法を目指して: 偏光吸光度検出法の開発

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2021-09-09 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24517/00063589

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.



光学活性物質の新たな検出法 を目指して

偏光吸光度検出法の開発

富山県衛生研究所 主任研究員

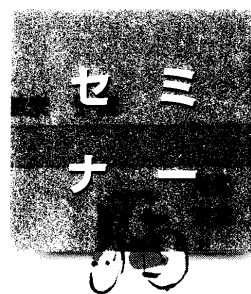
山本 敦

ATSUSHI YAMAMOTO

金沢大学薬学部 教授

早川 和一

KAZUICHI HAYAKAWA



1 はじめに

互いに鏡像関係にある物質が示す物理的性質の中で、唯一異なる点が不斉光学的な挙動である。いわゆる、旋光性とか円(偏光)二色性と呼ばれる性質である。近年、生理活性物質の光学鏡像体は、生体内で異なる物質として認識されることが明らかとなった。これら物質の光学純度測定は、クロマトグラフィ的な分離に大きく依存している。しかし、光学活性物質の持つ固有の不斉光学的性質を検出に利用すれば、煩わしい物理的な分離をせずともその純度判定が可能になると期待される。また円二色性は、タンパク質二次構造の重要な情報源としての利用価値が高い。そこで本稿では、不斉光学的な光学活性物質測定装置の原理と進歩を、著者らの開発した検出法も含めて紹介する。

2 円偏光

旋光性や円二色性とは、光のどのような性質がもたらす現象であろうか？ホイヘンスの波動説によれば、光とはエーテルという仮想媒質を介した横波である。自然光は、あらゆる波長、振幅並びに振動面を持った横波(電磁波)から成り立つ。さらに1本の横波は、同じ強度を持った互いに回転方向の異なる2つの成分の合成ベクトルと考えることができる。この一つ一つの成分を円偏光と呼ぶ。したがって、我々の周りには様々な円偏光が無数飛び交っていること

になる。この円偏光の回転方向は、光源に向かって見たとき、時計回りに回転してくる光を右回り円偏光と定義する。

さて、この円偏光は光学活性物質あるいはその溶液中で、以下のような性質を示す(図1参照)。まず右回りと左回りの円偏光では、その屈折率 n (透過速度)が異なる。試料に垂直に入射した1本の横波(平面偏光)を構成する2本の円偏光は、同じ光軸上を進むが、進行速度が異なる。試料からの透過時には、入射時期の異なる別の位相を持った円偏光とペアを組んで横波を形成することになる。その結果、透過光の振動(偏光)面には入射時のそれに対して特定の傾きが生じる。この現象が光学活性物質による旋光性である。一方、化合物の吸収帯の波長光では、両円偏光に対する透過率 ϵ も異なる。その結果、透過光の偏光面はもはや平面ではなく、楕円性を帯びたものとなる。これを光学活性物質による円二色性と呼ぶ。このように光学活性物質特有の不斉光学的性質は、すべて円偏光が引き起こしていることになる。

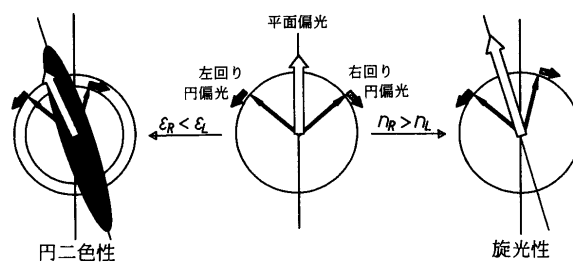


図1 光学活性物質中での円偏光の挙動

3 従来型の旋光(計)度検出器

光学活性物質の旋光性を捉える装置について説明しよう。旋光性とは両円偏光の屈折率の差であると説明したが、結果的には偏光面の回転という単純な現象を与えるため、比較的簡単な光学系で検出できる。図2のAは最も古典的かつ普遍的な偏光面変調型旋光計で、セル前の1枚目の自然光を偏光面の揃った平面偏光に変える偏光子とセル後の2枚目の偏光子(検光子と呼ぶ)の偏光面が直交するように配置されている。1枚目の偏光子による偏光面を変調器により振動(周波数 f)させると、検光子を通った光は周波数 $2f$ の微弱な交流信号となる。セル中に光学活性物質が存在して入射偏光面を回転させると、先の交流信号に周波数 f の基本周波数成分が加わるようになる。この信号を増幅し、その強度及び位相の変化から回転角の大きさと向きを求めることができる。変調器としては f が大きいほど光源のふらつき(ノイズ)の影響を抑えることができるため、¹⁾ 電気的な磁場を利用したファラデー効果の利用が一般的である。この方式のHPLC用旋光度検出器は、日本分光^(株)をはじめ各国のメーカーから市販されている。したがって、その応用例も農薬異性体、^{2,3)} 薬物代謝物、⁴⁾

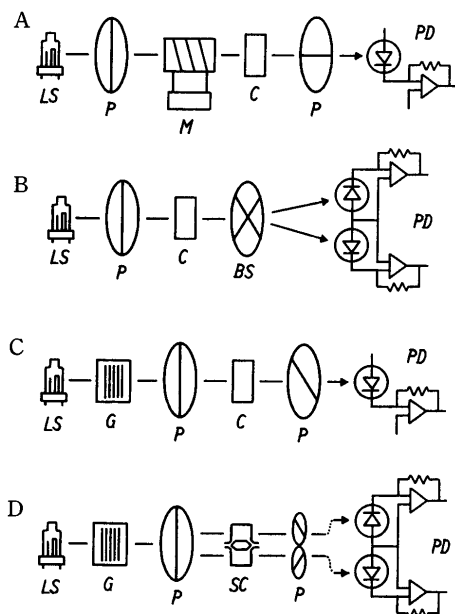


図2 旋光(計)度検出器のブロック図

LS:光源, P:偏光子, M:変調器, C:試料セル, PD:ダイオード素子, BS:ビームスプリッター, G:グレーティング, SC:スプリットセル

香料⁵⁾の分析と多岐にわたり、またペプチド合成時におけるアミノ酸試薬の光学純度モニターとしても使われている。⁶⁾

図2のBはビームスプリッター型の旋光計で、検光子の代わりに入射光を2本の互いに偏光面が直交する平面偏光に分割するプリズムが配置されている。これらのプリズムの光軸を1枚目の偏光子の偏光面に対して 45° 傾けると、2本の偏光の強度は等しくなるが、光学活性物質の存在によってそのバランスが崩れ、強度差が生じる。これを2つのダイオード素子で検知して旋光角に換算するものである。変調型に比べて変調回路が不要、精度(消光比)の高いプリズムが不要、精密な偏光軸調整が不要等の利点を有する。⁷⁾ この方式の検出器は、昭和電工^(株)より製品化されている。

4 偏光吸光度検出器

上記二方式の旋光計は、理論的には偏光面の回転角のみを捉える装置であり、化合物の光吸収の影響は受けないはずである。しかし、化合物の吸収帯では、透過光強度の低下がこれら装置の測定精度を低下させ、実質的な適用は不可能である。それでは、化合物の吸収のない可視部領域のみに測定を限定するのであれば、何も専用の装置でなくても旋光度が検出できるのでは、と考えたのが図2のCである。この原理は図3に示すように、1枚目の偏光子が作り出した平面偏光の回転を、2枚目の偏光子が吸光度変

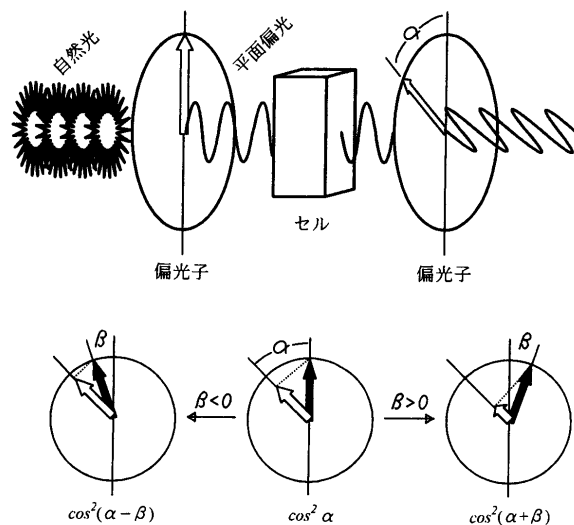


図3 PPDの原理

化として捉えるものである。そこで著者らは、この方式を「偏光吸光度検出法(polarized photometric detection: PPD)」と命名した。^{8,9)} 2枚の偏光子がつくる偏光面の角度を α 、光学活性物質による旋光角を β とおけば、吸光度変化量(ΔAbs)は次の式で表される。

$$\Delta Abs = 2 \beta \log e \cdot \tan \alpha$$

すなわち、旋光角がそのまま吸光度変化となって記録される。また、検出感度は $\tan \alpha$ に比例して大きくなり、理論的には偏光面を直交させれば無限大になるはずであるが、透過光量も0となってしまう。PPDで α が 90° 以下に設定されることは、ビームスプリッター型と同様、偏光子や光軸調整の精度が測定にほとんど影響を及ぼさないことになり、装置的には安価なシート型偏光板2枚をセルの前後に装着させるだけでよい。この偏光子はとても薄くてHPLC用のフローセルにも容易に装着でき、通常の吸光度検出器が旋光度検出器として使用しうる。さらにこの検出器では、対照側のダイオード素子をそのまま活用するため、PPDは従来型旋光計に比べて光源のノイズに対してより安定な光学系である。

PPDの開発にあたっては、誰もが容易に旋光度検出できることを目標に、その基本を吸光度検出器の光学系に置いた。この限られた装置空間の中でPPDの高機能化を目指した結果が、図2のDに示すスプリット型フローセル方式の開発である。¹⁰⁾ 二組の偏光板がなす位相角度を逆にして試料側、対照側のセルに同時に試験溶液を通せば、セル長を倍にした効果が得られる。さらに試料の持つ光吸収や示差屈折の影響も相殺できる。このセルアッセンブリを装着した吸光度検出器は、カラムへの絶対注入量で $1 \mu\text{g}$ 以下のショ糖の検出が可能であり、市販の旋光度検出器に匹敵する検出感度を与えた。¹¹⁾ これによってPPDの実用性は確立され、今までのところ、食品中の有機酸、^{12,13)} 糖¹¹⁾さらには医薬品分析¹⁴⁾へと適用範囲は広がっている。

5

円二色性分散計

旋光性に基づく検出をHPLCにおける示差屈折検出に例えるなら、円二色性による検出は吸光度検出に相当する。当然、光学活性物質の不斉光学検出に

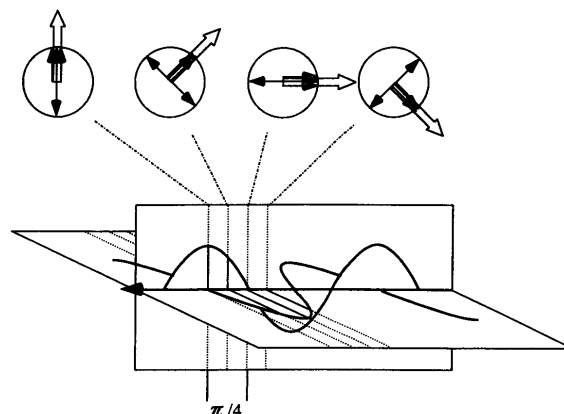


図4 円偏光の調製原理

は、感度、選択性の点で円二色性の方が優れると考えられている。円二色性測定 of 成否は、直接の楕円性測定法が確立されていないため、すべて円偏光の調製が鍵を握っている。先に平面偏光とは2本の回転方向の異なる円偏光の合成ベクトルであると説明したが、逆に円偏光とは互いの偏光面が直交し、強度は等しいが位相が $\pi/4$ だけ異なる2本の平面偏光であるとも説明される。図4に示すように、これらを構成する4本の円偏光のうち、黒い矢印で表される2本の右回り円偏光は常に逆位相のため、合成ベクトルとしての光を作り出せない。残ったグレーの2本の左回り円偏光は位相が等しく、一定の強度を持った大きな白矢印となる。それでは、こういった平面偏光はどうすれば作り出せるのか？方解石や水晶のような単光軸複屈折性の結晶を通して物を見ると二重に見える。これは1本の光線が結晶の中で2本に分かれて進むからであり、それぞれ(屈折の法則に従う)常光線と(従わない)異常光線と呼ぶ。これらは振動面が互いに垂直な平面偏光である。ところで、この結晶主軸に平行に切り取った平板に垂直に入射した光から生ずる両光線はそのまま直進して同一線上を進む。当然進行速度(屈折率)が異なるため、それらの位相に差が生じていく。このような平板を位相差板と呼ぶ。この主軸に対して偏光面が 45° 傾いた平面偏光は、強度の等しい2本の光線に分かれる。結晶板透過時にちょうど両者に $\pi/4$ の位相差ができれば円偏光となる。以上が一般的な円偏光の調製法である。

市販の円二色性分散計は、図5のAに示すように、

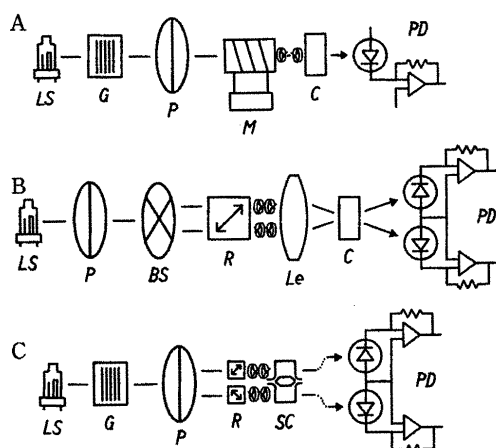


図5 円二色性(分散計)検出器のブロック図
R: 位相差板, Le: レンズ, 他の略号は図2に同じ

波長依存性を持つ位相差板に代わり, 結晶板に電場を加えることで屈折率が任意に変化する電気光学効果を利用した変調(器)子を用いている。ここでは, その電気光学変調子を使って特定の波長における左右両方向の円偏光を交互に送り出し, セル中の光学活性物質による両偏光の吸光度の差に基づく交流信号を取り出すことによって円二色性を測定している。測定には大出力の光源(窒素雰囲気下水冷)と断面積の広いセルを必要とし, これがHPLC検出器としての適用への大きな妨げとなっている。この装置にフローセルを組み込んだHPLC分析については総説¹⁵⁾が詳しい。

一方, 図5のBに示すダブルビーム型の専用検出器も報告されている。¹⁶⁾ここでは方解石の複屈折性を利用したビームスプリッターと位相差板を使って作り出した2本の左右両円偏光を, 巧みに1本のフローセル中で交差透過させている。しかし, 光源に波長固定のレーザーを用いているため, 汎用性に欠ける。

6 PPDによる円二色性検出

ダブルビーム型円二色性検出器の開発は, PPDにおける円二色性検出の可能性を示唆しているものである。スプリットセルのそれぞれに異なる回転方向を持った円偏光を入射させればよい。図5のCのように, 円偏光の回転方向は位相差板に入射される平面偏光の方向に応じて調節できるため, 構成的には

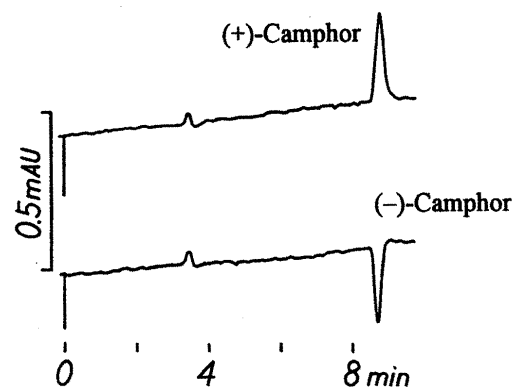


図6 カンファアの円二色性検出クロマトグラム
LC測定は, 分析カラム: 資生堂 Capcell Pak C₁₈, 移動相: 0.7 ml/minのMeCN/H₂O(3+2), 検出波長: 303 nm, 試料注入量は10 μgで行った。検出器内部には, 石英製グラントレープリズムと2枚の厚さ0.20 mmの石英板を組み込んだ。

1枚の偏光子と2枚の位相差板をスプリットセル前面に装着することで, 円二色性検出可能なことを見出した。¹⁷⁾ところで, 位相差板には波長依存性という問題が残されたままである。このままでは, 測定波長毎に位相差板交換という手間がかかる。波長依存性の小さな位相差板としてはフレネルの斜方体が知られているが, 装置空間的に装着不可能である。この欠点を補うために用いた手段が, 位相差板の作り出す $n\pm\pi/4$ (n は自然数)位相差の利用である。1枚の位相差板で使用できる波長は, 何も $\pi/4$ 位相差一つに限定されるものではない。この波長間隔は結晶板の厚みが増すにつれ, また低波長へ行く程短くなる。適当な厚さの結晶板を位相差板として選べば, これ1枚で多くの波長での測定が可能となる。この方式による実際のクロマトグラムを図6に示す。カンファアは, その異性体によってピークの出現方向が反転し, 円二色性に応じて検出された。PPDによる円二色性検出は, 旋光度検出に比べてピーク応答が強く, また検光子が不要で光量の減少が無い分, ベースラインの安定性に優れる。

三方式の円二色性測定装置を比較した場合, ダブルビーム方式は円偏光の調製に変調子が不要という利点を有するが, 使用する2つのフォトダイオード間に個体差があると, 大きな光吸収を持つ化合物の円二色性検出が困難という重大な欠点を有する。そこで現在, フォトダイオード検出器によるマルチビ



ーム型 PPD とでも呼ぶべき円二色性検出器を開発中である。

7 おわりに

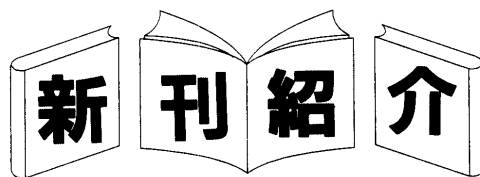
以上、現在実用化されている不斉光学的測定装置について、著者らの開発中の装置と合わせてその原理及び応用例について概説した。不斉光学検出器の問題点は、何と言っても検出感度の低さにある。バルク製剤は測定し得ても、その生体内挙動となると手も足も出ない。当初、光学活性物質による旋光度変化を吸光度変化として捉える検出法として開発した著者らの PPD も、その後の高感度化を目指す過程において、吸光度検出器による光学活性物質の検出法というようにその定義が拡大した。PPD には大いなる可能性が残されている。本来高選択性を有する

検出法だけに、これに高感度が加われば、より広い分野での活躍が期待されよう。

文 献

- 1) Lloyd D. K. *et al.*, *Anal. Chem.*, **61**, 1238 (1989).
- 2) Boehme W. *et al.*, *Anal. Chem.*, **54**, 709 (1982).
- 3) Müller M. D. *et al.*, *Anal. Chem.*, **66**, 2155 (1994).
- 4) 田中 眞ほか, *Jasco Report*, **32**, 26 (1990).
- 5) Bounoshita M. *et al.*, *Anal. Sci.*, **9**, 425 (1993).
- 6) Wodecki Z. *et al.*, *J. Chromatogr. A*, **696**, 149 (1995).
- 7) Kale U. *et al.*, *Analyst*, **120**, 325 (1995).
- 8) Yamamoto A. *et al.*, *Anal. Sci.*, **7**, 719 (1991).
- 9) Hayakawa K. *et al.*, *Biomed. Chromatogr.*, **8**, 130 (1994).
- 10) Yamamoto A. *et al.*, *Analyst*, **120**, 1137 (1995).
- 11) Yamamoto A. *et al.*, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **15**, 1383 (1997).
- 12) Yamamoto A. *et al.*, *J. Chromatogr. A*, **667**, 85 (1994).
- 13) Yamamoto A. *et al.*, *J. Chromatogr. A*, **727**, 55 (1996).
- 14) Hamasaki K. *et al.*, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, accepted.
- 15) Salvadori P. *et al.*, *Chirality*, **3**, 376 (1991).
- 16) Rosenzweig Z. *et al.*, *Appl. Spectrosc.*, **47**, 2017 (1993).
- 17) Yamamoto A. *et al.*, *Biomed. Chromatogr.*, in press.

新刊紹介



新刊紹介

レセプター

日高弘義, 谷口隆之, 宇井理生 編

講談社サイエンティフィック/A5・238頁・5,250円

近年の分析機器や分子生物学の進歩には目を見張るものがある。最初「レセプター」は、薬物に対する生体の反応を説明する概念として提唱された。しかし、これら新しい技術の導入により、概念から実体の存在するモノへと変わってきた。ここ数年レセプターの分子構造と機能が急速に明らかとなり、この間に得られたレセプターに関す

る情報は膨大である。したがって、これから生命科学に携わろうとしている人、あるいはレセプター研究を始めようとしている人が、これら多くの内容を筋道を立てて理解するのは並大抵ではない。本書は、そういう若い研究者を対象として書かれている。

本書は、いわゆる古典的なレセプターだけでなく、細胞内セカンドメッセンジャーと結合しその情報を伝達するタンパク質をレセプターの1項目として扱っているなど情報伝達の面から分かりやすく分類している。またレセプターの分子構造や機能など最先端の情報を盛り込んでいながら簡潔に

まとめている。さらに、レセプターの変異が原因とされるいわゆるレセプター病や薬物から見たレセプターについて多くのページを割いている。このことはこれまで得られた成果の羅列でなく、サブタイトルに「分子薬理学的アプローチ」と書かれているように、今後のレセプター及びそこに作用するリガンドに関する研究の方向性をも示唆しており、若い研究者の入門書というだけでなく今後の専門研究の展開にも役立つ1冊である。

吉川日出雄 HIDEO KIKKAWA

有機化学 基礎の基礎

—100のコンセプト

山本嘉則 編著

化学同人/B5変型・290頁・3,360円

有機化学を学んでいると、自分の理解不十分な概念のみを、手短かに勉強したいと思うことが多い。このようなとき、一般的な教科書は、分厚いうえに1つの概念があちらこちらに分散して記述されているため、これらを順を追って読み進んでいくのは時間がかかり、とかく敬遠されがちである。一方、用語辞典では、あまりに解説が簡潔す

ぎて、その概念の意味するところを十分に理解することができない。その点本書は、有機化学を学ぶ上で重要な“100のコンセプト”(例えば、不斉誘導、反応中間体、シントンなど)について各概念ごとにまとめられ、また各項目ごとに2~4ページの読みきりとなっているので、辞書を引くような感覚で調べられ、大変使いやすい。さらに、各項目とも図を多用しながら、そのキーポイントをできるだけ平易にかみくだいて解説してあるため、十分にその内容を理解することができる。また、関連するコンセプトについては、文中にその番号が示されており、

これらをあわせて読むことで、より幅広く関連事項を理解できるように工夫がなされている。本書は「基礎の基礎」シリーズの第3弾として刊行されたものであるが、基礎の内容のみならず、かなり高度な内容に触れた項目もあり、内容的にも充実している。有機化学を志す大学院生や学部学生、有機化学に携わる若手研究者の方々にとって必携の参考書となりうると思われる。

栗原美香 MIKA KURIHARA

*本書は、日本薬学会「薬学情報コーナー」で閲覧できます。