

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23655069

研究課題名(和文) 配向性分子の集積化により形成される不斉ナノキャビティの空間機能開発

研究課題名(英文) Development of chiral nano-space using highly-ordered molecular gel for molecular recognition

研究代表者

高藤 誠 (Takafuji, Makoto)

熊本大学・自然科学研究科・准教授

研究者番号：50332086

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：医薬、環境科学、工業材料などの分野において、光学異性体や構造異性体の精密分離・分析は重要な技術である。本研究では、キラル分子が形成するユニークな分子配向体が形成する立体特異的ナノ空間(ナノキャビティ)を利用した分子形状の精密認識システムの開発を目的とし、水中、有機溶媒中で一次元キラル分子配向体を形成するグルタミド誘導体を多孔質シリカ粒子界面にグラフト化するとともに、その分子認識能について評価した。その結果、市販の分離剤と比較して構造異性体、幾何異性体に対する高い分子認識能を示すとともに、ビタミン類やトコフェロール類などの生体関連分子に対しても高い認識能を示した。

研究成果の概要(英文)：Glutamide-derivatives with a triethoxysilyl group (CmGDD) was newly synthesized and confirmed to form fibrous self-assembly in various organic solvents. CmGDD was grafted onto the surface of porous silica particles through siloxane bonds (Sil-CmGDD) for use in reversed-phase HPLC as a stationary phase. Solid-state  $^{13}\text{C}$  NMR and DSC measurements indicate that CmGDD can form highly-oriented structures on the silica surface. The Sil-C10GDD packed-column was investigated by retention studies of polycyclic aromatic hydrocarbons. The chromatographic results showed that the Sil-CmGDD provided excellent selectivity for these isomers such as stilbenes and terphenyls than conventional octadecylated silica. It is estimated that these preferable results can be brought about through hydrogen bond-mediated molecular orientation of weak interaction sites such as carbonyl groups. Sil-CmGDD also showed excellent separations of bio-related molecules such as tocopherols isomers and Vitamine Ds.

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：キラル超分子集合体 分子認識 液体クロマトグラフィー 異性体分離

### 1. 研究開始当初の背景

医薬、環境科学、工業材料などの分野において、光学異性体や構造異性体の精密分離・分析は重要な基盤技術である。これまでに HPLC 用キラル固定相に関して、様々なアプローチや具体的な分離例が報告されてきた。例えば、ポリシュガー、ポリペプチドなどの規則的立体構造をもつ生体ポリマーや、キラル分子をインプリントした固定相などが挙げられる。キラル分離の分野は、国内の研究が世界をリードしており、最先端の研究・開発が展開されている。これらのキラル分離剤を用いることで、多くのキラル化合物を分離することが可能であるが、依然として分離が困難なキラル化合物も多数あり、さらなる HPLC 用キラル分離剤の開発が望まれている。

### 2. 研究の目的

申請者らは、これまでにファイバー状、チューブ状といったユニークなナノサイズ超分子集合体の会合形態や、キラル配向構造に基づく光学活性の増幅、誘起といった特殊な機能に関する研究を行ってきた (Langmuir, 2009, Tetrahedron, 2007.)。本研究では、キラル超分子集合体が形成する立体特異的な空間 (キラルナノキャビティ) を利用した分子認識システムの構築を目的とし、キラル超分子集合体の基材界面への固定化および精密分子形状認識剤への応用について検討する。

### 3. 研究の方法

#### 1) 配向性分子の合成

配向性キラル分子として、分子内に不斉炭素をもつグルタミン酸に長鎖アルキル基を導入し、さらに基材であるシリカとの界面に直接シランカップリング反応で導入可能なアルコキシシリル基を導入した分子を合成した。Fig. 1 には、本研究で合成したキラル分子 ( $C_mGDD$ ) の化学構造を示している。不斉炭素と基材シリカとの界面とのスペーサーは分子の配向構造に影響を及ぼすことが考えられるため、スペーサー長の短い ( $C_3$ ) 分子と長い ( $C_{10}$ ) 分子を合成した。また、シリカ界面とのアルコキシシリル基は3官能性のもをもちいたが、このことによりキラル分子をポリメリックにグラフト化させることができる。配向性キラル分子の合成確認は、融点測定、FT-IR スペクトルおよび NMR スペクトル測定、元素分析により行った。

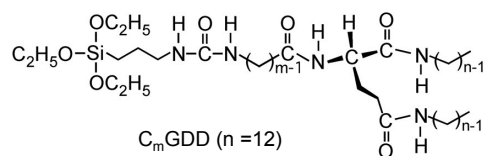


Fig. 1 Chemical structure of  $C_mGDD$ .

#### 2) キラル分子の多孔質シリカ界面への固定化

有機溶媒中で  $C_mGDD$  と多孔質シリカ (YMC-GEL, 平均粒径 = 5  $\mu m$ , 細孔径 = 12 nm) を加熱しながらかき混ぜることで、キラル分子の多孔質シリカへのグラフト化を行った。キラル

分子に反応性部位として導入したアルコキシシリル基と多孔質シリカ界面のシラノール基との縮合反応により、共有結合を介してキラル分子をシリカ界面に導入した ( $Sil-C_mGDD$ )。シリカ界面にグラフト化したキラル分子の配向構造や運動性について DSC による熱分析および固体  $^{13}C$  NMR スペクトルを利用して評価した。

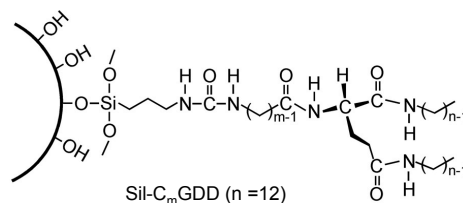


Fig. 2 Chemical structure of  $C_mGDD$ -grafted porous silica ( $Sil-C_mGDD$ ).

#### 3) 分子認識 (HPLC 固定相) への応用

キラル分子グラフト化多孔質シリカ ( $Sil-C_mGDD$ ) の分子形状分離能の評価不斉ナノキャビティを界面に固定化した多孔質シリカ微粒子の HPLC 用キラル固定相への応用について検討するため、構造異性体や分子形状 (分子長、平面性など) の異なる分子、エナンチオマー、ジアステレオマー化分子、キラルポリマーなどのキラル化合物の分離能評価を行い、市販のキラルカラムと比較することでその性能を評価した。

#### 4. 研究成果

##### キラル分子 ( $C_mGDD$ ) の配向構造

水中、有機溶媒中で一次元キラル分子配向体を形成するグルタミン酸誘導体にアルコキシシリル基を導入した分子 ( $C_mGDD$ ) の有機溶媒中での分子配向、会合構造を評価した。 $C_{10}GDD$  (スペーサー長 =  $C_{10}$ ) をシクロヘキサン中に加熱溶解させた後、10  $^{\circ}C$  まで冷却したところ、ゲルを形成することが確認された。ゲル状態のまま、TEM グリッド上にキャストし、その構造を観察した結果、Fig. 3 に示したようなナノファイバー状の会合体が形成されていることが確認された。このような会合構造は、グルタミン酸誘導体に特有の構造である。

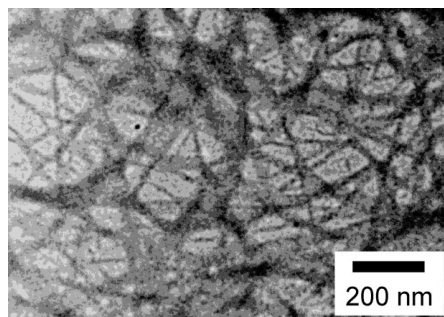


Fig. 3 TEM image of  $C_mGDD$  aggregates in cyclohexane.

CD スペクトルを測定した結果、Fig. 4 に示した様に、アミド結合の吸収に相当する波長付近に正の Cotton 効果 (196 nm)、負の Cotton 効果 (218 nm) が観察された。溶液の温度を 60  $^{\circ}C$  まで上げると、CD シグナルの強度が低下した。こ

のことから、 $C_{10}$ GDD は有機溶媒中でキラルな分子配向構造を形成し得ることが確認された。 $C_{10}$ GDD のシクロヘキサン溶液中にトリフルオロ酢酸、水を少量添加し、振り混ぜると、いったん濁り、ゲルは破壊されるが、そのまま室温で放置すると、再び透明なゲルに戻ることを確認された。 $^{29}\text{Si}$ -NMR スペクトルを測定した結果、シロキサン結合 (Si-O-Si) に由来する構造が観察されたことから、シクロヘキサン溶液中で重合が進行していることが確認された。重合後の CD スペクトルを測定すると、重合前とほぼ同じ CD スペクトルが得られたことから、重合による配向構造への影響は小さいと考えられる。また、温度を  $60^\circ\text{C}$  まで上げた場合でも CD 強度はほぼ同程度であったことから、重合により配向構造が安定化されたと推定される。

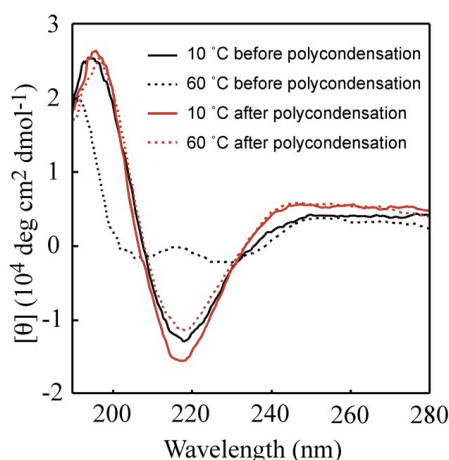


Fig. 4 CD spectra of  $C_m$ GDD in cyclohexane before and after polycondensation.

$C_m$ GDD を多孔質シリカ粒子界面にグラフト化して得られた  $\text{Sil-C}_{10}$ GDD の元素分析を行った結果、Table 1 に示したように炭素含有量 (C%) が約 24 wt% であることが確認された。市販されているオクタデシル化シリカ (ODS) の C% は一般的に 15~30 wt% であり、 $\text{Sil-C}_{10}$ GDD の C% はほぼ同等の有機物がグラフト化されていることを示している。

Table 1 Elemental analysis of  $\text{Sil-C}_{10}$ GDD

$\text{Sil-C}_{10}$ -GDD	%C	%H	%N	C/N
Found	24.03	4.26	3.10	7.75
Calcd.	24.03	3.82	3.18	7.56

Calcd. for  $C_{10}$ GDD molecule (34.1 wt%) on  $\text{Sil-C}_{10}$ GDD.

$\text{Sil-C}_{10}$ GDD のメタノール-水 (8:2) 懸濁状態での DSC 測定を行った結果、Fig. 5 に示したように、昇温過程で  $52^\circ\text{C}$  に吸熱ピークが、降温過程で  $32^\circ\text{C}$  に発熱ピークが観察された。また、固体状態での CP/MAS- $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルを測定した結果 (Fig. 6)、アルキル鎖のコンフォーメーションが、低温側で *trans* 構造がリッチであり、高温になるに従って *gauche* 構造が増えてくることを確認された。温度変化に対する DSC および  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルの変化は可逆的に観察されたことから、 $C_{10}$ GDD 分子はシリカ表面で配向構

造を形成し、温度によって可逆的に会合⇄非会合の変化を示唆された。スペーサー長を短くした  $\text{Sil-C}_3$ GDD ( $m=3$ ) では、相転移が観察されず、また幅広い温度範囲 ( $10$ - $60^\circ\text{C}$ ) で *gauche* 構造がリッチであることが確認されたことから、シリカ界面とグルタミド部位とのスペーサーが分子配向に極めて重要であることが確認された。

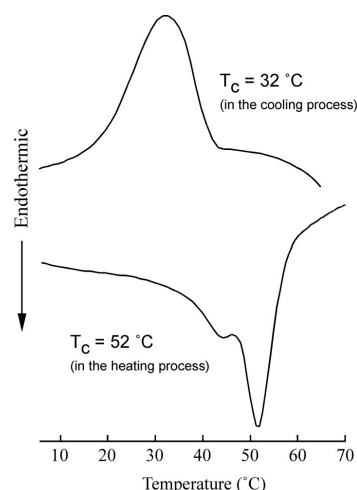


Fig. 5 DSC thermograms of  $\text{Sil-C}_{10}$ GDD in methanol-water (8:2) suspension. Heating rate =  $1.0^\circ\text{C}$ , Cooling rate =  $-1.0^\circ\text{C}$ .

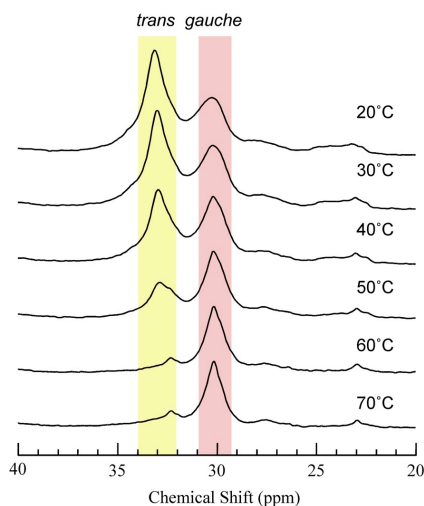


Fig. 6 Solid state  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of  $\text{Sil-C}_{10}$ GDD.

$\text{Sil-C}_m$ GDD をステンレス製のカラムに充填し、HPLC 用固定相を用いて、HPLC により多環芳香族や芳香族異性体に対する分離能を評価した結果、市販のオクタデシル化シリカと比較した場合、多環芳香族類や芳香族異性体類に対して著しく高い分離能が得られた。またスペーサーを長くした固定相において、より高い分離能が得られることが確認できた。Table 2 には、 $\text{Sil-C}_{10}$ GDD を固定相とした場合の結果の一例を示した。分子配向体が形成する立体空間中に配置された複数の相互作用ポイントにより、ゲスト分子の平面性、直線性を認識していると考えられる。グルタミド誘導体固定化シリカによる核酸塩基類、ステロイド類、トコフェロール類などの生体分子についても評価し、特定の分子に対して高い分子認識能を示すことが明らかになった。Fig. 7 には、トコフェロール類のクロマトグラムを示している。市販の ODS では、 $\gamma$ -と $\beta$ -の分離が困難であるが、 $\text{Sil-C}_{10}$ GDD では、これらも含め

ベースライン分離が達成されている。

Table 2 HPLC results for aromatic hydrocarbons.

Elutes	SiI-C <sub>10</sub> -GDD				ODS	
	20 °C		60 °C		20 °C	
	k	α	k	α	k	α
Triphenylene	9.69		3.40		5.89	
Chrysene	6.55	0.68	3.79	1.12	6.72	1.14
Benz[a]anthracene	6.10	0.63	3.34	0.98	6.90	1.17
Naphthacene	5.34	0.55	3.11	0.92	9.37	1.60
<i>o</i> -Terphenyl	2.15		1.20		1.72	
<i>m</i> -Terphenyl	4.54	2.11	1.68	1.40	2.92	1.70
<i>p</i> -Terphenyl	18.30	8.51	4.47	3.73	3.68	2.14
<i>cis</i> -Stilbene	3.26		1.98		2.57	
<i>trans</i> -Stilbene	8.43	2.58	3.98	2.01	3.05	1.19

Mobile phase: methanol/water 90/10. Flow rate: 1.00 mL/min.

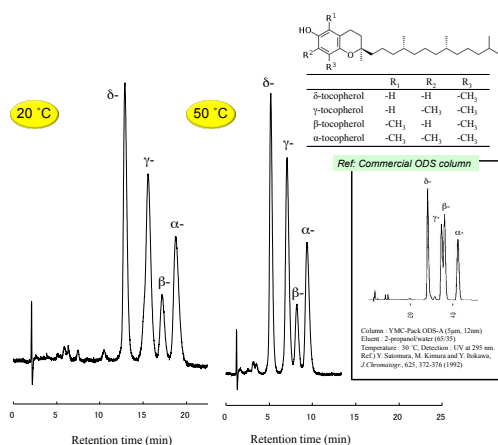


Fig. 7 Chromatograms of tocopherol isomers with SiI-C<sub>10</sub>GDD.

Mobile phase: methanol-water = 9:1.  
Flow rate: 1 mL/min

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

- 1) Abul K. Mallik, Sudhina Guragain, Hiroshi Hachisako, Mizanur M. Rahman, Makoto Takafuji, Hirotaka Ihara. Molecular orientation of gel forming compounds and their effect on molecular-shape selectivity in liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, Vol.1324, **2014**, pp.149-154. (査読有)
- 2) Sudipta Ray, Makoto Takafuji, Hirotaka Ihara. Peptide-based surface modified silica particles: Adsorption materials for dye-loaded wastewater treatment. *RSC Advances*, Vol.3, **2013**, pp.23664-23672. (査読有)
- 3) Makoto Takafuji, Thiraporn Charoenraks, Jin Izumi, Hirotaka Ihara. Organic thin layer of molecular gel-forming glutamide lipid on silica particles for practical application to molecular recognition. *Chemistry Letters*, Vol.41, **2012**, pp.181-183. (査読有)

- 4) Sudipta Ray, Makoto Takafuji, Hirotaka Ihara. New peptide-silica bio-inspired stationary phase with an improved approach for hydrophilic interaction liquid chromatography. *Analyst*, Vol.137, **2012**, pp.4907-4909. (査読有)

[学会発表] (計7件)

- 1) Hiroki Noguchi, Thiraporn Charoenraks, Makoto Takafuji, Hirotaka Ihara. Molecular shape recognition of self-assembling molecular gel-grafted silica particles in RP-HPLC. *The International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations (HPLC2013)*, RAI Congress Center, Amsterdam, Nederland, 2013. 6.17
- 2) Makoto Takafuji, Sudipta Ray, Hirotaka Ihara. Tri-Peptide Based Stationary Phases for Separation of Bio-Molecules: Chromatographic Insight with Structure Function Relation. *The International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations (HPLC2013)*, RAI Congress Center, Amsterdam, Nederland, 2013. 6.18
- 3) Abul Mallik, Makoto Takafuji, Hirotaka Ihara. Applications of Alternating Copolymer-Grafted Silica for High-Selective Liquid Chromatography. *Kyusyu-Seibu / Pusan-Gyeongnam Joint Symposium on High Polymers (16th) and Fiber (14th)*, Saga University, Saga, Japan, 2013.11.9
- 4) Makoto Takafuji, Thiraporn Charoenraks, Hirotaka Ihara. Self-assembled Molecular Gel Thin Film for Molecular Recognition. *Vth International Conference on Molecular Materials (MOLMAT2012)*, AXA Auditorium, Barcelona, Spain, 2012.7.5
- 5) 野口 広貴、高藤 誠、伊原 博隆.  $\pi$  共役分子を集積した有機相を用いる高選択的 HPLC 分離剤の開発. 第 49 回化学関連支部合同九州大会, 北九州国際会議場, 北九州, 2012. 6.30
- 6) Makoto Takafuji, Thiraporn Charoenraks, Jin Izumi, Hirotaka Ihara. Amplification of molecular shape selectivity with self-assembled molecular gel-immobilized silica in reversed-phase HPLC. *36th International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (HPLC2011)*, Budapest Congress & World Trade Centre, Budapest, Hungary, 2011.6.21

- 7) Abul K. Mallik, Hongdeng Qiu, Tsuyoshi Sawada, Makoto Takafuji, Hirotaka Ihara. Separation of Bioactive- and Shape-Constrained Isomers by Molecular Gel Forming Compounds-Grafted Silica in RP-HPLC. *37th International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (HPLC2011)*, Dalian World Expo Center, Dalian, China, 2011.10.10

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.chem.kumamoto-u.ac.jp/~wildcats/takafuji/index-j.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高藤 誠 (TAKAFUJI Makoto)

熊本大学 大学院自然科学研究科、准教授

研究者番号: 50332086

研究者番号:

### (2) 研究分担者

ガナパシー ヒュラシー (GANAPATHY S. Hullacy)

熊本大学 大学院先導機構、助教

研究者番号: 90551276