

平成23年 5月 13日現在

機関番号：15301
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20590035
 研究課題名（和文）HPLC充填剤としての八臭素化ポルフィリン固定化シリカゲルの開発
 研究課題名（英文）The Development of octabromed porphine immobilized silica gels as a stationary phase for HPLC
 研究代表者
 御船 正樹（MIFUNE MASAKI）
 岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授
 研究者番号：00200105

研究成果の概要（和文）：

八臭素化金属ポルフィリン(M-OBTC)固定化シリカゲルを極性、無極性移動相いずれも利用可能な HPLC 充填剤として開発できた。更に、金属ポルフィリンの中心金属として亜鉛を用いれば、カラム性能が向上すること、残存アミノ基やシラノール基の修飾の影響も明らかにでき、デカノイル基と Tetramethylsilane で修飾したカラムは、多環芳香族炭化水素を短時間で分離できた。今後、実用化が期待できる。

研究成果の概要（英文）：

It was developed octabromed metal-porphine (M-OBTC) immobilized silica gels as a stationary phase for HPLC using both polar and on-polar mobile phase. Furthermore, Zn-OBTC silica gels gave highest theoretical plate numbers. It was revealed the effect of modification of non-reacted amino and silanol groups and a stationary phase modified decanoyl and tetramethylsilane groups could separate polyaromatic-hydrocarbons in short time. It was expected practical use the column developed here.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：八臭素化ポルフィリン固定化シリカゲル，多環芳香族炭化水素，HPLC 充填剤，無極性移動相，極性移動相

1. 研究開始当初の背景

現在、HPLC 用充填剤として、様々な分離機構を持つ充填剤が開発されている。しかし、ほとんど移動相に極性溶媒を用いた逆相系 HPLC への応用を指向したものであり、無極性溶媒を移動相に用いる HPLC に利用できる充填剤はほとんど開発されていない。筆者は、今回の研究に先立ち、ポルフィリン類縁化合物である金属フタロシアニン誘導体を固定化したシリカゲル (M-PCS_s) 充填カラム及び銅 tetrakis(4-carboxy)phenylporphine (CuTCPP) 固定化シリカゲルが、極性及び無極性溶媒を移動相とする系においても、PAHs の分離に利用できることを明らかにしてきた。この時、無極性、極性、どちらの移動相を用いても PAHs の分離には、主に π 電子の関与する相互作用が分離機構として働いていることも明らかにした。また、Cu-TCPP 固定化シリカゲルを用いると理論段数において改善が認められた。

2. 研究の目的

ポルフィリンのピロール環を八臭素化 (八臭素化TCPPをOBTCと略す。また、図1に示すようなCu-OBTMPyPも用いた) すれば、ポルフィリン環は平面性を失い歪むという報告もあり、Cu-OBTCは、平面性の高いPAHsなどの分離の際、適度な π 電子相互作用をもたらす、テーリング及び理論段数において改善をもたらすことができる可能性があり、実用的な新規充填剤として期待できる。PAHs の実用的な分離分析に役立つHPLC用カラムを開発する。

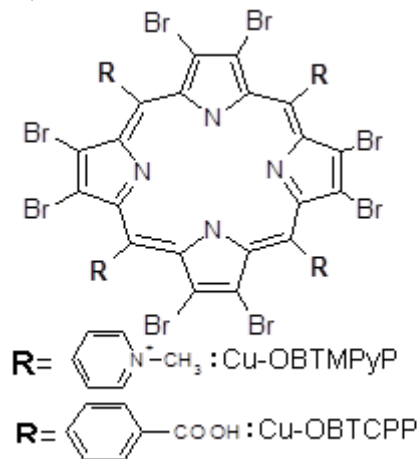


Fig.1 八臭素化ポルフィリンの構造

3. 研究の方法

(1) 金属 OBTC 固定化シリカゲルの調製法の確立

(2) 中心金属影響を検討

(3) 置換基のない多環芳香族炭化水素 (PAHs) を試料として、調製したシリカゲルの性能評価 (市販カラムとの比較も含む)

(4) 未反応極性基への修飾の影響の検討
なお、(4) の検討には、調製が容易な Cu-OBTMPyP 固定化陽イオン交換シリカゲル (Cu-OBTM_N) と 5 種の 4 級アンモニウム塩を用い、最初に検討し、最終的に Cu-OBTC_D と、無水条件下、対応する酸クロライドあるいは 2 種のシリル化剤を用いて検討した。検討には、HPLC ポンプ : JASCO PU-2089 Plus, 検出器 : JASCO-MD-2015Plus を用いた。無極性移動相には hexane を、極性移動相には 80%metanol を、流速 0.5 mL/min を用いた。試料 PAH としては benzene, naphthalene, anthracene, phenanthrene, pyrene 及び triphenylene を単独あるいはこれらを混合した 6 mix を用いた。

4. 研究成果

Cu-OBTC_D の中心金属の影響を見ることとし (M-OBTC_D, M=H₂, Cu²⁺, Zn²⁺, Ni²⁺, Co³⁺, Mn³⁺), M-OBTC_D カラム (φ 4.0×50 mm) の極性移動相及び無極性移動相での PAHs の分離挙動を検討した。その結果、検討したなかで、Zn-OBTCPP_D が、無極性移動相で、新規 HPLC 用充填剤として利用できる可能性が高いことがわかった。次いで、Zn-OBTC_D カラムが、Cu-OBTC_D カラムより優れたカラムであることを確認するため、実用的な長さのカラムである Zn-OBTC_D カラム (φ 4.6×150 mm) の無極性移動相での PAHs の分離挙動などを検討した。その結果、Zn-OBTC_D カラムが、Cu-OBTC_D カラムよりも優れた点を持つカラムであることがわかった。

ついで、シリカゲル上にはポルフィリンと未結合の極性基が多数残存しており、この残存極性基による試料との相互作用が、試料の分離に影響を与えられられる。そこで、ポルフィリンと未結合の極性基に注目し、無極性移動相中で使用できる新規 HPLC 用充填剤の開発を目的に、残存極性基を修飾した Cu-八臭素化ポルフィリン固定化シリカゲルの検討を行った。

(1) Cu-OBTM_N の残存スルホン酸基修飾がクロマトグラムに与える影響

まず、調製が容易な Cu-OBTM_N 用いた、無極性移動相における極性基修飾の影響を見るため、6 mix の分離を無極性移動相で検討した。その結果、用いた 4 級アンモニウム

のいずれで修飾しても、極性基修飾により、それぞれのカラムで PAH の保持時間の延長が見られた。これは、スルホン酸基の持つ負電荷が、修飾によりカバーされ、PAH の π 電子との反発が低下したためと考えられる。また、修飾する alkyl 基の長さも PAH 分離に影響を与える要因のひとつであると考えられる。次いで、極性移動相における極性基修飾の影響を 6 mix のクロマトグラムの比較により検討した。その結果、各修飾カラムで各々の PAH の保持時間の延長が見られた。これは、修飾化合物の alkyl 基により π -alkyl 相互作用が付加されたためと考えられる。この際、適当な長さの alkyl 基を持つ化合物を用いて極性基を修飾すれば、PAH の分離が向上することもわかった。

(2) Cu-OBTCPP_D の残存アミノ基のアシル化の影響

無極性移動相において Cu-OBTCPP_D カラムでは、6 mix は 5 本のピークに分離した。残存アミノプロピル基のアシルクロライドによる修飾（アシル化）を試みた。6 mix の保持時間はやや短縮した。一方、acetyl (Ace) や pivaloyl 基でアシル化したとき、保持は延長傾向となった。これは、修飾によりアミノプロピル基がアシル化でカバーされ、PAH との静電的相互作用が低下するが、Ace や pivaloyl 基は、Dec 基と異なりポルフィリン周辺の電子密度が上昇させポルフィリンの π 電子雲が拡大したと同じ効果、すなわち、分散力の増加をもたらしたためと考えた。また、Cu-OBTCPP_D カラムと修飾カラムとの間に、いずれの場合においても、 k 値に一次の相関が認められるため、修飾により分散力の増加による PAH の保持の増強のみで、新たな分離機構の付加はないと考えた。極性移動相中では、Dec でアシル化したとき 6 mix の分離が向上したが、Ace によるアシル化では、特に変化は見られなかった。Cu-OBTCPP_D-Dec カラムと Cu-OBTCPP_D カラムに一次の相関が見られないことから、Dec 修飾により新たな相互作用が付加されたことがわかった。一方、Cu-OBTCPP_D-Ace カラムでは一次の相関が見られることから、Dec のようなある程度の長さの alkyl 基を持つ化合物でアシル化したとき、 π -alkyl 相互作用を付加できると考えられる。

(3) Cu-OBTCPP_D のシリル化の影響

修飾前の Cu-OBTCPP_D カラムでは、5 本観測された 6 mix のクロマトグラムのピーク数は、*N*-trimethylsilylimidazole (TMSI) 処理でシラノール基の修飾を行うことでそれぞれの PAH 試料の保持時間は短くなりピーク数は 4 本に減少した。また、それぞれの PAH 試料の保持時間は短

くなった。一方、trimethylchlorosilane (TMCS) 処理によりシラノール基とアミノプロピル基の両方を修飾することで、PAH の保持時間は TMSI 処理時ほどではないがやや短縮し、ピークは 6 本観測され、6 mix の分離の向上が見られた。さらに、Dec や Ace でアシル化を施した後シリル化を行ったとき、いずれのアシル化剤の場合でも、シリル化が PAH の分離挙動に与える影響の傾向はアシル化のない場合と同様であった。しかし、アシル化の影響により、Dec で修飾したカラムは、アシル化なしのものよりも保持が弱く、Ace でアシル化したカラムは保持が強かった。そのため、TMCS 化 Cu-OBTCPP_D-Dec カラムは、TMCS 化 Cu-OBTCPP_D カラムより、保持時間が短い上に 6 mix の分離も良好であった。このことから、TMCS 化 Cu-OBTCPP_D-Dec カラムは、短時間で試料を効率よく分離できるカラムであると思われる (Fig.2)。

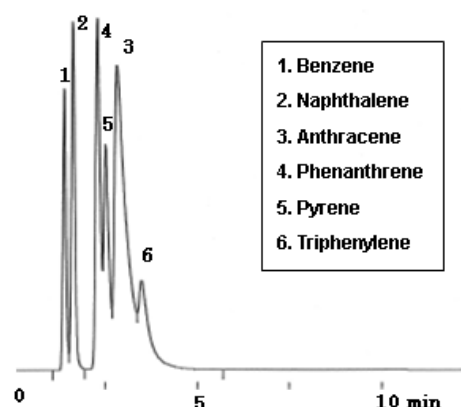


Fig.2 TMCS+Cu-OBTCPP_D-Dec カラムによる 6 mix のクロマトグラム

また、Cu-OBTCPP_D に TMSI でシラノール基のみをシリル化した後、TMCS でシラノール基とアミノプロピル基の両方にシリル化処理を行った。すると、TMSI 処理により PAH の保持が短くなったが、TMCS 処理後には保持時間が長くなった。また、その保持時間は TMCS 処理のみの場合よりも長かった。一方、Cu-OBTCPP_D-Dec でも 2 種類のシリル化剤でシリル化を行ったが、同様の傾向が見られた。これは一度だけのアシル化では未反応のアミノ基が残存しそのアミノ基の trimethylsilyl 化による電子密度の増加のもたらすポルフィリンの π 電子雲の拡大によるものと考えられる。さらに、シリル化やアシル化を行っても、Cu-OBTCPP の持つ相互作用が分離に関与していることを確かめるために、移動相に benzene を添加して pyrene の保持係数を検討した。その結果、benzene の添加量が増えるにしたがって pyrene の

保持が弱くなった。このことは、修飾しても Cu-OBTCPP の持つ相互作用が分離に関与していることを示している。さらに、修飾が極性を持つ物質の保持係数に及ぼす影響を明らかにするため、nitrobenzene の保持係数を種々のカラムで検討した。いずれのカラムでも TMCS 化すれば、保持係数が小さくなることが分かった。このことは、NH₂ 基や OH 基を修飾すれば、これらの基と pyrene との静電的相互作用が減少することを示している。

【総括】以上の検討から、短時間で試料を分離することのできる TMCS 化 Cu-OBTCPP_D-Dec カラムを開発し、その試料との相互作用を明らかにすることができた。今後、このカラムが医薬品などの π 電子を持つ試料を分離する HPLC 充填剤として利用されることを期待する。

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 2 件)

① Kitamura Y., *Mifune M., Takatsuki T., Iwasaki T., Kawamoto M., Iwado A., Chikuma M. and Saito Y., Ion-Exchange Resins Modified with Metal-Porphyrin as a Catalysis for Oxidation of Epinephrine (Adrenaline), Catalysis Communications, 9(2), 224-228 (2008)

② M. Mifune, A. Iwado, M. Taniguchi, S. Kamino, S. Enomoto, Photometric Study on the reaction between 2,3,7,8,12,13,17,18-Octabromo-5,10,15,20-tetrakis-(4-methylpyridyl)porphine and various metal ions, Yakugakuzasshi, 131(8), 掲載決定. (2011)

[学会発表] (計 2 件)

① 御船正樹、岩藤章正、北村陽二、巽 朝菜、神野伸一郎、榎本秀一、金属イオン捕集剤としての octabromo-tetrakis(*p*-carboxy)-phenylporphine 担持陰イオン交換樹脂の可能性、日本薬学会第 131 年会、2011 年 3 月 30 日、静岡

② 清水貴子、中島由香里、横山直子、森 勝也、清水隆也、北村陽二、御船正樹、斎藤 寛、金属-八臭素化ポルフィリン固定化シリカゲルの残存極性基修飾とその HPLC に及ぼす影響、第 47 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会、2008 年 11 月 9 日、岡山

6. 研究組織

(1) 研究代表者

御船 正樹 (MIFUNE MASAKI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：00200105

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし