

分子認識能を有する新規包接化合物の開発と液／液二相系反応
および抽出・分離プロセスへの応用(1)
—新規フルオラスレゾルシンアレーンの合成と分子包接特性—

日大生産工 清水正一

1. 緒言

フルオラス溶媒, 超臨界流体, イオン性液体などの新しい反応溶媒は, グリーンケミストリーを指向した反応プロセスを構築する上で, 大きな貢献が期待されている。特にフルオラス溶媒は, Horváth ら¹がフルオラス配位子からなるロジウム錯体触媒と組み合わせてオレフィンのヒドロホルミル化に用いて以来, その有効性が広く認められ, フルオラスな基質や反応剤をも含めてフルオラスケミストリーとして爆発的に広がってきた。これらの研究で取り扱われているフルオラス化合物を利用法から分類すると, 溶媒を除きほぼ次の4つに限られている。(1)フルオラス触媒^{2,3,4}, (2)フルオラス反応剤⁵, (3)フルオラス・タグ^{6,7}, (4)フェイズスクリーン⁸である。最近, これらに加えて, フルオラス界面活性剤が開発され, 超臨界二酸化炭素中での反応を促進する添加剤となることが Kobayashi ら⁹によって報告された。しかしながら, フルオラスケミストリーで用いることができるツールはまだ限定されたものにとどまり, フルオラスケミストリーの潜在性はまだ十分には解明されていない。

そこで本研究では, フルオラスケミストリーに超分子という新しいツールを提供することによりその潜在性を引き出す目的で, フルオラス溶媒中で機能する新規包接化合物(フルオラスカリックスアレーン)を開発する。この包接化合物は, 従来のフルオラス溶媒を用いた液／液二相系では実現が不可能であった反応において触媒として機能することが期待される。さらには, 新しい抽出・分離プロセスの創成へも貢献できるものと考えられ, これらの応用についても順次取り組む予定である。

今回はこの基本コンセプトに基づき, パーフルオロアルキル基を有する FIGURE 1 に例示した構造のカリックス[4]レゾルシンアレーンをデザインし, その合成を試みた。得られたフルオラスレゾルシンアレーンはフルオラス溶媒に溶解し, 今までにない包接能を示したので報告する。

2. 結果および考察

フルオラスレゾルシンアレーン **1a-c** は, それぞれ対応するフルオラスアルデヒドとレゾルシノールとの酸触媒環化縮合反応により, 53-68%の比較的良好な収率で得られた (FIGURE 1)。通常フッ素化されていないウンデシル基を有するレゾルシンアレーン **1d** は既往の文献¹⁰に従って合成した(FIGURE 1)。**2a** および **2b** は, それぞれ **1a** および **1b** の臭素化, 求核置換反応による環化¹¹の2段階で合成した。**3a-c** は, DMF/ベンゾトリフルオリド(BTF)の混合溶媒を

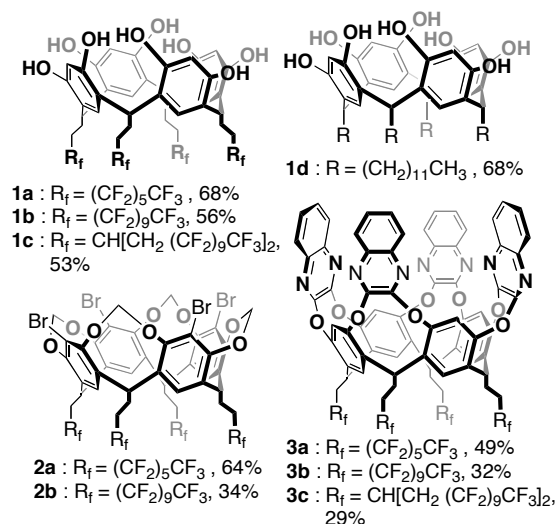


FIGURE 1. Structures of Resorcinarenes and Their Derivatives.

TABLE 1. The Solubility of Resorcinarenes and Their Derivatives^a

Solvent	1a	1b	1c	2a	2b	3a	3b	3c
Methanol	++	+-	-	-	-	-	-	-
Ethyl acetate	++	+-	-	++	-	+	-	-
Chloroform	-	-	-	++	+	++	+	-
Hexane	-	-	-	-	-	-	-	-
HFE-7100	-	-	++	-	-	-	-	-
FC-72	-	-	++	-	-	-	-	+

^a ++: soluble at room temperature, +-: soluble by heating, +: partially soluble, -: insoluble.

用い、 Cs_2CO_3 を塩基として **1a-c** に 2,3-ジクロロキノキサリンを反応させることによって合成した。このようにして得られた **1a-c**, **2a**, **2b**, および **3a-c** の各種有機溶媒に対する溶解性を調べ、TABLE 1 に示した。**1a** はメタノールおよび酢酸エチルに室温で溶解した。これに対し、**1c** は汎用される有機溶媒には全く溶けずに、フルオラス溶媒であるパーフルオロブチルメチルエーテル(HFE-7100)やパーフルオロヘキサン(FC-72)に溶解した。**1c** の水酸基を他の置換基へ変換し、疎水性を向上させたキノキサリン誘導体 **3c** でも、フルオラス溶媒への溶解性は **1c** よりも低かった。これは、誘導体とすることで分子内のフッ素含有率が低下したため、フルオラス溶媒へ溶解しにくくなったものと推察される。フルオラス溶媒への溶解性は疎水性を向上させても効果がなく、ほぼフッ素含有率に依存することが確かめられた。

次に、**1c** はフルオラス溶媒に対して良好な溶解性を示したのでフルオラス溶媒中での包接能を測定し、既に報告されている **1d**¹² と比較した。FC-72/HFE-7100 (6:4 (v/v))の混合溶媒に化合物 **1c** を溶解させ、これにゲスト分子として 3,3-ジメチル-1-ブタノールを加え、この混合溶媒中での ¹H NMR スペクトルを測定した(FIGURE

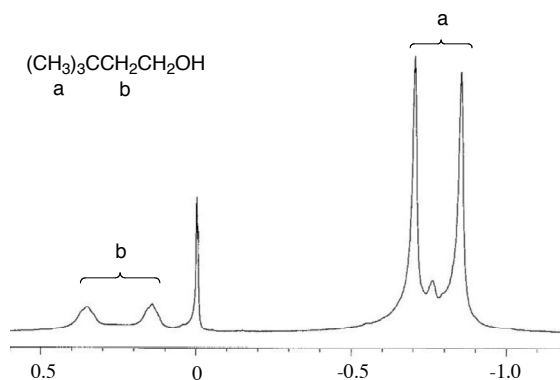


FIGURE 2. High field of the ¹H NMR spectra of **1c**⊃ G_A complex in 60% FC-72 at 25 °C. Absorptions H_a , H_b are for G_A bound with **1c**.

2)。3,3-ジメチル-1-ブタノールのメチル基のプロトン H_a (s, s)およびメチレンプロトン H_b (t, t) に帰属されるシグナルがそれぞれ - 0.70 ppm, - 0.85 ppm および 0.36 ppm, 0.15 ppm に新たに高磁場シフトして現れた。包接されていないアルコールは、それぞれ 0.88 ppm および 1.46 ppm に現れることから、この高磁場シフトはアルコールが包接されていることに因るものである。すなわち、**1c** がフルオラス溶媒中で包接化合物として機能したことを示しており、フルオラス溶媒中での包接の最初の例である。次に、化合物 **1c** による 3,3-ジメチル-1-ブタノールの包接についてのジョブプロットを作成した(FIGURE 3)。図中の $[1c \supset G_A]$ は **1c** と 3,3-ジメチル-1-ブタノールの会合体のモル濃度(mol/L)を表す。 $f_{1c} = 0.5$ の時、最大値を示したことから、**1c** は FC-

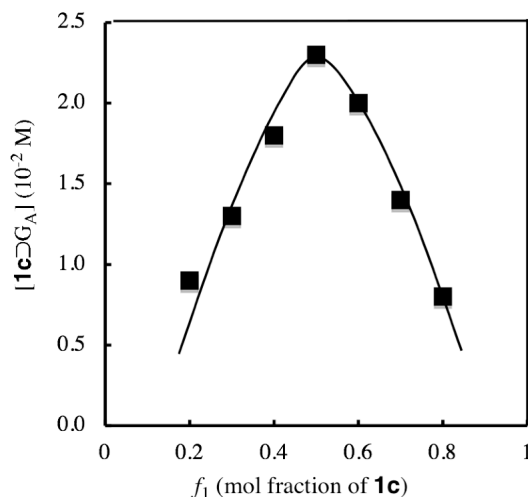


FIGURE 3. Job plots of $[1c \supset G_A]$ vs mole fractions of **1c** for the complexation of **1c** and G_A in 60% FC-72 at 25 °C under conditions where $[1c]_t + [G_A]_t$ is maintained at 5.0×10^{-2} M

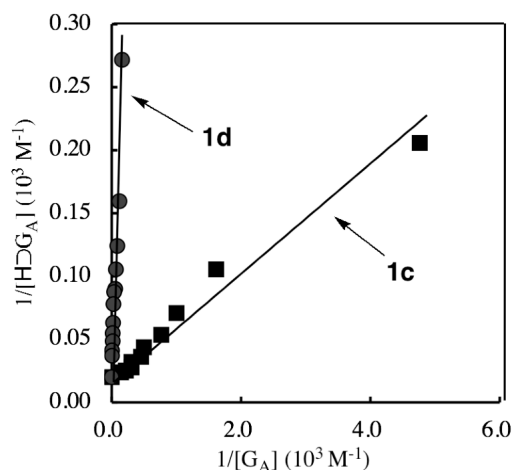


FIGURE 4. Scatchard plots of $1/[H \supset G_A]$ vs $1/[G_A]$.

TABLE 2. Binding Constants (K_a) for the Complexation of Host **1c or **1d** with 3,3-Dimethyl-1-Bbutanol^a**

Host	Solvents	T (°C)	K_a (M ⁻¹)
1c	60% FC-72, 40% HFE-7100	25	488
1d^b	Chloroform	25	14

^a [**1c**], [**1d**] = 50×10^{-3} M. ^b See ref 12.

72/HFE-7100 (6:4(v/v)) 混合溶媒中, 3,3-ジメチル-1-ブタノールと 1 対 1 の会合体を形成することが明らかとなった。さらに, 有機溶媒とフルオラス溶媒中での会合定数 K_a を比較して, フルオラス溶媒中での相互作用について検討した。FC-72/HFE-7100 (6:4 (v/v))混合溶媒中, **1c** と 3,3-ジメチル-1-ブタノールの会合定数 K_a は Scatchard プロット(FIGURE 4) の傾きから求めた。さらに, 重クロロホルム中での **1d** と 3,3-ジメチル-1-ブタノールの会合定数 K_a も同様にして求めた。このようにして求めた会合定数 K_a を TABLE 2 に示した。**1d** の重クロロホルム中での会合定数が 14 (文献値¹² 13)であるのに対して, フルオラス溶媒中での **1c** の会合定数は 488 であり, 35 倍の大きさであった。これは, 疎フルオラス性効果^{13,14,15} によってゲスト分子がよりレゾルシンアレーンの疎水性空孔に取り込まれやすくなったためと考えられる。すなわち, フルオラス溶媒中での包接においては, 一般的な水素結合や CH/ π 相互作用に加え, 疎フルオラス性効果が働き, より高い分子包接能および分子認識能を有する包接化合物の開発が期待できることが確かめられた。

3. 実験

3.1. 試薬

1a および **1b** の原料となるアルデヒド **4a** および **4b** の合成は既住の文献^{16,17} を参考にして行った(SCHEME 1)。**4c** は **5b** の脱ハロゲン化¹⁸, パーフルオロアルキルヨージドとのラジカル反応¹⁹, アリルトリブチルスズとのラジカルクロスカップリング反応¹⁹, ジシクロヘキシルボランを用いたヒドロホウ素化-酸化, Dess-Martin ペルヨージナンを用いた酸化反応¹⁷により合成した(SCHEME 2)。

1a: mp 269–272 °C; ¹H NMR (400 MHz, CD₃COCD₃) δ 8.53 (s, 8H), 7.66 (s, 4H), 6.32 (s, 4H), 4.48 (t, $J = 7.8$, 4H), 2.62 (m, 8H), 2.18 (m, 8H); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃SOCD₃) δ 153.0, 125.0, 121.1, 102.5, 32.5, 29.2(t, $J_{CF} = 22.5$ Hz, 4H), 26.4;

IR (KBr) ν 3365, 2981, 2952, 1619, 1508, 1438, 1237, 1204, 1146, 1121, 1080, 1028, 905, 847, 812, 783, 734, 700, 656 cm⁻¹.

1b: ¹H NMR (400 MHz, C₆F₆/CD₃COCD₃, 1/3, (v/v)) δ 8.53 (s, 8H), 7.68 (s, 4H), 6.18 (s, 4H), 4.43 (t, $J = 7.4$ Hz, 4H), 2.75–2.65 (m, 8H), 2.12–2.32 (m, 8H); IR (KBr) ν 3332, 2953, 1506, 1443, 1374, 1210, 1152, 1109, 1087, 1030, 990, 898, 843, 665 cm⁻¹.

1c: ¹H NMR (400 MHz, CD₃COCD₃/C₆F₆, 3:1 (v/v)) δ 8.49 (s, 8H), 7.37 (s, 4H), 6.22 (s, 4H), 4.42 (t, $J = 7.5$ Hz, 4H), 2.35–2.68 (m, 28H), 1.68–1.82 (m, 8H); partial ¹³C NMR (100 MHz, CD₃COCD₃/C₆F₆, 2:1 (v/v)) δ 153.9, 125.1, 125.0, 104.7, 35.9 (t, $J_{CF} = 20.6$ Hz), 35.2, 34.6, 32.1, 26.9; IR (KBr) ν 3250, 2946, 2874, 1621, 1503, 1445, 1205, 1114, 901, 710 cm⁻¹.

2a: ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.01 (s, 4H), 5.99 (d, $J = 7.4$ Hz, 4H), 4.94 (t, $J = 8.1$ Hz, 4H), 4.41 (d, $J = 7.4$ Hz, 4H), 2.45–2.62 (m, 8H), 2.03–2.20 (m, 8H); IR (KBr) ν 2962, 1472, 1453, 1238, 1208, 1145, 1017, 960, 811, 793, 732 cm⁻¹.

2b: ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃/C₆F₆, 3:1 (v/v)) δ 7.28 (s, 4H), 5.99 (d, $J = 7.4$ Hz, 4H), 5.06 (t, $J = 8.0$ Hz, 4H), 4.49 (d, $J = 7.4$ Hz, 4H), 2.70–2.74 (m, 8H), 2.22–2.31 (m, 8H); IR (KBr) ν 2962, 1559, 1507, 1456, 1419, 1211, 1152, 1089, 1018, 955, 803, 664 cm⁻¹.

3a: ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.23 (s, 4H), 7.77–7.82 (m, 8H), 7.46–7.55 (m, 8H), 7.22 (s, 4H), 5.77 (t, $J = 8.2$ Hz, 4H), 2.32–2.38 (m, 8H), 2.07–2.15 (m, 8H); IR (KBr) ν 3079, 2966, 1486, 1419, 1338, 1239, 1120, 1027, 896, 811, 759, 699, 656, 606 cm⁻¹.

3b: ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃/C₆F₆, 2 : 5 (v/v)) δ 8.11 (s, 4H), 7.84–7.94 (m, 8H), 7.58–7.68 (m, 8H, and s, 4H), 6.04 (t, $J = 8.1$ Hz, 4H), 2.91–3.02 (m, 8H), 2.43–2.61 (m, 8H); IR (KBr) ν 3079, 2966, 1487, 1420, 1339, 1214, 1154, 897, 759, 529 cm⁻¹.

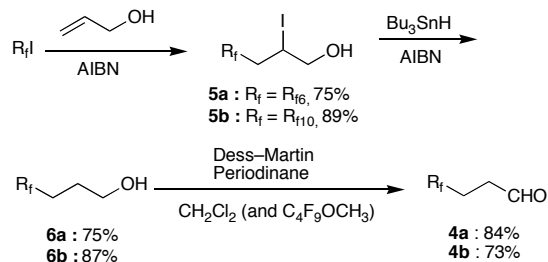
3c: ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃/C₆F₆, 3:1 (v/v)) δ 8.13 (s, 4H), 7.84–7.89 (m, 8H), 7.55–7.60 (m, 8H), 7.43 (s, 4H), 5.97 (t, $J = 8.1$ Hz, 4H), 2.78–2.89 (m, 4H), 2.40–2.68 (m, 24H), 1.90–2.04 (m, 8H); IR (KBr) ν 2966, 2870, 1419, 1339, 1214, 1151, 897, 763 cm⁻¹.

4c: ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃/C₆F₆, 1:1 (v/v)) δ 9.87 (s, 1H), 2.70–2.57 (m, 3H), 2.55–2.25 (m, 4H), 2.10–2.00 (m, 2H); partial ¹³C NMR (100 MHz, CD₃COCD₃/C₆F₆, 2:1 (v/v)) δ 199.7, 40.8, 34.6 (t, J_{CF}

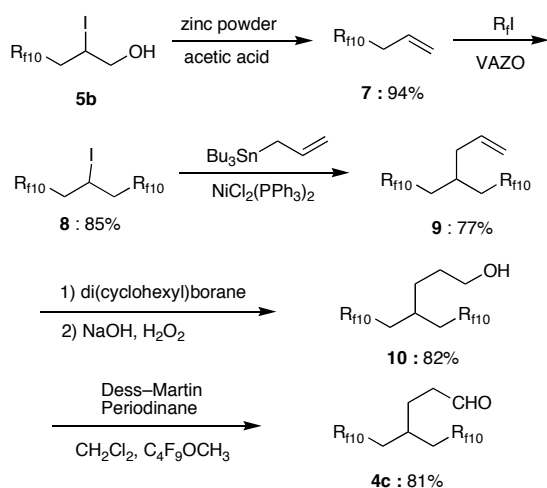
= 21.1 Hz), 26.9, 25.6; IR (KBr) ν 2932, 2853, 2748, 1731, 1216, 1151, 1020, 902 cm^{-1} .

10: ^1H NMR (400 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{C}_6\text{F}_6$, 3:1 (v/v)) δ 3.85–3.70 (m, 2H), 2.59–2.50 (m, 1H), 2.40–2.20 (m, 4H), 1.85–1.65 (m, 4H), 1.35 (s, 1H); partial ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{CD}_3\text{COCD}_3/\text{C}_6\text{F}_6$, 2:1 (v/v)) δ 63.9, 36.0 (t, $J_{\text{CF}} = 21.1$ Hz), 32.7, 30.7, 27.2; IR (KBr) ν 3377, 2938, 2872, 1214, 1154, 1071, 903 cm^{-1} .

SCHEME 1



SCHEME 2



3. 2. 装置

NMR スペクトルの測定には、Burker Avance-400s を用いた。基準物質にはテトラメチルシラン(TMS)を用い、400 MHz (^1H), 100 MHz (^{13}C)で測定した。IR スペクトルは、Bio-Rad FTS-60A を用い、KBr 錠剤法で測定した。

3. 3. 会合定数およびジョブプロット

会合定数は**1c**あるいは**1d**の50 mM溶液に、5.0–100 mM の濃度になるように 3,3-ジメチル-1-ブタノールを加えて測定した。ジョブプロットには、**1c**と 3,3-ジメチル-1-ブタノールの全濃度を 50 mM に保ち、異なるモル分率でそれぞれ測定した結果を用いた。 $[\text{HODG}_A]$ は、その ^1H NMR スペクトルにおいて **1c**あるいは**1d**の芳香族プロトンと包接された 3,3-ジメチル-1-ブタノール

のメチル基プロトンの積分強度から計算により求めた。

参考文献

- Horváth, I. T.; Rábai, J. *Science* **1994**, *266*, 72–75.
- Xiang, J.; Toyoshima, S.; Orita, A.; Otera, J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3670–3672.
- Wende, M.; Meier, R.; Gladysz, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 11490–11491.
- Ishihara, K.; Kondo, S.; Yamamoto, H. *Synlett* **2001**, 1371–1374.
- Curran, D. P.; Hadida, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 2531–2532.
- Studer, A.; Hadida, S.; Ferritto, R.; Kim, S.-Y.; Jeger, P.; Wipf, P.; Curran, D. P. *Science*, **1997**, *275*, 823–826.
- Miura, T.; Hirose, Y.; Ohmae, M.; Inazu, T. *Org. Lett.* **2001**, *3*, 3947–3950.
- Nakamura, H.; Usui, T.; Kuroda, H.; Ryu, I.; Matsubara, H.; Yasuda, S.; Curran, D. P. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 1167–1169.
- Komoto, I.; Kobayashi, S. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 680–688.
- Tunstad, L. M.; Tucker, J. A.; Dalcanale, E.; Weiser, J.; Bryant, J. A.; Sherman, J. C.; Helgeson, R. C.; Knobler, C. B.; Cram, D. J. *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 1305–1312.
- Cram, D. J.; Karbach, S.; Kim, H.-E.; Knobler, C. B.; Maverick, E. F.; Ericson, J. L.; Helgeson, R. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 2229–2237.
- Kobayashi, K.; Asakawa, Y.; Kikuchi, Y.; Toi, H.; Aoyama, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 2648–2654.
- Myers, K. E.; Kumar, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 12025–12026.
- Leeder, S. M.; Gagué, M. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 9048–9054.
- Martin, O. M.; Yu, L.; Mecozzi, S. *Chem. Commun.* **2005**, 4964–4966.
- Alvey, L. J.; Meier, R.; Soós, T.; Bernatis, P.; Gladysz, J. A. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2000**, 1975–1983.
- Rocaboy, C.; Bauer, W.; Gladysz, J. A. *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 2621–2628.
- Gambaretto, G.; Conte, L.; Fornasieri, G.; Zarantonello, C.; Tonei, D.; Sassi, A.; Bertani, R. *J. Fluorine Chem.* **2003**, *121*, 57–63.
- Wende, M.; Seidel, F.; Gladysz, J. A. *J. Fluorine Chem.* **2003**, *124*, 45–54.

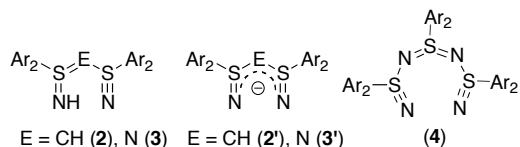
高選択的分離を指向した機能性材料の創製

—新規スルファンニトリル配位子の設計と合成—

日大生産工 ○藤井 孝宜・平田 光男

1 緒言

硫黄-窒素三重 (S≡N) 結合を有する λ^6 -スルファンニトリル類は非常に珍しい化合物であり、このような化合物の存在はあまり認識されていない。これまでにフルオロ- λ^6 -スルファンニトリル (FS≡N) やトリフルオロ- λ^6 -スルファンニトリル (F₃S≡N) のような含フッ素化合物として少し知られていたが¹⁾、有機化合物としてはその合成法がなかったためか殆ど研究が行われていなかった。最近我々は、*S, S*-ジフェニル-*N*-ハロスルフィミドをフッ化物イオンと反応させることにより、対応するフルオロ (ジフェニル)- λ^6 -スルファンニトリル (Ph₂FS≡N) (1) を得る方法を初めて見出し、さらに化合物 1 より、種々の官能基を有する λ^6 -スルファンニトリルの合成に成功し、それらの反応性や構造について興味ある知見を蓄積している²⁾。本プロジェクト研究では、有価金属の高選択的分離並びに微量分析が可能な新規配位子を開発することを目的に、硫黄-窒素三重結合の窒素原子の配位能力を活用し、さらに末端にイミン窒素を備え持つ新規スルファンニトリル配位子 2, 3 および両端に S≡N 結合を有する配位子 4 を設計・合成する。配位子 2-4 は、硫黄上に様々なアリアル基が導入できることから、チューニング機能を持った中性およびアニオン性 (2', 3') キレート剤として利用できることが期待できる。本発表では、新規配位子 2-4 の合成方法について主に報告する。



2 実験

ジフェニルスルフィイミド, ジフェニルスルフィミド, フルオロ (ジフェニル)- λ^6 -スルファンニトリル (1), メチル (ジフェニル)- λ^6 -スルファンニトリルは、既知の方法で合成した²⁾。

2.1 Ph₂(HN=)S=CH-(Ph₂)S≡N (2) の合成

メチル (ジフェニル)- λ^6 -スルファンニトリル (4.0 mmol) の -78 °C, テトラフラン (THF) 溶液にリチウムジイソプロピルアミド (8.4 mmol) を滴下し, 30分間攪拌した。化合物 1 の THF 溶液を反応溶液に加え 12 時間攪拌後, 室温まで昇温した。反応を 10% 過塩素酸で停止し, ジクロロメタンで抽出した。溶媒除去後, 得られた化合物をエタノール/エーテル混合液で再結晶することにより, 化合物 2 の過塩素酸塩を 66% の収率で得た。次に, 得られた過塩素酸塩をメタノールに溶解し, 塩基性イオン交換樹脂 (Amberlite IRA-410) で処理することにより, 化合物 2 を 98% の収率で得た。

2.2 Ph₂(HN=)S=CH-(Ph₂)S≡N (3) の合成

ジフェニルスルホジイミドのナトリウム塩 (3.0 mmol) と化合物 1 とをベンゼン還流条件下で 12 時間反応させた。反応終了後, 酸処理を行い, 化合物 3 の過塩素酸塩を得た後, 塩基性イオン交換樹脂 (Amberlite IRA-410) で処理し, アセトン/ヘキサンで再結晶することにより, 化合物 3 を 70% の収率で得た。

2.3 Ph₂S(=N-(Ph₂)S≡N)₂ (4) の合成

ジフェニルスルフィイミド (1.0 mmol) と 5 当量の化合物 1 とを 1, 8-ジアザビシクロ [5. 4. 0] ウンデカ-7-エン存在下, アセトニトリル中, 50 °C で 18 時間反応させた。反応終了後, 酸処理を行い, 化合物 4 の過塩素酸塩を得た後, 塩基性イオン交換樹脂 (Amberlite IRA-410) で処理することにより, 化合物 4 を 97% の収率で得た。

Design and Synthesis of Novel Functional Materials Directed toward High Selective Separation

— Design and Synthesis of Novel Sulfanenitrile Ligands —

Takayoshi FUJII and Mitsuo HIRATA

3 結果と考察

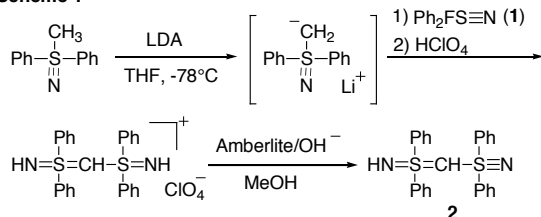
3.1 新規スルファンニトリル二座配位子の設計

硫黄-窒素三重結合を配位部位に活用した新規スルファンニトリル配位子は、現在、配位化学の分野で数多く用いられている β -ジケトン、 α -エナミノケトン、および β -ジケチミン二座配位子をモチーフとして、化合物 **2**, **3** を設計した。また、両端にチアジル基 ($S\equiv N$) をもち、配位金属のサイズ効果を考慮した化合物 **4** を設計した。

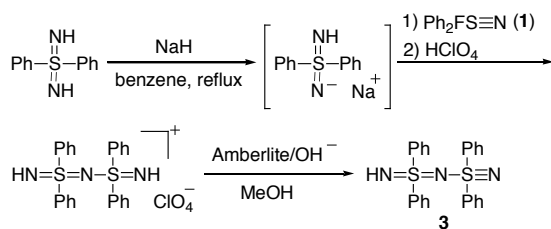
3.2 二座配位子 2-4 の合成

化合物 **2-4** の合成は、フッ素原子と容易に置換が可能であるフルオロ- λ^6 -スルファンニトリル **1** を鍵化合物として行った。すなわち、化合物 **2** は、メチル(ジフェニル)- λ^6 -スルファンニトリルの α -炭素の反応性を利用し、また、化合物 **3** は、ジフェニルスルフィイミノアニオンと化合物 **1** とを反応させることにより合成を行った (Scheme 1, 2)。

Scheme 1



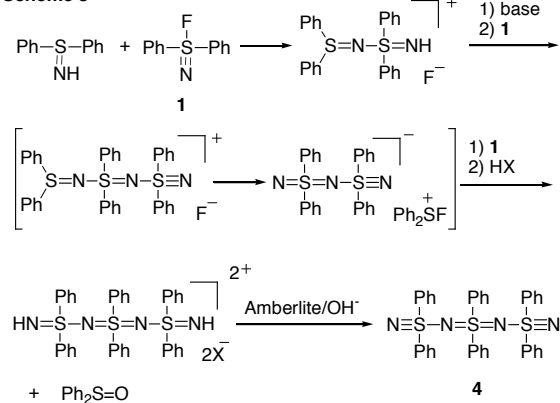
Scheme 2



次に、化合物 **4** の合成を検討した。化合物 **4** は、化合物 **1** と化合物 **3** とをアセトニトリル中、 40°C で反応させることにより、57%の収率で得ることができたが、興味深いことに、 $\text{Ph}_2\text{S}=\text{N}-(\text{Ph}_2)\text{S}\equiv\text{N}$ (**5**) と過剰量の化合物 **1** とを反応させることで、化合物 **4** が得られた (収率 12%)。化合物 **5** は、ジフェニルスルフィミドと化合物 **1** との反応から合成できることから³⁾、この反応で化合物 **1** を大過剰にすることで、1 ポット反応で化合物 **4** を得ることが期待できる。実際、ジフェニルスルフィミドと 5 当量の化合物 **1** とをアセトニトリル中、 50°C で 48 時間反応させ、酸抽出処理により副生成物を除いた後、塩基性イオン交換樹脂で処理することにより、化合物 **4** が 54%の収

率で得られた。反応機構について、種々検討したところ、反応途中で生成する共役酸が反応を阻害することが分かった。そこで、反応系中に 1,8-ビスクロ[5.4.0]ウンデカ-7-エンを加え同条件下で 18 時間反応を行ったところ、目的生成物 **4** を 97%の収率で得ることに成功した (Scheme 3)。

Scheme 3



化合物 **2-4** の同定は、 ^1H -, ^{13}C -NMR, IR および、元素分析により行い、さらに化合物 **3**, **4** の分子構造を X 線構造解析により明らかにした。

現在、化合物 **2-4** をキレート剤とし、種々の遷移金属との錯形成について検討しているため、その結果についても報告する。

4 まとめ

硫黄-窒素三重結合を鍵とする新規二座配位子 **2-4** を設計し、それらの合成方法を確立した。今後は、得られた配位子と各種遷移金属との錯形成を試みると共に、得られた錯体の安定度定数や酸化還元電位を測定し、化学種変換分離システムや水性二相高速交流クロマトグラフィーの有効なキレート剤としての探究を行う。

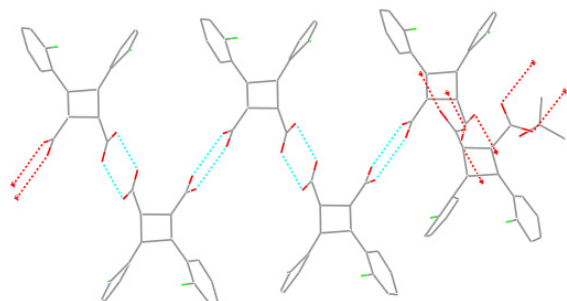
「参考文献」

- 1) O. Glemser and R. Mews, *Angew. Chem., Int. Ed.* **19**, 833 (1980).
- 2) T. Fujii and T. Yoshimura, et al., *Chem. Lett.*, **2002**, 1000, *Tetrahedron Lett.*, **42**, 6151 (2001), *Tetrahedron Lett.*, **42**, 5041 (2001), *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **74**, 945 (2001), *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **71**, 1629 (1998), *J. Org. Chem.*, **62**, 3810 (1997).
- 3) M. Ohkubo, T. Fujii, S. Ono, H. Morita, T. Yoshimura, E. Horn, and S., *Chem. Lett.* **1997**, 153.

ケイ皮酸誘導体クラスレートの合成と特性

日大生産工 ○杉山 邦夫

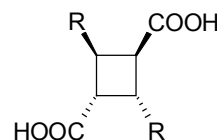
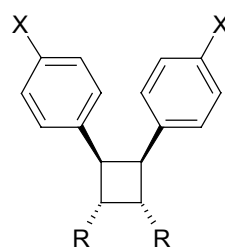
【序】近年、クラスレートを用いた研究は急速に拡大し様々な分野で利用されている。中でも立体選択性を活用した分野は有機合成において非常に興味深い分野の一つである¹⁾。また、このクラスレート形成に際しては様々な選択性があり、これを利用した分離、分析が期待される。一方けい皮酸の二量体である、トルキシル酸、トルキシシン酸誘導体は分子内に2個あるカルボキシル基による水素結合が可能であること、嵩高い置換基として芳香環を有すること等から包接能が高いことが期待される。また、分子間の水素結合が結晶構造の主鎖を形成し、前者二量体は直線的に配置されるのに対して、後者はジクザク型であり、その分空間が増え、ゲストを取り込みやすくなる可能性がある。



そこで、トルキシシン酸型二量体はその結晶構造から、選択的包接化による分離や選択的な反応が期待される。本研究ではケイ皮酸誘導体から選択的にトルキシシン酸誘導体を合成し、これとゲスト分子を水素結合が可能な環状エノン、不飽和カルボン酸とする包接化およびその光化学反応について検討した。更に、トルキシシン酸から誘導されるアルコール系ホスト分子との

クラスレート化とその光化学反応についても検討した。

【実験】置換ケイ皮酸をヘキサン中で懸濁し光照射を行い光反応生成物 **1a** 及び **1b** を得た。同様に、ナフチル(**1g**)、アントリルアクリル酸誘導体等について光反応を行った。**1a**, **1b** はエタノール中硫酸触媒でエステル化しブロモベンゼンを用いてグリニャール反応によりアルコール生成物 **1c** ~ **1f** を得た。ゲスト化合物として環状エノン類 (**3a** ~ **3e**) を用いた。包接体はそれぞれのホスト化合物とゲスト化合物を mol 比 2:1 で混合し、再結晶により形成させた。包接体の形成は ¹H NMR スペクトル



1a: X = Cl, R = COOH

1b: X = Br, R = COOH

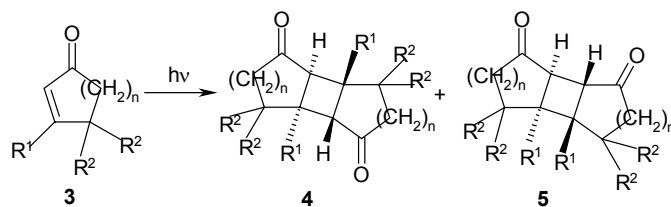
1c: X = Cl, R = C(Me)₂OH

1d: X = Br, R = C(Me)₂OH

1e: X = Cl, R = C(Et)₂OH

1f: X = Br, R = C(Et)₂OH

2: R = 4-Benzoylphenyl



a: R¹ = H, R² = H, n = 1 **d**: R¹ = Me, R² = H, n = 2

b: R¹ = Me, R² = H, n = 1 **e**: R¹ = Me, R² = Me, n = 2

c: R¹ = H, R² = H, n = 2

Synthesis and Characteristics of Clathrates Using Cinnamic Acid Derivatives

Kunio SUGIYAMA

測定及び融点測定, FT-IR 測定, 紫外可視拡散反射スペクトル測定, X線構造解析結果から確認した. 包接体の光反応は Pyrex ジャケット付 100-W 高圧水銀灯を用いて光照射を行い, 光反応生成物は $^1\text{H NMR}$ により構造解析を行った.

【結果・考察】 トルキシシン酸 (**1a**) とゲスト (**3**) をエーテル-ヘキサン (1:1, v/v) により再結晶させると, トルキシシン酸 : 環状エノン = 1:1 となるクラスレート(**4a**–**4g**)を形成した. トルキシシン酸 (**1b**) を用いたクラスレート(**5a**–**5g**)もエーテル溶媒により同様に得た. クラスレート結晶の FT-IR 測定によりイソホロンをゲストとして用いた場合以外のクラスレートでは水素結合が介在している事を確認した. イソホロンをゲストとして用いた際に水素結合が認められないことはホスト分子の隙間を埋める形で結晶が安定化していることを示唆する結果である. しかし, フランをゲストとした場合にはクラスレートが得られなかった. **3d** をゲストとする **1a** のクラスレート(**4d**)は, 光照射により *anti*-head to tail 型二量体(**6**)を与えた. ヘキサン溶液中では, *anti* head-to-head : *anti* head-to-tail = 83 : 27 であり, **1a** をホストとする [2+2]環化反応に対しての立体選択性が示された. 一方, **3a** をゲストとするクラスレート(**4a**)の光照射からは, [2+2]付加体の生成は認められなかった. クラスレート **4d** の X 線解析 (Figure 1) では *anti* head-to-tail 型となる **3d** の立体配置が確認されたが, **2** の分子間の最短距離は 6.8 Å であった. この値は Schmidt 則の 4.7 Å よりも大きく, クラスレート中において **2** がある程度の自由度を持ち, 環化できることを示唆する結果である. 一方, クラスレート **4a** の X 線解析 (Figure 2) では, **3a** の分子間最短距離は 7.8 Å であった. また, **3a** の分子間に **1** の芳香環が入り環化を抑制していることが考えられる. また Figure 3 には head-to-head 型の二量体を与える例として **1g** の解析図を示す.

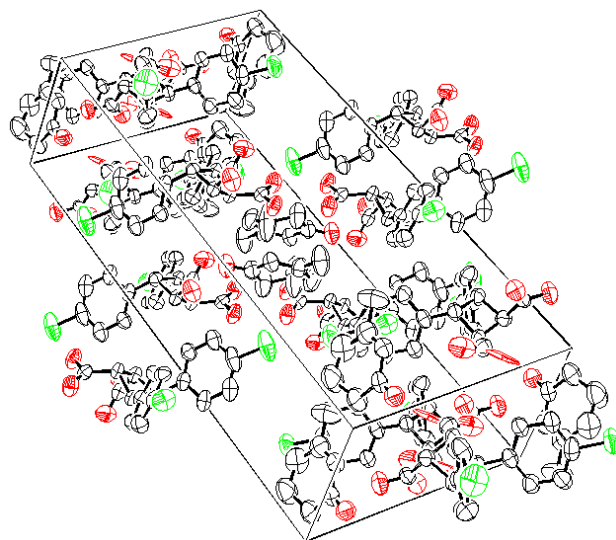


Figure 1. ORTEP Drawing of **4d**

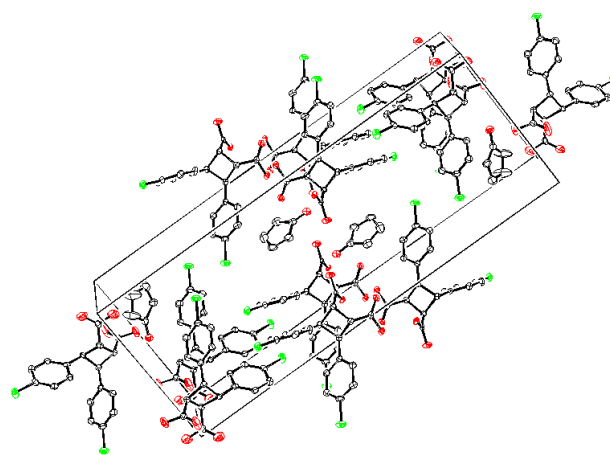


Figure 2. ORTEP Drawing of **4a**

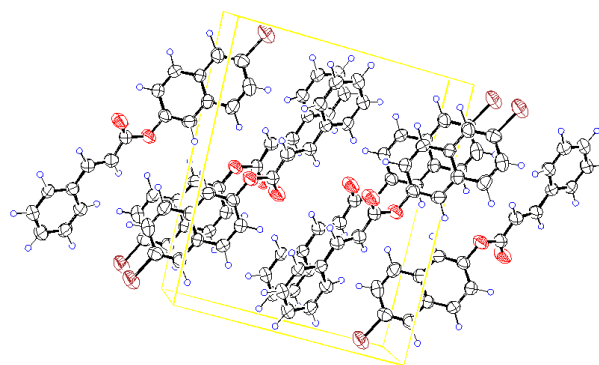


Figure 3. ORTEP Drawing of **1g**

【参考文献】

- 1) Dongbo, Z.; Kuiling, D.; *Org. Lett.*, **2003**, *5*, 1349-1351; Toda, F.; Tanaka, T. *Org. Lett.*, **2002**, *4*, 3255-3257

グラフト化 PTFE 膜に固定化した酵素の複合化による活性促進

日大生産工 ○松田 清美・柏田 歩
山田 和典・平田 光男

1 まえがき

生体組織の機能を代替する人工臓器の開発は 1950 年代より本格的に始まり、失われた生体の機能を代替する数々の人工臓器が開発されているが、現在使用されている人工臓器の素材は、工業用汎用性材料を医療用に加工したものに過ぎず、機械的特性は優れているものの、生体にとっては異物となる。そのため、生体に優しくかつ安全性の高い人工臓器の開発が強く望まれている。近年、膜自体が置かれた環境変化を敏感に感知して膜の透過特性を変化させる、すなわちセンサー機能とバルブ機能を有する開発が行われるようになってきている。

酵素はそれらの機能を触媒する作用を持っており、常温、常圧での穏和な条件下で優れた触媒活性を示し、反応を高効率に触媒し、さらに基質、立体、反応などの作用特異性が高いのが特徴である。しかし、熱や強酸、強塩基、有機溶媒などに不安定であり、酵素反応を行うのに適した環境においても比較的早く失活してしまうという欠点がある。さらに、反応溶液中から酵素を変性させずに回収し、これを再利用することは技術的に困難であり、一反応ごとに酵素を捨てることになるので非常に不経済な使用方法である。この酵素が特異的な触媒活性を保持し、連続的に酵素反応を行うことができ、再利用できる状態にあるものが固定化酵素である。

本研究では、人工血管などの医用材料に多く用いられているポリ(テトラフルオロエチレン)を延伸して得られる多孔質膜 (ePTFE フィルム)を高分子基質とし、酸素プラズマ前処理により表面を活性化し、モノマー水溶液中で光グラフト重合を行うことにより、アクリル酸 (AAc) をフィルムの片側表面に導入している。さらにグルコースオキシダーゼ (GOD) を固定化することにより、グルコースを感知し、インスリンを供給できる刺激応答性膜を調製した^{1),2)}。酵素 GOD はグルコ

ースを酸化してグルコン酸を生成するため、フィルム周辺の pH を低下させ、それに伴ってポリアクリル酸グラフト鎖が収縮するのでインスリンを透過させることができる。また、グルコースと GOD の反応では人体に有害である過酸化水素 (H₂O₂) が発生するため、これを無毒化する必要もあると考えられるので、酵素カタラーゼを用いて過酸化水素を分解することは意義があるものと考えられる。さらに、グルコン酸とともに生成する H₂O₂ をカタラーゼが消費することにより、グルコースと固定化 GOD との反応を促進できることが確認された。本研究では、このカタラーゼが使い捨てになることに対し、再利用することを目的として、GOD と同様にグラフト化 PTFE 膜への固定化と新しくゲル膜への包括固定化を行うことを検討した。

2 実験

1. ePTFE-g-PAAc フィルムの調製

従来の方法¹⁾に加えて光重合を2回重ねる方法でグラフト量の増加を図った。

2. ePTFE-g-PAAc フィルムへの酵素の固定化

GOD とカタラーゼの固定化は既報^{1), 2)}と同様に行った。

3. カタラーゼの PAAc および PEI ゲル膜への包括固定化

PAAc ゲル膜は、AAc モノマーを架橋剤として Methylenebisacrylamide, 促進剤として Tetramethylethylenediamine, 開始剤として Ammonium peroxodisulfate を用い純水に溶解した後、スペーサーを挟んだ2枚のガラス板の間に流し込み約 4°C で 12 時間以上かけてゲル化させた。カタラーゼはモノマーとともに純水に溶解し、ゲル化と同時に包括をさせた。枝分かれ Polyethylenimine (BPEI) ゲルは BPEI を Ethyleneglycoldiglycidylether (EGDGE) を用いて 3~5°C で 24 時間かけて架橋することによりゲル化させた。カタラーゼは BPEI 溶液に加え、ゲル化と同時に包括させた。

Acceleration of Enzymatic Activity by Composing Grafted PTFE Films Immobilized Enzyme

Kiyomi MATSUDA, Ayumi KASHIWADA, Kazunori YAMADA and Mitsuo HIRATA

4. 酵素活性測定

GOD およびカタラーゼの酵素活性測定も既報^{1),2)}に記載の方法を用いた。

5. インスリン透過

既報^{1),2)}と同様に円筒状セルの中間に GOD およびカタラーゼ固定化 ePTFE 膜または GOD 固定化 ePTFE 膜およびカタラーゼ包括固定化ゲルを挟みインスリンの透過量を測定した。

3 結果および考察

固定化量を増加させるため、光重合を2回行ったところ、Table 1に示すように、1回目で約75~82mgのグラフト量が2回目には140~160mgとほぼ2倍となり、確実にグラフト量の増加がみられた。この膜に酵素を固定化したところ、固定化量の増加も達成された。このことから酵素固定化ePTFE膜のグルコース感知能力の増加が期待される。

Table 1 Amount of PAAc grafted onto ePTFE films

Film No.	First mg	Second mg	Amount of grafted PAAc (g/g)
1	75.108	162.135	1.159
2	76.334	146.279	0.916
3	82.565	139.853	0.694
4	82.846	153.584	0.854
5	82.056	153.384	0.869
6	78.639	140.884	0.792
7	78.521	141.475	0.802
8	82.295	157.464	0.917

しかし、酵素を共有結合で固定化すると活性の低下が著しいため、他の方法としてゲルへの酵素の包括固定化を試みた。使用したゲルははじめPAAcゲルを選択し、低温レドックス重合によりカタラーゼを同時に包括固定した。ゲルに包括された酵素の活性は、共有結合で固定化した場合に比べ、格段に良好であった。そこで、GOD固定化ePTFE膜とPAAcゲル膜を組み合わせ、透過量測定装置のセルの中間に挟み、インスリン透過量を測定した。結果をFig. 1に示す。実験開始から150分後にグルコースを添加したところ、インスリンの透過量の増加がみられた。この状況はGODとカタラーゼによる酵素固定化ePTFE膜の場合と同様である。しかし、期待したようなインスリン透過促進がみられなかったことから、支持体としてのゲルの検討を行った。使用するゲルは、生体適合性が要求されることと、GODとの反応による酸性状態への変化によってもカタラーゼが酵素活性を発揮することが必要である。そのため、酸性下で膨潤状態となるPEIをゲル化させて用いることにした。架橋剤

にはEGDGEを用い、BPEIをゲル化させ、カタラーゼを同時に包括させた。インスリン透過実験はPAAcと同様に行った。結果はFig. 1に追加した。PAAcゲルを用いた場合に比べ、

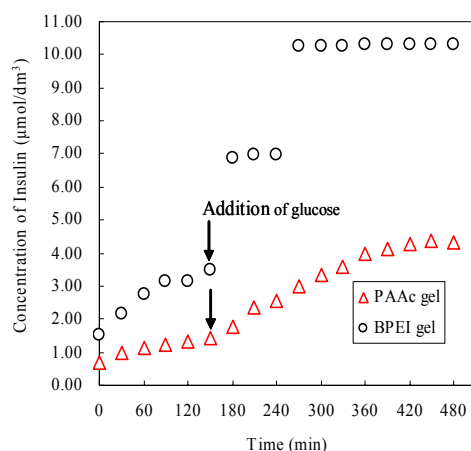


Fig. 1 Change in the Insulin permeabilities through ePTFE-g-PAA-i-GOD film and Catalase trapped in gels

グルコース添加前にインスリンの漏れ出しがあるが、グルコースの添加によるインスリンの透過量の増大は速やかであり、GODとの反応の後に更なるインスリン透過量の増大がみられ、カタラーゼによる促進作用であると推定される。現在までの段階ではゲル化の際のEGDGE量が多いと酵素の活性が低下することが確認されているので、最適な包括条件の検討が必要である。

4 今後の展望

透過膜として実用化へ向けての展開を図るために、固定化酵素膜の基質としてePTFE膜以外にもPE膜およびゲル膜の利用も検討している。ゲル膜については、ゲルの網目の調節により共有結合で固定化したものより高い活性を維持できる膜の調製を図る。ゲルの網目構成を通常の共重合高分子鎖の架橋によるもの他に対応の早いグラフト鎖をもつ高分子鎖の架橋によるものを考え、このゲル膜への酵素の包括あるいは固定化を行い、繰返し使用可能な膜リアクターとしての適応性をグラフト化膜に固定化したものと比較検討する。

「参考文献」

- 1) 日本大学生産工学部ハイテクリサーチセンター平成15年度研究報告書, (2004), 2-1
- 2) K. Matsuda, T. Makino, A. Kashiwada, K. Yamada and M. Hirata, J. Photopoly. Sci. Technol. 17, (2004) 165.

酵素反応を利用したフェノール化合物の除去と水質浄化への応用

日大生産工 山田 和典, 柏田 歩, 松田 清美, 平田 光男

1 緒言

水質汚染物質の1つであるフェノール化合物は、様々な工場排水から排出され、水道水源に混入すると、クロロフェノールを発生させて異臭を発することがある。フェノール化合物の除去は水質汚染防止や環境保全の点からも重要であり、パルス放電処理、活性炭ろ過法、オゾン酸化と活性汚泥処理の併用、液膜法、緑藻・藍藻などの微細藻類の使用といった分解除去法が報告され、実用化に至っているが、いずれも設備の大型化や高コストといった問題があり、低コストで効率的な除去法の構築が必要とされている。

ここでは、従来の方法と比べて簡易的で低コストな除去法として酵素反応を利用した方法を確立することに着目した。フェノール化合物に対してペルオキシダーゼ、チロシナーゼ、ラッカーゼなどの酵素が活性を示すことがこれまでに報告されているが¹⁾、効率的かつ迅速な除去法を確立するには至っていない。本研究では、フェノール系化合物からチロシナーゼとペルオキシダーゼによって生成した中間体生成物の反応性²⁾を利用した効率的な除去法の構築について至適条件の決定とその応用への基礎研究を行ったので報告する。

2 実験

2.1 チロシナーゼによる除去

マッシュルーム由来のチロシナーゼ(Sigma Aldrich(株)製, EC1.14.18.1, 2590U/mg)を使用し、pH7の緩衝溶液中でチロシナーゼとフェノール化合物を混合することで酵素反応を開始させた。また、フェノール化合物+チロシナーゼ混合溶液にキトサンフィルム(和光純薬化学工業(株)製のキトサン1000より作成)を浸漬させ、酵素反応によって生成したキノン化合物の反応性をUVスペクトル測定から評価した。さらに、混合溶液中でキノン化合物を除去する際にキトサンビーズ(富士紡績(株)製、粒径: 70~200 μm 、比表面積: 70~100 m^2/g)を添加させ、フェノール化合物の除去能を評価した。フェノール化合物の濃度は、

4-アミノアンチピリン(4-AA)法と逆相カラム(イナートシルODSII)を用いた高速液体クロマトグラフィー(HPLC)法によって求め、初期濃度との関係から添加率を算出した。

2.2 ペルオキシダーゼによる除去

西洋わさび由来のペルオキシダーゼ(Sigma Aldrich(株)製, EC1.11.1.7, 213U/mg)を使用し、ポリエチレングリコール(PEG)と過酸化水素の存在下でペルオキシダーゼとフェノール化合物を混合することで酵素反応を開始させた。酵素反応によって生成したフェノキシラジカルは溶液中で自己重合し、水不溶性なオリゴマーを形成するので、濁度とろ液のUVスペクトル測定から反応の経時変化を調べるとともに、フェノール化合物の濃度を上記と同様に4-AA法とHPLC法から求めた。

3 結果及び考察

3.1 チロシナーゼによる除去

p-クレゾール溶液(0.5mM)にチロシナーゼを加えると、酵素反応によるキノン化合物の生成によって波長 400nm での吸光度が上昇した。また、*p*-クレゾール+チロシナーゼ混合溶液に浸漬させたキトサンフィルム(直径 29mm)では、波長 460nm のピークが浸漬時間とともに上昇し、酵素反応によって生成したキノン化合物がキトサン中のアミノ基と反応して吸着することがわかったので、pH、温度、酵素濃度などの条件を変化させて実験を行った結果、pH7.0、45°C、酵素濃度 50U/cm³が至適条件であることがわかった。

pH7.0、45°Cで*p*-クレゾール+チロシナーゼ混合溶液にキトサンビーズを添加するとキノン生成を示す波長 400nm の吸光度が反応時間とともに低下した。チロシナーゼによるキノンへの転化は約 10 分でほぼ完了し、反応時間 60 分での除去率は 92.9%となった。フェノール化合物+チロシナーゼ混合溶液にキトサン溶液を添加した均一系反応では、フェノール化合物とキトサン中のアミノ基のモル比を 1 前後に調節すると凝集沈殿によってフェノール化合物が除去でき、キトサン添加量が

至適濃度に対して過不足すると、凝集が起こりにくいなるため、キノン化合物が溶液中に残存するが³⁾、本研究で行ったキトサンビーズを用いた不均一反応では、キトサンビーズの添加量を増加させることで除去率が上昇でき、吸着後の分別も非常に容易である。

4-tert-ブチルフェノール(4TBP)では、過酸化水素を 0.5mM となるように加えると、チロシナーゼによる酵素反応が起こった。これは、met 型のチロシナーゼが過酸化水素から発生した酸素分子と結合して 4TBP に対して触媒作用をもつ oxy 型に変換するためである⁴⁾。しかし、チロシナーゼは o-アルキルフェノールに対しては活性を示さないので、種々の p-及び m-アルキルフェノールの除去に本法を応用し、その除去率を評価した。表 1 に示すように、チロシナーゼは炭素鎖長 6 までの直鎖アルキルフェノールに対して活性を示し、本法によって効果的に吸着除去できることがわかった。また、4TBP では過酸化水素存在下で生成する 4-tert-ブチル-o-ベンゾキノンのキトサンとの反応性が低いため、キトサンビーズ添加量を 0.125cm³/cm³ まで増加させることで除去率は増加したが、その値は 33%に留まった。

3. 2 ペルオキシダーゼによる除去

ペルオキシダーゼは、過酸化水素の存在下でフェノール化合物をフェノキシラジカル化させ、o-, m-および p-クロロフェノールに対してオリゴマー化による不溶性ポリマーを生成することでこれらを除去することができた。また、至適条件を検討した結果、クロロフェノール濃度を 2.5mM とした場合、pH6.0, 30°C で、酵素濃度：0.10U/cm³, PEG(分子量 1.0×10⁴)濃度：0.10 mg/cm³, 過酸化水素濃度：2.5mM と決定できたので、本法を o-, m-および p-クレゾールに対して行った。至適 pH は 7 となり、m-と p-クレゾールは、10~20 分でほぼ完全にフェノキシラジカル化され、不溶性ポリマーを生成した。o-クレゾールでは、酵素濃度を 0.15U/cm³ まで上昇させると、転化率を 90%以上にすることができたが、オリゴマー化の進行が遅く可溶成分と溶液中に残存するので、キトサンフィルムやキトサンビーズによる吸着を併用したところ、0.25 cm³/cm³ のキトサンビーズを添加することでそのほとんどを除去することができたことは特記すべきことであり、o-アルキルフェノールの除去するための一方法を見いだしたと言える。

4 今後の展望と計画

チロシナーゼではキトサンビーズの添加に

Table 1 Removal of alkyl-substituted phenol compounds by the combined use of tyrosinase and chitosan beads in a pH 7 buffer at 45 °C.

Phenol compound	Tyrosinase (U/cm ³)	Chitosan beads (cm ³ /cm ³)	Removal (%)
p-cresol	50	0.0050	63.6
	50	0.0125	82.0
	50	0.025	92.9
	50	0.050	92.0
m-cresol	50	0.0050	46.3
	50	0.025	86.2
	100	0.050	94.1
4-ethyl	50	0.025	94.6
3-ethyl	50	0.025	88.0
	75	0.025	90.8
4-n-propyl	50	0.025	93.7
4-n-butyl	50	0.025	97.5
4-tert-butyl	50	0.025	7.8
	50	0.075	21.3
	50	0.125	32.9
(in presence of H ₂ O ₂ (0.5mM) at pH 6)			
4-n-hexyl	50	0.025	60.1
	75	0.025	81.0
(in 20%ethanol+buffer)			
4-n-heptyl	50	0.025	less activiy
(in 30%ethanol+buffer)			

よるとキノン化合物の吸着によって、ペルオキシダーゼでは PEG(分子量：1.0×10⁴)と過酸化水素の存在下での不溶性オリゴマーの生成によって、アルキルフェノールを効果的に除去できたので、今後はアルキルフェノールの除去を検討する。また、水溶性カルボジイミドを用いて弱酸性陽イオン交換樹脂やメタクリルまたはアクリル酸をグラフト重合したポリエチレン板に共有結合を介した固定化させることで pH や熱安定性を向上させるとともに反復利用と長期保存を可能にさせる。

参考文献

- 1) N. Durán, and E. Esposito, "Potential applications of oxidase enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review", *Appl. Catal. B: Environ.*, **28**, 83 (2000).
- 2) W. -Q. Sun and G. F. Payne, Tyrosinase-containing chitosan gels: a combined catalyst and sorbent for selective phenol removal, *Biotechnol. Bioeng.*, **51**, 79 (1996).
- 3) S. Wada, H. Ichikawa, and K. Tatsumi, Removal of phenols and aromatic amines from wastewater by a combination treatment with tyrosinase and a coagulant, *Biotechnol. Bioeng.*, **45**, 304 (1995).
- 4) M. Jiménez and F. García-Carmona, "Hydrogen peroxide-dependent-4-t-butylphenol hydroxylation by tyrosinase -a new catalytic activity, *Biochem. Biophys. Acta*, **1297**, 33 (1996).

de novo 設計ポリペプチドを用いた 金属イオン応答性ブロック型 coiled coil の構築

日大生産工 ○柏田 歩・松田 清美

1 緒言

天然には金属イオンの存在に応答して機能発現するタンパク質がある。この機能発現には金属イオンによるタンパク質のコンホメーション変化が大きく寄与している。このような系をモデル的に検討するために本研究では金属イオンの存在によって二種類のポリペプチドがブロック状coiled coil構造を形成する新規アセンブル系の構築を行なった。このような系は天然タンパク質の構造変化と機能発現機構のモデル的検討だけでなく、新規金属イオンセンサーの開発に関しても有意義であると考えられる。

2 実験方法

・ポリペプチド合成

本研究で使用したポリペプチドはすべてFmoc固相法にて合成した。そして精製はSephadex G-50を用いたゲルろ過クロマトグラフィーおよびYMC-Pack ODS-A カラム (10 mm i.d.×250 mm, 5 μm, YMC Inc., Japan)を用いた高速液体クロマトグラフィーによって行った。

・蛍光色素ラベルポリペプチドの合成

蛍光色素ラベル化用にFmoc固相法にて合成した含システインポリペプチド(Pep5およびPep6)それぞれ1.0 mgとマレイミド化Cy色素(Cy3BおよびCy5Q)それぞれ1.0 mgを1.0 cm³のDMSOに溶解した。40 μlのジイソプロピルエチルアミン添加後、遮光下、4 °Cで8時間攪拌することで目的化合物を得た。精製はYMC-Pack ODS-A カラム (10 mm i.d.×250 mm, 5 μm, YMC Inc., Japan)を用いた高速液体クロマトグラフィーによって行った。

・蛍光スペクトル測定

蛍光スペクトル測定はHITACHI F4500蛍光分光光度計を使用して行った。すべての測定試料は10 mM Tris-HCl緩衝液に溶解したものを、セル長1 cmで測定を行った。

3 結果と考察

本研究において用いたポリペプチドをFig. 1に示す。Pep1はIle残基のジッパー効果によって水溶液中で三本鎖coiled coil構造を形成するモデルである。¹⁾ また、Pep2はPep1に金属イオン結合部位としてのHis残基を付与したもので、金属イオンとの配位によりcoiled coil構造が誘起されるモデルである。一方、Pep3およびPep4はPep2を分割したモデルであり、金属イオン存在下で(Pep3)₃-M²⁺- (Pep4)₃型ブロック状 coiled coil構造を形成すると考えられる。さらに、金属イオンの存在によるポリペプチドのコンホメーション変化の可視化を目的としてPep3およびPep4それぞれに蛍光ドナー(Cy3B), アクセプター(Cy5Q)を導入したPep5およびPep6の合成も行った。

	efg	abcdefg	abcdefg	abcdefg	abcdefg					
Pep 1	YGG	EEK	IAAIEKK	IAAIEEK	IAAIEKK	IAAIEEK	GGY			
Pep 2	YGG	EEK	IAAIEKK	IAAIEEK	HAAIEKK	IAAIEEK	GGY			
Pep 3	YGG	EEK	IAAIEKK	IAAIE						
Pep 4					K	HAAIEKK	IAAIEEK	GGY		
Pep 5	YGG	ECK	IAAIEKK	IAAIE						
Pep 6		Cy3B				K	HAAIEKK	IAAIECK	GGY	Cy5Q

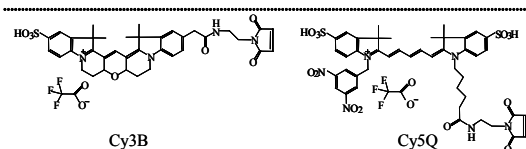


Fig. 1 Amino acid sequences of the metal induced polypeptides used in this study.

Construction of the Metal Ion Induced Block Type Coiled Coil
by the Use of *de novo* Designed Polypeptides

Ayumi KASHIWADA and Kiyomi MATSUDA

CD スペクトル測定の結果, Pep1 は設計通り coiled coil 構造の形成を示す CD シグナルが観測された。また, Pep2 においても Ni^{2+} イオンの存在の有無による random/coiled coil 構造転移が観測された。また, Pep3/Pep4 (1:1 混合系) の CD スペクトルにおいても Ni^{2+} イオンの存在の有無による構造転移が観測された (Fig. 2)。この結果は Ni^{2+} イオンに対するポリペプチド中の His 残基による軸配位に加え, 会合体形成時における Pep3 および Pep4 間の静電相互作用による安定化が寄与していることに起因するものと考えられる。さらに, 水溶液中におけるポリペプチドの会合数を見積もるためにゲルろ過クロマトグラフィーによる Pep3/Pep4 系の分画分析を行ったところポリペプチド六量体に相当する分画に観測された。また, 分画の成分分析を行った結果, Pep3/Pep4=1/1 の比であることが示された。以上の結果から (Pep3)₃- Ni^{2+} -(Pep4)₃ 型ブロック状 coiled coil 構造の形成が示唆された。²⁾

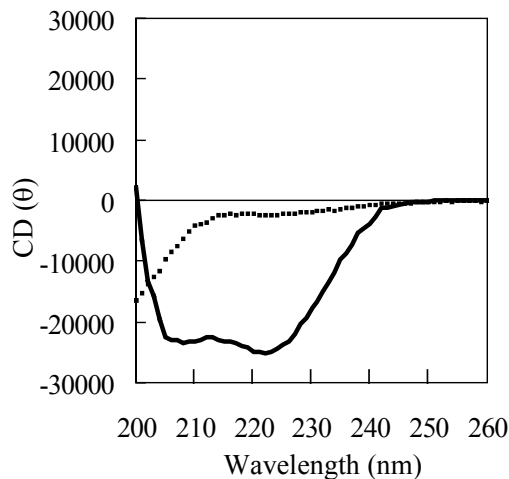


Fig. 2 CD spectra of the equimolar binary Pep5/Pep6 mixture in the absence (dotted line) and presence (solid line) of NiCl_2 (80 μM).

また, 種々の金属イオンに対する会合体形成挙動についての検討も行った。ポリペプチド濃度一定 (20 μM) のもと, Ni^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} および Zn^{2+} 濃度変化に伴う CD スペクトル変化を追跡することで会合体形成に対するアフィニティーとしての指標である結合(会合)定数を求めた。その結果, Ni^{2+} イオンにおいて $K_d=33.0 \mu\text{M}$ と最も高い会合体形成能を示した。また, Co^{2+} イオンにおいても会合体は形成したものの $K_d=313 \mu\text{M}$ と Ni^{2+} イオンに比べて低いアフィニティーであった。一方, Cu^{2+} および Zn^{2+} イオン存在下では金属イオンの濃度変化に伴う CD スペクトル変化は観測されず, (Pep3)₃- M^{2+} -(Pep4)₃ 型ブロック状 coiled coil 構造の形成が行われなかったことが示された。以上の結果は Pep3 および Pep4 中の His 残基による金属イオンへの軸配位だけでなく, 正八面体型六配位による

配位様式が会合体形成に重要な役割を果たしていることを示唆している。

さらに金属イオンセンシングの観点から, Pep5 および Pep6 に導入した蛍光ドナー-アクセプター間の FRET を用いることによる金属イオンに対するポリペプチドの構造変化の可視化について検討を行った。Pep5/Pep6 混合系においてエネルギードナー分子である Cy3B 励起による蛍光スペクトル測定の結果, 金属イオン不在下では Cy3B 由来の 572 nm 付近に発光が観測されたが Ni^{2+} イオン存在下ではアクセプター分子である Cy5Q 由来の 665 nm 付近に発光が観測された (Fig. 3)。この結果は Ni^{2+} イオン存在下においてブロック状 coiled coil 構造が形成した際に Pep5 および Pep6 それぞれに配した Cy3B-Cy5Q 間距離が Förster 半径内に近づいたことに起因すると考えられた。³⁾

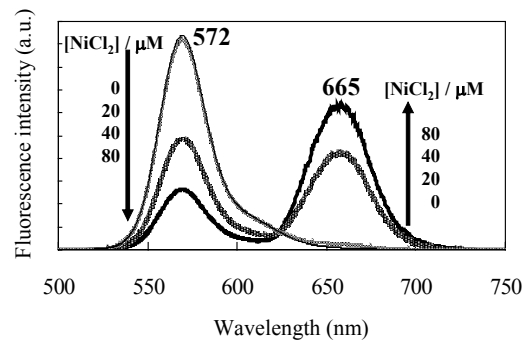


Fig. 3 Fluorescence emission spectra of the equimolar binary Pep5/Pep6 mixture in the absence and presence of NiCl_2 with the excitation wavelength at 564 nm.

4 今後の展望と計画

本研究では Ni^{2+} イオンに応答してブロック状 coiled coil 構造を形成するポリペプチドアセンブル系の構築に成功した。さらに, アセンブル系に FRET 機能を付与することで水溶液中における Ni^{2+} イオンセンシングへの展開についても言及することができた。現時点においては対象とする金属イオン濃度がやや高いため, 今後の検討においてアミノ酸残基の改変等の工夫が必要となる。さらに, 遷移金属だけでなく希土類イオンなどのセンシングを目指した新規な系の構築を目指す。

5 参考文献

- 1) K. Suzuki, H. Hiroaki, D. Kohda and T. Tanaka, *Protein Eng.*, **11**, 1051-1055 (1998).
- 2) A. Kashiwada, Y. Nakamura, and K. Matsuda, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **78**, 1291-1295 (2005)
- 3) A. Kashiwada, Y. Nakamura, and K. Matsuda, *Sens. Actuat. B.*, **108**, 845-850 (2005)

環境中の金属イオンの分離濃縮に関する研究

日大生産工 ○南澤 宏明

1 まえがき

コーヒー殻の様な生理活性物質を含有したリグノセルロースはきわめて安定な重金属に対する吸着能を有しており、Cd(II)やCu(II)の金属イオンを活性炭と同等もしくはそれ以上の吸着力で吸着できる。これらは安価で大量に入手でき、しかも簡易な操作で重金属類の分離濃縮が可能なことから、環境負荷の少ない重金属吸着素材としてその活用が期待されている。しかし、コーヒー殻のようにセルロース組織支持体をマトリックスとした生理活性成分を含有する廃棄系植物バイオマスを活用した例は少ない。しかも、その多くの報告は種々の官能基を導入した化学修飾型の分離剤として検討されていることが多く、廉価な材料とは言いがたい。以上のことをふまえ、本報告では有害な重金属類の吸着剤として、無機材料として活性炭と天然ゼオライトおよびセライトを、生物系材料としてキチン、キトサンを、植物系材料としては緑茶殻、番茶殻、紅茶殻、柚子、アロエ、コーヒー残渣を選び、循環機能を第一に考えた低コストで、より簡便な処理で重金属吸着能を有する機能性材料の検討を行ったので報告する。

2 実験

2.1 試薬

焙煎コーヒー豆は KEY COFFEE(株)のアラビカ種のブラジル、コロンビア、グアテマラコーヒーとロブスタ種のインドネシアロブスタの4種を等量ずつ混合し、所定の処理を行って調製した。キトサンは君津

化学工業(株)の Grade-F powder を、緑茶、紅茶、三年番茶、柚子の表皮 (*citrus junos*) とアロエ粉末(*Aloe aruborescens*)は市販品をそのまま使用した。

天然ゼオライトは栃木県産出のものを、活性炭は和光純薬(株)の粉状活性炭をそのまま使用し、これらをそれぞれ吸着剤として活用した。

なお、緑茶、紅茶、三年番茶は、熱水抽出後フリーズドライして用いた。

実験に用いたCu(II)、Cd(II)、Pb(II)の金属溶液はいずれも関東化学製原子吸光分析用標準溶液 (1 g L⁻¹ in 0.1 M HNO₃) を使用の都度、適宜蒸留水で希釈して使用した。その他のすべての試薬は、分析用試薬もしくは特級試薬を精製せずにそのまま使用した。

2.2 吸着実験

吸着実験はバッチ法で行った。コーヒー豆殻と緑茶、紅茶、三年番茶のカラ、柚子、アロエ、キトサン、活性炭、ゼオライトのそれぞれを吸着剤として1gを用い、10 mg L⁻¹ に調整したCu(II)、Cd(II)またはPb(II)溶液200 mlに添加した。これらの金属溶液は硝酸やアンモニア水で pH2, 3, 4, 5, 6.5-6.7 に調製して用いた。懸濁液は、マグネチックスターラーで24 hかき混ぜ、0.45 μm のメンブレンフィルターでろ過後、溶液中のCd(II)とPb(II)の残存量をセイコー電子工業製 SAS 7500 型原子吸光分光光度計を用いて測定し、吸着剤への吸着量を決定した。IRスペクトルは、日本分光工業(株) FT/IR-420 フーリエ変換赤外

分光光度計で KBr 法を用いて測定した。その他、吸着等温線の作成を行い、吸着現象を解釈する際に用いられる Langmuir、Freundlich の吸着等温式を用いて、これらバイオマスおよび無機系材料への重金属イオンの吸着現象を考察した。

2. 3 実試料への適用

河川水、実験排水、雨水中の重金属吸着実験は、以下の条件で行った。試料溶液の懸濁粒子を $0.45 \mu\text{m}$ のメンブランフィルターでろ過し、硝酸で pH1 に調製後、ポリエチレンボトルに保存した。アンモニア水で pH 5.5 に調製した試料溶液 (500 cm^3) に、コーヒー、活性炭を各 1 g 加え、マグネチックスターラーを用いて 24 h かき混ぜた。金属の回収率を決定するために、既知量の Cd (II) または Pb (II) を内部基準として添加した。メンブランフィルターを用いて母液から吸着剤を分離後、吸着剤を蓋つき試験管の中に注意深く移し、 0.1 mol dm^{-3} 酢酸水溶液 5.0 cm^3 を加え、ミキサーで混合溶解し、懸濁液をろ過して吸着剤を除去した。原子吸光光度計で溶液中の重金属濃度を測定し、吸着剤への Cd (II) と Pb(II) の吸着量を求めた。

3 実験結果および考察

3. 1 pH の影響

Cd (II) は pH2 の強酸性溶液中ではほとんどの吸着剤に対して非常に低い吸着率を示したが、活性炭、柚子やアロエを除き、pH4–6.7 の弱酸性から中性域で安定した吸着率を示し、pH6.7 で最も高い吸着挙動が得られた。なお、コーヒー豆殻ではほぼ 100% の吸着率が得られた。

一方、水溶液中の Pb (II) は pH2 の強酸性溶液中でゼオライトやアロエに対してほぼ 99% の吸着挙動を示し、pH4 ではアロエ以外の吸着剤で、88–99% の吸着率が得られた。Pb (II) の吸着はキトサンや柚子、アロエに関して特に幅広い pH 域で吸着が可能であることが確認された。

以上の結果より、金属イオン溶液の pH は金属の吸着に対して重要な影響を及ぼす因子であることが明らかとなり、Pb(II) は Cd(II) に比べてより低い pH 領域でこれらのバイオマスに強く吸着することが確認された。これより、本法では Cd (II) の吸着に関する最適挙動を示す水溶液の pH 条件を pH 6.5–6.7 の中性域に設定し、Pb (II) イオ

ンの最適な吸着挙動の pH 範囲をアロエでは pH2 に、その他のバイオマスでは pH4 に決定した。

Cd (II) の吸着は非常に速く進行し、ほとんどのバイオマスで 20 分後には 80% 以上の吸着率を示し、40 分後には平衡に達した。特にコーヒーと三年番茶は両方の金属イオンに対して、ゼオライトや活性炭より高い吸着率を示した。Cd (II) の場合、コーヒーとキトサンへの吸着量が吸着開始 20 分後には 90% 以上となり、コーヒー、キトサン (97%) > 三年番茶、紅茶、緑茶 (87–91 %) > 活性炭、ゼオライト (80–85 %) > 柚子 (58%) > アロエ (24 %) の順で増加した。

Pb (II) の吸着も Cd(II) と同様に非常に早く、コーヒー、紅茶、アロエ、三年番茶および無機材料の活性炭とゼオライトで 10–20 分後に 92–98% に達した。キトサンと柚子への吸着率は他のバイオマスよりも 10% 以上低い値を示し、キトサンへの吸着は 180 分後も平衡には至らなかった。これらの結果より、柚子とアロエ、キトサンへの重金属の吸着挙動には著しい選択性があり、ゼオライトや活性炭は Cd(II) よりも Pb (II) の吸着に適していることがわかった。一方、コーヒーや三年番茶、緑茶、紅茶類に両金属に対する選択性はなく、速やかで高い吸着能を示す吸着挙動が認められた。

3. 2 吸着等温線

一般的に吸着挙動の評価を行う際、気相吸着であれば吸着等温線、吸着等圧線、吸着等量線などが用いられるが、液相吸着の場合には、吸着に及ぼす圧力の影響が小さく、温度の影響も気相ほど大きくないなどの理由から吸着等温線が広く用いられている。各種バイオマスを用いた重金属の吸着実験にしたがって、Cd (II) の吸着に関する吸着は pH 6.7 で、Pb (II) の吸着は、pH 4 (アロエのみ pH 2) で検討を行った。一般に液相吸着での測定データは、Langmuir または Freundlich の式で評価されることが多い。Langmuir 式は、均一表面への吸着に対して導かれた理論式であり、吸着剤表面の吸着サイトに吸着質分子が 1 対 1 の単分子層吸着をするときに用いられる。したがって、均一な吸着サイトを持つイオン交換樹脂などの吸着剤の評価や Cu 粉末への Hg の吸着など気相吸着現象の理論的アプローチに用いられている。Langmuir 式が単分子層吸着に基づく理論式であるの

に対し、Freundlich 式は実験式であり、シリカゲルへの親水性化合物などの吸着不均一表面への吸着現象の評価に用いられることが多い。このように、それぞれの吸着系によってどちらの式がよく適合するかは異なる。本研究ではバイオマス、非バイオマスの担体を用いるためにさまざまな吸着サイトの存在が考えられ、これらの担体への吸着現象を Langmuir 式 (2) と Freundlich 式 (3) で総合的に評価した。

吸着等温式の吸着量 (q : mg g⁻¹)は、次の (1) 式より求めた。

$$q = (C_0 - C) / W \quad (1)$$

ここで、 C_0 と C は、それぞれ溶液中 (mg / 200 mL) の重金属の初濃度と最終濃度を示し、 W は担体として用いたバイオマテリアルの重量 (1.0 g / 200 mL) を示す。

Langmuir 式

$$\frac{1}{q} = \frac{1}{b} + \frac{1}{bKc} \quad (2)$$

Freundlich 式

$$q = kc^{1/n} \quad (3)$$

ここで q は吸着剤 1 g あたりの吸着物質の量 (mol·g⁻¹)、 C は吸着平衡時の溶液中吸着物質の濃度 (M)、 K は吸着平衡定数 (M⁻¹)、 b は最大吸着量 (mol·g⁻¹)、 k は吸着定数 (M⁻¹)、 $1/n$ は、任意のパラメーターである。Langmuir および Freundlich 吸着等温線はすべてのバイオマテリアルに関して直線性 (相関係数 $R^2 > 0.92$) を示し、2つのモデルに良く適合した。

Cd(II)イオンに関して Langmuir 式によって求めた最大吸着量 b は、アロエ > キトサン > 紅茶 > 番茶 > コーヒー > 緑茶 > 活性炭 > ゼオライト > 柚子の順に増加し、Freundlich 式で得られた吸着容量パラメーター k は、アロエ > キトサン > 紅茶 > 緑茶 > 活性炭 > コーヒー > 番茶 > 柚子 > ゼオライト の関係を示した。吸着剤と吸着質との親和力の指標となる $1/n$ は 0.1 - 0.5 の範囲で良好な吸着能を示し、2を超えた場合は吸着剤と吸着質との吸着は起こりにくいといわれている。Cd (II)では、アロエとキトサンを除いてほぼ同様な親和性を示した。特に吸着平衡定数 K と b の値が大きく、親和力のバランスが良い吸着剤はコーヒー、紅茶、緑茶であった。これらのパラメーターを考慮すると、Cd (II)の捕集除去に効果的なバイオマスは、コーヒー、紅茶、緑茶であるといえる。

一方、Pb(II)に関する吸着パラメーター b と $1/n$ は、アロエとゼオライトを除いて Cd (II)の場合と同様な傾向を示した。最大吸着量 b は、ゼオライト > 紅茶 > キトサン、緑茶 > 活性炭、番茶、アロエ > コーヒー > 柚子の順となり、特にコーヒー、緑茶、番茶、活性炭、柚子及び紅茶では、Cd (II)の吸着量の 1.3 - 8.5 倍を示した。コーヒー、番茶、ゼオライト及び柚子は、他のパラメーターに関しても Cd (II)より大きい値を示した。これに反して、キトサンとアロエの吸着パラメーターは、Pb (II) よりも Cd (II) に対して大きい値が得られたが、親和力 $1/n$ はいずれの場合も 0.5 以上の高い値を示した。故に、Pb(II)の除去に関して、植物バイオマテリアルのコーヒー、緑茶、番茶、紅茶の活用は、活性炭やゼオライト等の無機材料に匹敵する効果的な吸着材料と考えられる。しかし、前述したようにこれら植物バイオマテリアルへの重金属の吸着挙動は一様でなく、Cd (II) と Pb (II) で得られた吸着パラメーターを基に、(A) コーヒー、(B) 紅茶、番茶、緑茶、(C) アロエ、柚子、キトサンの 3 種類の挙動に大別できる。グループ(A) は、Cd (II) と Pb (II) の最大吸着量 b は 0.57 - 0.79 mmol g⁻¹ と温和な吸着能を示したが、他のパラメーターとのバランスが良く、両方の金属に対して同様な親和性を示している。(B) グループの吸着挙動は、他のグループと比べ溶液の pH に影響され、吸着パラメーターは Cd (II) よりも Pb (II) の方が高い値を示した。グループ (C) だけが pH 2-3 の酸性側で重金属の吸着が効率よく行われた。

3. 3 吸着挙動と吸着剤構成成分

植物バイオマテリアルでの 3 種の吸着パターンはこれらのバイオマテリアル中の活性成分に起因する。植物バイオマテリアルは主にセルロースから構成されている。紅茶、番茶、緑茶はアミノ酸、カフェインに加えカテキン類も含有している。コーヒー殻は、セルロースやリグニンとトリゴネリン、キノリン酸、タンニン、ニコチン酸、カフェインなどのアルカロイド等で構成されている。茶類の IR スペクトルでは、高分子会合した O-H 結合の吸収が確認でき、セルロースの構造と一致する。更に、カテキン類の -CH₂- 結合、O-H、NH₂ 基の吸収も観察されている。コーヒーの IR

3. 4 実試料中の重金属の定量

スペクトルは COOH 基の特性吸収が明瞭に出現し、カルボキシル基のOHと N-CH₃、及びフェノール性の OH 基間の水素結合形成による吸収が認められ、これらの特性基はコーヒー中のセルロース、タンパク質、アルカロイド由来と同定した。また、紅茶、番茶、緑茶、コーヒー殻への Pb (II) と Cd (II) の吸着は pH 2-3 ではほとんど進行しない。故に、植物性バイオマテリアルは、陽イオン交換体として作用するであろうと思われる。

これに反して、柚子、アロエ、キトサンへの重金属の吸着は、pH 2-3 で進行した。柚子とアロエの吸着挙動は甲殻類の殻から抽出した天然高分子キチンを脱アセチル化して得られるキトサンへの吸着挙動に酷似している。キトサンは有機酸の酸性溶液中で容易く溶解し、キトサンへの重金属の吸着は、グルコサミンユニットのアミノ基との相互作用によるといわれている。そのため、キトサンは低い pH 域で吸着活性を示す。本研究で活用した柚子とアロエは、ペクチン酸を含有し、さらに酸溶液に対する高い溶解性を示している。ペクチン酸はカルボキシル基を有する酸性の多糖類であり、主に柑橘類や海藻で見出される。一方、キトサンは、第一級アミンを有する塩基性の多糖類である。柚子とアロエ及びキトサンの 1740 cm⁻¹ の吸収は、C=O と N-H 結合に起因するものであり、明らかにコーヒーや紅茶から得られた吸収とは異なる。ペクチン酸はカルボキシル基の陽イオン交換反応によって様々な金属イオンを吸着する。そして、ピラノース環上の酸素原子が配位することで Pb(II) や Cd (II) と安定な 5 員環キレート形成し、これらの金属イオンをより強力に吸着する。全ての バイオマテリアルの IR 吸収は、重金属の吸着後に高波数側にシフトしているが、Pb (II) と Cd (II) が吸着した柚子の吸収に対するシフトの度合いは著しく大きく、Cd (II) よりも Pb (II) の吸着後の吸収がよりシフトした。柚子とアロエへの金属吸着は、強酸性から中性溶液までの広範囲な pH 条件下で生じた。

以上の結果は、茶類に含まれるカテキンやコーヒー豆中のアルカロイド成分、柚子またはアロエの含有成分ペクチン酸等の生理活性物質は Cd(II) と Pb(II) の吸着に寄与することを示唆し、バイオマテリアルのマトリックスであるセルロースよりもより強く起因していると考えられる。

3. 2 の実験で得られた吸着パラメーターが平均的に安定していたコーヒー豆残渣を用いて、環境試料水中でのバイオマテリアルの重金属吸着能を検討した。環境試料水には、水、実験室廃液、雨水を用い、試料水へ吸着剤添加後の Cd(II) または Pb(II) 含有量を測定した。

Cd(II) と Pb(II) は、原子吸光光度計の測定では河川水と雨水からは検出されず、再度それぞれ既知濃度の重金属を各天然水試料に添加し測定した。コーヒー残渣吸着剤は、天然水試料中の重金属をほぼ完全に回収することができた。相対的に多量の Cd(II) と Pb(II) を含有する実験室廃液の場合は、両重金属ともに効果的に吸着され、コーヒー豆残渣に吸着された金属量は、活性炭によるものとほぼ同程度の吸着能を示した。また、各試料水について、Pb(II) と Cd(II) を一定量添加し、コーヒー豆残渣による標準添加法で調べたこれら重金属の回収率は良好な結果を示した。以上の検討結果から、本法は操作も簡便で感度も良く、環境試料水中の Pb (II) と Cd (II) の定量に有効で、前濃縮操作における高い濃縮倍率も示すことがわかった。

オンライン化学種変換分離分析法の開発

—分離選択性発現の新しいアプローチ—

日大生産工 ○澁川 雅美 日大生産工 齊藤 和憲
日大生産工 西垣 敦子

1. まえがき

近年の研究の発展や社会の要請の高まりとともに、分析対象となる物質の種類は増加の一途をたどっており、さらにまた多量かつ多種類の共存物質から極微量の目的物質を分離定量する要求が強まっている。この要求に応えるためには、常に新しい選択性を有する分離分析法の開発を進める必要がある。

分析対象化合物に特異的な化学反応を利用する誘導体化法は、分離選択性を向上させる効果的な方法のひとつである。特に、化学反応を二次的平衡(SCE)として高速液体クロマトグラフィー(HPLC)に導入する方法は、分析対象物質の保持を微細に制御することが可能で大きな成果を挙げているが、原理的に酸塩基反応など反応速度の大きな反応に限られるという欠点がある。本研究は、分析対象物質に特異的な化学反応を接触的に高速で行なうオンライン化学種変換システムを複数の分離場(カラム)を持つHPLCに導入して、多次元分離による高選択性の獲得を目的としている。

本講演では、これまでに開発を行なった多孔質グラファイトカーボン(PGC)の酸化還元機能または電気化学セルを用いたオンライン酸化還元化学種変換 HPLC、および電気化学クロマトグラフィーを利用したオンカラム酸化還元化学種変換分離について紹介する。これらの方法は、あらかじめ化学種変換を行なった後に化学種の分離を行なう通常のオンカラムあるいはオンライン誘導体化とは概念を全く異にするものであり、このような着想に基づいた研究例はこれまでに報告されていない。

2. オンライン酸化還元化学種変換 HPLC 2.1 PGC カラムによる酸化還元化学種変換

SCE法は、目的成分を複数の化学種の平衡混合物としてカラム内を移動させる方法である。その保持係数 k は、個々の化学種の保持係数とそれぞれの分率 α で与えられ、2つの化学種AとBが平衡にある場合には次式のように表される¹⁾。

$$k = \alpha_A k_A + \alpha_B k_B \quad (1)$$

したがって、SCE法を用いれば、化学平衡を制御することによって α を変化させ、分析対象成分の保持時間を任意の値に設定することができる。しかし、化学反応をSCEとして利用するにはその溶液内反応速度が大きくなってはならない。もし、移動相—固定相間の物質移動に比べて化学反応速度が小さいと、ピークが幅広くなったり、分裂したりすることがあるためである。このため、これまで有効に用いられてきた化学反応は、酸塩基反応といくつかの高速錯形成反応だけであった。

一方、演者らはPGC逆相系カラム充填剤が酸化還元機能を有しており、しかもその反応速度は非常に高いことを見出し、これを利用したオンカラム酸化還元化学種変換HPLCを開発した^{2,3)}。さらに最近、分離場内の特定の位置で分析対象成分の化学種を変換し、変換前後の化学種の移動する距離を制御する方法でもSCE法と全く同じ分離効果が得られることを示した⁴⁾。この場合の分析対象化合物の保持係数は次式で与えられる。

$$k = \frac{k_A L_1 + k_B L_2}{L_1 + L_2} \quad (2)$$

ここで L_1 と L_2 はそれぞれ化学種変換を行なう前と後の分離場(カラム)の長さである。

そこで、Fig. 1に示したように、2つの分離場の間に酸化還元化学種変換ユニットを

Development of Separation and Determination Methods Incorporated with On-Line Derivatization

— A New Approach to Enhancement of Separation Selectivity —

Masami SHIBUKAWA, Kazunori SAITOH and Atsuko NISHIGAKI

配置して実験を行なった。Fig. 2は、2本のODSカラムの間に長さ 10 mmのPGCカラム (BTR carbon BL-01) を置いたシステムによる Co-EDTA錯体の分離例を示したものである。ここでPGCカラムはあらかじめH₂O₂により処理し、酸化機能を持たせてある。試料溶液中のCoは2価としてEDTAと反応しているの、Coは前段のカラムでは2価錯体として、また後段のカラムでは3価錯体として移動しており、多量に共存する他金属成分から完全に分離されていることがわかる。

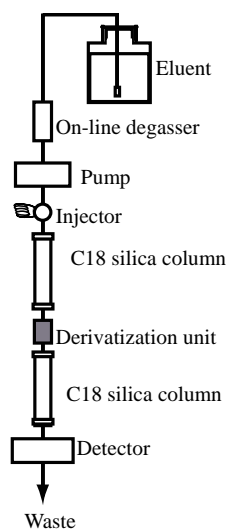


Fig. 1 Schematic diagram of on-line redox derivatization HPLC

このオンライン酸化還元化学種変換 HPLC システムを銅合金中の微量コバルトの定量に応用した。銅合金標準物質 C7701 を酸に溶解した後、過剰の EDTA を加え pH 調整した試料溶液を Fig.2 と同一の HPLC システムに供して得たクロマトグラムを Fig. 3 に、また得られた定量値を認証値と比較して Table 1 に示す。本法により得られた値は認証値とよく一致していることがわかる。

このほか、2-(5-bromo-2-pyridylazo)-5-diethylaminophenol をキレート試薬として用いて、このオンライン酸化還元HPLCシステムを Fe(II)/Fe(III)酸化還元対に適用し、Feの選択的分離ならびに水試料中のFeの酸化状態別分析に成功している⁵⁾。

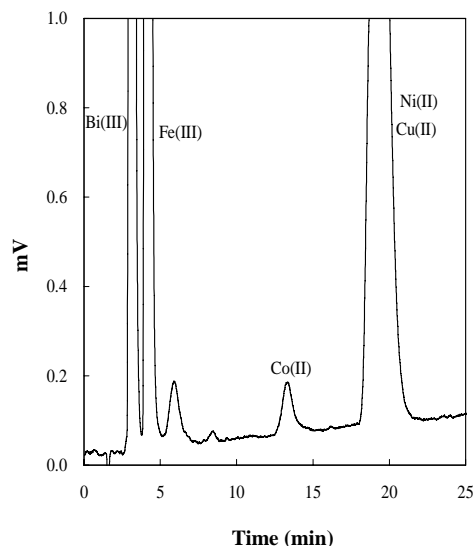


Fig.2 Separation of trace amount of cobalt from large amounts of co-existing metal ions using the on-line redox derivatization HPLC system shown in Figure 1. Concentrations of metal ions injected: 50 ppb for Co(II); 50 ppm for Bi(III), Fe(III), Cu(II) and Ni(II). Conditions: mobile phase, 0.1 M acetate buffer solution (pH = 5); flow rate, 0.6 mL min⁻¹; column temperature, 25°C

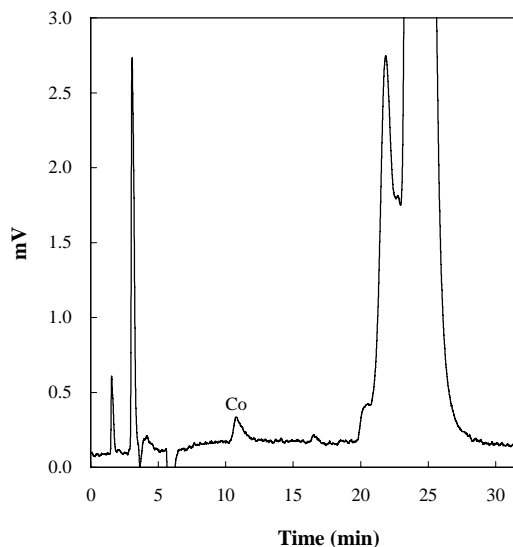


Fig. 3 Separation of cobalt in C7701 reference sample using the on-line redox derivatization HPLC system shown in Figure 1. Mobile phase: 0.1 M acetate buffer solution (pH = 5) and 0.1 mM EDTA. For other experimental conditions, see Fig. 2.

Table 1. Quantification Results of the Reference Copper Alloy Sample C7701 for Cobalt

determined value [$\mu\text{g/g}$]	recommended value [$\mu\text{g/g}$]
$436 \pm 6.1^{\text{a}}$ ($n = 3$)	$423 \pm 14^{\text{b}}$

^{a)} Values are mean \pm SD.

^{b)} Mean of six reported by five different laboratories.

2. 2 電解セルによる酸化還元化学種変換

酸化還元化学種変換ユニットとして電解セルを用いれば印加電位を変えることによって化学種変換反応を制御することができ、操作がより簡便になると考えられる。この目的に使用する電解セルは、電解効率が高く、耐圧性に優れているという条件を満たす必要がある。種々検討した結果、クーロメトリック検出器として市販されている ESA 製 Coulochem II のガードセル（作用電極：グラファイト，参照電極：Pd）を使用することとした。作用電極への印加電位はポテンシオスタットにより制御した。

PGC カラムの代わりに化学種変換ユニットとして電解セルを配し，Co(II)および Co(III)を含む数種の金属の EDTA 錯体を試料としたときに得られたクロマトグラムを Fig. 4 に示す。セルに $-0.6V$ 印加した場合には，Co(III)錯体が Co(II)錯体に還元されて他金属錯体から分離されているのに対して， $+0.3V$ 印加すると Co(II)錯体が酸化されて完全に分離されていることがわかる。同様のシステムを用いて多量の銅を含む試料溶液中のコバルトを分離した例を Fig. 5 に示した。

このように複数の酸化状態をとる金属を対象とするとき，オンライン酸化還元化学種変換 HPLC は極めて選択性の高い分離分析法となりうる。

3. 電気化学クロマトグラフィーを利用したオンカラム化学種変換

電導性固定相を作用電極として用いるオンカラム酸化還元化学種変換 HPLC システムを構築できれば，仮に変換効率が 100% でなくても，分析対象化合物を平衡混合物として分離することができる。印加する電位によって酸化還元平衡を制御できるという利点もある。

PorterらはPGCの導電性を利用し，これを充填した特殊なカラムを作製して，外部から電位を印加することにより表面の電位を変化させて溶質の保持特性を制御する電気化学クロマトグラフィー(electrochemically modulated liquid chromatography, EMLC)を開発した^{6,7)}。EMLCは，電気化学と分離化学が融合したユニークな分析法で，いわばイオン交換容量可変のイオン交換クロマトグラフィーといえるものである。しかし，それでは新しい分離選択性の獲得は原理的に期待できない。むしろ EMLC をオンカラム酸化還元化学種変換 HPLC として利用できれば，酸化還元反応を SCE として HPLC に組み込むことが可能にな

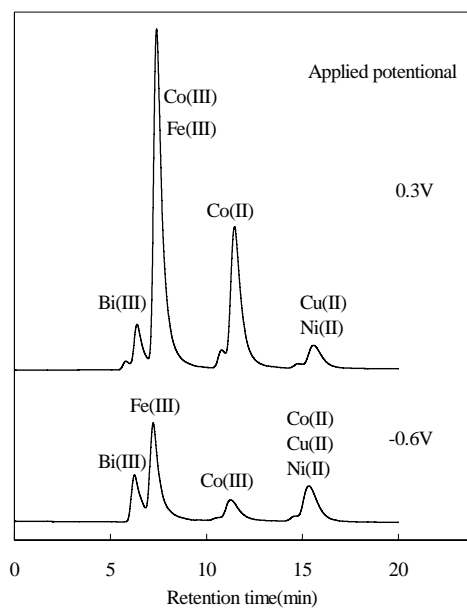


Fig. 4 Chromatograms of metal-EDTA complexes obtained by the on-line redox derivatization HPLC system equipped with an electrolytic cell

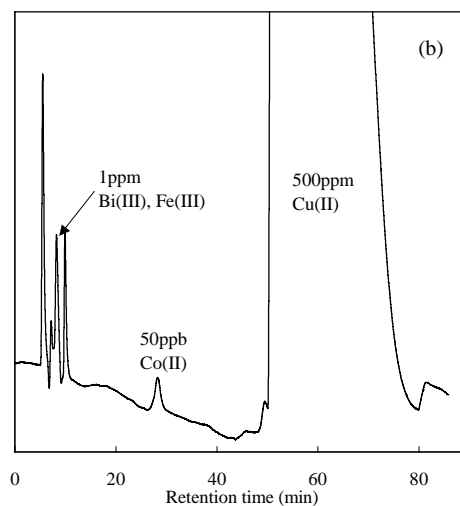


Fig.5 Separation of trace amount of cobalt from large amounts of co-existing metal ions

ると期待される。

一方，これまでの演者らの研究により明らかになったように，異なる酸化状態をとり得る金属を対象とするとき酸化還元化学種変換 HPLC は極めて選択性の高い分離分析法となる。これに対して，これらの酸化還元化学種変換 HPLC は，金属ばかりではなく酸化還元反応によって化学種変換できる有機化合物の選択的分離にも有用な手法と期待される。そこで，それぞれ類似した構造を持つレゾルシノールとカテコール，およびドーパとチロシンをモデル化合物として選び，EMLC 装置を用いてオンカラム酸化還元化学種変換 HPLC

の可能性を検討した。用いた移動相は 0.1 M リン酸緩衝液(pH 6.0)を含む 20%(v/v)アセトニトリル-水混合溶媒である。

4種のモデル化合物についての保持時間の印加電位(E_{app})依存性をFig. 6に示す。レゾルシノールとカテコールは印加電位が+200 mV以下、またドーパとチロシンは0 mV以下の範囲では保持時間がそれぞれほぼ等しいが、それ以上の電位を印加すると保持時間に大きな差が生じることがわかる。溶出した化合物の紫外可視スペクトルを調べたところ、カテコールとドーパは正の電位を印加すると他の化学種に変換していることがわかった。すなわちこれらの化合物はそれぞれ対応する電位で酸化されたと考えられる。このことは、EMLC装置を用いてオンカラム酸化還元化学種変換HPLCを行なうことができ、酸化還元性物質の分離選択性を高めることができることを示している。Fig. 7は+300 mVの電位を印加したときの各化合物のクロマトグラムを示したものであるが、良好に分離できることがわかる。

しかし、スペクトルから判断すると、カラムから最終的に溶出した化合物は完全に酸化されており、カラム内を部分的に平衡混合物として移動したかどうかは明らかでない。すなわち、EMLCが酸化還元反応をSCEとしてHPLCに導入することができるかどうかは、いまだに明らかでない。これを明らかにするにはサイクリックボルタンメトリーなどにより、酸化還元反応の可逆性と速度に関する知見を得る必要がある。

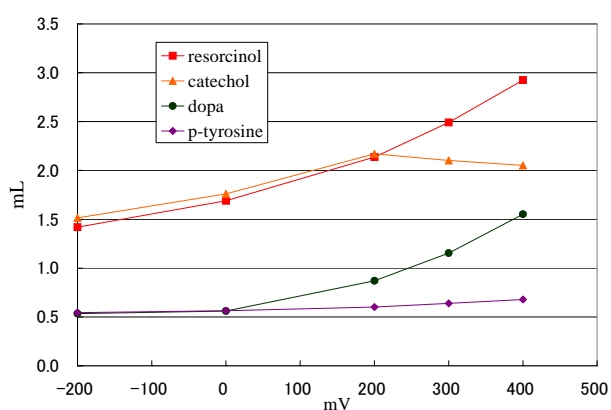


Fig. 6 Dependence of retention volumes of resorcinol, catechol, dopa and p-tyrosine on applied potential

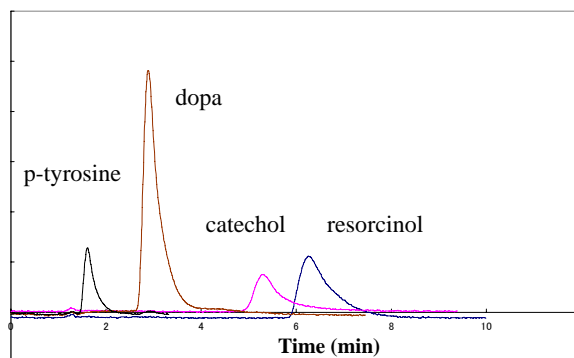


Fig. 7 Chromatograms of resorcinol, catechol, dopa and p-tyrosine obtained at E_{app} of +300 mV.

4. おわりに

オンラインおよびオンカラム酸化還元化学種変換 HPLC は、酸化還元電位の差や酸化還元反応速度の差に基づく HPLC 分離を可能にし、新しい分離選択性を生み出すことが期待される。酸化還元反応は通常反応速度が小さいが、高速化を目指して、触媒の利用のほか、高温高压下でのオンカラムならびにオンライン酸化還元化学種変換 HPLC システムを設計し、構築する計画である。

生体中で重要な働きをする化合物の多くは酸化還元反応性を有しており、本研究により酸化還元化学種変換 HPLC が実用化されれば、これらの化合物の選択的分離定量を容易にすると考えられる。また、酸化状態によって毒性が大きく異なる金属化学種のスペシエーションにも有力な方法となりうるものであり、社会的にも大きな貢献が期待できる。

5. 参考文献

- 1) J. P. Foley, W. E. May, *Anal. Chem.* **1987**, *59*, 102-109.
- 2) M. Shibukawa, A. Unno, Y. Oyashiki, T. Miura, A. Nagoya, K. Oguma, *Anal. Commun.* **1997**, *34*, 397-400.
- 3) M. Shibukawa, A. Unno, T. Miura, A. Nagoya, K. Oguma, *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 2775-2783.
- 4) K. Saitoh, N. Yamada, E. Ishikawa, H. Nakajima, M. Shibukawa, *J. Sep. Sci.*, in press.
- 5) 安田卓也, 齊藤和憲, 中嶋秀, 渋川雅美, 第 66 回分析化学討論会講演要旨集, p. 226.
- 6) R. S. Deinhammer, E. Y. Ting, M. D. Porter, *Anal. Chem.*, **1995**, *67*, 237-246.
- 7) H. A. Jennifer, M. D. Porter, *Analyst*, **2001**, *126*, 1841-1849.