速 報

アゾベンゼン修飾キラル固定相を用いるマイクロ液体クロマトグラフィーにおける光学異性体の光照射による溶出順序制御

猪狩 民行¹, 中釜 達朗^{®1}, 内山 一美¹, 保母 敏行¹

Control of the elution order of enantiomers by light irradiation
using azobenzene-modified chiral stationary phases
in micro liquid chromatography

Tamiyuki IGARI¹, Tatsuro NAKAGAMA¹, Katsumi UCHIYAMA¹ and Toshiyuki HOBÔ¹

¹ Development of Applied Chemistry, Graduated School of Engineering, Tokyo Metropolitan University, 1-1, Minamiosawa, Hachioji, Tokyo 192-0397

(Received 18 August 2003, Accepted 25 August 2003)

In micro liquid chromatography, a method for the reversible control of the elution order of enantiomers by light irradiation was developed. Two photo-responsive chiral stationary phases (CSP(1) and CSP(2)) with an azobenzene moiety were prepared using D- and L-valine, respectively. The prepared stationary phases were continuously packed into a UV-permeable polymer-coated fused-silica capillary tubing (100 μm , i.d.) with 20 cm of length, respectively, and used as a micro column. When 3,5-dinitrobenzoyl-D,L-leucine isopropyl ester and 3,5-dinitrobenzoyl-D,L-alanine methyl ester were used as test samples, the samples were eluted in the order D-form and L-form, after UV light was irradiated to only the part of CSP(1) in the column. Continuously, when UV light was irradiated to the part of CSP(2) after visible light was irradiated to the CSP(1), the elution order became L-form and D-form. It could be seen that a reversible change in the retention order was caused by the reduction of the enantio-selectivity of the stationary phase by UV light irradiation.

Keywords : enantiomer separation; HPLC micro column; control of elution order; photo-responsive stationary phase.

1 緒 言

近年、生体内における光学活性生理活性物質のラセミ化あるいはD-アミノ酸の役割¹⁾などが明らかにされてきている。また、副作用の問題などから光学活性医薬品の光学純度測定²⁾が重要になっており、光学異性体分離分析の重要性はますます高まっている。光学純度測定の場合には片方の光学異性体が極微量であることが多く、先に溶出させたほうが定量に有利な場合がある³⁾。液体クロマトグラフィー (LC) においては充填剤のキラリティーを変えることが多く、キラリティーだけが異なるカラムも市販されて

いる。

一方、分離系のダウンサイジングが急速に進んでいる。チップ化された装置や電気浸透流を利用した分離系では流路系と分離系が一体化したものが多く、分離部を変更することは容易ではない。キャピラリー LC においてもカラム接続部における試料ゾーンの拡散が懸念される。

著者らは、アゾベンゼン部位を固定相に導入し、光照射により分離挙動を制御する試みを行ってきている^{4)~6)}。本研究では、光照射により光学異性体の溶出順序を制御することを検討した。概念図を Fig. 1 に示す。同一カラム内に分子構造が同じでキラリティーだけが異なる光応答性固定相 {Fig. 1, CSP(1) 及び CSP(2)} をそれぞれ存在させる。この状態では、それぞれの CSP に由来するキラル認

¹ 東京都立大学大学院工学研究科: 192-0397 東京都八王子市南大沢 1-1

識能が相殺されて、カラムとしてはキラル認識できないようにする。CSP(1) 及び CSP(2) のキラル認識能が光照射により変化すると、どちらかの CSP のキラル認識能が反映された溶出順序となる。本研究では、キラルセクターとして光学純度が高く、かつ双方の光学異性体が比較的安価に入手できる D- 及び L-バリンとした。調製したキラル固定相はアミノ酸アミド型⁷⁾である。この固定相については、アルキルスペーサーの長さによりキラル分離能が異なることが報告されている⁸⁾。したがって、スペーサーにアゾベンゼン部位を導入 (Fig. 2) することで、光照射により固定相のキラル認識能を可逆的に変えることができると考えた。

Fig. 1 Concept of the change in the elution order of enantiomers by photo-irradiation using photo-responsive chiral stationary phases

2 実 験

2・1 光応答性キラル固定相及びマイクロカラムの調製

固定相の調製は以下に行った。まず、*n*-ヘキシルアミン (東京化成製) と *tert*-ブチルオキシカルボニル (Boc)-D-バリン (ペプチド研究所製) を 1-[3-(ジメチルアミノ)プロピル]-3-エチルカルボジイミド塩酸塩 (EDC-HCl) (東京化成製) 及び 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (HOBt) (同仁化学製) を用いてジクロロメタン中、0℃ でカップリングした。次にトリフルオロ酢酸中で Boc 基を除去した後、再び EDC-HCl 及び HOBt を用いてジメチルアセトアミド中、0℃ でアゾベンゼン-4,4'-ジカルボン酸 (東京化成製) とモル比 1 : 1 で反応させた化合物を合成した。最後に EDC-HCl 及び *N*-ヒドロキシコハク酸イミド (HONSu) (和光純薬製) を用いてジメチルアセトアミド中、0℃ でアミノプロピルシリカゲル (APS) (Deverosil NH₂ 100-5, 平均粒子径 5 µm, 細孔径 100 Å, 比表面積 350 m²/g, 野村化学製) と反応させ、光応答性キラル固定相 CSP(1) を得た。キラルティーの異なる固定相 CSP(2) は、Boc-D-バリンの代わりに Boc-L-バリン (ペプチド研究所製) を用いることにより調製した。CSP(1) 及び CSP(2) の元素分析における炭素含有量は共に 6.3% であった。APS の炭素含有量が 2.9% であったことから、既報⁹⁾と同様の方法でキラルセクターの平均固定化密度を求めた結果、CSP(1) 及び CSP(2) 共に 0.18 groups/nm² (1 nm² 当たり 0.18 個のキラルセクターが存在している) と推算された。

調製した固定相は、末端に水ガラスを焼結させて作製したフリットを有する光透過性ポリマー被覆石英キャピラリ

Fig. 2 Photo-responsive chiral stationary phase used in this study, the trans-form (1) and the cis-form (2)

Fig. 3 Experimental scheme of this study
All HPLC measurements were performed in the dark.

ー (内径 100 μm , ジーエルサイエンス製) にスラリー法により充填した。まず, CSP(1) を 20 cm 充填した後, 続いて CSP(2) を 20 cm 充填した。

2.2 分析装置及び試料

調製したマイクロカラムの分離能及び光応答性は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 用ポンプ (L6000, 日立製), インジェクター (7520, レオダイン製), カラム恒温槽 (3521C, センシユ科学製) 及びキャピラリー電気泳動用紫外可視吸光度検出器 (CE-971UV, 日本分光製) で構成される HPLC 装置により評価した。検出器からの信号はインテグレーター (C-R7A, 島津製) で処理した。紫外あるいは可視光源にはブラックライト (FL6BLB, 6 W, 東芝ライテック製) あるいは蛍光管 (FL6N, 6 W, 東芝ライテック製) を 1 本ずつ使用した。光を照射する場合, 光源は恒温槽内でマイクロカラムと並列に設置し, カラム背後に光を照射するために, その周囲をアルミはくで作製した筒で覆った (Fig. 3)。光源とカラムとの距離は 1 cm とした。

試料注入量は 0.2 μl , 恒温槽温度は 15 $^{\circ}\text{C}$, 試料の検出波長は 254 nm とした。本研究において調製した固定相 (Fig. 2) は, アミノ酸をキラル認識部位とし, アミノ酸の N 末端に芳香環を有するいわゆるアミノ酸アミド型キラル固定相である。アミノ酸アミド型キラル固定相におい

ては, 順相系 HPLC において 3,5-ジニトロベンゾイル基のような芳香環を有するアミノ酸エステル誘導体に対して比較的分離能が高いことが知られている¹⁰⁾。そこで本研究では, 保持の光応答性が確認しやすい試料として, 3,5-ジニトロベンゾイル-D,L-アラニン-メチルエステル (DNB-D,L-Ala-ME) 及び 3,5-ジニトロベンゾイル-D,L-ロイシン-イソプロピルエステル (DNB-D,L-Leu-IPE) を用いた。移動相には, 1% 2-プロパノール及び 10% ジクロロメタンを含むヘキサン溶液を用いた。なお, 本研究で使用したポンプは極微量送液 (10 $\mu\text{l}/\text{min}$ 以下) が困難であったため, 定圧送液 (300 kgf/cm^2) とした。ホールドアップ時間 (t_0) の測定には 1,3,5-トリ-*tert*-ブチルベンゼンを用いた。

移動相を送液した状態で一定時間紫外あるいは可視光照射を行った後, 暗下にて HPLC 測定を行った (Fig. 3)。それぞれの光照射は保持時間の変化が平衡状態になるまで続けた。実際に保持の変化が平衡に達するまでの光照射時間は紫外, 可視光照射とも約 6 時間であった。

3 結果及び考察

スラリー法によって CSP(1), CSP(2) をそれぞれ 20 cm ずつ充填したマイクロカラムを用いて HPLC 測定を行った。試料として DNB-D,L-Leu-IPE の移動相溶液 (D 体:L 体=1:4) を用いたとき, クロマトグラムでは 1 本のピークとして検出された。次に, CSP(2) を充填した部分だけに紫外光照射を行うと, 試料の D 体の溶出時間はほとんど変わらずに L 体の溶出時間だけが早くなり {Fig. 4 (a)}, 2 本のピークとして検出された ($t_0 = 15.3 \text{ min}$, 分離係数 (α) = 1.24)。CSP(2) だけに可視光照射を行うと再び L 体の溶出時間だけが遅くなって 1 本のピークとなった。続いて, CSP(1) を充填した部分にだけ紫外光照射を行ったところ, D 体のピークが L 体ピークの立ち上がり部分の肩として出現した。D 体のピークを確認するために試料溶液中の D 体と L 体の混合比を 1:2 としたところ, D 体のピークが明確になった {Fig. 4 (b)}。このときの α 値は 1.16 と計算された。その後, CSP(1) にだけ可視光照射を行ったところ, D 体の溶出時間だけが遅くなって 1 本のピークとなった。Fig. 5 は DNB-Ala-ME 溶液 (D 体:L 体=1:2) を試料として同様な光照射実験を行った結果である。DNB-Ala-ME と同様, 光照射により溶出順序の逆転が確認された。このときの α 値はそれぞれ 1.05 {Fig. 5 (a)} 及び 1.04 {Fig. 5 (b)} と計算された。

アミノ酸アミド型キラル固定相を用いた順相系 HPLC の場合, 固定相のアルキルスペーサー鎖長を短くすると残存シラノール基の影響などによりキラル認識能が低下するとの報告がある⁸⁾。実験結果 (Fig. 4 及び Fig. 5) から, Fig. 2 の CSP はトランス-シス光異性化により, スペーサー鎖長が短くなるのと同様な効果, すなわち, 残存シラノ

Fig. 4 Change in the elution order of DNB-D,L-Leu-IPE by photo-irradiation using the micro column in HPLC

The molar ratios of the enantiomer (D : L) were 1 : 4 (a) and 1 : 2 (b), respectively. HPLC conditions are described in the text.

Fig. 5 Change in the elution order of DNB-D,L-Ala-ME by photo-irradiation using the micro column in HPLC

The molar ratio of the enantiomer (D : L) was 1 : 2. HPLC conditions are described in the text.

ール基などの影響によりキラル分離能が低下するものと考えられる。

4 結 論

キラリティーだけが異なる光応答性キラル固定相をそれぞれ充填したマイクロカラムを用いて、光照射により光学異性体の溶出順序を制御することに成功した。今後、試料導入量を少なくする、固定相の分子構造を最適化する、あるいは光照射方法を改善することなどにより、より明確な光応答性が発現できると考える。また、問題点としてカラム圧損失が大きいことが挙げられる。固定相の固定化担体として、より圧損失の少ないモノリスシリカ¹¹⁾¹²⁾の利用を現在検討中である。

本研究は、文部科学省科学研究費補助金（基盤研究（C）、「オンサイトキラルスイッチング微小カラムの開発」により遂行されたものである。

文 献

- 1) K. Imai, T. Fukushima, T. Santa, H. Homma, K. Hamase, K. Sakai, M. Kato: *Biomed. Chromatogr.*, **10**, 303 (1996).
- 2) 医薬審第 496 号厚生省医薬安全局審査管理課長通知, “非臨床薬物動態試験ガイドラインについて” (1998.6.26).
- 3) 二村典行: *ぶんせき (Bunseki)*, **1999**, 456.
- 4) H. Matsuoka, T. Nakagama, T. Hobo: *J. High Resol. Chromatogr.*, **21**, 25 (1998).
- 5) T. Nakagama, K. Hirasawa, K. Uchiyama, T. Hobo: *Anal. Sci.*, **17**, 119 (2001).
- 6) T. Nakagama, A. Yamaguchi, K. Hirasawa, K. Yoshida, K. Uchiyama, T. Hobo: *Anal. Sci.*, **18**, 49 (2002).
- 7) W. H. Pirkle, C. J. Weich: *J. Org. Chem.*, **49**, 138 (1984).
- 8) N. B.-Leyder, J.-C. Truffert, A. Tambute: *J. Chromatogr.*, **666**, 27 (1994).
- 9) T. Ihara, Y. Sugimoto, M. Asada, T. Nakagama, T. Hobo: *J. Chromatogr. A*, **694**, 49 (1995).
- 10) K. Sato, H. Nakano, T. Hobo: *J. Chromatogr. A*, **666**, 463 (1994).
- 11) Z. Chen, K. Uchiyama, T. Hobo: *J. Chromatogr. A*, **942**, 83 (2002).
- 12) Z. Chen, M. Niitsuma, K. Uchiyama, T. Hobo: *J. Chromatogr. A*, **990**, 75 (2003).