論文特集「分子認識とその応用」

(日本化学会誌, 1987, (3), p.416~422)

© 1987 The Chemical Society of Japan

「タコ」形アザシクロファンの分子認識特性と
クロマトグラフィーへの応用

(1986年8月5日受理)

村上幸人*・菊池純一・松浦猛夫

種々の疎水性ゲスト分子に対して induced-fit 型の包接特性を示すホスト分子である N, N', N'', N''' -テトラキス(10-カルボキシデシル)-2, 11, 20, 29-テトラアザ[3.3.3.3]パラシクロファン-1, 12, 19, 30-テトラオン(以下 APC($C_{10}CO_2H$))₄と略記する)を, AF-アミノトヨパール 650 にアミド結合で導入したクロマトグラフィー用充填剤を調製した。溶離液としてはメタノールと炭酸緩衝液(0.01 mol·dm⁻³, pH 10.0, μ 0.10 (KCl))の混合溶媒を用い, 均一水溶液中における APC($C_{10}CO_2H$))₄の包接挙動が明らかにされている6種類の疎水性ゲスト分子の分離特性を明らかにした。AF-アミノトヨパール 650 のアミノ基をすべてアセチル化した充填剤と比較した場合に, APC($C_{10}CO_2H$))₄の包接特性を反映して静電相互作用と疎水性相互作用による新たな分離挙動が認められた。「タコ」形アザシクロファンを APC($C_{10}CO_2H$))₄の構造形態で担体に直接導入するよりも, その炭化水素鎖末端の4個のカルボキシル基のうち3個をメチルエステルとして保護して樹脂に固定化することによって, より効果的な分離機能が発現された。

1 緒 言

シクロファン類は剛直な環骨格によって作りだされる疎水性空間を有し, ゲスト識別能をもつホスト分子として近年興味の対象となっている^{1)~5)}。類似の疎水性場を提供できる半人工のホスト分子であるシクロデキストリン類^{6)~7)}にくらべて, シクロファンはその疎水性空間の分子設計にきわめて多様性がある点が大なる特徴である。以前, 著者らは一連の [20] および [10.10] パラシクロファン誘導体を合成し, それらが加水分解酵素における酵素と基質間のホスト・ゲスト相互作用に類似して有効なゲスト分子識別能をもつホスト分子としての機能を発現することを明らかにしている^{8)~10)}。また, テトラアザ [3.3.3.3] シクロファンに複数の

炭化水素鎖を導入した「タコ」形アザシクロファン類は, 剛直なシクロファン骨格と柔軟性のある炭化水素鎖によって深みのある疎水性場を形成し, この部位が疎水性ゲスト分子の認識にきわめて有効であることを見いだしている^{8)~12)}。この場合, ホスト分子に種々の官能基を導入することによって疎水性相互作用, 静電相互作用, 電荷移動相互作用などによる分子識別が可能になり, induced-fit 型の包接挙動を示すことを確かめている。本研究ではこのような特異的ゲスト識別能を有する「タコ」形アザシクロファンの一つである APC($C_{10}CO_2H$))₄を取り上げ, これをクロマトグラフィー用担体に導入して新しい分離特性を発現しうるクロマトグラフィー用充填剤を開発することを目的とした。現在までに, 大環状型ホスト分子をクロマトグラフィーに応用した例はシクロデキストリン^{13)~17)}, クラウンエーテル¹⁸⁾などに関して認められるが, シクロファンを導入する手法は本研究が最初である。

九州大学工学部合成化学科, 812 福岡市東区箱崎

- 1) 平岡道夫, 柳田博明, 小原正明, 古賀憲司編, “ホスト・ゲストケミストリー”, 講談社 (1984) p.168.
- 2) 村上幸人, 砂本順三, “酵素・生体膜モデルの化学”, 南江堂 (1981) p.40.
- 3) I. Tabushi, K. Yamamura, “Cyclophanes I”, Topics in Current Chemistry No.113, ed. by F. Vögtle, Springer-Verlag, Berlin (1983) p.145.
- 4) Y. Murakami, “Cyclophanes II”, Topics in Current Chemistry No.115, ed. by F. Vögtle, Springer-Verlag, Berlin (1983) p.107.
- 5) K. Odashima, K. Koga, “Cyclophanes”, Vol. II, ed. by P. M. Keehn, S. M. Rosenfeld, Academic Press, New York (1983) Chapter 11.
- 6) M. L. Bender, M. Komiyama, “Cyclodextrin Chemistry”, Springer-Verlag, Berlin (1978) p.65.
- 7) I. Tabushi, *Acc. Chem. Res.*, 15, 66(1982).

- 8) Y. Murakami, A. Nakano, R. Miyata, Y. Matsuda, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, 1979, 1669.
- 9) Y. Murakami, A. Nakano, K. Akiyoshi, K. Fukuya, *ibid.*, 1981, 2800.
- 10) Y. Murakami, J. Kikuchi, M. Suzuki, T. Takaki, *Chem. Lett.*, 1984, 2139.
- 11) Y. Murakami, J. Kikuchi, H. Tenma, *ibid.*, 1985, 103.
- 12) Y. Murakami, Y. Hisaeda, J. Kikuchi, T. Ohno, M. Suzuki, Y. Matsuda, *ibid.*, 1986, 727.
- 13) J. L. Hoffman, *J. Macromol. Sci., Chem.*, A7, 1147 (1973).
- 14) M. Tanaka, Y. Kawaguchi, M. Nakane, Y. Mizobuchi, T. Shono, *J. Chromatogr.*, 246, 207(1982).
- 15) K. Fujimura, T. Ueda, T. Ando, *Anal. Chem.*, 55, 446(1983).

クロマトグラフィー用基盤担体として、市販されているアフィニティークロマトグラフィー用の AF-アミノトヨパール 650 を用いた。この担体は、ゲル汙過用充填剤として開発された親水性のビニルポリマーであるトヨパール HW-65 に化学修飾によりアミノ基を導入した誘導体であるが、厳しい反応条件下でもゲルが安定であるため種々の化学修飾を施すことが可能であること、溶離液として水以外の有機溶媒も使用できること、高流速での使用が可能であることなどの特徴を有している。ここでは、均一水溶液中における APC($C_{10}CO_2H$)₄ とのホスト・ゲスト相互作用がすでに明らかにされている 6 種類の疎水性ゲスト分子に対して、「タコ」形シクロファンを固定化した AF-アミノトヨパール 650 を充填剤としたクロマトグラフィーを適用した場合の分離特性を明らかにした。また、「タコ」形シクロファンの担体への固定化方法が異なる場合の分離能についても合わせて検討を行なった。

2 実験

2.1 測定機器類

IR および 1H -NMR スペクトルの測定には、それぞれ日本分光工業製 IR-810 型赤外分光光度計および日立製作所製 R-24 B 型核磁気共鳴装置を用いた。pH の測定には Beckman 社製 39505 型複合電極を取り付けた ϕ 71 型 pH メーターを使用した。元素分析は九州大学中央元素分析所に依頼した。

2.2 「タコ」形アザシクロファンの合成

N, N', N'', N''' -テトラキス(10-カルボキシデシル)-2, 11, 20, 29-テトラアザ[3. 3. 3. 3]パラシクロファン-1, 12, 19, 30-テトラオン (APC($C_{10}CO_2H$)₄) の合成は既報⁸⁾で述べた方法にしたがった。上記化合物の 4 個のカルボキシ基のうち 3 個をメチルエステルとして保護した化合物の合成法を以下に述べる。

N -(10-カルボキシデシル)- N', N'', N''' -トリス(10-メトキシカルボニルデシル)-2, 11, 20, 29-テトラアザ[3. 3. 3. 3]パラシクロファン-1, 12, 19, 30-テトラオン (APC($C_{10}CO_2H$)($C_{10}CO_2Me$)₃): N, N', N'', N''' -テトラキス(10-メトキシカルボニルデシル)-2, 11, 20, 29-テトラアザ[3. 3. 3. 3]パラシクロファン-1, 12, 19, 30-テトラオン⁸⁾ 1.0 g (0.76 mmol) をメタノール (100 ml) に懸濁し、これに $0.2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 水酸化ナトリウム水溶液 (4 ml) を加えて還流下で 10 時間かきまぜた。溶媒を減圧下に留去して得られた固体にメタノール (100 ml) を加え、不溶物を汙別した。氷冷下に汙液に $1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 塩酸を加えて pH を 2 に調整し、析出した白色固体を汉取して水洗したのち、 50°C で減圧乾燥した。得られた固体についてゲルクロマトグラフィー (充填剤、トヨパール HW-40 F; 溶媒、メタノール-クロロホルム (1:1 v/v%)) によりくり返し精製を行ない白色固体を得た。収量, 69 mg (7%)。

IR (KBr) $\nu_{C=O}$: 1742, 1720, 1620 cm^{-1} . NMR (CDCl_3) δ (ppm): 1.27 (64 H, m, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_9\text{CH}_2\text{CO}$), 2.27 (8 H, t,

APC($C_{10}CO_2H$)₄

$R = (\text{CH}_2)_{10}\text{CO}_2\text{H}$

APC($C_{10}CO_2H$)($C_{10}CO_2Me$)₃

$R_{1/4} = (\text{CH}_2)_{10}\text{CO}_2\text{H}$

$R_{3/4} = (\text{CH}_2)_{10}\text{CO}_2\text{CH}_3$

CH_2CO), 3.50 [8 H, m, $\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_9\text{CO}$], 3.60 (9 H, s, CH_3), 4.45 (8 H, br s, ベンジル位水素), 7.12 (16 H, m, 芳香族水素)。

分析値 C 71.76%, H 8.73%, N 4.22%

$\text{C}_{79}\text{H}_{114}\text{N}_4\text{O}_{12} \cdot 1/2 \text{H}_2\text{O}$ としての

計算値 C 71.84%, H 8.78%, N 4.24%

2.3 「タコ」形アザシクロファンのゲル汉過用担体への固定化
クロマトグラフィー用担体として AF-アミノトヨパール 650 (東洋曹達工業製, 膨潤ゲル 1 ml あたりのアミノ基含量 180 μmol) を用い、図式 1 に示す 3 とおりの方法でアザシクロファンの導入を行なった。

2.3.1 AF-アミノトヨパール 650 に APC($C_{10}CO_2H$)₄ を直接導入する方法: AF-アミノトヨパール 650 をガラス汉過器 (G 2) 上で蒸留水、ついで $1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 塩酸にて pH を 4 に調整した蒸留水で十分に洗浄したのち、pH 4 の蒸留水中で膨潤させた。この 5 ml をジオキサン-水 (4:3 v/v%; 60 ml) に懸濁し、pH 4 に調整した。APC($C_{10}CO_2H$)₄ 64 mg (50 μmol) をジオキサン (20 ml) に溶解し、これに蒸留水 (15 ml) を加えて pH 4 に調整した溶液を上記ゲル懸濁液に加えた。この混合物に、 N -エチル- N' -(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩 (以下 EDC と略記する) 111 mg (580 μmol) を含む pH 4 の水溶液 (4 ml)

16) W. L. Hinze, T. E. Riehl, D. W. Armstrong, W. De-Mond, A. Alak, T. Ward, *Anal. Chem.*, **57**, 237 (1985).

17) I. Tabushi, T. Nabeshima, K. Yamamura, M. Tsuda, *J. Org. Chem.*, **51**, 1918 (1986).

18) E. Blasius, K.-P. Janzen, "Host Guest Complex Chemistry I", Topics in Current Chemistry No. 98, ed. by F. Vögtle, Springer-Verlag, Berlin (1981) p. 163; references cited therein.

Scheme 1

を加えて室温で 10 時間穏やかにふりまぜた。その後、ゲルを汙取し、蒸留水 (50 ml)、ジオキサン-水 (2:1 v/v%; 50 ml) で順次洗浄した。汙液およびそれぞれの洗浄液から溶媒を留去して得られた残留物について IR(KBr) および $^1\text{H-NMR}$ スペクトル ($\text{DMSO}-d_6$) を測定したところ、アザシクロファンに由来するシグナルはまったく検出されなかったことから、 $\text{APC}(\text{C}_{10}\text{CO}_2\text{H})_4$ はすべてゲルに結合したものと判断した。このゲルをさらに蒸留水で洗浄したのち、酢酸 64 mg (1.1 mmol) を含む pH 4 の水溶液 (20 ml) に懸濁し、これに EDC 1.3 g (6.8 mmol) を含む pH 4 の水溶液 (4 ml) を加えて室温で 17 時間穏やかにふりまぜた。その後、ゲルを汙取し蒸留水で十分に洗浄した。ゲルのニンヒドリン試験を行ない陰性であることを確認した。ここで得られたゲルを以下 APC-Toyopearl(I) と略記する。

2.3.2 部分的にアセチル化した AF-アミノトヨパール 650 に $\text{APC}(\text{C}_{10}\text{CO}_2\text{H})_4$ を導入する方法: AF-アミノトヨパール 650 をガラス汙過器 (G2) 上で蒸留水、ついで pH 4 に調整した蒸留水で十分に洗浄したのち、pH 4 の蒸留水中で膨潤させた。この 5 ml を酢酸 51 mg (850 μmol) を含む pH 4 の水溶液 (20 ml) に懸濁し、これに EDC 1.6 g (8.4 mmol) を含む pH 4 の水溶液 (4 ml) を加えて室温で 12 時間穏やかにふりまぜた。ゲルを汙取し、蒸留水で十分に洗浄したのちジオキサン-水 (4:3 v/v%; 60 ml) に懸濁して pH 4 に調整した。APC($\text{C}_{10}\text{CO}_2\text{H}$)₄ 64 mg (50 μmol) をジオキサン (20 ml) に溶解し、これに蒸留水 (15 ml) を加えて pH 4 に調整した溶液を上記ゲル懸濁液に加えた。この混合物に EDC 109 mg (570 μmol) を含む pH 4 の水溶液 (4 ml) を加えて室温で 10 時間穏やかにふりまぜた。その後、ゲルを汙取して蒸留水 (50 ml)、ジオキサン-水 (2:1 v/v%; 50 ml)、蒸留水 (50 ml) で順次洗浄した。この場合にも APC($\text{C}_{10}\text{CO}_2\text{H}$)₄ はすべてゲルに固定化されたことを、汙液と洗浄液から溶媒を留去にして得られたそれぞれの残留物について IR および $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを測定することにより確認した。また、ゲルのニンヒドリン試験は陰性であった。ここで得られたゲルを以下 APC-Toyopearl(II) と略記する。

2.3.3 AF-アミノトヨパール 650 に $\text{APC}(\text{C}_{10}\text{CO}_2\text{H})(\text{C}_{10}\text{CO}_2\text{Me})_3$ として導入する方法: AF-アミノトヨパール 650 をガラス汙過器 (G2) 上で蒸留水、ついで pH 4 に調整した蒸留水で十分に洗浄したのち、pH 4 の蒸留水中で膨潤させた。この 5 ml をジオキサン-水 (3:2 v/v%; 80 ml) に懸濁し pH 4 に調整した。APC-($\text{C}_{10}\text{CO}_2\text{H})(\text{C}_{10}\text{CO}_2\text{Me})_3$ 66 mg (50 μmol) をジオキサン (5 ml) に溶解し、これに蒸留水 (2 ml) を加えて pH 4 に調整した溶液

を上記のゲル懸濁液に加えた。この混合物に EDC 340 mg (1.8 mmol) を含む pH 4 の水溶液 (4 ml) を加えて室温で 21 時間穏やかにふりまぜた。その後、ゲルを汙取し蒸留水 (50 ml)、ジオキサン-水 (3:2 v/v%; 50 ml) で順次洗浄した。ジオキサン-水による洗浄液からは未反応のアザシクロファンを 7 mg 回収した。このゲルをさらに 0.2 mol $\cdot\text{dm}^{-3}$ 酢酸ナトリウム水溶液 (70 ml) で洗浄したのち、0.2 mol $\cdot\text{dm}^{-3}$ 酢酸ナトリウム水溶液 (40 ml) に懸濁した。これに無水酢酸 (20 ml) を加えて 0°C で 30 分間放置し、さらに無水酢酸 (20 ml) を加えて室温で 1 時間放置した。その後、ゲルを汙取して蒸留水 (100 ml)、0.2 mol $\cdot\text{dm}^{-3}$ 水酸化ナトリウム水溶液 (100 ml)、蒸留水 (100 ml) で順次洗浄した。ゲルのニンヒドリン試験は陰性であった。これをメタノール (80 ml) に懸濁し、1 mol $\cdot\text{dm}^{-3}$ 水酸化ナトリウム水溶液 (10 ml) を加えて 13 時間還流を行ないアザシクロファンのメチルエステル基を加水分解した。ゲルを汙取して蒸留水、0.01 mol $\cdot\text{dm}^{-3}$ 塩酸、蒸留水で順次洗浄した。ここで得られたゲルを APC-Toyopearl(III) と略記する。

一方、アザシクロファンを導入していない参照用のゲルとして、アミノ基をすべてアセチル化した AF-アミノトヨパール 650 (以下 Ac-Toyopearl と略記する) を aminoethyl Bio-Gel P 150 や amino-Sepharose 4B のアミノ基をアセチル化する方法¹⁹⁾²⁰⁾にしたがって調製した。得られたゲルはニンヒドリン試験が陰性であることを確認した。

2.4 クロマトグラフィーによるゲスト分子の分離

2.3 で調製したゲル (APC-Toyopearl(I), (II), (III) および Ac-Toyopearl) をそれぞれ内径 6.0 mm のガラス製カラムに 160 mm の長さに充填した。溶離液としては 0.01 mol $\cdot\text{dm}^{-3}$ の炭酸緩衝液 (pH 10.0, $\mu\text{0.10}(\text{KCl})$) とメタノールの混合溶媒を用い、分離能の測定はすべて室温 (20 $\pm$ 1°C) で行なった。1.0 mmol $\cdot\text{dm}^{-3}$ の各試料溶液 (30 μl) をカラムに注入し、流速はペリスタポンプ (ミツミ科学産業製) で 1.0 ml $\cdot\text{min}^{-1}$ に調整した。溶離成分の検出には紫外分光光度計 (日本分光工業製 UVI-DEC-100 型) を用いた。ブルーデキストラン 2000 (Pharmacia 社) の保持時間はいずれのカラムについてもすべて 4.7 $\pm$ 0.1 分間であった。N-フェニル-1-ナフチルアミン (PNA; 東京化成工業 1 級試薬) はメタノール-水 (4:1 v/v) から再結晶 (mp

19) R. J. Baues, G. R. Gray, *J. Biol. Chem.*, **252**, 57 (1977).

20) I. Matsumoto, H. Kitagaki, Y. Akai, Y. Ito, N. Seno, *Anal. Biochem.*, **116**, 103(1981).

61~62°C) したものを用いた。また、以下の化合物は高純度の市販品を購入してそのまま使用した: ローダミン 6G (2-(6-エチルアミノ-3-エチルイミノ-2,7-ジメチル-3*H*-キサンテン-9-イル)安息香酸エチルクロリド) (R 6G; キンダ化学), キナルジンレッド (2-(*p*-ジメチルアミノスチリル)-1-エチルキノリウムヨージド) (QR; 半井化学薬品), 1-(2-ピリジルアゾ)-2-ナフトール (PAN; 同仁化学研究所), メチルオレンジ (4-ジメチルアミノアゾベンゼン-4'-スルホン酸ナトリウム) (MO; 和光純薬工業), オレンジ I (*p*-(4-ヒドロキシ-1-ナフチルアゾ)ベンゼンスルホン酸ナトリウム) (OI; 半井化学薬品)。

3 結果と考察

3.1 「タコ」形アザシクロファンの分子認識特性とクロマトグラフィー用担体への固定化

テトラアザ[3.3.3.3]パラシクロファン骨格に 4 本のウンデカン酸部位を導入した「タコ」形アザシクロファンである APC-(C₁₀CO₂H)₄ は、pH 10 の水溶液中において陰イオン性ホスト分子として挙動し、陽イオン性および非イオン性の疎水性ゲスト分子に対して強い包接能を示す。たとえば、陽イオン性ゲストであるローダミン 6G (以下 R 6G と略記する) とキナルジンレッド (以下 QR と略記する) をゲスト分子としたときの 1 対 1 複合体の安定度定数はそれぞれ 4.8×10^8 および $4.5 \times 10^8 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3$ であり、一方、非イオン性ゲスト分子である *N*-フェニル-1-ナフチルアミン (以下 PNA と略記する) と 1-(2-ピリジルアゾ)-2-ナフトール (以下 PAN と略記する) との安定度定数はそれぞれ 1.6×10^8 および $1.5 \times 10^8 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3$ である⁹⁾¹¹⁾。これに対して、陰イオン性ゲスト分子であるメチルオレンジ (以下 MO と略記する) およびオレンジ I (以下 OI と略記する) などに対してはまったく包接能を示さない。したがって、APC-(C₁₀CO₂H)₄ は静電相互作用と疎水性相互作用によってゲスト分子を識別しており、とくに 2 種類の相互作用が協同的に働くと考えられる陽イオン性ゲストに対してその包接能は顕著である。また、APC-(C₁₀CO₂H)₄ よりも短い炭化水素鎖長をもつアザシクロファンである *N,N',N'',N'''*-テトラキス(2-カルボキシエチル)-2,11,20,29-テトラアザ[3.3.3.3]パラシクロファン-1,12,19,30-テトラオンでは、陽イオン性および非イオン性の疎水性ゲストに対しても取り込みがほとんど認められないことから¹¹⁾、APC-(C₁₀CO₂H)₄ においては剛直なアザシクロファン骨格と 4 本の柔軟性のある炭化水素鎖によって構成される深みのある疎水性空間が有効な分子認識の場として働いていることは明らかである。

このような特異的ゲスト認識能を有する「タコ」形アザシクロファンをクロマトグラフィー用担体に導入することによって、従来のクロマトグラフィーでは認められない新たな分離特性の発現が期待される。クロマトグラフィー用担体である AF-アミノトヨパール 650 へアミド結合を介してアザシクロファンを固定化するために、つぎの 3 とおりの方法を適用した。第一は、APC-(C₁₀CO₂H)₄ を水溶性の縮合剤である EDC を用いて直接導入する方法である。「タコ」形アザシクロファンの包接特性をできるだけ保持したまま固定化するには、1 分子あたり 1 個のカルボキシル基のみを反応させることが望ましいが (図 1 の模式図参照)、この方法では複数のカルボキシル基が反応する可能性が高い。第二は、AF-アミノトヨパール 650 中のアミノ基を部分的に

Fig.1 Schematic representation of gel surface to which octopus-like azacyclophane is chemically bound

アセチル化したのちに APC-(C₁₀CO₂H)₄ を結合させる方法であり、第一の方法にくらべれば 1 分子あたり複数のカルボキシル基が反応する割合は少なくなると考えられる。これに対して、第三の方法では、APC-(C₁₀CO₂H)₄ の 4 個のカルボキシル基のうち 3 個をメチルエステルとして保護した化合物である APC-(C₁₀CO₂-H)(C₁₀CO₂Me)₃ を用いて AF-アミノトヨパール 650 との縮合反応を行ない、その後エステルを加水分解する処理を行なっている。この場合には、アザシクロファンの結合様式はきわめて明確であり、図 1 に示すような結合様式で担体に固定化しているものといえる。第一および第二の方法を適用した場合には反応に用いたアザシクロファンはすべて担体に固定化されており、膨潤ゲル 1 ml あたり 10 μmol のアザシクロファンが固定化された。一方、第三の方法を用いて反応を行なった場合では一部未反応の APC-(C₁₀CO₂H)₄ が回収されており、固定化量は膨潤ゲル 1 ml あたり 9 μmol であった。いずれの方法を用いた場合にも担体中の残存アミノ基がゲスト分子の識別におよぼす影響を排除するために、未反応のアミノ基はすべてアセチル化しており、このことはニンヒドリン試験が陰性であることにより確認した。さらに、このようにして調製したクロマトグラフィー用充填剤のアザシクロファン導入効果を評価するために、アミノ基をすべてアセチル化した AF-アミノトヨパール 650 を参照用ゲルとして用いた。

3.2 クロマトグラフィーによる分離特性

「タコ」形アザシクロファンの固定化方法が異なる 3 種類の充填剤 APC-Toyopearl (I), (II), (III) と Ac-Toyopearl をそれぞれ充填したカラムを用いて、均一水溶液中で APC-(C₁₀CO₂H)₄ とのホスト・ゲスト相互作用が明らかにされているゲスト分子の分離特性について検討した。

まず、それぞれのカラムの充填状態を調べるために、平均分子量が 2×10^6 のブルーデキストラン 2000 を基準物質に選んで各カラムの保持時間 (以下 t_R と略記する) を測定した。いずれのカラムも担体ベッドの全容量は同一であり、流速を $1.0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ で一定にした場合には t_R 値はすべて $4.7 \pm 0.1 \text{ min}$ であった。また、本研究ではメタノールと炭酸緩衝液の混合溶媒を

Fig. 2 Retention times for hydrophobic guest compounds as chromatographed on columns of Ac-Toyopearl, APC-Toyopearl(I), (II), and (III) at 20°C: Rhodamine 6 G (●), Quinaldine Red (○), Methyl Orange (■), Orange I (□); eluant, methanol-aqueous carbonate buffer (0.01 mol·dm⁻³, pH 10.0, μ 0.10 with KCl) at 40:60 v/v%

溶離液として用い、その組成を 50:50(v/v%) から 35:65(v/v%) の間で変化させたが、いずれのカラムについてもブルーデキストラン 2000 の t_R 値にはまったく変化が認められなかった。以上のことは、担体に導入した「タコ」形アザシクロファンが構成する疎水性場は高分子物質であるブルーデキストラン 2000 に対しては認識部位としての機能を発現できないことを反映していると考えられる。また、各カラムについて容量比 (capacity factor) の算出に必要な排除容量 (void volume) を正確に見積もることは困難であったが、上述のようにブルーデキストラン 2000 の t_R 値が同じであったことから、以下の低分子ゲストに対する分離能の比較はそれぞれの t_R 値によって行なった。

固定化方法が異なるアザシクロファン導入ゲルの分離機能について、4 種類のイオン性ゲスト分子を用いて比較検討した。図 2 に示すように、溶離液組成がメタノール-炭酸緩衝液 (40:60 v/v%) の場合には、アザシクロファンを導入していない Ac-Toyopearl を充填したカラムにくらべて APC-Toyopearl を充填したカラムでは分離機能に大きな差異が認められた。すなわち、陽イオン性の R 6 G と QR の溶離はアザシクロファンの導入によって、いずれのカラムにおいてもいちじるしく抑制されるが、陰イオン性の MO と O I の溶離は幾分促進された。この傾向は APC-Toyopearl(I) および(II)にくらべて APC-Toyopearl(III) についてももっとも顕著であり、この第三のゲルの場合にアザシクロファンのもつ「タコ足」の効果がもっとも効果的に発現されていることを示すものである。ここで認められた分離挙動は、3.1 において述べた APC(C₁₀CO₂H)₄ の水溶液中における包接挙動によく対応しており、「タコ」形アザシクロファンのゲスト分子識別能がクロマトグラフィーによっても有効に発現されたことを意味している。また、APC-Toyopearl(I) および(II)の調製にさいしての「タコ」形アザシクロファンの固定化法の相違は、クロマトグラフィーによる分離挙動には大きな差異として現われなかった。以下の実験においては、アザシクロファンの効果をもっとも大きく現われた APC-Toyopearl(III) を用いて、Ac-Toyopearl との分離機能の比較について詳細に検討した。

図 3 には Ac-Toyopearl と APC-Toyopearl(III) を充填したカラムについて、溶離液組成を変化させた場合のイオン性ゲスト分

Fig. 3 Correlations of eluant composition with retention time for various hydrophobic guest compounds as chromatographed on columns of Ac-Toyopearl (A) and APC-Toyopearl(III) (B) at 20°C: Rhodamine 6 G (●), Quinaldine Red (○), Methyl Orange (■), Orange I (□); eluant, methanol-aqueous carbonate buffer (0.01 mol·dm⁻³, pH 10.0, μ 0.10 with KCl)

子の t_R 値をそれぞれ示した。Ac-Toyopearl の場合には、50% (v/v) メタノールを溶離液としたときの t_R 値は R 6 G, QR, MO, O I の順に増大した。陽イオン性分子は分子径の大きい順に溶出していることがうかがえるが、陰イオン性分子の場合はこれとは逆の傾向が認められる。測定条件下 (pH 10.0) において MO は一価陰イオン性ゲストであるのに対し、O I は二価陰イオンとして挙動する (O I の 1-位ヒドロキシル基の pK_a 値は

8.2 である²¹⁾。また、上述のように陰イオン性色素であるチバクロンブルー 3G-A (1-アミノ-4-[[4-[[4-クロロ-6-[(3または4-スルホナトフェニル)アミノ]-1,3,5-トリアジン-2-イル]アミノ]-3-スルホナトフェニル]アミノ]-9,10-ジヒドロ-9,10-ジオキソ-2-アントラセン-9-イル]アミノ]ナトリウム)を固定化しているデキストランである²²⁾ブルーデキストラン 2000 も分子径から予測されるよりかなり遅く溶出していることから、Ac-Toyopearl は陰イオン性分子と何らかの特異的相互作用をもつものと推察される。さらに、溶離液のメタノール含量を減少させるとともに t_R 値はいずれのゲスト分子の場合にも増大し、4種類のイオン性分子に対する分離能は低下したが、これは担体とゲスト分子との疎水性相互作用が支配的になったことを反映しているものと考えられる。このような疎水性相互作用による分離は、非イオン性分子である PNA や PAN の場合には、50% (v/v) メタノールを溶離液とした場合にも顕著に認められた (表1)。

50% (v/v) メタノールを含む溶離液を用いた場合のこれらのゲスト分子の t_R 値は、APC-Toyopearl(Ⅲ)を充填したカラムでは Ac-Toyopearl の場合にくらべて、非イオン性および陽イオン性分子については増大し、一方、陰イオン性ゲスト分子については減少した (表1)。したがって、APC-Toyopearl(Ⅲ)は明らかに、静電相互作用と疎水性相互作用による新たな分離特性を発現していることがわかる。このような分離特性は、イオン性ゲスト分子に対して、溶離液のメタノール含量を 35~50% (v/v) の範囲で変化しても同様に認められた (図3)。これに対して、非イオン性ゲスト分子については溶離液のメタノール含量を低下させると t_R 値はいちじるしく増大するとともに溶離ピークが幅広になり、正確な値の算出は困難であった。

さらに、図3Bに示すように、APC-Toyopearl(Ⅲ)の陽イオン性ゲストと陰イオン性ゲストとの分離能は溶離液のメタノール含量が多い場合にはそれほど顕著ではないが、メタノール含量の減少とともに次第に増大した。この挙動は、担体に固定化された「タコ」形アザシクロフアンのカルボキシレート部位は単純な静電相互作用で陽イオン性ゲストの滞留時間を大きくしているのではなく、アザシクロフアン分子の4本の炭化水素鎖の疎水性相互作用

Table 1 Retention times for hydrophobic guest compounds as chromatographed on columns of APC-Toyopearl(Ⅲ) and Ac-Toyopearl at 20 °C^{a)}

Guest	t_R /min	
	APC-Toyopearl(Ⅲ)	Ac-Toyopearl
PNA	66.0	63.0
PAN	13.5	12.0
QR	6.8	3.8
R6G	3.8	2.3
MO	3.0	4.9
OI	4.5	6.8

a) Eluant: Methanol-aqueous carbonate buffer (0.01 mol·dm⁻³, pH 10.0, μ 0.10 with KCl) at 50:50 v/v%.

によって構成される深みのある疎水性場に陽イオン性ゲスト分子が疎水性相互作用と静電相互作用の協同効果によって有効に包接されたことを意味するものであり、この効果によって有効な分離が行われたことを示している。

4 結 論

疎水性相互作用と静電相互作用によってゲスト分子を識別できる「タコ」形アザシクロフアンである APC(C₁₀CO₂H)₄ は induced-fit 型の特異な包接特性を有しているが、このホスト分子を AF-アミノトヨパール 650 に固定化することによって、「タコ」形アザシクロフアン分子のゲスト識別特性を反映した分離機能を示す新規クロマトグラフィー用充填剤を開発できた。本研究で用いたクロマトグラフィー用担体はそれ自体である程度疎水性相互作用による分離特性を有しており、今後、親水性がさらに大きい担体を用いることによって「タコ」形アザシクロフアン分子による分離特性をさらに強調できるものと期待される。「タコ」形アザシクロフアン分子の水溶液中におけるゲスト認識能は、炭化水素鎖の数を増した8本鎖型アザシクロフアンにおいてはさらにいちじるしく高められることが明らかになっており¹⁰⁾¹²⁾、このようなホスト分子の導入によって高度な分子識別能をもつクロマトグラフィー用担体の開発も可能になるといえる。

本研究を行なうにあたって研究費の一部を矢崎科学技術振興記念財団からご援助いただいた。ここに深く謝意を表したい。

21) 大河原 信, 北尾悌次郎, 平嶋 恒亮, 松岡 賢編, “色素ハンドブック”, 講談社 (1986) p.187.

22) P. Röschlau, B. Hess, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 353, 441(1972).

Special Articles on
Molecular Recognition and Its Application

Characteristic Molecular Recognition by an Octopus-like Azacyclophane
and Its Application to Chromatographic Separation

Yukito MURAKAMI*, Jun-ichi KIKUCHI and Takeo MATSUURA

*Department of Organic Synthesis, Faculty of Engineering, Kyushu University ;
Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka-shi 812 Japan*

An octopus-like azacyclophane having four flexible hydrocarbon chains on the rigid macrocyclic skeleton, *N,N',N'',N'''*-tetrakis(10-carboxydecyl)-2,11,20,29-tetraaza[3.3.3]paracyclophane-1,12,19,30-tetraone ($\text{APC}(\text{C}_{10}\text{CO}_2\text{H})_4$), was immobilized on the AF-amino Toyopearl 650 gel. The following hydrophobic guest molecules, whose binding behaviors toward $\text{APC}(\text{C}_{10}\text{CO}_2\text{H})_4$ in homogeneous aqueous solutions have been clarified, were chosen for chromatographic separation; cationic Quinaldine Red and Rhodamine 6 G, anionic Methyl Orange and Orange I, and nonionic *N*-phenyl-1-naphthylamine and 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol. The chromatographic separation of these guest compounds was performed on the azacyclophane-bonded stationary phase by using eluants composed of methanol and aqueous carbonate buffer ($0.01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, pH 10.0, μ 0.10 with KCl) at various ratios. The separation efficiency of the stationary phase is correlated with the inclusion ability of the octopus-like azacyclophane, which is primarily controlled by hydrophobic and electrostatic interactions between the host molecule and the guest molecules (Table 1 and Fig. 3). When only one carboxyl group was exclusively bound to the AF-amino Toyopearl 650 gel by protecting the rest of the carboxyl groups of $\text{APC}(\text{C}_{10}\text{CO}_2\text{H})_4$ as the methyl esters, selective molecular recognition by the modified stationary phase was most enhanced relative to other modified ones which were prepared by direct immobilization of $\text{APC}(\text{C}_{10}\text{CO}_2\text{H})_4$ on the Toyopearl gel.

~~~~~