α-シクロデキストリン担持粒状シリカゲルの 合成と液体クロマトグラフィーへの応用

辻本宗一*・斎藤由夫*・松原凱男*
伊藤征司郎*・吉原正邦*・前嶋俊寿*

要 旨

α-シクロデキストリンドデカベンゾエートと粒状シリカゲルとの脱水縮合反応によって、表面に直接シクロデキストリンが結合したシリカゲル粒子を合成した。この修飾粒子を充填したカラムは、芳香族化合物、およびラセミ体アミノ酸エステルの分離・分割に利用できることが判明した。

1. 緒 言

シクロデキストリン (CD) は内部が疎水性の円筒状の化合物で、種々の疎水性ゲスト化合物を取り込む能力のあることが知られている¹⁾。そこで、この取り込みを利用して、今まで、酢酸アリールの選択的加水分解²⁾、アニソールの選択的 p-位塩素化³⁾、ビタミンKの合成⁴⁾等、数多くの研究が報告されている。

一方、CD はクロマトグラフィーの分野にも利用されていて、適当な支持台に CD を結合させ、種々のカラムが作られている⁵⁾。これら支持台として従来は有機高分子ゲルが多く用いられてきたが、強度が低いという難点があった。そこで、強度的に優れている無機酸化物（特にシリカゲル）を支持台として用いる研究がなされるようになったが、まだ研究例も少なく、またそのほとんどが種々のスぺーサーによって CD と無機酸化物を結合させているものである⁶⁾。

本研究では、CD が直接表面に結合した粒状シリカゲルを合成し、液体クロマトグラフィーへ応用することを目的とした。CD としては α-シクロデキストリン (α-CD) を用いた。α-CD は内部が小さいので、小さい分子をより強く取り込むことができる。α-CD には 6 個の第一級水酸基および 12 個の第二級水酸基があるが、第一級の水酸基すべてをベンゾイル化したドデカベンゾエー

ト α-CD (II) を合成し、粒状シリカゲルとの脱水縮合反応により第一級水酸基をシリカゲル表面へ結合させて、修飾シリカゲル粒子 (III) を合成した。

2. 実 験

2.1 試 薬

α-CD、塩化ベンゾイル、置換ベンゼン誘導体等の試薬は市販特級品を用いた。シリカゲルは大ソー株式会社製粒状 Daisogel SP-120 (15 μm) を用いた。また、溶媒は常法により精製したものを用いた。N-ベンジルオキシカルボニルアミノ酸 p-ニトロエステル誘導体は、常法⁷⁾にしたがって合成した。

N-ベンジルオキシカルボニルアラニン-p-ニトロフ

Scheme-1

平成 3.11.27 受理

* 近畿大学 理工学部応用化学科
東大阪市小若江 3-4-1 (〒577)

ニルエステル (Z-Ala-ONp):mp=112.0~113.0°C

N-ベンジル オキシ シカル ボニル バリン-*p*-ニトロフェニルエステル (Z-Val-ONp):mp=96.6~97.0°C

N-ベンジルオキシシカルボニルイソロイシン-*p*-ニトロフェニルエステル (Z-Ileu-ONp):mp=74.6~75.1°C

N-ベンジルオキシシカルボニルフェニアラニン-*p*-ニトロフェニルエステル (Z-Phe-ONp):mp=126.5~128.0°C

2.2 機器分析

FT-IR スペクトルは PARKIN ELMAR FT-IR 1760 X FT-IR スペクトロメーターを用いて測定した。¹H-NMR スペクトルは日本電子 JEOL-GSX 270 (270 MHz) 型核磁気共鳴吸収装置を用いて測定した。液体クロマトグラフィーは、島津高速液体クロマトグラフィー送液ユニット LC-6 AD, 紫外分光光度計 SPD-6 A を用いて測定した。

2.3 α -シクロデキストリン修飾粉体 (III) の合成

ドデカベンゾエート α -シクロデキストリン (II) は, J. Bogel らの方法⁹⁾によって合成した。まず, α -CD (5 mmol) と塩化ベンゾイル (0.72 mol) をピリジン 120 ml 中で反応させて, シクロデキストリンオクタデカベンゾエート (I) 0.7 g を得た。つぎに, I (3 mmol) とカリウム 2-プロポキシドをベンゼン中で反応させて, II (1.36 g) を得た。II (1.0 g) をトルエン 50 ml に溶かし, 粒状シリカゲル (0.4 g) を加え, 窒素気流下 120°C で 6 時間脱水素反応を行った。溶媒を濾別後, クロロホルム 500 ml で 3 回洗浄し, 常温で減圧乾燥し, III (0.38 g) を得た。

2.4 シクロデキストリン修飾シリカゲルカラムの調整

III (2.0 g) をシクロヘキサノール/四塩化炭素 (20/80) 混合溶媒 20 ml 中で超音波を用いてスラリーとし, 4.6 ϕ $\times$ 15 cm のステンレス製カラム中へ, メタノールを溶媒として 100~400 kg/cm² 下充填した。

3. 結果および考察

修飾シリカゲル III の合成は, 水分定量器を付けたフラスコ中, II とシリカゲル粒子をトルエン中加熱脱水して調製した。このようにして調製した修飾シリカゲルの元素分析および FT-IR スペクトルの測定結果を, それぞれ Table 1 および Fig.1 に示した。元素分析の C% から求めた II の結合量は SiO₂ 1 g 当たり 8.5×10^{-2} mmol であった。また, FT-IR スペクトルの測定結果, 1739 cm⁻¹ にカルボニル基, 1453 cm⁻¹ に Si-O-C 結合, 707 cm⁻¹ に芳香環に基づく吸収がそれぞれ認められ,

Table 1 Elemental analysis of the modified silica gel (III)

C (%)	H (%)	Content of II mmol/1g SiO ₂
1.62	11.92	8.5×10^{-2}

Fig. 1. FT-IR spectra of the modified silica gel

II がシリカゲル表面に結合していることが判明した。なお, II には 6 個の第 1 級水酸基があるので, シリカゲル表面には複数の -Si-O-C 結合によってあたかもタコの吸盤のようにシリカゲル表面に強く固定されているものと考えられるが, その数については現在のところ不明である。また, III は第二級水酸基がすべてベンゾイル化されているので, 疎水性が強く, 興味ある性状を示すものと考えられる。

シクロデキストリンをシリカゲル表面に直接結合させた修飾粒子 III が合成できたので, つぎに液体クロマトグラフィーへの応用について検討した。すなわち, III を充填したカラムを作成し, 溶離液を変化させて, 数種の置換ベンゼン誘導体の溶出試験を行った。結果を Table 2 に示した。

保持係数 k' は, ベンゼン環上の置換基の種類ならびに溶離液の種類によって大きく変化することが判明した。

$$k' = \frac{t_r - t_0}{t_0}$$

(ここで, t_0 は保持されない成分の流出時間, t_r は実保持時間)

すなわち, モノ置換ベンゼン (No. 1 および 2) において, 溶離液として CHCl₃ を用いると, 疎水性のニトロベンゼンは $k'=0$ となって (No. 1) ニトロベンゼンが III

Table 2 Values of capacity factor (k') for separation of substituted aromatic compounds^{a)}

No.	Mobile phase Compounds	CHCl ₃	CH ₃ OH	CH ₃ OH/H ₂ O (50 : 50)	CH ₃ OH/H ₂ O (20 : 80)
1	<chem>c1ccc(cc1)[N+](=O)[O-]</chem>	0	—	1.33	—
2	<chem>c1ccc(cc1)O</chem>	1.23	—	0	—
3	<chem>c1cc(ccc1[N+](=O)[O-])[O-]</chem> o-	0.36	1.04	0.57	9.37
	<chem>c1cc(ccc1[N+](=O)[O-])[O-]</chem> m-	0.36	1.04	0.57	9.37
	<chem>c1cc(ccc1[N+](=O)[O-])[O-]</chem> p-	0.36	1.40	0.57	9.37
4	<chem>c1cc(ccc1[N+](=O)[O-])c2ccccc2</chem> o-	0	0	1.03	1.57
	<chem>c1cc(ccc1[N+](=O)[O-])c2ccccc2</chem> m-	0	0	1.74	1.57
	<chem>c1cc(ccc1[N+](=O)[O-])c2ccccc2</chem> p-	0	0.96	1.74	1.57
5	<chem>Nc1ccc(cc1[N+](=O)[O-])[O-]</chem> o-	0.44	0.03	0	—
	<chem>Nc1ccc(cc1[N+](=O)[O-])[O-]</chem> m-	1.37	0.26	0	—
	<chem>Nc1ccc(cc1[N+](=O)[O-])[O-]</chem> p-	2.14	0.71	0.41	—
6	<chem>Cc1ccc(cc1)O</chem> o-	1.07	0	0	—
	<chem>Cc1ccc(cc1)O</chem> m-	1.71	0	0	—
	<chem>Cc1ccc(cc1)O</chem> p-	1.71	0	0	—
7	<chem>OC(=O)c1ccc(cc1)N</chem> o-	—	0.14	0	—
	<chem>OC(=O)c1ccc(cc1)N</chem> m-	—	0.14	0	—
	<chem>OC(=O)c1ccc(cc1)N</chem> p-	—	0.14	0	—
8	<chem>Oc1ccc2cc(O)ccc2c1</chem> o, o'-	2.29	0	1.97	0.11
	<chem>Oc1ccc2cc(O)ccc2c1</chem> p, p'-	11.73	0	1.97	0.11

A) Flow rate 1 ml/min

に保持されていないのに対し、親水性の水酸基を有するフェノールでは $k'=1.23$ となっている (No. 2)。一方、溶離液を CH₃OH/H₂O (50 : 50) にすると、フェノールでは $k'=0$ となっているのに対し、ニトロベンゼンでは $k'=1.33$ となっていて、Ⅲによって保持されていることがわかる。

以上の事実は、Ⅲによる分離には、溶出しようとする化合物と溶離液との組み合わせが重要なことを示している。すなわち、親水性基を有する化合物に対しては疎水性溶離液を、一方、疎水性基を有する化合物に対しては親水性溶離液を用いると、比較的分離能のよいことが判明した。そこで、これらの点をさらに明らかにする目的で、数種の2置換ベンゼン誘導体の溶出試験を行った。

疎水性のニトロベンゼン誘導体 (No. 3 および 4) においては、疎水性の CHCl₃ を溶離液として用いると k' が小さくなっている。しかし、水含量の多いメタノールを溶離液にすると k' の値が大きくなっていて、疎水性化合物に対しては親水性溶離液が適していることを確認した。しかし、この場合、*o*-, *m*-, および *p*-異性体の分離はそれほどうまく起きなかった。

Fig. 2. Separation of *o*-, *m*-, and *p*-nitroaniline: Mobile phase, chloroform; flow rate, 0.5 ml/min; temperature, 25°C

Table 3 Separation of racemic *N*-benzyloxycarbonyl amino acid *p*-nitrophenyl esters^{a)}

No.	Compound ^{b)}	<i>k'</i>	α
9	Z-Ala-ONp	0.97	1.15
10	Z-Val-ONp	0.40	1.70
11	Z-Ileu-ONp	0.57	1.45
12	Z-Phe-ONp	0.62	2.22

a) Mobile phase, *n*-hexane/2-propanol(90 : 10) ; flow rate, 2 ml/min

b) Z : *N*-benzyloxycarbonyl, ONp : *p*-nitrophenyl

一方, NH₂ のような親水性基を有するニトロベンゼン誘導体 (No. 5) は, 水系の溶離液よりも疎水性の CHCl₃ によって効果的にⅢ上に保持されていて, さらに, この系においては, 図-2 に示したように, 異性体間の分離が効果的に起こっていることが判明した。また, クレゾール (No. 6) においては CHCl₃ で保持はされているが, 異性体間の分離はうまく起きなかった。一方, No. 8 のように親水性の OH と疎水性のフェニル基がともに 2 個ある異性体においては, CHCl₃ によって効率よく分離の起こることが判明した。

ところで, CD はグルコースで構成されているので, キラルな場を有していることが知られている。すなわち, Ⅲは光学分割剤として利用できる可能性がある。そこで, 表-2 において比較的包接されやすいことが判明した *p*-ニトロフェニル基を有するラセミ体 *N*-ベンジロオキシカルボニルアミノ酸 *p*-ニトロフェニルエステルの光学分割試験を試みた。

その結果, 表-3 に示したように, 溶離液として *n*-ヘキサン/2-プロパノール (90 : 10) を用いると, いずれのエステルの場合も光学異性体の分離がおこることが判明した。図-3 には Z-Val-ONp の測定例を示した。

以上の結果, 本研究で合成したシクロデキストリン修飾シリカゲル粒子は, 主に芳香族化合物の分離, および光学分割用カラムとして使用できることが判明した。

Fig. 3. Separation of racemic *N*-benzyloxycarbonyl phenylalanine *p*-nitrophenyl ester : Mobile phase, *n*-hexane/2-propanol (90 : 10, w/w) ; flow rate, 2.0 ml/min ; temperature, 25°C

参考文献

- 1) M. L. Bender, M. Komiyama : “シクロデキストリンの化学”, 学会出版センター (1978)
- 2) R. L. VanEtten, J. F. Sebastian, G. A. Clowes, M. L. Bender : *J. Am. Chem. Soc.*, 89, 3242 (1967)
- 3) R. Breslow, P. Campbell : *J. Am. Chem. Soc.*, 91, 3085 (1969)
- 4) I. Tabushi, K. Yamamura, K. Fujita, H. Kawakubo : *J. Am. Chem. Soc.*, 101, 1019 (1979)
- 5) B. Zsádon, M. Szilasi, F. Tüdös, J. Szejtli : *J. Chromatogr.*, 208, 109 (1981)
- 6) K. Fujimura, T. Ueda, T. Ando : *Anal. Chem.*, 55, 446 (1983)
- 7) 泉屋信夫, 加藤哲夫, 青柳東彦, 脇道典 : “ペプチド合成の基礎と実験”, 丸善 (1985)
- 8) J. Bogel, J. R. Corcoran, J. M. Lehn : *Helv. Chim. Acta*, 61, 2190 (1978)

Preparation of α -Cyclodextrin-Modified Silica Gel and Its Application for Liquid Chromatography

Munekazu TSUJIMOTO*, Yoshio SAITO*, Yoshio MATSUBARA*,
Seishiro ITÔ*, Masakuni YOSHIHARA* and Toshihisa MAESHIMA*

**Department of Applied Chemistry, Faculty of Science and
Engineering, Kinki University*

(3-4-1, Kowakae, Higashi-Osaka-shi, 〒 577)

Abstract

Cyclodextrin-modified silica gel was synthesized by condensation between silica gel and α -cyclodextrin dodeca benzoate. It was found that the modified silica gel was useful carrier for chromatographic separation for both substituted aromatic compounds and racemic N-benzyloxycarbonyl amino acid nitrophenyl esters.

Key-words : *Silica gel, α -Cyclodextrin, Optical resolution, Liquid chromatography*