

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2016-190204
(P2016-190204A)

(43) 公開日 平成28年11月10日 (2016. 11. 10)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
BO1J 20/281 (2006.01)	BO1J 20/26 L	4C057
GO1N 30/88 (2006.01)	GO1N 30/88 1O1L	4D017
BO1J 20/30 (2006.01)	GO1N 30/88 2O1X	4G066
BO1D 15/08 (2006.01)	GO1N 30/88 2O1W	4H006
CO8F 28/02 (2006.01)	BO1J 20/30	4J026

審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 38 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-71788 (P2015-71788)
(22) 出願日 平成27年3月31日 (2015. 3. 31)

(71) 出願人 504255685
 国立大学法人京都工芸繊維大学
 京都府京都市左京区松ヶ崎橋上町1番地
 (74) 代理人 110000796
 特許業務法人三枝国際特許事務所
 (72) 発明者 池上 亨
 京都府京都市左京区松ヶ崎橋上町1番地
 国立大学法人京都工芸繊維大学内
 (72) 発明者 上山 芳記
 京都府京都市左京区松ヶ崎橋上町1番地
 国立大学法人京都工芸繊維大学内
 Fターム(参考) 4C057 AA04 BB02 CC03 DD01 LL09
 LL10 LL11 LL12 LL15 LL41
 LL42

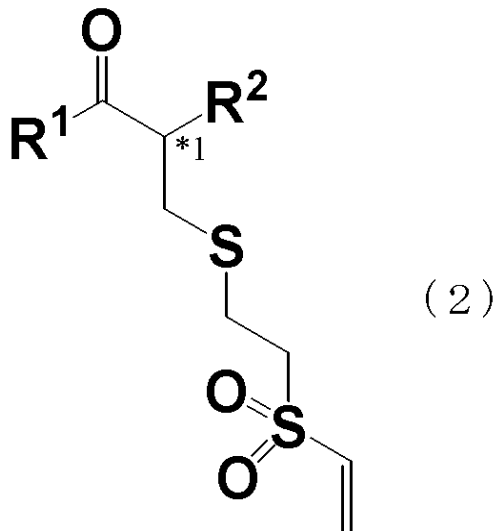
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 クロマトグラフィー用充填剤

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 光学分割能を有するクロマトグラフィー用充填剤の提供。

【解決手段】 式(2)で表されるモノマーをチオール等で表面修飾したシリカ担体の表面上に重合修飾した充填剤。

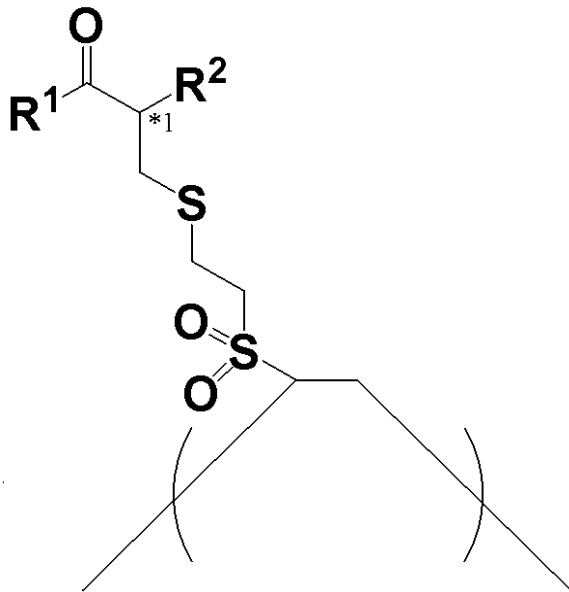


【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記一般式(1)で表される繰り返し単位からなるポリマーで表面が修飾されたシリカ担体からなる、クロマトグラフィー用充填剤。

【化 1】



(1)

10

20

[式中、 R^1 は OX 、 O^- または第1のアミノ酸残基を示し、 R^2 はアミン基(NH_2)、トリメチルアンモニウム基($N^+(CH_3)_3$)または NHR^a を示す。

X は水素原子またはアルカリ金属原子を示す。

R^a は、第2のアミノ酸残基を示す。

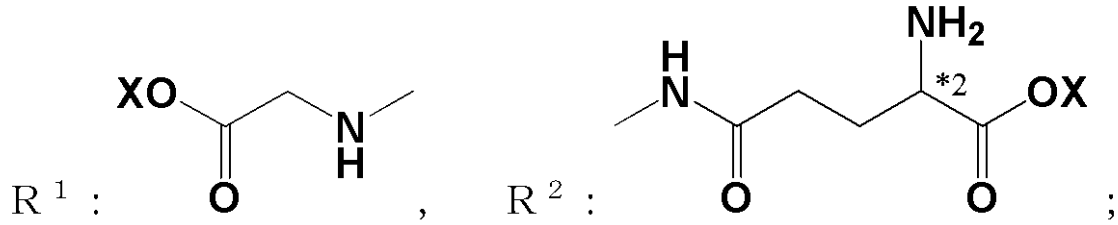
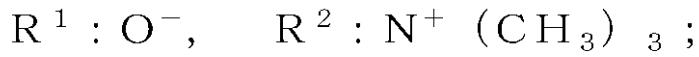
*1は、不斉炭素を示す。]

【請求項 2】

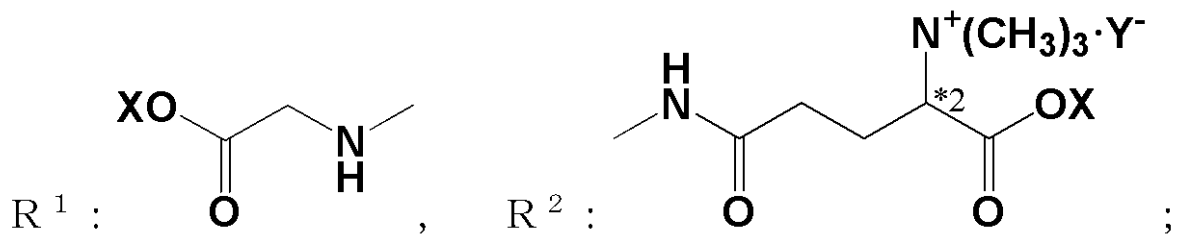
R^1 及び R^2 は下記のいずれかの組み合わせである、請求項1に記載のクロマトグラフィー用充填剤。

30

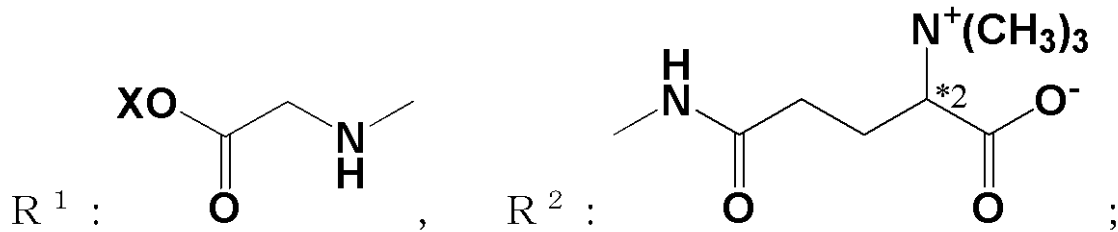
【化 2】



10



20



30

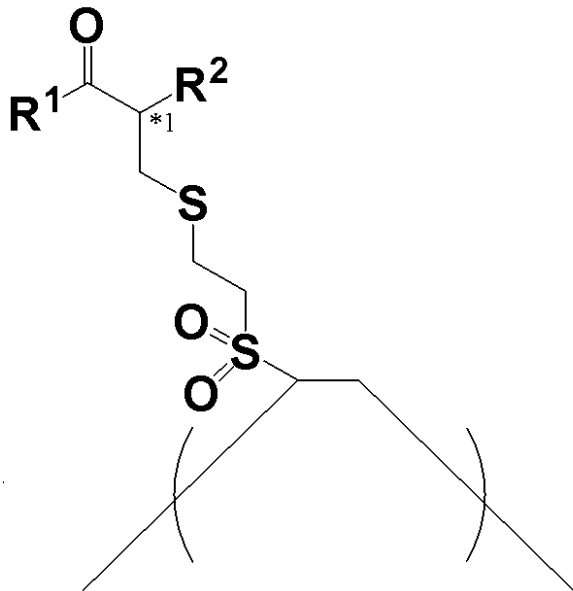
[式中、Xは水素原子またはアルカリ金属原子を示す。Y⁻は、カウンターイオンを示す。

* 2 は、不斉炭素を示す。]

【請求項 3】

下記一般式(1)で表される繰り返し単位からなるポリマー。

【化 3】



(1)

10

[式中、 R^1 は OX 、 O^- または第 1 のアミノ酸残基を示し、 R^2 はアミン基 (NH_2)、
 トリメチルアンモニウム基 ($N^+(CH_3)_3$) または NHR^a を示す。
 X は水素原子またはアルカリ金属原子を示す。

20

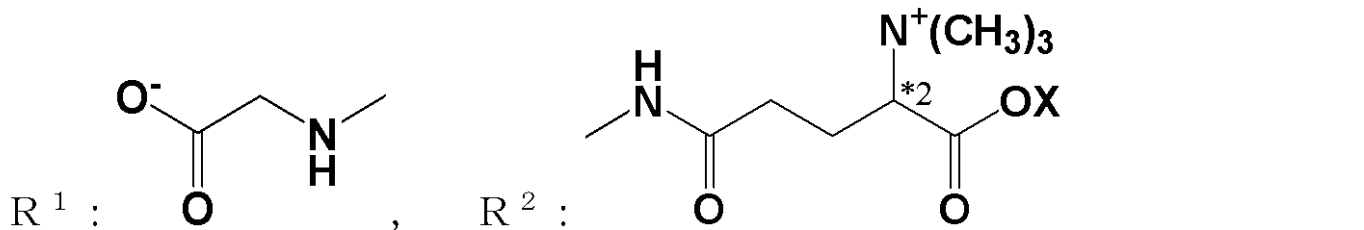
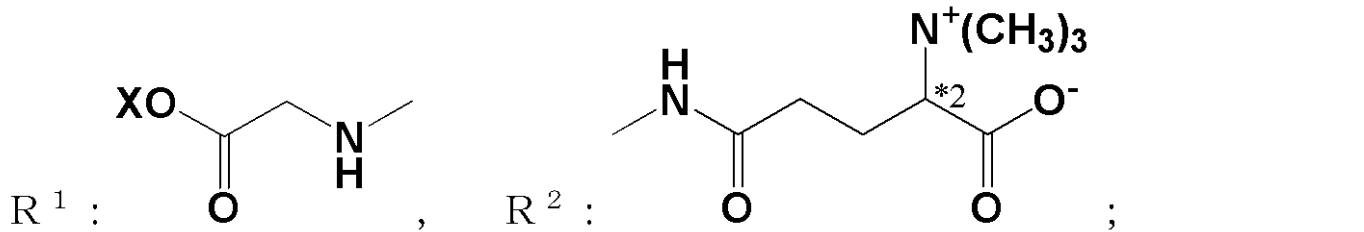
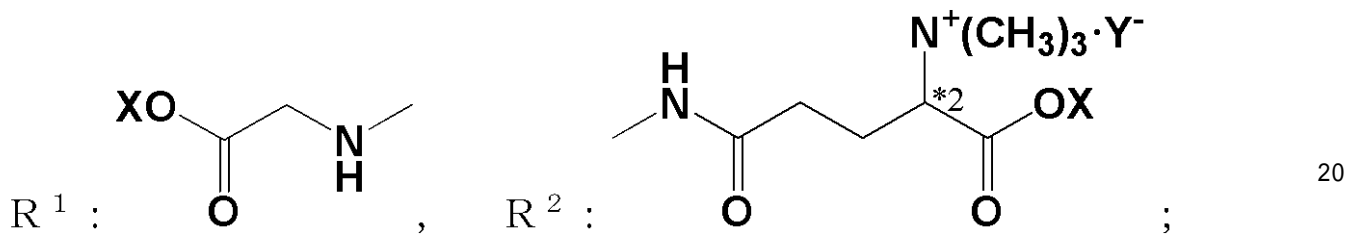
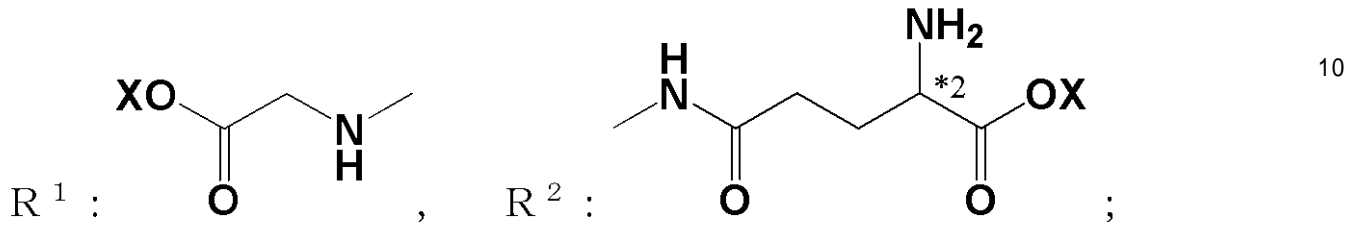
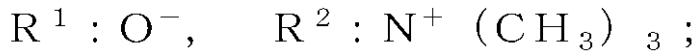
R^a は、第 2 のアミノ酸残基を示す。

* 1 は、不斉炭素を示す。]

【請求項 4】

R^1 及び R^2 は下記のいずれかの組み合わせである、請求項 1 に記載のポリマー。

【化4】



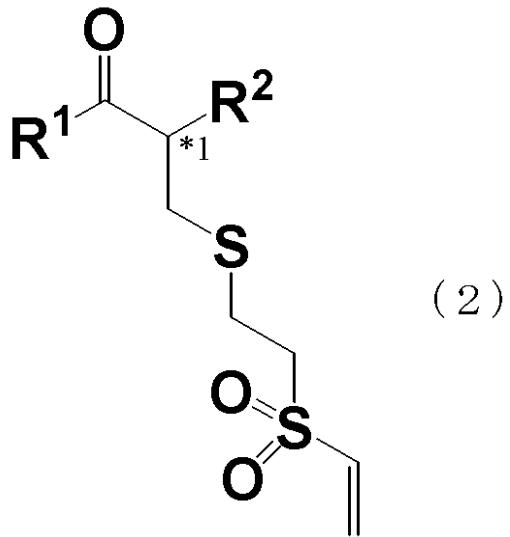
[式中、Xは水素原子またはアルカリ金属原子を示す。Y⁻は、カウンターイオンを示す。

* 2は、不斉炭素を示す。]

【請求項5】

下記一般式(2)で表される化合物。

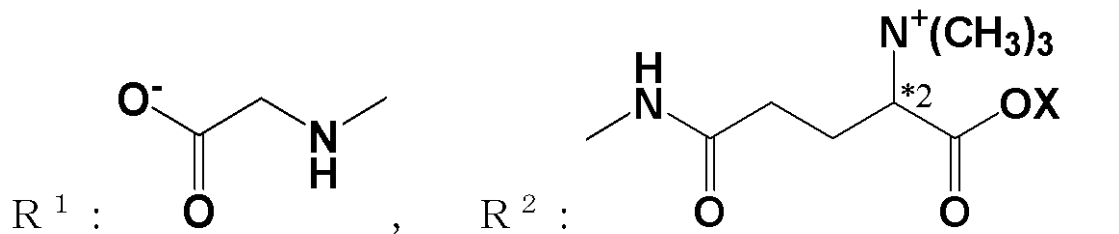
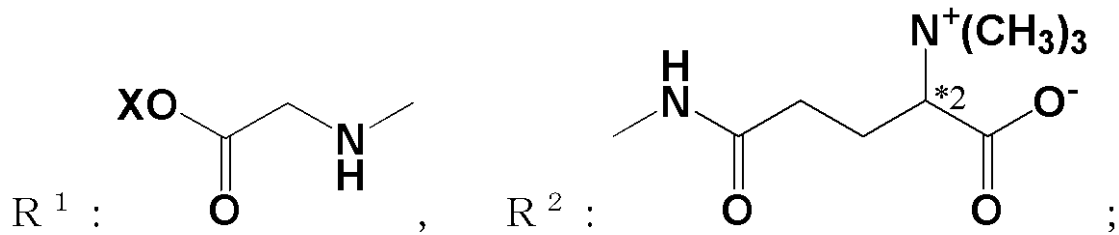
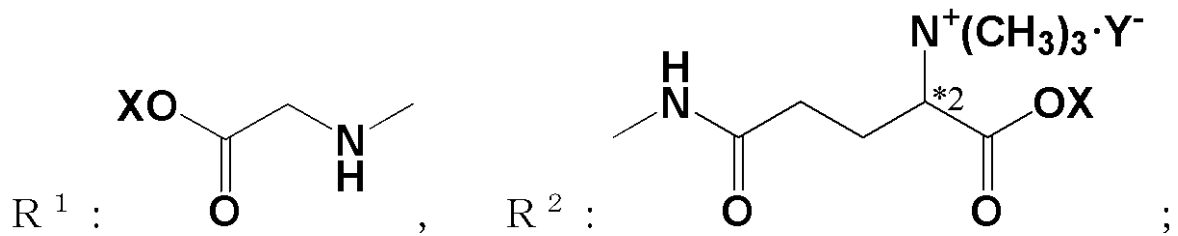
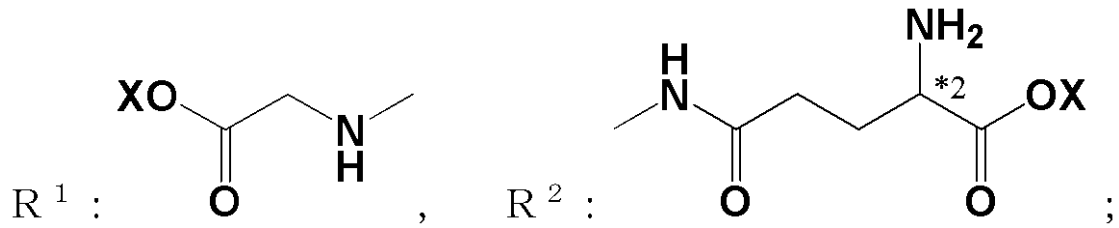
【化5】



10

[式中、R¹及びR²は下記のいずれかの組み合わせである：

【化 6】



10

20

30

Xは水素原子またはアルカリ金属原子を示す。Y⁻は、カウンターイオンを示す
* 1 及び * 2 は、不斉炭素を示す。]

【請求項 6】

(i) チオール基含有化合物とジビニルスルホンとを反応させて、モノマー (a) を得る工程、及び、

(ii) 表面に重合性不飽和基またはチオール基を有するシリカ担体の表面上で、前記モノマー (a) を重合する工程
を含む、クロマトグラフィー用充填剤の製造方法。

40

【請求項 7】

前記工程 (ii) において、水溶性のアゾ型重合開始剤の存在下で反応を行う、請求項 6 に記載の製造方法。

【請求項 8】

請求項 1 または 2 に記載のクロマトグラフィー用充填剤を充填したカラムを使用して、化合物を分離する工程を含む、化合物の分離方法、

【請求項 9】

分離される化合物が光学活性化合物である、請求項 8 に記載の方法。

50

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、主にクロマトグラフィー用充填剤及びその製造方法、ポリマー、化合物、並びに化合物の分離方法に関する。

【背景技術】

【0002】

高速液体クロマトグラフィー (High performance liquid chromatography, HPLC) は工業科学・生命科学・医薬学・環境科学など幅広い分野の精密分離分析において必要不可欠な手法であり、現在ではより高度な分離が求められている。

10

【0003】

HPLC分析は大半が最も適用範囲が広い反相クロマトグラフィー (Reversed-phase liquid chromatography, RPLC) によって行われている。しかし、生命科学において非常に重要な生体内での代謝成分をはじめ、核酸、糖、ペプチドなどは親水性を示すものが多く、RPLCでは保持時間が短く、精密分離が困難な場合がある。

【0004】

このような高極性物質の分離手段にはイオン交換クロマトグラフィー (Ion-exchange chromatography, IEC)、順相クロマトグラフィー (Normal Phase Liquid Chromatography, NPLC) といった分離モードが用いられる。しかし、IECでは中性の極性物質の分離ができず、NPLCでは移動相に極性の高い溶媒を用いることができないため、高極性化合物を溶解できない場合がある。そこで、親水性の試料を分離するための手段として親水性相互作用液体クロマトグラフィー (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography, HILIC) が注目を集めている。HILICは、移動相に有機溶媒と水または緩衝液の混合溶媒を用いる点で一般のNPLCとは異なる。

20

【0005】

更に水系の移動相を用いるため、NPLCでは導入が困難であったエレクトロスプレーイオン化 (Electrospray ionization, ESI) を用いた質量分析法 (Mass Spectrometry, MS) への接続および利用が容易になった。

【0006】

生命科学においてメタボローム解析やゲノム解析の需要が増えている今、HILICモードは正に必要とされている分析方法と言える。HILICモードでの測定はガスクロマトグラフィー質量分析で測定することができない熱に弱い物質や沸点の高い物質を液体クロマトグラフィー質量分析で測定することを可能としている。また従来はRPLCやIECで行われていた核酸やヌクレオシドの分析にも適用することができる。このことからHILICモードを用いることで生体物質の分析の幅が更に広がることが予想される。

30

【0007】

しかしながら、HILICモードでは、移動相に有機溶媒、水の混合物を用いるため、水が固定相と水素結合、イオン-双極子相互作用、双極子-双極子相互作用する。結果として、分離対象のサンプルと固定相の直接的な水素結合、イオン-双極子相互作用、双極子-双極子相互作用が制限されてしまう。

40

【0008】

また、糖は高極性物質であるが、異性体ごとの極性にあまり違いがなく、中性物質であり、イオン相互作用を用いる場合は強塩基性条件で分析する必要があり、適用できるサンプル、固定相に制限がかかる。糖の光学異性体分離は、以下の2つの点で困難である。1つ目は現有のカラムでは保持が小さい点、2つ目は固定相と強く相互作用を示す官能基が存在しない点である。近年では、希少な単糖の生理活性が明らかになりつつあり、糖のリン酸化合物が癌のバイオマーカーとして注目されていることなどから、糖の分離技術を確立することは大きな意義を持っている。

【0009】

親水性と光学分割能をともに発現する固定相や糖の異性体を分離可能な固定相は、現存

50

のものは能力が不十分であり、さらなる開発が求められているのが現状である。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0010】

【特許文献1】特開2006-122851号

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

本発明は上記を鑑みて、親水性相互作用液体クロマトグラフィーにおいて使用できる新規のクロマトグラフィー用充填剤を提供することを目的とする。特に、アミノ酸、糖などの光学分割能を有するクロマトグラフィー用充填剤を提供することを目指す。

10

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明者は、鋭意検討の結果、特定の繰り返し単位からなるポリマーで表面が修飾されたシリカ担体からなるクロマトグラフィー用充填剤を用いて、上記課題を解決できることを見出した。本発明は、さらに検討を重ねて完成したものである。

【0013】

本発明は、下記の態様を包含する。

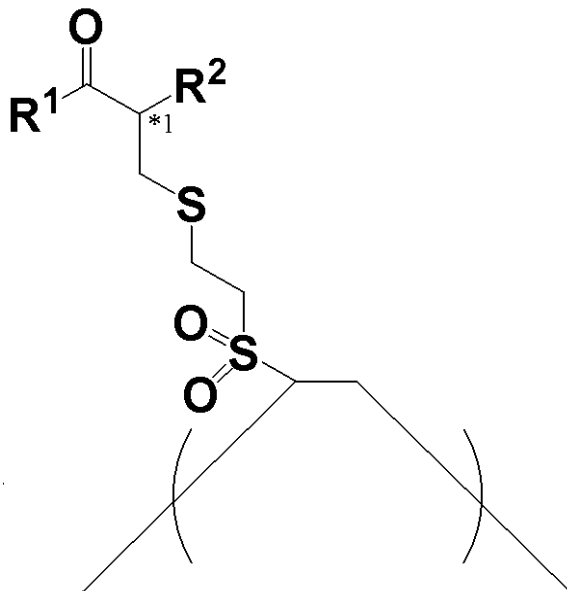
【0014】

項1、下記一般式(1)で表される繰り返し単位からなるポリマーで表面が修飾されたシリカ担体からなる、クロマトグラフィー用充填剤。

20

【0015】

【化1】



30

40

【0016】

[式中、 R^1 はOX、 O^- または第1のアミノ酸残基を示し、 R^2 はアミン基(NH_2)、トリメチルアンモニウム基($N^+(CH_3)_3$)または NHR^a を示す。

Xは水素原子またはアルカリ金属原子を示す。

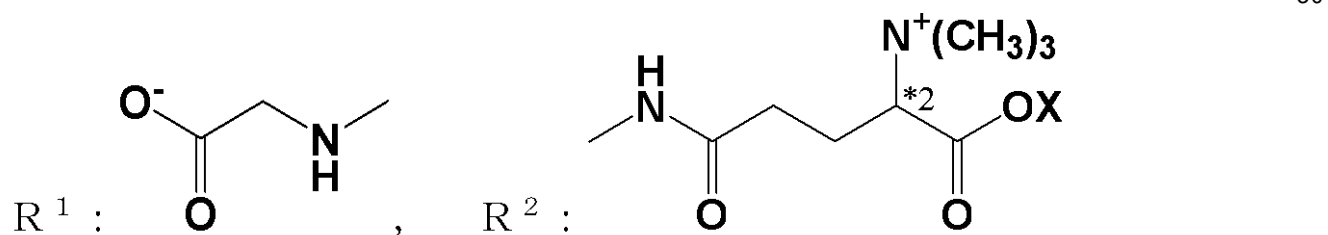
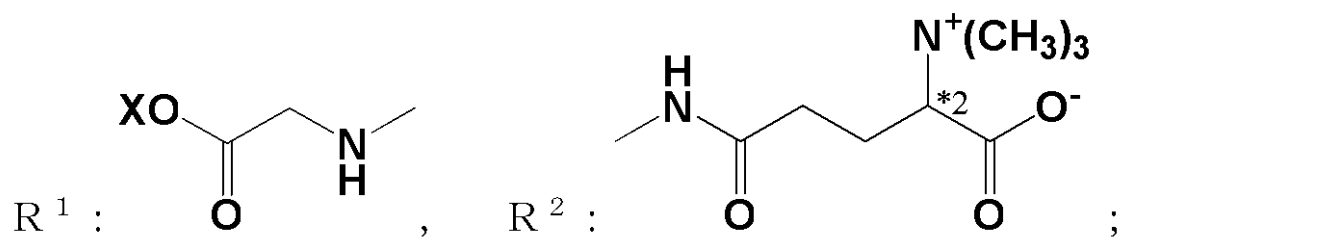
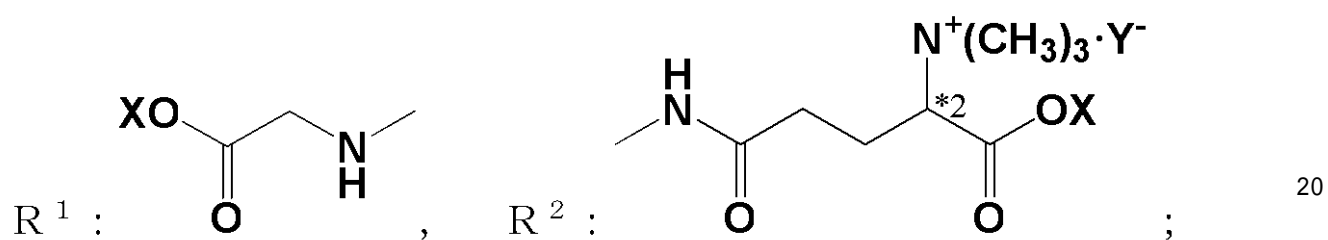
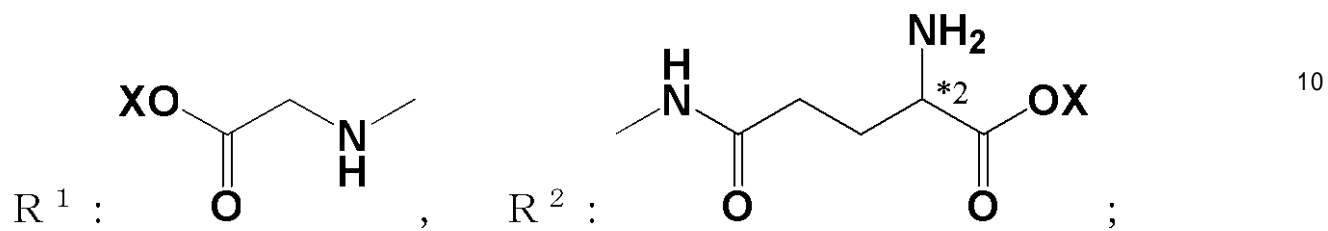
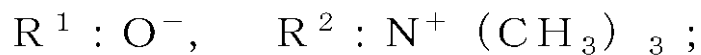
R^a は、第2のアミノ酸残基を示す。

*1は、不斉炭素を示す。]

項2、 R^1 及び R^2 は下記のいずれかの組み合わせである、項1に記載のクロマトグラフィー用充填剤。

【0017】

【化 2】



【 0 0 1 8 】

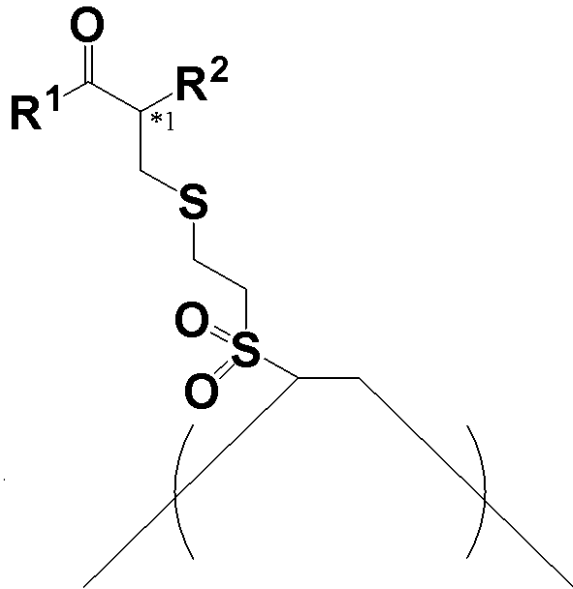
[式中、X は水素原子またはアルカリ金属原子を示す。Y⁻ は、カウンターイオンを示す

* 2 は、不斉炭素を示す。]

項 3、下記一般式 (1) で表される繰り返し単位からなるポリマー。

【 0 0 1 9 】

【化 3】



(1)

10

【 0 0 2 0 】

[式中、 R^1 は OX 、 O^- または第 1 のアミノ酸残基を示し、 R^2 はアミン基 (NH_2)、
 トリメチルアンモニウム基 ($N^+(CH_3)_3$) または NHR^a を示す。 20

X は水素原子またはアルカリ金属原子を示す。

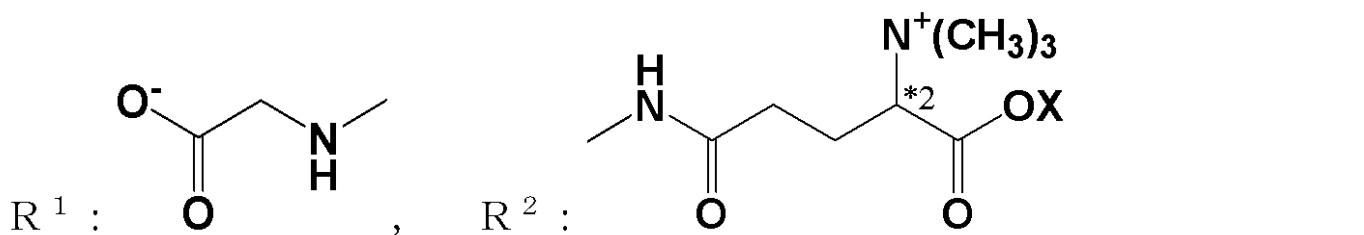
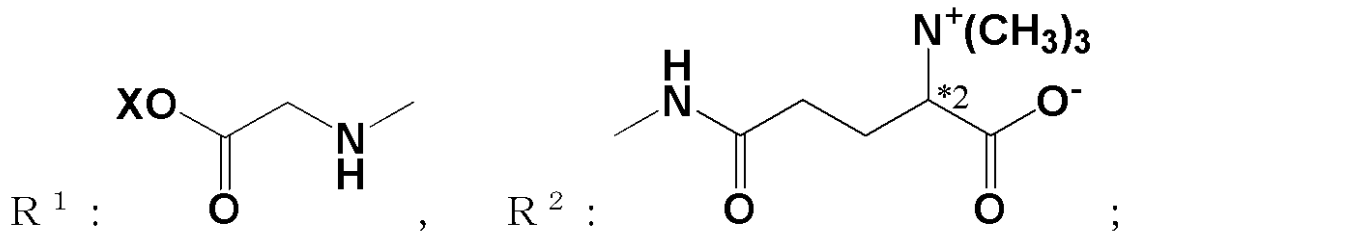
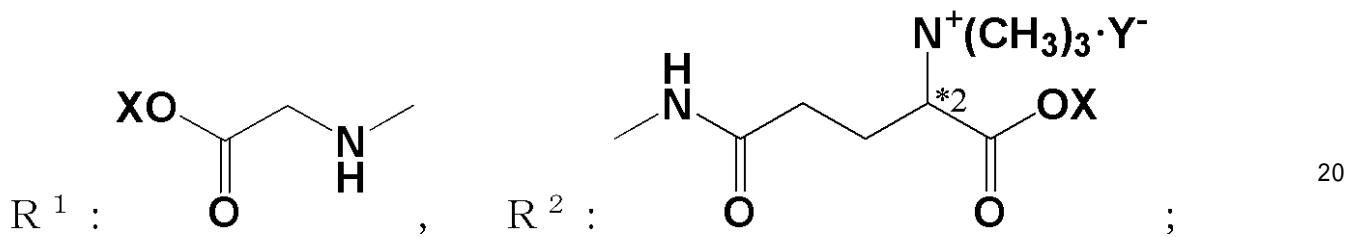
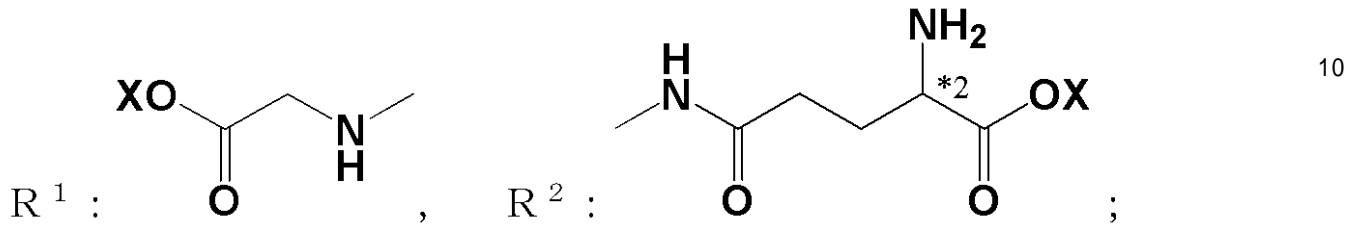
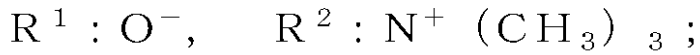
R^a は、第 2 のアミノ酸残基を示す。

* 1 は、不斉炭素を示す。]

項 4、 R^1 及び R^2 は下記のいずれかの組み合わせである、項 1 に記載のポリマー。

【 0 0 2 1 】

【化4】



【0022】

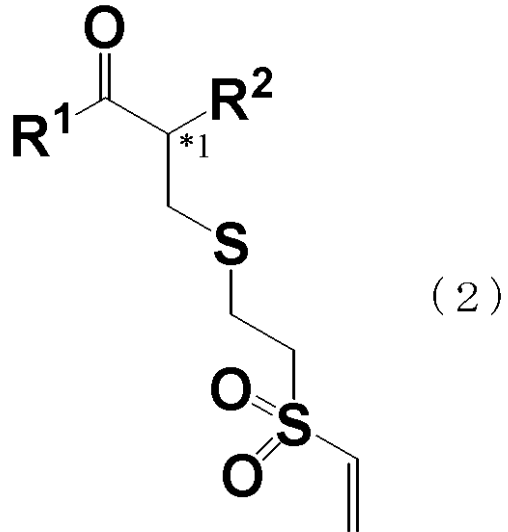
[式中、Xは水素原子またはアルカリ金属原子を示す。Y⁻は、カウンターイオンを示す。]

* 2は、不斉炭素を示す。]

項5、下記一般式(2)で表される化合物。

【0023】

【化5】



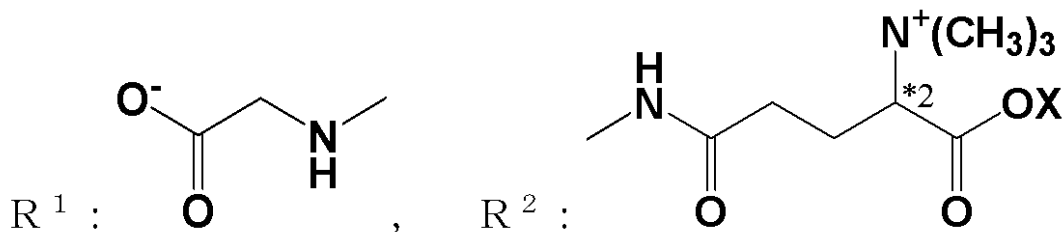
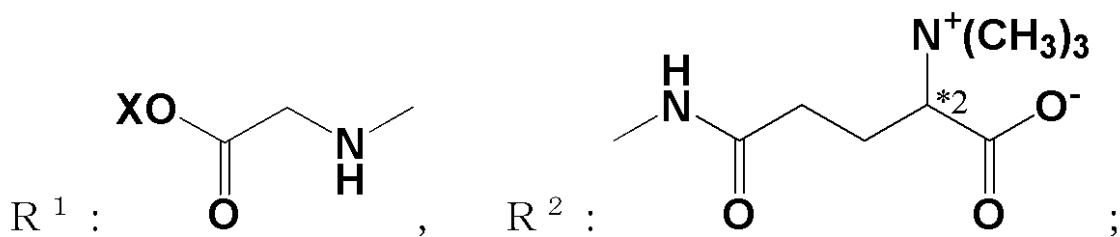
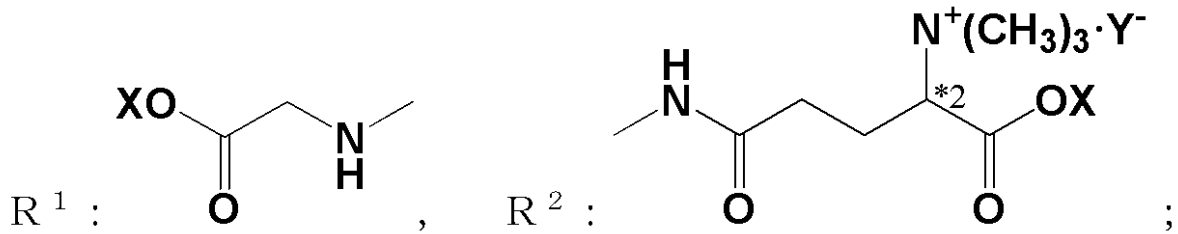
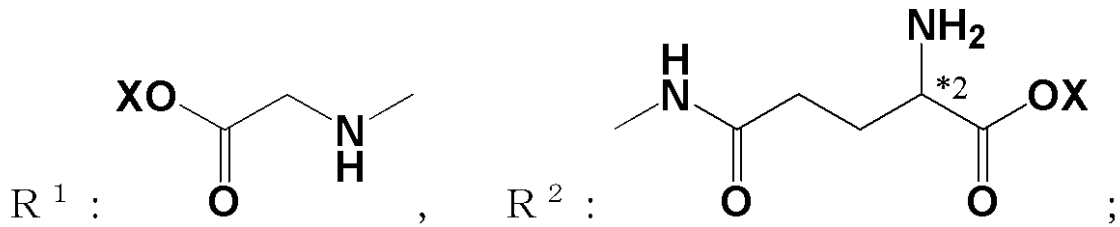
10

【0024】

[式中、R¹及びR²は下記のいずれかの組み合わせである：

【0025】

【化6】



【0026】

Xは水素原子またはアルカリ金属原子を示す。Y⁻は、カウンターイオンを示す。

*1及び*2は、不斉炭素を示す。]

項6、(i)チオール基含有化合物とジビニルスルホンとを反応させて、モノマー(a)を得る工程、及び、

(ii)表面に重合性不飽和基またはチオール基を有するシリカ担体の表面上で、前記モノマー(a)を重合する工程

を含む、クロマトグラフィー用充填剤の製造方法。

40

【0027】

項7、前記工程(ii)において、水溶性のアゾ型重合開始剤の存在下で反応を行う、項6に記載の製造方法。

【0028】

項8、項1または2に記載のクロマトグラフィー用充填剤を充填したカラムを使用して、化合物を分離する工程を含む、化合物の分離方法、

項9、分離される化合物が光学活性化合物である、項8に記載の方法。

【発明の効果】

【0029】

本発明により、新規な親水性相互作用液体クロマトグラフィーにおいて使用できるクロ

50

マトグラフィー用充填剤及びその製造方法が提供される。本発明のクロマトグラフィー用充填剤は、光学活性を有する分子を固定相に結合したものであるため、親水性条件での光学分割に使用することができる。本発明のクロマトグラフィー用充填剤は、ほぼ中性の表面を有し、市販のカラムに比肩する親水性を有する。また、市販の双性イオン型カラムと類似の、有利な分離特性を示すものである。

【0030】

本発明のクロマトグラフィー用充填剤を使用することで、複雑な生体成分の光学異性体を含めた分離と検出が可能となり、アミノ酸や糖の光学異性体の生理活性を解明することにつながると期待される。さらには、現在はその起源や成り立ちを含め、謎のままとされている自然界の糖がD体優先、及び、アミノ酸がL体優先のホモキラリティの現象を、解明する手段を提供することも期待される。

10

【図面の簡単な説明】

【0031】

【図1】VS-GSHのNMRスペクトル。

【図2】VS-CysのNMRスペクトル。

【図3】MASのNMRスペクトル。

【図4】レーダープロットによる比較。

【図5】カラムの親水性の比較。

【図6】(OH) - (Tb/Tp)プロットによる分類。

【図7】ヌクレオチドの分離結果を示す。

20

【図8】VS-GSH水溶液の温度応答性。

【図9】温度変化によるVS-GSH-Devの保持、選択性の変化。

【発明を実施するための形態】

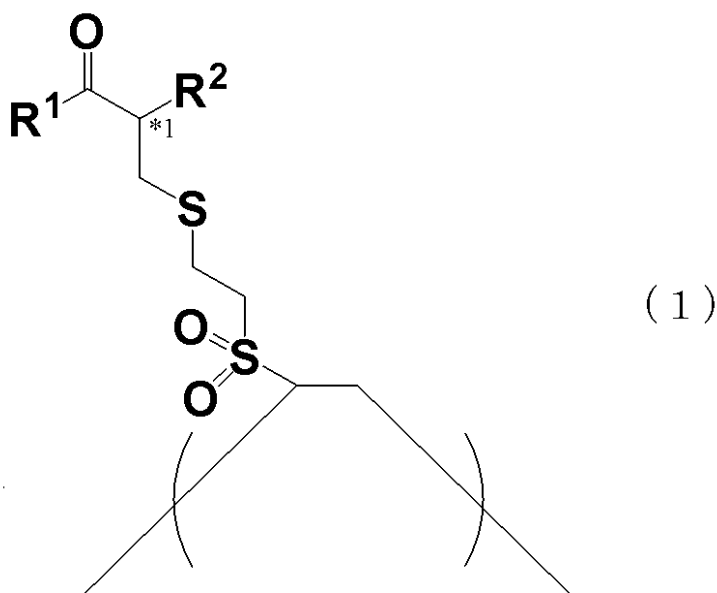
【0032】

1. クロマトグラフィー用充填剤

本発明のクロマトグラフィー用充填剤は、シリカ担体を基材とし、下記一般式(1)で表される繰り返し単位からなるポリマーで表面が修飾されたシリカ担体からなる。

【0033】

【化7】



30

40

【0034】

一般式(1)中、R¹はOX、O⁻または第1のアミノ酸残基を示し、R²はアミン基(NH₂)、トリメチルアンモニウム基(N⁺(CH₃)₃)またはNHR^aを示す。R^aは、第2のアミノ酸残基を示す。

50

【0035】

アミノ酸残基は、アラニン (Ala)、アルギニン (Arg)、アスパラギン (Asn)、アスパラギン酸 (Asp)、グルタミン (Gln)、グルタミン酸 (Glu)、グリシン (Gly)、ヒスチジン (His)、イソロイシン (Ile)、ロイシン (Leu)、リシン (Lys)、メチオニン (Met)、フェニルアラニン (Phe)、プロリン (Pro)、セリン (Ser)、トレオニン (Thr)、トリプトファン (Trp)、チロシン (Tyr)、バリン (Val) の生体を構成するアミノ酸 (ただし、システイン (Cys) を除く。) に由来する残基である。

【0036】

第1のアミノ酸残基は、アミノ酸のアミン基が、 R^1 に結合する $C=O$ 基とともにアミド結合 ($-NHC(=O)-$) を形成したアミノ酸残基を指す。アミド結合を形成するアミン基は、 α 位のアミン基であっても、リシンなどの β 位以外のアミン基を有するアミノ酸の、 β 位以外のアミン基であってもよい。

10

【0037】

第2のアミノ酸残基は、アミノ酸のカルボキシル基が、 NHR^a の NH 基とともにアミド結合 ($-NHC(=O)-$) を形成したアミノ酸残基を指す。アミド結合を形成するカルボキシル基は、 α 位のカルボキシル基であっても、アスパラギン酸、グルタミン酸などの β 位以外のカルボキシル基を有するアミノ酸の、 β 位以外のカルボキシル基であってもよい。

20

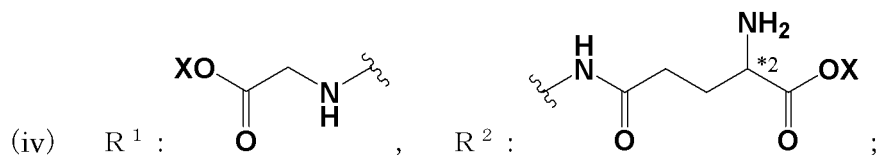
【0038】

本発明の好ましい態様において、 R^1 及び R^2 は下記のいずれかの組み合わせである。

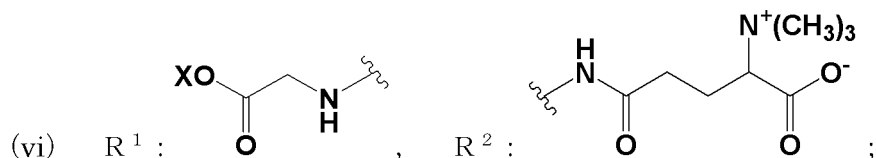
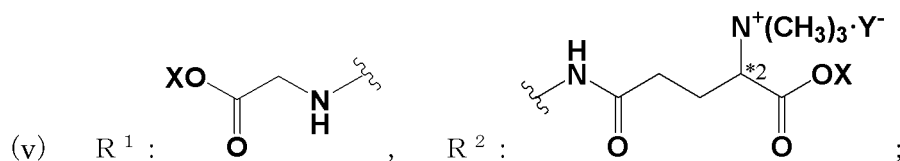
【0039】

【化8】

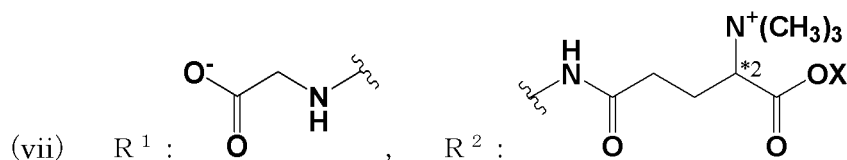
- (i) $R^1 : OX, R^2 : NH_2$;
 (ii) $R^1 : O^-, R^2 : N^+(CH_3)_3$;
 (iii) $R^1 : OX, R^2 : N^+(CH_3)_3 \cdot Y^-$;



30



40



【0040】

上記 (i) ~ (iii) の場合は、繰り返し単位部分が、システインまたはその誘導体に由

50

来する。上記 (iv) ~ (vii) の場合は、繰り返し単位部分が、グルタチオンまたはその誘導体に由来する。

【 0 0 4 1 】

繰り返し単位部分はシステイン、グルタチオン以外に由来する場合であっても、アミン基はトリメチルアンモニウム基であってもよい。

【 0 0 4 2 】

なお、繰り返し単位部分及び/またはポリマー部分は、全体が電氣的に電荷量が中和となるように構成されていることが好ましい。例えば、トリメチルアンモニウム基を有する場合、上記と同様に、分子内のカルボキシレート基 (COO^-) との双性イオンを形成すること、または、カウンターイオン Y^+ を用いることにより、電氣的に電荷量が中和されている。

10

【 0 0 4 3 】

一般式 (1) において、X は水素原子またはアルカリ金属原子 (例えば、リチウム原子、ナトリウム原子、カリウム原子。) を示す。

【 0 0 4 4 】

一般式 (1) において、 Y^- は、カウンターイオンを示す。カウンターイオンとしては、ハロゲンイオンまたは無機酸もしくは有機酸のイオンが例示される。ハロゲンイオンとしては、フッ素イオン、塩素イオン、臭素イオン、ヨウ素イオンが挙げられる。無機酸のイオンとしては、硝酸イオン、硫酸イオン；有機酸のイオンとしてはメタンスルホン酸などのスルホン酸のイオンが例示される。

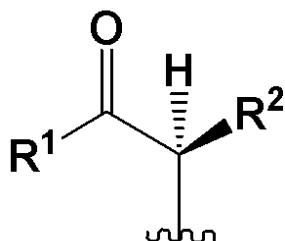
20

【 0 0 4 5 】

一般式 (1) 中、* 1 は不斉炭素を示す。C * 1 は、下記 L 配置

【 0 0 4 6 】

【 化 9 】



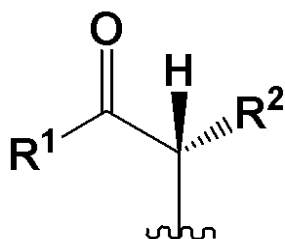
30

【 0 0 4 7 】

又は、下記 D 配置

【 0 0 4 8 】

【 化 10 】



40

【 0 0 4 9 】

[式中、 R^1 、 R^2 、は前記に同じ。]

のいずれかまたはその混合物 (ラセミ体を含む。) でもあってよいが、L 配置または D 配置であることが好ましい。入手が容易との観点から、L 配置であることが特に好ましい。

【 0 0 5 0 】

前記第 1 のアミノ酸残基及び第 2 のアミノ酸残基は、D 体もしくは L 体のいずれかまたはその混合物 (ラセミ体を含む。) でもあってよいが、L 体または D 体であることが好まし

50

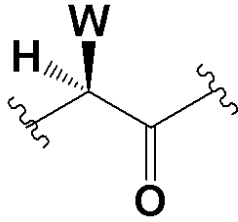
い。入手が容易との観点から、L体であることが特に好ましい。

【0051】

一般式(1)中、*2は、不斉炭素を示す。C*2は、下記L配置

【0052】

【化11】



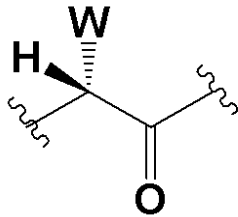
10

【0053】

又は、下記D配置

【0054】

【化12】



20

【0055】

[式中、WはNH₂またはN⁺(CH₃)₃を示す。]

のいずれまたはその混合物(ラセミ体を含む。)でもあってよいが、L配置またはD配置であることが好ましい。入手が容易との観点から、L配置であることが特に好ましい。

【0056】

ポリマーは、一般式(1)で表される繰り返し単位を、2以上有する。繰り返し単位の数は、好ましくは20~2,000程度であり、特にこのましくは200~400程度である。ポリマー部分の分子量は、好ましくは5,000~1,000,000程度であり、特にこのましくは50,000~100,000程度である。

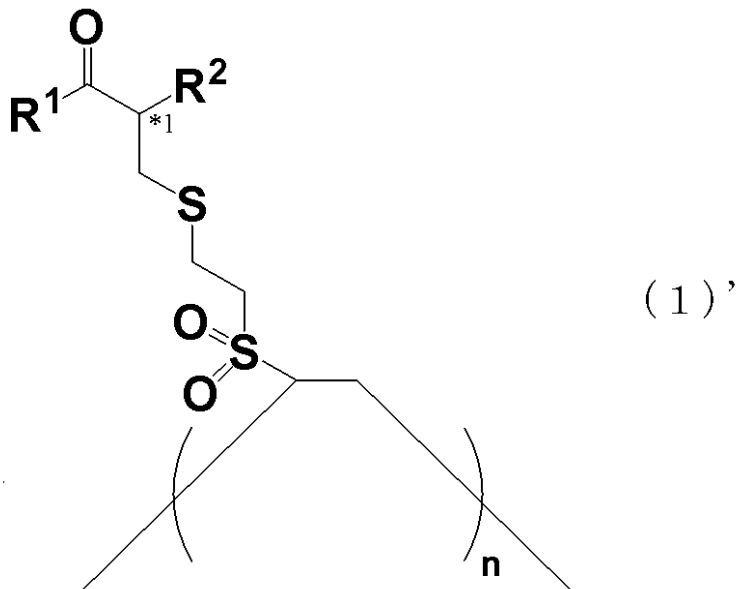
30

【0057】

従って、本発明のポリマーは、下記一般式(1)'で表される。

【0058】

【化 1 3】



10

【0059】

20

[式中、 R^1 、 R^2 、*1は前記に同じ。nは、2以上の整数を示す。]

シリカ担体は、クロマトグラフィー用充填剤の単体として使用できるものであれば特に限定されない。例えば、球状多孔質シリカゲル（例えば、粒子径1～200 μm 程度、好ましくは1～10 μm 程度のもの。）、モノリス型多孔質シリカなどが例示される。

【0060】

モノリス型多孔質シリカは、例えば文献：Motokawa M et al., J. Chromatogr. A 961: 53-63 (2002). に準じて製造することができる。

【0061】

一般式(1)で表される繰り返し単位からなるポリマーは、シリカ担体の表面に直接結合していてもまたはアンカー（リンカー）を介して結合していてもよい。

30

【0062】

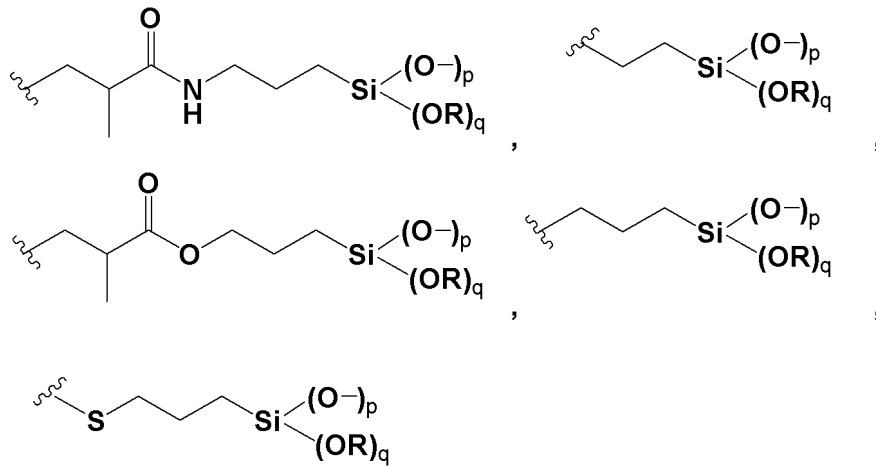
アンカー（リンカー）を介して結合している場合は、ある態様においては、3-メタクリロキシプロピルトリエトキシシラン（MOPTES）、3-メタクリルアミドプロピルトリエトキシシラン（MAPTES）、ビニルトリメトキシシラン（VTMS）、アリルトリメトキシシラン（ATMS）、3-メルカプトプロピルトリメトキシシラン（MPTMS）などに由来するアンカー（リンカー）を介している。

【0063】

アンカー（リンカー）の具体例を下記に挙げるが、これに限定されるものではない。

【0064】

【化 1 4】



10

【 0 0 6 5 】

[式中、R はメチルまたはエチルを示す。p 及び q はそれぞれ 0 ~ 3 整数であり、 $p + q = 3$ である。]

この場合、アンカー（リンカー）は、 $-Si-O-$ を介してシリカ担体のシラノール基と結合している（上記式の右側）。また、上記式の左側で、ポリマーと直接結合している。

20

【 0 0 6 6 】

本発明のクロマトグラフィー充填剤は、後述する製造方法により製造することができる。

【 0 0 6 7 】

2. クロマトグラフィー用充填剤の製造方法

本発明はまた、以下の工程を含むクロマトグラフィー用充填剤の製造方法をも提供する：

(i) チオール基含有化合物とジビニルスルホンとを反応させて、モノマー (a) を得る工程、及び、

30

(i i) 表面に重合性不飽和基を有するシリカ担体の表面上で、前記モノマー (a) を重合する工程

を含む、クロマトグラフィー用充填剤の製造方法。

【 0 0 6 8 】

以下、工程 (i) 及び工程 (i i) について詳述する。

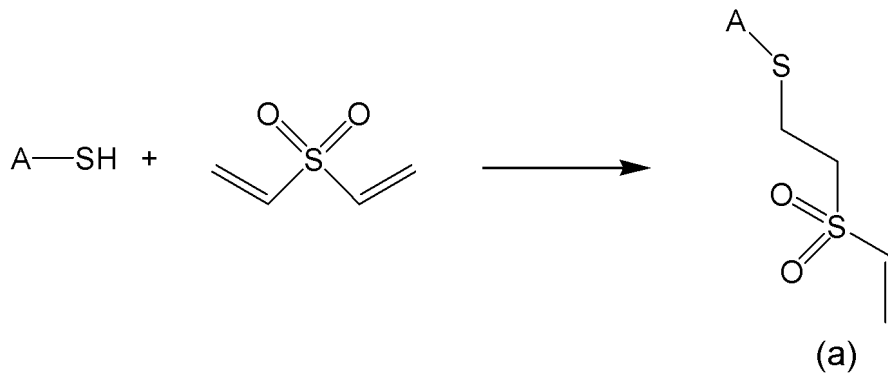
【 0 0 6 9 】

工程 (i)

【 0 0 7 0 】

【化 1 5】

反応式 1



10

【0071】

反応式 1

[式中、A は有機基を示す。]

工程 (i) において、チオール基含有化合物 (A - S H) とジビニルスルホンとを反応させてモノマー (a) を得る。

【0072】

チオール基含有化合物は、1つのチオール基を有する化合物であれば特に限定されるものではない。チオール基含有化合物の具体例としては、システイン、ホモシステインなどのチオール基含有アミノ酸、チオール基含有アミノ酸残基を含むペプチド化合物 (例えば、2 ~ 50 残基からなるもの ; 2 ~ 10 アミノ酸残基からなるもの ; 2 ~ 5 アミノ酸残基からなるもの ; 2 または 3 アミノ酸残基からなるものなど。) などが例示される。チオール基含有アミノ酸残基を含むペプチド化合物としては、グルタチオンが例示されるが、これに限定されるものではない。

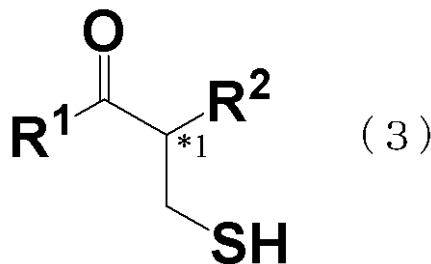
20

【0073】

チオール基含有化合物の一例を下記一般式 (3) に示す。

【0074】

【化 1 6】



30

【0075】

[式中、R¹、R²、*1 は前記に同じ。]

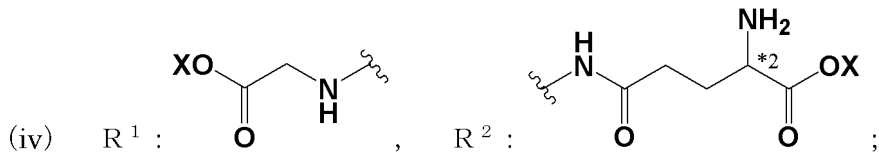
40

本発明の好ましい態様において、R¹ 及び R² は下記のいずれかの組み合わせである。

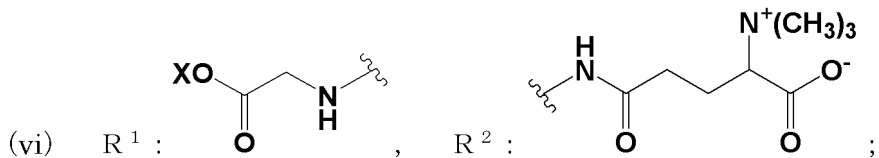
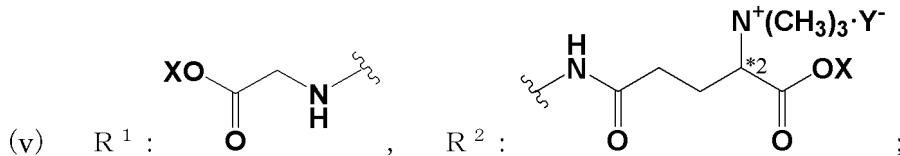
【0076】

【化 17】

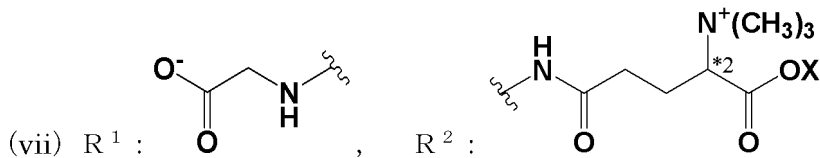
- (i) $R^1 : OX, R^2 : NH_2$;
 (ii) $R^1 : O^-, R^2 : N^+ (CH_3)_3$;
 (iii) $R^1 : OX, R^2 : N^+ (CH_3)_3 \cdot Y^-$;



10



20



【0077】

[式中、X、Y、*2 は前記に同じ。]

製造されるクロマトグラフィー用充填剤の光学分割能が高いとの観点から、チオール基含有化合物として不斉炭素を有する光学活性化合物を使用することができる。特に、チオール基含有化合物として、チオール基含有アミノ酸、チオール基含有アミノ酸残基を含むペプチド化合物は、光学活性を有するチオール基含有化合物である。各不斉炭素の立体配置 (L 配置 / D 配置) は、一の立体配置 (L 体または D 体) 又はその混合物 (D / L 体 (ラセミ体) を含む。) のいずれであってもよい。光学分割能が高いとの観点から、L 体または D 体であることが好ましい。

30

【0078】

工程 (i) の反応温度、反応時間、各試薬の使用量は、当業者が適宜設定することができる。例えば、反応温度は、10 ~ 80 程度とすることができる。反応時間は、30分 ~ 108 時間程度とすることができる。各試薬の使用量は、1モルの化合物チオール基含有化合物に対して、0.1モル ~ 過剰量のビニルスルホンとすることができる。

【0079】

工程 (i) の反応は、適当な溶媒中で行うことにより、有利に反応が進行する。溶媒としては、水性溶媒が好ましい。水性溶媒は、水、水とメタノール、エタノールなどの有機溶媒との混合溶媒が挙げられるが、これに限定されない。

40

【0080】

意図しないジビニルスルホン及びモノマー (a) の重合を阻害するために、亜硝酸ナトリウム、ヒドロキノン、ベンゾキノンなどの重合禁止剤の存在下で反応を行うこともできる。重合禁止剤の使用量は、モノマー (a) の使用量に対して 1 ~ 5, 000 重量 ppm 程度とすることができる。

【0081】

必要に応じて濾過、濃縮、抽出等の単離工程、及び / 又はカラムクロマトグラフィー、再

50

結晶化等の精製工程を経て目的とするモノマー (a) を得ることができる。

【 0 0 8 2 】

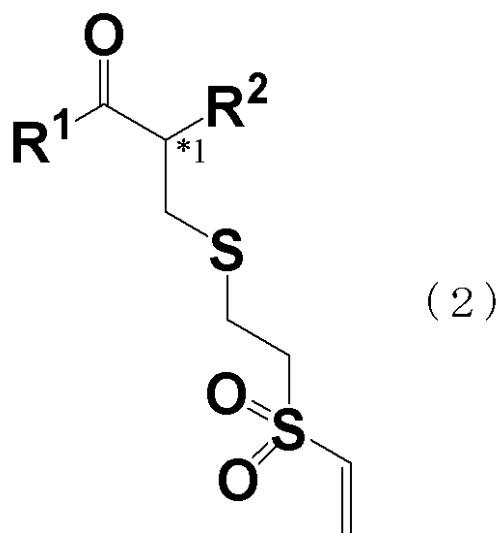
モノマー (a) が合成されたことは、例えば ^1H - NMR 測定、 ^{13}C - NMR 測定、質量分析等の公知の手段により確認することができる。

【 0 0 8 3 】

本発明の態様の一つにおいて、得られるモノマー (a) は下記一般式 (2) で表される化合物である。

【 0 0 8 4 】

【 化 1 8 】



10

20

【 0 0 8 5 】

[式中、 R^1 、 R^2 、* 1 は前記に同じ。]

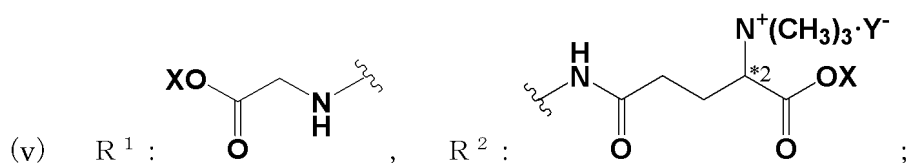
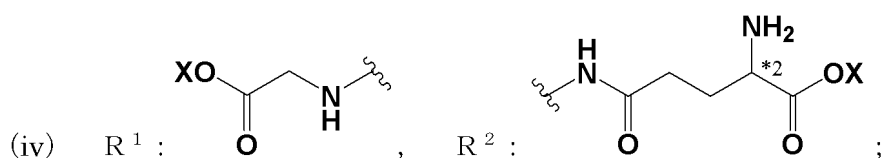
本発明の好ましい態様において、 R^1 及び R^2 は下記のいずれかの組み合わせである。

【 0 0 8 6 】

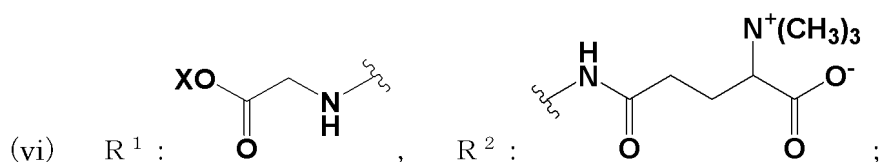
【 化 1 9 】

- (i) $R^1 : \text{OX}$, $R^2 : \text{NH}_2$;
 (ii) $R^1 : \text{O}^-$, $R^2 : \text{N}^+ (\text{CH}_3)_3$;
 (iii) $R^1 : \text{OX}$, $R^2 : \text{N}^+ (\text{CH}_3)_3 \cdot \text{Y}^-$;

30



40



【 0 0 8 7 】

50

[式中、X、Y、* 2 は前記に同じ。]

工程 (i i)

工程 (i i) において、表面に重合性不飽和基またはチオール基を有するシリカ担体の表面上で、前記モノマー (a) を重合する。重合は、公知の手法 (例えば、特許文献 1) に準じて行うことができる。

【 0 0 8 8 】

シリカ担体は、球状多孔質シリカゲル (例えば、粒子径のもの。)、モノリス型多孔質シリカなどが例示される。

【 0 0 8 9 】

表面に重合性不飽和基を有するシリカ担体は、シリカ担体と、重合性不飽和基を有する若しくは生じるシランカップリング剤とを反応させて得ることができる。重合性不飽和基を有する若しくは生じるシランカップリング剤としては、3 - メタクリロキシプロピルトリエトキシシラン (M O P T E S)、3 - メタクリルアミドプロピルトリエトキシシラン (M A P T E S)、ビニルトリメトキシシラン (V T M S)、アリルトリメトキシシラン (A T M S) などが例示される。当該反応において、シランカップリング剤はシリカ担体のシラノール基 (S i - O H 基) と反応する。

10

【 0 0 9 0 】

表面にチオール基を有するシリカ担体は、シリカ担体と、チオール基を有する若しくは生じるシランカップリング剤とを反応させて得ることができる。重合性不飽和基を有する若しくは生じるシランカップリング剤としては、3 - メルカプトプロピルトリメトキシシラン (M P T M S) などが例示される。当該反応において、シランカップリング剤はシリカ担体のシラノール基 (S i - O H 基) と反応する。

20

【 0 0 9 1 】

工程 (i i) の反応を有利に反応を進行させるために、重合開始剤の存在下で反応を行うことができる。重合開始剤としては、アゾビスイソブチロニトリル、過酸化ベンゾイル、過硫酸アンモニウムなどの公知の重合開始剤を使用することができる。中でも、反応が有利に進むとの観点から、2, 2' - アゾビス (プロパン-2-カルボアミジン) 二塩酸 (2, 2' -Azobis(2-methylpropionamide)dihydrochloride (V - 5 0))、アゾビス [2 - (2 - イミダゾリン - 2 - イル) プロパン] 二塩酸塩 (2, 2' -Azobis[2-(2-imidazolin-2-yl)propane] dihydrochloride (VA - 0 4 4))、2, 2' - アゾビス [2 - (- イミダゾリン - 2 - イル) プロパン] 二硫酸塩二水和物 (2, 2' -Azobis[2-(2-imidazolin-2-yl)propane] disulfate dihydrate (VA - 0 4 6 B))、2, 2' - アゾビス [N - (2 - カルボキシエチル) - 2 - メチルプロピオンアミジン] 水和物 (2, 2' -Azobis[N-(2-carboxyethyl)-2-methylpropionamide]hydrate (VA - 0 5 7))、2, 2' - アゾビス [2 - (2 - イミダゾリン - 2 - イル) プロパン] (2, 2' -Azobis[2-(2-imidazolin-2-yl)propane] (VA - 0 6 1))、2, 2' - ビス (2 - イミダゾリン - 2 - イル) [2, 2' - アゾビスプロパン] ・ 2 塩酸塩 (2, 2' -Azobis(1-imino-1-pyrrolidino-2-methylpropane)dihydrochloride (VA - 0 6 7))、2, 2' - アゾビス [N - (2 - ヒドロキシエチル) - 2 - メチルプロパンアミド] (2, 2' -Azobis[2-methyl-N-(2-hydroxyethyl)propionamide] (VA - 0 8 6))、などの水溶性アゾ重合開始剤が重合開始剤としては好ましい。

30

40

【 0 0 9 2 】

重合開始剤の使用量は、モノマー (a) に対して、0 . 0 0 0 1 ~ 1 モル % 程度、特に 0 . 0 0 1 ~ 0 . 5 モル % 程度とすることができる。

【 0 0 9 3 】

工程 (i i) の反応温度、反応時間、各試薬の使用量は、当業者が適宜設定することができる。例えば、反応温度は、20 ~ 80 程度とすることができる。反応時間は、1 ~ 5 時間程度とすることができる。各試薬の使用量は、シリカ担体が有する重合性不飽和基またはチオール基 1 モルに対して、1 モル程度 ~ 過剰量、10 モル程度 ~ 過剰量、20 ~ 2, 0 0 0 モル程度とすることができる。

【 0 0 9 4 】

50

工程 (i i) の反応は、適当な溶媒中で行うことにより、有利に反応が進行する。溶媒としては、水性溶媒が好ましい。水性溶媒は、水、水とメタノール、エタノール、ジメチルホルムアミドやアセトアミド、N, N' - ジメチルエチレン尿素などの有機溶媒との混合溶媒が挙げられるが、これに限定されない。

【 0 0 9 5 】

かくして、ポリマーで表面が修飾されたシリカ担体からなるクロマトグラフィー用充填剤が製造される。必要に応じて、クロマトグラフィー用充填剤を洗浄することが好ましい。特にシリカ担体がモノリス型多孔質シリカである場合、反応の副生成物であるシリカ担体と結合しなかったポリマーが目詰まりを起こす場合があり、十分な洗浄を行わうことが望ましい。

【 0 0 9 6 】

3. 化合物の分離方法

本発明のクロマトグラフィー用充填剤は、親水性相互作用クロマトグラフィーの固定相として、好適に使用することができる。

【 0 0 9 7 】

化合物の分離は、本発明のクロマトグラフィー用充填剤を充填したカラムを使用する以外は、公知の親水性相互作用クロマトグラフィーに準じて行うことができる。

【 0 0 9 8 】

分離される化合物は特に限定されないが、糖、アミノ酸などの光学活性化合物が好適である。

【 実施例 】

【 0 0 9 9 】

以下に、実施例により本発明をさらに詳細に述べるが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【 0 1 0 0 】

1. Divinyl sulfone substituted glutathione (VS-GSH) の合成

アルゴン雰囲気下、divinyl sulfone (5.908 g, 50 mmol) にhydroquinone (1 mg, 9.1×10^{-3} mmol) を加え、50 で攪拌した。そこに、glutathione (3.077 g, 10 mmol) を溶解した水10 mL、メタノール6 mLの混合溶液を1時間10分かけて滴下した。その後、72時間50 で攪拌し続けた。反応溶液を減圧乾燥し、アセトンを加え再結晶、濾過することで純粋なVS-GSHを得た。収量1.91 g、収率は45 %だった。

【 0 1 0 1 】

NMRスペクトルを図1に示す。ESI-MS (neg) (ネガティブモード) で測定したところ、424 ($[M - H]^-$) にピークが見られたため、VS-GSHであると確認した。融点は159 であつた。

【 0 1 0 2 】

2. Divinyl sulfone substituted L-cysteine (VS-Cys) の合成

アルゴン雰囲気下、divinyl sulfone (7.384 g, 62.5 mmol) にhydroquinone (1 mg, 9.1×10^{-3} mmol) を加え、50 で攪拌した。そこに、L-cysteine hydrochloride (2.190 g, 12.5 mmol) を溶解したメタノール6.4 mLを30分かけて滴下した。その後、49時間50 で攪拌し続けた。反応溶液を減圧乾燥し、酢酸エチルを加え再結晶、濾過することで純粋なVS-GSHを得た。収量1.94 g、収率65 %だった。

【 0 1 0 3 】

VS-CysのNMRスペクトルを図2に示す。ESI-MS (pos) (ポジティブモード) で測定したところ240 ($[M + H]^+$) にピークが見られたことや、NMRスペクトルの一致により既報の物質と同じであると確認した。

【 0 1 0 4 】

VS-GSH及びVS-Cysの合成スキームを下記に示す。

【 0 1 0 5 】

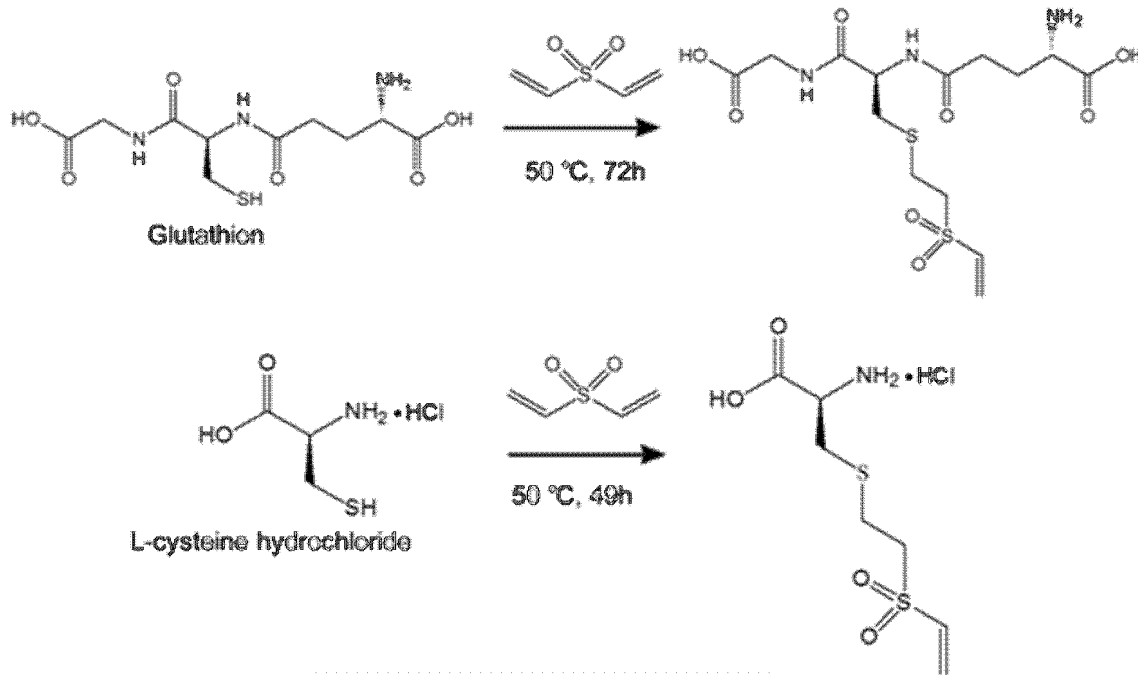
10

20

30

40

【化20】

VG-GSH、VS-Cysの合成スキーム

10

20

【0106】

3. MAS修飾済シリカゲルの合成(3.1) MAS (3-(methacrylamido)propyltriethoxysilane)の合成

3-Aminopropyltriethoxysilane (11.07 g, 50 mmol)、triethylamine (6.07 g, 60 mmol) 重合禁止剤としてhydroquinone (1 mg, 9.1×10^{-3} mmol)をTHF 30 mL中に溶解し、methacryloyl chloride (5.75 g, 55 mmol)を0-5 で滴下し、3時間室温で撹拌した。塩を濾過によって取り除き、濾液を濃縮した。酢酸エチルを加えることで、さらに塩を析出させ、濾過後、濾液を減圧乾燥することで、3-(methacrylamido)propyltriethoxysilane (MAS)を得た(収量: 13.52 g)。収率は94%であった。NMRスペクトルを図3に示す。

30

【0107】

(3.2) シリカゲルのMASによるシリル化

シリカゲルを6 M塩酸 300 mLとともに一晩加熱還流し洗浄、水でも同様に還流を行い、120 で加熱乾燥した。そしてそのシリカゲル12.02 gに合成したMAS (13.52 g, 47 mmol)をpyridine (7.13 g, 90 mmol)とともに加え、トルエン溶媒150 mL中で24時間加熱還流した。修飾したシリカゲルはトルエン150 mL、アセトン100 mLの順で洗浄した。

【0108】

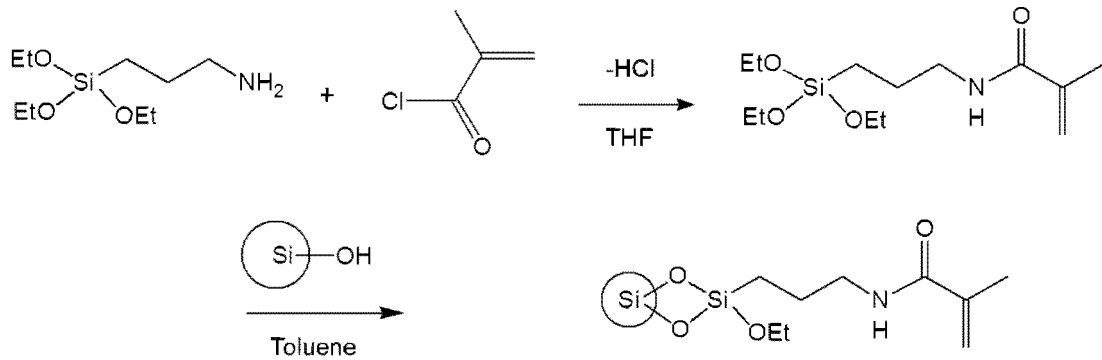
シリカゲルのシリル化はEPDシリカ(粒子径 5 μm 細孔径80 表面積 300 m^2/g 資生堂)とDevelosil(粒子径5 μm 細孔径 100 野村化学)の両方で行った。合成スキームを下記に示す。

40

【0109】

【化21】

MAS修飾済みシリカゲルの合成スキーム



10

【0110】

4. VS-GSH重合修飾型粒子充填剤及びVS-Cys重合修飾型粒子充填剤の調製

水5 mLを溶媒として、モノマー（VS-GSH又は、VS-Cys）1000 mgとMAS修飾済みシリカゲル700 mgを、開始剤として2,2'-azobis(2-methylpropionamide)dihydrochloride (V-50、10時間半減期温度56) 110 mgを用いて、3時間重合し、粒子充填剤を作製した。反応終了後に濾過し、水100 mL、メタノール30 mL、アセトン30 mLの順で洗浄を行った。

【0111】

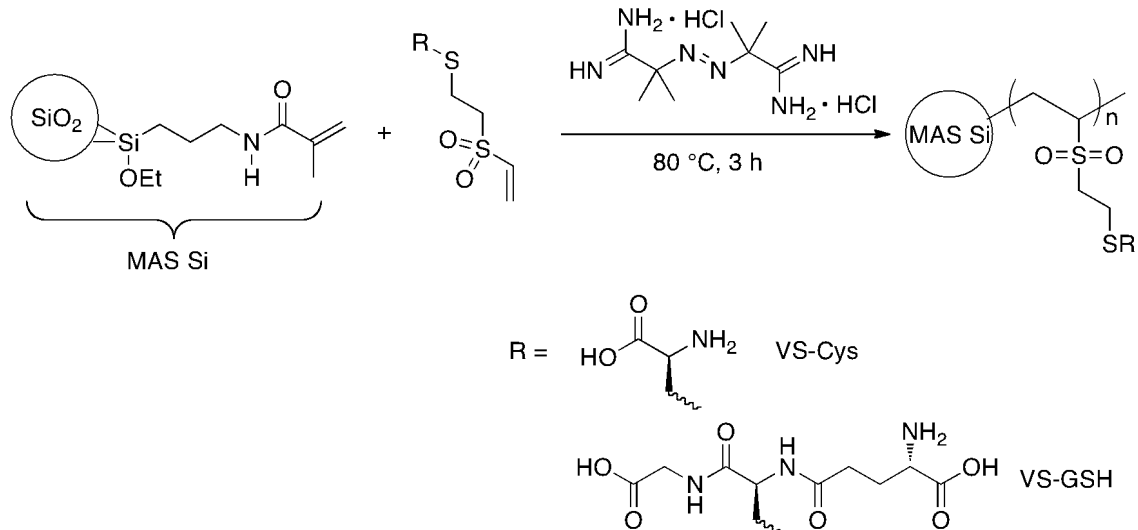
VS-GSH及びVS-Cys重合修飾型粒子充填剤の調製の反応スキームを下記に示す。

20

【0112】

【化22】

VS-GSH、VS-Cysの重合修飾



30

40

【0113】

5. 調製したシリカゲル粒子の充填

調製した充填剤700 mgをメタノール16 mL、水4 mLと混合し、10秒間超音波により分散させ、スラリーとした。これを加圧溶媒にメタノールを用いて最大圧力40 MPaでステンレススチールカラム（ID 3.0 mm x 10 cm）に充填した。スラリー充填機（124A、ケムコ社製）のプログラムレートは5に設定した。

【0114】

VS-GSHのカラム及びVS-Cysのカラムは、使用したモノマーの種類と使用したシリカをもとに、それぞれVS-GSH-Dev、VS-Cys-Devと名付けた。

【0115】

50

6. 作製したカラムのHILICモードによる測定

(6.1) カラムテスト法による分離特性の評価

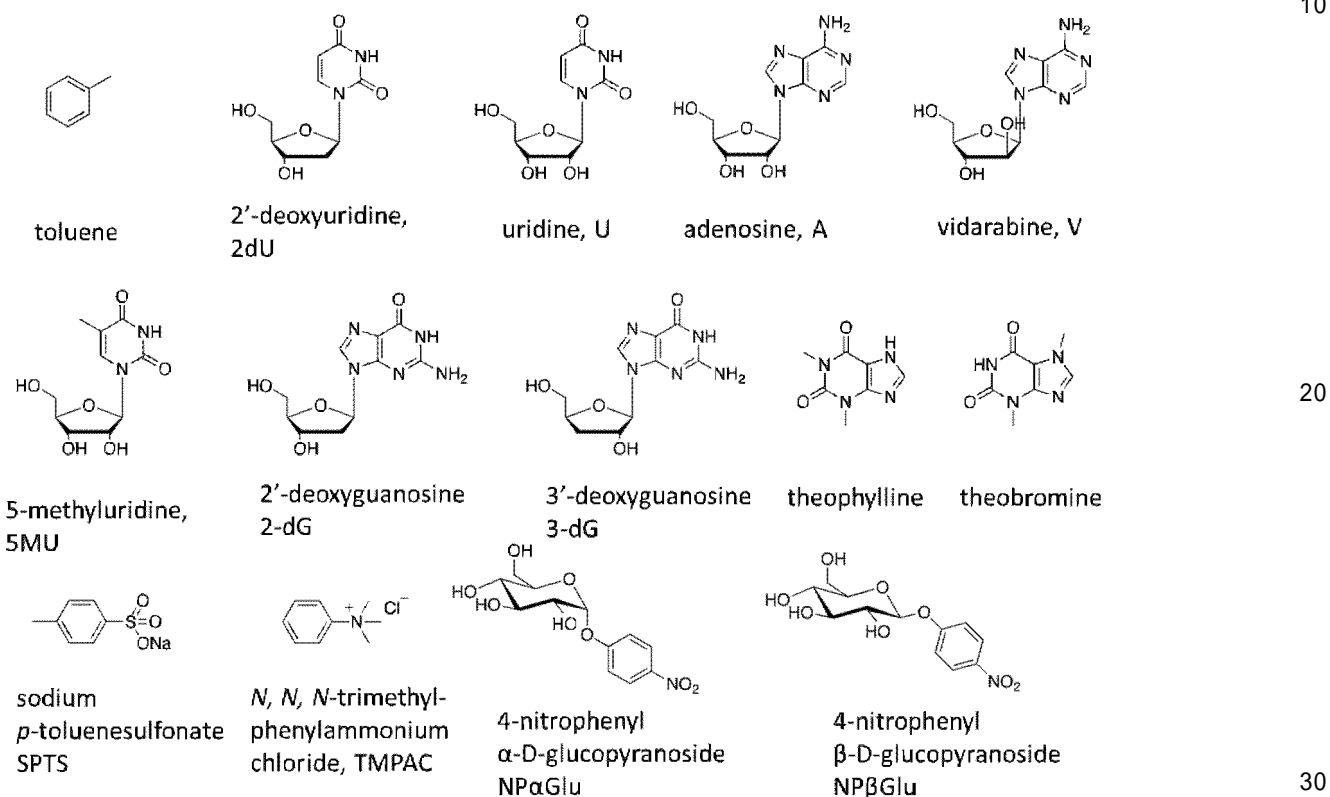
< 方法 >

作製したカラムは、文献：Y. Kawachi et al., J. Chromatogr. A, 1218 (2011) 903. に記載のカラムテスト法に準じて、分離特性の評価を行った。カラムテストに用いたサンプルの構造を下記に示す。また、カラムテストの評価項目を表1に示す。

【 0 1 1 6 】

【 化 2 3 】

カラムテストに用いたサンプル



【 0 1 1 7 】

【表 1】

カラムテストの評価項目

評価項目	詳細	
$k(U)$	$k(\text{uridine})$: uridine の保持係数
$\alpha(\text{CH}_2)$	$k(\text{uridine})/k(5\text{-methyluridine})$: 疎水性選択性
$\alpha(\text{OH})$	$k(\text{uridine})/k(2'\text{-deoxyuridine})$: ヒドロキシ基選択性
$\alpha(\text{V/A})$	$k(\text{vidarabine})/k(\text{adenocine})$: 立体配置の選択性
$\alpha(2d/3d)$	$k(2'\text{-deoxyguanosine})$ $/k(3'\text{-deoxyguanosine})$: 位置異性の選択性
$\alpha(\alpha/\beta)$	$k(\text{NP } \alpha \text{ Glu})/k(\text{NP } \beta \text{ Glu})$: α 位, β 位の選択性
$\alpha(\text{AX})$	$k(\text{SPTS})/k(\text{uridine})$: アニオン交換性
$\alpha(\text{CX})$	$k(\text{TMPAC})/k(\text{uridine})$: カチオン交換性
$\alpha(\text{Tb/Tp})$	$k(\text{theobromine})/k(\text{theophylline})$: 固定相表面の pH

10

20

30

【0118】

カラムテストの測定に用いた移動相は以下のとおりである。酢酸アンモニウム 20 mM の移動相ではTMPACやSPTSの保持時間がtolueneの保持時間 t_0 を下回ることがあるため、(CX)、(AX)の評価では100 mMの移動相を用いた:

(CX), (AX): ACN (アセトニトリル) / AcONH₄ (酢酸アンモニウム) 緩衝液 (100 mM, pH 4.7) (90:10, v/v)

上記以外の測定: ACN/AcONH₄ 緩衝液 (20 mM, pH 4.7) (90:10, v/v)。

【0119】

他の測定条件は以下の通りである:

流速: 線速度 $u = 1.0$ (mm/sec) になるように設定

温度: 30

検出波長: 254 nm。

40

【0120】

なお、保持係数 k は、保持係数が大きいほど固定相に溶質が存在する時間が長いことを示し、下式で表わされる。

【0121】

【数 1】

保持係数： k

t_R ：溶質の溶出時間， t_0 ：保持のない溶質の溶出時間

分離計数 α は、どれだけ 2 つのピークが離れているかを示し、下式で表わされる。

【0 1 2 2】

分離計数 は、どれだけ 2 つのピークが離れているかを示し、下式で表わされる。

【0 1 2 3】

【数 2】

分離係数： α

$$\alpha = \frac{k_B}{k_A}$$

k_A ：溶質 A の保持比， k_B ：溶質 B の保持比

【0 1 2 4】

< 結果 >

カラムテストの結果

VS-GSH-Dev、VS-Cys-Devのカラムテストの結果を表 2 に示す。両方のカラムでHILICカラムとしての十分な性能が確認できたが、VS-GSH-DevカラムはVS-Cys-Devカラムに比べ、uridineの保持と選択性共に上回る結果となった。これより、VS-GSH-DevカラムはVS-Cys-Devカラムより固定相表面に厚い水の層を形成したと考えられる。

【0 1 2 5】

10

20

【表 2】

VS-GSH-Dev、VS-Cys-Dev のカラムテストの結果

	VS-GSH-Dev	VS-Cys-Dev	規格化に用いた値
$k(U)$	4.37	3.02	4.58
$\alpha(CH_2)=k(U)/k(5-MU)$	1.40	1.27	1.71
$\alpha(OH)=k(U)/k(2-dU)$	2.03	1.77	2.13
$\alpha(V/A)=k(V)/k(A)$	1.30	1.30	1.51
$\alpha(\alpha/\beta)=k(\alpha)/k(\beta)$	1.23	1.19	1.31
$\alpha(2dG/3dG)=k(2dG)/k(3dG)$	1.09	1.07	1.11
$\alpha(AX)=k(SPTS)/k(U)$	0.26	0.35	0.80
$\alpha(CX)=k(TMPAC)/k(U)$	0.67	0.38	3.39
$\alpha(Tb/Tp)=k(Tb)/k(Tp)$	1.11	1.02	1.39

10

20

【0126】

市販のカラムとの分離特性の比較

VS-GSH-Dev、VS-Cys-Devと、市販のカラムとのカラムテストの結果を比較した。

【0127】

比較対象として、以下のカラムを使用した。

【0128】

ZIC-HILIC (Merck SeQuant)
 Nucleodur HILIC (Macherey-Nagel)
 TSKgel Amide-80 (東ソー)
 XBridge Amide (Waters)
 PolySULFOETHYL (PolyLC)
 PolyHYDROXYETHYL (PolyLC)
 CYCLOBOND I (Astec)
 LiChrospher Diol (Merck Millipore)
 Chromolith Si (Merck Millipore)
 HALO HILIC (Advanced Materials Technology)
 COSMOSIL HILIC (ナカライテスク)
 Sugar-D (ナカライテスク)
 NH2-MS (ナカライテスク)

30

40

【0129】

レーダープロット

VS-GSH-Dev、VS-Cys-Devと、双性イオン性HILICカラムであるZIC-HILIC、Nucleodur HILICのカラムテストの結果を比較した結果を、図4のレーダープロットに示す。

【0130】

(OH)の値はVS-GSHとZIC-HILICでほぼ同じ値を示し、uridineの保持、(/)の値はVS-GSH-Dev、VS-Cys-Devが上回った。

50

【 0 1 3 1 】

親水の比較

uridineの保持係数 ($k(\text{uridine})$) を指標として、VS-GSH-Dev、VS-Cys-Devと、市販カラムとについて、カラムの親水性を比較した。結果を図5に示す。

【 0 1 3 2 】

VS-GSH-Dev及びVS-Cys-Devは、市販カラムのうち高い親水性保持を示すAmide-80及びPolyHYDROXYETHYLと同程度の親水性保持を示した。

【 0 1 3 3 】

(OH) - (Tb/Tp) プロット

(OH) - (Tb/Tp) プロットを図6に示す。得られた図からは、VS-GSH-Devは双性イオン型カラムと類似の分離特性を示し、VS-Cys-Devはさらに固定相に修飾するVS-GSHの量を増やし、固定相表面の親水性を増やせば、双性イオン型カラムの領域に入ると考えられる。

【 0 1 3 4 】

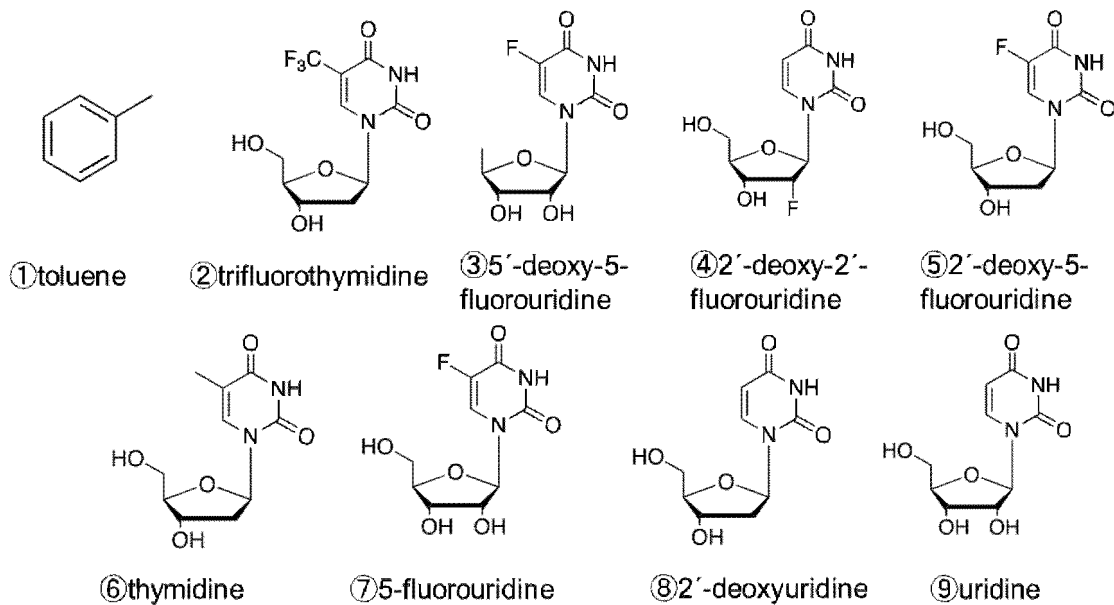
(6.2) 8種のヌクレオシドの分離

< 方法 >

実際にHILICモードでの分離対象となるヌクレオシドの下記のサンプルを用いた測定を行い、市販カラムと比較した。

【 0 1 3 5 】

【 化 2 4 】

8種のヌクレオシドの分離に用いたサンプル

【 0 1 3 6 】

フルオロウリジン類縁体は抗がん剤や、薬物の中間体として重要な物質として知られており、薬学分野において精密な分離、定量が求められている。これらの化合物群は構造異性体や類似構造が多数存在している。人体への投与も行われることから高性能な分離媒体が要求される。ウリジンとチミジンにフッ素が置換したもの、あるいはOH基が欠損したものであり、親水性ではあるがイオン交換性は低い。さらに、ウリジンよりもOH基が少ないことから親水性の保持は低下する。以上の特徴から、HILICのカラムにとって分離が困難な試料であり、固定相の分離能力を測定する上で好適である。

【 0 1 3 7 】

カラムは、VS-GSH-Dev及びVS-Cys-Dev、並びに、市販カラムのLiChrospher Diol、CYCLOBOND II、ZIC-HILICを用いた。

【 0 1 3 8 】

10

20

30

40

50

移動相にはACN/AcONH₄緩衝液(20 mM, pH 4.7)(90:10, v/v)を用い、線速度 $u = 1.0$ (mm/sec)になるように設定、温度:30 ; 検出波長:254 nmの測定条件で行った。

【0139】

<結果>

結果を図7に示す。

【0140】

5-fluorouridineと2'-deoxyuridineをVS-GSH-Dev、VS-Cys-Dev、LiChrospher Diol、CYCLOBOND II、ZIC-HILICでは識別することができた。一方、LiChrospher Diolでは、thymidineと5-fluorouridineを識別することができなかった。

【0141】

LiChrospher Diol、CYCLOBOND IIで1つのピークとなっていた2'-deoxy-2'-fluorouridineと2'-deoxy-5-fluorouridineは、VS-GSH-Dev、VS-Cys-Dev、ZIC-HILICで識別することができた。

【0142】

ZIC-HILICでは、thymidineと2'-deoxy-5-fluorouridineが1つのピークとなった。

【0143】

すべてのサンプルを識別できたのはVS-GSH-Dev、VS-Cys-Devであり、VS-GSH-Devが最も識別能力が高いことが分かった。

【0144】

双性イオン性カラムであるVS-GSH-Dev、VS-Cys-Dev、ZIC-HILICと中性カラムであるその他のカラムを比較すると5-fluorouridineと2'-deoxyuridineの溶出順が逆転した。また、ZIC-HILICは他のカラムと比べ、thymidineと2'-deoxy-2'-fluorouridineの溶出順が逆転することもわかった。これは電気陰性度の大きなフッ素原子によって起こった極性の偏った部分と双性イオン性固定相がイオン-双極子相互作用したことによる保持時間の変化によるものと考えられる。フッ素の置換される位置によっても保持時間の変化の度合いが異なったのは、立体的にイオン-双極子相互作用が起こりやすさに違いがあるためだと考えられる。

【0145】

(6.3) 作製したカラムでのアミノ酸の分析

<方法>

VS-GSH-Devで光学異性体を含めたアミノ酸の分析を行った。サンプルには、L-serine、D-serine、L-glutamic acid、D-glutamic acidを用いた。

【0146】

移動相には、ACN/AcONH₄緩衝液(20 mM, pH 4.7)(75:25, v/v)を用い、線速度 $u = 1.0$ (mm/sec)になるように設定、温度30、検出器にはRIを用いて測定した。

【0147】

<結果>

各アミノ酸に対する保持係数を表3に示す。

【0148】

この結果は、VS-GSH-Devを用いて理論段数10万段程度のカラムの作製することで、L-serineとD-serine、及び、L-glutamic acidとD-glutamic acidの完全分離が可能であることを示している。

【0149】

10

20

30

40

【表 3】

VS-GSH-Dev によるアミノ酸の保持係数および分離係数の比較

保持係数	VS-GSH-Dev
D-glutamic acid	3.39
L-glutamic acid	3.51
D-serine	9.72
L-serine	9.53
分離係数	VS-GSH-Dev
D/L-glutamic acid	1.04
D/L-serine	0.98

10

20

Mobile phase: 75 %Acetonitrile/ Ammonium acetate buffer(20 mM,pH 4.7).

Temperature: 30 °C Detection: RI

【 0 1 5 0 】

(6.4) 元素分析：重合修飾型充填剤の炭素・窒素含有率、被覆率の測定

< 方法 >

調製したVS-GSH重合修飾型シリカ粒子充填剤及びVS-Cys重合修飾型シリカ粒子充填剤をそれぞれ10 mg程度精秤し、元素分析装置CHN CORDER MT-5 (Yanaco社製)を用いてC, N, Hの含有率を測定した。測定後に灰分として残ったシリカゲルを精秤し、燃焼前後の差分を有機部分の結合量とし、C, H, Nの結合量の算出を行った。

30

【 0 1 5 1 】

< 結果 >

元素分析によって炭素・窒素含有率(重量%)、被覆率(重量%)を得た。結果を表4に示す。

【 0 1 5 2 】

まずはMAS修飾済み充填剤にモノマーがどれほど重合修飾したのか検討した。シリカ表面に結合した化合物の重量とシリカゲルの重量の百分率を取り、被覆率とした。VS-GSH、VS-Cysを修飾したDevelosilはMAS修飾前のものも測定し、シリカゲル自体でどの程度の炭素・窒素含有率、被覆率を示すかを検討した。

40

【 0 1 5 3 】

Develosilのシリカゲルのみの元素分析では、5.7%の被覆率だった。この被覆率はシリカゲルの吸湿性により、乾燥しきれなかったシリカゲルの水分の影響だと考えられる。MASを修飾したDevelosilの炭素・窒素含有率、被覆率はEPDシリカにMASを修飾したものよりも大きいため、より多くのMASを修飾することができたと考えられる。

【 0 1 5 4 】

VS-GSH、VS-Cysを修飾したDevelosilの被覆率はそれぞれ、29.3%、24.0%と高い値を示したが、VS-GSHの方がより大きな被覆率、炭素、窒素含有率を得ることができた。このことから、Dev-VS-GSHカラムがより大きな親水性物質の保持を得られたことが理解できる。

50

【 0 1 5 5 】

【 表 4 】

元素分析による炭素・窒素含有率（重量%）、被覆率（重量%）

使用したシリカゲル	k(U)	C (重量%)	N (重量%)	被覆率 (重量%)
Dev-silica のみ		0.09	0.00	5.7
MAS-Dev		9.58	1.38	16.6
VS-GSH-Dev	4.37	13.56	2.30	29.3
VS-Cys-Dev	3.02	11.05	1.77	24.0

10

【 0 1 5 6 】

7 . Poly-VS-GSHの温度応答性

VS-GSH重合修飾後のシリカゲルの濾液に含まれるシリカゲルに結合しなかったポリマーについて、温度を氷冷下、4℃、10℃、15℃としたときのそのポリマーの水溶液の状態を観察した。結果を図8に示す。

【 0 1 5 7 】

20

氷冷下ではコロイド状態であった水溶液が、温度が4℃、10℃と上昇するにつれ、コロイド状態の部分が減少していき、15℃では無色透明の液体となった。この状態変化は可逆的に起こるということも確認できた。すなわち、VS-GSHポリマー（poly-VS-GSH）の水溶液が温度応答性を示すことが明らかとなった。

【 0 1 5 8 】

このことから、poly-VS-GSHは低い温度の条件では疎水性が増加すると考えられる。そこで、VS-GSH-Devカラムの温度変化によるuridineの保持係数、ヒドロキシ基選択性、疎水性選択性の変化を表5及び図9に示す。

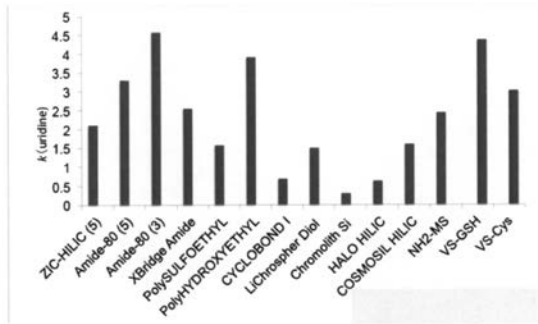
【 0 1 5 9 】

30

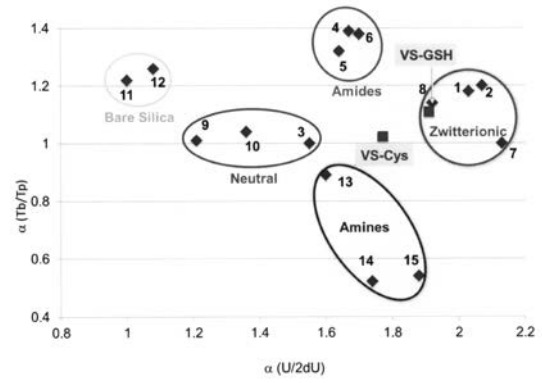
温度が減少するとともにuridineの保持係数が増加するという一般的な液体クロマトグラフィーの傾向が得られたが、温度の減少に伴い、ヒドロキシ基選択性はわずかに減少し、疎水性選択性はわずかに増加した。このことから、温度減少に伴い、固定相表面のpoly-VS-GSHの疎水性が増し、サンプルとの疎水性相互作用の増加により、疎水性選択性が上昇したと考えられる。

【 0 1 6 0 】

【 図 5 】

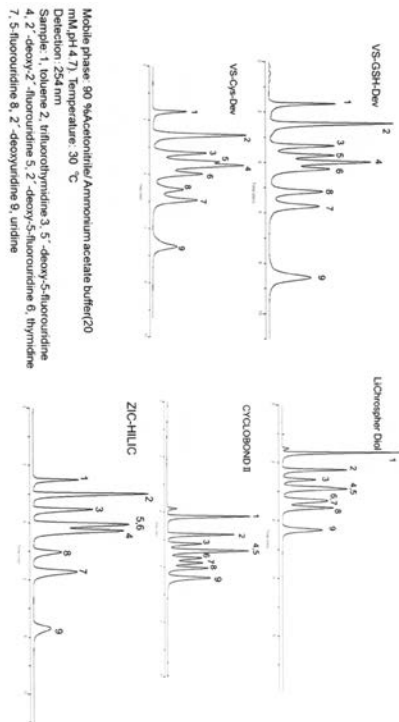


【 図 6 】

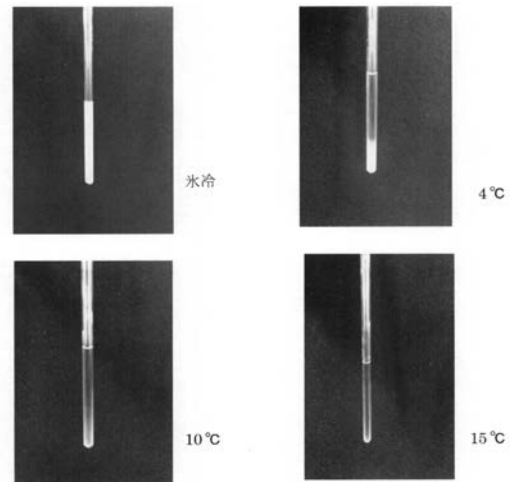


- | | |
|----------------------------|-----------------------------|
| 1: ZIC-HILIC (5 mm) | 9: CYCLOBOND I (5 mm) |
| 2: ZIC-HILIC (3.5 mm) | 10: LiChrospher Diol (5 mm) |
| 3: Nucleodur HILIC (3 mm) | 11: Chromolith Si |
| 4: Amide-80 (5 mm) | 12: HALO HILIC (2.7 mm) |
| 5: Amide-80 (3 mm) | 13: COSMOSIL HILIC (5 mm) |
| 6: XBridge Amide (3.5 mm) | 14: Sugar-D (5 mm) |
| 7: PolySULFOETHYL (3 mm) | 15: NH2-MS (5 mm) |
| 8: PolyHYDROXYETHYL (3 mm) | |

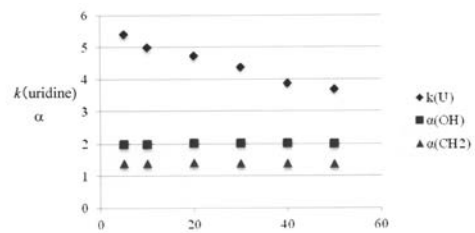
【 図 7 】



【 図 8 】



【 図 9 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
<i>C 0 8 F 292/00</i>	<i>(2006.01)</i>	B 0 1 D	15/08	4 J 1 0 0
<i>C 0 7 C 323/65</i>	<i>(2006.01)</i>	C 0 8 F	28/02	
<i>C 0 7 C 229/24</i>	<i>(2006.01)</i>	C 0 8 F	292/00	
<i>C 0 7 C 229/22</i>	<i>(2006.01)</i>	C 0 7 C	323/65	C S P
<i>C 0 7 C 227/34</i>	<i>(2006.01)</i>	C 0 7 C	229/24	
<i>C 0 7 B 57/00</i>	<i>(2006.01)</i>	C 0 7 C	229/22	
<i>C 0 7 H 19/073</i>	<i>(2006.01)</i>	C 0 7 C	227/34	
<i>C 0 7 H 19/067</i>	<i>(2006.01)</i>	C 0 7 B	57/00	3 6 5
<i>C 0 7 H 19/06</i>	<i>(2006.01)</i>	C 0 7 B	57/00	3 4 0
		C 0 7 H	19/073	
		C 0 7 H	19/067	
		C 0 7 H	19/06	

Fターム(参考) 4D017 AA03 BA04 CA14 CB01 DA03 EA05 EB04
 4G066 AA22C AC12B CA19 DA07 EA01 FA03 FA07
 4H006 AA01 AA02 AA03 AB46 AB84 AB90 AC83 AD17 BN10 BS10
 BU32
 4J026 AC00 BA08 BB01 DB02 DB08 DB12 FA02 GA08
 4J100 AP01P BA16P BA29P BA33P BA34P BA51P BA58P CA01 FA03 FA19
 GC35 JA17

【要約の続き】

【選択図】なし