

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K13756

研究課題名(和文) 分子認識を基礎とする高性能クロマトグラフィーによる環境分析手法の構築

研究課題名(英文) Development of Environmental Analysis Methods by High Performance Chromatography Based on Molecular Recognition

研究代表者

大塚 浩二 (OTSUKA, Koji)

京都大学・工学研究科・教授

研究者番号：70183762

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：環境関連物質の高性能分離分析手法構築を目指し、主にキャピラリー高速液体クロマトグラフィー(cHPLC)を利用して、モデル試料の高効率・高選択的分離のための基礎研究を行った。本研究では、官能基間距離固定化分子インプリント法による新規ポリマー分離媒体の作製およびナノ炭素材料固定化分離媒体の作製を行い、それぞれcHPLCの固定相として種々の環境関連物質分析へ適用し、従来にない高選択的・高性能分離が可能であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：To develop high performance analytical separation techniques for environmental analysis, fundamental studies on highly efficient and selective separation of model compounds were carried out mainly using capillary high performance liquid chromatography (cHPLC). In these studies, novel polymer separation media as well as nano-carbon material immobilized separation media were prepared. The prepared media were then applied to a stationary phase of cHPLC for the environmental analyses, where the possibility of highly selective and high performance separation was successfully demonstrated.

研究分野：分析化学

キーワード：環境分析 分子認識 分子インプリント ナノ炭素材料 クロマトグラフィー キャピラリー フラーション

1. 研究開始当初の背景

人工的に分子認識能を獲得する手法としては、分子インプリント法と呼ばれるいわゆる分子鋳型法が古くから研究されてきた。特に申請者らは、イオン性官能基の距離認識に着目し、官能基間距離認識に基づく選択的な分子認識について検討を行ってきた。すなわち有機溶媒に不溶な鋳型分子と同じくイオン性の機能性モノマーを用いて、イオン結合型錯体を合成し、架橋高分子表面で反応させることにより特定の官能基を距離選択的に固定化することを可能とした。

また、ナノ炭素材料の固定相基材への固定化法として、光/熱活性基であるペルフルオロフェニルアジド (PFPA) を用いた種々の手法開発と応用について研究を進め、C60 フラーレンを安定的にシリカ等の基材表面に固定化することに成功している。

本申請課題研究は、クロマトグラフィーによる環境関連物質分析をより高性能化するため、主にキャピラリー高速液体クロマトグラフィー (cHPLC) を基盤手法として用い、特定の物質を高効率・高選択的に分離分析する新たなシステムの構築を実現するための基礎研究を行うものである。これまで、環境分析に特化した cHPLC の構築を新規分離媒体の作製という概念から試みた例はほとんどなく、本研究は他に類を見ない先導的研究である。

2. 研究の目的

分子インプリント法によって合成した高選択性分離剤や、ナノ炭素材料を用いる特異的相互作用を誘起する分離剤を用いるクロマトグラフィーによって、環境汚染物質など環境関連物質の高性能分離分析手法を構築することを目指した。分子インプリント法では官能基間距離固定化法によって調製するポリマー分離剤を固定相に、またナノ炭素材料ではフラーレン等で修飾したポリマーモノリスおよびシリカモノリスを固定相に用い、主に cHPLC による高性能分離分析システムの構築を図った。

3. 研究の方法

マイクロスケール液相分離、すなわち cHPLC 及びマイクロスケール電気泳動 (キャピラリー電気泳動及びマイクロチップ電気泳動) による環境関連物質の高選択的分離システムの構築を行うため、分子認識を基礎とする新規分離剤の創製を行った。官能基間距離固定化法に基づく分子インプリント法による新規分離媒体の創製と、ナノ炭素材料を修飾したシリカまたはポリマー分離剤の創製を目指し、種々のマイクロスケール液相分離技術による高性能分離システムの構築を企図し研究を遂行した。

4. 研究成果

環境関連物質の高性能分離分析手法構築

を目指し、主に cHPLC を利用して、モデル試料の高効率・高選択的分離のための基礎研究を行った。本研究では、官能基間距離固定化分子インプリント法による新規ポリマー分離媒体の作製およびナノ炭素材料固定化分離媒体の作製を行い、それぞれ cHPLC の固定相として種々の環境関連物質分析へ適用し、従来にない高選択的高性能分離の可能性を探った。

(1) 従来の分子インプリント法では、水溶性化合物への適用が困難であることがその欠点として指摘されてきた。そこで、申請者らが開発した官能基間距離認識に基づく選択的な分離について検討を行い、官能基間距離固定化法では、有機溶媒に不溶な鋳型分子と同じくイオン性の機能性モノマーを用いて、イオン結合型錯体を合成し、架橋高分子表面で反応させることにより特定の官能基を距離選択的に固定化することが可能であることを明らかにした。

(2) 官能基間距離固定化法を基礎として、数種の環境関連モデル化合物についてそれぞれ適切な鋳型分子を選択して分子インプリントポリマー (MIP) を合成し、得られた MIP を cHPLC の固定相として利用するための基礎的検討を行った。

(3) ナノ炭素材料を用いる特異的分離場の創製について、C₆₀-フラーレン (C60) 修飾シリカモノリスを基盤として、特異的保持能を発現する cHPLC 用固定相のさらなる進展を図り、多環式芳香族炭化水素 (PAH) の分離に対して従来にない新たな分離特性を発現させることに成功した。

(4) C60 に加え、C₇₀-フラーレン (C70) を新たに用いて C60 と同様にシリカモノリスへの修飾を行い、分離特性の違いについて検討した。その結果、対象 PAH によっては C60 と C70 との間に大きな分離特性の違いがあることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 18 件)

- 1) Kubota, K.; Kobayashi, N.; Yabuta, M.; Ohara, M.; Naito, T.; Kubo, T.; Otsuka, K.: Identification and Characterization of a Thermally Cleaved Fragment of Monoclonal Antibody-A Detected by Sodium Dodecyl Sulfate- Capillary Gel Electrophoresis, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2017**, *140*, 98-104. (査読有)
[DOI: 10.1016/j.jpba.2017.03.027]
- 2) Kubota, K.; Kubo, T.; Tanigawa, T.; Naito, T.; Otsuka, K.: New platform for simple and rapid protein-based affinity reactions, *Sci. Rep.* **2017**, *7*: 178. (査読有)
[DOI: 10.1038/s41598-017-00264-y]
- 3) Kanao, E.; Naito, T.; Kubo, T.; Otsuka, K.:

- Development of a C₇₀-Fullerene Bonded Silica-Monolithic Capillary and its Retention Characteristics in Liquid Chromatography, *Chromatography* **2017**, *38*, in press. (査読有) [DOI: 10.15583/jpchrom.2016.020]
- 4) Kitagawa, F.; Matsuo, A.; Sueyoshi, K.; Otsuka, K.: Sensitivity Enhancement by Sweeping via Solid Phase Extraction Using Titania Nanoparticles in Capillary Electrophoretic Analysis of Phosphopeptides, *Chromatography* **2017**, *38*, 39-43. (査読有) [DOI: 10.15583/jpchrom.2016.013]
 - 5) Kitagawa, F.; Kinami, S.; Takegawa, Y.; Nukatsuka, I.; Sueyoshi, K.; Kawai, T.; Otsuka, K.: On-line coupling of sample preconcentration by LVSEP with gel electrophoretic separation on T-channel chips, *Electrophoresis* **2017**, *38*, 380-386. (査読有) [DOI: 10.1002/elps.201600184]
 - 6) Kubo, T.; Otsuka, K.: Recent progress for the selective pharmaceutical analyses using molecularly imprinted adsorbents and their related techniques: A review, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2016**, *130*, 68-80. (査読有) [DOI: 10.1016/j.jpba.2016.05.044]
 - 7) Kubo, T.; Kanao, E.; Matsumoto, T.; Naito, T.; Sano, T.; Yan, M.; Otsuka, K.: Specific Intermolecular Interactions by the Localized p-Electrons in C₇₀-fullerene, *ChemistrySelect* **2016**, *1*, 5900-5904. (査読有) [DOI: 10.1002/slct.201601470]
 - 8) Kobayashi, H.; Sukegawa, M.; Fujimura, K.; Kubo, T.; Otsuka, K.: Effect of Acidic Additives on Peak Capacity and Detectivity in Peptide Analysis Using Nano-Flow LC/MS with Low-Density ODS Modified Monolithic Silica Capillary Columns, *Chromatography* **2016**, *37*, 133-139. (査読有) [DOI: 10.15583/jpchrom.2016.012]
 - 9) Kubota, K.; Kobayashi, N.; Yabuta, M.; Ohara, M.; Naito, T.; Kubo, T.; Otsuka, K.: Validation of Capillary Zone Electrophoretic Method for Evaluating Monoclonal Antibodies and Antibody-Drug Conjugates, *Chromatography* **2016**, *37*, 117-124. (査読有) [DOI: 10.15583/jpchrom.2016.011]
 - 10) Naito, T.; Nakamura, M.; Kaji, N.; Kubo, T.; Baba, Y.; Otsuka, K.: Three-dimensional fabrication for microfluidics by conventional techniques and equipment used in mass production, *Micromachines* **2016**, *7*, 82-91. (査読有) [DOI: 10.3390/mi7050082]
 - 11) Kubo, T.; Otsuka, K.: Recent progress in molecularly imprinted media by new preparation concepts and methodological approaches for selective separations of targeting compounds, *Trends Anal. Chem.* **2016**, *81* 102-109. (査読有) [DOI: 10.1016/j.trac.2015.08.008]
 - 12) Kubo, T.; Arimura, S.; Naito, T.; Otsuka, K.: Selective adsorption of trypsin using molecularly imprinted polymers prepared with PEG-based hydrogels containing anionic functional monomers, *Mol. Impr.* **2015**, *3*, 18-25. (査読有) [DOI: 10.1515/molim-2015-0004]
 - 13) Kubo, T.; Murakami, Y.; Naito, T.; Otsuka, K.: C₆₀-fullerene Bonded Silica Monolithic Capillary for Specific Separation of Aromatic Compounds, *Chromatography* **2015**, *36*, 105-113. (査読有) [DOI: 10.15583/jpchrom.2015.032]
 - 14) Kubo, T.; Murakami, Y.; Tsuzuki, M.; Kobayashi, H.; Naito, T.; Sano, T.; Yan, M.; Otsuka, K.: Unique Separation Behavior of C₆₀-fullerene Bonded Silica Monolith Prepared via an Effective Thermal Coupling Agent, *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 18095-18098. (査読有) [DOI: 10.1002/chem.201503898]
 - 15) Kubo, T.; Kuroda, K.; Naito, T.; Mukai, S.; Sano, T.; Akiyoshi, K.; Otsuka, K.: Simple Preparation and Characterization of Viscoelastic Gels Induced by Multiple Intermolecular Interactions Using Low Molecular Weight Species, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2015**, *88*, 1575-1580. (査読有) [DOI: 10.1246/bcsj.20150209]
 - 16) Kitagawa, F.; Nakagawara, S.; Nukatsuka, I.; Hori, Y.; Sueyoshi, K.; Otsuka, K.: Simple and Rapid Immobilization of Coating Polymers on Poly(dimethyl siloxane)-glass Hybrid Microchips by a Vacuum-Drying Method, *Anal. Sci.* **2015**, *31*, 1171-1175. (査読有) [DOI: 10.2116/analsci.31.1171]
 - 17) Kubo, T.; Koterawasa, K.; Naito, T.; Otsuka, K.: Molecularly Imprinted Polymer with a Pseudo-template for Thermo-responsive Adsorption/desorption based on Hydrogen Bonding, *Micropor. Mesopor. Mater.* **2015**, *218*, 112-117. (査読有) [DOI: 10.1016/j.micromeso.2015.07.006]
 - 18) Kubo, T.; Arimura, S.; Tominaga, Y.; Naito, T.; Hosoya, K.; Otsuka, K.: Molecularly Imprinted Polymers for Selective Adsorption of Lysozyme and Cytochrome c Using a PEG-Based Hydrogel: Selective Recognition for Different Conformations due to pH Conditions, *Macromolecules* **2015**, *48*, 4081-4087. (査読有) [DOI: 10.1021/acs.macromol.5b00834]
- [学会発表](計 16 件)
- 1) Kubo, T.; Naito, T.; Otsuka, K.: Strategies for Microscale Liquid Phase Separations of Biogenic Compounds, 27th International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis (PBA 2016), Guangzhou (China); 13-16 November 2016. (招待講演)
 - 2) Kubo, T.; Kanao, E.; Naito, T.; Otsuka, K.: Microscale Liquid Phase Specific Separations Using Fullerenes, 16th Asia-Pacific International Symposium on Microscale Separations

- and Analysis (APCE2016), Johor Bahru (Malaysia); 7-10 November 2016. (招待講演)
- 3) 大塚浩二: 特異的相互作用を利用する分離分析, 第 47 回中部化学関係学協会支部連合秋季大会, 豊橋技術科学大学 (愛知県・豊橋市); 2016 年 11 月 5-6 日. (招待講演)
 - 4) Otsuka, K.; Tsuzuki, M.; Kanao, E.; Naito, T.; Kubo, T.: Microscale Specific Separations Using Fullerenes, 23rd International Symposium on Electro- and Liquid Phase-Separation Techniques (ITP2016), Minneapolis, MN (USA); 18-21 September 2016. (招待講演)
 - 5) 久保拓也, 内藤豊裕, 大塚浩二: 特異的相互作用を利用する分離場の開発, 第 29 回バイオメディカル分析科学シンポジウム (BMAS2016), 京都大学・桂キャンパス(京都府・京都市); 2016 年 9 月 2-3 日. (招待講演)
 - 6) Naito, T.; Kubo, T.; Otsuka, K.: High Performance Microscale Liquid Phase Separations of Biogenic Compounds, 44th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (HPLC2016 San Francisco), San Francisco, CA (USA); 19-23 June 2016. (招待講演)
 - 7) Kubo, T.; Tsuzuki, M.; Kanao, E.; Naito, T.; Otsuka, K.: High performance microscale separations using specific interactions, 40th International Symposium on Capillary Chromatography (ISCC2016), Riva del Garda (Italy); 29 May- 3 June 2016. (招待講演)
 - 8) 大塚浩二: 近未来における分離科学の展開, 第 76 回分析化学討論会, 岐阜薬科大学・岐阜大学 (岐阜県・岐阜市); 2016 年 5 月 28-29 日. (依頼講演)
 - 9) Fukushima, Y.; Naito, T.; Kubo, T.; Otsuka, K.: High performance microscale liquid phase separations of biomolecules, 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem 2015), Honolulu, HI (USA); 15-20 December 2015. (招待講演)
 - 10) Otsuka, K.: MEKC in 30 years, 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem 2015), Honolulu, HI (USA); 15-20 December 2015. (招待講演)
 - 11) Kubo, T.; Tsuzuki, M.; Murakami, Y.; Naito, T.; Otsuka, K.: The use of C₆₀-fullerene bonded silica monolith as a molecular recognition medium for microscale separation, 15th Asia-Pacific International Symposium on Microscale Separations and Analysis (APCE 2015), Tainan (Taiwan, ROC); 15-18 November 2015. (招待講演)
 - 12) Fukushima, Y.; Naito, T.; Kubo, T.; Otsuka, K.: Development of novel separation media for microscale separation, 43rd International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (HPLC2015 Beijing), Beijing (China); 21-25 September 2015. (招待講演)
 - 13) Murakami, Y.; Tsuzuki, M.; Naito, T.; Kubo, T.; Otsuka, K.: Development of nano carbon-material bonded silica monolith as separation media for microscale LC and CE, 10th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods, Siofok (Hungary); 02-04 September 2015. (招待講演)
 - 14) Kubo, T.; Naito, T.; Otsuka, K.: Development of silica monolith as molecular recognition media for microscale separation, 22nd International Symposium on Electro- and Liquid Phase-Separation Techniques (ITP2015), Helsinki (Finland); 30 August - 02 September 2015. (招待講演)
 - 15) Otsuka, K.; Kubo, T.; Arimura, S.; Naito, T.: Development of a molecularly imprinted PEG-based hydrogel for protein recognition, 26th International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis (PBA2015), Tbilisi (Georgia); 05-08 July 2015. (招待講演)
 - 16) Fukushima, Y.; Naito, T.; Kubo, T.; Otsuka, K.: Simplified high performance CE separations of biomolecules, 42nd International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (HPLC2015 Geneva), Geneva (Switzerland); 21-25 June 2015. (招待講演)
- ## 6. 研究組織
- (1) 研究代表者
大塚 浩二 (OTSUKA, Koji)
京都大学・工学研究科・教授
研究者番号: 7 0 1 8 3 7 6 2
 - (2) 研究分担者
久保 拓也 (KUBO, Takuya)
京都大学・工学研究科・准教授
研究者番号: 2 0 3 7 4 9 9 4

内藤 豊裕 (NAITO, Toyohiro)
京都大学・工学研究科・助教
研究者番号: 1 0 7 1 1 8 0 6