

機関番号：17401

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2007～2010

課題番号：19205011

研究課題名（和文） 精密な界面ラフネス制御による超選択的・高感度HPLC固定相の開発

研究課題名（英文） Development of novel organic phases for high selective and sensitive HPLC by controlled surface modification

研究代表者

伊原 博隆 (IHARA HIROTAKA)

熊本大学・大学院自然科学研究科・教授

研究者番号：10151648

研究成果の概要（和文）：

本研究は、高感度かつ高選択的なHPLC用分離剤の開発を目的として遂行されたものであり、具体的には、(1)物理的な界面強調構造の形成とその形態制御と(2)ポリマーグラフト化による化学的強調構造の形成、の両面から研究を進めた。

(1)物理的な界面強調構造の形成とその形態制御

ナノサイズのシリカ粒子からなる薄膜をシェル成分とするコア・シェル粒子の製造プロセスを確立した。同法の長所は、一段階の懸濁共重合によって製造できること、シリカ粒子の界面修飾率や粒径を選択することにより、シングルレイヤーやダブルレイヤーからなるコア・シェル粒子の作製が可能となること、また、シリカ粒子として多孔質粒子を使用した場合、希アルカリ水によって容易に除去することができ、結果として粒子表面にデンプル構造を形成させることなど、優位性は多岐にわたる。

(2)精密ポリマーグラフト化による化学的界面強調とHPLCへの応用

化学的な界面増強法として、モノマーにカルバゾールやオキサゾール、ビニルピリジンなどのヘテロ環を有するビニル化合物を使用し、これらのポリマーをシリカ表面にグラフト化させた。得られた粒子は、多環芳香族類に対して著しく高い選択性を示すHPLC分離が可能となることを確認した。加えて、グラフト化の方法として*N*-アルキルフタルイミドを用いた交互共重合を採用した。その結果、選択性が飛躍的に向上することを確認した。交互共重合のためのコモノマーを系統的に変化させることにより、選択性発現の相互作用点であるカルボニル基のマイクロ環境を変化させることが可能となった。とくに優れた選択性としてトコフェロールの分離があり、従来、HPLCによるベースライン分離が不可能であったβ、γの異性体に対する完全分離に成功した。

研究成果の概要(英文)：

This research project aims to develop a new class of HPLC packing materials with high selectivity. To accomplish this purpose, we proposed two goals: (1) Physical control of surface morphology and (2) chemical modification by graft polymerization on supporting materials and HPLC applications.

1. We established a new method for creation of core-shell particles with silica particles-layer shells. This method has several advantages that can be emphasized as follows: (a) the core-shell particles can be readily prepared by one-pot suspension polymerization. (b) The resultant shell is stably immobilized by covalent bonding. (c) By proper choosing the diameter and combination of silica particles, the shell structures can be adjusted from single- to multi-layers. (d) By using porous silica particles and removal of silica particles, the dimple structural surface can be created.

2. For chemical functionalization of silica surface, a polymer-grafting method has been investigated. Vinyl monomers with heterocyclic structures such as carbazole and oxazole were used. The resultant hybrids showed excellent separation ability in HPLC especially for polyaromatic hydrocarbons. It has also been established that the selectivity can be tuned by not only choosing a monomer but also polymerization method. The most successful results were observed in the base-line separation of tocopherols containing β- and γ-isomers.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	12,200,000	3,660,000	15,860,000
2008年度	8,100,000	2,430,000	10,530,000
2009年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
2010年度	9,500,000	2,850,000	12,350,000
総計	37,500,000	11,250,000	48,750,000

研究分野:化学

科研費の分科・細目:複合化学・分析化学

キーワード:液体クロマトグラフィー、分子認識、界面化学、ナノ構造制御、コア・シェル微粒子、分子ゲル、超分子化学

1. 研究開始当初の背景

液体クロマトグラフィー(HPLC)は、現代の分離・分析科学において必要不可欠な技術・プロセスとなっており、超微量分析から大量の分取・精製まで幅広く利用されている。HPLCの進歩を支える要素として、装置の革新的な進歩とソフトウェアを含むシステムの改善が挙げられるが、実はこれらに比して分離の原点となる分離剤(固定相)の開発は必ずしも多くない。近年においても、固定相の多くはシリカ系の担体に単純な有機相を固定化したものが全体の70%以上を占めていると言われる。

その中であって固定相の充填方法に関する研究が近年になって活発化しており、キャピラリー系やモノスロッド系、モノスディスク系などでの開発研究が顕著である。

一方、有機相の化学的改善によって高い選択性を得る近道は、ポルフィリンやシクロデキストリンのような高い分子識別能を有する大環状化合物を固定相中に直接導入する方法が一般的である。選択性が予測できる点で魅力は大きいが大環状化合物自体の選択性を越えることができないことや、ゲスト分子との結合力が高すぎるために、結果として理論段数が著しく低下するなどの問題があり、現在もっとも広く普及している逆相分配モードでのHPLCには適用しがたい。

2. 研究の目的

以上のような背景のもと、本研究では、独自のアプローチにより、高感度かつ高選択的なHPLCを実現するための分離剤の開発を目指した。具体的には、シリカ粒子を固定相キャリアとし、キャリア界面に相互作用点を集積する手法の確立を目指した。本研究の独創的な点は、選択性の駆動力として環状化合物のような超分子を用いず、直鎖上ポリマーを有機相とする点にあり、これによって鎖上に官能基を集積し、選択性を増幅することができるだけでなく、選択性の

チューニングが官能基の種類や集積方法によって可能となる点にある。以上に加え、キャリア界面の物理的なラフネス構造の制御にも着手し、化学的かつ物理的な両面から研究を推進した。

3. 研究の方法

(1) 物理的な界面強調構造の形成

- ① 平均粒径が80~500nm程度の単分散シリカ粒子を界面増強材に選択し、シランカップリング法によって重合性基を導入した(MPTS-Silicaの作製)。
- ② MPTS-Silicaと疎水性モノマー(スチレン、ジビニルベンゼン、エチレンジメタクリレートなど)の混合液を作製し、懸濁重合によって球状微粒子を作製した。
- ③ 微粒子の表面構造(界面ラフネス)を、シリカ粒子の直径、MPTSの導入量、加水分解による除去などにより制御した。

(2) ポリマーグラフト化による化学的界面強調

- ① シリカ粒子の表面を有機性ポリマー層で被覆するために、シランカップリング法によりシリカ粒子のメルカプトプロピル化を実施した。同粒子をテロゲンとして、各種のビニル化合物に対してグラフト重合を実施した。
- ② リビングラジカル重合によるポリマーグラフト化を行うため、2-ブロモ-2-メチルプロピル基を末端に有するシランカップリング剤を合成し、シリカ粒子表面に導入した。各種のビニル化合物に対して重合を実施した。
- ③ 交互共重合によってポリマーグラフト化を行うために、マレイミド誘導体を合成し、アクリレートモノマーとの共重合によってシリカ粒子表面に導入した。

(3) HPLCの実施と評価

- ① ポリマー有機相の導入密度や流動性に関する情報を、NMRおよびDSCを用いて調査し、

分離能との関連を調査した。

- ② 分解能や選択性に関する基礎研究は、主に $5\ \mu\text{m}$ ベースの粒子を用いてカラム充填し、逆相HPLCシステムを用いて詳細に検討した。
- ③ 特異な選択性を検出するため、様々な幾何異性体や構造異性体を分離対象物質として選択し、HPLCを実施した。併せて生体関連物質の分離についても検討した。

4. 研究成果

(1) 微粒子の物理的界面増強および表面ラフネス構造の制御に関する研究成果

シリカ微粒子のモノレーヤーからなるシェルを有するコア・シェル型微粒子を一段階の懸濁重合によって行うため、Fig. 1に示すように、重合性(MAPT)基を導入したシリカ微粒子とスチレン等との懸濁共重合法をデザインし、実施した。

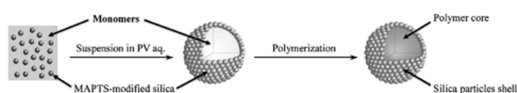


Fig. 1 Schematic illustration of the preparation method to a core-shell particle with a silica particles-shell

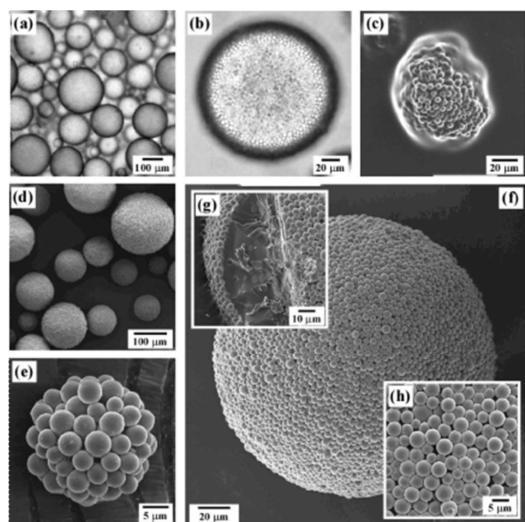


Fig. 2 Optical micrographs of the suspension particles (a, b) and SEM images of the resultant polystyrene-based core-shell particles (c - h) prepared with styrene and EGDMA. (a, b) 30 min after stirring at room temperature (before polymerization). (c) 1 h after stirring at $60\ ^\circ\text{C}$. (d - f) 24 h after polymerization at $60\ ^\circ\text{C}$. (g, h) SEM images of the surface and the cross-section of a typical particle, respectively. (d) Low magnification SEM image of the microspheres. (e) SEM image of a particle with a smaller diameter and a raspberry-like structure.

シリカ粒子への重合性基の導入量は主に反応時間によって調節した。導入量の評価は、元素分析および水の接触角によって確認した。

Fig. 2 は、MAPT化シリカ微粒子を、スチレンおよび架橋剤としてのエチレンジメタクリレート (EGDMA) からなる混合溶液中に分散させ、通常の懸濁重合により得られた粒子の走査型電子顕微鏡写真である。断面写真から明らかなように、シリカ微粒子はほぼモノレーヤーを形成しており、また最外層に固定化されていることがわかる。シリカ微粒子は共重合によって固定化されているので、従来広く利用されてきた表面吸着法によって作製されたものより、機械的な安定度が増しているものと考えられる。

一方、MAPTの導入量を変えて懸濁共重合を実施したところ、Fig. 3のように、シリカ粒子の界面露出度や集積度に大きな差異が認められた。すなわち、MAPTの導入量が高いもの(より疎水化されたもの)ほど界面に埋まりやすくなっている。懸濁重合の経時変化を追跡すると、シェル成分となるシリカ微粒子は懸濁界面に濃縮されやすく、モノマー成分の重合によってさらに界面への相分離が促進されているものと考えられる。

同法の有用性や拡張性について調査するために、MAPT化量の異なる2種のシリカ粒子を用いて懸濁重合を実施したところ、シェル層が2層のシリカ粒子レイヤーから構成されていることが明らかになった。詳細な検討により、内側のシェルがMAPT化よりの高いシリカ粒子から構成されていることが明らかになった。この現象を巧みに利用すると、モノレーヤーだけでなく、ダブルレーヤーやマルチレーヤーの形成も可能となる。

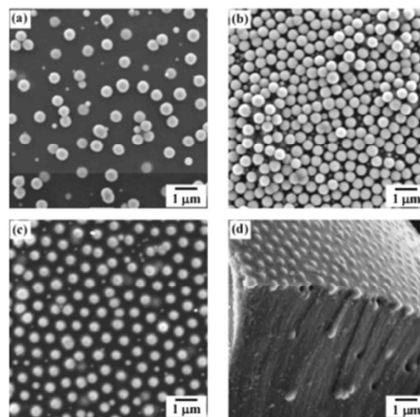


Fig. 3 SEM images of the surfaces of polystyrene-based core-shell microspheres prepared with various introduced amounts of MS on Sil-0.40 (a - d) and prepared by mixing Sil-4.27 and Sil-0.40 (e, d). The introduced amount of MS is (a) 0.17 wt%, (b) 0.43 wt%, and (c, d) 0.65 wt%. The mixed mass ratio of Sil-4.27 to Sil-0.40 is (e) 4: 1 and (f) 2: 1.

その他の展開として、固定化されたシリカ粒子を酸性条件下で処理すると、加水分解により除去され、結果として粒子表面にディンプルを形成させることが可能となった。

また、無機微粒子としてシリカだけでなく、他の金属酸化物にも応用することが可能であり、本研究では、チタニアや酸化マグネシウム、酸化鉄(磁性ナノ粒子)によるコア・シェル粒子の作製を行った。

Fig. 4は、本研究の手法で可能な表面構造のパターンを模式的に表している。

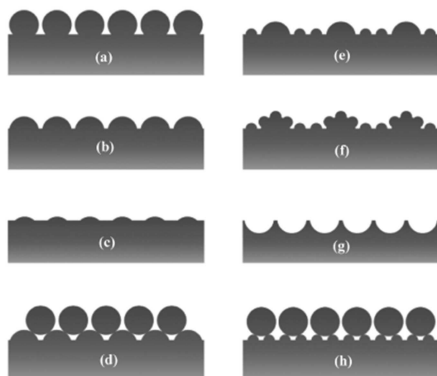
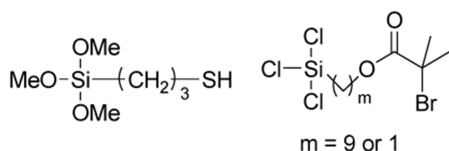


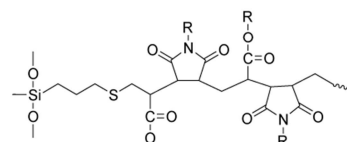
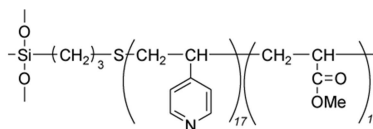
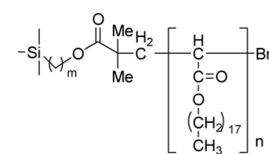
Fig. 4 Schematic illustrations of possible controlled structures on surfaces. (a)-(c) Single layer structures prepared with various MS contents ((a) < (b) < (c)) on shell particles. (d) Double layer structure prepared from two kinds of shell particles with the different MS contents. (e) Single layer structure prepared from two kinds of shell particles with the different diameters. (f) Double layer structure prepared from two kinds of shell particles with the different diameters. (g) Dimple structure obtained by hydrolytic removal of shell particles. (h) Double layer structure prepared from two kinds of shell particles with the different diameters and MS contents.

(2) ポリマーグラフト化による化学的界面強調

本研究は、シリカ粒子の表面をポリマーにより被覆し、分離の要となる官能基を集積することによって高い選択性を発現させることを目的としている。ポリマーのグラフト化には、下記のようなシランカップラーを用いて予めシリカ表面上を修飾し、テロメリゼーションあるいは原子移動ラジカル重合(ATRP)を実施した。

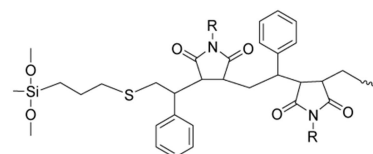


重合するモノマーには、相互作用点としてカルボニル基やヘテロ原子を有する環状化合物を採用した。本研究で作製されたグラフト化ポリマーの一例を示す。



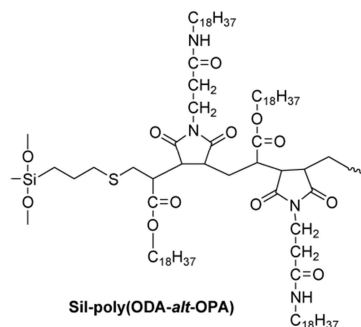
$\text{R} = (\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3$ for Sil-poly(ODA-*alt*-OMI)

and $\text{R} = \text{CH}_3$ for Sil-poly(MA-*alt*-MMI)



$\text{R} = (\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3$ for Sil-poly(ST-*alt*-OMI)

and $\text{R} = \text{CH}_3$ for Sil-poly(ST-*alt*-MMI)



(3) ポリマーグラフト化シリカによる HPLC

①ポリビニルピリジン (Sil-VP_n) およびカルバゾール系 (Sil-CEA) ポリマーグラフト化シリカのクロマト分離能について

これらのポリマー有機相の特異的なクロマト挙動を要約すると、単純疎水化シリカ(たとえば ODS)と比べ、分離対象物質の疎水性の差に鈍感であり、その一方で双極子モーメントや π 電子にきわめて敏感な点にある。この特性が特殊な選択性の発現に繋がることが明らかになった。Table 1 に示すように、とくに Sil-VP において圧

Table 1
Retention (k) and separation factor (α) for planar and non-planar PAHs with various columns at 35 °C.

PAHs	Sil-VP		Sil-CEA		ODS	
	k	α	k	α	k	α
<i>o</i> -Terphenyl (C ₁₈ H ₁₄)	0.22		1.37		2.52	
Triphenylene (C ₁₈ H ₁₂)	2.63	12.0	6.94	5.07	3.79	1.50
<i>o</i> -Terphenyl (C ₁₈ H ₁₄)	0.22		1.37		2.52	
<i>p</i> -Terphenyl (C ₁₈ H ₁₄)	0.65	2.95	3.63	2.65	3.60	1.43
<i>cis</i> -Stilbene (C ₁₄ H ₁₂)	0.18		0.89		1.92	
<i>trans</i> -Stilbene (C ₁₄ H ₁₂)	0.41	2.28	1.59	1.79	2.05	1.07
<i>cis</i> -Stilbene (C ₁₄ H ₁₂)	0.18		0.89		1.92	
Phenanthrene (C ₁₄ H ₁₀)	0.82	4.56	2.46	2.76	2.10	1.09

Mobile phase: methanol-water (9:1).

倒的な高い分子形状選択性が得られている。

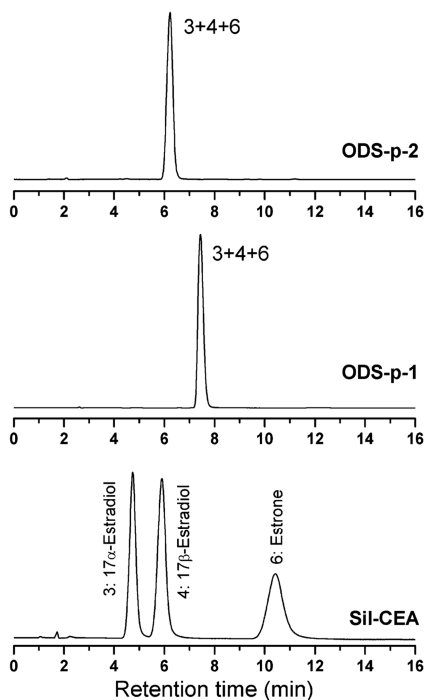
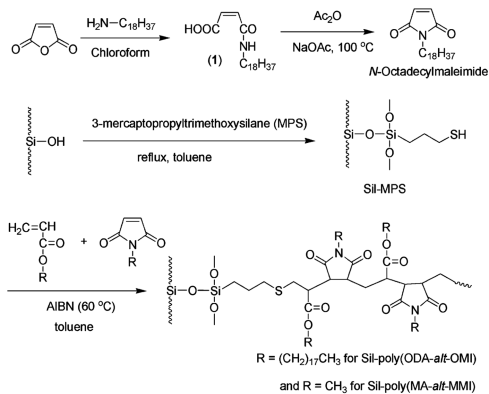


Fig. 5 Separation of 3:17 α -estradiol, 4:17 β -estradiol and 6:estrone with Sil-CEA, ODS-p-1, and ODS-p-2. Mobile phase: methanol–water (7:3), column temperature 35 °C, flow rate: 1.0 mL min⁻¹.

一方、Sil-CEAは、より大きな分子に対して高い形状識別能を示すことが明らかになった。Fig. 5は、分離対象としてきわめて難易度の高い、ステロイドホルモンのクロマトグラムを示している。市販の分離カラムの中でもっとも高い選択性を示す高分子化ODSではほとんど分離できない異性体混合物を、Sil-CEAはベースライン分離することが可能である。

②交互共重合ポリマーグラフト化シリカのクロマト分離能について

弱い相互作用点(この場合はカルボニル基)をポリマー主鎖上に配列させる手法として交互共重合を採用した。この新しい試みのために、下記のような新規なモノマーの合成とシリカ粒子が



らのグラフト重合を実施した。結果として、多環芳香族系物質に対してきわめて高い構造異性選択性を示すことが明らかになった。中でも、Fig. 6に示すように、液体クロマトグラフィーでは困難であったトコフェロール異性体(とくに β 、 γ 異性体)のベースライン分離を実現した。

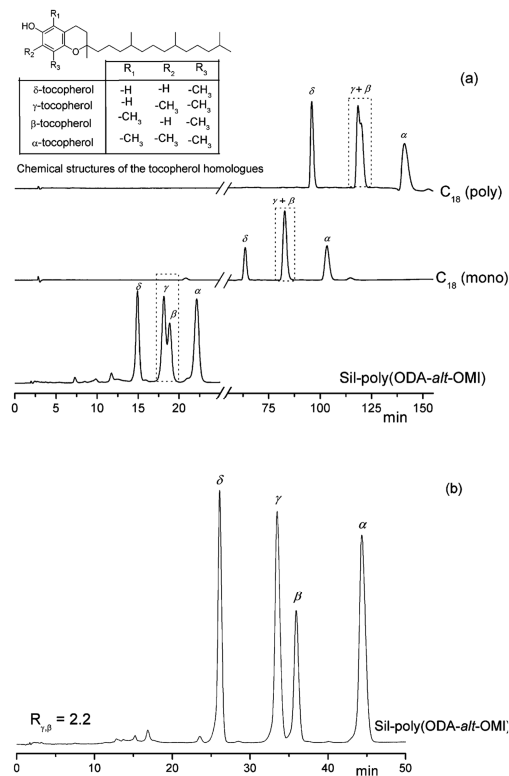
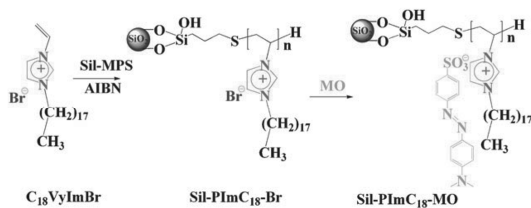


Fig. 6 Separation of the isomers of tocopherol (vitamin E) on monomeric ODS, polymeric ODS, and Sil-poly(ODA-alt-OMI).

③イオン液体の特性を利用した相互作用点の集積とクロマト分離能について



イオン液体を形成しうるイミダズリルベースのビニル化合物を新たに設計し、シリカ粒子からのグラフト重合を実施した。その後、カウンターイオンをイオン交換により行い、メチルオレンジをポリマー有機相中に濃縮することに成功した。ポリイオン液体そのものに、多環芳香族系物質に対する高い分子形状識別能が認められるが、イオン交換によってさらに選択性を高めることができることを確認した。すなわち、カウンターイオンを設計することにより、選択性のチューニングが可能

となることを明らかにした。

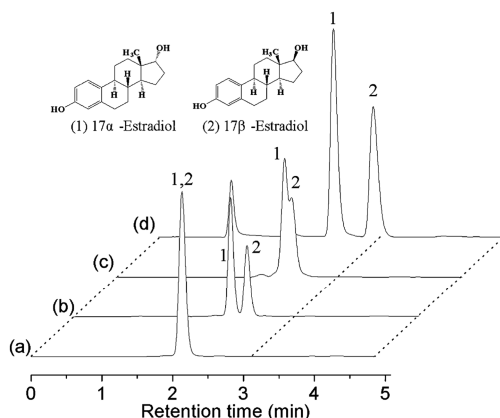


Fig. 7 Comparison of the separation of 17 α -estradiol and 17 β -estradiol with C18 (mon) (a), C30 (b), Sil-PIImC18-Br (c), and Sil-PIImC18-MO (d) columns.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 23 件)

① A. K. Mallik, T. Sawada, M. Takafuji, H. Ihara: *Analytical Chemistry*, 査読有, Vol. 82, pp. 3320–3328, 2010.

② H. Qiu, M. Takafuji, T. Sawada, X. Liu, S. Jiang, H. Ihara: *Chemical Communications*, 査読有, Vol. 46, pp. 8740–8742, 2010.

③ A. K. Mallik, K. Shingo, U. G. Gautam, T. Sawada, M. Takafuji, H. Ihara: *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 査読有, Vol. 397, pp. 623–629, 2010.

④ H. Qiu, X. Liu, S. Jiang, M. Takafuji, H. Ihara: *Journal of Chromatography A*, 査読有, Vol. 1217, pp. 5190–5196, 2010.

⑤ H. Ihara, S. Kubota, A. Uchimura, Y. Sakai, T. Wakiya, M. M. Rahman, S. Nagaoka, M. Takafuji: *Materials Chemistry and Physics*, 査読有, Vol. 114, pp. 1–5, 2009.

⑥ U. G. Gautam, M. P. Gautam, T. Sawada, M. Takafuji, H. Ihara: *Journal of Chromatography A*, 査読有, Vol. 1216, pp. 3571–3577, 2009.

⑦ M. M. Rahman, M. Czaun, M. Takafuji, H. Ihara: *Chemistry – A European Journal*, 査読有, Vol. 14, pp. 1312–1321, 2008.

[学会発表] (計 40 件)

① A. K. Mallik, T. Sawada, M. Takafuji, H. Ihara: *ACS Spring 2010 National Meeting & Exposition*, San Francisco, USA, 2010. 3. 21–25

② H. Ihara, S. Kubota, A. Uchimura, T. Wakiya, T. Sawada, M. Takafuji: *IUPAC 45th General Assembly & IUPAC 42nd Congress*, Glasgow, UK, 2009. 8. 2–7

[図書] (計 2 件)

① M. M. Rahman, A. Rana, U. G. Gautam, M. Takafuji, H. Ihara: *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Pollution, Health, Effects and Chemistry*, Nova Publishers, Edited by Pierre A. Haines and Milton D. Hendrickson, Chapter 11, pp. 265–294, 2011.

② A. K. Mallik, M. M. Rahman, M. Takafuji, H. Ihara, S. Nagaoka: *Encyclopedia of Chromatography, 3rd Edition*, CRC Press, Edited by Jack Cazes, pp. 2149–2156, 2009.

[その他]

ホームページ等

http://www.chem.kumamoto-u.ac.jp/~ihara/papers_select2007A.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊原 博隆 (IHARA HIROTAKA)

熊本大学・大学院自然科学研究科・教授

研究者番号: 10151648

(2) 研究分担者

高藤 誠 (TAKAFUJI MAKOTO)

熊本大学・大学院自然科学研究科・准教授

研究者番号: 50332086

(3) 研究分担者

澤田 剛 (SAWADA TSUYOSHI)

熊本大学・大学院自然科学研究科・准教授

研究者番号: 90240902

(4) 研究分担者

永岡 昭二 (NAGAOKA SHOJI)

熊本県産業技術センター・材料開発部・研究参事

研究者番号: 10227994