

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 29 日現在

機関番号：14303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26410151

研究課題名(和文) 生体由来高親水性化合物の超高性能分離のためのHPLC用カラムの開発

研究課題名(英文) Development of HPLC columns for ultra high performance separation of bio-based highly hydrophilic compounds

研究代表者

池上 亨 (Ikegami, Tohru)

京都工芸繊維大学・分子化学系・准教授

研究者番号：20301252

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：高性能/高選択的な親水性相互作用(HILIC)型、イオン交換型、キラル分離型HPLC用カラムをモノリス型、粒子充填型について調製し、既存の粒子充填型カラムの性能限界を超えた高親水性化合物の分離媒体を開発した。(1) シリカの表面修飾に用いる重合反応の反応条件とカラム性能の関係を精査し、最適な修飾条件を確立した(2) 導入した高分子鎖の鎖長と分離性能の相関を検討した(3) カラムの理論段高4-10ミクロン、理論段数30万段を発生させるHILIC型カラムを調製し、メタボローム解析に応用した。(4) HILIC型、カチオン交換型、アニオン交換型、キラル分離能を併せ持つカラムを調製した。

研究成果の概要(英文)：High performance / highly selective hydrophilic interaction (HILIC) type, ion exchange type, chiral separation type HPLC columns were prepared for monolithic and particle-packed type. They provided highly hydrophilic nature exceeding the performance limit of commercially available HILIC columns. (1) The relationship between the reaction conditions of the polymerization for surface modification of silica and the corresponding performance of the column were carefully examined to establish optimal modification conditions. (2) The correlation between the chain length of the introduced polymer chains and the separation performance and characteristics were examined. (3) HILIC type columns providing theoretical plate height 4-10 microns, 300,000 theoretical plates were prepared and applied to metabolome analysis. (4) A column having all of HILIC, cation exchange, anion exchange and chiral separation ability was prepared.

研究分野：分析化学

キーワード：親水性相互作用クロマトグラフィー 液体クロマトグラフィー キラル分離 カラム充填剤 分離特性解析

1. 研究開始当初の背景

生命現象を司る分子として、核酸、タンパク質、糖鎖が三大要素とされている。これらの分子を扱う膨大な化学の領域に更なる情報の蓄積をもたらすため、メタボローム、プロテオーム等、オーム解析と呼ばれるこれらの総合的・包括的・網羅的な解析について、世界中で研究開発競争が展開されている。これら生命情報の解析においては、複雑な生体成分の分離と検出、定量、同定などを実行可能な、力量ある分析手段の提供が研究推進のキーステップになっている。

核酸、オリゴ糖などの高親水性分子の莫大な構造異性体を分離するには、極めて高い構造選択性と分離性能を実現する必要がある、逆相液体クロマトグラフィーだけではこれらの高親水性分子の総合的・網羅的な解析は困難である。近年注目されている親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC)、あるいはイオン交換型クロマトグラフィーは核酸、オリゴ糖などの高親水性分子に適するが、まだ市販の製品は力量不足であると言わざるを得ない。

2. 研究の目的

糖鎖、フラボノイドなどのポリフェノール類、核酸誘導体、アミノ酸誘導体など、生命現象を司る高親水性の小分子化合物の分離、検出、定量の超高性能化、高速化を実現する液体クロマトグラフィー分離媒体の開発が目的である。

具体的には、超高性能/高選択的な親水性相互作用型 (HILIC) およびイオン交換型 HPLC 用カラム (モノリス型、粒子型) を調製し、既存の粒子充填型カラムの性能限界を超えた高親水性化合物の分離媒体を開発することが目的である。(1) シリカの表面修飾に用いる重合反応の反応条件とカラム性能の関係を精査し、最適な修飾条件を確立する (2) 導入した高分子鎖の鎖長と分離性能の相関を検討する (3) カラムの理論段高 4-10 ミクロン、理論段数 50 万段を発生させる HILIC 型、カチオン交換型、アニオン交換型、キラル分離能を併せ持つカラムを調製するなどが挙げられる。

3. 研究の方法

(1) シリカの表面修飾に用いる重合反応の最適化と分離性能の関係の精査

シリカモノリスキャピラリーカラム内での重合修飾において、重合時のモノマー濃度を段階的に高くすると高極性化合物の保持が非連続的に向上すること、モノリス流路に生成するポリマーによってカラムの洗浄が不可能になる限界濃度が存在することが分かっている。シリカ粒子とシリカモノリス両方について、モノマーの構造と対応するポリマーの溶解性を基に、カラムあたりの親水性ポリマー結合量を極限まで高め、親水性の層の厚みを確保し、高親水性物質の保持が極大

となる修飾条件を探索する。

(2) 高分子鎖の分子量とシリカ上の親水性層の関係の解明、分離性能との相関の検討

HILIC 型分離においては、安定な水和層の存在が保持と選択性を発現する鍵であることが明らかになりつつある。シリカ粒子を重合修飾し、元素分析、質量スペクトル分析法等の解析を行ない、高分子鎖の鎖長 (重合度) や結合量を解析するとともに、分離特性に関する関係性を調査する。

(3) HILIC 型、イオン交換型分離モードとキラル分離能を併せ持つカラムの調製、これらの高性能化

光学活性をもつ親水性あるいはイオン性のモノマーを重合修飾してこの種のカラムを得る。D 体のアミノ酸や L 体の糖の分析を可能とするため、ホモキラリティの原因解明と結びつく興味深い研究対象である。まず、天然に多く存在する単糖類やヌクレオシド類の L 体と D 体の分離を試みる。

様々な分離モードのカラムの高性能化を図り、理論段数 50 万段の発現を目指す。

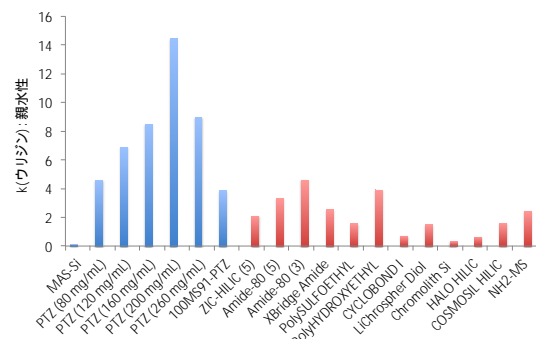
(4) 粒子からシリカモノリスまでの、多様なカラムフォーマットでの修飾法の展開

シリカモノリスキャピラリーでの研究は、修飾した高分子の解析が量的な問題から困難である。実験計画を円滑に進行させるため、つねに粒子型あるいは太いモノリスカラムで同様の修飾を実施し、分離性能の比較検討を行なう。元素分析や質量分析など多様な分析手法を用いて本申請による修飾法の利点を裏付けるデータを獲得する。

4. 研究成果

(1) シリカの表面修飾に用いる重合反応の最適化と分離性能の関係の精査

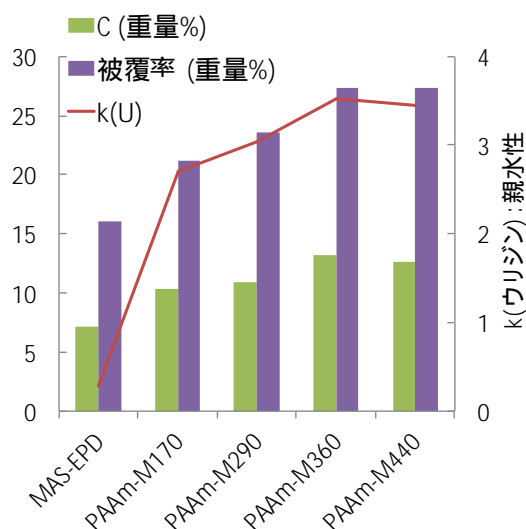
HILIC 型カラムの調製を目的とし、テトラゾールメタクリルアミドを重合修飾して PTZ カラムを調製した。水 5 mL あたり 1000 mg 以上のモノマーを用いるような条件でも様々な形状のシリカゲルを修飾できることが明らかになった。これから発生するポリマーの水溶性が高いことが原因だと考えられる。



図に示すように、PTZ カラムは市販の HILIC

カラム（図の右半分）をはるかに上回る親水性を発現した。k(ウリジン)が8を超えるような条件では、シリカ上の高分子は数平均分子量 27000~33000 であることが明らかになった。これほど高い親水性を示す分離媒体の報告例はなく、学術的に非常に興味深い。この修飾方法を企業に技術移転した。さらなる条件検討を重ねて試作品を作製し、世界各国の研究者に使用感を募ったところ、これまで不可能だった分離が実現できた、親水性の化合物の大量分取に成功した、という感想が多く、概ね好評である。

一方、アクリルアミドの重合による修飾は、生成するポリマーの溶解性が低いため、高い親水性の発現が難しい。以下は、水 5 mL あたり 170~440 mg のアクリルアミドをフリーラジカル重合修飾した際の元素分析とその分離媒体の親水性 k(ウリジン) を示す。



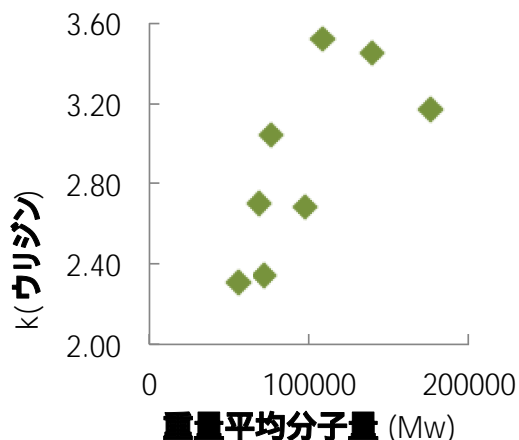
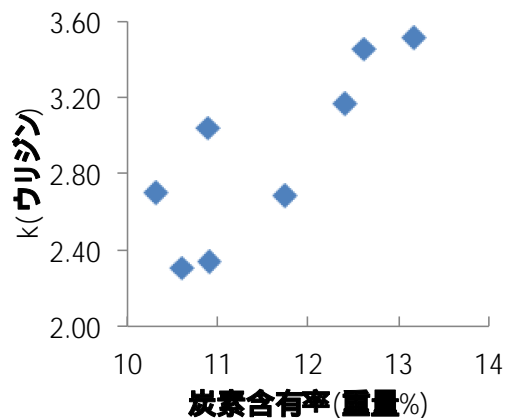
モノマー濃度が 360 mg を上回ったところでは良い親水性を示したが、これは市販の HILIC カラムと比較して同程度の数値である。なお、数平均分子量 4 万程度、重量平均分子量 10~14 万程度のポリアクリルアミドがシリカ上に結合していること、溶液中では重量平均分子量 50~70 万程度のポリアクリルアミドが生成しており、これが洗浄を困難にしていることが明らかになった。

ハロゲン化アルキルを含むシリル化剤で化学修飾したシリカを、臭化銅(I)とアクリルアミドの溶液中で加熱する方法で、原子移動ラジカル重合(ATRP)を行なったところ、溶液中でのアクリルアミドがかなり抑制され、主にシリカ上で重合反応が進行するため、反応後の洗浄が極めて容易になることを見出した。この方法はシリル化剤の結合量が十分な場合、ポリマー鎖がシリカ表面から垂直方向に伸長するポリマーブラシが生成すると考えられる。フリーラジカルで重合する場合は、溶液中で重合が進行し、ある程度の分子量になった重合体がシリカと反応するため、いわゆるマッシュルーム型のポリマー鎖がまばらに結合した表面構造をとることと

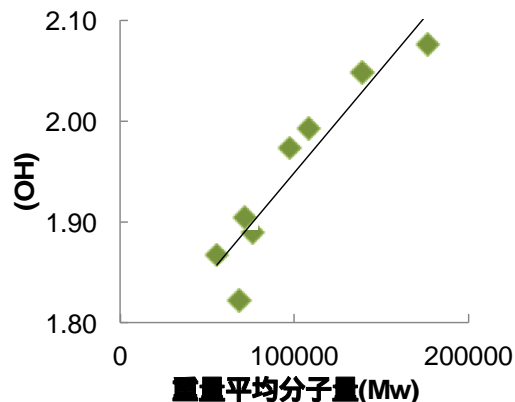
対照的である。

(2)高分子鎖の分子量とシリカ上の親水性層の関心の解明、分離性能との相関の検討

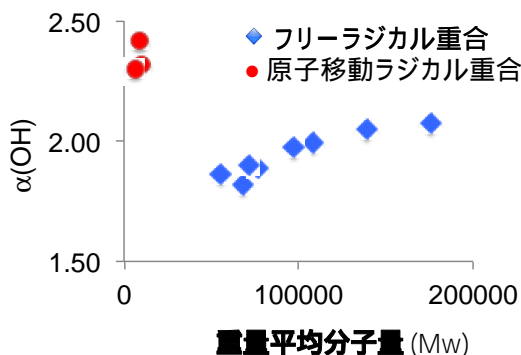
種々のモノマー濃度、開始剤濃度、反応温度におけるアクリルアミドのフリーラジカル重合修飾によって、異なる分子量のポリアクリルアミドが結合したシリカ粒子を得た。この分離特性と炭素含有率、分子量との相関を取ったところ、炭素含有率が 11%以上で良好な親水性 k(ウリジン)が発現できること、その際のポリマーの重量平均分子量は 10 万以上であることなどが示された。



リボースのヒドロキシ基一個の有無に対する選択性 (OH) についても同様に評価したところ、炭素含有量、重量平均分子量と相関が見られた(下図)。

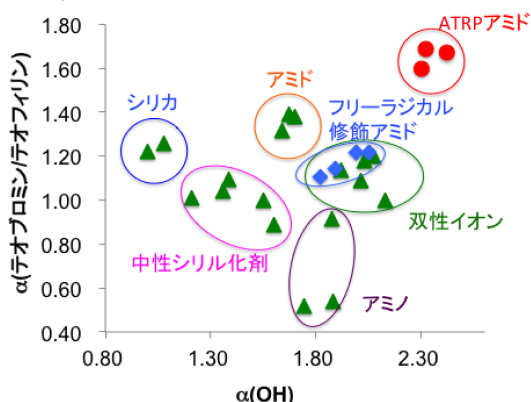


ATRP で修飾したシリカ粒子は、フリーラジカル重合修飾で得られたものとは全く異なる傾向を示した。下図に示すように、シリカ粒子に結合したポリアクリルアミドの分子量はわずか8~9千に過ぎないが、 $\alpha(\text{OH})$ は2.3~2.5を示した。



これは市販の HILIC カラムと比べてはるかに大きな値である。 k' (ウリジン)も最大で9付近を示し、市販のカラムの2~5倍の親水性を示した。

HILIC カラムの分離特性を表すダイヤグラムでは、縦軸にシリカ表面の酸性度(1付近では中性、1以下では塩基性、1以上では酸性)、横軸に固定相の水和の程度を表す。



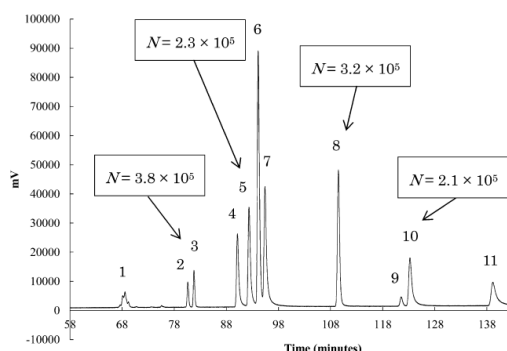
フリーラジカル修飾型のアクリルアミドカラムは、双性イオン型のカラムとよく似た分離挙動を示した。一方、ATRP型のアクリルアミドカラムは市販されているどのカラムとも違う分離特性を示した。今後の高機能化が期待される。

(3)HILIC 型、イオン交換型分離モードとキラル分離能を併せ持つカラムの調製、これらの高性能化

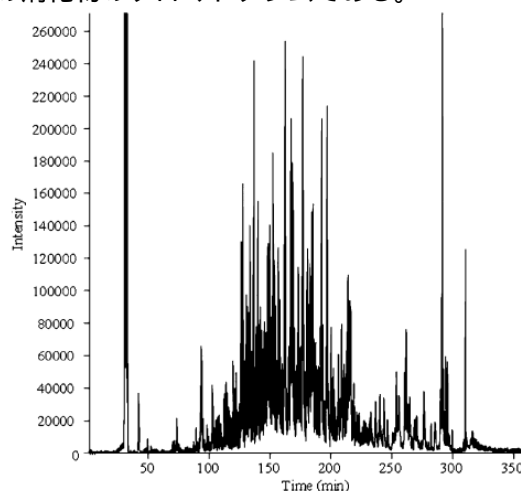
キラル分離を可能とし、かつ親水性/イオン交換性の媒体を作製するため、システインやグルタチオンに重合可能な基を化学結合により修飾し、(1)(2)同様にフリーラジカル修飾した。未修飾の単糖やアミノ酸に対して、2~3程度の保持を発生する親水性カラムが調製できた。グルコースのL体とD体の分離係数1.02、アミノ酸の分離係数1.04が現段階で最良の数値である。原理的にはキラル分離かつ親水性/イオン交換性のカラムが調

製できたが、エナンチオマーの完全な分離には理論段数4万程度は最低必要と算出された。この成果について特許を出願した。

シリカモノリスキャピラリーカラムに尿素官能基を有するシリル化剤を化学修飾することで、4mのカラム長を実現した。これはヌクレオシド類に対して21~38万段の理論段数を与えた。



このカラムをプロテオーム解析に応用したところ、12118ペプチド、2529タンパク質の同定に至った。同様の逆相型カラムで10562ペプチド、2605タンパク質の同定なので、遜色ない。またこのペプチドのうち、約40%はHILICカラムでのみ同定される親水性の高い分子であった。下に示すのはHeLa細胞の消化物のクロマトグラムである。



(4)粒子からシリカモノリスまでの、多様なカラムフォーマットでの修飾法の展開

(1)~(3)で示した通り、カラムフォーマットは粒子型からシリカモノリスまで使用し、化学修飾の方法もシリル化剤を結合させる方法、フリーラジカル重合修飾、原子移動ラジカル重合修飾などを行なった。十分な量を持っているものは元素分析や分子量分布の測定を行ない、その結合量や分子サイズと分離特性の相関を取った。

今回の研究で、多様な修飾法がそれぞれ有望な結果を与えたので、高親水性物質を対象とする分離媒体の調製法は進歩したと考える。

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 4 件)

Document

Yui, Y., Miyazaki, S., Ma, Y., Ohira, M., Fiehn, O., Ikegami, T., McCalley, D.V., Tanaka, N., Distinction of synthetic dl-tocopherol from natural vitamin E (d-tocopherol) by reversed-phase liquid chromatography. Enhanced selectivity of a polymeric C18 stationary phase at low temperature and/or at high pressure. *Journal of Chromatography A*, 査読有 1450, 2016, pp 45-52.

DOI: 10.1016/j.chroma.2016.04.076

Ghanem, A., Ahmed, M., Ishii, H., Ikegami, T., Immobilized β -cyclodextrin-based silica vs polymer monoliths for chiral nano liquid chromatographic separation of racemates. *Talanta*, 査読有 132, 2015, pp. 301-314.

DOI: 10.1016/j.talanta.2014.09.006

Okusa, K., Iwasaki, Y., Kuroda, I., Miwa, S., Ohira, M., Nagai, T., Mizobe, H., Gotoh, N., Ikegami, T., McCalley, D.V., Tanaka, N. Effect of pressure on the selectivity of polymeric C18 and C30 stationary phases in reversed-phase liquid chromatography. Increased separation of isomeric fatty acid methyl esters, triacylglycerols, and tocopherols at high pressure. *Journal of Chromatography A*, 査読有 1339, 2014, pp 86-95.

DOI: 10.1016/j.chroma.2014.02.077

Horie, K., Kamakura, T., Ikegami, T., Wakabayashi, M., Kato, T., Tanaka, N., Ishihama, Y. Hydrophilic interaction chromatography using a meter-scale monolithic silica capillary column for proteomics LC-MS. *Analytical Chemistry*, 査読有 86, 2014, pp3817-3824.

DOI: 10.1021/ac4038625

〔学会発表〕(計 4 件)

Ikegami, T., Wakabayashi T. Significant high retention and better selectivity of saccharides on a HILIC column, prepared by polymer-coating. 31st International Symposium on Chromatography. 2016, September, Cork (Ireland).

Ikegami, T. Drastic improvement of HILIC columns in terms of

hydrophilicity by polymer-coating functionalization. 42nd International Symposium on high performance liquid phase separations and related techniques. 2015, June, Geneva (Switzerland).

Ikegami, T., Y. Kawachi, N. Tanaka. Preparation and characterization of highly hydrophilic monolithic silica columns by on-column polymerization. 30th International Symposium on Chromatography. 2014, September, Salzburg (Austria).

Okada, T., Miyamoto, M., Ikegami T. Influence of surface coverage and molecular weight of polymer of HILIC phases modified with hydrophilic polymers, on the retention factor. 30th International Symposium on Chromatography. 2014, September, Salzburg (Austria).

〔図書〕(計 2 件)

Ikegami, T., Tanaka, N. Recent Progress in Monolithic Silica Columns for High-Speed and High-Selectivity Separations. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 査読有 9, 2016, pp317-342.

DOI:10.1146/annurev-anchem-071114-040102

Hara, T., Núñez, O., Ikegami, T., Tanaka, N. Monolithic columns in fast liquid chromatography." *Fast Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Methods in Food and Environmental Analysis*" 査読無 2015, pp57-107. DOI: 10.1142/9781783264940_0003

〔産業財産権〕

出願状況 (計 2 件)

名称: Separation agent
発明者: 池上亨、河内祐介、國澤研大
権利者: 京都工芸繊維大学 ダイセル化学工業
種類: 特許
番号: PCT/JP2014068237
出願年月日: 2016年02月12日
国内外の別: 外国

名称: クロマトグラフィー充填剤
発明者: 池上亨、上山芳記
権利者: 京都工芸繊維大学
種類: 特許
番号: JP 2015-71788
出願年月日: 2015年03月31日
国内外の別: 国内

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池上 亨 (IKEGAMI Tohru)
京都工芸繊維大学・分子化学系・准教授
研究者番号：20301252

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()