

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：14303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05550

研究課題名(和文) 親水性およびイオン性物質の高性能・高選択性分離のためのHPLCカラムの開発

研究課題名(英文) Development of HPLC columns for highly efficient and selective separation of hydrophilic and ionic substances

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：構造選択性に基づく親水性相互作用クロマトグラフィー(HILIC)およびミックスモードのカラムのテスト法を開発した。これはカラムの親水性、水和の程度、表面の弱カチオン/弱アニオン交換性などの要素を一つの図で表現できる。いくつかの重合法を用いて、シリカゲルを親水性ポリマーで修飾する手法を開発し、得られた固定相を前述のテスト法で評価した。この固定相をなす高分子鎖の形態および修飾密度を調整することで親水性の保持と選択性を制御できることを示している。この一連の研究で調製したカラムは、これまでのどのHILICカラムよりもOH基に対して高い選択性を示した。糖の精密分離の条件も検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新しくHILICのカラムを調製して、それがこれまでに報告されたカラムと分離特性(親水性、水和相の厚み、表面のイオン交換性など)と比較し、評価する方法を提供した。このことは、学術的な意義にとどまらず、カラムを製造する企業が製品開発したり、製品の品質管理をしたりする際に利用されるので、社会的意義が大きいと考える。また、原子移動ラジカル重合(ATRP)や可逆的付加開裂連鎖移動重合(RAFT)を用いて、古典的な重合法では到達できない領域まで、分離媒体の親水性の保持及び構造選択性を向上できることを示した。これは今後の分離媒体開発への指針となることが予想される。

研究成果の概要(英文)：Testing methods based on structural selectivity for hydrophilic interaction chromatography (HILIC) and mixed-mode columns were developed. This facilitates the comparison of columns in terms of the hydrophilicity, the degree of hydration, and the weak cation/anion exchange properties of the surface, using a single diagram. Methods were developed to modify silica gel with hydrophilic polymers using different manner of polymerization, and the resulting stationary phases were evaluated by the test method described above. It shows that the retention of hydrophilicity and selectivity can be controlled by adjusting the morphology and modification density of the polymer chains that make up the stationary phase. The columns prepared in this series of studies showed higher selectivity for OH groups than any previous HILIC columns. The conditions for precise separation of sugars were also investigated.

研究分野：分離化学

キーワード：親水性相互作用クロマトグラフィー イオン交換 ミックスモード 構造選択性 分離特性

1. 研究開始当初の背景

シリカ粒子の重合修飾において、高粘度の反応生成物に至ってその後の洗浄で非常に煩雑な作業が必要な場合があった。溶液相での重合を避け、シリカ表面での重合に切り替えることで、系の粘度増加を抑え、反応後の処理を容易にする戦略が合理的であると考へ、実際にその通りであることを示した。分離特性を評価する独自の手法を開発しており、これは国内外の企業や研究者に幅広く用いられている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、生体由来の複雑成分を超高性能で分離する液体クロマトグラフィー分離媒体の開発にある。特に最近注目を集めている生体由来の成分から、親水性およびイオン性分子を分離する際の分離性能を飛躍的に向上すること、及び、その分離機能の高速分離への応用を目指す。

本研究は、高性能/高選択的な親水性相互作用型 (HILIC)、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条件とカラム性能の関係の精査、最適化
- (2) 導入する高分子鎖の鎖長、鎖の密度と分離性能の相関の検討
- (3) 親水性相互作用型、イオン交換型で理論段数 10 万段を発生
- (4) 高速条件下で利用価値の高い低分子型の分子識別部位の開発
- (5) 糖ペプチド、糖タンパクの分離への応用

実験計画の中心は、HILIC 型カラム、イオン交換型カラムの選択性と分離性能を向上する方法を探索することにある。

3. 研究の方法

方法 1. シリカの表面修飾に用いる重合反応と分離性能の関係の精査、最適化

方法 2. 導入する高分子鎖の鎖長、鎖の密度と分離性能の相関の検討

方法 3. 高速条件下で利用価値の高い低分子型の分子識別部位の開発

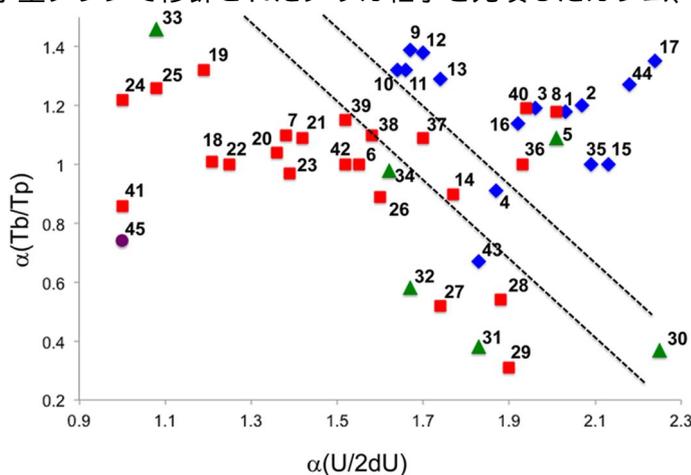
方法 4. 糖ペプチド、糖タンパクの分離への応用 について主に検討した。

4. 研究成果

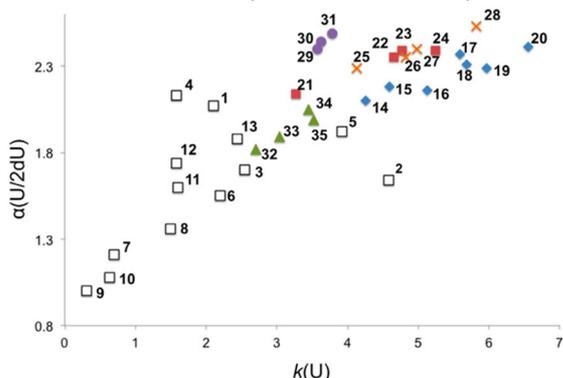
方法 1、2 に対する成果

親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC) で使用される 45 種類の市販のカラムを、ヌクレオシドとキサンチンなどの小分子間の微細な構造の違いを選択的に識別する能力を測定することによって特性評価した。構造的に類似した分析物から得られたデータに主成分分析 (PCA) を適用したところ、HILIC カラムは 2 つのグループに分類できた。すなわち、

(i) 未修飾シリカ粒子または低分子量シランで修飾されたシリカ粒子を充填したカラム、
 (ii) 有機ポリマーで官能化されたシリカ粒子から得られたポリマー修飾カラム である。これらのグループは、それぞれの固定相に付加されている機能に基づいてさらに細分化できた。この PCA の結果は合成関数を軸とする理解しにくいプロットだったのを、化学的なパラメータ、OH 基に対するカラムの選択性と、テオプロミン/テオフィリンの選択性を用いて PCA の結果に近い図を獲得できた。このテスト結果は、固定相の親水性、水和の程度、表面の酸性/塩基性、つまり弱カチオン/弱アニオン交換性などの要素を一つの図で表現できる。なお、OH 基に対するカラムの選択性 (図では $\alpha(U/2dU)$ と記述) は、別のグループが測定したカラム表面の水和相の厚みと相関があることがわかった。CH₂ グループに対するカラムの選択性も調査した。HILIC カラムの陽イオン交換の性質は、未修飾シリカカラムおよび一部のポリマー修飾カラムに大きな影響を与えることを示した。その結果は各 HILIC カラムの明確な分離特性を理解するのに役立ち、カラムの選択の指針となることがわかった (10.1016/j.chroma.2020.461850)。



10~30 nm のさまざまな細孔サイズのシリカ粒子を、さまざまな反応条件下での表面開始原子移動ラジカル重合 (SI-ATRP) を用いてポリ(アクリルアミド)で修飾した。20 種の異なるカラムを調製し、親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC) カラムのテスト法に従って分離特性評価した。SI-ATRP カラムによる親水性保持力は、フリーラジカル重合によって調製されたポリ(アクリルアミド)カラムや多くの市販の HILIC カラムよりもはるかに

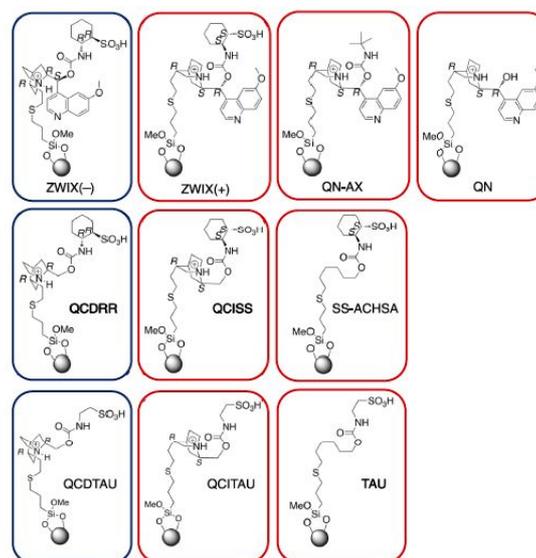


高いことが示された(左図:白抜きの四角は市販のHILICカラム、着色されたもののうち、緑の三角はフリーラジカル重合、それ以外の赤、オレンジ、紫、青はSI-ATRPによって調製したもの)。固定相をなす高分子鎖の形態および修飾密度を調整することで親水性の保持と選択性を制御できることを示している。この固定相設計戦略は、親水性の高い分析物の効果的な分離によって実験的に検証された(10.1016/j.chroma.2019.460837)。これらのカラムのオリゴ糖に対する識別能を、フリーラジカル重合(FRP)によって調製した

ものと比較した。ATRP-PAAm カラムは、FRP-PAAm カラムや市販のアミドカラムと比較して、マルトース同族体とシクロデキストリンに対する選択性が高いため、オリゴ糖の精密分離に役立つものと期待される(10.1016/j.chroma.2021.462207)。

方法3に対する成果

キラル両性イオン材料 Chiralpak ZWIX(+) および ZWIX(-) を構成する分子から、部分的に官能基やアルキル鎖を取り除いたさまざまなフラグメントからなる分子を用いたカラムを調製した。これらを表面電荷、逆相および HILIC テストによってクロマトグラフィー的に特徴付けた。その結果、市販の RP、HILIC、およびミックスモード固定相の位置づけが可能になった。新しい混合モード相は全体的に適度な親水性と疎水性のバランスを示し、弱陰イオン交換(WAX タイプ)、強陽イオン交換(SCX タイプ)、またはその両方(RP/ZWIX-)による追加のイオン相互作用によるイオン性化合物の保持を可能にします。タイプ)。したがって、新しい RP/ZWIX フェーズは、RP および HILIC 分離における選択性調整のための柔軟なツールとなり得る



(10.1016/j.chroma.2020.461075)。

方法4に対する成果

糖類を分離分析するため、当研究室で開発し、市販されるようになった HPLC カラムであるポリ-N-(1H-テトラゾール-5-イル)-メタクリルアミド結合固定相 (Daicel DCpak PTZ) の炭水化物異性体分離能力を体系的に評価した。4 つの主要なヘキソース (グルコース、マンノース、ガラクトース、フルクトース)、5 つの主要なペントース (リボース、リブローース、キシロース、キシルローース、アラビノース)、および 5 つの最も重要な二糖類 (マルトース、セロビオース、ラクトース、スクロース、トレハロース) を単一炭水化物標準として分析した。順方向() および逆方向() のアノマー化の速度定数および対応するエネルギー障壁を計算した。アノマー化のエネルギー障壁は 298 K で約 83~91 kJ mol⁻¹ の範囲にあり、順反応() と逆反応() の差は通常 1~3 kJ mol⁻¹ であった。最終的に、勾配溶出モードの PTZ を使用した HILIC-ESI-MS(/MS) による 14 種類の炭水化物すべての同時分析の条件を選択することができた。炭水化物異性体選択的 LC (PTZ を使用)、タンデム MS (炭水化物グループ選択的 MS1 およびいくつかの種特異的な SRM 遷移を使用)、および単純なデコンボリューション戦略の組み合わせにより、二糖を除く複雑な試験混合物のすべての炭水化物の測定が可能になった。したがって、提案された方法は、HILIC-ESI-MS(/MS) による単糖および二糖のグローバルなグリコメタボロミクス プロファイリング方法に向けた一歩を示している(10.1016/j.chroma.2020.460981)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ikegami Tohru, Taniguchi Ashin, Okada Tomoyuki, Horie Kanta, Arase Syuntaro, Ikegami Yuka	4. 巻 1638
2. 論文標題 Functionalization using polymer or silane? A practical test method to characterize hydrophilic interaction chromatography phases in terms of their functionalization method	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Chromatography A	6. 最初と最後の頁 461850 ~ 461850
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chroma.2020.461850	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Taniguchi Ashin, Ikegami Tohru	4. 巻 1650
2. 論文標題 Comparison of the steric selectivity on hydrophilic interaction chromatography columns modified with poly(acrylamide) possessing different morphology	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Chromatography A	6. 最初と最後の頁 462207 ~ 462207
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chroma.2021.462207	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Taniguchi Ashin, Tamura Saki, Ikegami Tohru	4. 巻 1618
2. 論文標題 The relationship between polymer structures on silica particles and the separation characteristics of the corresponding columns for hydrophilic interaction chromatography	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Chromatography A	6. 最初と最後の頁 460837 ~ 460837
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chroma.2019.460837	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fu Xiaqing, Cebo Malgorzata, Ikegami Tohru, Laemmerhofer Michael	4. 巻 1620
2. 論文標題 Separation of carbohydrate isomers and anomers on poly-N-(1H-tetrazole-5-yl)-methacrylamide-bonded stationary phase by hydrophilic interaction chromatography as well as determination of anomer interconversion energy barriers	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Chromatography A	6. 最初と最後の頁 460981 ~ 460981
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chroma.2020.460981	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Ferri Martina, Baeurer Stefanie, Carotti Andrea, Wolter Marc, Alshaar Belal, Theiner Johannes, Ikegami Tohru, West Caroline, Laemmerhofer Michael	4. 巻 1621
2. 論文標題 Fragment-based Design of Zwitterionic, Strong Cation- and Weak Anion-Exchange Type Mixed-mode Liquid Chromatography Ligands and their Chromatographic Exploration	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Chromatography A	6. 最初と最後の頁 461075 ~ 461075
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chroma.2020.461075	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Karongo Ryan, Ikegami Tohru, Stoll Dwight R., Laemmerhofer Michael	4. 巻 1627
2. 論文標題 A selective comprehensive reversed-phase x reversed-phase 2D-liquid chromatography approach with multiple complementary detectors as advanced generic method for the quality control of synthetic and therapeutic peptides	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Chromatography A	6. 最初と最後の頁 461430 ~ 461430
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chroma.2020.461430	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 池上 亨、上中達矢、富永太郎、柳澤利紀
2. 発表標題 ポリヨウ素化ベンゼン誘導体による新規クロマトグラフィー固定相の開発
3. 学会等名 第29回クロマトグラフィーシンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tohru Ikegami, Ashin Taniguchi and Yuta Haruki
2. 発表標題 Development and Characterization of HILIC Stationary Phases Modified with Polyacrylamide Prepared by different Polymerization Methods
3. 学会等名 33rd International Symposium on Chromatography (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 谷口 亜紳、池上 亨
2. 発表標題 高親水性物質の分離を目的としたポリマーブラシ修飾型 HILIC固定相の開発
3. 学会等名 第32回クロマトグラフィー科学会議（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 谷口亜紳 池上 亨
2. 発表標題 親水性相互作用クロマトグラフィー（HILIC）の固定相における糖類分子の保持と選択性に及ぼす高分子構造の影響
3. 学会等名 第31回クロマトグラフィー科学会議
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 箕崎知里 谷口亜紳 池上 亨
2. 発表標題 HILICカラムの新規キャラクタリゼーション法の開発
3. 学会等名 第31回クロマトグラフィー科学会議
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Kazuhiro Kimata, Eisuke Kanao, Takuya Kubo, Kodai Kozuki, Tohru Ikegami, Masahiro Furuno, Koji Otsuka, Nobuo Tanaka	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Taylor & Francis	5. 総ページ数 34
3. 書名 Advances in Chromatography Volume 57	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------