

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：14303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010-2012

課題番号：22550074

研究課題名(和文) 液体クロマトグラフィーによる生体由来高親水性化合物の超高性能分離法の開発

研究課題名(英文) Development of HPLC separation system of bio-based highly hydrophilic compounds with ultrahigh separation efficiencies.

研究代表者

池上 亨 (IKEGAMI TOHRU)

京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・准教授

研究者番号：20301252

研究成果の概要(和文)：親水性相互作用クロマトグラフィー(HILIC)固定相の親水性や部分構造の選択性について分離特性を横断的に評価する方法を開発した。シリカモノリスカラム上でラジカル重合を施し、シリカモノリスを親水性のポリマーでコートする方法を確立した。重合時のモノマー濃度を調整して、高親水性化合物の保持を段階的に向上することができた。市販のカラムを上回る非常に大きい親水性の保持、1mのカラムによる高性能分離を実現した。

研究成果の概要(英文)：Characterization method for hydrophilic interaction chromatographic stationary phases, based on hydrophilicity and selectivity for partial structure of analytes was developed. Using radical polymerization, functionalization method of monolithic silica columns was established. We could increase hydrophilic retention of highly polar compounds, by controlling monomer concentration of polymerization process. Significantly higher hydrophilicity and higher separation efficiency compared to commercially available HPLC columns were realized.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：分離化学・有機化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：(1) HPLC (2) シリカモノリス (3) 重合修飾 (4) 高親水性化合物 (5) 高性能分離

1. 研究開始当初の背景

親水性相互作用クロマトグラフィー(HILIC)は、アセトニトリル-水系の移動相と、それに比べて極性の高い固定相を用いる液体クロマトグラフィーであり、高親水性化合物の分離に適した手法である。HILICの用語が提唱された1990年代は、年間10報程度の論文が報告されるだけの分

野であった。2000年に双性イオン型の固定相が発売されると発表数が増え始め、2008年にミルクにメラミンが混入される事件が発覚してから急激に注目を集めるようになった。この年以降は毎年200報程度が報告され、今やクロマトグラフィーを扱う人の25%程度はHILICを扱っているという推測もある。

研究開発当初の状況は、5ミクロンの粒子が充填されたカラムが市販され、ようやく3ミクロンの粒子の発売が始まったところであった。理論段高で7~20ミクロン程度のカラムが入手できる状況下で、糖の異性体のように親水性の程度が非常に似ており、かつ構造の差異も少ないものを分離するにはまだ性能面で不十分であると言わざるを得ない状況であった。

本研究では、シリカモノリスカラム上に重合修飾によって親水性官能基を修飾し、長いカラムを用いた高理論段数の分離を可能にすることで、粒子充填型カラムの性能を上回る分離媒体の創成を目標とした。ただし、分離特性の評価において、いまだ定まった特性解析法がなかったため、このテスト法の決定も行なうことになった。

2. 研究の目的

本研究は、グリコーン解析およびメタボローム解析の発展に寄与する、超高性能の親水性相互作用型およびイオン交換型キャピラリーHPLC用カラムを調製し、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システムを構築することが目的である。具体的には、(1)シリカモノリス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、最適な修飾条件を精査する(2)カラムの理論段高5~10ミクロン、理論段数50万段を発生させるHILIC型、WCX型、WAX型カラムを調製する(3)重合によってどの程度の鎖長の高分子鎖がシリカ上に生成しているか解析し、この分子量と分離性能の相関を検討する(4)(3)で得られた知見をカラム調製の条件にフィードバックし、より良い性能のカラムを作成する(5)疾病のバイオマーカーとなる糖や核酸類縁体の分離分析法の基礎的技術を確立する、などが挙げられる。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、高親水性の小分子化合物の分離、検出、定量の超高性能化、高速化はグリコーン解析およびメタボローム解析の発展に多大な寄与を及ぼすと考える。このような分離・分析媒体を開発することが本研究課題の目的である。

3. 研究の方法

(1)カラムテスト法の開発

検討に用いたカラムは以下の通りである。特に表記しない場合、カラムサイズは150×4.6mmである。カッコ内に充填剤の粒子径を示した。アミド型 Amide-80 (3 μm および 5 μm); XBridge Amide (3.5 μm); 双性イオン型 ZIC-HILIC (3.5 μm および 5 μm); Nucleodur-HILIC (3 μm); アミン型 COSMOSIL HILIC (5 μm), NH₂-MS (5 μm); (5 μm); ポリスクシンイミド型

PolyHYDROXYETHYL A (3 μm, 100×2.1 mm) PolySULFOETHYL A (3 μm, 100×2.1 mm); 水酸基型 CYCLOBOND I (5 μm, 250×4.6 mm); LiChrospher 100 Diol; 未修飾シリカ型 Halo HILIC (2.7 μm); Chromolith Si (100×4.6 mm)。移動相に CH₃CN : NH₄O₂CCH₃ buffer (20 mM, pH = 4.7) = 90 : 10 を用い、30°Cで分離を行なった。移動相線速度が1 mm/secになるように流速を調整した。主に0.5 mL/minの流速であった。

①親水性の程度 使用した緩衝液中でイオン種の存在率が小さいウリジン(U)を標準サンプルに用い、この保持係数 $k(U)$ を親水性の指標とした。 $k(U)$ は 0.70~4.58 の値を示した。

②メチル基および水酸基に対する選択性 5-メチルウリジン(5mU)および 2'-デオキシウリジン(2dU)の保持係数 $k(5mU)$ および $k(2dU)$ を $k(U)$ に対して選択性を検討し、それぞれ $\alpha(CH_2)$, $\alpha(OH)$ とした。 $\alpha(CH_2)$ は 1.00~2.13、 $\alpha(OH)$ は 1.12~1.71 の値を示した。

③立体異性体間の選択性 アデニン(A)と、アデニンのリボース部がアラビノースになったビダラビン(V)の保持係数 $k(A)$ および $k(V)$ について選択性を取り、 $\alpha(V/A)$ とした。これは水酸基の向きの選択性を記述し、1.16~1.51 の値を示した。また 2'-および 3'-デオキシグアノシン(2dG, 3dG)について同様の評価を行い、水酸基の位置による選択性 $\alpha(2dG/3dG)$ を評価した。この値は 1.03~1.12 であり、この条件下では分離困難な異性体であることが示された。

④固定相表面の酸-塩基状態の評価 テオプロミン(Tb, pKa = 10)とテオフィリン(Tp, pKa = 8.6)について、 $\alpha(Tb/Tp)$ を評価したところ、酸性の固定相では $\alpha(Tb/Tp) > 1$ 、中性の固定相では $\alpha(Tb/Tp) \approx 1$ 、塩基性の固定相では $\alpha(Tb/Tp) < 1$ であることが明らかになった。塩基性のカラムを平衡化する際のコンディショニングが終了した指標として利用可能である。

⑤静電相互作用の程度 アニオン種として p-トルエンスルホン酸ナトリウム(SPTS)、カチオン種として塩化トリメチルフェニルアンモニウム(TMPAC)を用い、それぞれの保持係数を $k(U)$ で除して $\alpha(SPTS/U)$ および $\alpha(TMPAC/U)$ を得た。 $\alpha(SPTS/U)$ はアミノ基を有する固定相で 2.8~7.5 の値を示した他は 0 に近い値を示した。カチオン交換性の高い固定相では、SPTS は静電反発によりトルエンより早く溶出した。一方 $\alpha(TMPAC/U)$ はアミノ基を有する固定相では 0 付近、化学修飾型の固定相で 1.18~7.66、未修飾シリカ固定相では 43.86、65.27 と大きな値を示した。これは残存シラノール基のカチオン交換性に基づく相互作用と解釈され、エンドキャップの密度が

高い固定相では 1.18 と小さな値を示した。

(2)HILIC 型シリカモノリスカラムの調製と特性評価

キャピラリー中に調製したシリカモノリスカラムにアンカーとして 3-メタクリルアミドプロピルトリエトキシシランを結合した。ここへラジカル重合開始剤（過硫酸アンモニウム）を含むメタクリレートモノマー溶液を充填し、加熱によるカラム内重合反応でカラムの官能基化を行った。この手法で、アミノ基、カルボキシル基、アミド基、スルホン酸、スルホベタイン構造をもつ HILIC 型カラムを調製し、上記のカラムテスト法による評価を行った。移動相は $\text{CH}_3\text{CN}-\text{NH}_4\text{O}_2\text{CCH}_3$ buffer (pH = 4.6, 20 mM in aqueous portion) に固定した。

(3) アクリルアミドを重合した HILIC 型固定相の開発

①アンカーの結合

直径 5 μm 、細孔径 120 \AA の乾燥シリカゲル 23 g をトルエン 100 mL に分散し、3-メタクリルアミドプロピルトリエトキシシラン (MAS) 18 g とピリジン 4.7 g およびヒドロキノン 0.1 g を加えて 14 時間加熱還流した。シリカ粒子を分別し、トルエンで洗浄した後、同様の操作をもう一度繰り返して、重合用のアンカーとして MAS を結合したシリカゲルを得た。

②ポリアクリルアミドの結合とカラム作成

上記の MAS シリカ (700 mg)、アクリルアミド (280 mg) 過硫酸アンモニウム (26 mg) を水 5 mL に分散し、60°C で 1 時間加熱攪拌した。シリカ粒子をろ別し、水、メタノール、アセトンで順次洗浄し、内径 3 mm 長さ 100 mm のステンレス製カラムに充填した。反応条件を一定にし、アクリルアミドの量だけを 180、360、430 mg に変えたものも調製した。360 mg 以上のアクリルアミドを用いた場合は水によるシリカ粒子の洗浄は困難であったため、ポリアクリルアミドの溶解性の向上を期待して合成と洗浄にリン酸バッファー (50 mM) を用いた。

4. 研究成果

(1)カラムテスト法の開発

この内容は雑誌論文の④に報告した。検査項目を 9 種設定したため、9 角形のレーダー図として表現することが可能になった。この方法により、各固定相の選択性、親水性、イオン交換性などを横断的に評価することが可能になった。また、この特性評価の際に得られた保持に関する項目を主成分解析によって解析したところ、未修飾シリカ、アミン結合型、アミド結合型、中性官能基結合型の

各グループに分けることができた。

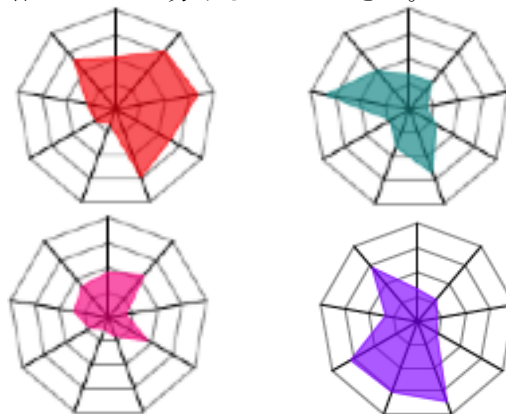


図1 レーダープロットの例

この方法により、各固定相の選択性、親水性、イオン交換性などを横断的に評価することが可能になった。また、この特性評価の際に得られた保持に関する項目を主成分解析によって解析したところ、未修飾シリカ、アミン結合型、アミド結合型、中性官能基結合型の各グループに分けることができた。簡単なテストサンプルを分離するだけで固定相のマッピングが可能になったため、新規固定相の作成とその評価が容易になった。

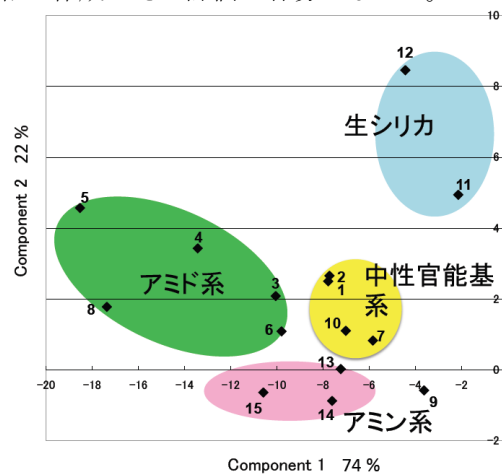


図2 固定相のマッピングの例

(2)HILIC 型シリカモノリスカラムの調製と特性評価

親水性の程度を表すウラシル(U)の保持 $k(U)$ 、2'-デオキシウリジン(2dU)、5-メチルウリジン(5MU)の保持 $k(2dU)$ 、 $k(5MU)$ から OH と CH_2 に対する選択性を見積もった。同様にアデノシン(A)-ビダラビン(V)の保持 $k(A)$ 、 $k(V)$ から OH の位置異性体の選択性を見積もった。またテオブロミン(Tb)-テオフィリン(Tp)の保持 $k(Tb)$ 、 $k(Tp)$ から固定相表面の酸性-塩基性の状態を見積もった。他にも 2'/3'-デオキシグアノシ

ン、 α/β -ニトロフェニルグルコシド、スルホン酸塩、アンモニウム塩等を用いて構造選択性、イオン交換選択性などを検討した。親水性の尺度 $k(U)$ の値は、市販のカラムで 0.31~4.58 であり、モノリス型カラムではどれも小さい値が得られた。シリカモノリスは相比が小さいためこの点では不利である。ただし選択性は粒子充填型のそれと遜色ない結果が得られ、 α/β -ニトロフェニルグルコシドに対する選択性は粒子充填型の場合より大きいこともあった。カラムの平衡化の段階で $\alpha(Tb/Tp)$ の値を追跡すると、固定相表面における pH の状態を把握することが可能になり、再現性のある測定を行なう上では有用であることが示された。

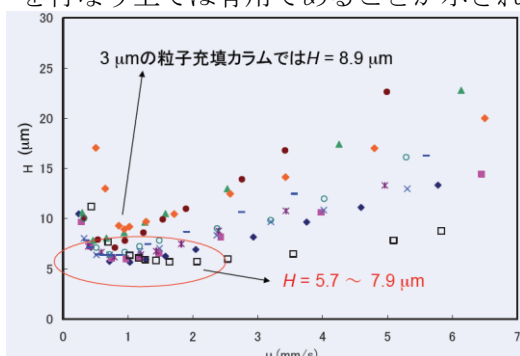


図3 H-u プロットの例

調製したシリカモノリスカラムの分離性能の流速依存性を測定したところ、図3に示すように最適線速度においては、理論段高が 10 ミクロン以下を示した。これは 3 ミクロンの粒子充填型カラムと同等の分離性能と言えるが、同じ理論段数を得るのに必要な時間は粒子充填型の 1/2 程度であることが示された。これは高速、高性能の実現を可能にする分離特性であり、当初の目標をある程度達成したものと言える。

また、内径 100 μm 、カラム長 30 cm のシリカモノリスカラムを、同バッチから 3 本、異なるバッチから 3 本切り出し、アンカーを結合後アクリルアミドの重合修飾を同じ条件で施した。異なるバッチから調製したカラムは、ウリジン、5-メチルウリジンなどのヌクレオシドの保持が 4~7% の誤差を含むことが示された。カラムの分離性能は未修飾のシリカモノリスのそれに依存しており、修飾の前後で大きな変化は見られなかった。一方、長いモノリスカラムをカラム長 30 cm に切断したものを同様に修飾したところ、保持の誤差は 0.3% 以下に納まり、分離性能もほぼ同じものが 3 本得られた。このことから、重合修飾法による固定相の結合には高い再現性があることが示された。

(3) アクリルアミドを重合した HILIC 型固定相の開発

既報のカラムテスト法の中で、固定相ご

との変化が大きいパラメータを選んで分離特性の評価に用いた。すなわち、ウリジン(U)の保持 $k(U)$ (親水性)、OH と CH_2 に対する選択性、アデノシン(A)-ピダラビン(V)による OH の位置異性体の選択性、テオブロミン(Tb)-テオフィリン(Tp)の選択性による固定相表面の酸性-塩基性の状態、スルホン酸塩(ST)およびアンモニウム塩(AC)の選択性によるイオン交換選択性の 7 種の保持および選択性を測定した。結果を Table 1 に示す。比較対象としてアンカーのみの粒子と TSKgel Amide-80 (5 μm) の保持および選択性も示した (図 4)。

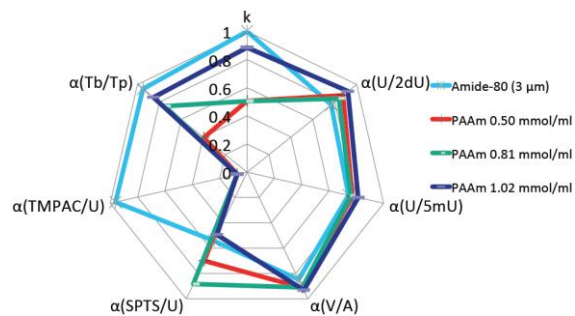


図4 アクリルアミド結合型固定相の選択性

親水性を尺度にすると、アクリルアミドを 180, 280 mg 用いたものと、360, 430 mg 用いたものの 2 つに大別できた。後者は TSKgel Amide-80 (5 μm) の親水性保持、構造選択性と同等あるいはやや上回る値を示したが、TSKgel Amide-80 (3 μm) の親水性保持 ($k(U)=4.58$) には至らなかったが、TSKgel Amide-80 (5 μm) の保持とはほぼ同等であった。MAS のみ修飾したシリカに比べて、重合液中のアクリルアミド濃度が高いものほど親水性も OH と CH_2 に対する選択性も高くなることが示された。

(4) 新規 HILIC 固定相の開発

アクリルアミドによる重合修飾の方法を、他のモノマーにも転用した。各種のメタクリレート系モノマーを用いたカラムを作成、評価したところ、あるモノマー (特許申請中につき、具体的に表現しない) の重合修飾によって、極めて親水性保持の高い固定相の作製に成功した。

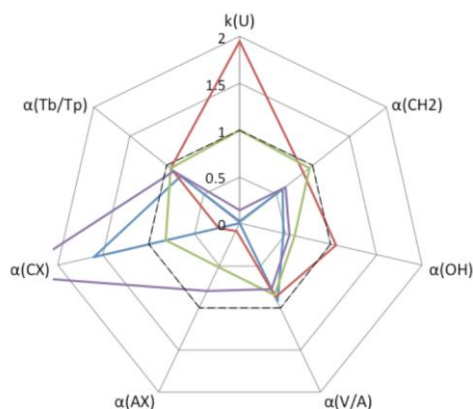


図5 新規モノマー結合型固定相の選択性

図5にはそのレーダー図を示したが、赤線で示した新規モノマーのグラフは、市販のカラムで最も親水性の高いカラム（緑線）の2倍の親水性保持を発現した。これは構造が類似した対象物質の精密分離には有利な特性であり、今後の検討が興味深い知見を与えることが予測される。

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7件）

- ① Horie, Kanta; Sato, Yoshiaki; Kimura, Takayuki; Nakamura, Tatsuji; Ishihama, Yasushi; Oda, Yoshiya; Ikegami, Tohru; Tanaka, Nobuo, Estimation and optimization of the peak capacity of one-dimensional gradient high performance liquid chromatography using a long monolithic silica capillary column, *Journal of Chromatography A*, 査読有り, 1228, 2012, 283-291. 10.1016/j.chroma.2011.12.088
- ② Ghanem, Ashraf; Ikegami, Tohru; Tanaka, Nobuo, New silica monolith bonded chiral (*R*)- γ butyrolactone for enantioselective micro high-performance liquid chromatography, *Chirality*, 査読有り, 23(10), 2011, 887-890. 10.1002/chir.21004
- ③ Ghanem, Ashraf; Ikegami, Tohru, Recent advances in silica-based monoliths: Preparations, characterizations and applications, *Journal of Separation Science*, 査読有り, 34(16-17), 2011, 1945-1957. 10.1002/jssc.201100086
- ④ Kawachi, Yuusuke; Ikegami, Tohru; Takubo, Hirotaka; Ikegami, Yuka; Miyamoto, Masatoshi; Tanaka, Nobuo, Chromatographic characterization of hydrophilic interaction liquid chromatography stationary phases: Hydrophilicity, charge effects, structural selectivity, and separation efficiency, *Journal of Chromatography, A*, 査読有り, 1218(35), 2011, 5903-5919. 10.1016/j.chroma.2011.06.048
- ⑤ Miyazaki, Shota; Takahashi, Masakazu; Ohira, Masayoshi; Terashima, Hiroyuki; Morisato, Kei; Nakanishi, Kazuki; Ikegami, Tohru; Miyabe, Kanji; Tanaka, Nobuo, Monolithic silica rod columns for high-efficiency reversed-phase liquid chromatography, *Journal of Chromatography, A*, 査読有り, 1218(15), 2011, 1988-1994. 10.1016/j.chroma.2010.11.032
- ⑥ Jemale, Alia Sofie; Jaafar, Jafariah; Watanabe, Yuta; Ikegami, Tohru; Tanaka, Nobuo, Mixed-mode monolithic silica as a chromatographic separation medium, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 査読有り, 34(7), 2011, 500-510. 10.1080/10826076.2011.556969
- ⑦ Iwasaki, Mio; Miwa, Shohei; Ikegami, Tohru; Tomita, Masaru; Tanaka, Nobuo; Ishihama, Yasushi, One-dimensional capillary liquid chromatographic separation coupled with tandem mass spectrometry unveils the *Escherichia coli* proteome on a microarray scale, *Analytical Chemistry*, 査読有り, 82, 2010, 2616-2620.

10.1021/ac100343q

〔学会発表〕（計 8 件）

- ① Tohru Ikegami, Monolithic silica columns for HPLC separation media, International Symposium on Functional Materials Based on Silicon-Oxygen Systems (招待講演), 2012年09月25日, Tokyo
- ② Tohru Ikegami, Yuusuke Kawachi, Nobuo Tanaka, Preparation and Characterization of HILIC Type of Monolithic Silica Columns, 38th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, 2012年06月20日, Anaheim, CA, USA
- ③ 池上 亨, 伊東和輝, 宮本真敏, アクリルアミドを重合したHILIC型固定相の開発と分離特性, 第19回クロマトグラフィーシンポジウム, 2012年05月25日, 八王子市
- ④ 池上 亨, HILIC 型シリカモノリスカラムの調製と再現性評価, 第 22 回クロマトグラフィー科学会議, 2011 年 10 月 21 日, 仙台市
- ⑤ Tomoyuki Okada, Tohru Ikegami, Nobuo Tanaka, Study of retention mechanism in HILIC in terms of deuterium isotope effect, 36th International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separation and Related Techniques, 2011年06月22日, Budapest, Hungary
- ⑥ Tohru Ikegami, Yusuke Kawachi, Hirota Takubo, Masatoshi Miyamoto, Nobuo Tanaka New Test Method for Chromatographic Characterization of Hydrophilic Interaction Chromatography (HILIC) Stationary Phases, 36th International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separation and Related Techniques, 2011年06月20日, Budapest, Hungary
- ⑦ 池上 亨, 河内佑介, 田窪宏貴, 宮本真敏, 田中信男, HILIC型シリカモノリスカラムの調製と特性評価, 第18回クロマトグラフ

ーシンポジウム, 2011年06月03日, 福岡市
⑧ 池上 亨, 河内佑介, 田窪宏貴, 宮本真敏, 田中信男, HILIC型カラムのテスト法開発, 第21回クロマトグラフィー科学会議, 2010年10月23日, 西宮市

〔図書〕（計 2 件）

- ① Oscar Núñez and Tohru Ikegami, Preparation and properties of various types of monolithic silica stationary phases for reversed-phase, hydrophilic interaction, and ion-exchange chromatography based on polymer-coated materials., “Monolithic Silicas in Separation Science”, K. K. Unger, N. Tanaka, E. Machtejevas ed. Wiley-VCH, 2011, 35–45.
- ② Takeshi Hara, Kosuke Miyamoto, Satoshi Makino, Shohei Miwa, Tohru Ikegami, Masayoshi Ohira, Nobuo Tanaka, High-speed and high-efficiency separations by utilizing monolithic silica capillary columns., “Monolithic Silicas in Separation Science”, K. K. Unger, N. Tanaka, E. Machtejevas ed. Wiley-VCH, 2011, 249–272.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池上 亨 (IKEGAMI TOHRU)

京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・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：