

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2014

課題番号：23245018

研究課題名(和文)異方性ハイブリッドゲル薄膜を有機相とする高次機能化HPLC分離剤の開拓

研究課題名(英文)Preparation of unique organic phases for high molecular recognitive HPLC

研究代表者

伊原 博隆 (Ihara, Hirotaka)

熊本大学・自然科学研究科・教授

研究者番号：10151648

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 37,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ゲスト分子との弱い相互作用を効果的に増幅し、多重相互作用によって高い選択性を示す分子形状識別型の液体クロマトグラフィ用分離剤の開発を目指した。具体的には、(1)選択性が限定される生体分子や環状超分子のような既製の分子認識剤を使用せず、(2)直鎖状高分子鎖上にカルボニル基や共役系グループを規則的に配列させることによって、また、分子配向によって2次構造を形成する分子を有機相として用いた。結果として、ゲスト分子との多重相互作用が促進され、選択性の増幅・変換・制御を可能とする様々な分離剤の開発が可能となった。研究成果の大部は、分析化学系の国際雑誌を中心に、28報で報告した。

研究成果の概要(英文)：In this research project, we have targeted to create a new class of molecular recognitive materials for high performance liquid chromatography. For this purpose, we did not use any biomaterial and supramolecular cyclic compound as a molecular recognitive moiety, but rather selected a linear polymer because we considered for controlling the selectivity through molecular design. In concrete terms, we have designed unique organic phases based on integration of weak interaction groups such as a carbonyl group and a pi-electron-rich moiety on a polymer chain. As a result, we have developed various organic phases indicating high selectivities for isomers having chemically similar properties, and then these main results have been published as 28 international journal papers.

研究分野：高分子機能材料

キーワード：液体クロマトグラフィ 分子形状識別 自己組織化 界面・界面物性 ポリイオン液体

1. 研究開始当初の背景

複雑な混合物系から迅速かつ精密に有用物質を分離精製する技術を追求することは、分析化学が担う普遍的な使命であり、今なお、分離技術の継続的な革新が求められている。中でも液体クロマトグラフィ(HPLC)に代表されるカラム分離システムは、簡便に精密分離できる手法として活用されているが、拡大する物質の多様性に対応しきれていない。

一方、生体システムには、酵素反応系や情報伝達系、免疫系など、多彩で高効率な分子認識システムが集積されており、このようなシステムを次世代型分離化学へ展開することは当然の研究トレンドとなっている。しかしながら、現状は、酵素や抗体のような生体分子、あるいは合成環状超分子を担体上に直接固定化するものがほとんどである。

このような背景の下、本研究グループでは、既存の生体分子や環状超分子を直接利用しない、独自の着眼点で高い選択性の発現を探索してきた。すなわち、有機相を鎖状高分子とし、ゲスト分子との相互作用点を一次構造上に集積ならびに配向制御することにより、選択性を増幅するという特異な立場をとってきた。その一例として、カルボニル基やピリジル基、マレイミド基のような単純な官能基を鎖状高分子によって集積することにより、環状超分子であるポルフィリン固定化物より優れた分子形状識別能を発現させることに成功している。

2. 研究の目的

本研究は、ゲスト分子との弱い相互作用を効果的に活用し、高い選択性を示す分子形状識別型の液体クロマトグラフィ(HPLC)用分離剤の開発を目指した。具体的には、

- (1) 選択性が限定される生体分子や環状超分子のような既製の分子認識剤を使用せず、
- (2) カルボニル基や π 共役系グループを規則的に配列させることによって、ゲスト分子との多重相互作用を促進し、結果として選択性の増幅・変換・制御の原動力とした。
- (3) また、有機相の機能を有効に発揮するための物理界面の設計・構築にも踏み込んで検討した。

3. 研究の方法

高い選択性を発現するための仕組みとして、相互作用点(カルボニル基や π 共役系側鎖等)を一次的に配向させる分子ユニットを設計し(一次構造の設計)、機能増幅のための仕組み(異方性二次構造化)を導入する。

図1(上図)には、一次構造および二次構造化によって相互作用点を配列させるための候補デザインとして、交互共重合体やポリペプチド、ポリオン液体アナログの構造を示している。また、その他の有望な手法として、低分子の配向集合によって生じる超分子ゲルシステム(図1下図)についても有機相の候補とした。

機能設計された一次構造および二次構造体を合成し、既存の手法を準用して多孔質シリカに

固定化した。ステンレスカラム等に充填してHPLC用カラムを作製し、分離機能を逆相モード、純相モード、および親水性相互作用(HILIC)モードによって評価した。

本研究では、有機相の設計・合成・HPLCへの適用だけでなく、物理的な界面増強法の検討も併行して行った。

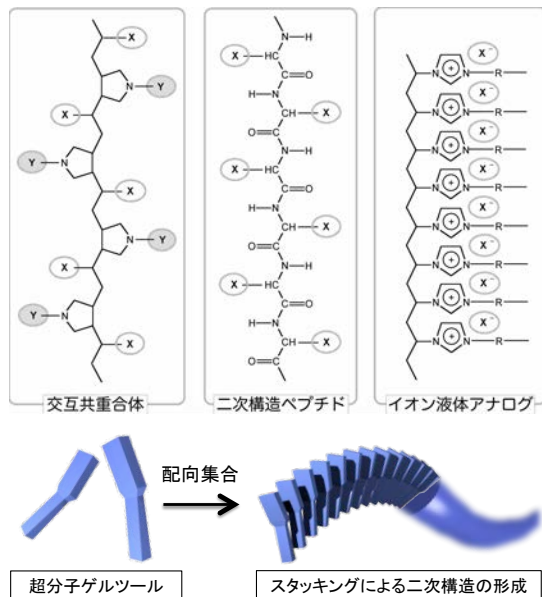


図1 分子認識型HPLCを実現するための有機相に関する基本デザイン

4. 研究成果

(1) 特異な物理界面の構築・制御に関する研究

HPLCにおける選択性は主に固定化された有機相の機能に依存するのに対し、分解能については、固定相の物理界面構造が影響を与える。本研究では、従来の分離剤にはない特異な物理界面を形成する手法についても探索した。

図2は、球状のポリスチレン粒子をシリカ微粒子の存在下で超臨界CO₂中において加熱処理して得られる複合微粒子の走査型電子顕微鏡(SEM)写真を示している。シリカ微粒子がポリスチレン微粒子の界面にほぼ細密充填されており、また、これを超音波処理することにより、シリカ粒子が脱落することによって均質なディンプル形状を有するポリスチレン粒子が可能であることを確認した。同法は、シリカ微粒子に限定されず、たとえばナノダイヤ粒子やセリア粒子などにも適用できることも確認している。

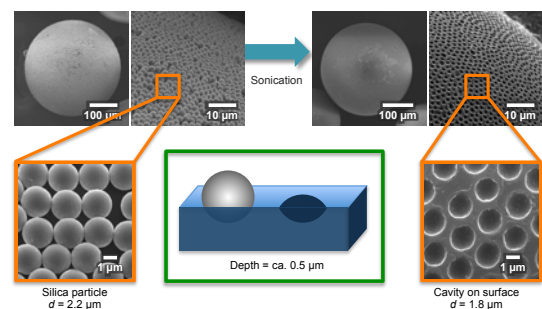


図2 超臨界CO₂を利用する有機・無機コア・シェル粒子の製造

(2) 超分子ゲル形成ツールを有機相とする分離剤の開発について

本研究室では、グルタミン酸誘導体が水あるいは有機溶媒中で繊維状に会合し、ゲルを形成することを報告してきた。このグルタミン酸誘導体に官能基を導入すると、官能基間の特異な分子配向により、単独では生成しない超分子的な機能の発現することを見いだしてきた。本研究では、この知見をもとに、図3のような超分子ゲル形成ツールを新たに開発し、これらをシリカ粒子に固定化することによって、新規なHPLC分離剤の開発を目指した。

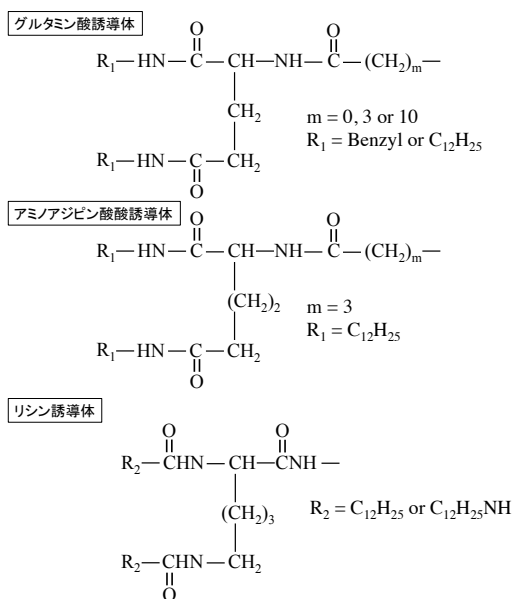


図3 アミノ酸をベースとした超分子ゲル形成能を有する分子

図3で示した分子のほとんど ($R_1 = \text{Benzyl}$ 以外) はゲルを形成しやすい分子材料であり、これらをシリカに固定化することによって特異な選択性を示すHPLCが可能となった。結果の一部を要約すると、

(a) グルタミン酸誘導体を固定化した分離剤では、導入したスペーサー (m) の構造が選択性に著しく影響を与えることを明らかにした。たとえば、図4に示すように、ビタミンDとビタミンE (トコフェロール) の混合物の分離では、スペーサー長が長いグルタミン酸誘導体でのみベースライン分離が可能となった。おそらく、グルタミン酸誘導体がシリカ上で配向することにより、スペーサー部位周辺でゲスト分子を取り込みやすい分子ポケットを形成しているものと推察した。

(b) アミノアジピン酸は、グルタミン酸と酷似したアミノ酸であるが、HPLCにおける選択性は、いずれも市販の単純疎水化シリカより高い選択性を示す一方で、ゲスト分子の形状に対してそれぞれ特異な選択性を示した。図5はその一例を示している。分子の平面性 (多環芳香族) に対する選択性はアミノアジピン酸誘導体で高くなるが、鎖状化合物 (トコフェロール) に対してはグルタミン酸誘導体において高い選択性が得られた。この差は、メチレン鎖わずか1個の差によって得

られたものであり、従来の分離剤では観察し得ない結果である。すなわち、有機相の分子配向が一次構造を超えた作用をひき出していることを示している。

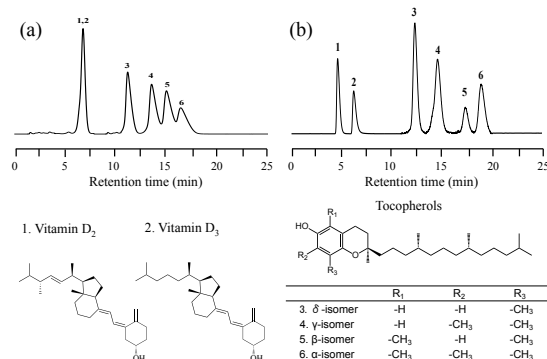


図4 グルタミン酸誘導体を有機相とする分離クロマトグラムの一例 (a: $m = 0$, $R_1 = C_{12}H_{25}$, b: $m = 10$, $R_1 = C_{12}H_{25}$)

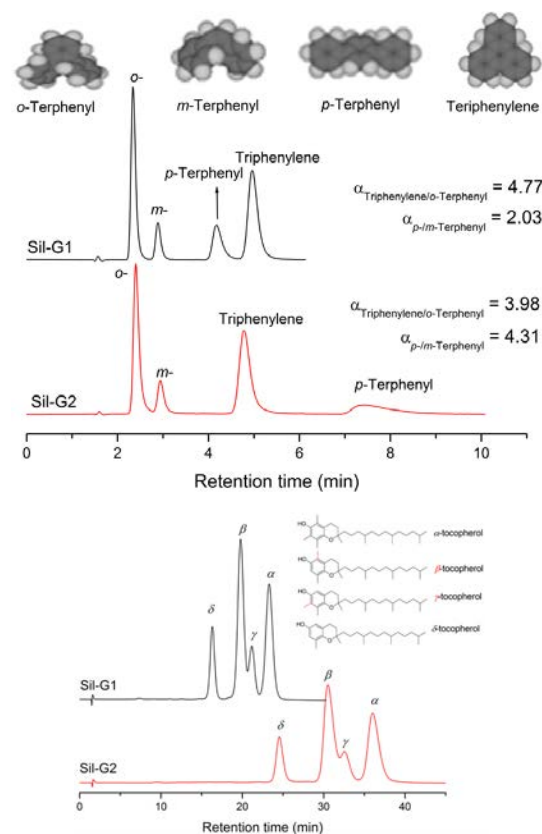


図5 グルタミン酸 (G1) 誘導体とアミノアジピン酸 (G2) 誘導体の比較

(c) リシン誘導体では、長鎖アルキル基の導入方法 (アミド結合と尿素結合) の影響について調査した。図6に示すように、尿素結合型の誘導体において高い分子平面性識別能が確認された。また、ビナフトールに対する光学分割能についても、尿素結合型誘導体でのみ明確な選択性が確認された。ゲル形成能が尿素型誘導体において高いことが確認されているので、分子間水素結合に基づく分子配向状態が選択性を決定する要因の一つとなっていることを裏付ける結果となった。

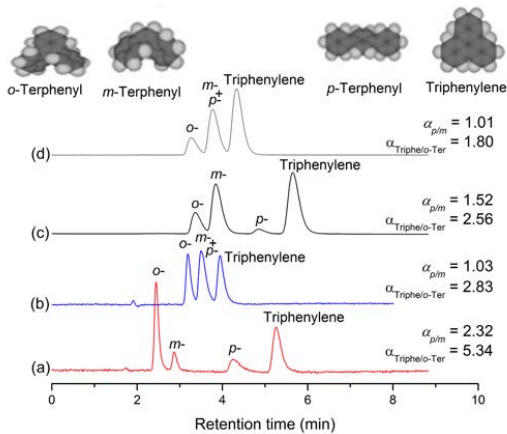


図6 リシン誘導体を有機相とする分離クロマトグラムの一例 (a:尿素型, b:アミド型, c:市販のC₃₀有機相, d:市販のC₁₈有機相)

(3) ポリイオン液体アナログを有機相とする分離材の開発について

本研究室では、今までに、イオン液体の性質を有する低分子をポリマー化し、これをシリカに固定化することによって特異な選択性を発現させてきた。本研究では、図7に示すように、カチオン成分とアニオン成分の導入法について詳細に検討し、特異な選択性の発現を目指した。

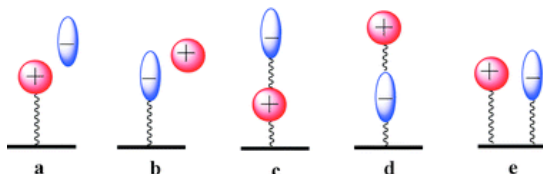


図7 HPLC用有機相としての多様なポリイオン液体アナログ

図7において、タイプaとbでは、対イオンの交換により選択性がチューニングできる利点がある反面、移動相の種類によっては容易に対イオンが溶出する問題があった。タイプc、d、eはこの問題を解決する方法であり、とくにタイプeはモノマーの組合せによって容易に化学構造を変化させることができる点で有用な構造である。

図8に、タイプeの具体的な作製方法を示している。アラニンをアクリロイル化することにより、アニオン性モノマーを作製した。ベースイオン液体としては、アリルイミダゾールオクタデシル基で4級化したものを利用し、この両者からなるイオン対の共重合を、シリカ表面からのグラフト重合によって実施した。得られたポリイオン液体アナロググラフトシリカをステンレスカラムに充填し、多環芳香族やステロイド、核酸塩基等をゲスト分子としてHPLC性能を調査した。いずれの場合も、従来の疎水化シリカとは異なる選択性や分離モードが得られることが明らかになった。図9に高い選択性の一例を示している。このクロマトグラムは、移動相に純水を利用(親水性相互作用:HILIC)して得られたものであり、ここで開発された分離剤が、逆相モードからHILICモードに渡る広範囲の分離モードで利用できることも明らかにした。

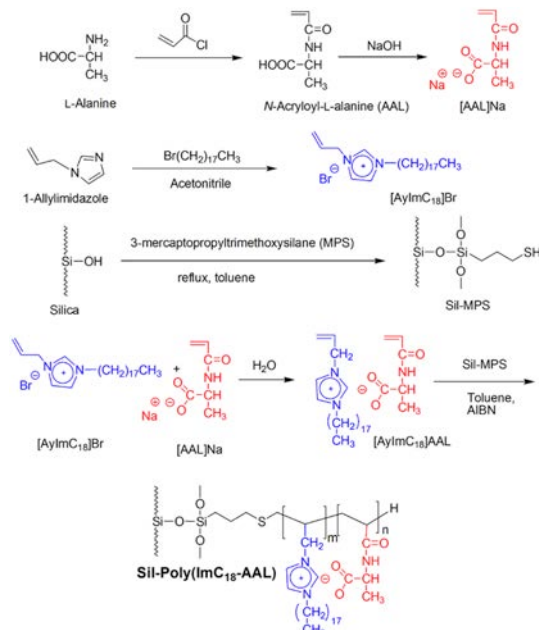


図8 有機相としてのコポリマー型ポリイオン液体アナログの合成スキーム

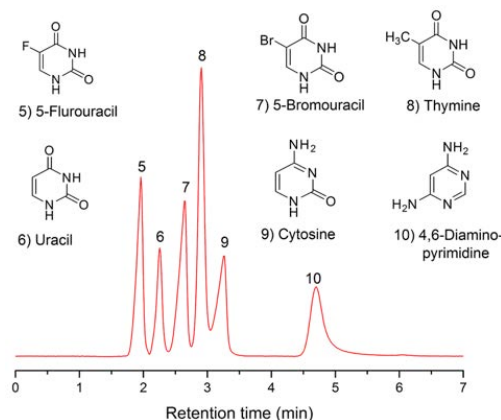


図9 コポリマー型ポリイオン液体アナログを有機相とするHILIC(移動相:純水)

(4) 極性ポリマーを有機相とするHPLC分離剤の開発

HPLCでは、一般に非極性物質に対しては逆相モード(移動相が極性溶媒を用いる)で、また極性物質に対しては順相モード(移動相が非極性溶媒)が適用されてきたが、近年、極性物質に対して極性溶媒(主に水溶液)を用いるHILICモードが注目されている。本項では、複数のモードで利用可能な新規な有機相について紹介する。

(a) スルホアズベンゼンを官能基とする分離剤

図10に示す合成スキームにより、アズベンゼンの末端にスルホン酸基を有する有機相を作製し、逆相モードでの分離能を調査した。図11はその代表的な分離クロマトグラムを示している。構造が極めて類似したステロイドに対して、短時間で完全分離が達成されている。市販の単純疎水化した分離剤より優れた分離能が得られていることが分かる。なお、同分離剤は、核酸塩基類に対して、HILICモードにおいて優れた選択性が得られることも確認している。

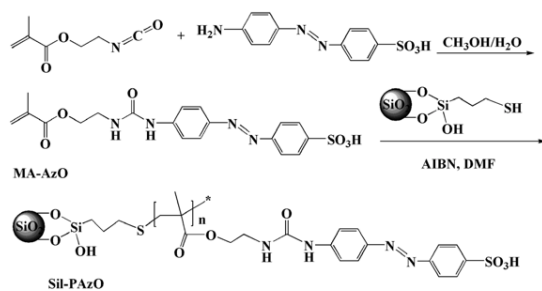


図10 スルホアゾベンゼンを有機相とするHILIC分離剤の合成スキーム

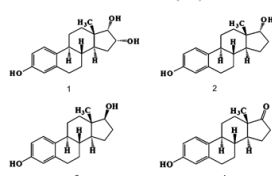
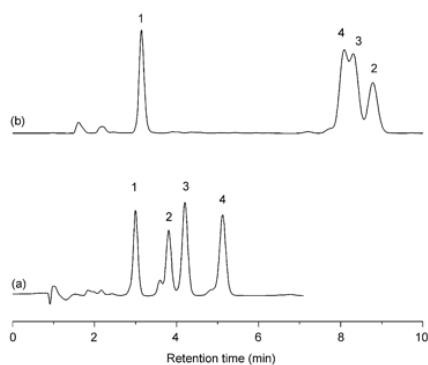
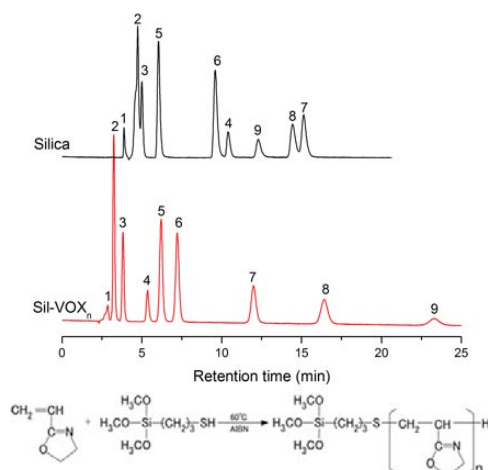


図11 逆相モードでのステロイドの分離クロマトグラム。(a)スルホアゾベンゼン有機相、(b)市販のODS

(b)非イオン性かつ極性の高い有機相の開発

HILICモードでの利用を念頭に、非イオン性かつ極性の高い新規な有機相の開発を目指し、ポリビニルオキサゾリンをグラフト化したシリカを作製した。

図12 ポリ(ビニルオキサゾリン)を有機相とする



HILICモードでの分離 (1) 5-iodouracil; (2) thymine; (3) uracil; (4) 4,6-diaminopyrimidine; (5) uridine; (6) adenosine; (7) cytosine; (8) cytidine; (9) guanosine.

図12のクロマトグラムを示すように、HILICモードにおいて、各種の核酸塩基がベースライ

ン分離可能となっている。溶離順がベースシリカと異なることから、イオン性相互作用ではないことを示しており、極性有機相として今後の展開が期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計28件)

①L-Lysine derived organogelator-based chiral stationary phase for mixed-mode liquid chromatography; *Anal. Methods*, Vol.7, pp.3320-3323, 2015, 査読有; A. K. Mallik, H. Ihara ほか2名

②Effects of substitution groups of glutamide-derived molecular gels on molecular shape recognition; *J. Chromatogr. A*, Vol.1392, pp.56-62, 2015, 査読有; M. Takafuji, H. Ihara ほか2名

③Homogenous formation, quaternization of urea-functionalized imidazolyl silane and its immobilization on silica for surface-confined ionic liquid stationary phases; *RSC Adv.*, Vol.4, pp.34654-34658, 2014, 査読有; A. K. Mallik, M. Takafuji, H. Ihara ほか3名

④Preparation and chromatographic evaluation of new branch-type diamide-embedded octadecyl stationary phase with enhanced shape selectivity; *Anal. Chim. Acta*, Vol.833, pp.48-55, 2014, 査読有; A. K. Mallik, H. Ihara ほか4名

⑤Highly hydrophilic and nonionic poly(2-vinyl oxazoline)-grafted silica: A novel organic phase for high-selective hydrophilic interaction chromatography; *Anal. Bioanal. Chem.*, Vol.406, pp.4585-4593, 2014, 査読有; A. K. Mallik, M. Takafuji, H. Ihara ほか3名

⑥Copolymer-grafted silica phase from a cation-anion monomer pair for enhanced separation in reversed-phase liquid chromatography; *Anal. Bioanal. Chem.*, Vol.406, pp.3507-3515, 2014, 査読有; A. K. Mallik, M. Takafuji, H. Ihara ほか1名

⑦Multi-mode chromatographic evaluation of new lysine-silica stationary phase for high-performance liquid chromatography; *Anal. Methods*, Vol.6, pp.7674-7680, 2014, 査読有; M. Takafuji, H. Ihara ほか1名

⑧A new L-lysine derived high molecular-shape selective organic phase with ordered functional groups for reversed-phase liquid chromatography; *Anal. Methods*, Vol.6, pp.5459-546, 2014, 査読有; A. K. Mallik, M. Takafuji, H. Ihara ほか2名

⑨Anionic and cationic copolymerized ionic liquid-grafted silica as multifunctional stationary phase for reversed-phase chromatography; *Anal. Methods*, Vol.6, pp.469-475, 2014, 査読有; M. Takafuji, H. Ihara ほか3名

⑩Tuning of the molecular orientation of gel forming compounds and their effect on molecular-shape selectivity in liquid chromatography; *J. Chromatogr. A*, Vol.1324, pp.149-54, 2014, 査読有; A. K. Mallik, M. Takafuji, H. Ihara ほか3名

⑪A sulfonic-azobenzene-grafted silica amphiphilic material: A versatile stationary phase for mixed-mode chromatography; *Chem. Eur. J.*, Vol.19, pp.18004-18010, 2013, 査読有; M. Takafuji, H. Ihara ほか3名

⑫Peptide-based surface modified silica particles: Adsorption materials for dye-loaded wastewater treatment; *RSC Adv.*, Vol.3, pp.23664-23672, 2013, 査読有; M. Takafuji, H. Ihara ほか1名

⑬Polyanionic and polyzwitterionic azobenzene ionic liquid-functionalized silica materials and their chromatographic applications; *Chem. Comm.*, Vol.49, pp.2454-2456, 2013, 査読有; M. Takafuji, H. Ihara ほか2名

⑭Molecular Shape Recognition through Self-Assembled Molecular Ordering: Evaluation with Determining Architecture and Dynamics; *Anal. Chem.*, Vol.84, pp.6577-6585, 2012, 査読有; A. K. Mallik, T.

Sawada, M. Takafuji, H. Ihara ほか1名

⑮ A new imidazolium-embedded C18 stationary phase with enhanced performance in reversed-phase liquid chromatography; *Anal. Chim. Acta*, Vol.738, pp.95-101, 2012, 査読有; H. Qiu, A. K. Mallik, M. Takafuji, H. Ihara ほか2名

⑯ Selectivity enhancement for the separation of tocopherols and steroids by integration of highly-ordered weak interaction sites along the polymer main chain; *Anal. Bioanal. Chem.*, Vol.404, pp.229-238, 2012, 査読有; A. K. Mallik, H. Ihara ほか2名

⑰ New ionic liquid-grafted silica hybrids with enhanced selectivity and stability produced by co-immobilization of polymerizable anion and cation pairs; *Chem. Comm.*, Vol.48, pp.1299-1301, 2012, 査読有; A. K. Mallik, M. Takafuji, H. Ihara ほか2名

⑱ New peptide-silica bio-inspired stationary phase with an improved approach for hydrophilic interaction liquid chromatography; *Analyst*, Vol.137, pp.4907-4909, 2012, 査読有; M. Takafuji, H. Ihara ほか1名

⑲ Chromatographic evaluation of a newly designed peptide-silica stationary phase in reverse phase liquid chromatography and hydrophilic interaction liquid chromatography: mixed mode behavior; *J. Chromatogr. A*, Vol.1266, pp.43-52, 2012, 査読有; M. Takafuji, H. Ihara ほか1名

⑳ New poly(ionic liquid)-grafted silica multi-mode stationary phase for anion-exchange/reversed-phase/hydrophilic interaction liquid chromatography; *Analyst*, Vol.137, pp.2553-2555, 2012, 査読有; A. K. Mallik, M. Takafuji, H. Ihara ほか2名

㉑ Molecular-shape selective HPLC: Stabilization effect of polymer main chain by alternating copolymerization; *J. Chromatogr. A*, Vol.1232, pp.183-189, 2012, 査読有; A. K. Mallik, T. Sawada, M. Takafuji, H. Ihara ほか1名

㉒ Enhancement of molecular shape-selectivity by in-tube anion-exchange in poly(octadecylimidazolium) silica column for reversed-phase chromatography; *J. Chromatogr. A*, Vol.1232, pp.116-122, 2012, 査読有; A. K. Mallik, M. Takafuji, H. Ihara ほか3名

㉓ Effect of High Density Poly(Vinyl Octadecanoate) Grafted Silica Stationary Phase on Physicochemical Properties and Shape Selectivity Enhancement of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in RP-HPLC; *Sep. Sci. Tech.*, Vol.47, pp.621-629, 2012, 査読有; M. Takafuji, H. Ihara ほか1名

㉔ High molecular-shape selectivity by molecular gel-forming compounds: Bioactive and shape-constrained isomers through the integration and orientation of weak interaction sites; *Chem. Comm.*, Vol.47, pp.10341-10343, 2011, 査読有; A. K. Mallik, M. Takafuji, H. Ihara ほか1名

㉕ A facile and specific approach to new liquid chromatography adsorbents obtained by ionic self-assembly; *Chem. Eur. J.*, Vol.17, pp.7288-7297, 2011, 査読有; A. K. Mallik, H. Ihara ほか2名

㉖ Preparation of multilayered organic-inorganic hybrid core-shell particles by stepwise surface formation; *Mat. Lett.*, Vol.65, pp.1407-1409, 2011, 査読有; M. Takafuji, S. Nagaoka, H. Ihara ほか6名

㉗ Facile and versatile method for preparing core-shell microspheres with controlled surface structures based on silica particles-monolayer; *Mat. Chem. Phys.*, Vol.129, pp.871-880, 2011, 査読有; M. Takafuji, S. Nagaoka, H. Ihara ほか5名

㉘ Strategic achievement for the baseline separation of tocopherol isomers by integration of weak interaction sites on alternating copolymer; *Anal. Methods*, Vol.3, pp.1277-1279, 2011, 査読有; A. K. Mallik, M. Takafuji, H. Ihara ほか1名

[学会発表]

① Development of silica-confined ionic liquid

stationary phases for high-performance liquid chromatography; *41st Symposium of High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques*, New Orleans, Louisiana, USA 2014, 5/11-5/15; H. Qiu, A. K. Mallik, M. Takafuji, H. Ihara

② Development of novel molecular-gel forming compound-grafted silica phases for the separation of shape-constrained isomers in RP-HPLC; *Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques*, New Orleans, Louisiana, USA 2014, 5/11-5/15; A. K. Mallik, H. Qiu, M. Takafuji, H. Ihara ほか多数

[図書] (計4件)

① *Ionic Liquids in Liquid Chromatography. Handbook of Ionic Liquids*, edited by Jihoon Mun, Haeun Sim: Properties, Applications and Hazards, Nova Science Publishers, Inc., pp.325-350, 2012; H. Qiu, H. Ihara ほか3名

② Chromatographic separation of tocopherol isomers. *Tocopherol: Sources, Uses and Health Benefits*, Edited by Angel Catala, Nova Science Publishers, Inc., Chapter 5, 2012; A. K. Mallik, H. Ihara ほか3名
ほか2件

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: コアシェル複合粒子の製造方法

発明者: 高藤誠、伊原博隆、龍直哉

権利者: 熊本大学

種類: 特許

番号: 特願 2013-178753

出願年月日: 2013/8/30

国内外の別: 国内

○取得状況 (計0件)

[その他]

http://www.chem.kumamoto-u.ac.jp/~ihara/paper_s_select2011A.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 (H23~H26)

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 (H23~H26)

永岡 昭二 (NAGAOKA SHOJI)

熊本県産業技術センター・研究主幹

研究者番号: 10227994

(4) 研究分担者 (H23~H24)

ガナバシー ヒュラシー (GANAPATHY HULLATHY)

熊本大学・大学院先端機構・助教

研究者番号: 90551276

(5) 研究分担者 (H23)

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

(6) 研究分担者 (H23)

富永 昌人 (TOMINAGA MASOTO)

熊本大学・大学院自然科学研究科・准教授

研究者番号: 70264207