京都工芸繊維大学

氏　　名	たにぐち あしん **谷口　亜紳**
学位(専攻分野)	博　士（工学）
学位記番号	博甲第 1012 号
学位授与の日付	令和 3 年 9 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	工芸科学研究科　物質・材料化学専攻
学位論文題目	**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**
審査委員	(主査)准教授　池上　亨 教授　箕田　雅彦 教授　前田　耕治 教授　田嶋　邦彦

論文内容の要旨

高い親水性を有する生体由来物質の研究を促進する上で、親水性物質をより強く保持する親水性相互作用クロマトグラフィー(HILIC)が注目される。しかしながら、移動相、水和相、固定相という三相間の分配と相互作用で成されるその複雑な保持挙動や、市販 HILIC カラムにもみられる多種多様な固定相表面の官能基により、その選択と使用に困難を伴うため、まだ広く普及しているとは言えない。

本論文では、ブラシ型ポリアクリルアミドをシリカ粒子上で合成し、親水性分子の保持と分子構造に対する識別能力に優れた新規 HILIC 型固定相を開発した。さらにシリカ表面のポリマーの分子形状、結合密度と、水和相の形成能力、親水性分子の保持と、その分析対象の部分構造に対する識別能力の相関関係を検討し、短鎖のポリアクリルアミドを高密度に修飾した固定相が HILIC の分離において好ましい分離特性を示すことを見出した。本論文は、第１章（序論）、第２～５章（研究成果）、第６章（総括）で構成されている。

第１章では液体クロマトグラフィーの理論的背景と熱力学的な解釈、測定結果の主成分分析(PCA)による統計解析の手法が述べられている。

第 2 章では、市販の HILIC カラムを用いて、ヌクレオシド、グルコピラノシドおよびキサンチンの低分子化合物群の分析をおこない、分析対象の保持（あるいは特性）や、それらの微細な構造の差異に対する識別能力を評価した。さらに、構造の類似した化合物の測定結果に PCA を適用した結果、HILIC カラムは (i)未修飾シリカ粒子を充填したシリカカラム、および低分子シランで修飾されたシリカ粒子を充填したシラン修飾カラム　(ii)有機高分子で修飾されたシリカ粒子を充填したポリマー修飾カラムの 2 つのグループに大別できることがわかった。これら 2 つのグループは、デンドログラムおよびクラスター分析によりそれぞれの固定相に結合した官能基に基づいてさらに細分化された。ウリジンの OH 基の有無に対するカラムの選択性を示すα(OH)と、固定相表面の酸塩基条件(弱いカチオン交換性、および弱いアニオン交換性)を反映するテオブロミンとテオフィリンの保持比α(Tb/Tp)を用いることで、PCA の結果と極めて近い 2 次元プロットを得た。市販されている 45 種類の HILIC カラムをこの方法で分類することで、各カラムの特徴

が物理化学的な理解と共に示された。またこの報告には、α(U/2dU)という選択性が「HILIC カラムの水和相の厚み」という重要な量を反映する良い指標となるという指摘が含まれている。さらに、大きいα(U/2dU)は、アミン型、双性イオン型、アミド型のポリマー修飾で達成されることが示された。

第 3 章では、大体積の水和相を獲得する固定相の創出を目的とし、ポリアクリルアミド結合多孔質シリカ粒子を合成したことが述べられた。また、これまで議論されなかったポリマー形態が分離特性に与える影響を検討すべく、フリーラジカル重合法(FRP)および表面開始原子移動ラジカル重合法(SI-ATRP)を用いて 2 種類のポリマー形態を有する充填剤を合成した。それぞれの方法において、重合時のモノマー濃度および重合時間を変化させてポリマーの修飾量を段階的に変えた充填剤を調製した。元素分析およびサイズ排除クロマトグラフィーにより、合成した各充填剤のキャラクタリゼーションを行った。SI-ATRP による合成は FRP による合成と比べてより大質量のポリマー修飾を可能としたが、グラフトポリマー鎖の分子量は数千～数万の比較的小さいものであった。これらの解析結果から FRP は多孔質シリカ粒子上に高分子量のポリマーをまばらに結合すること、SI-ATRP はブラシ構造を有するポリマーを与えることが確認された。また、FRP と SI-ATRP のどちらの合成方法でも、全多孔質シリカ粒子上に結合可能なポリマー量やその分子量には限界があり、それはシリカ粒子の細孔径および比表面積に関係することが示された。

第 4 章では、FRP および SI-ATRP によりポリアクリルアミド修飾された表面を有する充填剤を用いて HILIC 用カラムを作製し、これを HILIC カラムテストに基づいて評価した。SI-ATRP カラムの親水性保持は、FRP により作製されたポリアクリルアミドカラムや市販の多くの HILIC カラムのものをはるかに上回った。α(U/2dU)の値によると、SI-ATRP により作製された HILIC カラムは他のどの HILIC カラムよりもヒドロキシ基に対する選択性が高かった。α(U/2dU)は充填剤のシリカ成分と有機ポリマー成分の比を表すΔ(C/Si)値と相関し、より大量のポリマーの結合がより大きい親水性選択性の由縁となることが確認された。この結果は有機固定相のポリマー形態を調整することで親水性の保持と選択性を向上・制御できることを示している。この固定相設計戦略は、親水性の高い分析対象物を効果的に分離することで実験的に検証された。

第 5 章では、SI-ATRP および FRP カラムのポリマー形態の違いによる立体選択性を評価するために、マルトース類(MH)およびシクロデキストリン類(CD)の分析を行った。SI-ATRP カラムは FRP で調製したカラムや保持、選択性の面でトップクラスの 3 種の市販 HILIC カラムよりも優れた MH の保持を示した。固定相表面に結合したポリマーの成長度合いや密度が異なる 3 種類の SI-ATRP カラムでは、水和相の厚さや相比が異なっていた。保持係数の対数 ln k は温度の逆数(1/T，T＝278－333 K)に対して非線形な依存性を示した。密度を利用する移動相体積の測定とクロマトグラフィー的測定を組み合わせて、各固定相の相比を詳細に決定した。相比の対数 ln φと 1/T の間にも非線形な相関関係が見られた。これらを組み合わせて各成分の分離プロセスの熱力学的パラメータを van't Hoff plot を用いて決定した。SI-ATRP カラムにおける分配に関するギブス自由エネルギー変化(ΔG°)は、MH については FRP カラムで測定されたものよりも小さかったが、CD についてはその逆であった。この結果は、PAAm の形態や固定相表面のポリマー密度の違いが分子の立体的な要因に基づいて分析物の分離に影響を与えていることを示している。ATRP-PAAm カラムの MH および CD に対する高い構造選択性は、FRP-PAAm および市販のアミドカラムと比較してオリゴ糖の高性能分離に有用である。

本論文に関わる公表筆頭著者論文数は 2 編、公表共著者論文数は 1 編（すべて掲載済み）である。

論文審査の結果の要旨

本論文では、親水性相互作用クロマトグラフィー（HILIC）のカラムに充填する分離媒体が分子構造の差異を識別する際の特性評価の方法を構築するとともに、シリカゲル表面に graft to および graft from の異なる重合修飾法でポリアクリルアミドを結合し、その分離特性を多角的に検討しており、意欲的かつ独創的な研究が展開された。HILIC カラムの分離特性評価においては、ヌクレオシド類縁体、グリコシド、キサンチンなどからなるプローブの分析と、それらの構造の差異に対する各カラムの識別能力（選択性）について主成分分析を適用した。この方法により HILIC カラムは低分子量シラン修飾型と有機ポリマー修飾型に大別でき、後者の親水性保持が大きいことを示した。また多数の HILIC カラムの分離特性を親水性－イオン交換性の二次元マップで表現する手法により、各カラムの特徴を直感的に理解する手段の確立に寄与した。

申請者は従来行われてきたフリーラジカル重合（FRP）によるシリカゲルの graft to 型の重合修飾に加え、表面開始原子移動ラジカル重合（SI-ATRP）による graft from 型の重合修飾を試み、その手法を確立した。FRP 型に比べて SI-ATRP 型は結合されるポリアクリルアミド（PAAm）の分子量が主に 3,000 から 40,000 と FRP 型の 1/2 から 1/20 と小さいながら、ポリマー鎖の結合密度が 20 倍から 100 倍と高く、シリカゲルの重量あたりのポリマー結合率を飛躍的に高めることに成功した。これらを充填したカラムを上述の二次元マップで評価したところ、18 種類の SI-ATRP 型の多くが市販の HILIC 型カラムより大きな親水性を示した。この修飾手法で得られるカラムの優位性を示すものとして、幅広い移動相組成が挙げられる。すなわち、一般的な HILIC 型カラムでは移動相中の水の体積分率が 20%を上回ると急激に保持が減少するのに対し、本論文で議論している SI-ATRP 型 PAAm カラムは水の体積分率が 40%の移動相中でも糖類に対する十分な保持を与えた。これらのカラムは分析用の使用に加え、大きな保持力を活用して各種サンプルの前処理にも有用であると示唆される。さらにシリカ粒子の細孔径が分離特性に及ぼす影響を検討し、HILIC 型分離媒体の改良に重要な指針を与えた。

申請者が調製したカラムを用いて、D-グルコースのα-1,4 結合型オリゴ糖（7 量体まで）と、対応するシクロデキストリンの保持および選択性とそれらの温度依存性について検討した。得られた結果を解析するにあたり、各カラムの相比を詳細に算出する方法をも初めて確立した。シリカゲル上のポリマーが水和を受け、温度変化によって水和層の体積が増減する様子について、具体的なイメージを獲得することができた。保持係数の対数 ln k および相比の対数 ln φ と温度の逆数 1/T の間に非線形な相関があることが見出され、1/T の二次関数での近似によって直線的な van't Hoff プロットを得て、分配に関するエントロピー並びにエンタルピーを決定した。これらは、シリカ表面上のポリアクリルアミドの形状と密度が分子識別に及ぼす影響を定量的かつ多面的に評価したものとして学術的に重要な成果である。申請者が調製した分離媒体は、実用化の可能性が十分あると判断できる点からも高く評価できる。

本論文の基礎となっている学術論文は、レフェリー制度の確立した雑誌３編に掲載され、うち２編は申請者が筆頭著者である。その他、計３回の国際会議で発表している。

発表論文

(1) A. Taniguchi, T. Ikegami, “Comparison of the steric selectivity on hydrophilic interaction chromatography columns modified with poly(acrylamide) possessing different morphology”, Journal of Chromatography A, 1650 (2021) 462207. [DOI: 10.1016/j.chroma.2021.462207]

(2) T. Ikegami, A. Taniguchi, T. Okada, K. Horie, S. Arase, Y. Ikegami, “Functionalization using polymer or silane? A practical test method to characterize hydrophilic interaction chromatography phases in terms of their functionalization method”, Journal of Chromatography A, 1638 (2021) 461850.
[DOI: 10.1016/j.chroma.2020.461850]

(3) A. Taniguchi, S. Tamura, T. Ikegami, “The relationship between polymer structures on silica particles and the separation characteristics of the corresponding columns for hydrophilic interaction chromatography”, Journal of Chromatography A, 1618 (2020) 460837.
[DOI: 10.1016/j.chroma.2019.460837]

国際学会におけるポスター発表

(1) A. Taniguchi, K. Ito, S. Tamura, T. Ikegami, “Study on relationship between polymer structures on silica particles and the separation characteristics of the corresponding HPLC columns for hydrophilic interaction chromatography”, HPLC 2019, Milan, Italy, June 2019.

(2) A. Taniguchi, T. Ikegami, “Development and Characterization of novel HILIC stationary phase proceeding from poly(glycidyl methacrylate) using SI-ATRP”, International Symposium on Chromatography 2018, Cannes-Mandelieu, France, September 2018.

(3) A. Taniguchi, T. Ikegami, “Development and characterization of HILIC stationary phases modified with polymers possessing chiral group based on cysteine derivatives”, HPLC 2017, Prague, Czech, June 2017.