

キャピラリー液体クロマトグラフィーの開発

岐阜大学工学部 竹内豊英

1. はじめに

高速液体クロマトグラフィー(HPLC)におけるキャピラリーカラムの導入は、液体クロマトグラフィー(LC)の高性能化を図る上で有力な一手段であり、環境保護の観点からも追い風を受けている。通常サイズの分離カラムを用いる HPLC では達成が困難な分離検出が、キャピラリーカラムを用いることによりはじめて実現できる場合がある。講演ではキャピラリーカラムの特徴を活かした分離検出法の紹介ならびに実際にキャピラリーカラムを使用する際の留意点などを紹介する。

2. キャピラリーLC の位置付けと特徴

液体クロマトグラフィー(LC)におけるキャピラリーカラムの利用は、高性能化、検出の高感度化、分離システムの簡易化あるいは高機能化につながるものとして期待されている [1]。厳密には定義がなされていないが、LC は分離カラムの内径により表 1 のように分類でき、それぞれの特徴や用途が異なる。なかでも Nano-LC は、移動相流量が数 100 nL/min 以下となり、質量分析計との結合に極めて有効であり、最近ではとくにプロテオーム解析などに有効な分離技術として期待が高い。一方、 μ -LC の典型的な流量は、2~30 μ L/min である。ここでは、キャピラリーLC は Nano-LC と μ -LC を含むものとする。

表 1. カラムサイズによる液体クロマトグラフィーの分類

用途	分類	内径 mm	試料負荷量 ^a	流量 ^b ml/min
分析用	Nano-LC	0.075以下	1 ng以下	0.00027以下
	μ -LC	0.2~0.8	数10 ng	0.002~0.030
	Semi- μ -LC	1.0~2.1	数100 ng	0.047~0.21
	Conventional LC	4.0~6.0	数 μ g	0.76~1.7
分取用	Preparative LC	10~	数10 μ g	4.7~

a: 理論段高さを 10%程度増加させる試料負荷量の目安の値

b: 同じ線流速を与える流量 (内径 4.6 mm のカラムの流量を 1 mL/min とする)

キャピラリーLC では、カラム内径の微小化に基づいてその特徴が発現する。上述のように用いられる移動相流量が nL/min~ μ L/min であり、コンベンショナル LC と比べて 2~3 桁小さな流量であることにその最大の特徴がある。キャピラリーLC は、次のような利点をもたらすことが期待されている。

- (1) 移動相流量が小さいため移動相溶媒の使用量および廃溶媒の量が減少し(環境フレンドリー)、高価な移動相や新規な移動相添加剤が使用しやすくなる。その結果、新しい分離検出システムの創出につながる。
- (2) カラム内径の微小化に伴って質量検出感度が改善される。
- (3) 移動相流量が小さいので質量分析計(MS)との直結が容易になる。
- (4) カラム熱容量が小さいため温度制御が容易であり、ガスクロマトグラフィー(GC)と同様に温度プログラミングが有効となる。

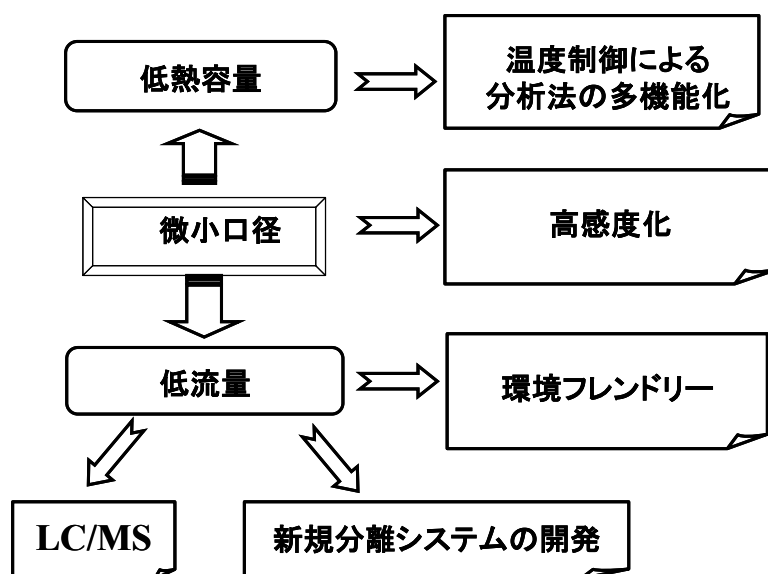


図1 キャピラリーLCの特徴

3. キャピラリーカラムおよび周辺技術の開発

キャピラリーカラム

これまで開発されてきたキャピラリーカラムは、固定相の形状や充填状態によって分類できる。図2にその代表的な三種の模式図を示す。(A)は、HPLCで通常用いられている充填カラムと同じで、キャピラリー内に微粒子充填剤（粒径2～5 μm ）を詰めたものである。(B)はキャピラリー内にゾルゲル法などで一体型（モノリス型）のシリカゲルを調製したもので、シリカ骨格とスルーポアがそれぞれ μm オーダーで調製可能なため、透過性の高い高性能カラムが実現できる。(C)は、キャピラリーGCで用いられるキャピラリーカラムの様にキャピラリーの内壁に固定相が担持されたカラムである。

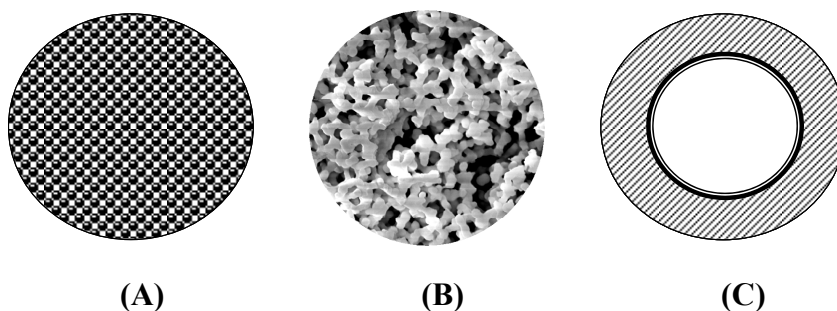


図2 LCで用いられる分離カラム断面の模式図

(A) 微粒子充填型カラム (B) モノリス型シリカカラム (C) 中空キャピラリーカラム

このうち、(A)については、充填剤の粒子径を小さくすることにより高性能化が達成できるが、圧力損失が高くなるためとくに2 μm 程度の充填カラムを利用するときには100 MPa以上の高压に耐えられる装置の使用が不可欠となる。最近になってそのような高压で作動するシステムが市販されるようになり、高性能化が図られている。

(B)の圧力損失は(A)と比較して1/10程度に抑えることができるため、比較的低い圧力損

失で高性能を達成できる。図 3 は、(B) タイプのモノリス型シリカキャピラリーカラムで海水中の臭化物イオンを分離定量した例である。標準試料の 5 成分を 2 分以内に分離することができ、海水中臭化物イオンの迅速分離定量に応用することができた（海水中臭化物イオンの定量値：63mg/L）。図 3 では溶離液(0.5 M NaCl)中に 0.1 mM のセチルトリメチルアンモニウムイオンを含むことにより保持の再現性を改善している [2]。

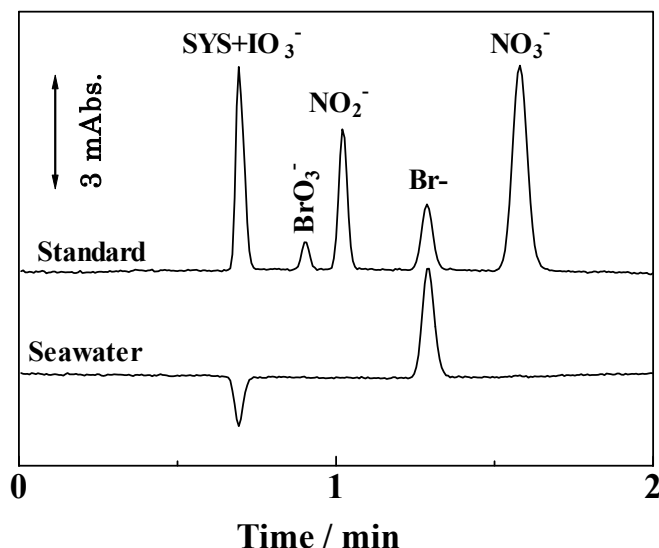


図 3 セチルトリメチルアンモニウムイオンで修飾したモノリス型シリカキャピラリーカラムによる海水中臭物イオンの分離
Column: 400×0.1 mm ID. Eluent: 0.5 M NaCl + 0.1 mM cetyltrimethylammonium chloride. Flow rate: 5.6 μ L/min. Injection volume: 20 nL. Analyte: 0.5 mM each for standard. Wavelength of UV detection: 210 nm.

(C)については、液体中の試料成分の拡散係数が気体中と比べてかなり小さいために LC において高性能を達成するためにはカラム内径を 5~10 μ m 程度にする必要があり、残念ながら現時点で実用化されていない。

試料成分のカラム外拡散の影響

キャピラリーLCにより分析を行う際、分離カラム以外の流路部における試料成分の拡散を抑える必要がある。とくに試料注入体積および検出器フローセルの体積ならびに連結管のサイズに留意が必要である。目安として試料注入体積およびフローセル体積は分離カラム体積の 1/100 程度であれば分離性能に与える影響は無視することができる。例えば、内径 0.5 mm、長さ 15 cm のカラムであれば、カラム内の 60%を移動相が占めるとするとその体積は 18 μ L であり、体積 0.2L の注入による分離性能の低下は小さいと見積もることができる。一方、連結管については分離カラムの内径の 1/10 程度であれば数 10 cm 程度連結管を使用してもそこでの拡散の影響は小さい。例えば、上記の分離カラムの場合、0.05 mm のキャピラリーを連結管として用いたときの拡散の影響は小さい。

試料注入体積の影響は次式により評価することができる。

$$\sigma^2 = \frac{t^2}{12} = \frac{V_{inj}^2}{12} \quad (1)$$

また、連結管中の拡散の影響は、次式を利用して評価することができる。

$$\sigma_{\text{con}}^2 = \frac{\pi^3 d_{\text{con}}^6 L_{\text{con}} D_m}{32 F^3} + \frac{\pi d_{\text{con}}^4 L_{\text{con}}}{384 D_m F} \quad (2)$$

ここで、 σ は溶質の分散、 d_{con} および L_{con} は連結管の内径および長さ、 F は移動相流量、 D_m は溶質の拡散係数を表している。

講演では、各条件下（連結管の長さおよび内径、移動相流量、試料注人体積、試料成分の保持時間など）でカラム外における試料成分の拡散を見積もり、それらがどの程度分離性能に影響を与えるかを紹介する。

周辺技術の開発

キャピラリーLCの機能を高めるために、微小体積下での試料濃縮、スプリットフロー、ポストカラム反応、リサイクル分離システムを開発した。これにより、キャピラリーLCの検出感度、分離性能、分離選択性の改善を図ることができた。

4. キャピラリーカラムを活かした分離分析法

移動相添加剤による検出支援および分離選択性の発現

2-*p*-toluidinyl-6-naphthalene sulfonate (TNS)はシクロデキストリン(CD)の空孔内に取込まれると蛍光強度が増大することが知られている。これを利用して、移動相中にTNSを添加しておくことでCDを蛍光検出することができる。図4は練りわさび中のCDを分離検出した例である[3]。

このように、キャピラリーLCは消費する移動相量が少ないため、従来法では困難であった各種添加剤の利用が容易となり、LCにおいて新しい分離検出システムを開発することができる。図3においても移動相にセチルトリメチルアンモニウムイオンを添加することによりシリカゲルカラムで無機イオンの分離を達成している。

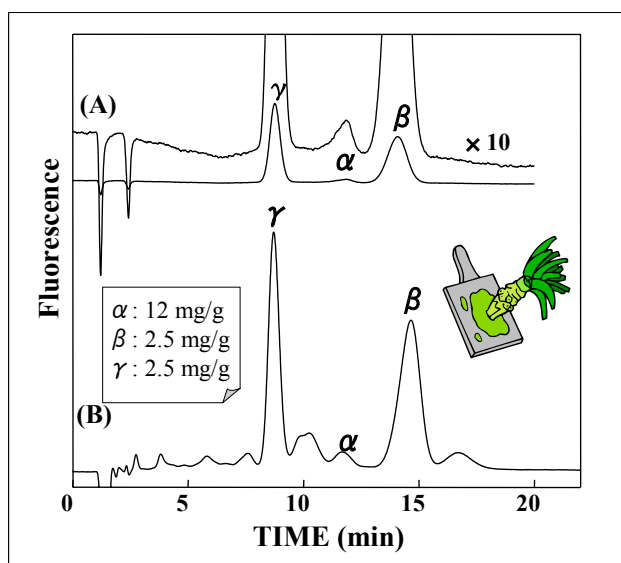


図4 わさび中シクロデキストリンの分離検出

Column: Develosil ODS (100×0.32 mm). Eluent: 1.5% CH₃CN aqueous solution including 0.018% TNS. Flow rate: 4.2 μL/min. Wavelengths: Ex, 280 nm; Em, 465 nm

固定相支援による検出感度の改善

オンカラム検出は分離カラムの一部を直接検出する方法でキャピラリーLCやキャピラリー電気泳動においてカラム外における試料成分の拡散を抑える目的で導入された技術である。オンカラム検出は固定相に保持された成分をも検出の対象とするため、固定相の保持に基づくフォーカシング効果と環境効果を受ける。充填フローセルを使用すれば分離カラムを直接検出しなくても固定相の効果を発現できる。図5は、ダンシルアミノ酸をオンカラム蛍光検出した場合と通常の検出法（Post-column detection）とを比較している。オンカラム検出により、保持の大きな成分の検出感度が改善できることが示されている [4]。

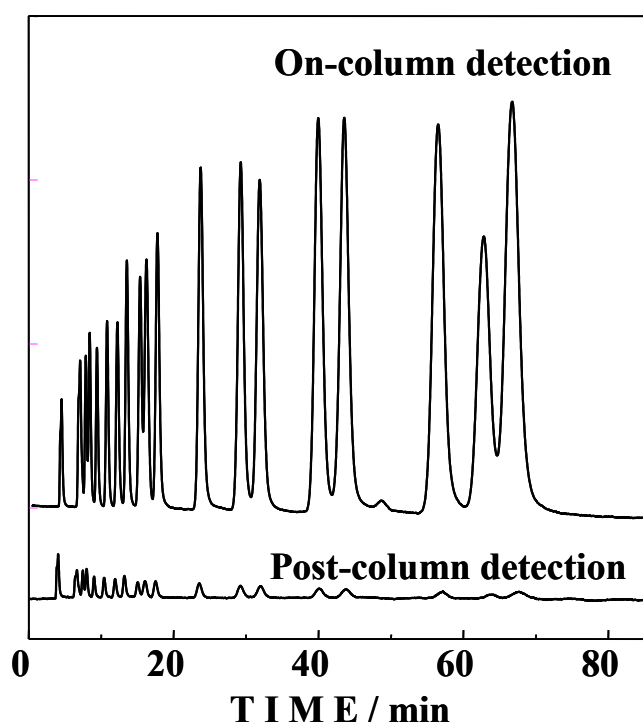


図5 ダンシルアミノ酸のオンカラム蛍光検出

Column: L-column ODS, 150×0.35 mm. Eluent: 23% acetonitrile in 40 mM ammonium acetate. Flow rate: 4.2 μ L/min. Wavelengths of detection: (Ex) 335 nm ; (Em) 528 nm (A) or 522 nm (B).

低流量を活かした複合分離システム：二元分離

キャピラリーLCの低流量の特徴を活かし、二元分離を達成するシステムを開発した。その1例を図6に示す。最初にサイズ排除モードキャピラリーLCによりタンパク質が分子サイズの差異に基づいて分離される。分離されたタンパク質は、引き続いてトリプシンを固定化した酵素カラムを通過する際にペプチドに消化され、逆相HPLC用の試料ループに導かれる。ループに目的の消化物が導入されたところでバルブを切り替え、グラジエント溶離によりペプチドの逆相分離が達成される。流量が1 μ L/minであれば固定化酵素カラムによりタンパク質がトリプシン消化できることがわかり、分析時間の短縮化・簡易化を図ることができた。ただし、2元目のHPLC逆相分離に数10分を要するので連続的な二次元分離は達成できていない [5]。

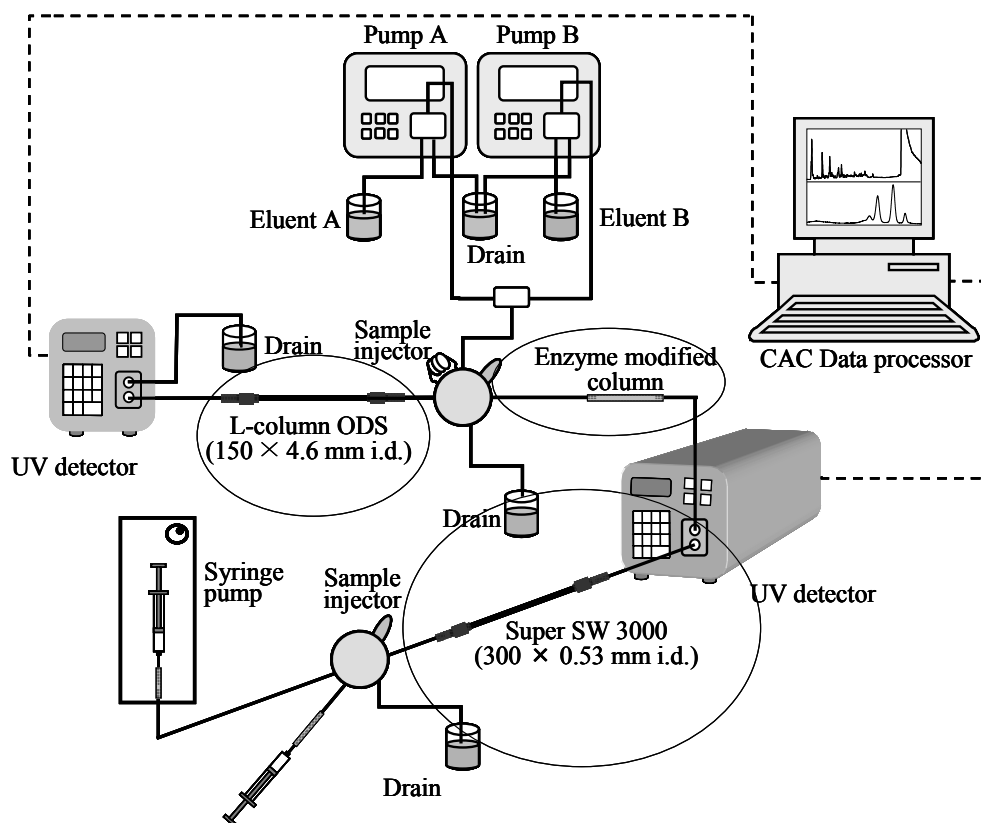


図6 タンパク質の二元分離システム

5. おわりに

30 年ほど前にスタートしたキャピラリーLC は、時間が非常にかかったものの、ここに来てようやく重要な分離分析法の一つとして普及しつつある [6]。しかしながら、今後さらに成熟するまでには積み残された問題の解決や新しい技術開発のためにももう少し時間がかかりそうである。完全二次元分離を視野に入れた超高速分離の達成，超微細ポンプの開発，微細加工技術を駆使したミキシングや反応場の構築，システム全体のダウンサイジング化などに挑戦したい。

参考文献

- [1] 竹内豊英，ぶんせき，2004，465-468.
- [2] A. Suzuki, L. W. Lim, T. Hiroi and T. Takeuchi, Talanta, 70, 190-193 (2006).
- [3] Takeuchi, Y. Kitamaki and T. Miwa, J. Microcol. Sep., 13, 19-23 (2001).
- [4] T. Takeuchi and T. Miwa, Anal. Chim. Acta, 311, 231-236 (1995).
- [5] L. W. Lim, M. Tomatsu and T. Takeuchi, Anal. Bioanal. Chem., in press.
- [6] 竹内豊英，Jasco Report, 46, No.1, 6-11 (2004).