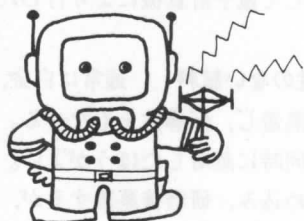


## ガラスキャピラリーカラムの新しい展開

約30年前にGolayによって考案されたキャピラリーカラムが溶融シリカガラスキャピラリーカラムをはじめとする画期的な進歩を遂げてきた過程の、幾つかのエピソードを解説し、キャピラリーカラムが優れた性能とともに、今日ではたいへん使いやすいものになっていることを紹介する。



小島 次雄

### 1 はじめに

1957年、M. J. Golayによってキャピラリー管の内壁に固定相液体をコーティングした新しいタイプのガスクロマトグラフィー分離カラムが考案された。この種のキャピラリーカラムは中空構造をもつため抵抗が小さく透過係数が大きいので、従来用いられてきた充てんカラムに比べると、i) 50~100倍も長いカラム（ときには数百mにも及ぶ）を用いても、これに最適に近い速度でキャリアーガスを流すことができ、これまで困難と考えられていた対象物でも短い時間で容易に分離することができる（10万~20万の理論段数のカラムが作れるので、例えば2:2型のテトラクロロダイオキシンのすべての異性体の分離が容易にできる）、ii) 分離が割合容易な対象物ならば、比較的短いカラムを用いて極めて短時間に迅速分離ができる（例えばヘプタンのすべての異性体が数秒で分離される）などという優れた特長をもっていることが明らかにされた。

1952年のMartinの提案以来、ガスクロマトグラフィー（GC）は年々急速度の発展を遂げてきていたが、この中空構造のキャピラリーカラムはGCに飛躍的な進歩をもたらす革新的な発明であることがいち早く認識され、1958年にヨーロッパで開かれた第2回GCシンポジウムに参加した多くの人は、すべてのGC分離は近い将来充てんカラムに代わってこの種のキャピラリーカラムによって行われることになるだろうと信じたほどである。初期のころはもっぱらステンレススチール製のキャ

ピラリーカラムによる石油関連の炭化水素の分析が行われたが、秀でた性能が理解されるにつれて、このカラムを炭化水素以外の広範囲の物質の分析にも用いようとする気運が研究者の間に生まれ、生化学、医学、環境科学などの分野における複雑な組成の試料の分析への応用について努力が積み重ねられた。しかし、このような分野の試料は、極性の官能基を有し、沸点の高い成分を多く含むため、幾つかの成分はカラムの内壁に吸着されたり、分解されたり、あるいはカラムが急速に劣化するなどという問題が発生したため、必ずしも当初の予測のように急速に普及するには至らなかった。このような問題を解決するには、金属に代わって不活性な材質が必要であるということからガラスキャピラリーカラムの開発に多くの研究者の興味が集中するようになった。そして今日ようやく安定した性能のカラムが容易に使用できるようになり、GCは新たな発展期に入ったといえよう。

### 2 ガラスキャピラリーカラム

ガラスは一般に不活性な材質であると考えられているが、数十mにも及ぶ長いキャピラリーカラムの中に微量の試料を通して分離を行うと、内壁表面上にわずかしかな存在しない活性点であってもその影響は顕著に現れ、次に述べるように、好ましくない現象が現れることが指摘され、単に金属をガラスに代えただけでは問題は解決しないことが明らかになった。

i) キャピラリーカラムでは内壁が担体となって固定相液体は保持されるのであるが、滑らかな表面をもっているため、固定相液体を均一な厚さの薄膜として内壁表面上に広げ、安定に固定することが難しい。特に高い表

面張力をもつ高極性の固定相液体の場合にはガラス表面が“ぬれ”にくく、固定相液体が滴となる傾向がある。このことは、高い効率を有するカラムを作る基本条件に反するばかりではなく、滴状となった固定相液体は漏出現象を起こしやすく、カラムの熱安定性も低下する。

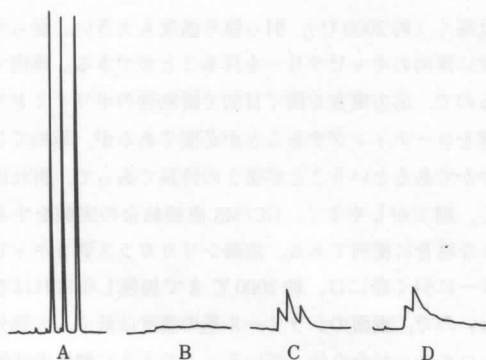
ii) ガラス表面の活性点の接触作用によって固定相液体の熱分解が促進され、カラムの寿命が短くなる(例えば、シリコンガム SE-30 は耐熱性が高く 400℃ ぐらいの温度に耐えられるが、ガラスキャピラリーの内壁上で薄膜として存在するときには 250℃ ぐらいで分解が起こる)。

iii) 極性の試料成分を分離対象とする場合、特に微量成分である場合には、ガラス表面に吸着されやすく、クロマトグラム上に観察されるピークにはしばしばテーリングが見られたり、あるいは非可逆的吸着によってカラムから溶出せず、ピークが消失してしまうことがある。

このような現象を引き起こす原因となる活性点は、ガラス表面に存在する金属酸化物及び水酸基(シラノール基)であると考えられる。これらの活性点を不活性化しないと広範囲の物質の分離分析においてキャピラリーカラムのもつ高い分離効率を発揮させることはできないので、ガラス表面を修飾して活性点を除いたり、ブロックしようとする研究が盛んに行われるようになった。初期には試行錯誤的な方法によって経験的にカラム技術を向上させようとする研究が多く、人によっていろいろの方法が提案されるなどの混乱が見られ、追試の結果は再現性に乏しく、ガラスキャピラリー GC は科学ではなく、芸術であると言われたこともあったが、ガラスの表面化学が進歩するとともに、ガラス表面の化学修飾法、不活性化法も進歩し、今日では効率の高い優れたカラムを再現性良く作製することができるようになった<sup>1)~4)</sup>。

## 2.1 酸浸出

ガラスキャピラリーカラムが導入された初期のころはソーダ石灰ガラスあるいはホウケイ酸ガラス製のカラムが用いられたが、これらのガラスの表面に存在するアルカリ、アルカリ土類金属イオン、ホウ素及びアルミニウムイオンなどはルイス酸として働き、ケトン、アミンなどのほか芳香族炭化水素、オレフィンなどのルイス塩基成分に対して吸着活性点として作用する。更に、ポリジメチルシロキサンのような固定相液体に接触的に働き、高温での解重合を促進しカラムの熱安定性を低下させるので、除去しなければならない。金属イオンを除くには塩酸浸出法が用いられている。反応の方法としては溶液法と気相法がある。いずれの方法を採るにせよ、表面の



試料：n-ブタノール（3回続けて注入）； A：SE-30を固定相とするガラスキャピラリーカラムを用いた場合、B：不活性化処理をしていないガラスキャピラリーをAに連結した場合、C：塩酸浸出をしたパイレックス製ガラスキャピラリーをAに連結した場合、D：塩酸浸出をした軟質ガラス製ガラスキャピラリーをAに連結した場合

図1 ガラスキャピラリーの内壁上への吸着

金属を除去するだけでなく、純度の高い丈夫なキセロゲル構造をもつ SiO<sub>2</sub> の表面層を作り、塩酸浸出処理の後に再び内部から表面へ金属イオンが拡散移動してくることのないような構造にすることが大切である。塩酸浸出の効果を示すクロマトグラムを示そう。

図1は高性能のガラスキャピラリーカラム(I)に不活性度をテストしようとするキャピラリー(II)を連結し、試料をI-IIの順序に通して描いたクロマトグラムである<sup>5)</sup>。AはIのみを用いたとき、BはIに酸浸出処理を施していないIIを連結した場合のクロマトグラムである。試料はIIの内壁に吸着されてしまいピークは現れない。C及びDはそれぞれ酸浸出処理を施したIIをIに連結したときのクロマトグラムである。酸浸出の効果は歴然としている。最近では酸浸出の効果表面分析機器を用いて判定しようとする試みもされるようになった。例えば、ESCA法で調べると、酸浸出を行った後には表面からの深さ0.5~2.0Åの範囲でK, Na, Ca, Mgのほとんどが除かれ、ほぼ純粋なシリカ層が形成されることが分かっている<sup>3)</sup>。

## 2.2 熔融シリカガラスキャピラリーカラム

熔融シリカ製のガラスキャピラリーカラムは1979年 Dandeneau らによって提案された<sup>6)</sup>。純度の高い四塩化ケイ素から作られ、ほとんど純粋な SiO<sub>2</sub> からできており、クロマトグラフの性能に悪い影響を与える金属酸化物は合わせて1 ppm以下しか含んでいない。このことは普通のガラスキャピラリーとは違った際立った特長であって酸浸出処理を必要としない。網目修飾イオンを含まず、高度に架橋された3次元構造をもつので、軟化点

は高く(約2000℃),引っ張り強度も大きい。従って非常に薄肉のキャピラリーを作ることができる。薄肉であるので,応力腐食を防ぐ目的で耐熱性のポリイミドで外壁をコーティングすることが必要であるが,極めてしなやかであるということが第2の特長であって,折れにくく,細工がしやすく,GC/MS直接結合の実験をするような場合に便利である。熔融シリカガラス管をキャピラリーに引く際には,約2000℃まで加熱しなければならないので,表面のシラノール基の濃度は低く,大部分はシロキサン結合を作っている。このように酸性の活性点が少ないということは,高性能のカラムを作るうえで極めて好ましいことであり,熔融シリカガラスキャピラリーカラムの第3の特長ということができる。

表面が普通のガラスよりも不活性であるということからもたらされるもう一つの特長は,固定相液体の熱安定性が良くなることである。固定化処理を施さなくてもCarbowax 20Mは250℃まで使用することができるし,SE-30, SE-52などの無極性固定相だと325℃ぐらいまで使用することができる。熱安定性が良くなるということは昇温クロマトグラフィーを実施する場合に極めて好ましいことである。

### 2.3 シリル化

普通のガラスを酸浸出処理したとき表面に生成するシリカ層には,  $\text{nm}^2$  当たり2.84個程度のシラノール基が存在するといわれている。熔融シリカガラスの場合には,これより少なく0.2個/ $\text{nm}^2$ 程度である。400℃まで加熱すると水が遊離してシロキサン結合が作られるが,この反応は可逆的であって冷却後水が存在すればシラノール基が再生される。酸性のシラノール基はプロトン受容性のグループに対する吸着活性点として働くので,吸着不活性なカラムを作るには,酸浸出処理に引き続いてシラノール基をブロックし,吸着活性を抑制する処理を施さなければならない。熔融シリカガラスの場合には普通酸浸出を省いてもよいが,シラノール基の吸着活性を抑制する処理は必要である<sup>47)</sup>。

普通用いられているのはシリル化である。シラノール基に環状メチルシロキサンとかヘキサメチルジシラザン(HMDS)などを反応させてシリルエーテルとする反応である。ガラス表面のシラノール基の徹底的シリル化は長い間困難なことだと考えられてきたが,高温(350~400℃)で長時間反応させる方法が提案されてから再現性良くほぼ完全に行われるようになった<sup>8)</sup>。シリル化剤としてHMDSのほかいろいろの試薬が用いられているが,最近になって環状のシロキサン,例えば octa-

methylcyclotetrasiloxane (D4)などが導入された。400℃で反応させると表面シラノール基によってD4は開環し, D4あるいはそれから生成したオリゴマーは近接する二つのシラノール基と反応し, ループを形成して結合するのではないかと考えられている<sup>4)</sup>。シリル化剤のほかにポリジメチルシロキサン系の固定相液体を高温に加熱して部分的に熱分解を起こさせ, 分解生成物によってシラノール基をブロックする polysiloxane degradation method (PSD法)と呼ばれる方法があるが,これも反応のタイプとしては環状シロキサンの場合と同様である。

シリル化はたいへん有効な表面の不活性化法であり, 表面被膜の耐熱性も優れているが, 表面がメチル基で覆われるので化学修飾前と比較するとガラスの表面張力は減少し, 疎水性を帯びることになる。このことは低い表面張力をもつ無極性の固定相をコーティングする場合には問題とならないが, 極性が高く表面張力の大きい固定相液体をコーティングしようとする場合には表面が“ぬれ”にくいという問題を引き起こすことになる。高い効率のカラムを作るためには, ガラスキャピラリーの内壁が均一な厚さの固定相液体膜によって覆われなければならないので, ガラス表面の“ぬれ”やすさはガラスキャピラリーカラム作製のうえでたいへん重要な問題である。シラノール基をブロックすると同時に, 極性の高い固定相液体によっても“ぬれ”やすい表面張力の大きなガラス表面が得られるならば理想的な表面化学修飾法といえるわけである。

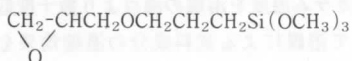
このような要望を満たす方法として次のような修飾法が提案された。例えば, OV-73, OV-17あるいはSE-52のようにフェニル基を含むシリコン系の固定相液体を用いたい場合にはジフェニルテトラメチルジシラザンとかテトラフェニルジメチルジシラザンのようにフェニル基を含むシリル化剤でシリル化を行うのである<sup>9)</sup>。シラノール基がブロックされるとともにガラス表面はフェニル基で覆われ, 固定相液体と同程度の表面張力をもつようになり, “ぬれ”やすい表面が得られる。より高い極性をもつシアノプロピル基を有するシリコン系の固定相液体を用いようとする場合には, シアノプロピル(メチル)シクロテトラシロキサンとかビス(シアノプロピル)シクロテトラシロキサンのようなシリル化剤でシリル化を行うのである。シアノ基が固定相液体膜の方向に配向し, 表面修飾膜と固定相液体が互いに化学的類似性をもつようになり, 表面張力もほとんど等しくなると, 表面はシアノプロピルシリコン類によって容易に“ぬれ”ようになる。フッ素を含む固定相液体(例えば

OV-215) を用いたい場合にはフッ素を含むシリル化剤 [例えばトリフルオロプロピル(メチル)シクロシロキサン] を用いればよい。不活性さと“ぬれ”やすさの両方の点で満足すべき表面が得られ、高効率のキャピラリーカラムを作ることができる。

Carbowax 20M をコーティングした後キャピラリーの両端を閉じて 280℃ に 16 時間加熱すると、熱分解によって生成するエチレンオキシドによってシラノール基がブロックされ、固定相として Carbowax 20M をコーティングすることができる高い表面張力をもつガラス表面が得られる。

高温シリル化はたいへん有効な不活性化法であるが、400℃ では外壁上に保護膜として塗られているポリイミドの分解が起こる。これを防ぐため窒素置換したオープン中で加熱処理を行わなければならないという不便さがあり、それでもポリイミドの酸化を完全には防ぐことができないという問題がある。そこでポリイミドの代わりに保護膜としてアルミニウムをコーティングした耐熱性の高い溶融シリカキャピラリーを使う方法<sup>24)</sup> も提案されているが、一方ではポリメチルヒドロシランあるいはポリフェニルメチルヒドロシランなどを用いて 250~350℃ という比較的低い反応温度でシリル化を行う方法も報告されている<sup>10)</sup>。

γ-グリシドオキシプロピルトリメトキシシラン (GPTMS, 下記) は低温で使用できるシリル化剤である



が、この試薬はシラノール基と反応して結合するメトキシ基のほかにエポキシ基を含んでいる。エポキシ基が開環してジオールとなると Carbowax 20M とか Superox などによって“ぬれ”やすく、極性ガラスカラムを作るのに都合のよい表面張力の高い表面を与える<sup>11)</sup>。

### 3 固定相液体の架橋と固定化

キャピラリーカラムでは平滑な内壁表面上に固定相液体がコーティングされているため、充てんカラムと異なって固定相液体フィルムは不安定であり、特に粘度の低い固定相液体では、充てんカラムの場合と比べるとはるかに低温でカラムから漏出する現象が見られる。これはガラス表面と固定相液体の間で表面エネルギーの温度変化が異なるために起こる現象であって、高温で固定相液体の表面張力が相対的に大きくなるとフィルムの厚さが不均一になったり、あるいは形状が滴状に変化するために生ずる現象(熱的転移現象)であると考えられてい

る。シリコーンガム SE-30 などではこのような現象が見られないのは、粘度が高く表面エネルギーの温度変化が小さいからである。また充てんカラムでは保持体の表面は平滑ではなく粗であるので、物理的にこのような現象は起こりにくい。長寿命で安定なガラスキャピラリーカラムを作るために、固定相液体分子間に架橋を行うとともに固定相液体フィルムをガラスカラムの内壁に化学結合させて固定化する方法が開発され、広く用いられている<sup>11-17)</sup>。固定化によってもたらされる利点として、上述の熱的転移現象によるカラム効率の低下を防ぐことができるほかに、i) 大抵の溶媒に不溶性となるので、オンカラム試料注入法によって大量の溶媒がカラムに導入されても固定相膜ははく離されることがない。ii) 生体成分とか環境汚染成分のように、複雑な組成の試料の分析を行う場合に高沸点成分によってカラムが汚染されても、溶媒洗浄によって汚染成分を取り除き、劣化したカラムを再生させることができるなどという点を挙げることができる。

固定化法を大別すると二つの方法がある。その一つはジメチルクロロシランとトリメチルクロロシランの混合物の加水分解によって α, ω-ヒドロキシポリメチルシロキサンをプレポリマーを調製し、あらかじめ四塩化ケイ素(多官能性のモノマーを与える)で処理しておいたキャピラリーの内壁にコーティングする。320℃ に加熱して縮合させると Si-O-Si 結合によって架橋され、ガラス表面に固定化された固定相膜が形成される。もう一つは、遊離基発生剤から発生させた遊離基によってメチル側鎖の水素引き抜きを行わせ、Si-C-C-Si 結合によって固定相液体分子間の架橋を行うとともに、シリル化されたガラス表面に固定相液体を固定化する。

現在では後者の方法が広く用いられており、遊離基発生剤を添加した固定相液体溶液をカラムにコーティングし、固定相膜が形成されてから温度を上げて遊離基を発生させ、架橋反応を行わせる。遊離基発生剤としてベンゾイルペルオキシドなどは分解産物として安息香酸を生成するので、塩基性成分の溶出を妨げたり、シリコーン系の固定相の分解反応を促進するなどの現象が現れ、カラム性能に悪い影響を及ぼすので避けなければならない。無害の分解生成物のみを与えるという理由からジクミルペルオキシドとかアゾ化合物が広く用いられている<sup>12)</sup>。

ガンマ線を固定相膜に照射して結合電子を活性化し遊離基を発生させる方法は、外部から遊離基発生試薬を加えないのでカラム性能に悪影響を与える分解産物が生ずる心配がなく、また架橋反応は室温で行えるという長所

がある<sup>13)</sup>。固定相として用いるポリシロキサンがフェニル基あるいはシアノプロピル基を含む場合には架橋反応は進みにくくなるので、これらのグループの含量が増えるほど遊離基発生試薬の必要量も多くなり、分解産物によってカラム性能が損なわれる危険も増す。従ってフェニル基の含量はたかだか30%と考えられていたが、ビニル基あるいはトリル基を含むポリシロキサンを使用すると架橋反応が容易に進行することが明らかにされた。例えば、ビニル基4%、フェニル基70%、メチル基26%のポリシロキサンあるいはシアノプロピル基50%、メチル基40%、トリル基10%のポリシロキサンなどはビニル基あるいはトリル基の存在によって架橋は容易に進むようになる。トリル基は特に有効であってこれを側鎖の中に10%含ませるとシアノプロピル基を90%含む極性の強い固定相であっても不溶化することができる<sup>17)</sup>。

ポリエチレングリコール(PEG)は極性で選択性のある固定相として広く用いられるが、キャリアーガス中に水分とか酸素が存在すると分解するし、またかなり低い温度(220~240℃)で熱分解するという短所も持っている。このような性質を改善するため、最近 Superox と呼ばれる分子量分布のそろった高分子量のPEGが開発されている。架橋と固定化を行うことも、シリコーン系の場合と同様に、安定なPEG固定相を得る方法の一つである。最近PEGを固定化したカラムが幾つかの会社から販売されているが、製法の詳細は不明のものが多く、ここでは最近の文献に発表されたPEGの架橋と固定化の方法を紹介しよう。

GPTMSによってカラムの不活性化処理を行った後、Carbowax 20M, GPTMS, 遊離基発生試薬ジクミルペルオキシド, dibutyltin dilaurateを含む溶液をコーティングし、290℃で熱処理を行うと、メカニズムは不明であるが、固定化が達成され、300℃まで耐えるPEG固定相が得られる。また、PEGをコーティングした後、エチレンオキシド(EO)を満たし、キャピラリーカラムの両端を閉じて280℃に加熱すると、ガラス表面に存在する微量のアルカリイオンの触媒作用によってシラノール基及びPEG末端OH基へのEOの付加重合が起り固定化が達成される<sup>14)</sup>。

ジクミルペルオキシドのみを用いて直接ポリオール固定相を固定化しようとする試みもあるが、非常に薄い固定相膜を除いて一般には良い結果は得られない。そこでシリコーンの場合と同様にビニル基を含むシロキサンを介してPEG分子の架橋を行う方法が提案されている。例えば、PEGに架橋剤としてメチル(ビニル)シクロペ

ンタシロキサン(V5)あるいは1,2,3-トリビニル-1,1,3,5,5-ペンタメチルトリシロキサンを混合し、ジクミルペルオキシドを加え180~200℃に加熱して架橋反応を行うのである。こうして得られる架橋固定相は水を含むいろいろの溶媒に不溶であり、300℃の高温に耐えることができる<sup>15)</sup>。

#### 4 オンカラム試料導入法

GC分離系において分離結果に影響を及ぼす重要な要素としてカラムのほかに試料導入部がある。キャピラリーカラムは充てんカラムに比べてカラム負荷量が少ないため試料導入が困難であり、当初はもっぱらスプリット法といって試料導入部に設けられたスプリッターと呼ばれる装置によって導入試料量の大部分を系外に放出させ、数十分の1ないし数百分の1のみをカラムに注入する方法が採用された。しかし、いったん蒸発させてからスプリットするため不安定な物質は蒸発過程で分解したり、あるいは分別蒸発現象のためスプリッターに導入された試料の組成とカラムに注入された微量の試料の組成が異なることがあり、信頼できる定量分析結果を得るために解決しなければならない重要な課題とされてきた。そのためスプリットレス法、直接試料導入法など多くの方法が提案されたが、最も信頼できる方法は低温オンカラム注入法であろう<sup>21)</sup>。特殊な方法によって低温に保たれたカラムの先端部に試料溶液を直接注入するのであるが、初期のカラム温度を溶媒の沸点より数十度低く保つことによって溶媒による試料成分の濃縮効果を利用し、数μlという比較的少量の試料溶液を注入しながら試料バンドを広げることなくキャピラリーカラムの優れた分離能を充分発揮させようとした方法である。この方法の導入によって優れた定量分析結果が得られるようになり、不安定な物質でも熱分解の危険を最小限に抑えて分析することができるようになった。

#### 5 LCとキャピラリーカラムGCとの結合

GCは他のいかなる方法よりも優れた分離法であるが、それでも複雑な組成の試料を分離対象とする場合には、なお分離能の不足を痛感することがある。このような場合に2次元ガスクロマトグラフィーと呼ばれる方法を用いると、個々の成分の分離度をたいへん改善することができるが、基本的に異なる分離技術であるHPLCとキャピラリーカラムGCを組み合わせて2次元クロマトグラフィーを行うことができれば理想的であって、最も有効な分離系を組み立てることができる。もちろん従来から複雑な組成の試料のGC分析を行う場合には、あら

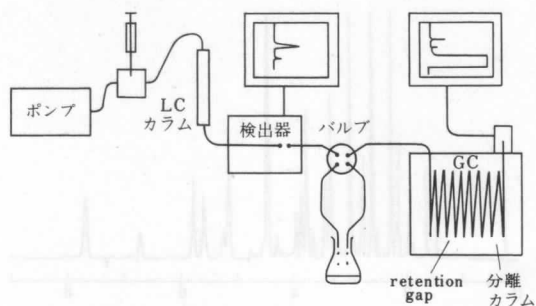
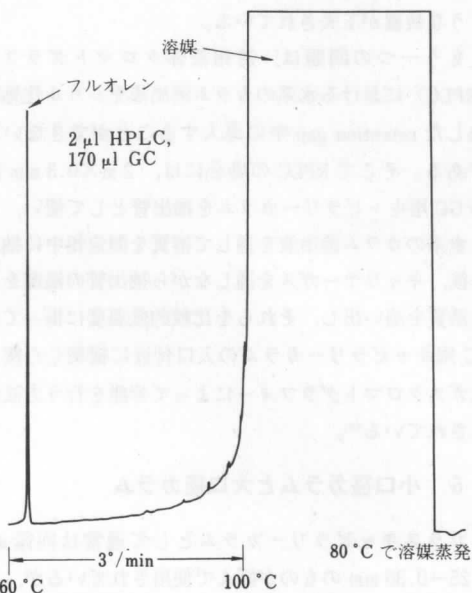


図2 retention gap 法による LC-GC 結合

はじめ LC によって試料のクリーンアップを行うとか、グループ分離を行うという方法はよく用いられた。筆者らも石炭液化油の分析において TLC と GC の組み合わせが非常に有効な分析法であることを報告してきた<sup>17)</sup>。しかし、HPLC で分離された成分を回収して更に GC 分離を行おうとすると、カラム溶出液を集め、LC の移動相溶媒を蒸発させ、数  $\mu\text{l}$  に濃縮してから GC カラムに注入するという一連の実験操作が必要であった。操作が複雑でめんどうであるだけでなく、濃縮過程で目的成分の大部分が失われることが多かった。こういう理由で HPLC と GC をオンライン結合することが望まれていたが、最近の研究によって実用的な装置が現れるのも近いのではないと思われる。

HPLC で分離された画分を直接 GC のキャピラリーカラムに注入する際に問題となることは、LC カラムでの分離過程で試料成分が希釈されることである。目的とする成分は数百  $\mu\text{l}$  のカラム溶出液に含まれるのが普通であるが、これはキャピラリーカラム GC における試料注入量の数千倍にも達する量である。しかもオンライン結合では、これだけの LC カラム溶出液がほぼ 1 分あまりの時間をかけて GC に注入されるのであるから、キャピラリーカラムの入口付近は数 m~数十 m にもわたって試料溶液によって満たされることになり、とてもキャピラリーカラムのもつ優れた分離性能を充分に発揮させることはできない。そこで K. Grob, Jr. は図 2 に示すような retention gap 法と呼ばれる方法を提案している<sup>18)</sup>。溶融シリカ製のキャピラリー分離カラムとほぼ同じ内径をもち、内壁にシリル化処理を施してあるが固定相液体をコーティングしていない長さが数十 m の裸の溶融シリカ製のキャピラリー (retention gap) を分離カラムの前に連結してカラム恒温槽の中に収容する。LC クロマトグラムを見ながら 4 方コックを切り換えることによって目的とする画分を LC ポンプの圧によってオンカラムインジェクターを通して retention gap 中に導入する。



フルオレンの 30 ppm ジクロロメタン溶液 2  $\mu\text{l}$  を HPLC カラム (Spherisorb, 100  $\times$  3 mm) に注入し、フルオレンを含む溶出液 170  $\mu\text{l}$  を retention gap に導入したときのクロマトグラム

図3 フルオレンのクロマトグラム

恒温槽の温度を LC 移動相溶媒の沸点より少し高めにしておくと溶媒は蒸発し、キャリアーガスによって運ばれ分離カラムを通過して系外に排出される。その後昇温操作を始めると目的とする成分は retention gap より分離カラムのほうへ蒸発移動するが、分離カラムには固定相液体が存在するため、目的成分はカラム入口付近で固定相液体に吸収され再濃縮される。そして温度が上昇するにつれてカラム中での移動を始め、やがて分離されて溶出する。

図 3 はフルオレン 30 ppm を含むジクロロメタン溶液 2  $\mu\text{l}$  を LC カラムに注入し、フルオレンを含むカラム溶出液 170  $\mu\text{l}$  を上述の方法により GC カラムに移して得たクロマトグラムである。GC カラム入口付近での再濃縮効果によって鋭い形のフルオレンのピークが得られており、ピーク幅は試料溶液を直接オンカラム法によって GC カラムに注入したときと同程度であり、HPLC で分離された画分を高分解能のキャピラリー GC で効率良く分離することが可能なことが分かる。しかし、この方法では、キャリアーガスの流速を 4 ml/min としたとき、約 400  $\mu\text{l}$  の溶媒を retention gap から蒸発させて GC 分析を開始するまでに 25~50 分も要する点に問題がある。そこで LC カラム溶出液を retention gap 中に導入すると同時に蒸発させる方法を採用することにより、短い retention gap を用いても多量の溶出液を導入することができ、しかも短時間に GC 分析を終了することが可能な

ような装置が工夫されている。

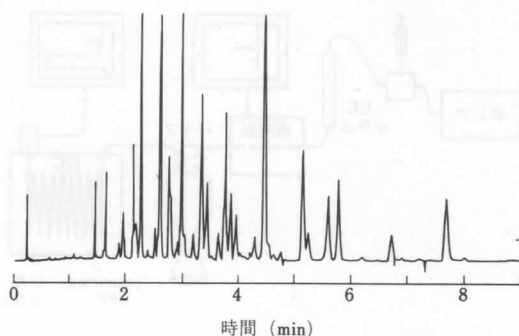
もう一つの問題は、逆相液体クロマトグラフィー (RPLC) における水系のカラム溶出液をシリル化処理を施した retention gap 中に導入することができないことである。そこで RPLC の場合には、 $2\text{ m} \times 0.3\text{ mm}$  程度の GC 用キャピラリーカラムを抽出管として使い、これに水系のカラム溶出液を通して溶質を固定相中に抽出した後、キャリアーガスを通しながら抽出管の温度を上げて溶質を追い出し、それらを比較的低温度に保ってある GC 用キャピラリーカラムの入口付近に捕集した後、昇温ガスクロマトグラフィーによって分離を行う方法が提案されている<sup>19)</sup>。

## 6 小口径カラムと大口径カラム

ガラスキャピラリーカラムとして通常は内径  $d_c$  が  $0.25\text{--}0.30\text{ mm}$  のものが好んで使用されているが、このことには確たる理論的根拠があるわけではなく、この程度の内径のキャピラリーカラムだとキャピラリー管の作製、固定相液体のコーティング、クロマトグラフィー分離などの操作が容易なことと、大抵の試料の分離に際してはほぼ満足できる高いカラム効率が得られるということに由来していると思われる。しかし、通常用いられているより内径の細い  $0.05\text{--}0.10\text{ mm}$  の小口径カラムを用いると何十万段というはるかに高い理論段数を短時間に得ることができることが理論的にもまた実験的にも明らかにされ、注目を浴びるようになった。

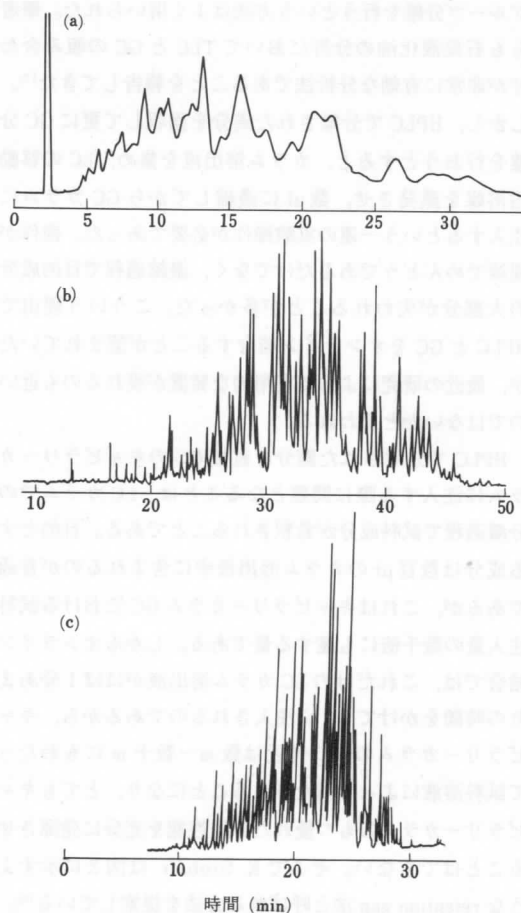
例えば、HETP の最小値  $H_{\min}$  は  $k'$  が 10 以下の場合には、ほぼ  $d_c$  に等しくなるので、 $d_c$  の減少とともに得られる理論段数は多くなる。また単位時間当たり得られる理論段数で分離速度を表現すると、分離速度も  $d_c$  減少とともに大となり、特に  $d_c$  が  $30\text{ }\mu\text{m}$  以下になると分離速度の増加の傾向は著しく、 $500\text{ 段/s}$  も可能であることが理論的に明らかにされている。実際  $4.1\text{ m} \times 55\text{ }\mu\text{m}$  の短いカラムを用いても分離時間 7 分で得られる理論段数は約 7 万にも達し、鋭いピーク形のクロマトグラムを描くことができるので、ECD を用いると約  $10^{-15}\text{ g}$  という超微量の塩素化殺虫剤でも検出できるようになることが報告されている<sup>20)</sup>。

またポリクロロビフェニル (Arochlor) を通常のガラスキャピラリーカラムで分離すると約 30 分を要するが、小口径カラムを用いると、図 4 に示すように、8 分で分離が完了する。またポリクロロカンフェン (Toxaphene) は殺虫剤として用いられるが、残留成分の生体に及ぼす毒性が問題となっている。このものには置換塩素数の異なる化合物及びそれらの異性体などが合わせて 170 種以



キャピラリーカラム (WCOT),  $4.1\text{ m} \times 55\text{ }\mu\text{m}$ , OV-1,  $225\text{ }^\circ\text{C}$

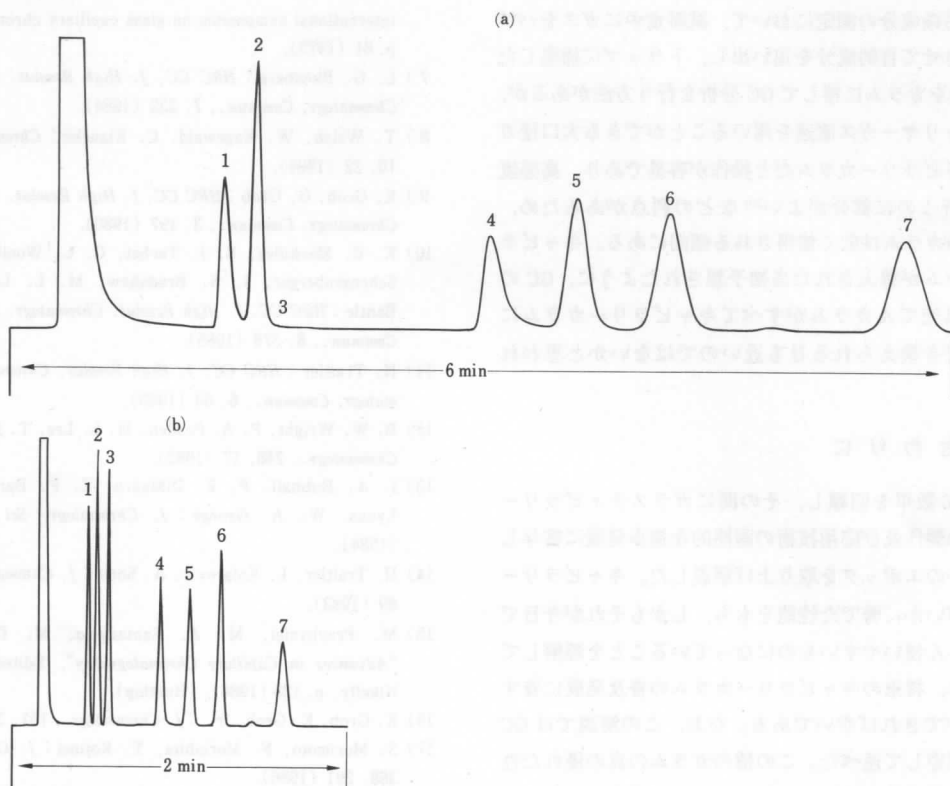
図 4 Arochlor 1260 のガスクロマトグラム



(a) 充填カラム, OV-1/クロモソル W (3%),  $185\text{ cm} \times 2\text{ mm}$ ,  $200\text{ }^\circ\text{C}$ , ECD; (b) キャピラリーカラム (WCOT), OV-1,  $30\text{ m} \times 250\text{ }\mu\text{m}$ ,  $140\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow 230\text{ }^\circ\text{C}$  ( $2\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ ), ECD; (c) 小口径キャピラリーカラム (WCOT), OV-1,  $25\text{ m} \times 104\text{ }\mu\text{m}$ ,  $180\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow 230\text{ }^\circ\text{C}$  ( $1\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ ), ECD

図 5 Toxaphene のガスクロマトグラム

上も含まれるため、全成分を同定し定量することは図 5 (a) 及び (b) に示すように極めて困難である。しかし、小口径のガラスキャピラリーカラムで分離すると、図 5



(a) 充てんカラムによるクロマトグラム——カラム：OV-101, 3%/クロモソルブ W, 6ft×2mm, 150℃, 試料注入量：1 $\mu$ l; (b) 大口径キャピラリーカラムによるクロマトグラム——カラム：OV-101, 15m×530 $\mu$ m, 150℃, 試料注入量：0.3 $\mu$ l; 1:4-クロロフェノール, 2:ドデカン, 3:1-デシルアミン, 4:1-ウンデカノール, 5:テトラデカン, 6:アセナフテン, 7:ペンタデカン

図6 充てんカラムと大口径キャピラリーカラムの比較

(c) に示すように、(b) に比べ約半分の時間で優れた分離度のクロマトグラムが得られることが分かる<sup>21)</sup>。クロマトグラムプロファイルの間の類似性をパターン認識法によって測り、汚染源の同定を行いたいような場合に、(c) のような分離度が良く、試料の特徴がよく現れたクロマトグラムを用いるとまことに都合がよい。小口径のガラスキャピラリーカラムはこのように優れた分離性能をもっているが、ガスクロマトグラフに装着してその性能を発揮させるには、もちろんキャリアーガスの圧、流速、サンプルの注入量、注入法、検出器のセル容積、時定数などの条件選定に細心の注意が必要である。

一方では、内径が0.50 mm 以上の大口径カラムのほうにも関心が寄せられている<sup>22)</sup>。カラムのサンプル負荷量はカラム断面積にほぼ比例するので、大口径カラムを用いることによって充てんカラムに匹敵するほど多くの試料量の分離が可能となるからである。もちろん、分離速度とか分離効率などの点では小口径カラムに比べて不利であるが、固定相液体膜を厚くし1~2 $\mu$ m 程度にするとサンプル負荷量を1成分当たり数 $\mu$ g 程度にまで高め

ることができ、分離速度とか分離効率以外の点でいろいろな利点をもつようになる。

例えば、i) 最近のガラスキャピラリーカラムは内壁の修飾法の進歩によって充てんカラムに比べるとはるかに化学的に不活性であるので、極性物質とか不安定物質を分離するには大口径ガラスキャピラリーカラムのほうが有利である。ii) 内径0.053 mm のガラスキャピラリーカラムでは、最適キャリアーガス速度はヘリウムで約20 cm/s という大きな値になるので、分離効率は悪いが、長いカラムを使って多くの理論段数を生み出し、充てんカラムに比べると短い時間に鋭いピーク形のクロマトグラムを得ることができる。図6は充てんカラムに比べ大口径ガラスキャピラリーカラムが分離時間、検出感度、カラムの不活性さにおいていかに優れているかを示している。iii) GC-FTIR 法は有力な分離同定手段として用いられているが、GC/MS 法と比べると検出感度が低いので良質のスペクトルを得ることが困難な場合がある。しかし、大口径ガラスキャピラリーカラムを用いることによってこの困難を克服することができる。iv) 揮発性



の水質汚染成分の測定において、試料水中にガスをバブリングさせて目的成分を追い出し、トラップに捕集した後、全量をカラムに移してGC分析を行う方法があるが、高いキャリヤーガス流速を用いることができる大口径ガラスキャピラリーカラムだと操作が容易であり、高感度検出を行うのに都合がよい<sup>23)</sup>などの利点があるため、この種のカラムは広く使用される傾向にある。キャピラリーカラムが導入された当初予想されたように、GCの分野では充てんカラムがすべてキャピラリーカラムによって置き換えられる日も近いのではないと思われる。

## 7 おわりに

過去10数年を回顧し、その間にガラスキャピラリーカラムの製作及び応用技術の画期的な進歩発展に寄与した幾つかのエポックを取り上げ解説した。キャピラリーカラムがいかに秀でた性能をもち、しかもそれが今日ではたいへん使いやすいものになっていることを理解していただき、将来のキャピラリーカラムの普及発展に資することができれば幸いである。なお、この解説ではGCのみに限定して述べた。この種のカラムの真の優れた性能はこの分野においてのみ発揮されると理論的に考えられるからである。

## 文 献

- 1) 小島次雄, 森下富士夫: 科学と工業, 57, 451 (1983).
- 2) 正田芳郎, 小島次雄編: “高分解能ガスクロマトグラフィ”, (1983), (化学同人).
- 3) M. L. Lee, B. W. Wright: *J. Chromatogr.*, 184, 235 (1980).
- 4) L. G. Blomberg, J. Buijten, K. Markides, T. Wannmann: *J. Chromatogr.*, 279, 9 (1980).
- 5) G. Schomburg, H. Husmann, F. Weeke: *Chromatographia*, 10, 580 (1977).
- 6) R. Dandeneau, E. H. Zerenner: Proceedings of the third international symposium on glass capillary chromatography, p. 81 (1979).
- 7) L. G. Blomberg: *HRC CC, J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.*, 7, 232 (1984).
- 8) T. Welsh, W. Engewald, C. Klaucke: *Chromatographia*, 10, 22 (1984).
- 9) K. Grob, G. Grob: *HRC CC, J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.*, 3, 197 (1980).
- 10) K. E. Markides, B. J. Tarbet, C. L. Woolley, C. M. Schregener, J. S. Bradshaw, M. L. Lee, K. D. Bantle: *HRC CC, J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.*, 8, 378 (1985).
- 11) H. Traitler: *HRC CC, J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.*, 6, 60 (1983).
- 12) B. W. Wright, P. A. Peaden, M. L. Lee, T. J. Stark: *J. Chromatogr.*, 248, 17 (1982).
- 13) J. A. Hubball, P. R. DiMauro, E. F. Barry, E. A. Lyons, W. A. George: *J. Chromatogr. Sci.*, 22, 185 (1984).
- 14) H. Traitler, L. Kolarovic, A. Sorio: *J. Chromatogr.*, 279, 69 (1983).
- 15) M. Przybyciel, M. A. Santangelo, M. D. Walla: “Advances in Capillary Chromatography”, Edited by J. G. Nikelly, p. 125 (1986), (Huethig).
- 16) K. Grob, K. Grob, Jr.: *J. Chromatogr.*, 151, 311 (1978).
- 17) S. Morimoto, F. Morishita, T. Kojima: *J. Chromatogr.*, 368, 291 (1986).
- 18) K. Grob, Jr., D. Fröhlich, B. Schilling, H. P. Neukom, P. Nageli: *J. Chromatogr.*, 295, 55 (1984).
- 19) K. Grob, Jr., B. Schilling: *HRC CC, J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.*, 8, 726 (1985).
- 20) C. P. M. Schutjes, E. A. Vermeer, G. J. Scherpenzeel, R. W. Bally, C. A. Cramers: *J. Chromatogr.*, 289, 157 (1984).
- 21) F. Onuska: *J. Chromatogr.*, 289, 207 (1984).
- 22) W. Jennings: “Advances in Capillary Chromatography”, Edited by J. G. Nikelly, p. 1 (1986), (Huethig).
- 23) EPA Method 502.2 and 524.2, Purgeable Halocarbons, (1986).
- 24) 小島盛昭, 塩田孝夫, 小出年男: 日本分析化学会第34年会講演要旨集, p. 612 (1985).