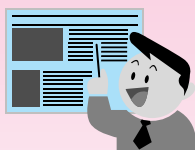


## 解説



# モノリス型シリカカラムによる HPLC の高性能化

HPLC において、一般に使用されている粒子充填型カラムより高い分離能力をもたらすモノリス型シリカカラムの構造、性能、ならびにそれが可能とする高性能分離について紹介する。

木村 宏, 池上 亨, 田中 信男

## 1 はじめに

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は、幅広い分野で応用されてきたが、近年、質量分析計 (MS) と組み合わせてプロテオーム解析やメタボローム解析など、とくに高度な分離を要求される分野において広く用いられている。高性能分離分析法としては、ほかにガスクロマトグラフィー (GC)、キャピラリー電気泳動 (CE) などが挙げられる。HPLC はこれらの分離分析法より広く適用可能であると考えられるが、その分離能力はほかの分離法に比べて一般的に低い。これは、高性能化を可能とする微粒子充填カラムが高い送液圧力を必要とするという、粒子充填型カラムの構造に付随する限界による。

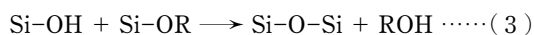
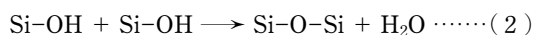
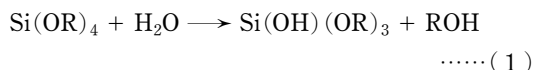
この限界を超えて HPLC の分離能力を飛躍的に増大させる手段としてキャピラリー電気クロマトグラフィー (CEC) や超高压液体クロマトグラフィー (UPLC) が開発されている。CEC については、1990 年代からの研究にもかかわらず日常的な応用例は少ない。UPLC については、非常に高性能の機器とカラムが最近市販され始めた。1000 気圧に上る圧力を用いる UPLC の実際的な分離能力と操作性に大きな興味もたれる。一方、モノリス型シリカカラムは全く異なるカラム構造を用いて、圧力と性能との関連において粒子充填型の限界を超える性能を示す。ここでは、HPLC において高い分離能力をもたらすモノリス型シリカカラムの構造、性能、ならびにそれが可能とする高性能分離について紹介する。

## 2 モノリス型シリカカラムの構造

モノリス型シリカカラムは、従来までのシリカ粒子充填型カラムと異なり三次元ネットワーク状の骨格とその空隙(流路、マクロポア、スルーポアなどと表現される)

が一体となった構造を持つ<sup>1)</sup>。骨格サイズと流路サイズは独立して制御可能で、粒子充填型カラムと比較して大きな流路により低圧での送液が可能であり、同時にその細い骨格により同等以上の性能を示すことも可能である。また、カラムが一体型でフリットが不要であり、均一溶液から高性能キャピラリーカラムの作製が容易であることも利点である。

モノリス型シリカカラムの構造上の特徴は、その調製法に由来する。モノリス型シリカの流路と骨格の共連続構造は、アルコキシシランとポリエチレングリコール (PEG) の酢酸水溶液中、スピノーダル分解に基づく相分離により生成する過渡的な秩序構造が、ゾル-ゲル転移を伴う有機シランの加水分解-重縮合反応により凍結されてつくられる<sup>1)</sup>。流路径は 0.5~10 μm、シリカ骨格に存在するメゾポアは 10~30 nm の範囲で独立して制御することが可能である。一般 HPLC 用 (ロッドタイプ) のモノリス型シリカカラムは、試験管中において有機シラン (テトラメトキシシラン: TMOS) から形成される {式(1)~(3)}。相分離の速度や、重縮合による凍結速度を変化させることによりモノリス構造を変化させることが可能であり<sup>1)~4)</sup>、それによりカラムとしての性能が変化する。



モノリス型シリカが形成された後、アンモニア処理によりシリカ骨格にメゾポアを作製する。つまり、モノリス型シリカの流路はスピノーダル分解に基づくゾル-ゲル転移により形成され、メゾポアはアンモニア処理にて調製されるので、これらは独立して制御することが可能となる。その後、熱処理により強度を持たせ、これを PEEK 樹脂にてコート (Clad) することにより、シリ

カロッドカラムとして完成する。市販のシリカロッドカラムは、約2 μmの流路、約1.5 μmのシリカ骨格からなり、骨格中に平均13 nmの細孔が存在している。

キャピラリー中のモノリス型シリカは、TMOSとPEGの酢酸水溶液をキャピラリーに注入して、管壁と結合された状態で調製される<sup>5)6)</sup>。しかし、シリカロッドの調製と大きく異なる点がある。ロッドタイプのカラムはシリカ連続体を調製後、PEEK樹脂によるCladで完成されるので、重合や熱処理によるモノリスシリカの収縮は大きな問題とはならない。しかし、キャピラリー中での調製においては、モノリスシリカが収縮によりキャピラリー壁面から剥がれると致命的な性能低下をもたらす。TMOSから調製されるモノリス型シリカカラムは、内径100 μm以下のキャピラリー中で調製が可能である。一方、4官能性シラン(TMOS)と3官能性シラン(メチルトリメトキシシラン: MTMS)の混合シラン溶液から調製されるハイブリッドモノリス型シリカカラムは、キャピラリー内径500 μmのものまで調製が可能となっている。

### 3 モノリス型シリカカラムの特性—送液圧力、透過率、カラム性能

図1にモノリスカラムの走査型電子顕微鏡(SEM)写真を示す<sup>4)5)</sup>。モノリス型シリカカラムは、粒子充填型カラムよりも大きな流路を持つことにより低圧での送液が可能となる。一般的に粒子充填型カラム内の(流路サイズ)/(骨格サイズ)比が0.25~0.4であるのに対し、モノリス型シリカカラムにおいては(流路サイズ)/(骨格サイズ)比=1~3、市販されているシリカロッドカラムでは約1.3、キャピラリーカラムでは2~3である。流路サイズと骨格サイズの和(ドメインサイズ)を変化させることにより、カラムの性能と透過率( $K$ )を変化させることができる。透過率 $K$ は、式(4)のように表され、一般的な5 μmのシリカ粒子充填カラムに

おいて $4 \times 10^{-14} \text{ m}^2$ である。モノリス型シリカカラムにおいて、透過率は $8 \times 10^{-14} \text{ m}^2 \sim 130 \times 10^{-14} \text{ m}^2$ である<sup>5)6)</sup>。大きな流路サイズは大きな透過率、低圧送液が可能とするが、同時に移動相中での試料バンドの拡がり大きいことも意味する。

$$K = \eta \eta L / \Delta P \dots\dots\dots (4)$$

HPLCによる分離は、溶質の固定相への分配の差がカラム内の移動速度の差をもたらすことにより達成される。ここで、分離度 $R_s$ は、溶質の固定相-移動相間の分配係数 $k$ {式(5):カラム内で溶質が固定相に存在する時間、 $t_R - t_0$ と移動相に存在する時間、 $t_0$ との比}、選択性を表す $\alpha$ {式(6):隣り合うピークの分配係数の比}及びカラムの理論段数( $N$ )により表される{式(7)}。大きな $N$ 、 $k$ 及び $\alpha$ がより良い分離に寄与する。

$$k = (t_R - t_0) / t_0 \dots\dots\dots (5)$$

$$\alpha = k_2 / k_1 \dots\dots\dots (6)$$

$$R_s = (\sqrt{N}/4) [ (\alpha - 1) / \alpha ] [ k / (1 + k) ] \dots\dots (7)$$

HPLCカラムの性能を表す $N$ は、ピークの溶出時間( $t_R$ )とピーク幅(半値幅 $t_{W1/2} = 2.35\sigma$ , ピーク幅 $t_W = 4\sigma$ ,  $\sigma$ はガウス分布の標準偏差)から式(8)により計算される。最適条件下でカラムの与える $N$ は、カラムに充填されている粒子の大きさ( $d_p$ )にほぼ反比例する。ある粒子径のカラム(長さ: $L$ )により得られる $N$ には限界があり、粒子径5 μm, 15 cmカラムが10000~15000段を与える。HPLCにおける粒子充填型カラムの理論段高{ $H$ :式(9)}はGiddingsにより、式(10)のような線速度( $u$ )及び粒子径( $d_p$ )依存性を持つとされている。 $d_p$ は充填剤粒子径を表しており、モノリス型シリカカラムの場合は、ドメインサイズ(骨格サイズ+流路サイズ)が考慮される<sup>3)7)8)</sup>。

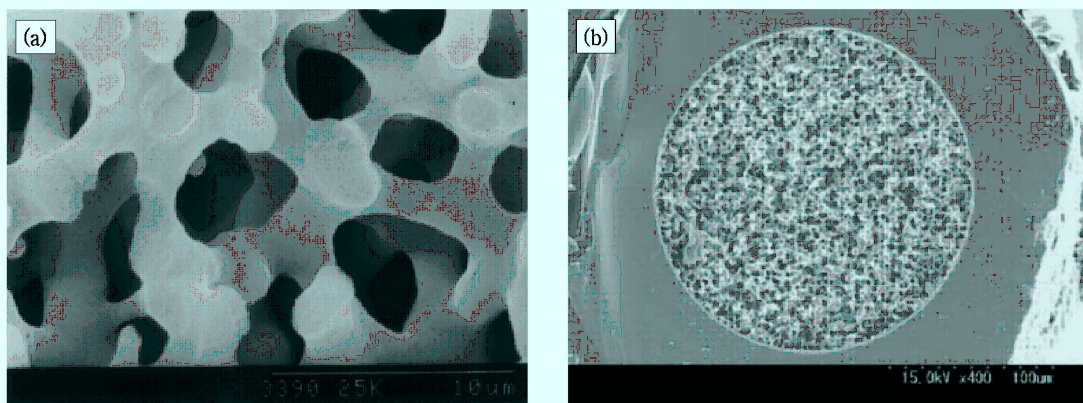


図1 試験管中でTMOSから調製されたモノリス型シリカのSEM (a)とTMOSとMTMS混合物から調製されたハイブリッド型モノリス型シリカカラム200 μm I.D. (b)

$$N = (t_R/\sigma)^2 = 5.54(t_R/t_{w1/2})^2 = 16(t_R/t_w)^2 \quad \dots\dots(8)$$

$$H = \sigma^2/L = L/N \quad \dots\dots(9)$$

$$H = 1/[1/(C_e d_p) + (D_m/C_m d_p^2 u)] + C_d D_m/u + C_{sm} d_p^2 u/D_m \quad \dots\dots(10)$$

$$\Delta P = \phi \eta u L/d_p^2, (u = L/t_0) \quad \dots\dots(11)$$

$N$ の増加は、カラム長の増加や小さな粒子径の充填剤の使用で達成されてきた。しかし、粒子径を小さくすることにより、カラム送液に必要となる圧力は、2乗に反比例して大きくなる{式(11)}。したがって、小さな粒子の使用により高性能を得る手法は、ポンプの圧力限界(通常300~400 bar, 常用圧力100~200 bar)により、実用的には5  $\mu\text{m}$ あるいは3  $\mu\text{m}$ で限界となっている。モノリス型シリカカラムにおいては、小さなシリカ骨格が高性能に寄与しており、低いカラム圧力と併せて総合的に粒子充填型カラムより高性能分離を達成する。

移動相線速度による理論段高 $H$ の変化(van Deemterプロット)は、カラム性能に最適な移動相線速度が存在することを示す<sup>5)</sup>。高い送液圧力を必要とする粒子充填型カラム( $d_p=5 \mu\text{m}$ )と比較して、モノリス型シリカカラムは、高速領域における性能の低下が小さい。これはシリカ骨格径が小さいため、溶質が固定相に分配されるときに起こる移動相中の溶質からの遅れによるバンド拡がり(第3項の寄与)が小さいことによる。

モノリス型シリカカラムを用いることにより可能になったことは、次の点である:(1)低圧送液,(2)長いキャピラリーカラムの作製,(3)高速操作と高性能分離の両立,(4)長いカラムにより高理論段数の発現,(5)高性能の担体の提供と、表面化学修飾による高理論段数を発現するカラムの調製。

Tallarekらは粒子充填型カラムと市販モノリス型シリカカラム(骨格径=約1.5  $\mu\text{m}$ , 流路=約2  $\mu\text{m}$ )の軸方向の分散について流体力学的比較と、試料負荷量の検討を行った<sup>7)</sup>。モノリス型シリカカラムは、同粒子径の粒子充填型カラムと比較してシリカ量は約1/3倍であるが、モノリスシリカ内の空隙率は粒子内に比べて大きいこと、総合的に試料負荷量は粒子充填型カラムの0.64倍程度にしか低下しないと報告している。また、バンド拡がりについて粒子充填型における $d_p=3.5 \mu\text{m}$ 相当としている。

Miyabeらは、モーメント解析法を適用して、モノリスカラム内における試料物質の保持挙動や物質移動現象を解析した<sup>8)</sup>。約80~90%の試料分子が表面拡散によってモノリス固定相内を移動しており、固定相内の物質移動に対して表面拡散が重要な役割を果たしていることを明らかにした。また、モノリスカラムと球状粒子充填カラムのクロマトグラフィー挙動を比較して、シリカロッドモノリスの相当粒子径を約4  $\mu\text{m}$ としている。

#### 4 モノリス型シリカキャピラリーカラム

一定量の試料を注入して分析を行う場合、一定長さ、一定性能のカラムを通過した後のバンド拡がり(ピーク幅)を同等と仮定すれば、試料の希釈率はカラム内径の2乗に反比例する。したがって、極微量の試料を分析する場合、サンプル量に応じてカラム径を選択することにより検出感度の改善が期待される。1970~80年代にマイクロHPLCに関する先駆的な成果が報告されている<sup>9)~11)</sup>。ここで注意しなければならないことは、カラムをマイクロ化する場合、分析システム全体をマイクロ化する必要があることである。定性分析、定量分析に10  $\mu\text{L}$ ~100 nL/minの安定した流量を維持できる高性能微量ポンプが必要であるが、汎用ポンプから送液をスプリットすることにより安定した流量を得ることが可能である<sup>12)</sup>。また、極微量のサンプル体積を注入できるインジェクターやオンカラムUV検出が、性能の維持に有効であると考えられる。

長さ25 cm, 200  $\mu\text{m}$  I.D. カラム(内容積8  $\mu\text{L}$ )にインジェクターから試料溶液10~20 nLを注入した場合、保持の小さな溶質に対して $N$ が50%以上低下することがある。100  $\mu\text{m}$  I.D.のカラムにおいてはさらに影響が大きい。この程度の試料体積のバルブ注入による性能低下は、スプリット注入や溶出力の弱い試料溶媒の使用により軽減できる。また、注入体積がカラムに対して大量である場合でもグラジエント溶出によるサンプルの濃縮により、この問題を解決できる場合もある。逆相モードの場合、試料は水系溶媒に溶解していることが望ましい。プロテオーム解析やメタボローム解析においては多くの場合、グラジエント溶出による濃縮によりサンプル注入量の問題を解決している<sup>13)</sup>。

キャピラリーモノリスカラムの評価においては、カラムをインジェクターに直接接続してスプリット注入<sup>5)6)12)</sup>を行い、1~5  $\mu\text{L}$ の試料から1~10 nLを注入している。また、オンカラム検出を行い、ゼロデッドボリュームシステムとして測定している。ここで $N/\Delta P$ (カラム圧力)と $N/t_0$ および $\eta$ (溶媒粘度)の積の逆数をとったセパレーションインピーダンス( $E$ )が総合的なカラム性能の指標となる{式(12)}。図2は、移動相線速度に対するセパレーションインピーダンスのプロットであり、低圧送液が可能なモノリス型シリカキャピラリーカラムMS(50)-Aは、総合的な性能において粒子充填型カラムより一桁近く高い性能をもたらしていることを示している。

$$E = \Delta P t_0 / \eta N^2 = (\Delta P / N) (t_0 / N) (1 / \eta) = H^2 / K \quad \dots\dots(12)$$

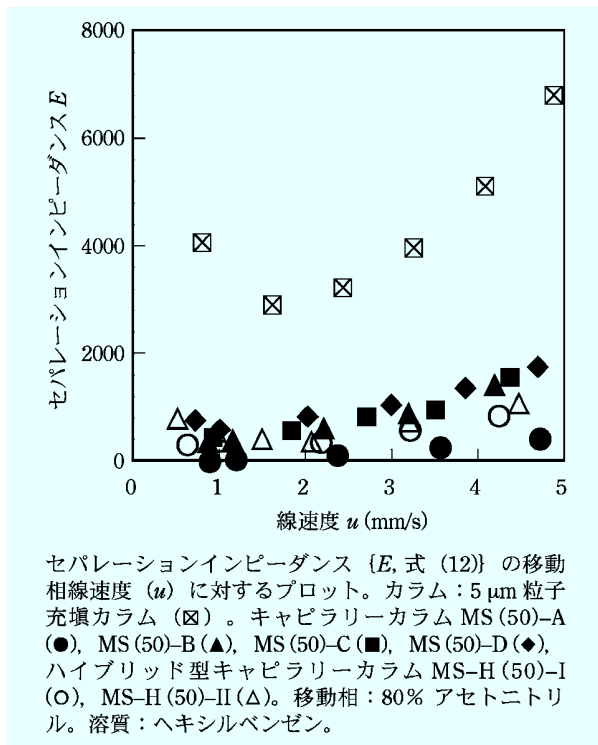


図2 モノリス型シリカカラムの総合的な性能

## 5 モノリス型シリカカラムの性能の限界と短所

モノリス型シリカカラムの短所としては、シリカカラムと化学修飾の過程を含む個別の調製の煩雑さ、厳密な再現性を得ることの困難さ、及び空隙率が大きく試料の負荷量と保持容量が小さいことなどが挙げられる。モノリス型シリカキャピラリーカラムの調製においては、 $k$  値に  $\pm 5\%$  程度のばらつきが見られる。また、CEC において電気浸透流が遅いことは、シリカが高純度であることによる。

クロマトグラフィシステムの性能限界を比較する  $\log(t_0/N)$  と  $\log(N)$  とのプロットにおいて<sup>14)</sup>、高速分離に対応する領域、例えば  $t_0=10$  s で  $N=10000$  を発現する場合においては、モノリス型シリカカラムの性能と粒子充填型カラムの性能は非常に近い。さらに、高速領域での粒子充填型カラムの性能限界に相当するモノリス型シリカカラムは、まだ調製されていない。モノリス型シリカカラムの大きな流路とネットワーク構造の不均一性をもたらす移動相中のバンド拡がり、この領域における性能を支配していると考えられる。Vervoort らは、コンピュータ上で均一なモノリス型シリカ構造を作製し、流体力学からバンド拡がりをシミュレーションした<sup>15)</sup>。その中で、モノリス型シリカカラムはさらなる均一性を持つことにより、性能の向上が期待されると報告している。

## 6 モノリス型シリカカラムの表面修飾

モノリス型シリカカラムは1本ずつ調製されるので、オンカラム反応に付随する困難があり、また再現性が問題となる場合がある。しかし、高性能の担体がカラムとなった状態として調製されるので、化学修飾後、粒子をカラムに充填する過程なしに、機能化された高性能のカラムを得ることができる利点もある。内径  $200 \mu\text{m}$ 、長さ  $1$  m のキャピラリー中モノリスシリカに存在するシラノール基量は約  $18 \mu\text{mol}$  であり、必要となる試薬、反応溶液は少量である。モノリス型シリカカラムの表面修飾方法には、(1)モノリスシリカを表面修飾した後、Clad によりカラム形成を行うバッチ修飾法と、(2)Clad されたモノリス型シリカカラムあるいはキャピラリーカラムに反応溶液を送液することにより、表面修飾を行うオンカラム修飾法とがある。後者は、高性能カラムの充填法開発が困難であった固定相を結合した粒子、とくにキラル分離用カラムに対して有利である。現在市販されている逆相 HPLC 用 C18 型固定相のほか、今後種々の固定相による機能化が行われるものと考えられる。

Lubda らは、 $\beta$ -シクロデキストリン (CD) をシリカロッドカラムに表面修飾した<sup>16)</sup>。その中で、アミノプロピルシランによるバッチ修飾法とオンカラム修飾法との比較を行い、後者を採用して得られた  $\beta$ -CD モノリス型シリカカラムにより高速キラル分離を達成している。そのほかに、*tert*-ブチルカルバモイルキニンを修飾したシリカロッドカラムを6本連結し、カラム長を  $60$  cm として高速分離を達成している<sup>17)</sup>。同様に Chankvetadze らは、セルロース誘導体を結合して、ロッドカラム及びキャピラリーカラムにおいて高速キラル分離を可能としている<sup>18)19)</sup>。Chen らは、モノリス型シリカキャピラリーカラムにスパーサーを修飾し、キラルセクターとしてアミノ酸誘導体などを結合させることによりキラル固定相を得ている<sup>20)21)</sup>。Liu らは、モノリス型シリカキャピラリーカラムにアビジンを吸着により固定化し<sup>22)</sup>、HPLC において  $66000$  段/m、CEC において  $122000$  段/m の性能を発現している。Ikegami らは、未修飾  $\beta$ -CD、メチル化  $\beta$ -CD、及びフェニルカルバモイル化  $\beta$ -CD をモノリス型シリカキャピラリーカラムに修飾して、HPLC においてカラム長  $29$  cm で  $N=33000$  段を発現している<sup>23)</sup>。

Kato らは、シリカモノリスカラムの調製時に、ウシ血清アルブミンまたはオボムコイドを加えてゲル化することにより、タンパク質をシリカ内にカプセル化して、キラル分離能を有するモノリス型シリカカラムを調製している<sup>24)</sup>。タンパク質導入量と分離能の検討を行い、CEC により  $72000$  段/m を発現している。Kato らはまた、トリプシン固定化リアクターを調製し、オンライン

反応を可能としている。これらの例は、このタイプのカラムの新しい調製法、機能化法を示している<sup>25)</sup>。

ODS型モノリスカラムを修飾した例として、Xuらは、ラウリル硫酸リチウム水溶液を送液することによりコートしたC18型シリカロッドカラムを用いて、水素イオン、マグネシウムイオン、及びカルシウムイオンの高速分離を達成している<sup>26)</sup>。

## 7 モノリス型シリカカラムによる高速分離とピークキャパシティの増大

高速分離を可能とするモノリス型シリカカラムは、とくにMSと組み合わせたハイスループット分析において非常に有効であると考えられる。Volmerらは、シリカロッドモノリスカラムを用いて、大気圧化学イオン化法による検出を行い1~8 mL/minにより検出感度、分離性能の比較を行っている<sup>27)</sup>。8 mL/minにおいても大きな感度の低下はなく、30秒でazaspiracid biotoxinsの高性能分離を達成している。

Dengらは、自動ウェルプレート処理装置に代わるシステムを、4本のシリカロッドモノリスカラムを並列に用いることにより構築している。1サイクルを2分で終了することにより、10時間で96試料のウェルプレート12枚に相当する試料を処理したと報告している<sup>28)</sup>。Leinweberらは、モノリス型シリカキャピラリーカラム、及び5 μmまたは10 μm粒子充填型キャピラリーカラム（カラム長10 cm）において、高速でのペプチドスクリーニングを検討した<sup>29)</sup>。システム限界圧力320 barにおいて送液し、同じグラジエント時間における分析を行っている。その結果、高流速でのグラジエント分離が有効であり、その中でもモノリス型シリカカラムは最も良い分離を示したことを報告している。このようにモノリス型シリカカラムの使用により、分析時間を大幅に短縮することが可能であり、生産性の向上を図ることができる。

モノリス型シリカカラムは、ポリペプチドなどの巨大分子の分離においても有利である<sup>30)</sup>。モノリス型シリ

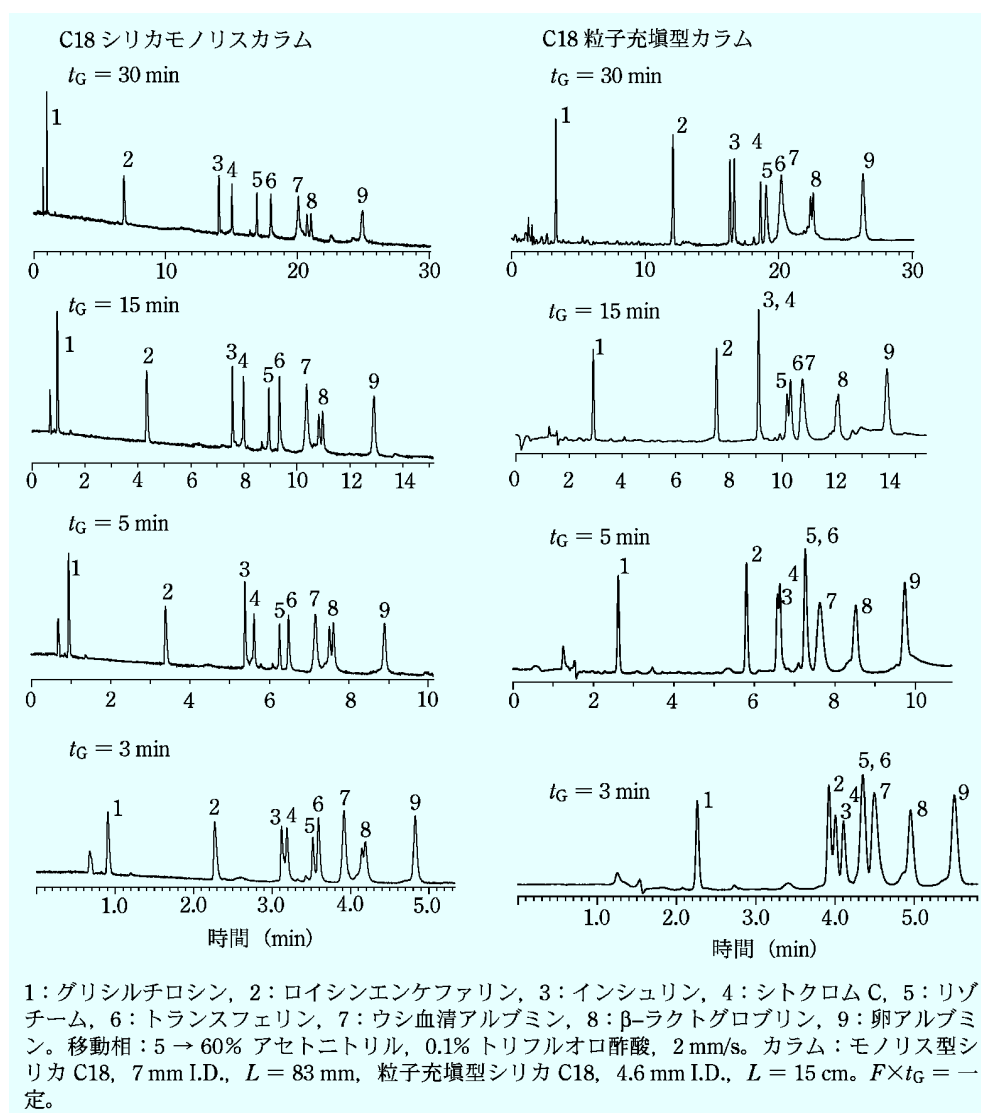


図3 ポリペプチドに対するシリカモノリスカラムと粒子充填型カラムの分離比較

カラムの小さな骨格径が分離能に大きく寄与していることは前述したとおりであるが、巨大分子のように細孔内で拡散速度が小さいような試料に対しては、その寄与はさらに大きくなる。図3に、シリカロッドカラムを用いてポリペプチドを分離したクロマトグラムを示す。この比較は、流速 ( $F$ ) $\times$ グラジエント時間 ( $t_G$ ) $=$ グラジエント体積 ( $V_G$ )一定で行った比較であるが、骨格径が小さなモノリス型シリカカラムにおいてはバンド拡がり小さく、短い  $t_G$  においても良い分離を示し、分析時間の短縮が可能である。粒子充填型カラムにおいてもバンド拡がりの寄与を小さくするために、細孔を持たない非多孔性シリカ粒子により改善が図られているが、表面積が小さいので試料保持能が減少し、試料の負荷量も減少する。

モノリス型シリカキャピラリーカラムは、必要とするサンプル量が極微量 (1~50 nL) であるので、LC/MS における貴重試料の解析に向いているだけでなく、フリットレスであるため、その取り扱いが非常に簡便であ

る。また、従来以上の低圧送液が可能なことにより長いカラムを使用し、その分離能を上げることも可能である。

図4に、30 cm~90 cm の C18 基修飾ハイブリッドモノリス型シリカキャピラリーカラムによるシロイヌナズナ細胞抽出液のアセトニトリルグラジエント LC/ESI-MS の結果を示す<sup>31)</sup>。ゆるやかなグラジエント溶出 (大きな  $t_G$ ) を用いて、より長いカラムを使用することにより、分離が大きく改善されている。同時に MS 検出においても改善が見られる。MS 検出において、イオン化されやすい試料とイオン化されにくい試料が同時に溶出した場合、イオン化されにくい試料はイオン化されずに検出されない場合がある。MS 検出の前段階において試料を可能な限り分離しておくことは MS 解析において重要であり、カラム長を増加させて分離能を増加させるアプローチは理解しやすいものである。

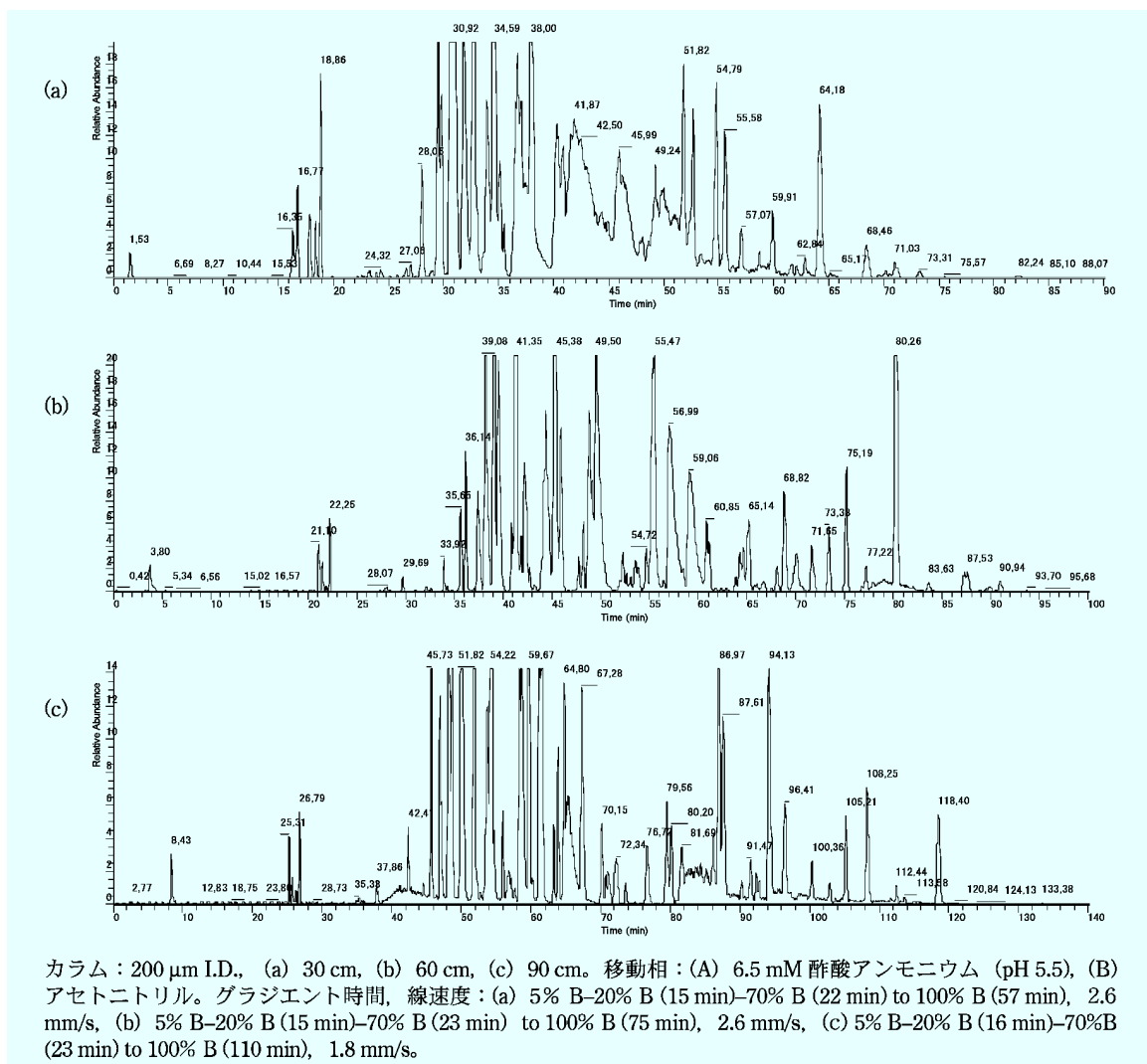


図4 30~90 cm のハイブリッドモノリス型 C18 キャピラリーカラムによるシロイヌナズナ葉抽出物の分離

## 8 二次元 HPLC

数百から数千という膨大な数の物質を含む試料を網羅的に解析することが LC/MS において求められている。この程度 of 分離を一段階のクロマトグラフィーで達成することは現実的に不可能であると考えられる。これを短時間で達成しようとする一つの方法が二次元 (2D-) HPLC である。一分析で完全分離 ( $R_s=1$ ) することができる最大のピーク数をピークキャパシティ {PC, 式 (13)} という。 $t_1$ ,  $t_R$  はそれぞれ最初のピークと最後のピークの溶出時間である。PC はクロマトグラフィー系が潜在的にどの程度 of 分離能力を持つかを示すものであり、分離システムの性能評価の指標として用いられる。

$$n = 1 + (\sqrt{N}/4) \ln(t_R/t_1) \dots\dots\dots (13)$$

$$n_{2D-HPLC} = n_{1st-D} \cdot n_{2nd-D} \dots\dots\dots (14)$$

超臨界流体クロマトグラフィーや UPLC においては、1 時間で PC=300 を得ることが可能である<sup>32)</sup>。HPLC の場合、PC=100~200 を発現する。複数のクロマトグラフィー系を組み合わせた場合、全体の PC は原理的には、各クロマトグラフィー系の PC の積で表される {式 (14)}。完全 2D-HPLC の実現には高速分離が課題である。これは、第一次元 (1st-D) 分離からのフラクシヨ

ンをすべて第二次元 (2nd-D) で分離するために、2nd-D に非常に速い分離法が要求されるからである。通常、1st-D と 2nd-D は異なる分離原理を使用する。Jia らはモノリス型シリカキャピラリーカラムを用いる HPLC を 1st-D として、2nd-D の CE と接続した例を報告している<sup>33)</sup>。プロテオーム解析においては、イオン交換クロマトグラフィーによりいくつかの分画に分けた後、各分画の濃縮を経て逆相 HPLC により精密分離することが一般的である。イオン交換型固定相は速い分離には適していないので、1st-D において長いグラジエントを用いて溶出される。2D-HPLC における主な PC は逆相モードによってもたらされる。粒子充填型カラムを超高速で使用するのには性能と圧力において困難である場合が多いので、2nd-D には複数のカラムが使用される場合が多い。Unger らは 1st-D にイオン交換、2nd-D に非多孔性の C18 型粒子充填カラムを 4 本用いることにより、PC=3000/96 min という高性能システムを報告している<sup>34)</sup>。

モノリス型シリカカラムが高速で使え、高速領域での性能低下が小さい点は、2D-HPLC に非常に適している。2nd-D にモノリス型シリカカラムを使用した 2D-HPLC の一例を示す。図 5 は、フッ化アルキル基 (FR) 結合シリカ粒子充填型 1st-D カラム (4.6 mm

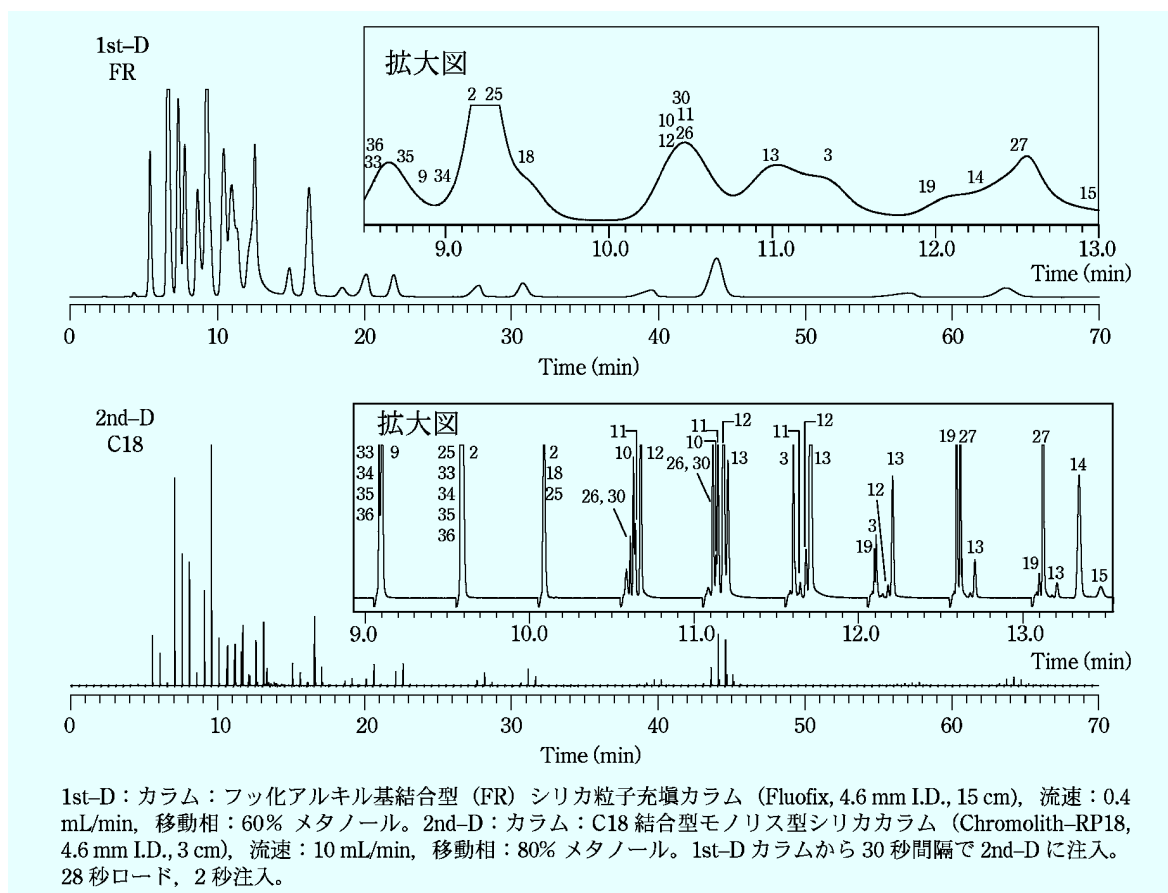


図 5 単純 2D-HPLC による炭化水素およびベンゼン誘導体混合物の分離<sup>35)</sup> (1st-D および 2nd-D のクロマトグラム)

I.D., 150 mm) を短い C18 結合モノリス型高速 2nd-D カラム (4.6 mm I.D., 30 mm) と結合し, 単純に 1st-D の溶出液を 2nd-D のインジェクターループに導入することにより, 逆相モードにおいて 2D-HPLC を行うスキームとその結果である<sup>35)</sup>. 1st-D 分画の 2nd-D への注入を 30 秒間隔とし, 28 秒間ループにロードし, 2 秒間注入する最も単純な 2D-HPLC を達成している。図 5 において 1st-D 分離後, 30 秒の分画に多くの溶質が共存しているが, 次の 30 秒間で 2nd-D においていくつかのピークに分離されている。2nd-D のクロマトグラムを 1st-D の時間軸に対してプロットすると, 二次元クロマトグラムが得られる (図 6)。

モノリス型シリカカラムは, 移動相線速度 10 mm/s の高流速に耐え, 2nd-D における 30 秒の分析で PC = 17 をもたらした。1st-D の PC は約 60 であり, 2D-HPLC の最大 PC は約 1000 と計算される。溶質の構造によって一群の溶出位置となり, 2D-GC と同様, 2D-HPLC は混合物の分離とともに溶質の構造に関する情報をもたらす。この場合, フッ化アルキル基を持つ FR 固定相においては溶質の分極率の小ささが保持に寄与し, C18 固定相においては溶質の疎水性と分極率の大きさが大きな寄与をすることにより, 二次元分離が可能となっている。2D-HPLC は, そのシステムの分解能の高さ, システムの自動化, MS への接続の可能性, そして分析時間の短縮といった利点を持つ。現在, 開発が行われおり, 近い将来複雑な試料に対する LC/MS 標準システムになる可能性がある。

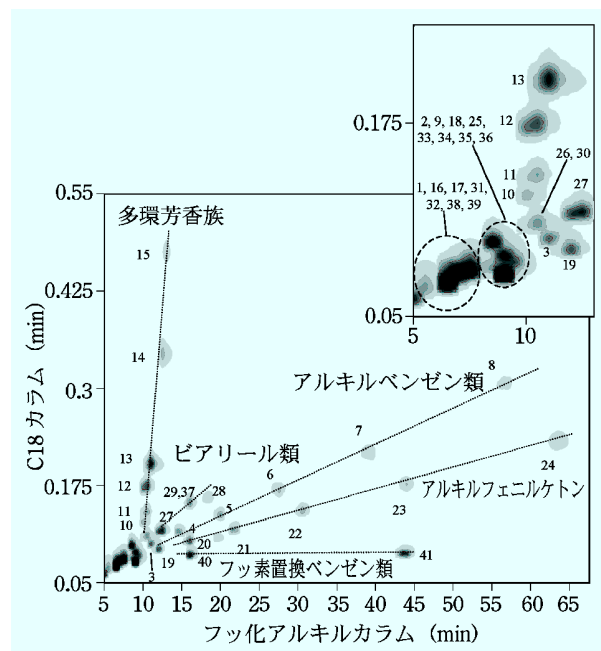


図 6 逆相 2D-HPLC による炭化水素およびベンゼン誘導体混合物分離の二次元クロマトグラム (図 5 の 2nd-D クロマトグラムから再構成)

## 9 おわりに

モノリス型シリカカラムの使用により, 従来, 不可能であった高速あるいは高性能分離が達成できる例が報告されている。モノリス型シリカカラムは, 従来の HPLC カラムの概念を超えた形状と使用法で広く適用されるものと思われる。同時に低圧力, 高速ではあるが, カラム長あたりの高性能を達成することは容易でないというモノリス型シリカカラムの性能の限界も明らかとなってきた。カラム内の空隙率を調整することにより高性能化が可能となることが示され, 新しい内部構造のモノリス型分離媒体の開発とともに, このタイプのカラムの UPLC, CEC あるいは SFC への適用により, 一層の高性能分離が可能となることを期待したい。

## 文 献

- 1) K. Nakanishi : *J. Porous Materials*, **4**, 67 (1997).
- 2) H. Minakuchi, K. Nakanishi, N. Soga, N. Ishizuka, N. Tanaka : *Anal. Chem.*, **68**, 3498 (1996).
- 3) H. Minakuchi, K. Nakanishi, N. Soga, N. Ishizuka, N. Tanaka : *J. Chromatogr. A*, **797**, 121 (1998).
- 4) N. Tanaka, H. Kobayashi, K. Nakanishi, H. Minakuchi, N. Ishizuka : *Anal. Chem.*, **73**, 420A (2001).
- 5) M. Motokawa, H. Kobayashi, N. Ishizuka, H. Minakuchi, K. Nakanishi, H. Jinnai, T. Ikegami, N. Tanaka : *J. Chromatogr. A*, **961**, 53 (2002).
- 6) N. Ishizuka, H. Kobayashi, H. Minakuchi, K. Nakanishi, K. Hirao, K. Hosoya, T. Ikegami, N. Tanaka : *J. Chromatogr. A*, **960**, 85-96 (2002).
- 7) F. C. Leinweber, U. Tallarek : *J. Chromatogr. A*, **1006**, 207 (2003).
- 8) K. Miyabe, A. Cavazzini, F. Gritti, M. Kele, G. Guiochon : *Anal. Chem.*, **75**, 6975 (2003).
- 9) D. Ishii : *Jasco Report*, **11**(No. 6), 1 (1974).
- 10) K. Hibi, D. Ishii, I. Fujishima, T. Takeuchi, K. Nakanishi : *J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.*, **1**, 21 (1978).
- 11) T. Tsuda, M. V. Novotony : *Anal. Chem.*, **50**, 632 (1978).
- 12) T. Takeuchi, S. Tatsumi, S. Masuoka, K. Hirose, H. Uzu, J. Jin, C. Fujimoto, K. Ohta, K. Lee, J. Ryoo, S. Choi : *J. Chromatogr. A*, **1021**, 55 (2003).
- 13) L. Jia, N. Tanaka, S. Terabe : *J. Chromatogr. A*, in press (2004).
- 14) H. Poppe : *J. Chromatogr. A*, **778**, 3 (1997).
- 15) N. Vervoort, P. Gzil, G. V. Baron, G. Desmet : *J. Chromatogr. A*, **1030**, 177 (2004).
- 16) D. Lubda, K. Cabrera, K. Nakanishi, W. Linder : *Anal. Bioanal. Chem.*, **377**, 892 (2003).
- 17) D. Lubda, W. Lindner : *J. Chromatogr. A*, **1036**, 135 (2004).
- 18) B. Chankvetadze, C. Yamamoto, Y. Okamoto : *Chem. Lett.*, **32**, 850 (2003).
- 19) B. Chankvetadze, C. Yamamoto, N. Tanaka, K. Nakanishi, Y. Okamoto : *J. Sep. Sci.*, in press.
- 20) Z. Chen, K. Uchiyama, T. Hobo : *J. Chromatogr. A*, **942**, 83 (2002).
- 21) Z. Chen : *Chromatography*, **25**, 9 (2004).



- 22) Z. Liu, K. Otsuka, S. Terabe, M. Motokawa, N. Tanaka : *Electrophoresis*, **23**, 2973 (2002).
- 23) T. Ikegami, Y. Miyaji, W. Kajiwara, H. Fujita, K. Hosoya, N. Tanaka : *Chromatography*, **25**, 5 (2004).
- 24) M. Kato, K. Sakai-Kato, N. Matsumoto, T. Toyo'oka : *Anal. Chem.*, **74**, 1915 (2002).
- 25) K. Sakai-Kato, M. Kato, T. Toyo'oka : *Anal. Chem.*, **74**, 2943 (2002).
- 26) Q. Xu, M. Mori, K. Tanaka, M. Ikedo, W. Hu : *J. Chromatogr. A*, **1026**, 191 (2004).
- 27) D. A. Volmer, S. Brombacher, B. Whitehead : *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **16**, 2298 (2002).
- 28) Y. Deng, J. Wu, T. L. Lloyd, C. L. Chi, T. V. Olah, S. E. Unger : *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **16**, 1116 (2002).
- 29) F. C. Leinweber, D. G. Schmid, D. Lubda, K. Wiesmuller, G. Jung, U. Tallarek : *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **17**, 1180 (2003).
- 30) H. Minakuchi, N. Ishizuka, K. Nakanishi, N. Soga, N. Tanaka : *J. Chromatogr. A*, **828**, 83 (1998).
- 31) V. V. Tolstikov, A. Lommen, K. Nakanishi, N. Tanaka, O. Fiehn : *Anal. Chem.*, **75**, 6737 (2003).
- 32) J. E. MacNair, K. D. Patel, J. W. Jorgenson : *Anal. Chem.*, **71**, 700 (1999).
- 33) L. Jia, B. Liu, S. Terabe, T. Nishioka : *Anal. Chem.*, **76**, 1419 (2004).
- 34) K. Wagner, T. Miliotis, G. Marko-Varga, R. Bischoff, K. K. Unger : *Anal. Chem.*, **74**, 809 (2002).
- 35) N. Tanaka, H. Kimura, D. Tokuda, K. Hosoya, T. Ikegami, N. Ishizuka, H. Minakuchi, K. Nakanishi, Y. Shintani, M. Furuno, K. Cabrera : *Anal. Chem.*, **76**, 1273 (2004).



木村 宏 (Hiroshi KIMURA)

京都工芸繊維大学繊維学部高分子学科 (〒606-8585 京都市左京区松ヶ崎御所海道町)。京都工芸繊維大学繊維学部高分子学科卒。同大学博士前期課程在学中。《現在の研究テーマ》多次元液体クロマトグラフィーの設計と評価, 多成分分離法の開発。《趣味》寺・神社巡り。  
E-mail : b8330030@ipc.kit.ac.jp



池上 亨 (Tohru IKEGAMI)

京都工芸繊維大学繊維学部高分子学科 (〒606-8585 京都市左京区松ヶ崎御所海道町)。京都大学大学院理学研究科博士後期課程修了。博士(理学)。《現在の研究テーマ》クロマトグラフィー分離媒体の合成と評価, 微量有機合成法の開発。《主な著書》“Houben-Weyl, Science of Synthesis, Vol. 4” (分担執筆) (Thieme)。《趣味》能楽鑑賞, 茶道, ガーデニング。  
E-mail : ikegami@kit.ac.jp



田中信男 (Nobuo TANAKA)

京都工芸繊維大学繊維学部高分子学科 (〒606-8585 京都市左京区松ヶ崎御所海道町)。京都大学大学院理学研究科博士後期課程修了。博士(理学)。《現在の研究テーマ》クロマトグラフィー分離媒体に関する研究, 精密分離法に関する研究。《主な著書》“メタボローム研究の最前線” (分担執筆) (シュプリンガー・フェアラーク東京)。《趣味》テニス。  
E-mail : nobuo@kit.ac.jp

## 新刊紹介

### ブロウ 生命系のための X 線解析入門

D. Blow 著, 平山令明 訳

本書は, Oxford University Press から 2002 年に出版された書を翻訳出版した書である。書名にあるとおり, タンパク質の構造解析への応用を念頭に, 生命科学者向けに X 線構造解析の実際が解説されている。本質的に難解な結晶学, X 線回折法, 同型置換法などがわかりやすくなるよう, 平易な図が多用されている。構造解析の実際がどのようなものであるか, ざっと理解する上で必要な要素は網羅されているので, まさしく入

門編として有用な一冊である。本書は 2 部構成になっており, 第 I 部の基礎編では五つの章で, X 線, 結晶と対称性, フーリエ変換, 回折現象, X 線回折法の順に解説されている。特に難解である結晶の対称性については, 図が多用されていて各対称性の違いがイメージしやすいように工夫されている。フーリエ変換の解説も難しい数学は少なく, 波の重ね合わせが実感できるよう, 図が多用されている。第 II 部の実践編は, 第 6 章から第 13 章までの計 8 章からなる。第 6 章はデータの収集技術, 第 7 章は同型置換法, 第 8 章は X 線の異常散乱, 第 9 章は分子置換法の結晶構造の基礎的な解析技術が解説されている。それに続く 4 章は得られた電子密度から構造を決めていく手法の解説で, 電子密度マップの見方, 構造の最適化, 解析結果の評価法が解説されている。

(ISBN 4-7598-0949-X・A5 判・282 ページ・4,600 円+税・2004 年刊・化学同人)