



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

## 超高分解能キャピラリー液相分離システムの開発

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2008-03-12 キーワード (Ja): 液相分離システム, キャピラリーカラム, モノリス型シリカ, 粒子充填型カラム, グラジエント溶離, 理論段数 キーワード (En): 作成者: 竹内, 豊英 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/20.500.12099/2829">http://hdl.handle.net/20.500.12099/2829</a>

---

# 超高分解能キャピラリー液相分離システムの開発

---

1 6 5 5 0 0 7 1

## 平成16年度～17年度科学研究費補助金 (基盤研究(C)) 研究成果報告書

平成18年5月

研究代表者 竹内豊英

岐阜大学工学部教授

目次

	頁
1. 研究課題	1
2. 研究課題番号	1
3. 研究期間	1
4. 研究組織	1
5. 交付決定額	2
6. 研究成果の要約	2
7. 研究発表	9
(1) 学会誌等	9
(2) 口頭発表等	9
8. 研究論文写し	11

## はしがき

本研究報告書は、平成16年度～17年度文部科学省研究費補助金(基盤研究(C))(研究課題番号16550071)によって行った「超高分解能キャピラリー液相分離システムの開発」についてその成果をまとめたものである。

### 1. 研究課題

超高分解能キャピラリー液相分離システムの開発

### 2. 研究課題番号 16550071

### 3. 研究期間 平成16年度～17年度

### 4. 研究組織

研究代表者 竹内豊英 (岐阜大学工学部 教授)

### 5. 交付決定額 (配分額) (金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成16年度	2,100,000	0	2,100,000
平成17年度	800,000	0	800,000
総計	2,900,000	0	2,900,000

## 6. 研究成果の要約

液体クロマトグラフィーは、分離分析ならびに分取を用途とし、現在では様々な科学技術を支える重要な技術となっている。通常、液体クロマトグラフィーは、内径 4.6 mm、長さ 150～250 mm の管に、粒径 5～10  $\mu\text{m}$  の微粒子（充填剤）を充填した分離カラムを用い、移動相溶媒を毎分 1 ml 程度の流量で流して、目的とする成分を複雑なマトリックスから分離する方法である。

しかしながら、液体クロマトグラフィーでは、移動相溶媒の流量が毎分 1 ml 程度と比較的多量であることから、①多量の廃溶媒が生じる、②液体クロマトグラフィーの理想的な検出器である質量分析計の使用が制限される、③高性能化や高速化を図ることが困難であるなどの重大な問題を抱えている。これらの問題は、主として分離カラムのダウンサイジングによって達成できる。

液体クロマトグラフィーにおける分離カラムのダウンサイジングは、1970 年代後半から、研究が推進された。この研究では、内径 0.25～0.35 mm の石英製の毛細管（キャピラリー）に従来の充填剤を充填することにより、分離カラムのダウンサイジングが図られ、分離カラムとして非常に高いポテンシャルを有することが実証された。しかしながら、このようなキャピラリーカラムを組み込んだシステムは現在まであまり普及していない。これは、キャピラリーカラムの性能が通常のものとはほとんど変わっていないためであると思われる。一方、ヘリウムなどの気体を移動相とするガスクロマトグラフィーにおいては、高性能フューズドシリカキャピラリーカラムが開発され、キャピラリーガスクロマトグラフィーの普及につながった。液体クロマトグラフィーにおいても、高性能キャピラリーカラムの開発は通常液体クロマトグラフィーの抱える諸問題の解決と、キャピラリー液体クロマトグラフィーの普及を意味すると考えられる。

近年、京都大学・京都工芸繊維大学及び浜松医科大学の研究グループらによって、充填剤が一体化した、新規かつ高性能な液体クロマトグラフィー用のキャピラリーカラム（モノリス型キャピラリーカラム）が開発された。このモノリス型カラムの最大の特徴は、比較的大きな貫通型の孔（スルーポア）と 10 nm 程度の非貫通型の孔（メソポア）を併せ持ち、シリカ骨格の大きさを独自に制御可能なことから高性能な長いカラムの調製が可能となり、高分離能を達成する点にある。しかしながら、*in situ* 法では現在まで内径 100  $\mu\text{m}$  以下のモノリス型カラムの調製に成功しているに過ぎない。モノリス型キャピラリーカラムを液体クロマトグラフィー用のカラムとして普及させるためには、

現在の周辺技術の進展状況から内径 100~500  $\mu\text{m}$  のカラムを調製する必要がある。そこで、本研究では、ゾル・ゲル法を用いてキャピラリー内に *in situ* で一体型のシリカ系固定相を再現性よく生成させる方法を確立し、キャピラリー液体クロマトグラフィーの高性能化を図った。その上で、ユーザーフレンドリーなキャピラリー分離計測システムを構築し、その普及を目指すものである。併せて、プロテオーム解析を視野に入れた高分解能キャピラリー分離システムの開発を行った。

本研究で開発するキャピラリー液体クロマトグラフィーシステムは、流量が毎分数  $\mu\text{l}$  程度と低いので、クロマトグラフィーの理想的な検出器である質量分析計との直結を容易にする。また、廃溶媒の量が数百分の一に低減されるので、環境に低負荷な分離計測システムである。さらに、モノリス型キャピラリーカラムは、次世代の超高性能分離分析法としてその開発動向が注目されている電気クロマトグラフィーの分離カラムとしても最適なものである。これらの成果について以下の項目に分けて概要を述べる。

## 6.1 実験

### 6.1.1 装置

分離カラムには粒子充填型キャピラリーカラムおよびモノリス型シリカキャピラリーカラムを調製した。測定装置には、主に 0.5 ml のガスタイトシリンジを装着したマイクロフィーダー（東電機工業製）をポンプとして用い、UV-970 紫外可視分光計（日本分光製）を検出器として用いた。試料は、各種バルブインジェクターにより、0.02~0.2  $\mu\text{L}$  注入した。分離カラムは、急激な温度変化を避けるためできる限り水槽に浸した。詳細は、個々の研究論文の実験項に記載した。

### 6.1.2 試薬

試薬は、ことわりのない限り和光純薬工業より入手し、とくに前処理をせずにそのまま用いた。純水は、GS-590 water distillation system（Advantec）によって調製した。また、HPLC 用の蒸留水およびアセトニトリルを併せて使用した。

### 6.1.3 修飾剤の構造と修飾の方法

孔径の異なる各種シリカ系強塩基性陰イオン交換体は東ソーより入手した。各種陰イオン交換体を、内径 0.32 mm、長さ 10 cm の熔融シリカキャピラリーに充てんし、10 mM 硫酸ナトリウムおよび水で洗浄後、0.1~1% の修飾剤を含む水溶液をポンプにより流速  $4.2 \mu\text{l min}^{-1}$  で 0.5 ml 通液することによって修飾固定相を調製した。用いた修飾剤の構造を Fig.1 に示す。用いた修飾剤は、それぞれ官能基の種類や構造が異なるが、共通して硫酸基などの陰イオン性の基を有しており、修飾剤は、これらの陰イオン性の基を通して陰イオン交換体に静電的に導入される。

## 6・2 海水中微量陰イオンの定量のためのモノリス型シリカキャピラリーカラムの開発

### 6・2・1 はじめに

海水中に含まれる微量イオンのイオンクロマトグラフィーによる定量は、高濃度のマトリックスイオンの妨害のために困難な場合が多い。これを解決するためにイオン交換容量の大きなイオン交換体を用い、溶離液に高濃度の塩化ナトリウムを含む水溶液を用いることがある。本研究では、交換容量の大きなシリカ系モノリス型キャピラリーカラムを調製し、海水試料に適用できる固定相の検討を行った。

### 6・2・2 装置

溶離液は定圧モードまたは定流量モードの2通りで送液した。定圧モードの場合にはガスボンベからの窒素圧を利用するか、あるいは HPLC 用ポンプを定流量モードで運転した。定流量の場合には、シリンジ型ポンプを用いた。試料は、オンカラムで少量加圧法により導入するか、20nL のキャピラリー LC のインジェクターを使用しスプリットすることなく全量をカラムに導入した。検出はオンカラム方式で紫外吸光度を測定した。

### 6・2・3 キャピラリーカラムの調製法

従来法に従って内径 0.1 mm のフューズドシリカキャピラリー内にモノリス型シリカを調製した後、第4級アンモニウムイオンを含む水溶液を定流量下で通液して陰イオン交換基を導入した。

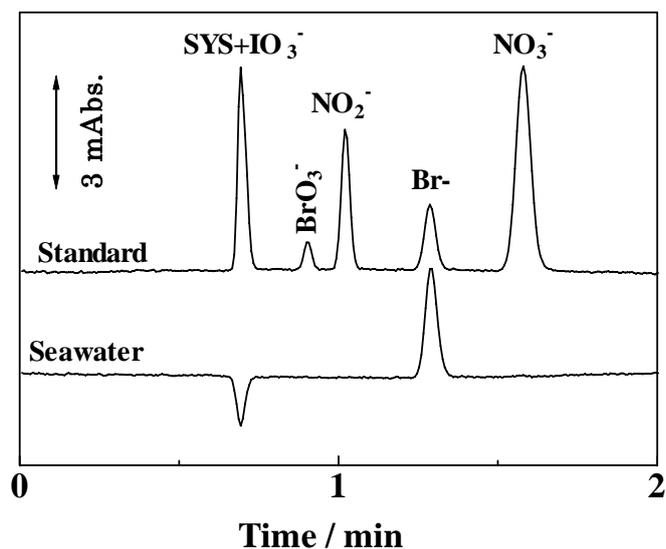
### 6・2・4 結果と考察

第4級アンモニウムイオンを含む水溶液を通液すると、第4級アンモニウムイオンがシラノール基とイオン交換で導入され、引き続いて疎水性相互作用により第4級アンモニウムイオンの第2層が形成される。この第2層がイオン交換基として作用する。導入したセチルトリメチルアンモニウムイオンは、溶離液を通すことによって次第にカラムから溶出されるため陰イオンの保持が次第に減少するが、適量のセチルトリメチルアンモニウムイオンを含む溶離液を使用すると保持時間が安定した。ジラウリルジメチルアンモニウムイオンの場合には、セチルトリメチルアンモニウムイオンと比べて疎水性相互作用が強く、溶出されにくいことがわかった。

Fig.1 に陰イオンの分離例を示す。標準試料の5成分が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。その結果、海水中の臭化物イオンは、63mg/L と定量できた。Fig.1 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するこ

とができたが、とくに分離検出に悪い影響を与えることはなかった。

保持時間および検出シグナルの再現性は Fig.1 の条件下でそれぞれ 0.4%, 約 3%であった。臭化物イオンの検出限界は 4.5 mg/L であり、今後検出感度を改善することにより、その他の微量イオンの定量に応用したいと考えている。



**Fig.1 Separation of inorganic anions on a monolithic silica column dynamically modified with cetyltrimethylammonium ion.** Column: 400×0.1 mm ID. Eluent: 0.5 M NaCl + 0.1 mM cetyltrimethylammonium chloride. Flow rate: 5.6 μL/min. Injection volume: 20 nL. Analyte: 0.5 mM each for standard. Wavelength of UV detection: 210 nm.

### 6・3 タンパク酵素消化物のオンライン計測システムの開発

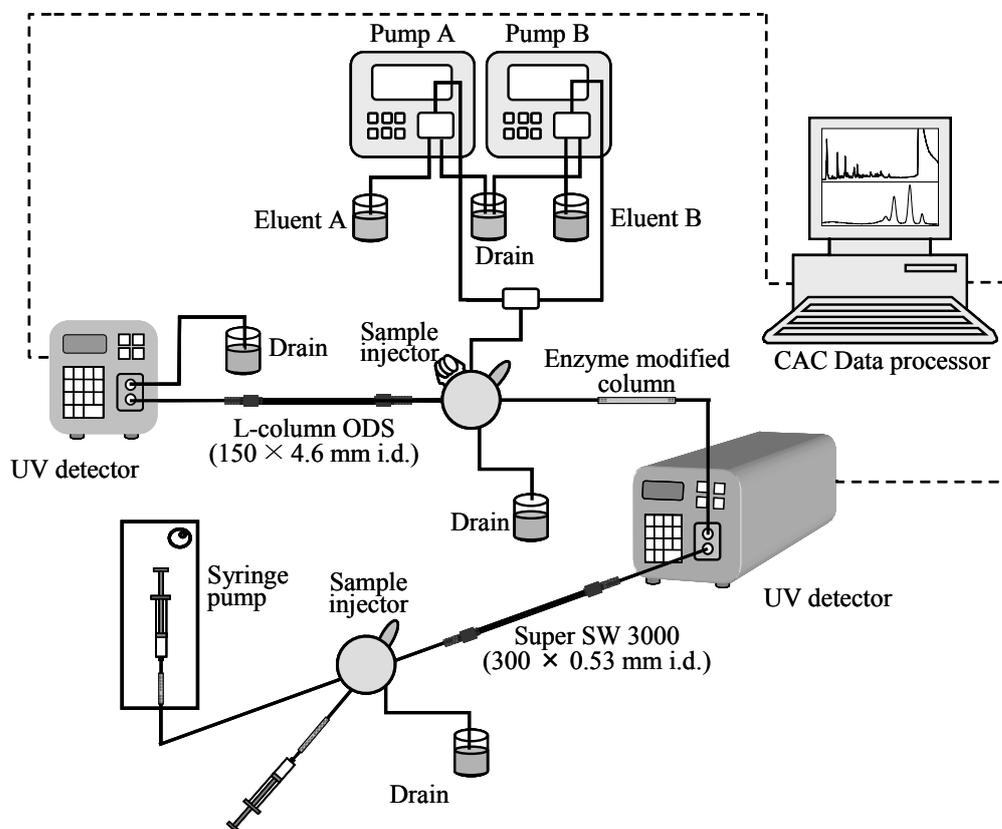
#### 6・3・1 はじめに

キャピラリーLC/MS は、プロテオーム解析の一手法として既に多くの成果を挙げつつある。本研究では、タンパクの分子量による一次分離、トリプシン固定化酵素によるタンパクの消化および消化物の逆相グラジエント分離をオンラインで可能とするシステムの構築を図った。

#### 6・3・2 装置

本システムは、タンパクを分子量の大小で分離するサイズ排除モードのカラム、分離したタンパク酵素消化する固定化酵素カラムおよび消化物（ペプチド）を分離する逆相カラムを使用している。タンパクの分離（Super SW 3000 カラム）を UV 検出器でモニターした後、トリプシンを固定した酵素カラムに導入し、タンパクの迅速消化を達成

し、分画を逆相 HPLC に導入しグラジエント分離を達成する。システムの概要を Fig.2 に示す。

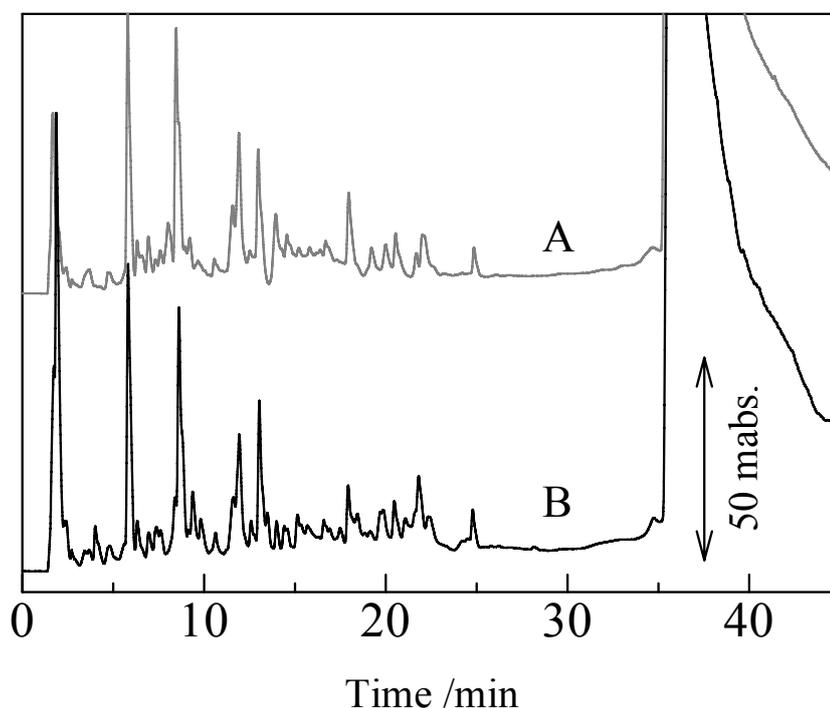


**Fig.2** A schematic diagram of the fractional micro 2D liquid chromatography system for fast proteomics with on-line protein digestion.

### 6・3・3 結果および考察

本研究で調製した固定化酵素カラム（内径 0.5 mm，長さ 50 mm）の消化効率を調べたところ，タンパクを含む溶液が通過する流量により消化効率に影響が表れることがわかった。検討の結果，流量 1  $\mu\text{L}/\text{min}$  で通液する際に，バッチ法とほぼ同じトリプシン消化効率を示すクロマトグラムが得られたため，タンパクをサイズ排除モードで分離する際には，1  $\mu\text{L}/\text{min}$  の流量で行う必要があった。この結果を受けて，サイズ排除モードのカラムは，内径 0.53mm，長さ 50cm とした。固定化酵素カラムを用いることで従来長時間を要していたトリプシン分解を数分に短縮することができ，分析の迅速化に成功した。

Fig.3 に



**Fig.3 Comparison of the BSA digestion through on-line enzyme-immobilized micro column (A) and in-solution conventional batch-wise method (B).** Sample: BSA in 10 mM Tris-HCl buffer containing 1.0 M urea (A), BSA:trypsin = 50:1 in 10 mM Tris-HCl buffer containing 1.0 M urea (B). Separation column: L-column ODS (150 × 4.6 mm i.d.). Enzyme-immobilized column: CPG-trypsin (50 × 0.5 mm i.d.). Linear gradient elution for the triptic fragment separation: 2% to 40% ACN in 0.01% phosphoric acid at 0 to 40 min; Flow rate: 1.0 mL min<sup>-1</sup>. Sample: 20 μL. Flow rate for the on-line digestion: 1.0 μL min<sup>-1</sup>. Wavelength of UV detection: 214 nm.

#### 6・4 キャピラリーLCにおけるビスフェノールAの濃縮法の開発

##### 6・4・1 はじめに

コンベンショナル LC と比較した際のキャピラリーLC の欠点として濃度感動の悪化が挙げられる。これについては、従来からプレカラム濃縮法が提唱され応用されてきている。とくに、プレカラム濃縮法は生体関連試料や環境関連物質の定量には重要である。本研究では、環境水や飲料水中の微量環境ホルモン、ビスフェノール A (BPA) の濃縮定量法の開発を行った。

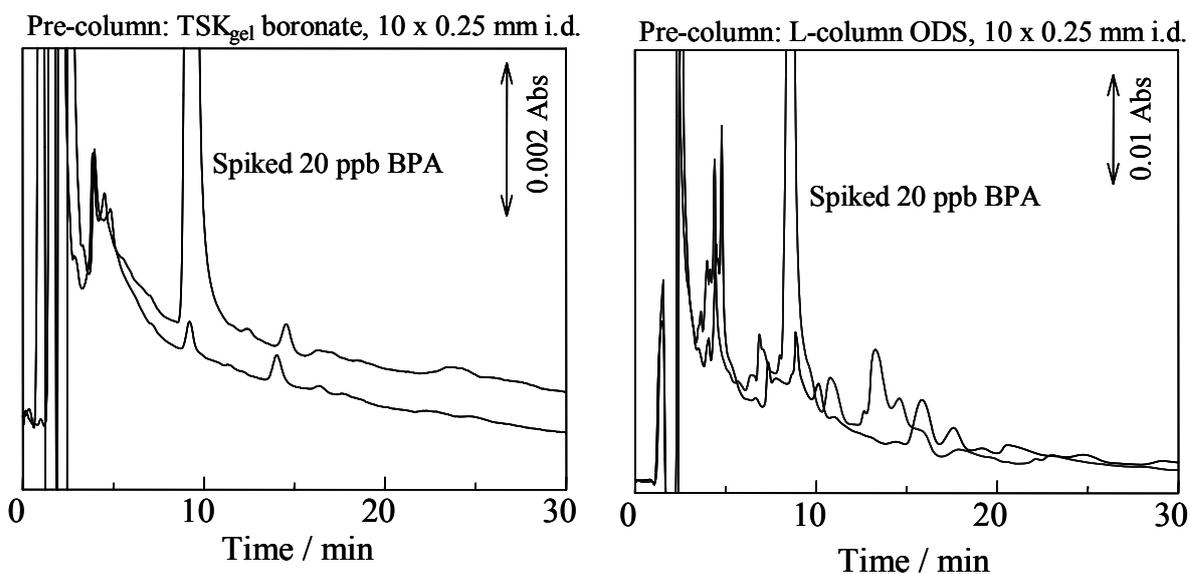
##### 6・4・2 装置および試薬

ホウ酸系の官能基を有する充填剤の BPA に対する濃縮特性に注目し、キャピラリー

ーLC用の濃縮カラムを調製し、その吸着特性を評価した。濃縮カラムはデッドボリユームの小さい六方バルブ (M435, Upchurch Scientific) に配管し、オンライン濃縮を可能とするシステムを組み立てた。

#### 6・4・3 結果および考察

Fig.4 に応用例を示す。ここでは、飲用水を各濃縮カラムに1 mL通液することにより、飲用水中のBPAの定量を試みた。TSK<sub>gel</sub> boronateプレカラム (10 × 0.25 mm I.D) を濃縮に用いた場合 (Fig.4 の左図), BPAが他の成分の妨害を受けずにピークが出現していることがわかる。これに対し、通常の疎水性充填剤であるODSを濃縮カラムに用いた場合 (右図) には共存成分に妨害を受けていることがわかる。このことは、TSK<sub>gel</sub> boronate固定相が半選択的にBPAを濃縮する能力を持っていることを示している。TSK<sub>gel</sub> boronate固定相を濃縮カラムに用いた系によりこの飲用水中のBPAは0.24 μg l<sup>-1</sup>と定量された。本法は、キャピラリーLCの感度を改善し、飲用水や環境水中の微量分析への適用を拡げることに貢献するものと期待される



**Fig. 4 Determination of BPA in bottled water by comparing the TSK<sub>gel</sub> boronate precolumn to the ODS (C<sub>18</sub>) precolumn.** Upper trace: 1.0 mL of bottled water spiked with 20 ng mL<sup>-1</sup> BPA. Lower trace: 1.0 mL of bottled water. Column: L-column ODS, 100 × 0.32 mm I.D. Mobile phase: acetonitrile-water (40:60). Precolumn: TSK<sub>gel</sub> boronate, 10 × 0.25 mm I.D. or L-column ODS, 10 × 0.25 mm I.D. Flow rate: 4.2 μL min<sup>-1</sup>. Wavelength of UV detection: 217 nm.

## 7. 研究発表

### (1) 学会誌等

#### Original articles:

1. On-line precolumn enrichment of bisphenol A using boronate column in microcolumn liquid chromatography (L. W. Lim and T. Takeuchi), J. Chromatogr. A, 1106, 139-145 (2006).
2. Development of an on-line enzyme-immobilized reversed-phase HPLC for protein digestion and peptide separation (L. W. Lim, M. Tomatsu and T. Takeuchi), Anal. Bioanal. Chem., in press.
3. Rapid determination of bromide in seawater samples by capillary ion chromatography using monolithic silica columns modified with cetyltrimethylammonium ion (A. Suzuki, L. W. Lim, T. Hiroi and T. Takeuchi), Talanta, in press.

#### Review article:

1. Development of capillary liquid chromatography (T. Takeuchi), Chromatography, 26, 7-10 (2005).
2. キャピラリー液体クロマトグラフィー (竹内豊英), 化学工業, 57, No. 5, 348-351 (2006).

### (2) 口頭発表

1. 竹内豊英: キャピラリー液体クロマトグラフィーの開発, 第15回クロマトグラフィー科学会議, 北里大学, 平成16年11月11日~12日.
2. Toyohide Takeuchi: Development of Capillary Columns for Ion Chromatography, The 1st Japan-China-Korea Joint Symposium on Ion Chromatography, Chubu University, 平成16年12月14日~16日.
3. Xion Li, Lee Wah Lim, Toyohide Takeuchi: Rapid Separation of Common Inorganic Cations by  $\mu$ LC Using a Monolithic Octadecyl-bonded Silica Stationary Phase Modified with Dodecylsulfate, Chubu University, 平成16年12月14日~16日.
4. Lim Lee Wah・竹内豊英: On-line precolumn enrichment of bisphenol A using

- boronate column in microcolumn LC, 北見工業大学, 平成 17 年 5 月 14 日～15 日.
5. 鈴木 敦・リムリーワ・竹内豊英： モノリス型シリカキャピラリー陰イオン交換カラムの調製, 北見工業大学, 平成 17 年 5 月 14 日～15 日.
  6. 大河内雄希・中島清友・Lim Lee Wah・竹内豊英, 液体クロマトグラフィーにおける気相中有機物の濃縮分離法の開発, 北見工業大学, 平成 17 年 5 月 14 日～15 日.
  7. リムリーワ・竹内豊英： キャピラリーLCにおけるカラム周辺技術, 日本分析化学会第 54 年会, 名古屋大学, 平成 17 年 9 月 14 日～16 日.
  8. 戸松磨美・リムリーワ・竹内豊英： タンパク質のオンライン酵素消化逆相 HPLC システムの開発, 日本分析化学会第 54 年会, 名古屋大学, 平成 17 年 9 月 14 日～16 日.
  9. Toyohide Takeuchi: Downsizing of Chemical Experiment Equipments for Less Environmental Impact - Miniaturization of Separation Columns in Liquid Chromatography -, 7th Symposium on Asian Academic Network for Environmental Safety and Waste Management, Hotel Metropolitan, Tokyo, 平成 17 年 9 月 19 日～21 日.
  10. 加藤友則・鈴木千夏・リムリーワ・竹内豊英： ガスクロマトグラフィーにおける C30 充填カラムの利用, 第 36 回中部化学関係学協会支部連合秋季大会, グランシップ, 平成 17 年 9 月 23 日～24 日.
  11. 鈴木 敦・リムリーワ・竹内豊英： 第 4 級アンモニウムイオンで修飾したモノリス型シリカカラムを用いるキャピラリーイオンクロマトグラフィーによる海水中臭化物イオンの定量, 第 16 回クロマトグラフィー科学会議, 長良川国際会議場, 平成 17 年 11 月 7 日～8 日.
  12. 竹内豊英： キャピラリーイオンクロマトグラフィーの開発, 第 22 回イオンクロマトグラフィー討論会, 岐阜大学図書館小講堂, 平成 17 年 12 月 1 日～2 日.
  13. 竹内豊英： キャピラリーLC の理論と特徴, 第 193 回液体クロマトグラフィー研究懇談会, 東京理科大学, 平成 18 年 4 月 28 日.

## 8. 研究論文写し

### Original

- 1: pp.12-18.
- 2: pp.19-25.
- 3: pp.26-29.

### Review

- 1: pp.30-33.
- 2: pp.34-37