



キャピラリー液体クロマトグラフィー

竹内 豊 英

1 はじめに

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^{-1} 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、 $2 \sim 30 \text{ }\mu\text{L min}^{-1}$ である。本稿では、キャピラリー LC は Nano-LC と μ -LC を包含するものとする。

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 $\text{nL min}^{-1} \sim \mu\text{L min}^{-1}$ であり、コンベンショナル LC と比べて $1/1000 \sim 1/10000$ の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、図1にまとめたように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ので移動相溶媒および廃溶媒の量が減少し、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検出できる質量が低減化できる (質量検出感度の改善)。
- (3) 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

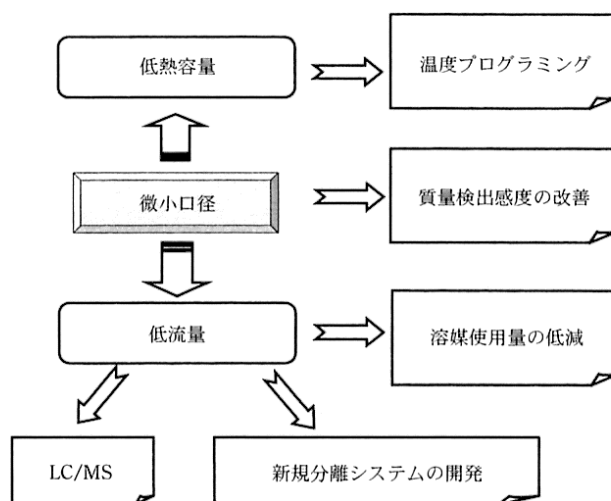


図1 キャピラリー LC の利点

効となる。
(4) 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。

本稿では、2001年以降に発表されたキャピラリー LC に関する研究の進展状況を報告する。

2 分離の高性能化・高機能化

分離の高性能化や高機能化を目指したものとして、モノリス型キャピラリーカラムの開発および超高压クロマトグラフィーに関する研究が挙げられる。

2.1 シリカ系モノリス型キャピラリーカラム

モノリス型シリカカラムは、アルコキシシランのゾルゲル反応により μm オーダーのスルーポアとシリカ骨格を共存させることができ、小さな圧力損失で高分離能が達成できることから次世代カラムとして注目されている。モノリス型シリカキャピラリーカラムは、*in-situ* で調製が可能であり、キャピラリー LC およびキャピラリー電気泳動の高分離能カラムとして期待が高い²⁾。ゾルゲル試薬としてテトラメトキシシランだけを用いた場合には内径が $100 \mu\text{m}$ 以下のキャピラリーカラムの調製が可能であるのに対し、メチルトリメトキシシランを適量加えることにより内径が $200 \mu\text{m}$ までのキャピラリーカラムの調製

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	0.002~0.020
	Semi- μ -LC	1.0~2.1	数 100 ng	0.047~0.21
	Conventional LC	4.0~6.0	数 μg	0.76~1.7
分取用	Preparative LC	10~	数 10 μg	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)

が可能となる³⁾。アビジンをモノリス型シリカキャピラリーに物理的に吸着させることにより光学異性体の分離が達成されている⁴⁾。

2・2 ポリマー系モノリス型キャピラリーカラム

高い透過性を有するポリマー系のモノリス型キャピラリーカラムも開発され、高スループットを目指した高速分離が検討されている。これまでポリアクリルアミド、ポリスチレン⁵⁾⁶⁾、ポリメタクリレート⁷⁾⁸⁾などのモノリス型キャピラリーカラムが開発され、重合条件とカラム性能との関連が検討されている。

ポリスチレン/ジビニルベンゼン共重合体が内径20~100 μm のキャピラリー内に調製され、ペプチド⁵⁾やタンパク質⁶⁾の分離に応用されている。1-クロロオクタデカンをポリスチレンに導入することによってペプチドの分離選択性を改善できることが示されている⁹⁾。

2・3 超高压 LC

理論段高さは、充填剤粒子径に比例して小さくなるので、微粒子充填剤を詰めたカラムを使用すれば高分離能が達成できる。通常は、ポンプや流路系の耐圧性によってこの実現は制約を受ける。超高压下(120 MPa)での試料注入バルブが評価され、多孔性の充填剤よりも非多孔性の充填剤のほうが高い分離性能を与えることが見だされている¹⁰⁾。粒子径1.5 μm の非多孔性粒子の充填カラムを用いることにより1mあたり40万段の理論段数が光学異性体の分離系で達成されている¹¹⁾。ただし、超高压LCは、操作時に安全面により慎重に対応する必要がある。フューズドシリカキャピラリーを用いた際には、破損しやすいため、充填キャピラリーカラム入口部分をプレキシガラスなどで覆うことによって、移動相や充填剤の噴出を防ぐことが望まれる¹²⁾。

3 フローシステムおよびスイッチングバルブ技術

キャピラリーカラムの体積は極めて小さいため、それにふさわしい低流量ポンプ、サンプリング技術、連結技術、スイッチングバルブ技術などの開発が必要である。

3・1 サンプリング技術

キャピラリーLCでは、直接試料注入の場合少量の体積しか導入できないため、濃度で表した検出感度(濃度検出感度)が劣るといふ欠点が指摘されている。これは、プレカラム濃縮^{13)~17)}、オンカラム濃縮¹⁸⁾あるいは固相マイクロ抽出(SPME)により改善できる^{19)~23)}。プレカラム濃縮では、試料溶液の透過性をよくするために通常比較的大きな粒子径の充填剤を詰めたプレカラムを用いるが、透過性の高いモノリスキャピラリーカラムを用いた例も報告されている¹⁵⁾。SPMEでは、充填剤¹⁹⁾、ポリマー系の繊維を詰めたキャピラリー^{20)~22)}や中空繊維²³⁾などが固相抽出に利用されている。これらのサンプリング操作をオンラインで可能とするデッドボリュームの小さなバルブが開発され市販されている。

3・2 カラム周辺マイクロ技術

デッドボリュームの小さなスイッチングバルブやコネクター

を利用することにより、各種フロー系を構築することができる。ナノYコネクターを用いることにより、スプリットフローやバイパスフローシステムを構築できることが報告されている²⁴⁾。バイパスフローとは、スプリットした溶液を分離カラムの出口でカラム溶出液と合流させる方法で、フローセルを通過する流量が増大するためオンカラム検出を回避し市販のフローセルが使用できるとしている。また、ナノYコネクターを用いてポストカラムミキシングや誘導体化反応が達成できることが報告されている²⁵⁾。 $\mu\text{-LC}$ で分離後のオンラインポストカラム反応は、チップ上でも可能であり、反応後MSと結合できるとしている²⁶⁾。

スイッチングバルブを用いることにより、カラムスイッチングが可能となり、スループットの改善に有効である²⁷⁾²⁸⁾。これは、2本のカラムを使用することで、一方の分析中に再生が可能であり、注入インターバルを短くすることができるからである。

タンパク質をオンライン酵素キャピラリーリアクターでトリプシン分解し、プレカラムでトラップされた後LC/MSで分析されている²⁹⁾。この方法は、プレカラムで脱塩できるため、塩によるエレクトロスプレーイオン化(ESI)MSのシグナルの抑制が避けられるとしている。

3・3 新規送液システム

キャピラリーLC用の高性能ポンプが市販されるようになり、低流量域(1~5 $\mu\text{L min}^{-1}$)でもスプリットすることなくグラジエント溶離が可能となっている³⁰⁾³¹⁾。指数関数的な濃度変化であれば、ミキシング容器を用いた簡易グラジエント溶離システムが構築できる³²⁾。高性能ポンプを用いることなく電気浸透流を利用した送液法も報告されている³³⁾。

4 新規検出法および多次元分析

キャピラリーLCにおいても紫外可視吸光検出器が最も汎用的に利用され、蛍光検出器や電気化学的検出器も目的に応じて利用されてきている。これらの汎用的検出器は定性能力に乏しいため未知成分の同定は困難であり、キャピラリーLCと定性能力の高い分析法であるMS、ICPMS、イオンモビリティースペクトロメーターなどの直結化やキャピラリー電気泳動(CE)などの分離法との直結化が図られている。

4・1 LC/MSⁿ

キャピラリーLCをMSと結合する際、イオン化法とアナライザーの組み合わせによって様々な選択肢があり、非常に多くの応用研究が報告されている。表2にまとめたように、LC/MSに関する研究で報告されているイオン化法には、エレクトロスプレー法(electrospray ionization)、マトリックス支援レーザー脱離イオン化法(MALDI)、電子イオン化法(electron ionization)などがある。一方、アナライザーとして飛行時間型(time-of-flight)、四重極(quadrupole)、イオンサイクロトロン共鳴(ion cyclotron resonance)、イオントラップ(ion trap)などがある。LC/MSにさらにMSを結合させたLC/MSⁿによる応用研究も多く報告されており、プロテオーム解析などにおいて重要な分析手段の一つとなっている^{33)~35)}。

表2 LC/MSのイオン化法とアナライザー

イオン化法	アナライザー
electrospray ionization	time-of-flight
MALDI	quadrupole
electron ionization	ion cyclotron resonance
	ion trap

4.2 LC/NMR

核磁気共鳴 (NMR) 分光法は、試料成分の構造解析、定性および定量ならびに化学的基礎研究に重要な情報を提供する。分離手段のキャピラリー LC と結合することで LC の定性能力の強化となるほか、NMR 測定の前処理の簡略化、NMR 測定範囲の拡大につながる³⁶⁾³⁷⁾。

NMR は、LC 用の汎用検出器と比較して感度が悪いので、試料量が多いときはオンフロー法での NMR 測定が可能であるが、濃度が低いときには、ストップフロー法で積算測定を行い、スペクトルの S/N を改善する必要がある³⁶⁾。

4.3 LC/ICPMS

LC と ICPMS を結合することによって元素選択的検出が可能となる。キャピラリー LC と結合する際には、ネプライザーのデッドボリュームに注意する必要がある³⁸⁾。応用例として、³¹P を見ることによりタンパク質やペプチドのリンの結合の有無や位置を解析することができる^{38)~40)}。

4.4 LC/CE

キャピラリー LC と迅速分離が可能なキャピラリー電気泳動 (CE) と結合することによって、ピークキャパシティーを大幅に改善することができる。この手法は、広範囲にわたる性質を有する複雑な生体系混合物の分析にとくに威力を発揮する⁴¹⁾。

4.5 その他の検出法

キャピラリー LC とイオンモビリティスペクトロメーターとを結合した多次元分析法が提案され、除草剤⁴²⁾やプロテオーム解析⁴³⁾に有効であることが報告されている。放射化学検出⁴⁴⁾や蛍光のクエンチングを利用した検出なども報告されている⁴⁵⁾⁴⁶⁾。

5 その他の注目すべき研究

5.1 温度制御

キャピラリーカラムの熱容量が小さい利点を生かして、LC においても GC と同様カラム温度の制御を積極的に行うことができる。通常の溶媒グラジエント溶離に代わる手段として、温度プログラミングが有効であることが報告されている^{47)~49)}。ポリエチレングリコールの分離にはネガティブ温度プログラミングを行うことにより、ピーク形状や分離選択性が改善されるとしている⁵⁰⁾⁵¹⁾。また、カラム入口部を冷却することにより、試料の濃縮効率が高くなる⁵²⁾⁵³⁾。高温水を移動相としてベンゼン誘導体 6 種を 2 分以内に達成できたとしている⁵⁴⁾。

5.2 新規固定相

アゾベンゼン系の光感応型固定相を用い、紫外線照射により光学異性体の溶出順序を変えることに成功している⁵⁵⁾。また、アミロースの 3,5-ジメチルフェニルカルバメート誘導体をコーティングしたシリカゲルを充填したキャピラリーカラムにより、光学異性体の分離が達成されている⁵⁶⁾。

5.3 キャピラリー界面のイメージング

フューズドシリカキャピラリー内壁と水との界面におけるタンパク質分子の吸着挙動が蛍光測定により明らかにされている⁵⁷⁾。

6 まとめ

キャピラリー LC は、約 30 年前に研究がスタートしたが、ここに至るまでようやくユーザーフレンドリーな形で普及し始めている。微小体積の試料注入が可能でインジェクターが開発され、流れを止めずに高圧下での試料導入が可能になった。低流量でグラジエント溶離が可能なポンプも登場した。デッドボリュームの小さなバルブやユニオンが開発され、流路の切り替え、前処理濃縮、ポストカラム反応なども低流量下で達成できるようになった。また、透過性の高いモノリス型キャピラリーカラムが開発され、高理論段数や迅速分離が達成できるようになり、その進展が期待されている。さらに、LC/MS も信頼できる分析技術として成長した。最近では、環境保護の観点からもキャピラリーを用いた分離分析技術は追い風を受けており、さらに普及が進むものと期待している。

文献

- 1) 竹内豊英: *Jasco Report*, **46**(1), 6 (2004).
- 2) N. Tanaka, M. Motokawa, H. Kobayashi, K. Hosoya, T. Ikegami: *J. Chromatogr. Library*, **67**, 173 (2003).
- 3) M. Motokawa, H. Kobayashi, N. Ishizuka, H. Minakuchi, K. Nakanishi, H. Jinnai, K. Hosoya, T. Ikegami, T. Tanaka: *J. Chromatogr. A*, **961**, 53 (2002).
- 4) Z. Liu, K. Otsuka, S. Terabe, M. Motokawa, T. Tanaka: *Electrophoresis*, **23**, 2973 (2002).
- 5) A. R. Ivanov, L. Zang, B. L. Karger: *Anal. Chem.*, **75**, 5306 (2003).
- 6) C. Legido-Quigley, N. Marlin, N. W. Smith: *J. Chromatogr. A*, **1030**, 195 (2004).
- 7) P. Holdsvendova, P. Coufal, J. Suchankova, E. Tesarova, Z. Bosakova: *J. Sep. Sci.*, **26**, 1623 (2003).
- 8) P. Coufal, M. Cihak, J. Suchankova, E. Tesarova, Z. Bosakova, K. Stulik: *J. Chromatogr. A*, **946**, 99 (2002).
- 9) X. Huang, S. Zhang, G. A. Schultz, J. Henion: *Anal. Chem.*, **74**, 2336 (2002).
- 10) Y. Gong, Y. Xiang, B. Yue, G. Xue, J. S. Bradshaw, H. K. Lee, M. L. Lee: *J. Chromatogr. A*, **1002**, 63 (2003).
- 11) Y. Xiang, D. R. Maynes, M. L. Lee: *J. Chromatogr. A*, **991**, 189 (2003).
- 12) N. Wu, J. A. Lippert, M. L. Lee: *J. Chromatogr. A*, **911**, 1 (2001).
- 13) P. Molander, A. Thomassen, E. Lundanes, G. Fladseth, S. Thorud, Y. Thomassen, T. Greibrokk, Tyge: *J. Sep. Sci.*, **24**, 947 (2001).
- 14) L. Lim, T. Miwa, T. Takeuchi: *Anal. Sci.*, **17** (Supplement), i887 (2001).
- 15) L. W. Lim, K. Hirose, S. Tatsumi, H. Uzu, M. Mizukami, T. Takeuchi: *J. Chromatogr. A*, **1033**, 205 (2004).
- 16) M. Moberg, S. J. M. Holmstrom, U. S. Lundstrom, K. E. Markides: *J. Chromatogr. A*, **1020**, 91 (2003).

- 17) T. Bjellaas, A. Holm, P. Molander, J. A. Tornes, T. Greibrokk, E. Lundanes : *Anal. Bioanal. Chem.*, **378**, 1021 (2004).
- 18) T. Takeuchi, T. Kimura, J.-Y. Jin, C. Fujimoto, K. Ohta, K.-P. Lee, J.-J. Ryoo, S.-H. Choi : *Anal. Sci.*, **19**, 1265 (2003).
- 19) G. Famigliini, H. Truffelli, E. Pierini, E. De Simoni, F. Mangani, A. Cappiello : *J. AOAC Int.*, **86**, 941 (2003).
- 20) Y. Saito, M. Imaizumi, T. Takeuchi, K. Jinno : *Anal. Bioanal. Chem.*, **372**, 164 (2002).
- 21) Y. Saito, M. Nojiri, M. Imaizumi, Y. Nakao, Y. Morishima, H. Kanehara, H. Matsuura, K. Kotera, H. Wada, K. Jinno : *J. Chromatogr. A*, **975**, 105 (2002).
- 22) Y. Saito, M. Imaizumi, K. Ban, A. Tahara, H. Wada, K. Jinno : *J. Chromatogr. A*, **1025**, 27 (2004).
- 23) L. Zhu : *J. Chromatogr. A*, **924**, 407 (2001).
- 24) T. Takeuchi, S. Tatsumi, S. Masuoka, K. Hirose, H. Uzu, J.-Y. Jin, C. Fujimoto, K. Ohta, K.-P. Lee, J.-J. Ryoo, S.-H. Choi : *J. Chromatogr. A*, **1021**, 55 (2003).
- 25) T. Takeuchi, S. Masuoka, J.-Y. Jin : *J. Sep. Sci.*, **23**, 635 (2003).
- 26) V. Spikmans, S. J. Lane, B. Leavens, A. Manz, N. W. Smith : *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **16**, 1377 (2002).
- 27) Y. Shen, N. Tolic, R. Zhao, L. Pasa-Tolic, L. Li, S. J. Berger, R. Harkewicz, G. A. Anderson, M. E. Belov, R. D. Smith : *Anal. Chem.*, **73**, 3011 (2001).
- 28) D. C. Delinsky, K. D. Greis : *J. Proteome Res.*, **1**, 279 (2002).
- 29) J. Samskog, D. Bylund, S. V. Jacobsson, K. E. Markides : *J. Chromatogr. A*, **998**, 83 (2003).
- 30) F. Kuhn, M. Oehme, M. Schleimer : *J. Chromatogr. A*, **1018**, 203 (2003).
- 31) X. Zhou, N. Furushima, C. Terashima, H. Tanaka, M. Kurano : *J. Chromatogr. A*, **913**, 165 (2001).
- 32) C. E. Doneanu, D. A. Griffin, E. L. Barofsky, D. F. Barofsky : *J. Am. Soc. Mass Spectr.*, **12**, 1205 (2001).
- 33) S. K. Bergstrom, J. Samskog, K. E. Markides : *Anal. Chem.*, **75**, 5461 (2003).
- 34) Y. Shen, N. Tolic, C. Masselon, L. Pasa-Tolic, D. G. Camp, II, K. K. Hixson, R. Zhao, G. A. Anderson, R. D. Smith : *Anal. Chem.*, **76**, 144 (2004).
- 35) S. Myung, Y. J. Lee, M. H. Moon, J. Taraszka, R. Sowell, S. Koeniger, A. E. Hilderbrand, S. J. Valentine Stephen, L. Cherbas, P. Cherbas, T. C. Kaufmann, D. F. Miller, Y. Mechref, M. V. Novotny, M. A. Ewing, C. R. Sporer, D. E. Clemmer : *Anal. Chem.*, **75**, 5137 (2003).
- 36) M. Sandvoss, A. D. Roberts, I. M. Ismail, S. E. North : *J. Chromatogr. A*, **1028**, 259 (2004).
- 37) E. Rapp, A. Jakob, A. B. Schefer, E. Bayer, K. Albert : *Anal. Bioanal. Chem.*, **376**, 1053 (2003).
- 38) M. Wind, A. Eisenmenger, W. D. Lehmann : *J. Anal. Atom. Spectrom.*, **17**, 21 (2002).
- 39) M. Wind, H. Wesch, W. D. Lehmann : *Anal. Chem.*, **73**, 3006 (2001).
- 40) M. Wind, D. Gosenca, D. Kubler, W. D. Lehmann : *Anal. Biochem.*, **317**, 26 (2003).
- 41) L. Jia, B.-F. Liu, S. Terabe, T. Nishioka : *Anal. Chem.*, **76**, 1419 (2004).
- 42) D. C. Collins, Y. Xiang, M. L. Lee : *Chromatographia*, **55**, 123 (2002).
- 43) L. M. Matz, H. M. Dion, H. Hill : *J. Chromatogr. A*, **946**, 59 (2002).
- 44) B. C. Onisko : *J. Am. Soc. Mass Spectr.*, **13**, 82 (2002).
- 45) J. V. Goodpaster, S. B. Howerton, V. L. McGuffin : *J. Foren. Sci.*, **46**, 1358 (2001).
- 46) J. V. Goodpaster, V. L. McGuffin : *Anal. Chem.*, **73**, 2004 (2001).
- 47) P. Molander, A. Thomassen, L. Kristoffersen, T. Greibrokk, E. Lundanes : *Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, **766**, 77 (2002).
- 48) O. Nordstrom, P. Molander, T. Greibrokk, R. Blomhoff, E. Lundanes : *J. Microcol. Sep.*, **13**, 179 (2001).
- 49) P. Molander, T. Greibrokk, A. Iveland, E. Ommundsen : *J. Sep. Sci.*, **24**, 136 (2001).
- 50) T. Andersen, P. Molander, R. Trones, D. R. Hegna, T. Greibrokk : *J. Chromatogr. A*, **918**, 221 (2001).
- 51) I. L. Skuland, T. Andersen, R. Trones, R. B. Eriksen, T. Greibrokk : *J. Chromatogr. A*, **1011**, 31 (2003).
- 52) M. E. Leon-Gonzalez, L. V. Perez-Arribas, L. M. Polo Diez, C. Panis, M. P. San Andres : *Anal. Chim. Acta*, **445**, 29 (2001).
- 53) A. Holm, P. Molander, E. Lundanes, T. Greibrokk : *J. Sep. Sci.*, **26**, 1147 (2003).
- 54) K. T. Scott, P. K. Dasgupta : *Talanta*, **56**, 977 (2002).
- 55) 猪狩民行, 中釜達朗, 内山一美, 保母敏行 : *分析化学*, **52**, 959 (2003).
- 56) L. Chankvetadze, I. Kartoziya, C. Yamamoto, B. Chankvetadze, G. Blaschke, Y. Okamoto : *J. Sep. Sci.*, **25**, 653 (2002).
- 57) S. H. Kang, E. S. Yeung : *Anal. Chem.*, **74**, 6334 (2002).



竹内豊英 (Toyohide TAKEUCHI)

岐阜大学工学部応用化学科 (〒501-1193 岐阜市柳戸1-1)。名古屋大学大学院工学研究科博士課程前期修了。工学博士 (名古屋大学)。<現在の研究テーマ>液体クロマトグラフィーの高性能化。<趣味>スポーツ。
E-mail : takeuchi@apchem.gifu-u.ac.jp

原稿募集

トピックス欄の原稿を募集しています

内容：読者の関心をひくような新しい分析化学・分析技術の研究を短くまとめたもの。

執筆上の注意：1) 1000字以内 (図は1枚500字に換算) とする。2) 新分析法の説明には簡単な原理図などを積極的に採り入れる。3) 中心となる文献は原則として2年以内のものとし、出所を明記する。

なお、執筆者自身の文献を主として紹介する

ことは御遠慮ください。又、二重投稿は避けてください。

◇採用の可否は編集委員会にご一任ください。原稿の送付先及び問い合わせは下記へ。

〒141-0031 東京都品川区西五反田1-26-2

五反田サンハイツ304号

(株)日本分析化学会「ぶんせき」編集委員会

〔電話：03-3490-3537〕