

報 文

モノリス型シリカ系キャピラリーカラムを用いる 液体クロマトグラフィーによる高速分離

鈴木 敦¹, 宇津 秀之¹, 増岡 伸一¹, 李 雄¹,
リムリーワ¹, 竹内 豊英^{®1}

Rapid separation on monolithic silica-based capillary columns in LC

Atsushi SUZUKI¹, Hideyuki UZU¹, Shinichi MASUOKA¹, Xiong LI¹,
Lee Wah LIM¹ and Toyohide TAKEUCHI¹

¹ Department of Chemistry, Faculty of Engineering, Gifu University, 1-1, Yanagido, Gifu-shi, Gifu 501-1193

(Received 4 May 2004, Accepted 8 July 2004)

Monolithic silica capillary columns have an advantage over conventional densely packed columns in terms of their higher permeability. The inlet pressure and the column length have been optimized. By applying moderate inlet pressures, benzene and five kinds of alkylbenzenes could be separated on a monolithic ODS-bonded silica capillary column within one minute.

Keywords : capillary LC; monolithic silica columns; rapid separation; alkylbenzenes.

1 緒 言

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) における粒子充填型カラムの高性能化は、充填剤粒子の微小化によって達成することができる。シリカゲル系微粒子充填剤はこの30年間 HPLC 用分離媒体として HPLC の発展を支えてきたが、更なる粒子の微小化は間隙^{けき}流路を小さくし、それに伴って高い入口圧力を招くため、35~40 MPa 程度の耐圧性しかない通常の HPLC システムでは種々制限を受ける。これに対し、超高压 HPLC が開発され、数百 MPa の圧力下、1.5 μm 程度の微粒子を充填したキャピラリーカラムにより15~20万段の理論段数が10分以内の保持時間で達成されている¹⁾。しかしながら、現時点では超高压 HPLC システムは、はん用的ではないため、透過性の高いカラムを利用することにより HPLC の高性能化を図るほうが得策と考えられている。

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、小さな入口圧力で高分離能が達成できることから HPLC における次世代の分離カラムとして注目されている^{2)~10)}。モノリス型シリカカラムは、全体で80%以上という高い空隙率を有し、驚異的な低カラム背圧を実現する。これまで、コンベンショナルサイズ (内径4.6 mm) のモノリス型シリカカラムを用い、その高い透過性に基づいた1分以内の高速分離が報告されている¹¹⁾¹²⁾。しかしながら、この場合、流量は9 ml min⁻¹と極めて大きな流量を必要とする。一方、田中ら⁵⁾は、内径100 μm 、長さ25 cm のモノリス型シリカキャピラリーカラムを用いて1.3 MPa の入口圧力でベンゼン及びアルキルベンゼン6種を2分で分離しているが、溶出の早い成分の分離が不完全であった。また、粒子充填型カラムを用いたキャピラリー LC においても高速分離は古くから検討され、14成分の多環芳香族化合物が2分で分離されている¹³⁾。この際、入口カラム圧力は、15 MPa であり高い入口圧力を必要としていた。

モノリス型シリカキャピラリーカラムは、透過性が高く、*in-situ* で調製が可能なことから、キャピラリー LC 及びキャピラリー電気クロマトグラフィーの高分離能カラムとし

¹ 岐阜大学工学部応用化学科: 501-1193 岐阜県岐阜市柳戸1-1

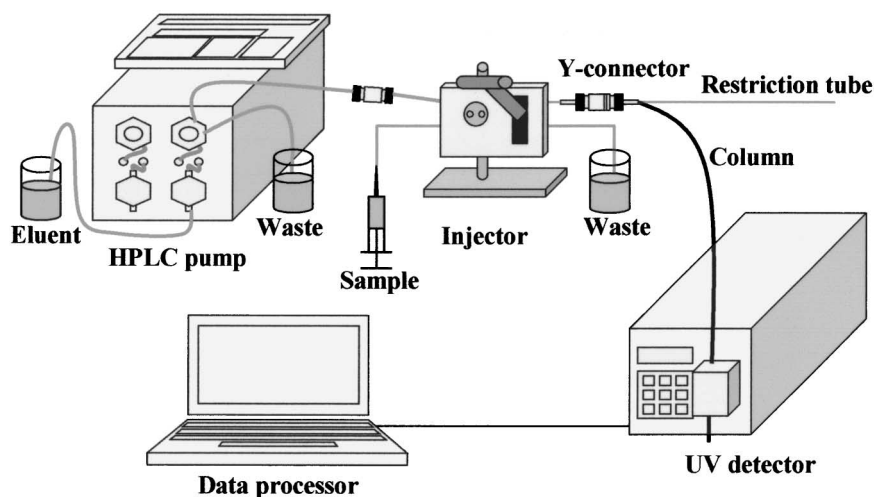


Fig. 1 Schematic diagram of the apparatus

でも期待が高い。本研究では、モノリス型シリカキャピラリーカラムの高い透過性を利用した高速分離の可能性を検討した。

2 実験

2.1 試薬

テトラメトキシシラン、ジメチルオクタデシルクロロシラン、プロピルベンゼン、プチルベンゼン及び *n*-アミルベンゼンは、東京化成工業より入手した。ポリエチレングリコール（分子量：10000）は Aldrich Chemical より、またベンゼンは和光純薬工業より入手した。その他の試薬は、断りのない限りナカライテスクより入手した。試薬は、特に前処理を施さず入手したままの状態で用いた。移動相やカラム調製に用いた水は GS-590 蒸留水製造装置（アドバンテック製）で精製した。

2.2 分離カラムの調製及び測定装置

フューズドシリカキャピラリー（内径 50～100 μm ）内に既法¹⁴⁾によりモノリス型シリカを調製し、オクタデシル基を化学結合させた。移動相は、ガス圧又は市販の HPLC ポンプを用い、定圧モードで送液した。送液用ガスには窒素を使用し、圧力は CFC14PP フローコントローラー（島津製）により調整した。HPLC ポンプ（東ソー製、CCPM）を使用したときの装置概要を Fig. 1 に示した。試料溶液は、キャピラリー LC 用のインジェクター（日本分光製、ML522; 0.2 μl ）の下流側でスプリットして導入した。検出は、キャピラリー電気泳動用紫外線検出器（日本分光製、CE-1570）を用い、フューズドシリカキャピラリーカラムのポリイミド被覆を一部取り除いてオンカラム検出法により行った。スプリットは、市販のナノ Y コネクター（Upchurch Scientific 製）を用いて行い¹¹⁾、スプリット比

は抵抗管（フューズドシリカキャピラリー）の内径と長さによって調整した。試料成分として、芳香族炭化水素及びアルキルベンゼンを選択した。本研究では、入口圧力とカラム長を変化させ、分離度を保ちつつ、分析時間の短縮化を図った。

粒子充填型キャピラリーカラムを既報¹⁵⁾のスラリー法に従って調製し、モノリス型キャピラリーカラムとの性能を比較した。この際、移動相の送液には SSC-3700 マイクロポンプ（センシユー科学製）を使用し、試料は Nano Injector（0.02 μl ; ケムコ製）により注入した。

3 結果及び考察

3.1 移動相の線流速のカラム性能に与える影響

高速分離を達成するためには理論段高さ（あるいは理論段数）の移動相の線流速依存性を検討する必要がある。

移動相に 60% アセトニトリル水溶液を用い、移動相の高線流速と理論段高さとの関係を測定した。ここでは、内径 100 μm のモノリス型キャピラリーカラムを用いた。検討した試料の中で最も保持の大きい *n*-アミルベンゼンについての結果を Fig. 2 に示した。カラム長を 15.0 cm とし、移動相の線流速は入口圧力を変えることによって調整した。その結果、移動相の線流速が 0.53 mm s^{-1} のときに最も良いカラム性能が得られ、このときの *n*-アミルベンゼンについて達成された理論段数は 8300 段であった。移動相の線流速の上昇とともに理論段数は低下したが、線流速が 15 mm s^{-1} のとき *n*-アミルベンゼンについて達成された理論段数は 1500 段であった。また、このときの入口圧力は 6.0 MPa であった。なお、移動相の線流速は本条件下で保持がないと思われる亜硝酸ナトリウムから求めた。一方、抵抗管には内径 50 μm 、長さ 4.8 cm のフューズドシリカキャピラリーを用い、スプリット比は約 1 : 100 で

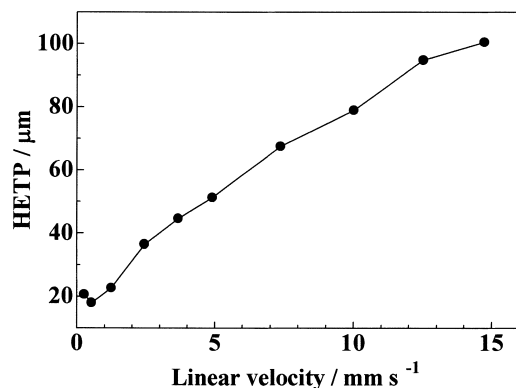


Fig. 2 van Deemter plots up to higher velocity

Column: monolithic ODS column ($15 \times 100 \mu\text{m}$); Eluent: acetonitrile/water (60 : 40); Sample: *n*-amylbenzene; Restriction tube: $4.8 \text{ cm} \times 50 \mu\text{m}$; Split ratio: 1 : 100

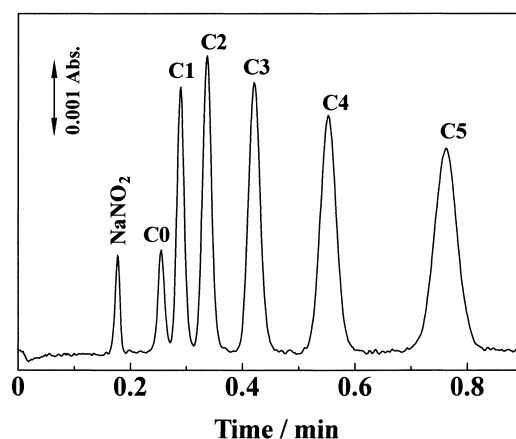


Fig. 3 Separation of benzene and alkylbenzenes on a 15-cm monolithic column

Inlet pressure: 6.0 MPa; Linear velocity: 14.7 mm s^{-1} ; Sample: benzene (C0), toluene (C1), ethylbenzene (C2), *n*-propylbenzene (C3), *n*-butylbenzene (C4), *n*-amylbenzene (C5); Wavelength of UV detection: 210 nm; Other operating conditions as in Fig. 2

あった。なお、用いたカラムのシリカモノリスの骨格は、走査型電子顕微鏡観察により、約 $2 \mu\text{m}$ の大きさであった。一方、スルーポアサイズは $5 \sim 10 \mu\text{m}$ であった。

3・2 高速分離例

カラム長さ 15 cm のモノリス型キャピラリーカラムを用いてベンゼン及びアルキルベンゼン 5 種の 6 成分の高速分離を試みた。Fig. 3 にその分離例を示す。Fig. 3 は、60% アセトニトリル水溶液を移動相として用い、入口圧力 6.0 MPa 、移動相の線流速 15 mm s^{-1} の条件で測定されており、1 分以内に 6 成分の完全分離が達成されているこ

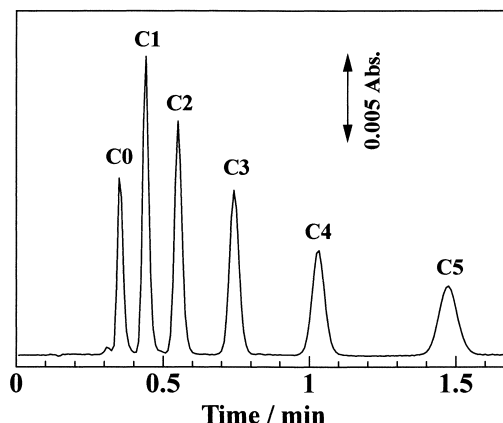


Fig. 4 Separation of benzene and alkylbenzenes on a 5-cm microcolumn

Column: L-column ODS ($5 \text{ cm} \times 0.53 \text{ mm}$); Eluent: acetonitrile/water (70 : 30); Flow rate: $50 \mu\text{l min}^{-1}$; Inlet pressure: 5.5 MPa; Injection volume: $0.02 \mu\text{l}$; Sample and wavelength of UV detection: as in Fig. 3

とが分かる。*n*-アミルベンゼンは 0.76 分 に溶出し、1500 段の理論段数が達成されている。

通常の粒子充填型カラムによる高速分離を試み、モノリス型キャピラリーカラムの性能と比較した。ここでは、粒子径 $5 \mu\text{m}$ のオクタデシルシリカ L-column ODS (CERI 製) を内径 0.53 mm 、長さ 5 cm のフューズドシリカキャピラリーに充填し、Fig. 3 と同程度の入口圧力下での分離を試みた。結果を Fig. 4 に示した。Fig. 4 では、移動相として 70% アセトニトリル水溶液を用いた。移動相流量は、 $50 \mu\text{l min}^{-1}$ (移動相の線流速 2.6 mm s^{-1}) で *n*-アミルベンゼンは 1.47 分 に溶出し、2300 段の理論段数が達成されている。Fig. 4 の条件下での入口圧力は、 5.5 MPa であった。なお、Fig. 4 では、内径 0.35 mm のフューズドシリカキャピラリーをフローセルとして用いている。

L-column ODS 及びモノリス型 ODS カラムについて、70% アセトニトリル水溶液を移動相としたときの *n*-アミルベンゼンの保持係数を比較すると、それぞれ 1.43 及び 3.78 であった。このことは、カラム体積当たりには ODS 結合量は、前者が後者の約 2.6 倍であることを示している。

粒子充填型マイクロカラムは、Fig. 4 の条件下で Fig. 3 のモノリス型キャピラリーカラムの結果と比べて分析時間がおおよそ 2 倍となっているが、より大きな分離度を達成しているので、更に入口圧力を上げることによって分離時間の短縮を図ることができると考えられる。すなわち、入口圧力が実験上の制限とならない範囲では、モノリス型シリカキャピラリーカラムと粒子充填型キャピラリーカラムは同程度の高速分離能力を持っていると判断できる。ただし、Fig. 3 と 4 で達成された移動相の線流速とカラム長

Table 1 Measurement data for *n*-amylbenzene and the column length required for producing 2000 theoretical plates at various inlet pressures

Inlet pressure/ MPa	Linear velocity/ mm s ⁻¹	Retention time/ min	Plate height/ μm	Plate number	Column length-2000/ cm	Retention time-2000/ min
0.1	0.27	41.56	21	7260	4.1	11.45
0.2	0.53	21.15	18	8330	3.6	5.08
0.5	1.25	8.72	23	6610	4.5	2.64
1.0	2.45	4.44	36	4110	7.3	2.16
1.5	3.68	3.05	45	3360	8.9	1.81
2.0	4.91	2.31	51	2930	10.3	1.58
3.0	7.36	1.49	67	2220	13.5	1.34
4.0	10.01	1.10	79	1900	15.8	1.16
5.0	12.51	0.89	95	1580	19.0	1.12
6.0	14.72	0.76	100	1490	20.1	1.02

Operating conditions: as in Fig. 3. Column length-2000: column length required for producing 2000 theoretical plates. Retention time-2000: retention time of *n*-amylbenzene on the column producing 2000 plates

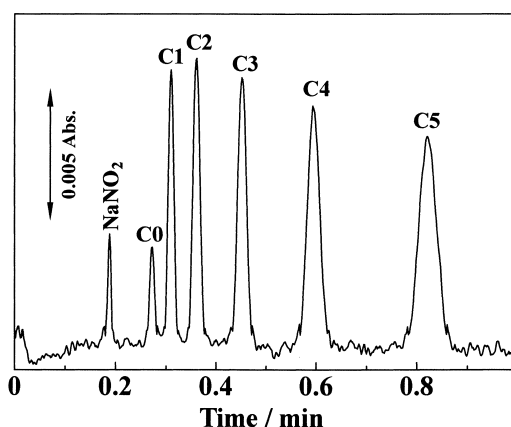


Fig. 5 Separation of benzene and alkylbenzenes on a 30-cm monolithic column

Inlet pressure: 12.0 MPa; Linear velocity: 25.0 mm s⁻¹; Split ratio: 1 : 75; Other operating conditions as in Fig. 3

からわかるように、カラム透過性はモノリス型キャピラリーカラムがはるかに優れていた。このことは、モノリス型キャピラリーカラムの理論段高さを改善することにより、分析時間をより短縮することができることを示している。

3.3 カラム長さの最適化

モノリス型キャピラリーカラムについて、カラム長さの最適化を検討した。Table 1 に 15 cm のモノリス型キャピラリーカラムについて、入口圧力、移動相線流速、*n*-アミルベンゼンの保持時間、理論段高さ、理論段数、各線流速の条件で理論段数 2000 段を達成するのに必要なカラム長さ (Column length-2000)、及び 15 cm カラムと同じ線流速で操作したときの *n*-アミルベンゼンの予想される保持時間 (retention time-2000) をそれぞれ比較検討した。Table 1 から分かるように、移動相の線流速 0.53 mm s⁻¹

では 3.6 cm のカラムを用いて、*n*-アミルベンゼンが 5.08 分に溶出する。また、移動相の線流速 14.72 mm s⁻¹ では 20.1 cm のカラムを用いて *n*-アミルベンゼンが 1.02 分に溶出する。*n*-アミルベンゼンの保持時間は、カラム長さが長く、移動相線流速が早いほど短くなっており、このことは、長いカラムを用いて入口圧力を高くしたほうが迅速分離に有利であることを示している。Table 1 で示した方法により、必要な理論段数が分かればカラム長さの最適化を図ることができる。これらの最適化は、移動相組成ごとになされなければならない。Table 1 から 6.0 MPa の入口圧力では、20.1 cm のカラムを用いて 1.02 分で 2000 段の理論段数が得られることが分かる。すなわち、Table 1 の結果は、15 cm より長いカラムを用い、高い入口圧力をかけることによって分離が改善できることを示している。

Fig. 5 に長さ 30 cm のモノリス型シリカキャピラリーカラムを用い、入口圧力を 12.0 MPa としたときの迅速分離を示した。Fig. 3 の 15 cm のカラムで達成された分離と比べて分離が改善されていることが分かる。このことは、Fig. 5 の条件下で *n*-アミルベンゼンについて 2100 段の理論段数が達成されていることから裏付けられる。このときの *n*-アミルベンゼンの保持時間は、0.88 分であった。更なる迅速化は、用いたシステムの耐圧性の限界まで入口圧力を上げることと適切なカラム長を選択することによって達成できるものと考えられる。

Fig. 3 及び Fig. 5 で観察されるベースラインは、Fig. 4 のそれと比較して大きい。これは前者ではモノリス型シリカキャピラリーカラムの内径が小さく、カラム外での試料成分の拡散の影響を最小限に抑えるためにオンカラム検出をしていることに基づいている。オンカラム検出を行うと、固定相の影響及び小さなフローセル光路長のために通常の検出 (Fig. 5) と比べてノイズレベルが高くなる。

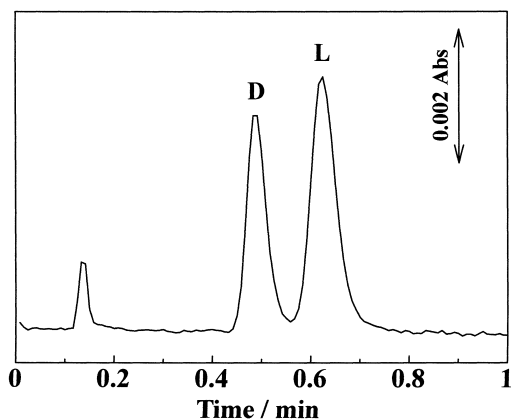


Fig. 6 Rapid enantiomeric separation of dansyl phenylalanine

Column: monolithic ODS column (20 cm \times 100 μ m); Eluent: 20% acetonitrile aqueous solution containing 15 mM γ -cyclodextrin and 50 mM ammonium acetate (pH = 7.3); Sample: Dansyl-DL-phenylalanine; Inlet pressure: 11 MPa; Restriction tubing size: 50 cm \times 50 μ m; Split ratio: 15 : 1; Wavelength of UV detection: 210 nm

3・4 ダンシルアミノ酸の迅速分離例

中極性試料成分として, ダンシルフェニルアラニン対掌体の迅速分離例を Fig. 6 に示す. ここでは, 移動相中に γ -シクロデキストリンを加えることによって対掌体^{しょうたい}を分離している.

文 献

1) J. E. MacNair, K. C. Lewis, J. W. Jorgenson: *Anal. Chem.*, **69**, 983 (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*, **762**, 135 (1997).
- 4) N. Ishizuka, H. Minakuchi, K. Nakanishi, N. Soga, N. Tanaka: *J. Chromatogr. A*, **797**, 133 (1998).
- 5) N. Tanaka, H. Nagayama, H. Kobayashi, T. Ikegami, K. Hosoya, N. Ishizuka, H. Minakuchi, K. Nakanishi, K. Cabrera, D. Lubda: *J. High Resol. Chromatogr.*, **23**, 111 (2000).
- 6) N. Ishizuka, H. Minakuchi, K. Nakanishi, N. Soga, H. Nagayama, K. Hosoya, N. Tanaka: *Anal. Chem.*, **72**, 1275 (2000).
- 7) N. Tanaka, H. Kobayashi, K. Nakanishi, H. Kobayashi, N. Ishizuka: *Anal. Chem.*, **73**, 420A (2001).
- 8) N. Ishizuka, H. Kobayashi, H. Minakuchi, K. Nakanishi, K. Hirao, K. Hosoya, T. Ikegami, N. Tanaka: *J. Chromatogr. A*, **960**, 85 (2002).
- 9) M. Motokawa, H. Kobayashi, N. Ishizuka, H. Minakuchi, K. Nakanishi, H. Jinnai, K. Hosoya, T. Ikegami, N. Tanaka: *J. Chromatogr. A*, **961**, 53 (2002).
- 10) N. Tanaka, H. Kobayashi, N. Ishizuka, H. Minakuchi, K. Nakanishi, K. Hosoya, T. Ikegami: *J. Chromatogr. A*, **965**, 35 (2002).
- 11) K. Cabrera, D. Lubda, H. M. Eggenweiler, H. Minakuchi, K. Nakanishi: *J. High Resol. Chromatogr.*, **23**, 93 (2000).
- 12) A. M. van Nederkassel, A. Aerts, A. Dierick, D. L. Massart, Y. Vander: *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **32**, 233 (2003).
- 13) T. Takeuchi, D. Ishii, A. Nakanishi: *J. Chromatogr.*, **285**, 97 (1984).
- 14) 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).
- 15) T. Takeuchi, D. Ishii: *J. Chromatogr.*, **213**, 25 (1981).

要 旨

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 μ m 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, 小さな入口圧力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* で調製が可能なことから, キャピラリー液体クロマトグラフィー及びキャピラリー電気クロマトグラフィーの高分離能カラムとして期待が高い. 本研究では, モノリス型シリカキャピラリーカラムの高い透過性を利用して高速分離の可能性を検討した. 種々入口圧力下での測定を行い, カラム長さ及び入口圧力を最適化し, 1 分以内でベンゼン及び5種アルキルベンゼンの迅速分離を達成した.