

博士論文要録

キャピラリー液体クロマトグラフィーのためのマイクロフロー制御技術の開発

Lee Wah LIM

学位授与：名古屋大学（2007年1月31日）

液体クロマトグラフィー（LC）の高性能化並びに環境低負荷を図るためには、分離カラムのダウンサイジングが有効であり、高性能キャピラリー LC システムの開発が期待されている。すなわち、LC の更なる高度化・迅速化が図られ、ランニングコストの軽減が達成される。しかし、多くの利点を有するキャピラリー LC はまだ広く普及していない。これは、キャピラリーカラムの性能が通常のものとほとんど変わっていないためである。本論文では、デッドボリュームの極めて小さなマイクロバルブをキャピラリー LC システムに組み入れることによって、カラム性能を損なうことなく、多機能を有するキャピラリー LC システムを提案した。

第1章は本研究の背景、目的及び意義について述べた。

第2章では、ガス圧を利用する階段状勾配溶離送液システムの開発について述べた。勾配溶離法は、広範囲にわたる溶出成分を効率よく分離するために広く用いられ、分析時間の短縮、分離度の改善などに特に有効である。キャピラリー LC では、低流量で精度の高い送液ポンプが利用できなかったことから、多くの場合、スプリット方式によって、通常の LC から供給される移動相の一部を低流量での勾配溶離を達成してきた。キャピラリー LC においては、1 台のポンプ及び 2 個の六方切り替えバルブを用いる簡易な階段状勾配溶離システムが提案されているが、バルブ切り替え時に流量が減少し、流量の正確さと再現性に問題がある。この問題を解決するには 3 台のポンプを用いる階段状勾配溶離システムが開発されているが、コスト的に問題である。そこで、ガス圧を利用した階段状勾配溶離送液システムを開発した。このシステムは、ガスポンプ、六方選択バルブ、インジェクター又はプレカラム濃縮システム、分離カラム、紫外検出器及び 1 台のシリンジポンプから構成されている。移動相はガス圧によって送液され、検出器下流側に設置されたシリンジポンプの吸引速度がシステムの流量となる。六方バルブに取り付けられたループにあらかじめ組成の異なる移動相が満たされ、バルブを切り替えることによって、アルゴンガス加圧下で瞬時にループ内の組成の異なる移動相を供給することができる。開発したシステムは、フタル酸エステル及びアルキルベンゼンの勾配溶離に応用した。

第3章では、オンライン試料濃縮システムの開発について述べた。キャピラリー LC の利点の一つとしてマス感度の増加があるが、試料注人体積を大きくすることができないので、通常の LC と比べ濃度感度が低い。また、キャピラリー LC では、分離カラム内径の微小化に伴い、試料成分のカラム外における拡散の問題が大きくなるため、試料の有効な導入法を考えなければならない。本研究では、デッドボリュームの小さい六方切替バルブを用いて、オンラインプレカラムあるいはオンカラム試料濃縮法を開発し、大量サンプルの導入を実現した。オンカラム濃縮法とは、試料濃縮・分離が同じ分離カラム内で行われる手法で、試料の溶媒及び移動相の組成の差により、導入した試料が分離カラムの先端に濃縮され、それから溶出される。分離カラムの性能を損なうことなく、通常の 0.2 μL 導入量の 50 倍に相当した 10 μL の試料を直接導入することができ、6 種無機陰イオンに対する検出下限は 0.6~7.7 $\mu\text{g L}^{-1}$ であった。環境水に含まれる 6 種類の無機陰イオンの濃縮・分離に応用したところ、硝酸及び亜硝酸の定量ができた。しかし、イソクラチック溶離モードでは、大量な試料がピークの広がりをもたらし、分離性能を低下してしまう。そこで、分離カラムの上流側にプレカラムを取り付け、大量サンプル（最大 1 mL、5000 倍濃縮）を一時的にプレカラムに吸着させ、プレカラム濃縮を達成した。結果的により高濃度で少量の試料が分離カラムに導入される。プレカラム濃縮法はオンカラム濃縮法より 1 桁良い感度が得られた。プレカラムの充填剤として C_{18} 、 C_{30} 、陰イオン交換体のほかにモノリス型 C_{18} 又は C_{30} でコーティングした石英繊維の濃縮効率を調べてみた。このシステムを用いて、河川水中の無機陰イオンや水道水に含まれるフタル酸エステルなどの微量定量に成功した。また、ホウ酸系充填剤を用いると、PET ボトル飲料に含まれるビスフェノール A の選択的濃縮・定量が可能であった。

第4章では、逆相リサイクルシステムの開発について述べた。LC に使われている充填カラムでは、5 μm 以下の充填剤を使用する場合、送液圧力の増加を伴うため、一般的なシステムでは制限が多い。また、モノリス型シリカキャピラリーカラムは、充填カラムと比較して透過性が良くカラム圧力損失が小さいので、より高い分離能力を持っているが、長いカラムを調製することは非常に困難である。そこで本研究では調製した内径 0.1 mm のモノリス型シリカキャピラリーカラム 2 本を用いて、リサイクル分離を可能

とする実験装置を開発した。リサイクルクロマトグラフィーとはカラム溶出液を再びカラムへ導入することで、結果的に長カラムを用いた場合と同様の分離を得るための方法である。この装置を利用して近接した保持を持つベンゼンとベンゼン- d_6 の分離を試みた。送液圧力 1.0 MPa で、2 成分を 5 サイクル目で完全分離することに成功し、このときのベンゼン及びベンゼン- d_6 の理論段数は、それぞれ、160000 及び 150000 段であった。更に送液圧力を 2.5 MPa に上げると 2 成分の分離時間を 300 分から 70 分に減らすことができた。すなわち、このシステムは、高性能（高理論段数）と高速（低圧力）を両立することができる。

第 5 章では、酵素固定化カラムによるタンパク質のトリプシン消化及び消化物の分離について述べた。トリプシンは特異性の高い酵素であり、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）でのタンパク質やポリペプチドの分析においても加水分解を触媒する酵素として多く用いられている。トリプシンにより試料を加水分解する際には、事前に温度管理の下で試料とトリプシンを反応させるのが一般的で、その反応時間は 4～24 時間と報告によって様々であり、統一されていない。そこで、今回はタンパク質のトリプシン消化をオンラインで行うためのトリプシン固定化カラムを作製し、酵素消化の簡易化、迅速化を図った。酵素固定化カラムは、アミノプロピル多孔性粉末ガラスビーズを担体として、グルタルアルデヒドを介してトリプシンを共有結合で固定化させたものを用いて作製した。試料を 1.0 μ L

min^{-1} で送液したとき、酵素固定化カラムによるトリプシン消化と従来法によりトリプシン消化した BSA 試料のクロマトグラムにおいて同等なものが得られた。このオンラインタンパク質消化システムは、手動によるトリプシン消化と比べて、操作上より簡便にタンパク質のトリプシン消化ができ、タンパク質の二次元分離への適用も可能となった。

第 6 章では本論文の総括で、本研究の有用性及び将来展望についてまとめた。

公表論文

- 1) 竹内豊英, L. W. Lim: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **50**, 825 (2001).
- 2) L. W. Lim, T. Miwa, T. Takeuchi: *Anal. Sci.*, **17** (Supplement), i887 (2001).
- 3) L. W. Lim, J.-Y. Jin, T. Takeuchi: *Anal. Sci.*, **19**, 447 (2003).
- 4) L. W. Lim, K. Hirose, S. Tatsumi, H. Uzu, M. Mizukami, T. Takeuchi: *J. Chromatogr. A*, **1033**, 205 (2004).
- 5) L. W. Lim, H. Uzu, T. Takeuchi: *J. Sep. Sci.*, **27**, 1339 (2004).
- 6) L. W. Lim, T. Takeuchi: *J. Chromatogr. A*, **1106**, 139 (2006).
- 7) L. W. Lim, M. Tomatsu, T. Takeuchi: *Anal. Bioanal. Chem.*, **386**, 614 (2006).
- 8) L. W. Lim, Y. Okouchi, T. Takeuchi: *Talanta*, **72**, 1600 (2007).



Digest of Doctoral Dissertation

Development of Micro-Flow-Controlled Techniques for Capillary Liquid Chromatography

Lee Wah Lim

Department of Chemistry, Faculty of Engineering, Gifu University,

1-1, Yanagido, Gifu-shi, Gifu 501-1193

(Awarded by Nagoya University dated January 31, 2007)

Capillary liquid chromatography (LC) saves energy and waste, and possesses several advantages over conventional LC; nevertheless it has not been very much popularized since its appearance due to the fact that the column efficiency of the capillary at this moment is not dramatically higher than that of conventional LC. The present research focused on developing versatile capillary LC systems using commercially available low dead-volume micro unions and valves, allowing simple postcolumn-controlled stepwise-gradient elution, on-line sample enrichment (on- and precolumn enrichments) and recycle separation with relatively superior efficiency and tolerable band broadening. The on-column enrichment gave a 50-fold improvement in sample injection, while the precolumn allowed injection of up to 5000-fold, which is so far the highest enrichment factor that has been reported. These systems were successfully applied to the analysis of environmental as well as drinking water samples. Alternatively, an alternate-pumping recycle chromatography system was newly-designed using two monolithic silica capillary columns, and baseline separation of benzene and deuterated benzene was achieved after 5 cycles when the system attained 160000 theoretical plates. Additionally, the development of a novel glass-bead-based immobilized-enzyme micro column for simple and swift on-line protein digestion and its peptide separation by reversed-phase HPLC was also described.

(Received June 17, 2008)

Keywords : capillary liquid chromatography; on-line sample enrichment; postcolumn-controlled stepwise-gradient elution; alternate-pumping recycle chromatography; immobilized-enzyme microcolumn; high resolution; trace analysis.