

学会創立20周年記念特集

分離カラム開発の変遷とシリカモノリス、
クロマトグラフィー科学会、国際シンポジウム

田中信男

(京都工芸繊維大学)

1. 分離カラム開発の変遷とシリカモノリス

1970年代は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 発展の初期で、HPLCは現在の理解である High Performance Liquid Chromatography でなく、まだ High Pressure Liquid Chromatography と呼ばれ、性能と機器の信頼性においてやや不足していた。1973年に Edward Thornton 教授の下で、疎水性相互作用の発現メカニズムやカルボン酸塩コート ODS 固定相の性質を検討するために、購入してあった HPLC を初めて使用した。Thornton 教授は、物理有機化学から生物有機化学を志向し始めていたところだった。当初は数十マイクロンの充填剤をカラムにマニュアル充填して数百段/60 cm の性能を得ていたが、程なく 10 μm 粒子充填カラムが市販され、数千段/30 cm の理論段数を示して H/D 同位体化合物を容易に分離した[1]。重水素の効果をはっきりと示すクロマトグラムは、反応速度に対する小さな二次同位体効果に慣れたものにクロマトグラフィーの能力を焼き付けた。その数年後77-79年に Barry Karger 教授の下で HPLC カラム、充填剤、ならびに、LC 応用機器開発に携わった。共同研究者の Lloyd Snyder 博士は HPLC の広い範囲について非常に実践的なアプローチを行い、その主導で開発された 5 μm ODS シリカ粒子充填カ

ラムは、初期の微粒子充填カラムとしては非常に良い性能を示した。この過程で、結果的には高性能のカラム作成に成功しているが、カラム充填プロセスは名人芸を含んでいるように思われた。

1980年代には逆相 HPLC が汎用となり充填剤の微粒子化、ODS 充填剤の高性能化が進んだ。シリカを基材とする化学修飾型固定相の調製において、シラノール効果や金属不純物の効果を抑制する修飾法は、 $^{16}\text{O}/^{17}\text{O}/^{18}\text{O}$ あるいは $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ などの同位体化合物の分離を可能とした。ほとんど役に立たない研究の中で少しだけ役に立ったと思われるのは、いわゆるシラノール効果が Si-OH の効果だけではなくシリカ中の金属不純物がもたらす効果を含むのではないかという考えから、解決法として高純度シリカの使用[2]、および、木全一博氏らとともに立体選択性や金属不純物の効果を含む ODS 固定相のテスト法を報告したことである [3]。主にクロマトグラフィーの化学的な側面についての実験の中で短期間行ったキャピラリーカラムとオンカラム検出器の使用法を通じて [4]、津田孝雄先生や寺部茂先生に教えていただいたことが、後で非常に役に立っている。しかし同時にクロマトグラフィーの理論を学んでおかなかったことが、あとから考えると少し残念である。

90年代には ODS カラムを用いる逆相 HPLC が成熟し、HPLC やカラムに関する研究からキャピラリー電気泳動 (CE) やキャピラリー電気クロマトグラフィー (CEC) に研究者の関心に移りつつあった頃、中西和樹先生と水口博義氏からモノリス型シリカを用いる HPLC カラム作成とその評価法について相談を受けた。粒子充填型と異なるモノリスの構造、骨格外空隙と骨格とのサイズ比、空隙率、骨格と空隙の形など、多くの特性に興味をもたれたが、当初 tetramethoxysilane (TMOS) からの調製が困難をともない、クロマトグラフィー関係者から見ると十分な性能が得られない状態で、水口氏は辛抱強く調製を続けられた[5,6]。シリカ骨格と through pore サイズあるいはドメインサイズの効果とともに、(理論段数/圧力) の尺度で、粒子充填型カラムより一桁近い高性能発現の可能性が示され、続いて TMOS-methyltrimethoxysilane (MTMS) Hybrid 型モノリスシリカ調製法

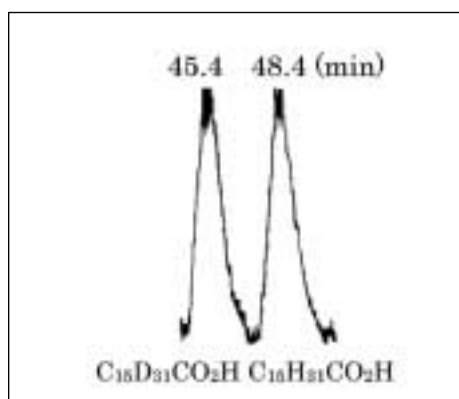


図1. 逆相クロマトグラフィーによる水素/重水素同位体化合物の分離 [1]。カラム： μ -Bondapak C18 (4 mm I.D., 30 cm)。移動相：メタノール/水=80/20 pH 3.33 with acetic acid, 0.5 mL/min。溶質： $\text{C}_{15}\text{H}_{31}\text{COOH}$, $\text{C}_{15}\text{D}_{31}\text{COOH}$ 。

とキャピラリーカラム調製法が開発された[7,8]。

90年代から2000年代にかけて、汎用 5 μm 粒子充填カラムをはるかに超えるカラム性能の追求が現実的となり、超高压 HPLC (UHPLC) [9]が 2 μm より小さな粒子充填剤や表面多孔性充填剤[10]とともに開発され、モノリス型シリカカラムも市販され始めた。今日、HPLC の性能向上は再び多くの研究者や使用者の興味の対象となっている。70-80年代の粒子充填型カラムの開発当時とは異なり、機器の性能限界とカラム(充填剤)の最適使用条件が近いという条件下で次世代の標準を目指して HPLC の高性能化が図られている。理論的には粒子のさらなる微粒子化により(時間あたりの理論段数において)一層の高性能化が可能であり、微粒子の製法も UHPLC と同じところに報告されているが、問題は、汎用の機器を作ることのほか、分離や性能に対する圧力や摩擦熱による影響を抑える点にあると思われる。

今後モノリス型シリカカラムはいくつかの面で研究課題を提供するものと考えられる。

(1) 高速における高理論段数: 2 μm 程度の充填剤は高速 (t_0 = 数秒、400-500気圧) で 1-3 万段の理論段数を与える。一方、透過率において優位であるモノリス型シリカは、研究段階で 2-2.5 μm 相当の性能を示している[11]。UHPLC が一般的となり微粒子化された充填剤が実用となるか、あるいは小さなドメインサイズをもつモノリスシリカが一層の高速、高性能をもたらすか、カギとなるのはいずれにおいても小さな構造(小さな粒子と粒子充填、モノリス型の場合には、均一性の高い、小さな連続構造の実現)である[12]。

(2) 高理論段数: 1970年代から研究対象となってきた100万段を超える高理論段数の発現は、粒子充填カラムを接続するアプローチでなく、10-30 μm 程度の細いオープンチューブキャピラリーカラムを用いて保持係数の小さな溶質に対して実現されてきた[13]。キャピラリー内に調製されたモノリス型シリカカラムは、数本接続して10 m を超える長さとするることにより、400-500気圧程度において保持される溶質に対して100万段を超える性能を与えた[14]。この投稿論文に対して、ギネスブック向きであるというコメントを受けた。長いキャピラリーカラムの作成と高い透過率の点で、モノリス型シリカはこの種の応用に非常に適している、実際に非常に長いキャピラリーカラムが実用となる可能性もある。図2は、約800 cm の ODS 型モノリスシリカキャピラリーカラムにより $\text{C}_6\text{H}_5\text{D}$ 、 C_6H_6 を分離したクロマトグラムである。試料として用いたのは benzene- d_6 、benzene-1,3,5- d_3 、benzene- d 、benzene の混合物であるが、重水素 1 個の差に基づいてすべての H/D 同位体置換ベンゼンの分離が示されている。(見かけの結果にかかわらず、なぜこの系で tailing が起こるか、他の溶質に比べて理論段数が小さいか、なぜ三相系の移動相が最適かなど、個々の溶質に対するカラム性能について不明の点も多い。)

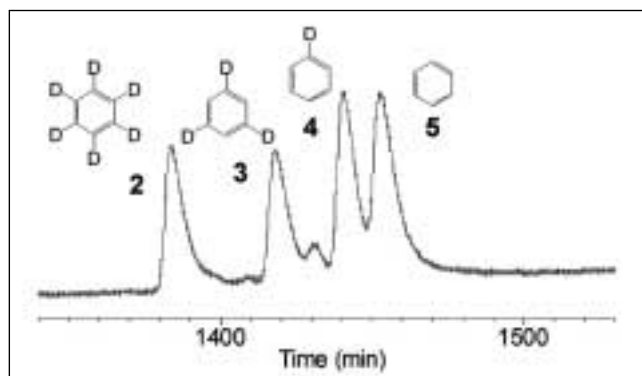


図2. ベンゼン重水素同位体化合物の分離。カラム: モノリス型シリカ- C_{18} キャピラリーカラム, 100 mm I.D., 850 cm (500 cm + 350 cm). 移動相: アセトニトリル/メタノール/水 = 10/5/85. 線速度: 1.02 mm/s. 検出: 210 nm. 温度: 30°C. 溶質: benzene- d_6 , benzene-1,3,5- d_3 , benzene- d , benzene. 圧力 = 34 MPa.

(3) 官能基修飾型固定相: ODS 充填剤を用いる逆相クロマトグラフィーによる分離が困難であるような試料のために、親水性相互作用 LC (HILIC)、イオン交換、サイズ排除などのモードの HPLC のために提供されている粒子充填型カラムの性能は、逆相 HPLC 用カラムに比べると低い。これが固定相の構造と相互作用、すなわち充填剤に本質的なものか、修飾後粒子のカラムへの充填の困難によるものか、明らかでない。モノリス型シリカカラムにおいてはカラム内でシリカが固定され、化学修飾後、カラム充填を行う必要がないので、固定相が物質移動を妨げなければ、担体のもつ高性能の発現が期待される[15]。

(4) 多次元 HPLC: HPLC 分離溶出液を細かく分画し、これを試料溶液として第二次元 HPLC に注入することにより、Comprehensive 2D-HPLC が実現するが、高いピークキャパシティを得るためには細かく 1 次元溶出液を分画する必要がある。一般的に第一次元の方画に対応する短い時間で第二次元 HPLC の分離を終了するために、第二次元分離は非常に高速で行われる。そのためのカラムとして、高い理論段数、高い透過率と流れに対する安定性が求められ、これらの点でモノリス型シリカは高速分離に適している。第一次元を一般的なグラジエント溶出、第二次元に現在市販されている最高性能、最適長さのカラムを組み合わせる場合、1 時間あたり 3000 (モノリス型シリカカラム)-5000 (2 μm 粒子充填カラム) のピークキャパシティが可能であると計算される[16]。

微粒子充填剤充填カラムは高压操作を必要とするが、短時間で高い理論段数を発現する確実な手段である。一層の微粒子化が一層の高速性能をもたらすものと期待されるが、一般的な使用においてカラム中で摩擦熱がもたらす温度分布による性能低下や、保持と分離に対する圧力の効果を考慮することが必要となる。また、溶質の拡散係数を増大させてさらに

高性能を実現するために、高温での HPLC 分離が提唱されている。従来 HPLC 機器の仕様はカラムの要求に対して十分であったが、今後はカラム性能と必要条件が HPLC 機器の仕様にも影響することが予想され、大げさに言えば、カラムが HPLC の仕様を決め、そのような限界的性能を示す機器、分離剤の応用が、例えば、広い範囲の生命関連科学の進歩の速度に影響することもあると思われる。

2. クロマトグラフィー科学会

1980年代、クロマトグラフィー科学会の前身当時から参加させていただき、発足後しばらく学会開催のたびにヤクルトホールが満員となる熱気に圧倒された時代があった。その当時の運営に努力された先生方のご苦勞を十分に理解せずに、2000-2003年、中川照眞先生、寺部先生の会長時代に事務局を担当させていただいた。事務に追われるばかりで、財政や会費にかかわる懸案を解決することなく、また、会員管理等を委託していた学会事務センターの状況を察知することができず、2004年から引き継がれた神野清勝会長、竹内豊英事務局長ほか、会員の皆様にたいへんご迷惑をおかけしたことを申し訳なく思っている。

現在、事務局長の大塚浩二先生に支えられながら会長を務めさせていただいているとき、法人化の問題が現実化してきている。人材の育成、クロマトグラフィーの進歩、他分野の科学技術あるいは健康、産業への貢献などとともに、会員数や学会、シンポジウムの状況を考えると、公益法人となると同時に、活動をより活発にしていくことが必要である。学会の事業は、「学術及び科学技術の振興を目的とする事業」に合致し、非会員の利益の増進にも寄与する公益目的事業と考えられる。書類の閲覧、立ち入り検査などによる行政庁による監督、意思決定組織の改編、書類の整備と情報公開の必要性など、負担が増加することは間違いないようであるが、会員の皆様の協力を得ながら現実的な方策を考えて行くことが必要だと思われる。

現在 HPLC を最も必要としている分野は医薬学分野であると考えられるが、いわゆる Biopharmaceuticals においては、製品コストの70-90%が分離精製にかかわるといわれている。分離精製の技術的な側面を担当する専門家が、研究活動の発表や意見交換により相互のレベルアップを図ることは、この分野にとって大きな助けとなるものと思われる。高速化、マイクロ化、自動化などが流れとなり、理解や操作が高度になるとともに個人がカバーできる領域が狭くなりがちなとき、理論、機器、分離媒体、条件開発、サンプル前処理などについて、基礎に基づいて考える人材を育てていくことが非常に大切に思われる。HPLC 機器が多用途型から、用途によって選択するブラックボックスとなることはないとしても、目的に応じて現在よりも細かく機器の仕様と分離剤を使い分けることが必要となるかもしれない。いずれにしても、使用の対象が深く専門的になるにしたがって、理解し、考

る使用者が活躍できるよう情報交換の場として学会の重要性が増すものと思われる。とくに現在のように高性能分離媒体や機器が開発されつつあるときに、その研究発表や意見交換に参加することは、ニーズや進歩に対する迅速な対応を可能とするものと思われる。

クロマトグラフィー科学会会員数は漸減の傾向を示しているが、最近の中国における研究の進展は著しい。中国クロマトグラフィー学会は個人会員制でなく機関会員制であり、機関会員数からクロマトグラフィー人口は10-20万人と推定されている。2008年12月に京都で開催された第33回高性能液相分離及び関連技術国際シンポジウム (The 33rd International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques: HPLC2008 Kyoto) には、中国 (68名)、台湾 (31名) を含むアジア諸国から約120名、ヨーロッパ、アメリカから60名 (国外参加者合計185名)、国内参加者を併せて、26カ国、435名が参加し、前回 HPLC Kyoto (2001年9月開催) と比較して、参加者、発表件数とも約1.5倍となった。口頭発表・講演92件、ポスター発表241件の中で、中国からの参加者は約90件の発表を行い、Journal of Chromatography A 特集号への投稿論文80編あまりのうちの多数を占めている。

HPLC2008 Kyoto において、国内からの参加者数、発表数はそれぞれ250名、120件であり、ポスター発表や Evening Session において国内の若手研究者が非常に興味深い話題についてレベルの高い発表を行ったことは次世代の分離科学にとって心強いものであったが、将来、非常に厳しい競争も予測される。とくに充填剤、試料前処理剤やその使用法の開発、天然物の分離分析など、ある程度研究者の数が必要な領域において中国からの大きな寄与が予測される。将来 HPLC シリーズ国際シンポジウムをヨーロッパ-アジア-アメリカの間で順に年1回開催することとして、初めてアジアで2014-15年ころに開催する可能性も話題に上っている。そのときには国外からの参加者はさらに倍増するものと思われるが、我が国においても分離科学と関連分野の一層の発展が期待される。

References

- [1] Tanaka, N.; Thornton, E. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 7300-7307.
- [2] Ohtsu, Y.; Shiojima, Y.; Okumura, T.; Koyama, J.; Nakamura, K.; Nakata, O.; Kimata, K.; Tanaka, N. *J. Chromatogr.* **1989**, *481*, 147-157.
- [3] Kimata, K.; Iwaguchi, K.; Onishi, S.; Jinno, K.; Eksteen, R.; Hosoya, K.; Araki, M.; Tanaka, N. *J. Chromatogr. Sci.* **1989**, *27*, 721-728.
- [4] Tanaka, N.; Kinoshita, H.; Araki, M.; Tsuda, T. *J. Chromatogr.* **1985**, *332*, 57-69.
- [5] Minakuchi, H.; Nakanishi, K.; Soga, N.; Ishizuka, N.;

- Tanaka, N. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 3498–3501.
- [6] Tanaka, N.; Nakanishi, K.; Minakuchi, H.; Ishizuka, N.; Kobayashi, H. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 420a–429a.
- [7] Ishizuka, N.; Minakuchi, H.; Nakanishi, K.; Soga, N.; Tanaka, N. *J. High Resol. Chromatogr.* **1998**, *21*, 477–479.
- [8] Ishizuka, N.; Kobayashi, H.; Minakuchi, H.; Nakanishi, K.; Hirao, K.; Hosoya, K.; Ikegami, T.; Tanaka, N. *J. Chromatogr. A* **2002**, *960*, 85–96.
- [9] MacNair J. E.; Lewis K. C.; Jorgenson J. W. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 983–989.
- [10] Kirkland, J. J.; Truszkowski, F. A.; Ricker R. D.; *J. Chromatogr. A* **2002**, *965*, 25–34.
- [11] Hara, T.; Kobayashi, H.; Ikegami, T.; Nakanishi, K.; Tanaka, N. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 7632–7642.
- [12] Nakanishi, K.; Tanaka, N. *Acc. Chem. Res.* **2007**, *40*, 863–873.
- [13] Swart, R.; Kraak, J. C.; Poppe, H. *J. Chromatogr. A* **1995**, *689*, 177–187.
- [14] Miyamoto, K.; Hara, T.; Kobayashi, H.; Morisaka, H.; Tokuda, D.; Horie, K.; Koduki, K.; Makino, S.; Nunez, O.; Yang, C.; Kawabe, T.; Ikegami, T.; Takubo, H.; Ishihama, Y.; Tanaka, N. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 8741–8750.
- [15] Ikegami, T.; Horie, K.; Saad, N.; Hosoya, K.; Fiehn, O.; Tanaka, N. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *391*, 2533–2542.
- [16] Horie, K.; Kimura, H.; Ikegami, T.; Iwatsuka, A.; Saad, N.; Fiehn, O.; Tanaka, N. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 3764–3770.