

報告番号

※ 乙 第 2789 号

主論文の要旨

題名 ミクロ高速液体クロマトグラフィーの開発と応用に関する研究

氏名 竹内豊英

主論文の要旨

報告番号	※乙第	号	氏名	竹内豊英
------	-----	---	----	------

高速液体クロマトグラフィーは高性能微粒子充てん剤及び高性能高圧ポンプの開発、並びに周辺技術の発展により非常に進歩し、医学、薬学、生化学、環境化学など様々な分野で利用されてきている。高速液体クロマトグラフィーが登場したころ（1969年）、「無限大内径」という概念が提唱され、分離カラムサイズ及び充てん剤粒子径は溶質がカラム内を移動する際にカラム内壁に達しないように設計しないと良好な分離が達成されず、2mm以下の内径をもつカラムでは良好な結果が得られないとされていた。

2mm以下の内径をもつカラムにおける性能の低下はカラム外での溶質の広がり効果によるものと考え、内径0.5mm以下のマイクロ充てんカラムを用いてもカラム性能が低下しないことを実証することから本研究が始まった。高速液体クロマトグラフィーを微小化すると、(1)移動相、固定相の使用量が減少する、(2)マス感度が増加する、(3)質量分析計などへの接続が容易になるなどの有用性が生まれる。これらを達成するためには、低流量送液法、微量試料注入法、高性能マイクロ分離カラムの調製、微小体積検出法、デッドボリュームの小さい連結方法、試料前処理法の開発が必要である。一方、中空キャピラリーカラムを用いるガスクロマトグラフィーが最近多くの分野で活用されてきている。この種のカラムは充てんカラムと比較して透過性が高いため、単位時間、単位圧力損失あたりに得られる理論段数が大きく、複雑な多成分混合物の分析に威力を発揮している。液体クロマトグラフィーにおいてもこのような中空キャピラリーカラムの適用が考えられ、その開発が期待されてきた。本論文の第1編は充てんカラムを用いるマイクロ高速液体クロマトグラフィーの開発とその応用に関する研究をまとめたもので、第2編は液体クロマトグラフィーにおける中空キャピラリーカラムの利用に関する研究をまとめたものである。

第1編は「充てんカラムを用いるマイクロ高速液体クロマトグラフィー」と題し

主論文の要旨

報告番号	※乙第	号	氏名	竹内豊英
------	-----	---	----	------

9章からなる。内径0.1-0.35mmの充てんカラムを用いる高速液体クロマトグラフィーの開発における装置上の問題点や高性能のために解決すべき問題点並びに応用に関する研究をまとめたものである。

第1章はマイクロカラムを固定相の状態やサイズによって類別し、通常の高速液体クロマトグラフィーで用いられているカラムと比較し、本研究の目的及び特色を論じた。

第2章はマイクロ高速液体クロマトグラフの開発とその性能について論じ、移動相の低流量送液法、微量試料注入法、分離カラムの調製法、検出法及びカラム材質の影響について個々に議論した。0.1 μ l以下の微小体積の試料の注入法並びに検出法、1 μ l/minレベルでの精度よい移動相の送液法を開発した。また、フューズドシリカ管をカラム材質として利用することによって、非常に高性能な分離カラムが調製できることを示した。

第3章は高分離能分析のための長いマイクロ充てんカラムの調製法とその性能について論じた。カラム内径が小さくなることによってカラム内の温度の均一性がよくなり、多流路拡散の影響が小さくなることによってカラム長に比例した理論段数が達成できることを示した。サイズ排除モードでは長さ4mのカラムで約20万段、逆相クロマトグラフィーでは1.5mのカラムで約10万段の理論段数が達成され、複雑な混合物の分析に応用できた。

第4章は従来のバッチ式の抽出や濃縮などの前処理に代わる方法として内径0.2mm、長さ1cm程度のマイクロプレカラムを用いる方法がマイクロ高速液体クロマトグラフィーでは有用であることを論じ、濃縮体積変化や濃度変化に伴うピーク高の変化を調べた。この方法は特に生体試料や環境試料などの微量分析に有効であることを示した。

第5章はこう配溶離法について論じており、マイクロ高速液体クロマトグラフ

主論文の要旨

報告番号	※乙第	号	氏名	竹内豊英
------	-----	---	----	------

ィーでは通常の溶媒こう配溶離をはじめ、温度こう配溶離も有効であることを示した。後者はマイクロカラムの熱容量が小さく熱伝達が速いことによった。溶媒こう配溶離は、階段状に組成を変える方法と連続的に組成を変える方法について検討した。

第6章はマイクロ高速液体クロマトグラフによる超高速分離を行う際の問題点について議論した。小さな粒子径(3-5 μm)の充てん剤を詰めた短い(5-10cm)カラムを用いることによって、1分で10成分程度程度の分離が可能であることを示し、低流量で超高速分離を達成できることを示し、不安定化学種の分析や工程管理または臨床化学におけるルーチン分析などに有効であることを指摘した。

第7章はマイクロ高速液体クロマトグラフ全体の耐圧性を改善することによって通常移動相として使用されることのないプロパンやジメチルエーテルなどの低沸点液体を移動相として用いることができ、低粘性移動相の利用により高性能分離が得られることを示した。

第8章は更に装置の耐圧性を改善することによって二酸化炭素を移動相とする液体クロマトグラフィーや超臨界流体クロマトグラフィーにも効果的に応用できることを示し、その利点を明らかにした。マイクロ高速液体クロマトグラフはこのような低沸点移動相をも安全かつ容易に取り扱えることを示した。また、二酸化炭素を移動相とすると迅速分離が可能なのも示した。

第9章はここで開発したマイクロ高速液体クロマトグラフによって、血清中胆汁酸やステロイド、食品中アミノ酸、水中有機化合物、エポキシ樹脂オリゴマー、ガソリン中酸化防止剤などの微量成分の分析が効果的に達成できることを示した。実際試料の分析にはプレカラム濃縮法が有効であることを示した。また、マイクロ高速液体クロマトグラフィーによってマス感度が増加することを実証した。

主論文の要旨

報告番号

※乙第

号

氏名

竹内豊英

第2編は「中空キャピラリー液体クロマトグラフィーに関する研究」と題し、8章からなる。液体クロマトグラフィーにおいて中空ガラスキャピラリーカラムを用いる際の問題点やカラム調製法に関する研究をまとめたものである。

第1章は液体クロマトグラフィーにおける中空キャピラリーカラムの利用状況やアプローチの方法について論じ、本研究の目的及び特色を示した。

第2章は液体クロマトグラフィーにおける高分離能カラムを固定相の状態によって類別し、中空キャピラリーカラムの特徴及び性能を充てんカラムのそれらと比較しながら論じ、中空キャピラリーカラムの内径は可能な限り小さくする必要があることを示した。

第3章は塗布型中空キャピラリーカラムを調製し、カラム性能に影響を与える因子(カラム内径、移動相流速、移動相の粘性、カラム温度、試料注入法など)について論じた。内径30 μ m、長さ20m程度のカラムで数10万段の理論段数が達成できることを示し、複雑な混合物の高理論段分離に利用できることを明らかにした。また、固定相を良好に塗布するには、前処理が非常に重要であることを指摘した。

第4章は軟質ガラスを1Nの水酸化ナトリウムなどのようなアルカリ水溶液で数時間から数日間加熱処理することによってキャピラリー内壁が生成するシリカゲル層によって効果的に改質されることを明らかにし、その調製条件について詳しく論じた。キャピラリー内壁の電子顕微鏡写真を示し、内壁の表面の変化の様子を明らかにした。1Nの水酸化ナトリウムで、2日間から6日間、室温から50度程度で軟質ガラスを処理すると良好な結果が得られた。

第5章はガラスキャピラリー内壁へオクタデシル基や陽イオン交換基などを化学的に結合させる方法を確立し、固定相の移動相中への溶解の問題を解決しカラム性能の耐久性を向上させた。調製されたカラムは従来の充てんカラムと

主論文の要旨

報告番号	※乙第	号	氏名	竹内豊英
------	-----	---	----	------

同様な保持挙動を示した。この化学結合型中空キャピラリーカラムを用いて、溶媒こう配分離と温度こう配分離の両法が有効であることを示した。

第6章はポリスチレンやポリシロキサンの架橋型固定相の調製方法とその性能について論じた。固定相を架橋することによって化学結合型カラムと同様、移動相中への固定相の溶解を防ぐことができ、中空キャピラリー液体クロマトグラフィーの固定相として利用できることを示した。架橋反応条件について詳しく検討した。

第7章は臭化セチルトリメチルアンモニウムなどの長鎖アルキル基を有する第4級アンモニウムイオンで修飾した中空キャピラリーカラムの性能について論じた。これはシリカゲルカラムの陽イオン交換性を利用したもので、アンモニウムイオンが内壁のシリカゲルへ静電的に強く吸着している。吸着したアンモニウムイオンの長鎖アルキル基の疎水性部分が固定相として働き、化学結合オクタデシルシランカラムと類似した分離が達成できることを示した。この方法だと、非常に容易に疎水性の固定相を調製することが可能であり、内径の小さなキャピラリーカラムを調製する際有利であることを指摘した。

第8章は調製した塗布型カラム、シリカゲルカラム、化学結合型カラム、架橋型カラム、界面活性剤を修飾したカラムの性能を比較検討した。