

機関番号：14303

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20350036

研究課題名(和文) HPLC用、高速・高理論段数モノリス型シリカキャピラリーカラムの開発

研究課題名(英文) Development of high-speed and high-efficiency monolithic silica capillary columns for high-performance liquid chromatography

研究代表者

田中 信男 (TANAKA NOBUO)

京都工芸繊維大学・法人本部・学長特任補佐

研究者番号：60127165

研究成果の概要(和文)：

高速型、および、高理論段数型、モノリスシリカキャピラリーカラムの開発、高性能化を行った。シリカキャピラリー管内でテトラメトキシシランとメチルトリメトキシシランを原料とするシリカモノリスの調製において、シリカ量、ならびに、1-2 μm のマクロ細孔と約 10 nm のメソ細孔の大きさを制御することにより、溶媒のカラム通過時間 10 s で 10000 理論段、5000 s で 1000000 理論段の発現を可能とし、超高性能分離を実現した。

研究成果の概要(英文)：

Optimization of preparation conditions of monolithic silica capillary columns attained 10000 and 1000000 theoretical plates with a column dead time of 10 s and 5000 s, respectively, providing ultrahigh resolution of closely related substances.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2009年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010年度	2,700,000	810,000	3,510,000
年度			
年度			
総計	10,300,000	3,090,000	13,390,000

研究分野：分離科学・分析化学

科研費の分科・細目：複合化学 ・ 分析化学

キーワード：HPLC、モノリスカラム、シリカ、キャピラリー、高性能化、理論段数、ピークキャパシティ、ナノHPLC

1. 研究開始当初の背景

ゲノム解析、プロテオーム解析に続き、膨大な構造的多様性をもつメタボローム解析やタンパク質との関係を含めた糖鎖の総合的な理解(グライコーム解析)において、国際的に開発競争が継続している。この原動力となるのがHPLC分離技術である。HPLC用粒子充填カラムの性能が向上し、1.7~2

μm 粒子充填カラムと高压ポンプの開発により、5分間でピークキャパシティ(分離可能ピーク数)200~300の発現が可能となった。しかし、粒子充填カラムの性能は、構造に付随する制限から逃れられない性能限界を示していた。すなわち、

(1) カラム理論段数が粒子径に反比例し、送液圧力(上限 100 MPa)が粒子径の2乗に反比例するので、これ以上の高速性能の実現は、

経済的、資源環境的適合性において高いコストを伴う。

(2) 1～2 μm 粒子が高速性能を発現できるのは、30,000～100,000 理論段以下の範囲であり、それ以上の高理論段数カラム、とくに長いキャピラリーカラムの実用化は図られていなかった。このような粒子充填カラムの限界を超えるカラムの開発が将来の物質分離のために不可欠であり、HPLC 用モノリス型キャピラリーカラムの開発は、生命科学に必須の HPLC-質量分析 (MS) においてとくに重要であった。

粒子充填型カラムの性能限界を超える高性能化は、カラム内の空隙サイズと骨格サイズを独立して制御可能な、すなわち、大きな空隙による低圧送液と小さな骨格に基づく高性能とが両立するモノリス型カラムにおいて可能である。有機モノリスの研究例は多いが高性能の発現は困難であり、モノリスシリカ調製法について他の研究例は少なく、応用研究に偏っていた。

申請者は、(1) 5 μm 粒子相当の圧力で 2-2.5 μm 粒子相当の分離性能、および、(2) 3-4 m 長のキャピラリーカラムにより 400,000-500,000 理論段の発生などを実現してきた。フィード中シラン濃度の増加すなわち (空隙サイズ/骨格サイズ) 比の減少と、低温におけるゲル化による均一なモノリス構造の実現による、一層の高性能化に関する開発指針が得られていた。

2. 研究の目的

本研究は、(1) 極限的な性能を目指す調製法に関する基礎的な面と、(2) 実サンプルについて高い分離能力を実証するという応用的な側面とを有する。具体的には、(1) 高性能モノリス型シリカカラム調製法の開発により、①高速性能、②高理論段数、③試料負荷量の3点において極限的な性能の向上を達成し、応用例で実証することを目標とした。

①ドメインサイズ (d_p) の縮小と構造の均一性の増大により、最高性能の粒子充填カラムと同等の高速性能 (時間当たり理論段数) の実現を目標とした。 $d_p=2 \mu\text{m}$ を高い均一性で実現し、粒子径 2.5-3 μm 相当の圧力で、粒子径 2 μm 相当の高速性能を発現するモノリスの調製を目指した。

②ドメインサイズ $d_d=2.5-3.5 \mu\text{m}$ において均一性の高いモノリス構造を得ることにより逆相 HPLC 系で高理論段数 (圧力あたり理論段数) の発現、 $t_0=1.5$ 時間で 100 万理論段あるいはそれ以上の理論段数の発生を目指した。さらに 10 万理論段を与える親水性相

相互作用 LC (HILIC) 用の高性能キャピラリーカラムの調製を試みた。現在でも同等性能の粒子充填カラムは存在しない。

③試料負荷量の増大は、シリカ調製における相比 (骨格量) の増加と、表面修飾後の性能が保証されるモノリスの特徴を生かして、シリカ表面に二重結合をもつアンカーを結合し、ビニルモノマーを重合してポリマー被覆を行うことにより、粒子充填カラムと同等以上の試料負荷量を実現することを目標とした。

3. 研究の方法

モノリス型シリカの共連続構造は、ポリエチレングリコール (PEG) など水溶性高分子の存在下、アルコキシシランから相分離とゲル化をシンクロナイズさせたゾルーゲル反応により得られる。

高速、高理論段数モノリス型シリカ調製へのアプローチは、次の通りである。

(1) カラム中のシリカ量の最適化: シリカ調製時の tetra methoxysilane (TMOS) 濃度、あるいは TMOS と methyltrimethoxysilane (MTMS) との混合物の仕込み濃度の調整による (空隙サイズ/骨格サイズ) 比 (カラム内の相比、あるいはカラム空隙率) の最適化、

(2) ドメインサイズの最適化: PEG 濃度の調整による相分離の進行速度とゲル化の進行速度との調整による細孔サイズ、骨格サイズの最適化、

(3) 高い構造均一性の実現: 反応温度、触媒濃度の最適化による均一な共連続構造の実現、

(4) 試料負荷量の増大: HILIC 用固定相の調製において、重合反応を用いて修飾することにより固定相量を増加させ、溶質の保持能力、試料負荷量においても粒子充填カラムと競争できるモノリスシリカカラムの調製

カラム性能の評価と、高性能の実証において、①高速性能および高理論段数性能はイソクラティック溶出における結果から、kinetic plot 解析により評価した。②複数のキャピラリーカラムを接続して長いキャピラリーカラムを構成し、1,000,000 理論段を超える高理論段の発現を実証した。さらに、長いカラムと長いグラジエント時間を用いるグラジエント溶出を行って非常に大きなピークキャパシティを発現させ、HPLC-ESI-MS によるタンパク質同定能力の向上を示すことにより、プロテオームの実サンプルに対する高い分離能力、すなわちモノリス型シリカキャピラリーカラムの実用性を実証することを試みた。

4. 研究成果

Tetramethoxysilane (TMOS) と methyltrimethoxysilane (MTMS) との混合物を原料とするハイブリッド型シリカモノリスの調製において、フィードにおける (TMOS/MTMS) 比とシラン濃度、相分離の開始時期を調整する polyethylene glycol (PEG) 濃度、ならびに、反応温度の最適化により、①、②の目標が達成された。

(1) (TMOS/MTMS) 比 = 10/0 ~ 9/1 ~ 3/1 の範囲で PEG 濃度を最適化した結果、(TMOS/MTMS) 比 = 9/1 においてシリカ量を従来より約 22% 増加して得られたモノリスシリカカラムは、Octadecylsilyl 基による化学修飾を経て、第二世代の TMOS 型モノリスシリカと同等のカラム性能、すなわち 5 μm 粒子相当の透過率と、2-2.5 μm 粒子相当の理論段高 $H=4.6\text{--}5.0\ \mu\text{m}$ と、(TMOS/MTMS) 比 = 3/1 から得られたハイブリッドモノリスシリカに近い保持能力を示した。これにより保持の大きな高速型モノリスシリカカラムの調製が可能となった。

(2) (TMOS/MTMS) 比 = 3/1 において調製した 3 - 5 m 長のカラムは高い透過率 (5 μm 粒子の約 5 倍) と約 7 μm の理論段高を示し、3 本のキャピラリーカラムを接続した 12.5 m カラムシステムは 80% アセトニトリル中、50 MPa 以下の圧力で、通過時間 (t_0) = 1.5 時間で 100 万段以上の理論段数を発生した (図 1)。

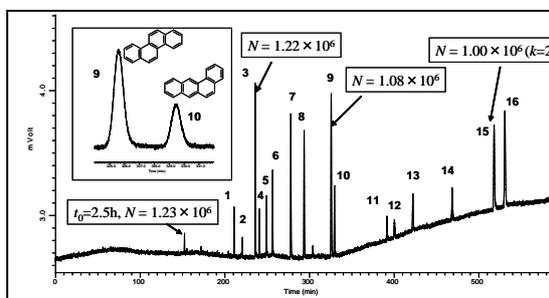


図 1. ODS モノリスシリカカラムによる多環芳香族化合物の分離 (L=12.5 m)

(3) (TMOS/MTMS) 比 = 9/1 ~ 3/1 の範囲のモノリス調製における PEG 濃度を最適化により、(TMOS/MTMS) 比 = 9/2 において得られたキャピラリーカラムは、Octadecylsilyl (ODS) 基による化学修飾後、従来の高理論段数型と同等の性能 $H=7.5\text{--}8\ \mu\text{m}$ と従来のカラムより高い透過率 $K=1.5\text{--}2 \times 10^{-13}\ \text{m}^2$ を与え、4-5 m 長のキャピラリーカラムにより約 50 万理論段、3 本のキャピラリーカラムを接続した 15 m カラムシステムは、50 MPa 以下の圧力で 200 万理論段の発生を可能とした。

(4) (3) のキャピラリーカラムを 2 本接続し

た 8.5 m カラムシステムは、保持時間 1400-1500 分で重水素置換ベンゼンについて 1 個の重水素置換による分離を可能とした (図 2)。

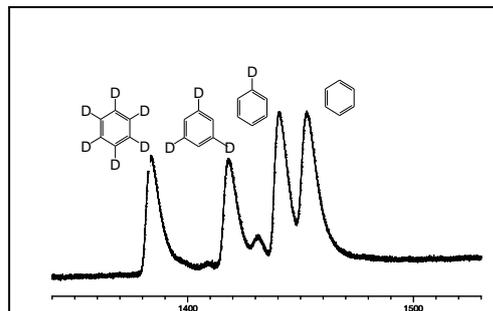


図 2. 重水素置換ベンゼンの分離 (L=8.5 m)

(5) 大腸菌プロテオームの解析において、3.5 m 長カラムを用いて約 40 時間のアセトニトリルグラジエント溶出を数百 nL/min の流速で 3 回繰り返すことにより、約 22000 のペプチドが同定され、2600 の遺伝子に対応するほぼ全プロテオームの解析が可能となった。大量注入条件下、長いモノリス型シリカキャピラリーカラムの適用により 90% 以上の膜タンパク質の同定と、イオンサプレッションの抑制による低濃度タンパク質の同定により 70 倍程度のダイナミックレンジ拡大が可能となった (図 3)。

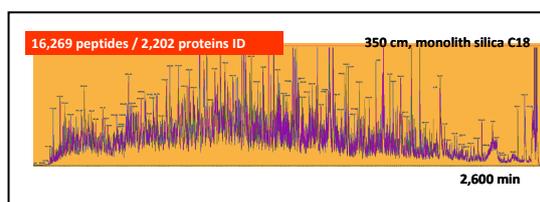


図 3. ODS モノリスシリカカラムによる大腸菌プロテオームに由来するペプチドの分離 (L=350 cm)

(6) TMOS から調製したロッド型カラムについて ODS 修飾後、5 cm 長カラムにより 8000-9000 理論段、25 cm カラムにより 40000-45000 段が得られ、2 本あるいは 3 本を接続することにより、カラム圧 10-15 MPa、 $t_0=4\text{--}7$ 分において、8-8.5 万段および 12-12.5 万段が得られた。これにより 2 μm 以下の微粒子あるいはコアシェル粒子充填型カラムと比較して、より低圧で高理論段数の発現が一般的 HPLC 装置を用いて可能となった。

(7) シリカ表面に二重結合をもつアンカーを結合し、新規ビニルモノマーを重合して重合修飾によるポリマー被覆を行うことにより、HILIC 用固定相の保持能力、試料負荷量の増大を可能とした。このカラムは、数倍の相比をもつシリカ粒子充填カラムと同等以上の保持能力をもつことが示された。これは、

長いカラムによる高理論段数発現、あるいは二次元 HPLC において重要な要素である。

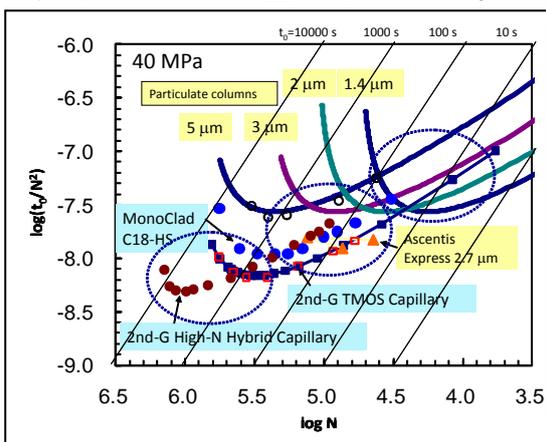


図 4. Kinetic plot 解析による粒子充填カラムとモノリスシリカカラムとの性能比較

以上のように、調製の容易なハイブリッド型について、調製条件の最適化により高速型および高理論段数型モノリスシリカカラムの性能向上が達成された。図 4 が示すように、40 MPa 圧力限界の下で、2 μm 粒子充填剤と同等の 25000 理論段以上の全領域で、現在のカラムを超える性能を発現できるモノリス型シリカキャピラリーカラムの開発は、これまでに得られている開発ガイドラインに基づいて可能であり、とくに、モノリスカラムの特徴が顕著に表れる 10-100 万理論段の領域の高性能分離において、その実用化が期待される。

モノリスシリカカラムの実用化は、世界で数十万台以上使用されている圧力限界約 40 MPa の装置による超高性能の発現を可能として、経済的、資源環境的なコストを最小限とすると同時に、分離能力の進歩が、それを利用する関連領域、とくにプロテオーム、メタボロームに代表される生命科学の飛躍的な進歩に貢献するものと期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 14 件)

1. S. Miyazaki, M. Takahashi, M. Ohira, H. Terashima, K. Morisato, K. Nakanishi, T. Ikegami, K. Miyabe, N. Tanaka, J. Chromatogr. A, 1218, 1988-1994 (2011). Monolithic silica rod columns for high-efficiency reversed-phase liquid chromatography. (査読有)
2. M. Iwasaki, S. Miwa, T. Ikegami, M. Tomita, N. Tanaka, Y. Ishihama, Anal. Chem., 82, 2616-2620 (2010). One-Dimensional Capillary Liquid

Chromatographic Separation Coupled with Tandem Mass Spectrometry Unveils the Escherichia coli Proteome on a Microarray Scale. (査読有)

3. K. Okusa, Y. Suita, Y. Otsuka, M. Tahara, T. Ikegami, N. Tanaka, M. Ohira, M. Takahashi, J. Sep. Sci., 33, 348-358 (2010), Test compounds for detecting the silanol effect on the elution of ionized amines in reversed-phase LC. (査読有)

4. T. Hara, S. Makino, Y. Watanabe, T. Ikegami, K. Cabrera, B. Smarsly, N. Tanaka, J. Chromatogr. A, 1217, 89-98 (2010). The performance of hybrid monolithic silica capillary columns prepared by changing feed ratios of tetramethoxysilane and methyltrimethoxysilane. (査読有)

5. Y. Watanabe, T. Ikegami, K. Horie, T. Hara, J. Jaafar, N. Tanaka, J. Chromatogr. A, 1216, 7394-7401 (2009). Improvement of separation efficiencies of anion-exchange chromatography using monolithic silica capillary columns modified with polyacrylates and polymethacrylates containing tertiary amino or quaternary ammonium groups. (査読有)

6. W. Soonthorntantikul, N. Leepipatpiboon, T. Ikegami, N. Tanaka, T. Nhujak, J. Chromatogr. A, 1216, 5868-5874 (2009). Selectivity comparisons of monolithic silica capillary columns modified with poly(octadecyl methacrylate) and octadecyl moieties for halogenated compounds in reversed-phase liquid chromatography. (査読有)

7. O. Núñez, K. Nakanishi, N. Tanaka, J. Chromatogr. A, 1191, 231-252 (2008). Preparation of monolithic silica columns for high-performance liquid chromatography. (査読有)

8. T. Ikegami, K. Tomomatsu, H. Takubo, K. Horie, N. Tanaka, J. Chromatogr. A, 1184, 474-503 (2008). Separation efficiencies in hydrophilic interaction chromatography. (査読有)

9. K. Miyamoto, T. Hara, H. Kobayashi, H. Morisaka, D. Tokuda, K. Horie, K. Koduki, S. Makino, O. Núñez, C. Yang, T. Kawabe, T. Ikegami, H. Takubo, Y. Ishihama, N. Tanaka, Anal. Chem., 80, 8741-8750 (2008),

High-efficiency liquid chromatographic separation utilizing long monolithic silica capillary columns. (査読有)

10. J. Jaafar, Y. Watanabe, T. Ikegami, K. Miyamoto, N. Tanaka, Anal. Bioanal. Chem., 391, 2551-2556 (2008). Anion exchange silica monolith for capillary liquid chromatography. (査読有)

11. T. Ikegami, K. Horie, N. Saad, K. Hosoya, O. Fiehn, N. Tanaka, Anal. Bioanal. Chem., 391, 2533-2542 (2008). Highly efficient analysis of underivatized carbohydrates using monolithic-silica-based capillary hydrophilic interaction (HILIC) HPLC. (査読有)

[学会発表] (計 20 件)

1. Nobuo Tanaka, High-efficiency monolithic silica columns for HPLC. Pittsburgh Conference on Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy. 2011 年 3 月 15 日. Atlanta, USA.

2. 田中 信男, モノリス型シリカカラムのクロマトグラフィー特性. 日本分析化学会第 59 年会. 2010 年 9 月 15 日. Sendai.

3. N. Tanaka, Monolithic silica columns for high-speed and high-efficiency HPLC Separations. 35th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques. 2010 年 6 月 20 日. Boston, USA,

4. 田中 信男 HPLC カラムの高性能化. 第 20 回クロマトグラフィー科学会議. 2009 年 11 月 12 日. Tokyo.

5. N. Tanaka, High-efficiency monolithic silica capillary columns for micro-HPLC. 24th International Symposium on MicroScale Bioseparations. 2009 年 10 月 22 日. Dalian, China.

6. N. Tanaka, High-efficiency monolithic silica columns for HPLC. 34th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques. 2009 年 7 月 1 日. Dresden, Germany.

7. Hirotaka Takubo, Tohru Ikegami, Nobuo Tanaka 他. Study of peak capacity utilizing monolithic silica capillary

columns in liquid chromatography - mass spectrometry. International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques. 2008 年 12 月 3 日. Kyoto

8. Yuta Watanabe, Tohru Ikegami, Nobuo Tanaka 他. Development of high-efficiency ion-exchange monolithic silica columns. International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques. 2008 年 12 月 3 日. Kyoto.

9. Tohru Ikegami, 他. Preparation of monolithic silica capillary columns for chiral separation by on-column polymerization, and the evaluation of their separation efficiency. International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques. 2008 年 12 月 3 日. Kyoto.

10. Tohru Ikegami, 他. Preparation and evaluation of monolithic silica columns for hydrophilic interaction (HILIC) chromatography. International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques. 2008 年 12 月 4 日. Kyoto.

11. Thumnoon NHUJAK, Tohru Ikegami, Nobuo Tanaka 他. Selectivity comparison of monolithic silica capillary columns modified with poly(octadecyl methacrylate) and octadecyl moiety for halogenated compounds in reversed-phase HPLC. International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques. 2008 年 12 月 3 日. Kyoto.

12. Thumnoon NHUJAK, Tohru Ikegami, Nobuo Tanaka 他. Two-dimensional capillary HPLC in a reversed-phase mode using two C18 monolithic silica columns modified with octadecyl moiety and poly(octadecyl methacrylate). International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques. 2008 年 12 月 3 日. Kyoto.

13. Nobuo Tanaka 他. High efficiency monolithic silica capillary columns for micro-HPLC. Asia-Pacific International Symposium on Microscale Separations and

Analysis, 2008年11月3日. Kaoshung, ROC Taiwan.

14. Thumnoon NHUJAK, Tohru Ikegami, Nobuo Tanaka 他. Two-dimensional capillary HPLC in a reversed-phase mode using two monolithic silica C18 columns modified with octadecylsilyl- (N,N-diethylamino)silane and poly(octadecyl methacrylate). International Symposium on Chromatography. 2008年9月22日. Munster, Germany.

15. Nobuo Tanaka 他. High performance monolithic silica columns for reversed-phase, HILIC, and ion-exchange mode HPLC. 19th International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis (PBA2008) 2008年6月9日. Gdansk, Poland.

16. Nobuo Tanaka 他. High-efficiency liquid chromatographic separation utilizing long monolithic silica capillary columns. International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques. 2008年5月12日. Baltimore, USA.

[図書] (計7件)

1. K. Miyamoto, T. Ikegami, T. Hara, Y. Ishihama, N. Tanaka, In “Extreme Chromatography: Faster, Hotter, Smaller” W.C. Byrdwell and M. Holcapek, ed. AOCs Press. In press. High-efficiency liquid chromatography separations achieved by monolithic silica columns.

2. N. Tanaka, K. K. Unger, Ed. K. K. Unger, N. Tanaka, E. Machtejevas, “Monolithic Silicas in Separation Science”, Wiley, 2011. The basic idea and the drivers. pp 1-5.

3. O. Núñez and T. Ikegami, Ed. K. K. Unger, N. Tanaka, E. Machtejevas, “Monolithic Silicas in Separation Science”, Wiley, 2011. Preparation and properties of various types of monolithic silica stationary phases for reversed-phase, hydrophilic interaction, and ion-exchange chromatography based on polymer-coated materials. pp 35-45.

4. T. Hara, K. Miyamoto, S. Makino, S. Miwa, M. Ohira, N. Tanaka, In “Monolithic Silicas in Separation Science”, E.

Machtejevas, N. Tanaka, K. K. Unger, ed. Wiley, 2011. High-speed and high-efficiency separations by utilizing monolithic silica capillary columns. pp. 249-269.

5. N. Tanaka, In “Frontiers in Chemistry”, T. Kitamori, Ed., Kagaku Dojin. 2008. (In Japanese) High-speed and high-efficiency HPLC separations by using monolithic silica columns. pp. 43-51.

6. T. Ikegami, H. Aoki, H. Kimura, K. Hosoya, N. Tanaka, In “Multidimensional Liquid Chromatography: Theory and Applications in Industrial Chemistry and the Life Sciences”, S. Cohen and M. Schure Ed., John and Wiley and Sons. 2008. Monolithic columns and their 2D-HPLC applications. pp. 147-176 ISBN: 978-0-471-73847-3

7. T. Ikegami, N. Tanaka, et al. John and Wiley and Sons. Monolithic columns and their 2D-HPLC applications. In “Multidimensional Liquid Chromatography: Theory and Applications in Industrial Chemistry and the Life Sciences”. 2008. pp. 147-176.

[その他]

ホームページ等

田中 信男

HPLC分離カラム開発と精密分離

<http://repository.lib.kit.ac.jp/dspace/handle/10212/1960>

6. 研究組織

(1)研究代表者

田中 信男 (TANAKA NOBUO)

京都工芸繊維大学・法人本部・

学長特任補佐

研究者番号：60127165

(2)研究分担者

池上 亨 (IKEGAMI TOHRU)

京都工芸繊維大学・工学科学研究科・

准教授

研究者番号：20301252

(3)連携研究者

()

研究者番号：