

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25810085

研究課題名(和文) マイクロ波支援による高機能性モノリス型キャピラリーカラムの迅速調製の確立

研究課題名(英文) Microwave-assisted Rapid Fabrication of Monolithic Stationary Phases for Capillary Liquid Chromatography

研究代表者

リム リーワ(Lim, Lee Wah)

岐阜大学・工学部・准教授

研究者番号：80377689

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：近年、充填カラムと異なる種類の分離カラムとして、透過性の高いモノリス型カラムが注目を集めている。キャピラリーサイズのモノリスカラムはin situ重合法により調製されるが、現在の加熱炉を用いる方法では、シリカ系モノリスの場合は調製に約5日間の長時間を要している。マイクロ波を用いた加熱法では、マイクロ波吸収性物質の内部から急速に加熱されるため、内部の温度が外壁などの温度より高くなり、反応時間の大幅な短縮や収率・選択性の向上など様々な効果が現れる。そこで本研究は、マイクロ波を照射することによってモノリスの骨格と細孔の生成時間を短縮し、高性能キャピラリーカラムの迅速調製法の開発を目指した。

研究成果の概要(英文)： Monolithic columns, which consist of μm -sized skeletons and through-pores, could offer high separation efficiency with ultra low flow resistance, and they have attracted much attention since their introduction in the early 1990s. In this research, rapid fabrication of monolithic silica- and polymer-based capillary columns was evaluated using microwave irradiation. The reaction solution was filled into fused-silica capillary tubing and the column was then irradiated at different time under various temperature and output control of the microwave device. The morphology of the monoliths was observed with a scanning electron microscope and was compared to those monoliths that were fabricated under normal thermal conditions. The results showed that the degree of output of the microwave device had direct influence on the morphology as well as size of the skeleton backbone of the monoliths.

研究分野：化学

キーワード：キャピラリーモノリス固定相 迅速・簡便調製法 マイクロ波 ポロゲンレス調製法 マレイン酸系モノリスカラム

1. 研究開始当初の背景

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 分析で用いられる分離カラムは、3~5 μm 程度の球状シリカゲルや有機高分子を円筒管に充填した、充填型カラムが一般的である。近年、充填型カラムと異なる種類の分離カラムとして、より空隙率が高く、より流路抵抗が小さい、すなわち、比較的低い圧力で迅速かつ高性能な分離を実現しやすいモノリス型カラムが注目を集めている。このモノリス型カラムはキャピラリーの中で充填剤を合成し、キャピラリーと充填剤を一体化したカラムであり、その特徴は充填剤が比較的大きな貫通型の孔 (スループア) と 10 nm 程度の非貫通型の孔 (メソポア) を併せ持ち、これらのポアサイズを制御することによって分析対象に応じた分離能を達成できることである。

モノリス型カラムは、その素材によりシリカ系と有機高分子系の二種類に大別できる。シリカ系モノリスは、一般的に分離能が高く、機械的強度に優れている。一方、有機高分子モノリスは、不可逆的な吸着が起こりにくく、また pH 耐久性 (pH 2-12) に優れているため、バイオ関連の研究に好適な基材であり、シリカモノリスよりも潜在的な有用性が高い。しかし、骨格径や流路孔の精密制御や、モノリス作製の再現性に問題がある。

シリカ系、有機高分子系を問わず、キャピラリーサイズのモノリスカラムは *in situ* 重合により調製されるが、現在の加熱炉を用いる方法では、シリカ系モノリスの場合はカラムの調製には性能を決定づける 3 つの独立した加熱・反応工程があり、調製に約 5 日間の長時間を要している。また、キャピラリー液体クロマトグラフィー用として望ましい内径 0.2 mm を越えるカラムの調製は困難である。

2. 研究の目的

加熱炉を用いる外部加熱方式では作製されるモノリスのポアの均一性に限界があり、他の加熱方法を調査したところ、マイクロ波による加熱に到達した。マイクロ波を用いた加熱法では、マイクロ波吸収性物質の内部から急速に加熱されるため、内部の温度が外壁などの温度より高くなり、反応時間の大幅な短縮や収率・選択性の向上など様々な効果が現れる。そこで本研究は、マイクロ波を照射することによってモノリスの骨格と細孔の生成時間を短縮し、高性能キャピラリーカラムの迅速調製法の開発を目指した。

3. 研究の方法

反応溶液をフューズドシリカキャピラリ

ーチューブに満たしてマイクロ波の出力と照射時間を検討し、最適な調製条件を検討した。シリカ系モノリスの場合は、ゾル・ゲル反応過程とメソポア生成過程の 2 過程に分け、反応時におけるマイクロ波の照射条件を検討した。調製したキャピラリーカラムは、走査型電子顕微鏡 (SEM) でのモルフォロジー観察とキャピラリー液体クロマトグラフィーシステムにより芳香族化合物やアルキルベンゼン等を分離することで評価し比較した。マイクロ波反応装置には EYELA 社の Wave Magic MWO-1000S 型の装置を用いて、温度優先制御と出力優先制御の二通りの使用条件について検討を行った。

また、キャピラリー液体クロマトグラフィーシステムにより分離したピークの理論段数 (N) を算出し比較した。

$$N = 2 (ht/A)^2$$

h : ピーク高さ

t : 保持時間

A : ピーク面積

キャピラリーカラムには、シリカ系モノリスの場合は内径 0.100 mm、有機高分子モノリスの場合には内径 0.320 mm のフューズドシリカキャピラリーチューブ (GL Science) のものを使用した。

4. 研究成果

4-1. シリカ系モノリス

ゾル・ゲル反応過程においてマイクロ波照射の効果が現れ、とくに出力優先制御 (300W) で 1 時間照射した際には、短時間にもかかわらず高性能なキャピラリーカラムが調製できることを見出している (常法では 24 時間がかかっていた)。これに対し、ゾル・ゲル反応過程において温度制御でマイクロ波を照射した場合には、明らかな効果は観察されないこと、また、メソポア生成過程ではマイクロ波照射の効果が現れないことを見出している。

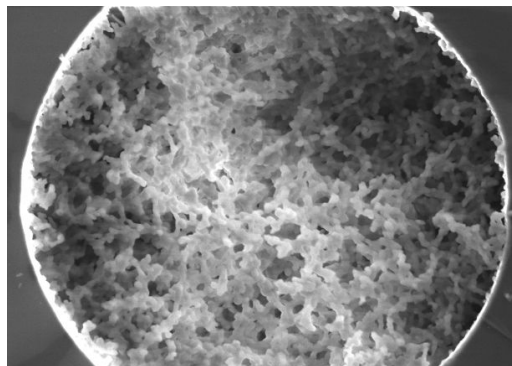


図 1 モノリス型シリカキャピラリーカラム (内径 0.100 mm) の断面写真 (倍率: 1,200)

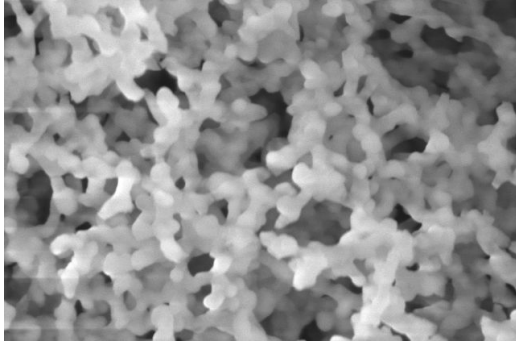


図 2 モノリス型シリカキャピラリーカラム (内径 0.100 mm) の断面写真(倍率: 3,000)

図 1 および図 2 より, 網目状のシリカ骨格およびマイクロメートルサイズの流路(スルーポア)が確認できたが, 分離性能と再現性は常法で調製したキャピラリーカラムより低いものとなった。

4-2. 有機高分子モノリス

ポリマー系モノリスの場合は, 出力優先制御(200W)で調製時間が 10 分では反応が不十分であったが, 15 分で照射したカラムがもっとも良い理論段数を得ることができた(10 cm で 5500 段)。15 分より長時間マイクロ波を照射することにより骨格が大きくなり, 細孔の大きさが小さくなることを見出された。また, マイクロ波出力は低い方が良いカラムが調製できる傾向であることを見出している。

最適条件で調製したカラムを用いて 5 種アルキルベンゼンの高速分離を試みた。流量を 60.0 $\mu\text{L}/\text{min}$ としたときに 4.7 Mpa という低い圧力でアルキルベンゼン 5 種のベースライン分離を 1 min で達成することができた。

しかしながら, 重合(調製)時間は大幅に短縮できたものの, キャピラリーカラムの前処理¹⁾には 24 時間の長時間を要している。そこで, 本研究は, 一般的に有機高分子モノリスに使用されるアクリルアミド系やメタクリル酸エステル系等のモノマーに代わって, マレイン酸系のモノマー(図 3)を使用することにより, カラム管に前処理を施さず, カラムの調製にポロゲン²⁾(細孔形成剤)を使用しない, 従来のカラムよりも調製手順が少ない, 簡便かつ斬新なカラム調製法を見出した(L. W. Lim, K. Katagiri, T. Takeuchi, 投稿準備中)。

¹⁾モノリスを管内壁面に化学的に固定するため, 二重結合を有するシランカップリング剤で前処理を行う。前処理なし, あるいは不十分な場合は, ゲル化の過程においてモノリスが収縮してしまいカラム内壁から剥離するという問題点になる。

²⁾モノマーはポロゲンと呼ばれる溶媒に溶解して重合させる。このポロゲンは流路孔の制御に最も重要なパラメーターである。

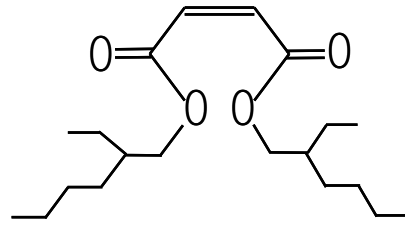


図 3 マレイン酸ビス(2-エチルヘキシル)の構造式

モノマーとしてマレイン酸ビス(2-エチルヘキシル)(MBEH)を, 架橋剤としてジメタクリル酸エチレン(EDMA)を選択し, ここに重合を促進させるために 1-プロパノールを添加し, 開始剤として 2,2'-アゾビス(イソブチロニトリル)(AIBN)を用いてモノマー溶液を調製した。上記のモノマー溶液を未処理および前処理済のフーズドシリカキャピラリー(内径 0.320 mm)に満たし, 熱重合させた。モノマー溶液中の各成分の最適割合や反応条件を検討し, 作製した固定相は, 2-エチルヘキシル基を有するため, 逆相モードで評価した。

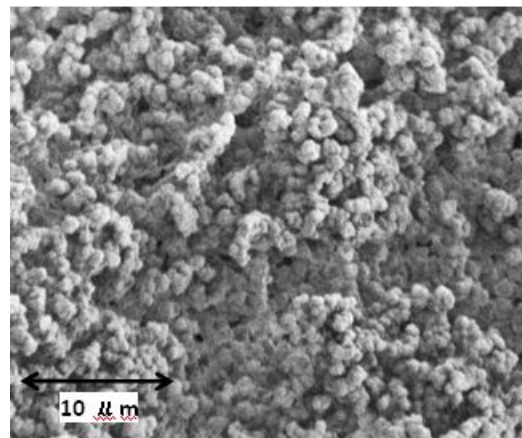


図 4 マレイン酸ビス(2-エチルヘキシル)モノリスの SEM 断面写真(内径 0.320 mm)

図 4 のキャピラリーカラムは従来のキャピラリーカラムに比べ, カラムの前処理やポロゲンの濃度調整といった操作手順が不要にも関わらず, モノリス骨格が綺麗に形成され, ポリマー骨格は直径 1 μm の球体が連なったような形状をしていた。また, カラムの内壁からモノリスが剥離するといった問題も見られなかった(図 5)。これは, カラムの内壁にポリマーの層が形成されており, ポリマーとカラムは前処理による化学的な結合の代わりに, 摩擦力により物理的に固定されると考えられる。但し, 逆相液体クロマトグラフィー用のカラムとしての分離能は既存のカラムと比べると劣るため, さらなる検討が必要である。

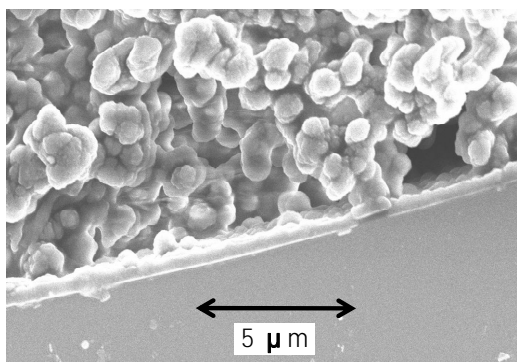


図5 前処理を行っていないマレイン酸ビス(2-エチルヘキシル)モノリスキャピラリーカラムの壁面のSEM断面写真(内径0.320 mm)

調製したキャピラリーカラム(長さ=100 mm、カラム内径=0.320 mm)にて最適な分離条件で分離したところ、理論段数はおよそ1,000段で圧力は0.6 MPaであり、未処理のカラムと前処理済みのカラムでは性能に有意差は見られなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計6件)

1. A. Rahayu, L. W. Lim, T. Takeuchi, "Polymer monolithic methacrylate base modified with tosylated-polyethylene glycol monomethyl ether as stationary phase for capillary liquid chromatography," *Talanta*, **134**, 232-238 (2015). (査読有)
DOI: 10.1016/j.talanta.2014.10.060
2. H. Sakamaki, T. Uchida, L. W. Lim, T. Takeuchi, "Evaluation of column hardware on liquid chromatography-mass spectrometry of phosphorylated compounds," *J. Chromatogr. A*, **1381**, 125-131 (2015). (査読有)
DOI: 10.1016/j.chroma.2014.12.088
3. H. Sakamaki, T. Uchida, L. W. Lim, T. Takeuchi, "Evaluation of column carryover by duplicated solvent gradient method in liquid chromatography/tandem mass spectrometry," *Anal. Sci.*, **31**, 91-97 (2015). (査読有)
DOI: 10.2116/analsci.31.91
4. A. Rahayu, L. W. Lim, T. Takeuchi, "Preparation of hybrid monolithic stationary phase with allylsulfonate for the rapid and simultaneous

separation of cations in capillary ion chromatography," *J. Sep. Sci.*, **38**, 1109-1116 (2015). (査読有)

DOI: 10.1002/jssc.201401264

5. M. Rafi, L. Wulansari, R. Heryanto, L. K. Darusman, L. W. Lim, T. Takeuchi, "Curcuminoid's Content and Fingerprint Analysis for Authentication and Discrimination of *Curcuma xanthorrhiza* from *Curcuma longa* by High-Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detector," *Food Anal. Methods*, **8**, 2185-2193, (2015). (査読有)
DOI: 10.1007/s12161-015-0110-1
6. L. W. Lim, "Development of Micro-Flow-Controlled Techniques and Novel Stationary Phases in Capillary Liquid Chromatography," *Chromatography*, **36**, 1-12 (2015). (査読有)
DOI: 10.15583/jpchrom.2015.011

[学会発表](計8件)

国内学会発表

1. L. W. Lim, T. Takeuchi, Microwave-assisted Rapid Fabrication of Monolithic Stationary Phases for Capillary Liquid Chromatography: The Second ASIAN SYMPOSIUM ON ANALYTICAL SCIENCES (2nd ASAS), 2015/9/9-10, Fukuoka (Invited Lecture)
2. A. Rahayu, L. W. Lim, T. Takeuchi, Preparation of Sulfonate Monolithic Columns for Rapid and Simultaneous Separation of Inorganic Cations in Capillary Ion Chromatography: The 8th Asia-Pacific Symposium on Ion Analysis, 2015/8/31-9/3, Makuhari Messe, Chiba
3. I. Kawase, L. W. Lim, T. Takeuchi, Development of Dendritic Polymer-based Stationary Phases for Capillary Liquid Chromatography: The 8th Asia-Pacific Symposium on Ion Analysis, 2015/8/31-9/3, Makuhari Messe, Chiba
4. R. Putri, L. W. Lim, T. Takeuchi, Development of Immobilized Enzymatic Trypsin Micro-reactor on Polymer Monolith Column for Biocatalytic Reactions by Using Capillary Chromatography: The 8th Asia-Pacific Symposium on Ion Analysis, 2015/8/31-9/3, Makuhari Messe, Chiba
5. L. W. Lim, Y. Ito, T. Takeuchi, Microwave-assisted Rapid Fabrication of Polymeric Sulfobetaine Stationary

- Phases for Capillary Ion Chromatography: The 8th Asia-Pacific Symposium on Ion Analysis, 2015/8/31-9/3, Makuhari Messe, Chiba
6. L. Rong, L. W. Lim, T. Takeuchi, Poly(ethyleneglycol) Methylether Methacrylate-bonded Stationary Phase in Capillary Ion Chromatography: 第22回クロマトグラフィーシンポジウム, 2015/5/28-30, 近畿大学, 東大阪

国外学会発表

7. Y. Horibe, L. W. Lim, T. Takeuchi, Study on Zirconium Introduction to Silica Monolithic Capillary Column: 4th International Conference on Chemical Sciences (4th ICCS), 2015/9/16-17, Padang, Indonesia
8. L. W. Lim, Microwave-assisted Fabrication of Stationary Phases for Capillary Liquid Chromatography: 4th International Conference on Chemical Sciences (4th ICCS), 2015/9/16-17, Padang, Indonesia (Keynote Lecture)

〔その他〕

ホームページ:

www1.gifu-u.ac.jp/~bunseki/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

リム リーワ (LIM LEEWAH)

岐阜大学・工学部・准教授

研究者番号: 80377689