

HPLC 分離カラム開発と精密分離 Development of HPLC columns and the application for high-efficiency separations

田中 信男
Nobuo Tanaka

京都工芸繊維大学 名誉教授
Professor Emeritus, Kyoto Institute of Technology
(2009年4月17日原稿受理、2009年6月5日採用決定)

これまで携わった高速液体クロマトグラフィー(HPLC)用分離カラム開発の経過と、その性能を実証する同位体化合物の精密分離の例を挙げて、HPLC 分離能力の向上の経過と、モノリス型カラムの性能、ならびにクロマトグラフィー研究の意義などについて紹介したい。

1. HPLC 分離カラムの進歩と同位体化合物の分離

1.1 シリカ ODS カラム開発初期、H/D 同位体化合物の分離

1970年代は 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(Octadecylsilyl)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。当初は数十ミクロンの表面多孔性 ODS シリカ粒子充填剤をカラムにマニュアル充填して理論段数、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(図1)は、反応速度に対する小さな二次重水素同位体効果に慣れたものに HPLC の能力を焼き付けた。同時に、疎水性相互作用に基づく分配クロマトグラフィーのもたらす結果の美しさが印象的だった。市販された高性能 ODS シリカカラムは、当初、破碎状シリカ粒子表面を多官能性シランにより修飾し、Endcap なしで提供されていたので、緩衝溶液中で使用すると数週間で保持能力を失い始めた。これが繰り返されたので、メーカーのカラム担当者と互いに愚痴をこぼし合った。Endcap されて安定なカラムが提供されるまでに数ヶ月を要した。

75-77年、Y. Pocker 教授の下での酵素反応機構に関する仕事の後、77-79年に Barry Karger 教授の下で HPLC カラム、充填剤、ならびに、臨床分析用 HPLC 応用機器の開発に従事した[2]。共同研究者の Lloyd Snyder 博士は HPLC の広い範囲について実践的なアプローチを行い、初期の微粒子充填カラムとしては非常に良い性能を示す化学修飾型 5 μm シリカ粒子充填カラムを開発した。この過程で、結果的には高性能カラムの作成に成功したが、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。この時期は、あちこちで 5 μm 球状シリカを修飾した ODS カラムと LC 関連装置・部品の開発が進み、いくつかのベンチャー企業が成功した。しかし、この当時の ODS カラムについては、特性とその差が明らかでなく、また、逆相クロマトグラフィー分離は低分子向きと考えられ、塩基性化合物の分離についての問題の他に、タンパク質を注入することは常識外と考えられていた。

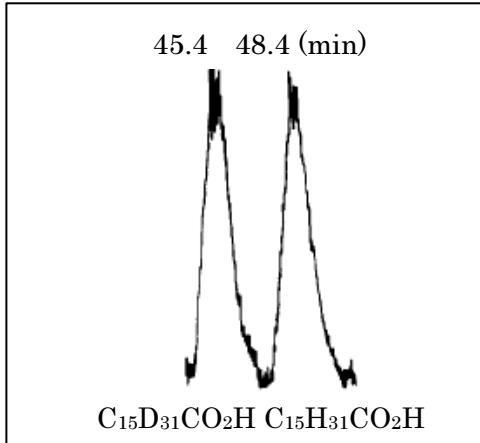


図 1. 逆相 HPLC による水素/重水素同位体化合物の分離[1]。カラム： μ -Bondapak C18 (4 mmI.D., 30 cm). 移動相：メタノール/水=80/20 pH 3.33 with acetic acid, 0.5 mL/min. 溶質： $\text{C}_{15}\text{H}_{31}\text{COOH}$, $\text{C}_{15}\text{D}_{31}\text{COOH}$.

1.2 発展期、窒素 ($^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$) および酸素 ($^{16}\text{O}/^{17}\text{O}/^{18}\text{O}$) 同位体化合物の分離

1980 年代には逆相 HPLC が汎用となり充填剤の微粒子化 (3-5 μm)、ODS 充填剤の理解及び高性能化が進んだ。シリカを基材とする化学修飾型充填剤の調製において、アミン類の溶出バンドにテイリングをもたらすシラノール効果や金属不純物の効果を抑制する修飾法により改良された充填剤は、 $^{16}\text{O}/^{17}\text{O}/^{18}\text{O}$ あるいは $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ などの同位体化合物の分離 (図 2, 図 3) を可能とした[3,4]。

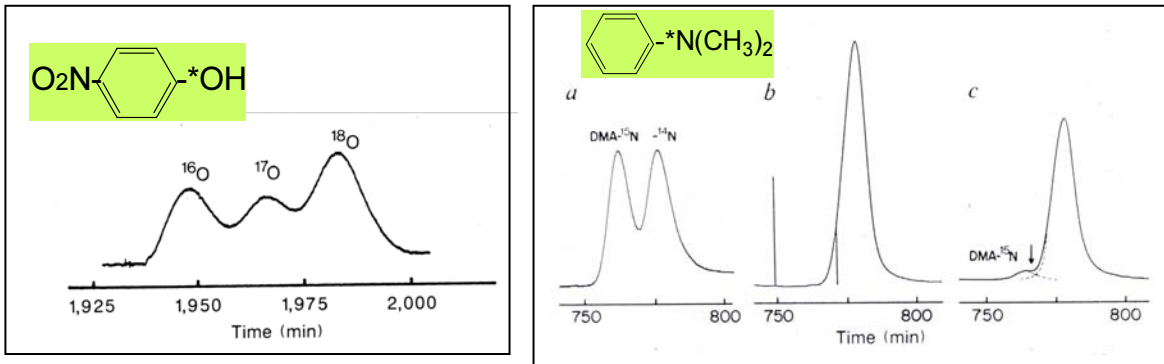


図 2. 逆相 HPLC による酸素同位体化合物(p-ニトロフェノール- $^{16}\text{O}/^{17}\text{O}/^{18}\text{O}$)の分離[4]。カラム：C18 (4.6 mmI.D., 90 cm x 12 cycle). 移動相：0.02 M phosphate buffer / CH_3OH = 95 / 5, pH 7.6, 0.4 mL/min, 40 $^\circ\text{C}$

図 3. 逆相 HPLC による窒素同位体化合物の分離[4]。ジメチルアニン(DMA)- $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ 標準化合物の分離(a)、自然濃度 ^{15}N を含む DMA から ^{15}N -DMA 分画の濃縮、(c) b 分画の再分離. カラム：C18, 4.6 mmID, 350 cm, 0.05 M acetate buffer / CH_3CN = 90 / 10, pH 3.8, 0.37 mL/min, 50 $^\circ\text{C}$

図 2, 3 に示した酸素および窒素同位体化合物の分離は、酸やアミンの pK_a 付近の pH において、一次同位体効果に基づく中性型と解離型の存在比率の同位体質量数による差 (pK_a の差) を、中性型と解離型とを合わせた平均としての (ある pH における) 疎水性の差に置き換えることにより達成されている (式 1, k : ある pH での保持係数, $k_{(AH)}$: 中性型の保持係数、 $k_{(A^-)}$: 解離型の保持係数, K_a : 酸解離定数)。この種の分離は CE を用いてより容易に達成される [5]。

$$k = \frac{k_{(AH)}[RCOOH]}{[RCOOH] + [RCOO^-]} + \frac{k_{(A^-)}[RCOO^-]}{[RCOOH] + [RCOO^-]}$$

$$= \frac{k_{(AH)}}{1 + K_a/[H_3O^+]} + \frac{k_{(A^-)} K_a/[H_3O^+]}{1 + K_a/[H_3O^+]} \quad (1)$$

$$\alpha = \frac{{}^{16}K_a/{}^{18}K_a}{k_{(AH)} - {}^{16}k} = \frac{{}^{18}k - k_{(A^-)}}{{}^{16}k - k_{(A^-)}} \quad (2)$$

ほとんど役に立たないものを研究した中で、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 [6,7] と、ODS 固定相のテスト法として立体選択性や金属不純物の効果を含む方法を報告したことである [8]。塩基性化合物分離のための ODS 充填剤の改良は国内で先行し、高純度シリカの使用、工夫された化学修飾法および Endcap 法により調製された日本製の ODS カラムは高い完成度を示し、外国製品と比較して優位であった。低分子、塩基性の溶質の分離にとどまらず、タンパク質の逆相クロマトグラフィー分離の有用性も広く認められた。

このような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、キャピラリー液体クロマトグラフィーやキャピラリー電気泳動 (CE) において先駆的な仕事をされた津田孝雄先生や寺部茂先生からキャピラリーカラムとオンカラム検出器の使用法などを通じて、教えていただいた多くのことが後で非常に役に立っている [9]。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。また、寺部先生の開発されたミセル動電クロマトグラフィー (MEKC) の美しい原理と高性能は、非常に刺激的であった [10]。

1.3 ODS カラム成熟期、同位体キラリティに基づく分離

上に示した同位体分離の例より実用的に有用であるのは、種々の生体関連物質や有機化合物異性体の分離である。80-90 年代には種々のアルキル鎖長の逆相クロマトグラフィー用充填剤が開発されたほか、異性体や構造類似同族体の識別が、立体選択性をもたらす電子供与体-受容体相互作用型 [11,12]、あるいは、双極子-双極子相互作用型固定相 [13]、また、剛直性をもつ固定相 [14,15,16] や、分子の包接を行う環状の構造要素をもつ固定相によって達成された。Pentabromobenzyl 基修飾固定相において強く観測される分散相互作用 [17] は、アルキル型固定相においても普遍的に溶質の保持に寄与していることが理解された [18,19]。

1990 年代、3 μm 粒子の性能とその使用が一般的 HPLC 機器適用の限界と考えられ、1980

年代から研究されてきた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) が一層の高性能分離のための主たる研究対象となった。HPLC においては、有機ポリマーモノリスカラム[20]や親水性相互作用型液体クロマトグラフィー(HILIC) [21]が注目され始めた。シリカ粒子やそれに基づく逆相クロマトグラフィーの分離能力の限界が理解されると同時に、複雑組成の混合物や、親水性の生体関連物質が分離対象として非常に重要となったことを示している。

クロマトグラフィーは元来、応用目的の分離法であるが、時には純粋に興味本位の分離例もある。1930 年代、重水製造が開始された当初から化学者が、重水素の存在が作るキラリティに基づいて Enantiomer を分離しようとしたことは、驚くべき科学的好奇心と言える。その初期に旋光計を用いて、重水素の存在が作るキラリティに基づく Enantiomer 分離の成功が報告されたが、これらの報告は後に否定された[22]。図 4 に示すように、初期に同位体キラリティ分離の対象となった基質である Benzhydrol- d_5 (phenyl(phenyl- d_5)methanol)について、セルロースを担体とするキラル固定相を用いて直接分離が達成された[23]。1930 年代の同位体キラリティに基づく分離は、このアルコールのフタル酸モノエステルを基質として試みられた。図 5 は、Phenyl 基と重水素化 Phenyl 基(phenyl- d_5)の存在が作るジアステレオマーを、疎水性の差に基づいて分離した例である[24]。結果的にはこれがこれまで達成できた中では最も困難な分離 ($\alpha=1.0053$) であった。この分離は、完成度の高いシリカ ODS カラムを 60 cm 接続し、ポンプと検出器を含むリサイクルクロマトグラフィーによって達成されている。

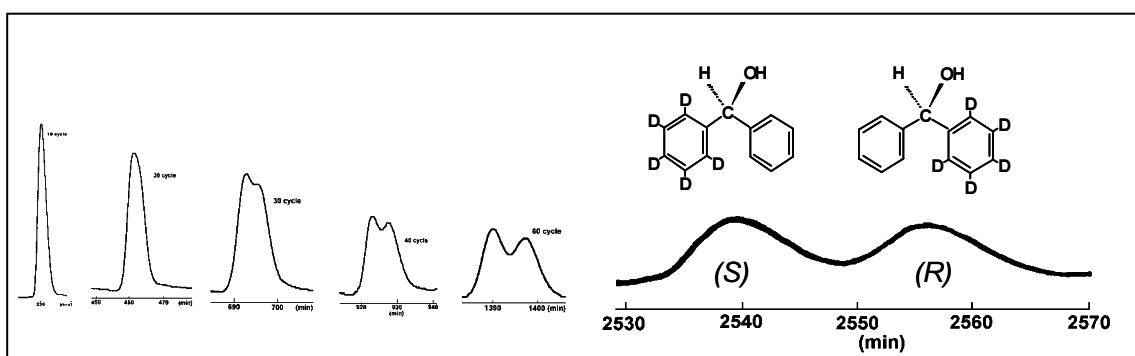


図 4. 同位体キラリティに基づく Enantiomer の分離. カラム: Tribenzoylated cellulose on silica (6.0mmID-600mm) x 65 cycle. 移動相: Hexane/2-Propanol=95/5, 流速: 2.0 ml/min, 温度: 40°C, 検出: UV 220nm. 溶質: phenyl(phenyl- d_5)-methanol, 20mg/ml, 0.5 μ l 注入.

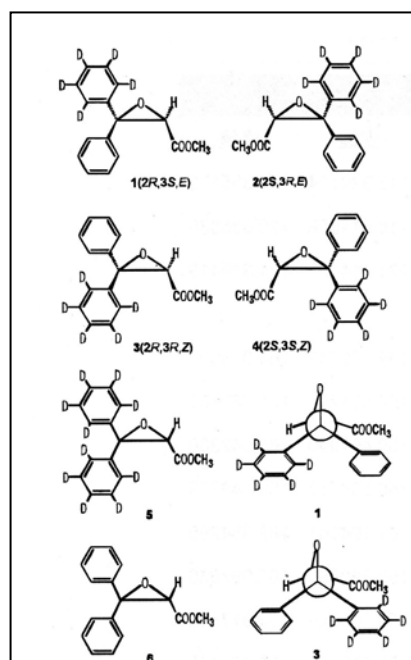
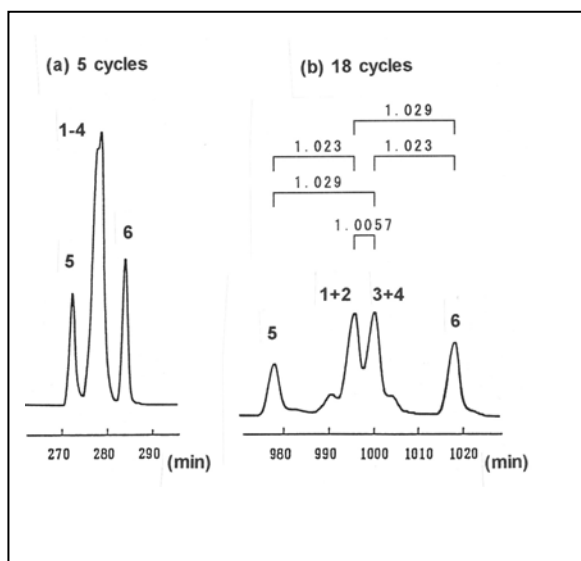


図 5. 同位体キラリティに基づく Diastereomer の分離. カラム : C18 (6 mmI.D. 15 cm x 4). 移動相 : methanol/water = 65/35. 温度: 30 °C. 溶質 Methyl 3-phenyl-3-phenyl-*d*₅-glycidate (**1-4**), **5** 及び **6**. 検出: UV 254 nm. ポンプおよび検出器を通したリサイクル分離.

逆相 HPLC において、C-H と C-D との識別は比較的容易に達成される。しかし、同一移動相溶媒中でも、同位体効果は、固定相の構造、C-H/C-D 炭素原子の混成状態、隣接原子、隣接官能基などに依存する。分極率の大きな固定相や溶質において C-H/C-D 識別が大きい傾向があり、PBB 固定相において最大となる。逆相 HPLC における溶質の保持は、いわゆる疎水性相互作用に加えて、固定相との分散相互作用に支配されていると見なすことができる[19]。この結果は逆相クロマトグラフィーにおいて分散相互作用が溶質の保持、識別に寄与することを示し、さらに、分散相互作用に対する炭素原子の混成状態や隣接原子の効果などを示すことができる[25]。同位体キラリティの識別においては固定相の分極率の大きな部位が R 配置の基質とより有利な分散相互作用に基づく binding を行うことに基づいて、識別が行われているものと考えられる。

1.4 超高性能化と高速・高理論段数カラム、1 個の D 原子に基づく分離

汎用 HPLC カラムのもたらす理論段数(N)は 1.0–2.5 万段であり、窒素同位体や酸素同位体の分離が必要とする理論段数には不足している。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、2 μm より小さな粒子充填剤や 2.7 μm 径の表面多孔性充填剤[26]が、超高压 HPLC (UHPLC) [27]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 カラムの性能向上は、再び多くの研究者や使用者の興味の対象となっている。しかし、実用的なカラムの分離能力は、この 30 年間ほとんど変わらず、これまでのカラム開発の主たる目的は分析時間の短縮であった。400 気圧を操作圧力の限度として、最適線速度における時間(*t*₀)あたりの理論段数は、5 μm 粒子充填カラムにおける 100–150/s(*t*₀)に対して、2 μm 粒子充填カラムにおいて 1000/s(*t*₀)に達する。これに基づ

いて分離能力が一桁近く向上したということは正しくないが、10000-20000 理論段を数倍短い時間(t_0 =数秒、1-2 分の分析時間)で発現することが可能となっている。

充填剤粒子を小さくすると、溶質の拡散移動距離が減少するので速い分配平衡の達成が可能となり、カラム長あたりあるいは時間あたりの理論段数が増大する。しかし、カラム理論段数は粒子径に反比例し、送液に必要な圧力は粒子径の二乗に反比例するので、このアプローチにより分離時間は短縮されるが、機器に付随する圧力限界の下で理論段数の増加には限界がある。また、カラムの理論段数を向上させることは、カラムを長くすることにより容易に行うことができるが、分離時間と送液圧力がカラム長に比例して増加するので、このアプローチも実用上好ましくない。2.7 μm 径の表面多孔性充填剤は、3 μm 粒子に近い圧力(透過率)と 2 μm 粒子に近い理論段数を可能として、ある意味でモノリス型カラムに近い性能を示す。これも粒子間隙を大きく、溶質の拡散移動距離を小さくした結果であり、通常の全多孔性充填剤の限界を超え、kinetic plot [28] において粒子充填型カラムとして最も高い性能を示すことができる。

保持係数(分配係数) $k = 4.0$ (溶質が固定相と移動相に 4:1 に分配している条件、あるいは、溶媒のカラム通過時間の 5 倍の位置に溶質がピークとして溶出される条件)において分離度 $R_s = 1.0$ を得るためには、 $R_s = (1/4)\sqrt{N\{(\alpha - 1)/\alpha\}\{k/(k+1)\}}$ から、 $N = 20000$ のとき、分離係数(隣接する 2 ピークに対する保持係数の比) $\alpha = 1.037$ を必要とする。すなわちこの条件下では保持係数において 3.7%異なる溶質間の完全分離が可能である。

ここで H/D 同位体化合物に対する D 一個あたりの分離係数は 1.010 以下、図 2, 3 に示す $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ に対して 1.010-1.012、 $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ に対して約 1.011 である。このような背景に基づいて、図 2-5 に示される小さな分離係数をもつ同位体化合物や同位体キラリティに基づく分離は、15-25 cm 長の完成度の高い 5 μm 粒子充填カラム、すなわち理論段数 1.5-2.5 万段のカラムを連結し 60-100 cm のカラムシステム(理論段数 6-10 万段)と、ポンプを通して未分離の溶質をリサイクルさせることにより数十万段の理論段数を発生させて実行されている例であり、カラムや充填剤としての新しさはない。ただし、自然濃度(0.36%)から ^{15}N 化合物を濃縮する場合には、1 回の通過で数万段の理論段数をもたらす長さのカラムを連結して用いている[4]。粒子充填型カラムは高速分離において非常に進歩した。一方、高理論段数への種々のアプローチが試みられてきたが、5-10 μm 粒子を充填したカラムを 10-20 m 接続し、高圧ポンプを用いて高理論段数(例えば 1000000 理論段)を目指した実験は、接続部でのバンド拡がりにより、目的を達成していない。

モノリス型シリカカラムは、後述するように大きな骨格間空隙と、大きな骨格とに基づいて、粒子充填型カラムより大きな透過率と高い理論段数を同時に発現できる。これまでに、5 μm 粒子相当の圧力において、2.0-2.5 μm 粒子相当の性能を示す高速キャピラリーモノリスシリカカラム[29]、ならびに、8-10 μm 粒子相当の圧力において、4 μm 粒子相当の理論段数を与える高理論段数キャピラリーカラムが調製されており[30]、前者は 10000 理論段を $t_0 = 7-8$ s、後者は 1000000 理論段を $t_0 = 5000$ s、300000 理論段を $t_0 = 1000$ s で発現する能力を示している。高理論段数型キャピラリーモノリスカラムは、40-50 MPa において(粒子充填型カラムでは不可能であった)保持される溶質に対して 1000000 理論段を実現し、このような高理論段数カラムの実用化の可能性を示している[31]。

この場合、汎用カラムより 1-2 桁以上高い理論段数をもたらすカラムの高性能を示すために

は、互いにより類似した溶質が必要である。図6は、850 cm のモノリス型シリカ ODS キャピラリーカラムにより C_6H_5D , 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 (2), benzene-1,3,5- d_3 (3), benzene- d (4), benzene(5)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。(このカラムは80万段以上の理論段数を発生させる能力があるにもかかわらず、なぜこの系で低い理論段数と tailing が得られるか、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6において、1個の重水素が与える分離係数は1.0080 であるが、100万段を与えるカラムは、移動相から固定相への移動に伴う自由エネルギー変化において、わずか3 cal/mol 程度の差を識別して、分離係数1.0050 程度の類似化合物に対して完全分離を可能とする。

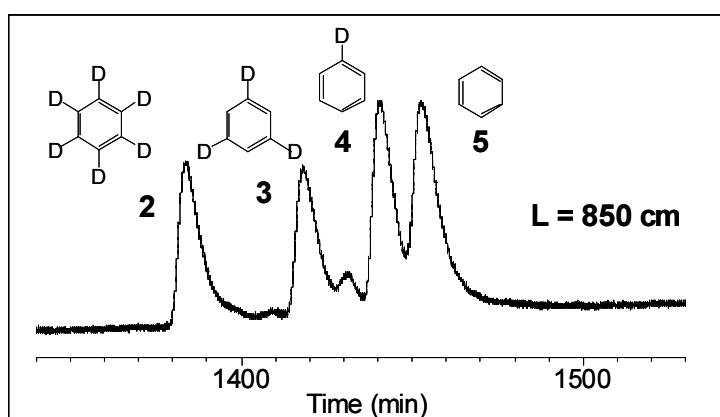


図6. ベンゼン重水素同位体化合物の分離. カラム:モノリス型シリカ- C_{18} キャピラリーカラム, 100 μ m I.D., 850 cm (500 cm + 350 cm). 移動相:アセトニトリル/メタノール/水=10/5/85. 線速度:1.02 mm/s. 検出:210 nm. 温度:30 °C. 溶質:(2) benzene- d_6 , (3) benzene-1,3,5- d_3 , (4) benzene- d , (5) benzene. 圧力 = 34 MPa.

1970年代、数千-10000理論段によるH/D化合物の分離、80年代、数万理論段による窒素あるいは酸素同位体の分離、90年代、カラムリサイクルを用いて数十万理論段による同位体キラリティに基づく分離、そして、2000年代、10 m程度のモノリス型シリカキャピラリーカラムを用いて数十万-100万理論段による重水素1個に基づく分離は、(逆相)HPLCカラムの発展を象徴的に示すと考えることもできる。同位体化合物の分離は、固定相の二次的保持効果のないことやカラムの大きな分離能力を実証すると同時に、同位体分離自身が古くから興味の対象となっていることが、これらの結果を意義あるように見せる要因となっている。これからの課題として、小数の重水素置換により分離を達成できる能力を利用して、分散相互作用に対する隣接原子、原子団の効果の検討、オルト、メタ、パラ重水素置換ベンゼン異性体、あるいは ^{13}C 置換化合物の分離などが課題として考えられるが、クロマトグラフィーによりこれを達成するためには、超高理論段数カラムを開発する意欲と実力があり、条件を最適化して非常に長い時間ピークの分離をまっ我慢強い研究者が必要である。図2-5の結果の多くが、最初に $^{16}O/^{18}O$ 分離ピークの溶出の瞬間を共有した1人の共同研究者によって達成されたことは特筆に値する

ものと思われる。

2. モノリス型シリカカラム

2.1 モノリス型シリカカラムの構造特性

1990年代、ODSカラムを用いる逆相HPLCが成熟し、HPLCやカラム充填剤に関する研究からキャピラリー電気泳動(CE)、キャピラリー電気クロマトグラフィー(CEC)、さらにチップ分離システムに分離関連の研究者の関心が移りつつあった頃、京都大学、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、とくに、小さな骨格と大きな空隙および空隙率、ならびに、骨格外空隙(Through-pore)と骨格(Skeleton)との大きなサイズ比など、多くの特性に興味もたれたが、当初Tetramethoxysilane(TMOS)からの骨格調製と溶媒置換、アンモニアによる細孔形成が困難をともない、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、中西先生と水口氏は辛抱強く調製を続け、ロッド型カラムの調製法を確立された[32,33,34]。細孔の形成法、シリカ骨格とThrough-poreサイズあるいはドメインサイズ(Through-pore size + Skeleton size)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[34,35,36,37]、続いてTMOS-Methyltrimethoxysilane(MTMS) Hybrid型モノリスシリカ調製法とキャピラリーカラム調製法が開発された[30,38,39,40]。

図7は、試験管内で調製されたモノリス型シリカ(a)、およびフューズドシリカキャピラリーで調製されたモノリス型シリカカラム(b-d)の走査型電子顕微鏡写真である。キャピラリーカラムについて、現在TMOSから200 $\mu\text{mI.D.}$ まで調製でき、Hybrid型について、より低い成功率であるが、500 $\mu\text{mI.D.}$ まで調製可能となっている[41]。現在2 mmI.D. 以上がロッド型(PEEK成型)において市販されているので、1 mmI.D. だけが欠けている状況であるが、このギャップを埋めるモノリス調製法の研究が進められている。

図8は、モノリス型シリカの骨格サイズと空隙サイズとのプロットである。モノリス型カラムの最大の特徴は、(i) 一体型であるので、骨格の大きさと空隙の大きさを独立して制御できることである。これは、(空隙サイズ/骨格サイズ)比を変化させ得ることを意味している。(粒子充填型カラムの場合には、安定な充填層を作るために、粒子を密に充填することが必要であり、(空隙サイズ/骨格サイズ)比=0.25~0.4となる[42]。)モノリス型シリカカラムは粒子充填型カラムと比較して、非常に大きな(空隙サイズ/骨格サイズ)比(1~2)をもち、小さな骨格と大きな空隙を併せもつので(図7, 図8)、小さな骨格に基づく移動相-固定相間の溶質の速い分配平衡の達成と、大きな空隙(流路)に基づく低圧での送液を同時に可能とする。

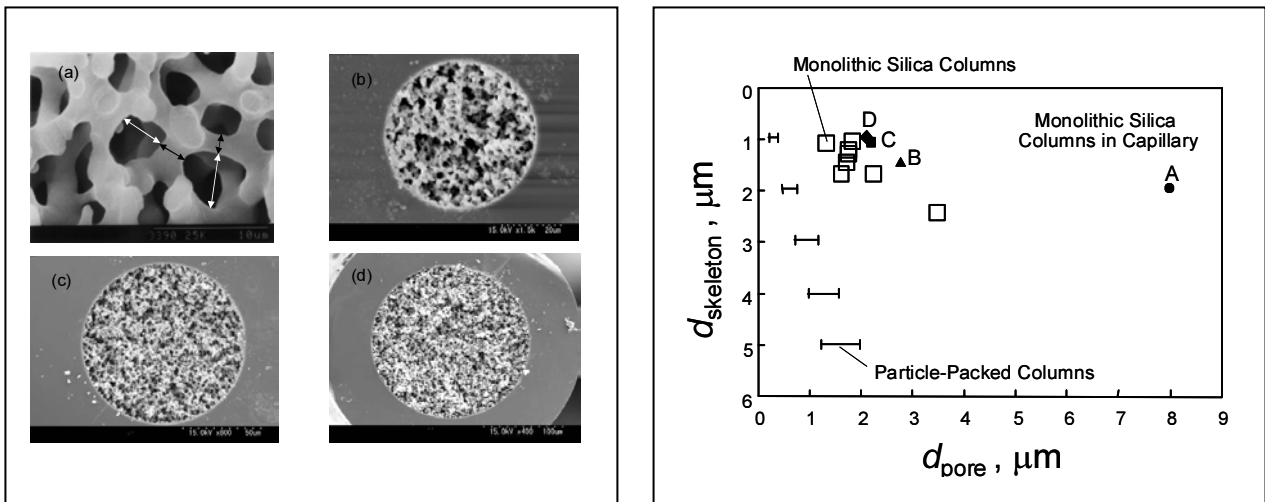


図7. モノリス型シリカの走査型電子顕微鏡写真。(a) 試験管中 TMOS から調製したモノリス型シリカ。(b-d) キャピラリー中で TMOS, MTMS 混合物から調製したハイブリッド型モノリス型シリカカラム。(b) 50 μm I.D., (c) 100 μm I.D., (d) 200 μm I.D.

図8. モノリス型シリカカラムにおける空隙 (through-pore) サイズと骨格 (skeleton) サイズ. ロッド型(□), 50 μm I.D.キャピラリー型, MS(50)-A(●), MS(50)-B(▲), MS(50)-C(■), MS(50)-D(◆). 粒子充填型カラム中の粒子径と空隙サイズ (|---|, 空隙径=粒子径 \times 25-40%).

また、(ii) 一体型の構造は、骨格外空隙率を変化させることを可能とする。粒子充填カラムにおいて骨格外空隙率は約 0.4 である。(空隙サイズ/骨格サイズ) 比の比較から明らかなように、モノリス型シリカカラムは非常に高い空隙率をもつことが可能である。サイズ排除クロマトグラフィーから得られた全空隙率は、ロッド型カラムにおいて約 0.8、キャピラリー型において 0.9–0.95、骨格外空隙率はそれぞれ約 0.6、約 0.8 である。大きな空隙率と大きな空隙サイズは高い透過率 (低いカラム圧力) をもたらし、高流速を可能とする。また、長いカラムの使用を可能として、大きな理論段数の発生を可能とする。

2.2 モノリス型シリカカラムのクロマトグラフィー特性

粒子充填型カラムと内部構造は異なるが、モノリス型カラムにおいてもバンド拡がりの要素 (構造的要素) とクロマトグラフィー特性との関係は共通である [43,44]。モノリス型カラムにおいても、粒子充填カラムと同様に、空隙サイズと骨格サイズの減少が速い平衡達成を可能として高流速における高性能をもたらす。図 7a において、矢印は骨格サイズと空隙サイズを表し、その合計がドメインサイズと呼ばれる。ドメインサイズは、粒子充填型カラムにおける粒子径に相当し、カラムの性能を記述する単位長さとなる。

2000 年から、内径 4.6 mm、5-10 cm 長のロッド型 ODS シリカ(TMOS 型)カラムが、PEEK 外装により市販され始めた。このカラムは 10-20 MPa 程度の圧力下で使用でき、 $H = 7-8 \mu\text{m}$, 透過率 $K = 8 \times 10^{-14} \text{m}^2$ という、7-8 μm 粒子相当のカラム圧力と、3.5-4 μm 粒子相当の理論段数を与える。高い透過率はアセトニトリル-水系移動相中で 10 mL/min(10 mm/s)における溶出 (t_0

< 10 s) を可能とし、また、多数のモノリス型カラムを接続して長いカラムシステムとして、10 万段を超える理論段数を発現することも可能である[45]。

2001-2002 年に第一世代のキャピラリーカラム調製法が確立され、理論段高 $H = 10 \mu\text{m}$ 、透過率 $K = 1 \times 10^{-13} \text{ m}^2$ を与えた。その後実験者の熟練により、 $H=7\text{-}10 \mu\text{m}$ 、透過率 $K=1.0\text{-}1.5 \times 10^{-13} \text{ m}^2$ が得られている。短いカラムについては、長いカラムからよい部分を選んで切り取ることができるので、よりよい結果を得ることが可能である。性能の悪い長いカラムから一部分を切り取ると、残りが高い性能を示すこともある。表 1 は、異なる実験者が長いキャピラリーカラムを調製した結果を示している[31]。50–200 μm 径のキャピラリー内で調製されたモノリス型シリカカラムは 500 気圧程度までの圧力で評価されている。

1970 年以来、粒子充填型カラムの開発過程において、カラムのもたらす理論段数はほぼ 10,000 – 25,000 に固定され、微粒子充填剤の使用による性能の向上はカラム長さの減少（分析時間の短縮）をもたらした。一方、モノリス型シリカカラムについては、高速型と高理論段数型キャピラリーカラムのそれぞれにおいて性能の向上が図られた。粒子充填型と異なり、ドメインサイズのほかに、空隙率もカラム特性を決める重要な要素となっている。調製において、理論的にはシラン濃度が空隙率を決め、PEG 濃度が相分離のタイミングすなわちドメインサイズを支配するが、実際には、一方の濃度を固定して他方の濃度を変化させて最適の組み合わせを得ることは容易ではない。現在の高性能化研究においては、ゲル化速度と相分離の進行を調和させて、均一性の高いモノリス構造を得ることが最も重要な課題となっている。

2.3 高理論段数型モノリスシリカカラム

図 9 は、2001 年に開発された Hybrid 型モノリスシリカ調製法の再現性を示している[31]。このデータから kinetic plot [28] (図 10) を作成すると、一定の圧力下で、現在の調製法により得られるカラムの限界的性能が示される。この一般的製法により調製される Hybrid 型(TMOS : MTMS = 3 : 1)カラムは、高速領域 ($N \sim 10000$) において 3.5-4 μm 粒子相当の性能を示し、高理論段数領域 ($N=100000 \sim 1000000$) において、5–10 μm 粒子より 3–5 倍速い分離を可能とする。最適性能は理論段数約 100 万段($t_0 = 5000 \text{ s}$)において発現する。

図 10 は 12 m のカラムにより 100 万段の理論段数を示す分離の一例である[31]。現在はさらに改良された調製法により、15 m カラム、カラム圧力 500 気圧、 $t_0=10000 \text{ s}$ において、保持される溶質について理論段数 2000000 段が得られている[46]。このような長いカラムと長い分離時間を要する高性能分離が直ちに実用的とは考えられないが、非常に分離困難な、あるいは、非常に複雑な混合物の分析に役立つ可能性がある。

表 1. 長いモノリス型シリカ ODS キャピラリーカラムの評価結果

Column No.	L cm	u mm/s	N ^a x10 ⁴	H μm	P MPa	K x10 ⁻¹⁴ m ²	E
MS-50-C ₁₈ (1HK)	254 ^b (260) ^c	2.0	22.6	11.2	20	11.7	1070
MS-200H-C ₁₈ (2DT)	253 ^b (260) ^c	1.1	31.3	8.1	12	10.7	610
MS-200H-C ₁₈ (3HK)	270 ^b (276) ^c	1.0	30.0	9.0	7.8	11.8	740
MS-100H-C ₁₈ (4TH)	88 ^b (94) ^c	1.0	12.5	7.0	5.9	7.2	680
MS-100H-C ₁₈ (5KK)	133 ^b (143) ^c	1.0	16.3	8.2	4.8	13.1	510
MS-100H-C ₁₈ (6SM)	120 ^b (128) ^c	1.1	15.9	7.5	4.3	14.5	390
MS-100H-C ₁₈ (7ON)	130 ^b (138) ^c	1.1	15.9	8.2	4.9	13.7	490
MS-100H-C ₁₈ (8KM)	442 ^b (448) ^c	1.1	54.7	8.1	16.1	13.8	480
MS-100H-C ₁₈ (9KM)	442 ^b (448) ^c	1.1	45.4	9.7	13.5	16.5	570
MS-100H-C ₁₈ (10KM)	342 ^b (348) ^c	1.1	30.3	11.3	7.6	22.8	560

カラム記号はモノリス型シリカカラムの直径(μm)、TMOS と MTMS から調製された Hybrid column (H)であること、octadecyl (C₁₈) 化、およびカッコ内にカラム番号と実験者の initial を示す。

^a Hexylbenzene を溶質として 80% acetonitrile 中で測定されたカラムの理論段数。

^b Effective length (cm).

^c Total length (cm).

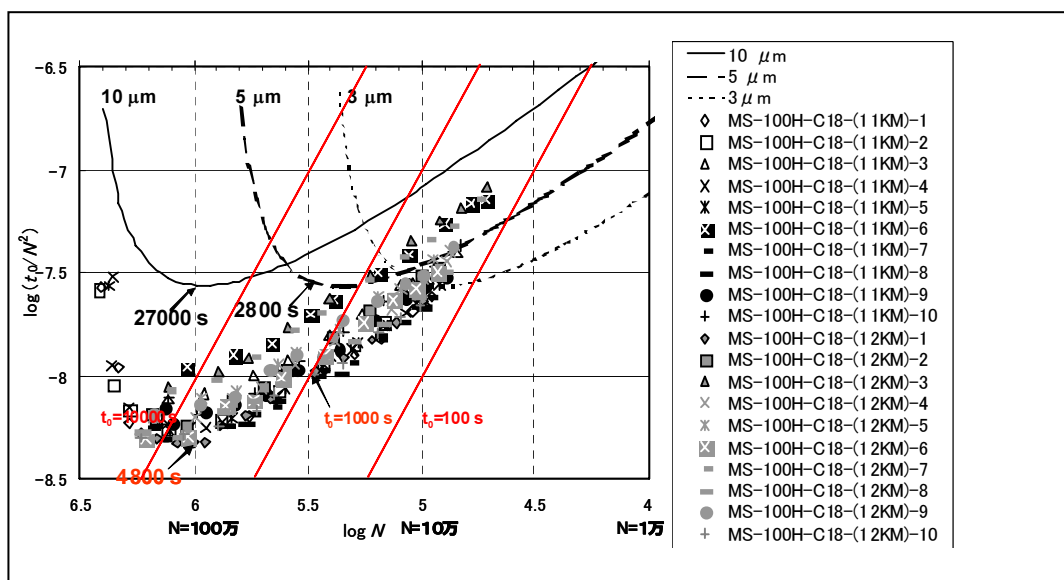


図 9. 高理論段数型モノリス型シリカキャピラリーカラムにおける $\log(t_0/N^2)$ 値と $\log(N)$ 値との関係。評価条件、圧力 40 MPa, flow resistance parameter $\Phi=700$, 移動相粘度 $\eta=0.00046$ Pa s, 溶質の拡散係数 $D_m=2.22 \times 10^{-9}$ m²/s, 粒子充填型カラムにおける Knox 式 $h=0.65v^{1/3}+2/v+0.08v$, 粒子径 (d_p) 3, 5, および 10 μm.

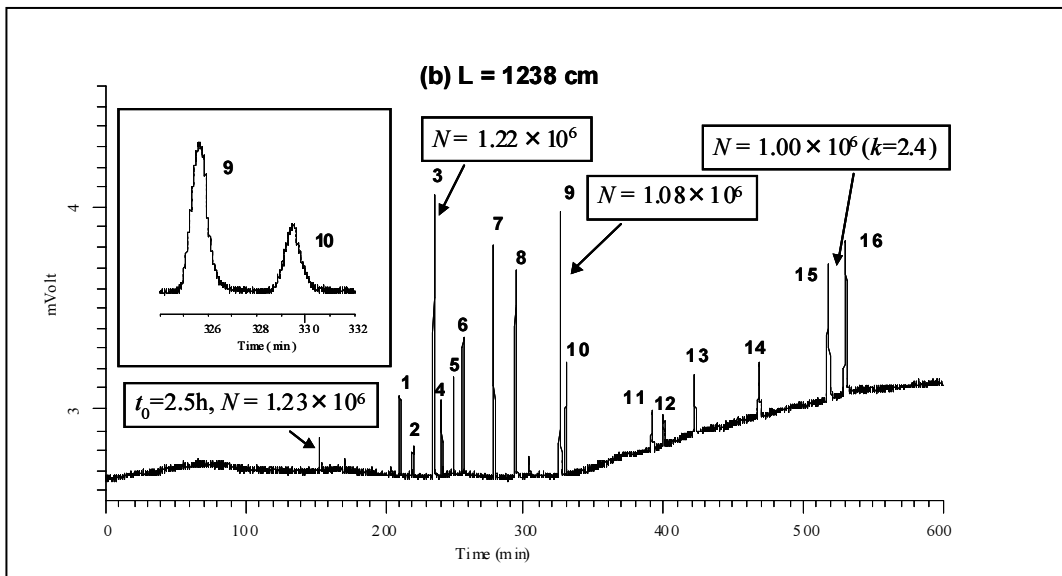


図 10. モノリス型シリカ ODS キャピラリーカラムによる多環系芳香族化合物の分離.

移動相: acetonitrile-water (80/20). 検出: 210 nm. 温度: 30 °C. 試料: EPA 16-PAHs 標準物質. Peak 番号: 1, naphthalene, 2, acenaphthylene, 3, fluorene, 4, acenaphthene, 5, phenanthrene, 6, anthracene, 7, fluoranthene, 8, pyrene, 9, chrysene, 10, benz(a)anthracene, 11, benzo(b)fluoranthene, 12, benzo(k)fluoranthene, 13, benzo(a)pyrene, 14, dibenz(a,h)anthracene, 15, indeno(1,2,3-cd)pyrene, and 16, benzo(g,h,i)perylene. (a) Column: MS-100H-C18 MS-100H-C18 (8KM, 9KM, 10KM), 有効長 1238 cm (全長 1244 cm). 圧力 $\Delta P = 46.6$ MPa. 線速度 = 1.31 mm/s.

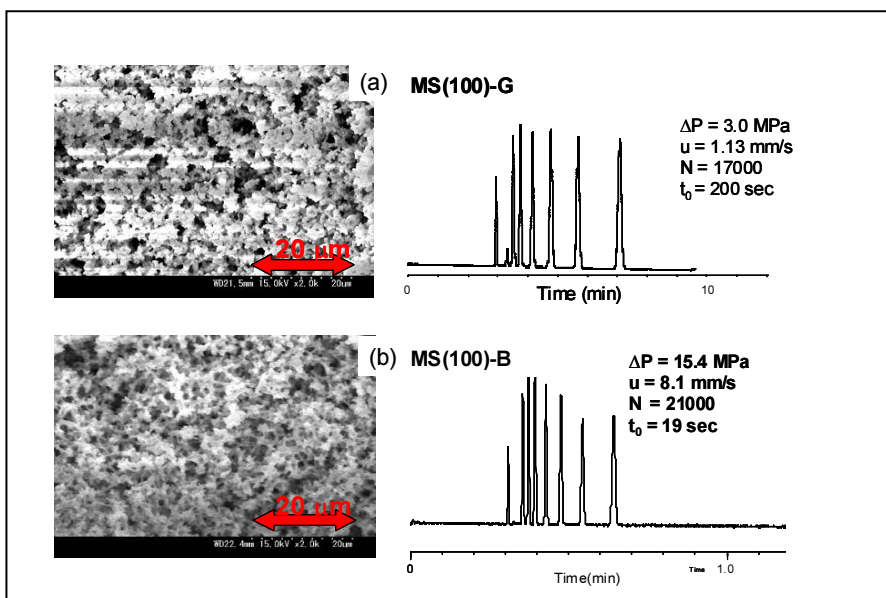


図 11. 第一世代(a)と第二世代(b)モノリス型シリカキャピラリーカラムの走査型電子顕微鏡写真. 溶質: uracil, $C_6H_5(CH_2)_nH$, ($n=0-6$). カラム: (a) MS(100)-G, (b) MS(100)-B. 100 μ m ID, 20 cm. 移動相: Methanol-H₂O = 80/20. 温度: 30 °C.

高理論段数型カラムについては、長いカラムにより非常に大きな理論段数を発現するために高い透過率が求められる。これは大きな空隙サイズを意味する。一方で大きな空隙サイズは、移動相中の物質移動速度に依存するバンド拡がりの寄与により、性能を低下させる。図9が示すように、高理論段数領域でモノリス型シリカカラムの優位性は明らかである。これは、モノリスにおいて空隙サイズを骨格サイズと独立して設計可能であるのに対して、高い透過率を示す粒子充填カラムは必然的に大きな骨格（粒子）径をもち、移動相－固定相間の遅い物質移動の寄与による大きなバンド拡がりをもたうからである。

2.4 高速型モノリスシリカカラム

一方、高速領域で2 μm 以下の粒子を充填したカラムと競争できるモノリスシリカを調製することは容易ではない。現在、最高性能の高速モノリス型シリカカラムは TMOS から調製されたものであり、5 μm 粒子と同等の透過率(カラム圧力)と、2.0-2.5 μm 粒子相当の理論段高(H=4.5~5 μm)を示す。このカラムは20 MPaの圧力下、 $t_0=20$ sで理論段数20000段を与える。すなわち、カラム圧力100気圧において、 $t_0=10$ s、10000理論段をもたらす(図11) [29]。これは、初期の調製法に比べて、骨格量(仕込みにおけるシラン量)の増大、空隙サイズの減少、均一性の増加によって達成された。図11bのSEM写真は、図7b-dや図11aと比較して明らかな均一性の向上を示している。このカラムは、粒子充填型カラムについての構造上の特性に基づく限界、および従来型のモノリスカラムについての調製上の問題から”Forbidden Region”とされていた領域の性能を示した(図12)。しかし高速性能に限って言えば、1.7-2.0 μm 粒子充填カラムは、 $t_0=5$ sにおいて同等の理論段数をもたらす。モノリス型シリカの一層の高性能化のためには、ドメインサイズの減少と構造均一性の向上が必須である。

現在 HPLC において最も高速性能のよい粒子充填カラムは、H=2.0-4.0 μm の性能を与える。次世代の標準的高性能充填剤として2 μm 以上の粒子か、2 μm 以下の粒子か、これらの間の選択が熱い議論となっている。また、1.7 μm の固体コアをもち、その表面に0.5 μm 厚の多孔性シリカ層をもつ充填剤もほぼ同等の性能を示す[47]。モノリスシリカが次世代高速カラムの候補として加わることができるかは、今後の開発にかかっている。この場合、当面の目標は明確である。キャピラリー型モノリスと比較して、Kinetic plotにおいて優位となる構造を作る自由度は大きいかもしれないが、ロッド型モノリスが競争するためには、claddingの問題を解決し、耐圧性能を向上することが必要である。

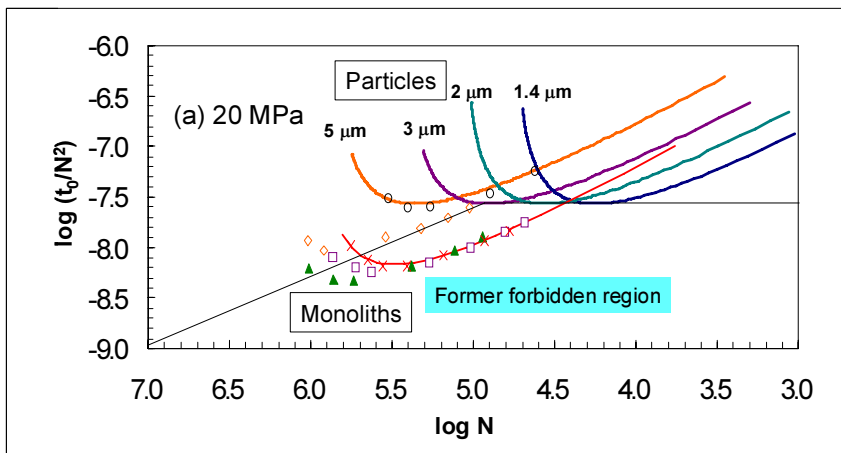


図 12. 高速型モノリス型シリカキャピラリーカラムにおける $\log(t_0/N^2)$ 値と $\log(N)$ 値との関係。評価条件、圧力 20 MPa, flow resistance parameter $\Phi=700$, 移動相粘度 $\eta=0.00046$ Pa s, 溶質の拡散係数 $D_m = 2.22 \times 10^{-9}$ m²/s, 粒子充填型カラムにおける Knox 式 $h = 0.65v^{1/3} + 2/v + 0.08 v$, 粒子径 (d_p) 1.4, 2.0, 3.0 および 5.0 μm .

2.5 モノリス型シリカカラムの将来

モノリス型カラムの将来が有望視される分野の一つは、キャピラリー-HPLC である。細い、とくに、長いキャピラリーに粒子を充填することは、粒子径の減少にともなってより困難となる。これと比較して、シラン溶液を注入して一体型カラムを調製することは理にかなっている。単なる興味の対象に過ぎないかもしれないが、200 万段を発現する 15 m 長のカラムの存在が実証するように、構造特性に付随する高い透過率は明らかな利点である。今後の開発において最も重要な要素は、均一性の増加である。長いカラムについて、高い均一性を全カラム長にわたって得ることは困難を伴い、調製の再現性が要求されるが、生命科学関連分野の複雑混合物の分離[48,49]は、モノリスカラム関係者の貢献を要求する領域であると考えられる。このようなカラムを実用とする分野が存在すれば、次はハードウェアが課題となる。

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[29]。UHPLC が一般的な分離分析の手段となり、さらに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、小さな共連続構造の実現）である[50]。これまでの結果に基づいて、約 1.2 μm の空隙サイズ、約 0.8 μm の骨格サイズをもつモノリス型シリカカラムにおいて、3 μm 粒子相当のカラム圧力、1.5 μm 粒子相当のカラム性能が得られるものと期待される(図 13)。

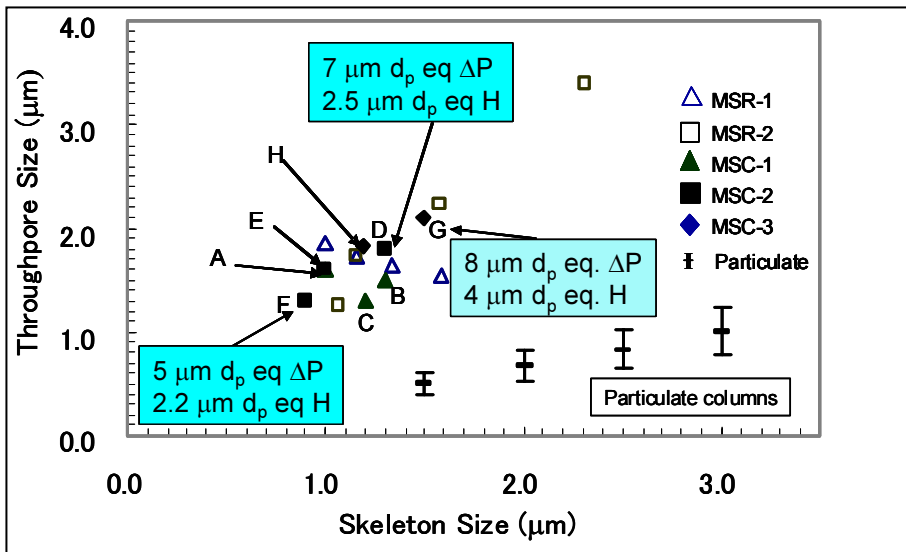


図 13. モノリス型シリカカラムにおける空隙 (Through-pore) サイズと骨格 (Skeleton) サイズ。ロッド型(MSR), キャピラリー型(MSC)。粒子充填型カラム中の粒子径と空隙サイズ (I-I, 空隙径=粒子径 x 25-40%)。

(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程度の細か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[51]。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、保持される溶質に対して400-500気圧程度において100万段を超える性能を与えた[31]。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、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。

構造類似化合物の分離、例えば、不純物の検出などにおいて分離条件設定が困難な場合には設定を容易とする高理論段数カラムが役立つものと期待される。しかし、現在のところ30 cmのカラムと3 mのカラムを比較し、カラム長に比例したグラジエント時間を用いて、長いカラムにより3-5倍のピークキャパシティを発現させた場合(図14)でも、ペプチドの同定率やプロテインスコアにおいて、長いカラムが必ずしもよりよい結果を与えていない。複雑混合物の一斉分離、例えばLC/MSによるプロテオーム解析、メタボローム解析において、長いカラム、長時間グラジエントによる高い分離能力がMSに基づく多数の有機化合物の構造決定に役立つかどうかは、感度やサンプル負荷許容量、すなわち今後のHPLC装置や質量分析計の進歩にも依存する。

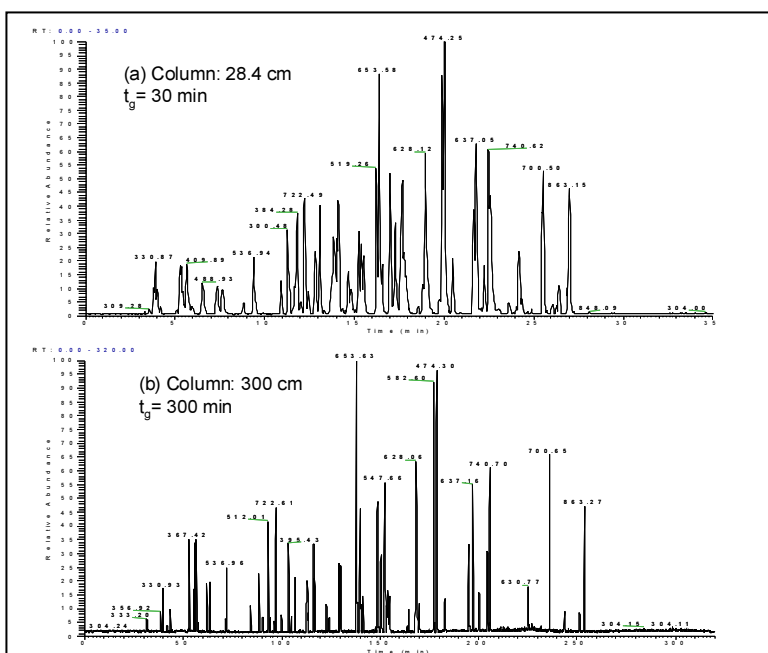


図 14. BSA 消化物のグラジエント分離. カラム: MS-100H-C18-(6SM), (a) 28.4 cm, (b) 300 cm. 移動相: (A) 0.1% formic acid /H₂O, (B) 0.1% formic acid / acetonitrile. B 5% -- 40% / 30 min (a) および 300 min (b). グラジエント開始時に BSA 消化物(100 nL, 1 nmol/200 μ L) 注入. 流速: 1.2 μ L/min (a), 0.67 μ L/min (b).

(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担体が固定され、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[52,53]。

図 15 は、モノリス型シリカ調製後、アンカーとなる Methacryl ester あるいは Amide 結合後、モノマーを共重合してポリマー固定化型としたカラムの分離能力を示している。このポリマー固定化法は、逆相型、(ODM)、HILIC 型(Amide, PAA)、イオン交換型(PAA, Sulfonate, Ammonium, Amine)など、広い範囲の固定相の調製に適用でき、しかも、保持を大きくできるという利点をもっている[54,55,56,57,58]。

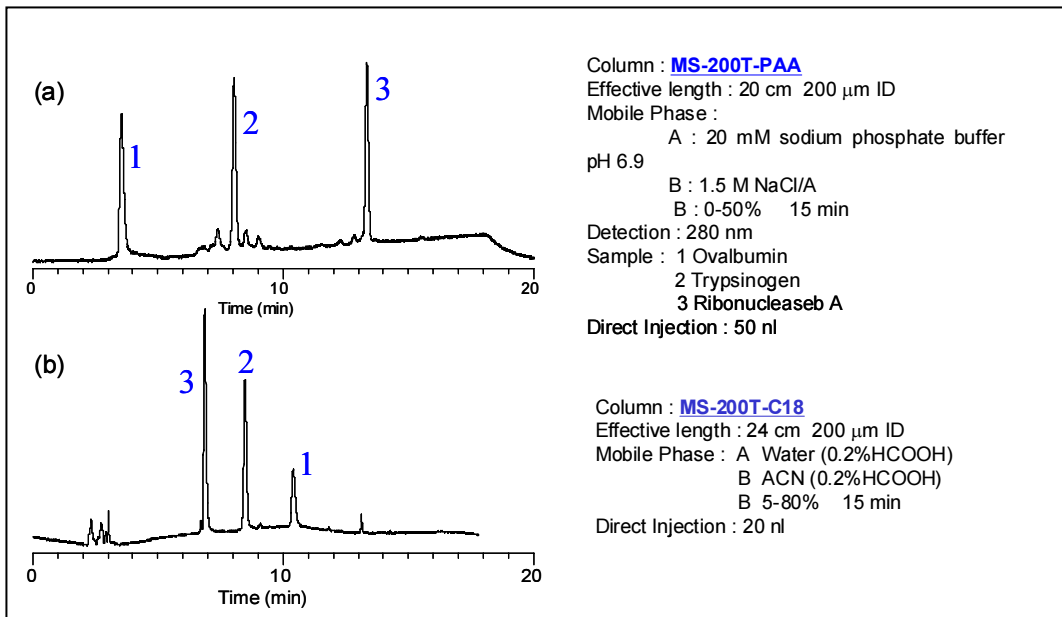


図 15. カチオン交換モード(a)と逆相モードにおけるポリペプチドのグラジエント分離。(a)カラム: ポリアクリル酸コートモノリス型シリカカラム、(b)モノリス型シリカ ODS カラム。

(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、完全二次元 HPLC(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分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 [59,60]。

2D-HPLC において、各次元のピークキャパシティ(Isocratic: $n = 1 + (\sqrt{N} / 4) (\ln(t_R/t_1))$, Gradient: $n = 1 + t_G/t_W$)の単純な積($n_{2D} = ({}^1n) ({}^2n)$)は、第一次元の溶出液を無限に細かく分画し、その短い時間内に第二次元(HPLC)を終了したと仮定した理論的なピークキャパシティを表す。実際には第一次元での分画の中で、分離されたピークの再混合が起こりバンド幅が増加するために、2D-HPLC クロマトグラムにおいて実際に得られるピークキャパシティは理論値よりはるかに小さい($n_{2D-exp} = e_M ({}^1n) ({}^2n)$)。一般的には第一次元のピークの $2\sigma - 4\sigma$ に相当する分画時間が最適である。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、最長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 [61]。

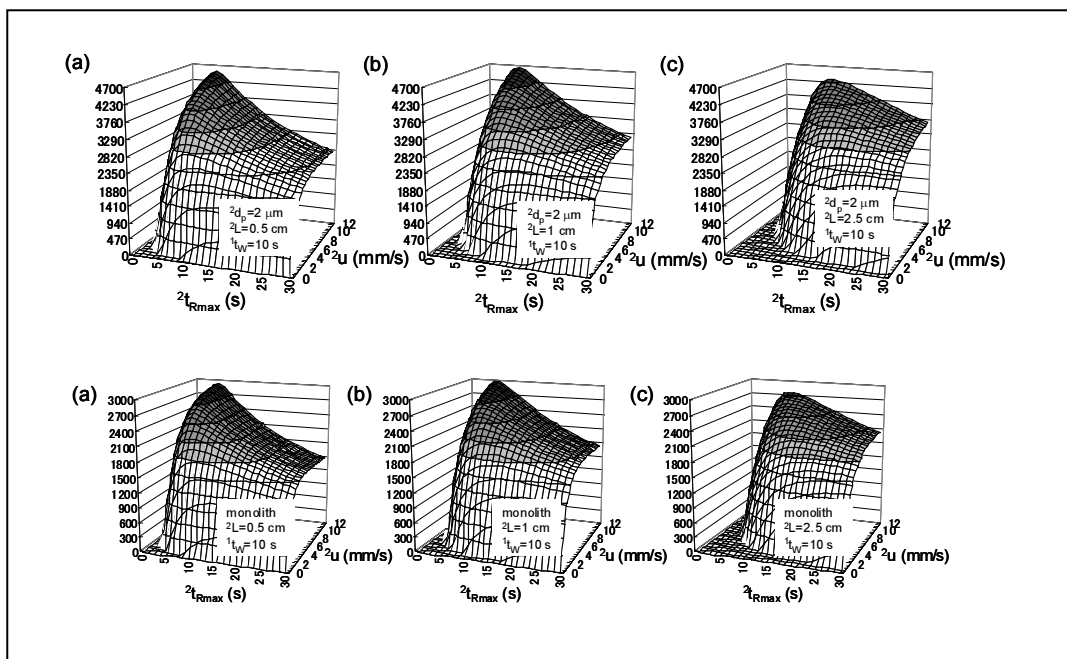


図 16. 二次元(2D)HPLCにおいて実際に期待されるピークキャパシティ($n_{2D\text{-exp}}$)計算値。

第一次元分離: グラジエント分離、グラジエント時間 $t_{tG}=60$ min. 第二次元分離: イソクラティック分離. 粒子充填型カラム(粒子径 $2\ \mu\text{m}$): (a) 第一次元ピーク幅 $t_{tW}=10$ s, 第二次元カラム長 ${}^2L=0.5$ cm, (b) $t_{tW}=10$ s, ${}^2L=1$ cm, (c) $t_{tW}=10$ s, ${}^2L=2.5$ cm. モノリス型シリカカラム: (a) $t_{tW}=10$ s, ${}^2L=0.5$ cm, (b) $t_{tW}=10$ s, ${}^2L=1$ cm, (c) $t_{tW}=10$ s, ${}^2L=2.5$ cm.

モノリス型シリカカラムの応用は、粒子充填型カラムに優る性能を示し続けることにより広まるものと思われるが、一般的に広く利用されるかどうかは、高性能で使いやすい多種類のカラムが、いくつかの企業から提供されるかどうかによって依存すると考えられる。研究者が担体を容易に入手でき、修飾できることも、応用範囲が広がるための重要な要件である。潜在的な分離能力を考慮すれば、カラム市場において 10%程度を占めることも可能であると考えられるが、楽観はできない。同時に、粒子充填型カラムの性能を超える極限的な性能を発現させることも、今後の研究にかかっている。

2.6 HPLC 研究の将来の課題

微粒子充填剤充填カラムは高圧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。しかし現実には、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)の最適使用条件に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、汎用の機器を作るもののほか、分離や性能に対する圧力の効果や、溶媒と充填剤との摩擦熱による温度分布の影響を抑える点にあると思われる。

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

提唱されているが、100°Cを超える温度で HPLC を行うことは、数十万台と推定される汎用 HPLC にとってかなりの環境上の問題を作ることが予測される。今後、粒子の微小化が続けられるか、モノリス型カラムが高性能化に貢献できるか、人工的なシリカパターン形成が実用的となるか、非常に興味もたれる。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、高性能カラムが 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。

応用範囲の拡大と限界的な性能の利用が日常的となるにつれて、個々の使用者が広い範囲の HPLC 分離を一般的な機器を使用して行うことが困難となり、狭い範囲の応用に専門的な機器と技術者が必要となることも考えられる。しかし、分離の課題を広くとらえて、総合的に課題を解決できるような、本質の理解できる実験者が必要である。将来の課題に対して柔軟に対応できる実験者が育つように、クロマトグラフィーについて基礎的な教育が行われることは、生命関連科学だけでなく、医薬学、工業化学にとっても非常に重要であると考えられる。超高压、微粒子、高温など HPLC における Big cannon を好む進め方と、モノリス構造の最適化などソフトなアイデアを評価する進め方の両方がうまく組み合わせられたとき、現在より一段と高性能の HPLC が実現できるように思われる。

2.7 雑感

1968-73 年の修士課程、博士課程在学中には、 S_N2 型塩素同位体交換反応における二次重水素同位体効果の検討を行った。PD としての最初の研究室に誰も使っていない第一世代の高性能 HPLC があり、重水素化合物の購入を正当化する根拠を何か示すよう言われて、試薬棚にあった 2-chloro-2-methylbutane-*d*₃ (tert-butyl chloride-*d*₃) を加水分解して理論段数数百段のカラムに注入したとき、H 化合物との混合物にわずかに分離（ピーク幅の増加）が見られたこと、購入した重水素化合物がこの時期に市販され始めた数千理論段のカラムにより、ちょうど分離を与える程度の同位体効果を示したこと、さらには 2 回目の PD の期間が終わるときにちょうど Karger 研究室で PD 募集があり、採用されたことなど、偶然に恵まれて HPLC とのつきあいがスタートしている。アメリカでの PD を終え、79 年、帰国に際して Thornton 教授を訪れたところ、重水素化合物をすべてもち帰るよう勧められたが、これらの化合物はその後 30 年間、役に立った。1998-2000 年、Poland からの PD が重水素同位体効果に基づいて疎水性相互作用発現メカニズムについて検討した結果は手に余る内容であったので、Thornton 教授に修正、執筆を頼んだところ、3 年がかりで書かれた原稿は審査員に "Magnum Opus" であるとコメントされてほとんど無審査の状態であった。話が難しすぎたのかもしれない[19]。データと草稿を提供した後、執筆が遅いことに対して帰国後も漏らしていた PD の不満は、審査の結果を見て賞賛に変わった。

官能基と官能基の相互作用が溶質-固定相-移動相の系のどこで起こるかにより、同一カラムを用いる 2D-HPLC 分離[62]、あるいは同一溶媒を用いる 2D-HPLC 分離[63]が可能となるが、これも 30 年前の仕事（保持に対する溶媒の効果[64]）の延長線上であり、同位体効果とともに、相変わらず同じことをしていると自分でも思う。逆相 HPLC、同位体の分離、これらとモノリス型シリカカラムの開発がちょうどうまく組み合わせられたことが、非常に幸運であったと感じている。

同位体効果とともにもう一つデータ集積に長い時間を要した 100 万段を超える高理論段数の

発現については、1970年代から多くのクロマトグラフィー研究者の研究対象となり、1990年代に10-30 μmID の細いオープンチューブキャピラリーカラムを用いて、ほとんど保持のない溶質に対して実現されている[51,65]。モノリス型シリカカラムは高理論段数の発現に適したカラムであり、フェーズドシリカキャピラリー内に調製した3-4 m長のモノリス型シリカカラムを数本接続して10 mを超える長さとする事により、保持される溶質に対して400-500気圧程度において100万段を超える性能が得られた[31]。欧米でこのデータを報告すると、「この種のカラムを作ることができるのは日本人と中国人だけだ。」と言われる。表の中にスペインからのPDのデータが含まれていることに意味がある。この結果を記した論文に対しては、ギネスブック向きであるというコメントを受けた。これは典型的な例で、実験者、学生の得たデータだけが優秀であり、指導者による理論も考察も必要ない論文がある程度受け入れられるという点で、性能の良し悪しが明確で、ピークを見ただけで仕事が評価されるこの分野は自分に合っていたと考えている。

クロマトグラフィーが自分に合っていたと思うもう一つの理由は、クロマトグラフィーにおいては、また、分離できればOKで、性能が高くても分離できなければ認められないという、「かけ」の要素があることだと感じている。HPLC2008 Kyotoに招いたアメリカの教授が、実験室を回ったときに気づいたことについて、学生やPDに、「...について自分はこう思う、おまえはどう思うか」と尋ねて、考えが違くと、「ビールをかけよう。」と言って仕事を面白くしているという話を聞いて、何か似ていると感じた。話し相手になる学生やPDがいる間は、考えが進む。

3. クロマトグラフィー教育・研究、他の分野への貢献

現在HPLCの進歩を最も必要としている分野は生命科学と医薬学の分野であると思われるが、生物由来の医薬品、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。一般的な医薬品開発においても、候補化合物の探索、微量不純物の発見、構造決定、開発期間の短縮などのために、分離精製の技術的な側面を担当する専門家の育成は、この分野にとって大きな助けとなるものと思われる。HPLCの高速化、マイクロ化、自動化が流れとなり、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は非常に大切であると思われる。HPLC機器が多用途型から、用途によって機器を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、本質を理解し、考える使用者を育成する教育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、その研究に参加することは、将来の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。

わが国の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, Chairman: 大塚浩二教授)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。とくにキーとなる充填剤、試料前処理剤などの分離媒体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。理論、機器、分離媒体、応用にわたってバランスよく研究を進められる程度の資金と研究者の数が必要であり、分離科学が他の先端科学や産業を支える基盤的科学・技術であることが理解されて、この分野の科学・技術のよりどころとなる研究機関が発展することが望まれる。クロマトグラフィーは比較的成本が小さい割に波及効果が大きな科学・技術の一つであり、少数の機関に集中的に投資することも有効であると思われる。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2015年ご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、わ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。

-
- ¹ N. Tanaka, E. R. Thornton, *J. Am. Chem. Soc.*, 98, 1617-1619 (1976). 99, 7300-7307 (1977).
 - ² J. W. Dolan, J. R. Gant, N. Tanaka, R. W. Giese, B. L. Karger, *J. Chromatogr. Sci.*, 16, 616-622 (1978).
 - ³ N. Tanaka, A. Yamaguchi, M. Araki, K. Kimata, *J. Am. Chem. Soc.*, 107, 7780-7781, 7781-7782 (1985).
 - ⁴ N. Tanaka, K. Hosoya, K. Nomura, T. Yoshimura, T. Ohki, R. Yamaoka, K. Kimata, M. Araki, *Nature*, 341, 727-728 (1989).
 - ⁵ S. Terabe, T. Yashima, N. Tanaka, M. Araki, *Anal. Chem.*, 60, 1673-1677 (1988).
 - ⁶ Y. Ohtsu, Y. Shiojima, T. Okumura, J. Koyama, K. Nakamura, O. Nakata, K. Kimata, N. Tanaka, *J. Chromatogr.*, 481, 147-157 (1989).
 - ⁷ K. Kimata, N. Tanaka, T. Araki, *J. Chromatogr.*, 594, 87-96 (1992).
 - ⁸ K. Kimata, K. Iwaguchi, S. Onishi, K. Jinno, R. Eksteen, K. Hosoya, M. Araki, N. Tanaka, *J. Chromatogr. Sci.*, 27, 721-728 (1989).
 - ⁹ N. Tanaka, H. Kinoshita, M. Araki, T. Tsuda, *J. Chromatogr.*, 332, 57-69 (1985).
 - ¹⁰ S. Terabe, K. Otsuka, T. Ando, *Anal. Chem.*, 57, 834-841 (1985).
 - ¹¹ E. R. Barnhart, D. G. Patterson, N. Tanaka, M. Araki, *J. Chromatogr.*, 445, 145-154 (1988).
 - ¹² K. Kimata, K. Hosoya, T. Araki, N. Tanaka, E. R. Barnhart, L. R. Alexander, S. Sirimanne, P. C. McClure, J. Grainger, D. G. Patterson, Jr., *Anal. Chem.*, 65, 2502-2509 (1993).
 - ¹³ K. Kimata, K. Hosoya, N. Tanaka, T. Araki, D. G. Patterson, Jr., *J. Chromatogr.*, 595, 77-88 (1992).
 - ¹⁴ N. Tanaka, Y. Tokuda, K. Iwaguchi, M. Araki, *J. Chromatogr.*, 239, 761-772 (1982).
 - ¹⁵ N. Tanaka, T. Tanigawa, K. Kimata, K. Hosoya, T. Araki, *J. Chromatogr.*, 549, 29-41 (1991).
 - ¹⁶ N. Tanaka, K. Kimata, K. Hosoya, H. Miyanishi, T. Araki, *J. Chromatogr.*, 656, 265-287 (1993).

-
- ¹⁷ K. Kimata, T. Hirose, K. Moriuchi, K. Hosoya, T. Araki, N. Tanaka, *Anal. Chem.*, **67**, 2556-2561 (1995).
- ¹⁸ M. Turowski, T. Morimoto, K. Kimata, H. Monde, T. Ikegami, K. Hosoya, N. Tanaka, *J. Chromatogr. A*, **911**, 177-190 (2001).
- ¹⁹ M. Turowski, N. Yamakawa, J. Meller, K. Kimata, T. Ikegami, K. Hosoya, N. Tanaka, E. R. Thornton, *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 13836-13849 (2003).
- ²⁰ F. Svec, J. M. J. Fréchet, *Anal. Chem.*, **64**, 820-822 (1992).
- ²¹ A. J. Alpert, *J. Chromatogr. A*, **499**, 177-196 (1990).
- ²² T. Makino, M. Orfanopoulos, T. P. You, B. Wu, C. W. Mosher, H. S. Mosher, *J. Org. Chem.*, **50**, 5357-5360 (1985).
- ²³ K. Kimata, K. Hosoya, T. Araki, N. Tanaka, *Anal. Chem.*, **69**, 2610-2612 (1997).
- ²⁴ K. Kimata, M. Kobayashi, K. Hosoya, T. Araki, N. Tanaka, *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 759-762 (1996).
- ²⁵ K. Koduki, Unpublished results.
- ²⁶ J. J. Kirkland, F. A. Truszkowski, R. D. Ricker, *J. Chromatogr. A*, **965**, 25-34 (2002).
- ²⁷ J. E. MacNair, K. C. Lewis, J. W. Jorgenson, *Anal. Chem.*, **69**, 983-989 (1997).
- ²⁸ G. Desmet, D. Clicq, P. Gzil, *Anal. Chem.*, **77**, 4058-4070 (2005).
- ²⁹ T. Hara, H. Kobayashi, T. Ikegami, K. Nakanishi, N. Tanaka, *Anal. Chem.*, **78**, 7632-7642 (2006).
- ³⁰ M. Motokawa, H. Kobayashi, N. Ishizuka, H. Minakuchi, K. Nakanishi, H. Jinnai, K. Hosoya, T. Ikegami, N. Tanaka, *J. Chromatogr. A*, **961**, 53-63 (2002).
- ³¹ 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).
- ³² H. Minakuchi, K. Nakanishi, N. Soga, N. Ishizuka, N. Tanaka, *Anal. Chem.*, **68**, 3498-3501 (1996).
- ³³ K. Nakanishi, *J. Porous Mater.*, **4**, 67-112 (1997).
- ³⁴ N. Tanaka, K. Nakanishi, H. Minakuchi, N. Ishizuka, H. Kobayashi, *Anal. Chem.*, **73**, 420a-429a (2001).
- ³⁵ H. Minakuchi, K. Nakanishi, N. Soga, N. Ishizuka, N. Tanaka, *J. Chromatogr. A*, **762**, 135-146 (1997).
- ³⁶ H. Minakuchi, K. Nakanishi, Soga, N. Ishizuka, N. Tanaka, *J. Chromatogr. A*, **797**, 121-131 (1998).
- ³⁷ H. Minakuchi, Ishizuka, K. Nakanishi, N. Soga, N. Tanaka, *J. Chromatogr. A*, **828**, 83-90 (1998).
- ³⁸ N. Ishizuka, H. Minakuchi, K. Nakanishi, N. Soga, N. Tanaka, *J. High Resol. Chromatogr.*, **21**, 477-479 (1998).
- ³⁹ N. Ishizuka, H. Minakuchi, K. Nakanishi, N. Soga, H. Nagayama, K. Hosoya, N. Tanaka, *Anal. Chem.*, **72**, 1275-1280 (2000).
- ⁴⁰ Ishizuka, N.; Kobayashi, H.; Minakuchi, H.; Nakanishi, K.; Hirao, K.; Hosoya, K.; Ikegami, T.; Tanaka, N. *J. Chromatogr. A*, **960**, 85-96 (2002).
- ⁴¹ M. Motokawa, M. Ohira, H. Minakuchi, K. Nakanishi, N. Tanaka, *J. Sep. Sci.*, **29**, 2471-2477 (2006).
- ⁴² K. K. Unger, "Porous Silica", *Journal of Chromatography Library-vol. 16*, Elsevier, Amsterdam, 1979, page169.
- ⁴³ J. C. Giddings, *Dynamics of chromatography, Part 1, Principles and Theory*, Marcel Dekker, New York, 1965.
- ⁴⁴ P. A. Bristow, J. H. Knox, *Chromatographia*, **10** 279-289 (1977).

-
- ⁴⁵ T. Ikegami, E. Dicks, H. Kobayashi, H. Morisaka, D. Tokuda, K. Cabrera, K. Hosoya, N. Tanaka, *J. Sep. Sci.*, 27, 1292-1302 (2004).
- ⁴⁶ S. Miwa, Unpublished result.
- ⁴⁷ D. V. McCalley, *J. Chromatogr. A*, 1193, 85-91 (2008).
- ⁴⁸ V. V. Tolstikov, A. Lommen, K. Nakanishi, N. Tanaka, O. Fiehn, *Anal. Chem.*, 75, 6737-6740 (2003).
- ⁴⁹ S. Wienkoop, M. Glinski, N. Tanaka, V. Tolstikov, O. Fiehn, W. Weckwerth, *Rapid Commun. Mass Spectr.*, 18, 643-650 (2004).
- ⁵⁰ K. Nakanishi, N. Tanaka, *Acc. Chem. Res.*, 40, 863-873 (2007).
- ⁵¹ R. Swart, J. C. Kraak, H. Poppe, *J. Chromatogr. A*, 689, 177-187 (1995).
- ⁵² T. Ikegami, K. Horie, J. Jaafar, K. Hosoya, N. Tanaka, *J. Biochem. Biophys. Methods*, 70, 31-37 (2007).
- ⁵³ K. Horie, T. Ikegami, K. Hosoya, N. Saad, O. Fiehn, N. Tanaka, *J. Chromatogr. A*, 1164, 198-205 (2007).
- ⁵⁴ O. Núñez, K. Nakanishi, N. Tanaka, *J. Chromatogr. A*, 1191, 231-252 (2008).
- ⁵⁵ T. Ikegami, H. Fujita, K. Horie, K. Hosoya, N. Tanaka, *Anal. Bioanal. Chem.*, 386, 578-585 (2006).
- ⁵⁶ T. Ikegami, K. Horie, J. Jaafar, K. Hosoya, N. Tanaka, *J. Biochem. Biophys. Methods*, 70, 31-37 (2007).
- ⁵⁷ T. Ikegami, J. Ichimaru, W. Kajiwara, N. Nagasawa, K. Hosoya, N. Tanaka, *Anal. Sci.*, 23, 109-113 (2007).
- ⁵⁸ T. Ikegami, K. Horie, N. Saad, K. Hosoya, O. Fiehn, N. Tanaka, *Anal. Bioanal. Chem.*, 391, 2533-2542 (2008).
- ⁵⁹ N. Tanaka, H. Kimura, D. Tokuda, K. Hosoya, T. Ikegami, N. Ishizuka, H. Minakuchi, K. Nakanishi, Y. Shintani, M. Furuno, K. Cabrera, *Anal. Chem.* 76, 1273-1281 (2004).
- ⁶⁰ H. Kimura, T. Tanigawa, H. Morisaka, T. Ikegami, K. Hosoya, N. Ishizuka, H. Minakuchi, K. Nakanishi, M. Ueda, K. Cabrera, N. Tanaka, *J. Sep. Sci.*, 27, 897-904. (2004).
- ⁶¹ K. Horie, H. Kimura, T. Ikegami, A. Iwatsuka, N. Saad, O. Fiehn, N. Tanaka, *Anal. Chem.*, 79, 3764-3770 (2007).
- ⁶² T. Ikegami, T. Hara, H. Kimura, H. Kobayashi, K. Hosoya, K. Cabrera, N. Tanaka, *J. Chromatogr. A*, 1106, 112-117 (2006).
- ⁶³ T. Nhujak, Unpublished results.
- ⁶⁴ N. Tanaka, H. Goodell, B. L. Karger, *J. Chromatogr.*, 158, 233-248 (1978).
- ⁶⁵ G. Liu, N. M. Djordjevic, F. Erni, *J. Chromatogr.*, 592, 239-247 (1992).