

高速液体クロマトグラフィーにおける
高分離能モノリス型シリカカラムの開発と
その応用に関する研究

2014

堀江 勘太

本学位論文は、以下の原著主論文、および参考論文を基に作成されたものである。

主論文

1. K. Horie, Y. Sato, T. Kimura, T. Nakamura, Y. Ishihama, Y. Oda, T. Ikegami, N. Tanaka
Estimation and optimization of the peak capacity of one-dimensional gradient high performance liquid chromatography using a long monolithic silica capillary column
J. Chromatogr. A, 1228 (2012) 283
2. K. Horie, H. Kimura, T. Ikegami, A. Iwatsuka, N. Saad, O. Fiehn, N. Tanaka
Calculating optimal modulation periods to maximize the peak capacity in two-dimensional HPLC
Anal. Chem., 79 (2007) 3764
3. T. Ikegami, K. Horie, N. Saad, K. Hosoya, O. Fiehn, N. Tanaka
Highly efficient analysis of underivatized carbohydrates using monolithic-silica-based capillary hydrophilic interaction (HILIC) HPLC
Anal. Bioanal. Chem., 391 (2008) 2533
4. K. Horie, T. Ikegami, K. Hosoya, N. Saad, O. Fiehn, N. Tanaka
Highly efficient monolithic silica capillary columns modified with poly(acrylic acid) for hydrophilic interaction chromatography
J. Chromatogr. A, 1164 (2007) 198
5. K. Horie, T. Kamakura, T. Ikegami, M. Wakabayashi, T. Kato, N. Tanaka, Y. Ishihama
Hydrophilic interaction chromatography using a meter-scale monolithic silica capillary column for proteomics LC-MS
Anal. Chem., 86 (2014) 3817

参考論文

1. K. Miyamoto, T. Hara, H. Kobayashi, H. Morisaka, D. Tokuda, K. Horie, K. Koduki, S. Makino, O. Nunez, C. Yang, T. Kawabe, T. Ikegami, H. Takubo, Y. Ishihama, N. Tanaka
High-efficiency liquid chromatographic separation utilizing long monolithic silica capillary columns
Anal. Chem., 80 (2008) 8741
2. T. Ikegami, K. Horie, J. Jaafar, K. Hosoya, N. Tanaka
Preparation of highly efficient monolithic silica capillary columns for the separations in weak cation-exchange and HILIC modes
J. Biochem. Biophys. Methods, 70 (2007) 31

目次

略語表	1
緒言	3
結果と考察	9
第1章 モノリス型シリカカラムを用いた HPLC システムの高性能化	9
第1節 粒子充填型カラムとの性能比較と特性評価	9
第2節 メートル長モノリス型シリカカラムを用いた複雑成分の精密分離	14
第3節 1D-LC における条件最適化法の検討	18
第1項 グラジエント溶出におけるカラム長の最適化	18
第2項 グラジエント溶出におけるグラジエント時間の最適化	23
第3項 1D-LC 条件最適化法の検証	28
第4節 2D-LC における条件最適化に関する検討	31
第5節 総括	39
第2章 HILIC および IEC 用モノリス型シリカカラムを用いた HPLC システムの高性能化	40
第1節 ポリアクリルアミド修飾モノリス型シリカキャピラリーカラムの開発と応用	43
第1項 HILIC モードにおける保持特性	44
第2項 van Deemter plot および kinetics plot による評価	48
第3項 保持に対する温度の効果	52
第4項 糖分分離への応用	56
第2節 ポリアクリル酸修飾モノリス型シリカキャピラリーカラムの開発と応用	62
第1項 分離効率の評価とタンパク質分離への適用	62
第2項 HILIC 用カラムとしての検討	69

第3項	van Deemter plot および kinetics plot による評価	72
第4項	保持に対する温度効果	74
第5項	保持に対する移動相 pH の効果	77
第6項	重合修飾法における重合条件の変更による固定相量の調節	84
第7項	ペプチド分離への応用	89
第3節	ウレイドプロピル修飾モノリス型シリカキャピラリーカラムの開発と 応用	93
第1項	van Deemter plot および kinetics plot による評価とメートル長 HILIC カラムによる高性能分離	94
第2項	ウレイドプロピル修飾モノリス型シリカキャピラリーカラムを用 いたプロテオミクス試料の分離	97
第3項	ショットガンプロテオミクス試料を用いた保持特性の評価	103
第4節	総括	111
結論		112
謝辞		114
実験の部		116
参考文献		129

略語表

- α : 分離係数 (selectivity factor)
- APTES : アミノプロピルトリエトキシシラン (aminopropyltriethoxysilane)
- CID : 衝突誘起解離 (collision-induced dissociation)
- d_p : 粒子径 (particle diameter)
- E : セパレーションインピーダンス (separation impedance)
- e_M : 分画効率 (modulation efficiency)
- ERLIC : 静電反発親水性相互作用液体クロマトグラフィー (electrostatic repulsion-hydrophilic interaction chromatography)
- ESI : エレクトロスプレーイオン化 (electro-spray Ionization)
- FWHM : 全半値幅 (full width at half maximum)
- H : 理論段高 (theoretical plate height)
- HIC : 疎水性相互作用クロマトグラフィー (hydrophobic interaction chromatography)
- HILIC : 親水性相互作用液体クロマトグラフィー (hydrophilic interaction liquid chromatography)
- HPLC : 高速液体クロマトグラフィー (high performance liquid chromatography)
- I.D. : 内径 (inner diameter)
- IEC : イオン交換クロマトグラフィー (ion-exchange chromatography)
- k : 保持係数 (retention factor)
- K : 透過率 (permeability)
- L : カラム長 (column length)
- LOD : 検出限界 (limit of detection)
- MATES : [3-(メタクリロイルアミノ)プロピル]トリエトキシシラン
([3-(methacryoylamino)propyl]triethoxysilane)
- MS : 質量分析計 (mass spectrometry)
- N : 理論段数 (theoretical plate number)
- NPLC : 順相液体クロマトグラフィー (normal phase liquid chromatography)
- PC : ピークキャパシティー (peak capacity)
- P_M : 分画時間 (modulation period)
- P_{\max} : 圧力上限 (maximum pressure)
- RPLC : 逆相液体クロマトグラフィー (reversed phase liquid chromatography)

R_s : 分離度 (resolution factor)

SCX : 強カチオン交換クロマトグラフィー (strong cation exchange chromatography)

SDS : ドデシル硫酸ナトリウム (sodium dodecyl sulfate)

SEC : サイズ排除クロマトグラフィー (size exclusion chromatography)

SIM : 選択イオンモニタリング法 (selected ion monitoring)

SRM : 選択反応モニタリング法 (selected reaction monitoring)

S/N : シグナル-ノイズ比 (signal to noise ratio)

t_g : グラジエント時間 (gradient time)

t_0 : ホールドアップ時間 (hold-up time)

u : 線速度 (linear velocity)

UHPLC : 超高压液体クロマトグラフィー (ultra high pressure liquid chromatography)

UPTMS : ウレイドプロピルトリメトキシシラン (ureidopropyltrimethoxysilane)

UV : 紫外分光光度計 (ultraviolet spectrophotometer)

WCX : 弱カチオン交換クロマトグラフィー (weak cation exchange chromatography)

1D-LC : 一次元液体クロマトグラフィー (one-dimensional liquid chromatography)

2D-LC : 二次元液体クロマトグラフィー (two-dimensional liquid chromatography)

緒言

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は、精密分離分析の分野において必要不可欠な手法である。「全て」を分離する HPLC システムの獲得はクロマトグラファー、ひいては科学者の夢であり、それは科学技術の進展やそれに基づく人々の健康と幸福の実現に貢献する。事実、創薬研究に従事する私自身、様々な場面で分離困難な事例に遭遇し、創薬研究の遅滞が危惧された経験を少なからず有しており、高分離能の重要性を常々感じている。そこで、本博士論文研究を開始するにあたり、HPLC における高分離能の実現を主題とし、新規カラム開発を中心に研究を行うこととした。

HPLC は様々な分離モードを有するが、現在 HPLC 分析の大半は逆相液体クロマトグラフィー (RPLC) モードによって行われ、化学修飾を行ったシリカゲルや有機ポリマーゲルなどの粒子充填型カラムが一般的に使用されている。シリカゲル修飾法としては、表面にオクタデシル基 (C18) のような疎水性基を化学結合させるシリル化法が現在広く用いられている。C18 修飾シリカゲル充填剤は、有機溶媒に対して膨潤および収縮が少なく、様々な有機溶媒が使用可能である。また機械的強度が強く優れた耐圧性を有し、粒子の微粒子化により、ある理論段数の領域内ではカラム性能 (単位時間あたりの理論段数) が向上するという利点を有する。しかし、粒子の微小化は、カラム負荷圧の増大を招く結果となり、汎用の HPLC システム (以降、圧力上限 (P_{\max}) = 20 MPa 以下で操作する HPLC システムと定義) を用いた分離性能の向上には限界があった。近年、100 MPa を超える高圧にも耐えうる特殊な装置が開発され、粒子径 (d_p) = 2 μm 以下の粒子充填型カラムを用いた超高压液体クロマトグラフィー (UHPLC) が実用化された[1]-[4]。UHPLC においては、 $d_p = 1.5 \mu\text{m}$ の粒子を充填したキャピラリーカラムを使用することによりホールドアップ時間 (t_0) = 140 s において理論段数 (N) = 160,000 を発現させた報告がある[4]。2004 年以降、多くのメーカーから $d_p = 2 \mu\text{m}$ 以下の粒子充填型カラムと高耐圧の UHPLC 装置が販売され、実用化されている。

クロマトグラフィーの高性能化を達成するもう一つの手段として、流路と骨格が一体となったネットワーク構造を有するモノリス型カラムの使用が報告されている。モノリス型カラムは細い骨格による高分離と太い流路に基づく低いカラム負荷圧での送液を同時に実現することが可能であり、一定の圧力制限下

における高性能化において有利である。またモノリス型カラムには、粒子充填型カラムの製造に必須である「充填」のプロセスが不要であり、本プロセスにおける充填状態の不均一性に由来する性能低下なしに、分析カラムとして使用できる利点を有する。中西らは、水溶性高分子共存下において有機アルコキシシランの加水分解・重合反応を行うことにより、流路と骨格とが一体となったモノリス型シリカの調製に成功した[5]-[8]。Figure 1にモノリス型シリカの走査型電子顕微鏡による写真を示す。モノリス型シリカの他にスチレン - ジビニルベンゼン系やエポキシ系のモノリス型有機ポリマーも報告されている[9]-[14]。

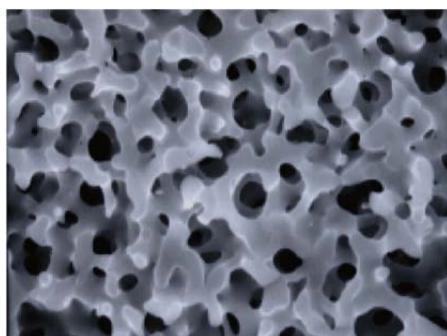


Figure 1. 3D-Network Structure of Monolithic Silica [18]

また、モノリス型シリカやモノリス型有機ポリマーをフューズドシリカキャピラリー中で調製した例も報告されている[15]-[23]。キャピラリー中での調製には、試験管中での調製において湾曲により調製が困難であった長いカラムを調製できることや、Chromolithに代表される一般的なモノリス型カラムのように、モノリスロッドの外側にPEEK樹脂などのカラム材を加工することなくHPLC用カラムとして使用可能であることなどの利点がある。特に、モノリス型シリカキャピラリーカラムは高い透過性を有することから、汎用HPLC条件下においてもメートル長カラムを使用することができ、数十万段を越す高い N を発現させることが可能である。また、キャピラリーカラムを用いたnanoLCシステムはサンプル量も極微量であるため、貴重な微量生体試料の分析に適している上、移動相流量も極微量であり、エレクトロスプレーイオン化(ESI)を介した質量分析(MS)とオンライン接続したnanoLC-ESI-MSシステムにおいて高感度化が期待できる。しかし、モノリス型シリカキャピラリーカラムは、カラム内に存在するシリカ量が少ないために、おのずと修飾できる固定相の量が少なくなり、

結果として保持係数 (k) 並びに試料のローディングキャパシティーが粒子充填型カラムと比較して小さいという欠点も有している[21]。

宮本らは、100 μm 内径 (I.D.), 長さ 0.9–4.4 m の長い C18 修飾モノリス型シリカキャピラリーカラムを、汎用 HPLC 条件下で用いることにより、 $t_0 = 5 - 40$ min において $N = 100,000 - 500,000$ を得ることが可能であり、更にはそれらの長いカラムを複数連結して長さ 11.3–12.4 m のカラムとすることにより、多環芳香族化合物群に対して $N = 1,000,000$ ($t_0 = 150$ min, $k = 2.4$) の発現が可能であることを報告した[24]。また、岩崎らは、当メートル長モノリス型シリカキャピラリーカラムを用いた応用検討として、100 μm I.D., 長さ 3.5 m の C18 修飾モノリス型シリカキャピラリーカラムを用いた nanoLC-ESI-MS システムによる *Escherichia coli* プロテオーム解析を実施し、41 h の長時間グラジエント溶出により、22,196 個のトリプシン消化ペプチドと 2,602 個のタンパク質の同定に成功した[25]。本報告は、メートル長オーダーのモノリス型シリカキャピラリーカラムによる高性能分離の有用性を示すと共に、長いカラムの活用による試料ローディングキャパシティーの向上というモノリス型シリカキャピラリーカラムの欠点の解消を示唆するものであり、この報告に端を発するメートル長モノリス型シリカキャピラリーカラムを用いた nanoLC を ESI-MS のフロントエンドに置いた「ワンショットプロテオミクス」アプローチは、現在世界に広く認知されている状況にある[25][26]。しかし、当手法の更なる汎用化に向けて、メートル長モノリス型シリカキャピラリーカラムの製造困難さの解消、並びに長時間にわたるグラジエント分析条件の最適化等、解決すべき課題は依然多い。

前述の通り、モノリス型シリカキャピラリーカラムは、カラム内のシリカ表面積が粒子充填型と比較して小さいことから、保持係数が小さいという欠点を有する。そこで、予め二重結合を有するアンカー官能基を表面修飾したモノリス型シリカキャピラリーカラム中でメタクリル酸ステアリル等に代表される疎水性モノマーを重合修飾することにより、固定相量を増大させる手法が報告されている[27]。この手法により疎水性化合物に対して従来の C18 修飾モノリス型シリカキャピラリーカラムの 2 倍以上の保持能力を発現することが可能となる。しかし、これらのカラムを用いたとしても、保持を発現できるのは疎水性化合物に限られており、高極性化合物の分離は依然困難な場面が多い。生化学や薬学分野において重要なタンパク質並びにペプチド、代謝物、生理活性物質など

には高極性化合物が多く、RPLC では保持が小さく、分離が困難な例が多数存在する。このような高極性成分の分離に用いられている分離モードがイオン交換クロマトグラフィー (IEC) 並びに順相液体クロマトグラフィー (NPLC) のような RPLC とは異なる分離モードである。親水性試料を分離するための手段として近年注目を集めている分離モードに親水性相互作用液体クロマトグラフィー (HILIC) がある[28]-[31]。HILIC は NPLC の一種であるが、移動相に水-有機溶媒の混合溶媒を用いるという点で一般の NPLC と異なる。このモードを用いることにより、NPLC 条件 (非水条件) では溶解および溶出しない糖類やペプチド、薬物等の高極性化合物の分離が可能であり、分離溶出した試料成分を直接 ESI-MS に導入できる利点を有する[32]-[37]。ポストゲノム時代の現在、プロテオミクス並びにメタボロミクス等の新たな挑戦が進行中である。それに伴い、分離対象成分は、疎水性物質から高極性物質、イオン性物質など多岐にわたり、その数も数千から数万という膨大な数になっている。生体からの多成分試料を一斉に解析することにより知見を得ようとする大規模解析を実施するためには、その定性および定量手段である MS に導入する前に、できるだけ多くの成分を分離しておく必要がある。しかし、数千ピーク以上の分離は、従来の単一の粒子充填型カラムを用いた汎用 HPLC では困難であり、前述のメートル長モノリス型シリカキャピラリーカラムを用いた次元液体クロマトグラフィー (1D-LC) の活用や、一般に用いられる RPLC に対して直交性を有する IEC および HILIC のような分離モードの相補的な活用、更にはそれらを組み合わせた二次元液体クロマトグラフィー (2D-LC) による高いピークキャパシティー (PC) の実現が求められる。PC とは、一分析で分離度 (R_s) = 1 を達成しながら収容できる最大のピーク数であり、粒子充填型カラムを用いた汎用 HPLC の PC は 通常 100 - 200 /h 程度で、UHPLC においては PC = 300 /h を得ることが可能であることが報告されている[38][39]。一次元目から溶出した全ての分画を二次元目で分析する完全 2D-LC における全体の PC は各次元の PC の積で表されるため、理想的な 2D-LC を組み立てることができればその値は非常に大きな値となる。Jorgenson らが先駆実施した IEC - RPLC 系の完全 2D-LC では、二次元目の RPLC において複数のカラムを用いる複雑なシステムにおいて PC = 512 /100 min を実現している[40]。また、Yates らは MS のイオン化部である ESI のスプレーチップ内に C18 修飾シリカ粒子とスルホプロピル修飾シリカ粒子を積層充填した二相カラムを

作製し、IEC-RPLC系の2D-LCシステムを開発した[41]。彼らは細胞から抽出された多くのタンパク質を、分析システムに導入する前に一斉消化し、この2D-LC-ESI-MSシステムにより一斉分析後、データベース検索によりペプチドおよびタンパク質を同定するショットガンプロテオミクスを確立し、それは現在のプロテオミクスにおける主要ツールとなっている[42]。一次元目から溶出する分画中に、前分画の二次元目分離を完結させる「完全2D-LC」においては、二次元目において高速分離が求められる。汎用的な5 μm 粒子充填型カラムは高速領域において固定相中での溶質拡散の遅れが顕著に現れるため、性能低下が大きい。また、高流速下で性能低下が小さい $d_p = 2 \mu\text{m}$ 以下の粒子充填型カラムの使用は、同時に背圧の大幅な増加を招く。一方、モノリス型シリカカラムは、大きな流路に基づく高い透過性と、小さな骨格に基づく高流速下での高性能を有しているため、完全2D-LCにおける二次元目のカラムとして適していると考えられている[43]-[47]。田中らは二次元目にモノリス型シリカカラムを用いた完全2D-LCシステムにおいて、炭化水素系の環境汚染物質群に対して $PC = 1000/30 \text{ min}$ の高速かつ高性能分離を達成している[43]。なお、多次元クロマトグラフィーを実施するにあたり、各次元の分離選択性の交差性（以降、直交性と称する）は極めて重要なファクターである[48][49]。現在最も広く用いられているIEC-RPLCの組み合わせは、直交性の面でその他の分離モード（HILIC等）と比較して劣る上、一次元目のIEC分離性能の低さに起因して2D-LC全体の実際の PC は理論計算値より大きく劣る値となることが報告されている[49]-[52]。また、完全2D-LCを実施する際に課題となるアンダーサンプリング現象（一つのピークから一回又は複数回のフラクションを取るにより生じる見かけ上のバンド広がり）を加味した実際に得られる PC に基づく条件設定の最適化方法は、未だ確立されておらず、最適条件で実験がなされていないことは明らかであった。

以上のような背景に基づき、本研究で行った検討を以下に示す。

1. C18修飾モノリス型シリカキャピラリーカラムに対して、分離特性の評価を実施することにより、メートル長ロングカラムフォーマットにおける最適使用条件のシミュレーションを行った。その後、算出した最適条件を含

むいくつかの分離条件におけるペプチドおよびタンパク質の同定数を考察することにより、本最適化法の検証を行った。

2. 二次元目にモノリス型シリカカラムを用いた完全 2D-LC に関して、様々な分画条件のシミュレーションを実施し、最大の *PC* を得るための条件最適化法の検討を行うことにより、HPLC の高性能化に向けたアプローチについて考察を行った。
3. 様々な性質（疎水性、親水性およびイオン性）を有する物質に対して高選択性および高分離能を有するモノリス型シリカキャピラリーカラムの開発を行った。現在盛んに開発、市販されているモノリス型シリカカラムの大半が RPLC 用であり、親水性、イオン性物質の分離が課題となっていることから、特に HILIC および IEC 用の新規固定相をモノリス型シリカキャピラリー内に調製し、それらのカラムの特性評価を行った。
4. 最後に、上記新規 HILIC 用モノリス型シリカキャピラリーカラムを nanoLC-MS システムに組み込み、メタボローム解析並びにプロテオーム解析への応用を検討し、その有用性を検証した。

結果と考察

第1章 モノリス型シリカカラムを用いた HPLC システムの高性能化

第1節 粒子充填型カラムとの性能比較と特性評価

緒言でも述べた通り、モノリス型シリカキャピラリーカラムは高流速下でもカラム効率の低下が緩やかであり、その高い透過性を利用してカラム長を大幅に長くすることにより、高理論段数が期待できる。では、一般に広く用いられている粒子充填型カラムと比較して、どのくらい性能が異なるのだろうか。また、どのような分離条件下でその真価を発揮できるのだろうか。モノリス型シリカキャピラリーカラムの特性を評価するために、以下の検討をおこなった。

最初に、80% CH₃CN 条件下におけるアルキルベンゼン分析時の線速度 (u) に対して、その理論段高 (H) をプロットした (van Deemter plot, Figure 1-1-1)。カラムには $d_p = 1 - 5 \mu\text{m}$ の粒子充填型カラムおよび C18 修飾モノリス型シリカキャピラリーカラム (MS-100H-C18) を用いた。粒子充填型カラムに関しては、式(1-1)および式(1-2)に示す Knox 式を用いてプロットした[53]。また、MS-100H-C18 に関しては、実験により得られたデータを、非線形最小二乗法を用いて Knox 式に回帰させることにより、式(1-3)を得た。

$$H = d_p h = d_p \left(0.65\nu^{1/3} + \frac{2}{\nu} + 0.08\nu \right) \quad (1-1)$$

$$\nu = \frac{d_p u}{D_m} \quad (1-2)$$

h : 換算理論段高, ν : 換算線速度, D_m : 拡散係数

$$H = 3.54u^{1/3} + \frac{3.34}{u} + 1.06u \quad (1-3)$$

次に、カラムの透過率(K)について検討した。 K は Kozeny-Carman 式(式(1-4))で表される[54]。Table 1-1-1 に $d_p = 1 - 5 \mu\text{m}$ の粒子充填型カラムおよび MS-100H-C18 に対して K を算出した結果を示す。

$$K = \frac{F\eta L}{\pi r^2 \Delta P} = \frac{u\eta L \varepsilon}{\Delta P} \quad (1-4)$$

K : 透過率, ΔP : カラム負荷圧, F : 移動相流速, η : 移動相の粘度, L : カラム長, r : カラム半径, u : 移動相線速度, ε : カラム空隙率 (ポロシティー)

今回調製した MS-100H-C18 は透過率を重視した設計となっており, $d_p = 5 \mu\text{m}$ の粒子充填型カラムとほぼ同等の $H-u$ 性能を示す一方, K は $5 \mu\text{m}$ 粒子充填型カラムと比較して 3 倍以上高い性能を示した。前者の $H-u$ 性能に関しては, $d_p = 3 \mu\text{m}$ 以下の微小粒子の使用によってカラム効率を向上させることができるが, 同時にカラム圧の高圧化が問題となる。したがって, 使用するカラム種の選択は, 試験の目的並びに環境に応じて最適化される必要がある。

また, van Deemter plot に変わる別のカラム性能評価法として, plate time を用いる方法が提案されている[55]。Plate time とは(1-5)式で表され, 1 理論段を与えるのに必要な時間を示すものであり, 分離性能と分析時間の両方を考慮したものである。

$$\text{Plate time (time equivalent to a theoretical plate; TETP)} = \frac{t_0}{N} = \frac{H}{u} \quad (1-5)$$

Poppe は横軸に $\log N$, 縦軸に $\log (t_0/N)$ のプロットをとり, 一定圧力条件下において, d_p の異なるカラムの性能を一斉比較した[55]。また, Desmet らは Poppe の手法を拡張し, kinetics plot (横軸に $\log N$, 縦軸に $\log (t_0/N^2)$ をプロット) を考案した[56]。Kinetics plot は, 一定圧力条件下における単位時間当たりのカラム性能の限界を簡便に示すことができることから, 異なるカラム間における限界性能の比較の場で頻繁に活用されている[21][24]。粒子充填型カラム ($d_p = 1 - 5 \mu\text{m}$) と MS-100H-C18 について, 80% CH_3CN 条件下におけるアルキルベンゼン

を溶質とした時の kinetics plot を Figure 1-1-2(A)および Figure 1-1-2(B)に示す。なお、汎用 HPLC 条件および UHPLC 条件を考慮し、それぞれ $P_{\max} = 20 \text{ MPa}$ および 100 MPa として計算を行った。図中の点線は特定の理論段数を発現するために必要な t_0 を示す。MS-100H-C18 は $P_{\max} = 20 \text{ MPa}$ の条件下において $\log N = 4.6 - 6$ の領域でどの粒子充填型カラムよりも高性能を発揮する。更には $P_{\max} = 100 \text{ MPa}$ の条件下において $\log N = 5.3$ 以上の領域で、どの粒子充填型カラムよりも優位な性能を示しており、粒子充填型カラムでは達成し得ない高理論段数を発現することが可能である。また、これらの結果は、今回調製した MS-100H-C18 が $t_0 = 240 \text{ s}$ の汎用的な分析時間の下で $N = 100,000$ を発現し、 $t_0 = 3,000 \text{ s}$ の長時間分析条件下で $N = 500,000$ の高理論段数を汎用 HPLC 条件下で発現可能であることを意味する。また、高耐圧 HPLC 装置を使用することにより、 $N = 1,000,000$ 以上の超高理論段数の発現が可能であり、モノリス型シリカカラムの高い透過性を利用したロングカラムの有用性が示唆された。

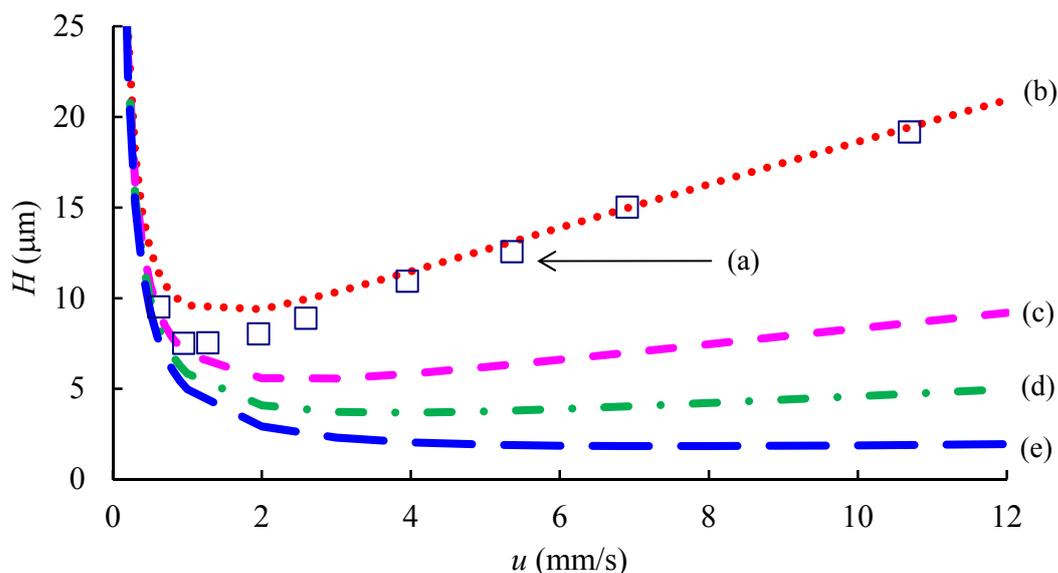


Figure 1-1-1. van Deemter Plots for Various Columns

(a) Square plot: MS-100H-C18, (b) dotted line: 5 μm particle-packed column, (c) dashed line: 3 μm particle-packed column, (d) dot-dash line: 2 μm particle-packed column, (e) long dashed line: 1 μm particle-packed column. The diffusion coefficient of a solute = $2.22 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ is assumed for the evaluation of particle-packed columns. The described van Deemter curves were calculated for the particulate columns based on Knox equation, whereas measured for MS-100H-C18.

Table 1-1-1. Permeability, K Values for Various Columns

Particle size (μm)	K (m^2)
5	2.5×10^{-14}
3	9.0×10^{-15}
2	4.0×10^{-15}
1	1.0×10^{-15}
Monolith (MS-100H-C18)	9.1×10^{-14}

Column porosities (ϵ) of 0.9 and 0.7 are assumed for monolith (MS-100H-C18) and particle packed columns, respectively.

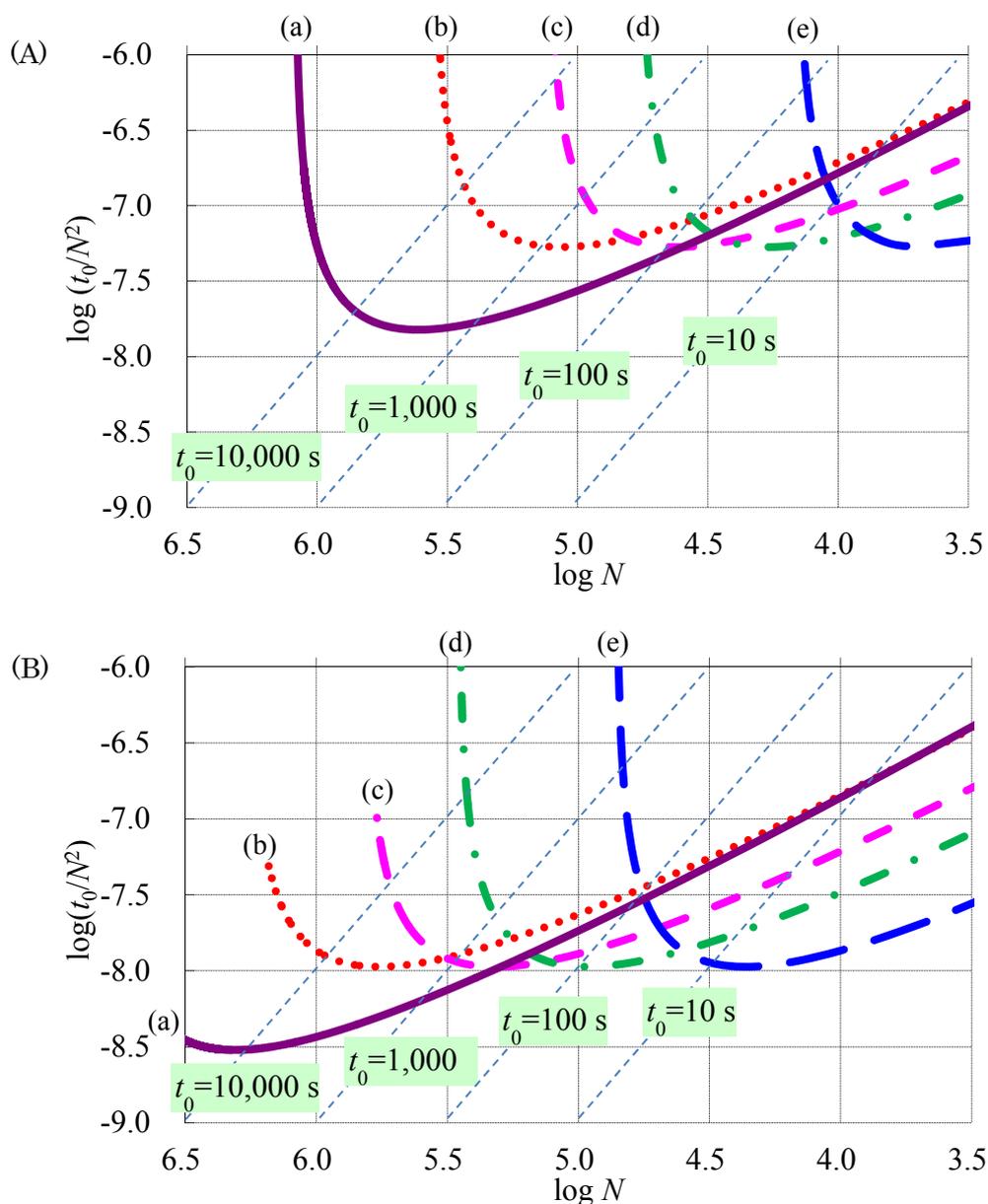


Figure 1-1-2. Kinetics Plots for Various Columns under Changed Maximum Pressure

(A) Assumed maximum pressure of 20 MPa, (B) assumed maximum pressure of 100 MPa, (a) solid line: MS-100H-C18, (b) dotted line: 5 μm particle-packed column, (c) dashed line: 3 μm particle-packed column, (d) dot-dash line: 2 μm particle-packed column, (e) long dashed line: 1 μm particle-packed column. The diffusion coefficient of a solute = $2.22 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$, the viscosity of mobile phase = $0.00045 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ ^a, and the flow resistance factor $\phi = 700$ were assumed for the evaluation of columns.

^a Viscosity of $\text{CH}_3\text{CN}/\text{water}$ (v/v 8/2) at 30 $^\circ\text{C}$

第2節 メートル長モノリス型シリカカラムを用いた複雑成分の精密分離

前節で述べたモノリス型シリカカラムの高い透過性に基づくロングカラムの有用性について検証するため、本節ではメートル長モノリス型シリカカラムを用いた2種類の複雑成分試料（ポリスチレンオリゴマーの幾何異性体試料およびタンパク質のトリプシン消化試料）の精密分離について検討した。

さて、クロマトグラフィーにおいて、二つのピークの分離を定量的に示す分離度 R_s は N 、分離係数 α および保持係数 k を用いて次式のように記述される。

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \times \frac{\alpha - 1}{\alpha} \times \frac{k}{k + 1} \quad (1-6)$$

幾何異性体や同位体化合物等の構造がよく似た化合物の α は一般に小さく、このような化合物の分離や、複雑試料中の成分をできるだけ多く分離する際には高い理論段数を必要とする。モノリス型シリカキャピラリーカラムのような数十万単位の理論段数を容易に発現するカラムを用いることによって、非常に小さな α の化合物対に対しても良好な分離が期待できる。

まず、ポリスチレンオリゴマーのアイソクラティック分離について検討を行った。カラムには、3本のメートル長モノリス型シリカカラムを連結した計11.3メートルのものを使用した。結果を Figure 1-2-1 に示す。複数のメートル長カラムを連結することにより $N = 1,000,000$ 以上の高理論段数の発現に成功した。3量体以上のポリスチレンオリゴマーはイソタクチック、シンジオタクチックの組み合わせにより多くのジアステレオマーを有する。例えば、短いカラムにおいては一本のブロードなピークとして共溶出する5量体中のラセミーラセミーメソ体 (rrm)、メソ-ラセミ-ラセミ体 (mrr)、ラセミ-メソ-ラセミ体 (rmr) (Figure 1-2-1 中の 13, 14, 15 ピーク) に対して、それぞれ完全分離を達成した。このような分離例は、ロングカラムフォーマットが高圧化のために制限される粒子充填型カラムでは実現困難であり、モノリス型シリカキャピラリーカラムの有用性を示すものである。

次に、汎用的長さ (28.4 cm) およびメートル長 (3 m) の二本の MS-100H-C18 でタンパク質 (ウシ血清アルブミン (BSA)) のトリプシン消化ペプチドの分離比較を行った。結果を Figure 1-2-2(a) および Figure 1-2-2(b) に示す。通常、逆相モ

ードでペプチドを分離する際にはグラジエント溶出が用いられる。今回は $t_g/t_0 = 10$ として分離比較を行ったところ、長さ約 28.4 cm の汎用的長さカラムと比較して、明らかに良好な分離 ($PC = 380 / 215 \text{ min}$) が達成された。LC-MS プロテオーム解析システムでは、できるだけ多くのペプチドを高精度に分離し、同定できるシステムが求められている。LC で分離された成分は MS イオン源でイオン化されるが、多くの試料が共溶出するとイオン化抑制が生じ、試料の検出感を著しく妨げる場合がある[57]。したがって、複雑成分試料の MS 分析における HPLC 分離性能は非常に重要なファクターであり、本カラムを組み込んだ 1D-nanoLC-ESI-MS システムは複雑成分を一斉に分離同定する大規模解析分野での活躍が期待される。

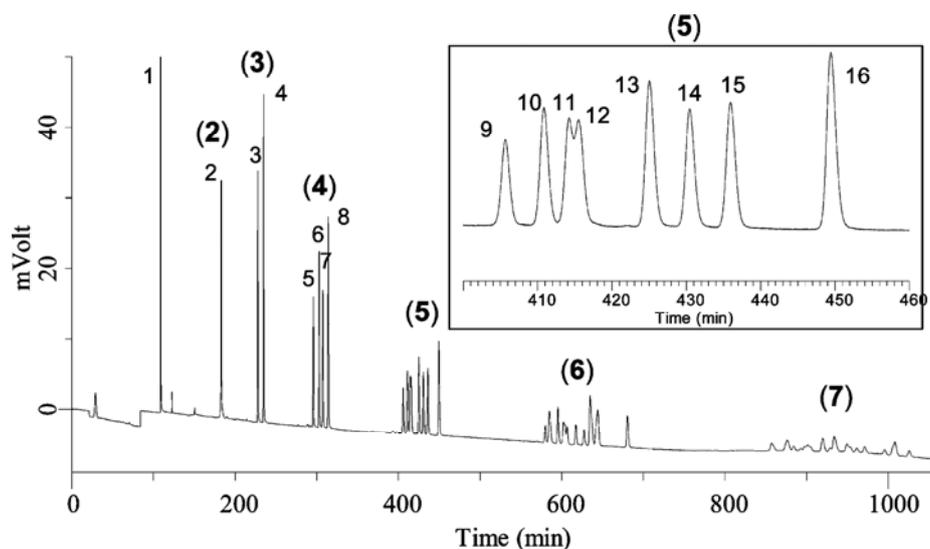


Figure 1-2-1. Separation of Styrene Oligomers (Molecular Weight (*MW*) Standard for *MW* = 580)

The numbers in parentheses indicate the number of styrene units in the oligomer. Column: MS-100H-C18 (three connected columns), total length: 1130 cm × 100 μm I.D., mobile phase: CH₃CN/water (v/v 95/5), Δ*P* = 39.5 MPa, *u* = 1.73 mm/s, detection: 210 nm, temperature: 30 °C, injection volume: 5 μL split injection. The inset is a magnification of the chromatogram for the pentamers.

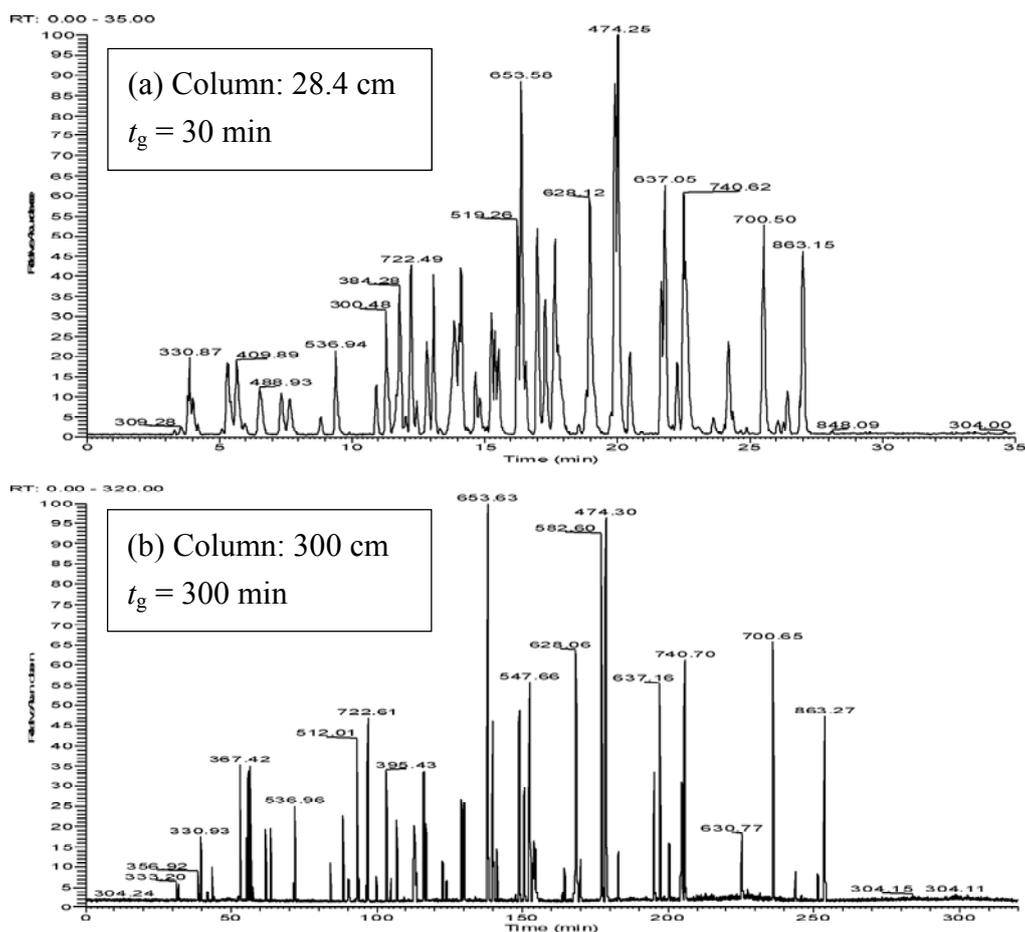


Figure 1-2-2. NanoLC-ESI-MS Base Peak Chromatogram of a BSA Tryptic Digest

Column: MS-100H-C18, (a) 28.4 cm \times 100 μ m I.D., and (b) 300 cm \times 100 μ m I.D., detection: 2.0 kV positive ESI - ion-trap mass spectrometer (LTQ). The mobile phases consisted of 0.1% HCOOH in water and 0.1% HCOOH in CH₃CN. Linear gradient programs of 5% to 40% CH₃CN in 30 min for the short column and in 300 min for the long column were employed. A BSA tryptic digest sample dissolved in water (100 nL, 1 nmol/200 μ L) was injected at the start of gradient with a flow rate 1.2 μ L/min for the 28.4 cm column and 0.67 μ L/min for the 300 cm column.

第3節 1D-LCにおける条件最適化法の検討

前述の通り、モノリス型シリカキャピラリーカラムは、その高い透過性を利用して、長いメートル長カラムとして用いることにより、粒子充填型カラムでは達成し得ない高分離能分析を行うことが可能である。特に、数千から数万単位の複雑な混合試料の分離を要するプロテオーム解析において、本 1D-LC システムを用い、試料前分画を行わずに解析をする「ワンショットプロテオミクス」手法が注目を集めている。本法は、従来法であるオフライン型の 2D-LC（複数のフラクション前処理を実施後に RPLC 分析を行う手法）と比較して、分析に要する総時間、並びに分析信頼性（定性および定量）の観点で優位である[25]。しかし、一回の HPLC 分析におけるグラジエント溶出に要する最適な t_g は数十時間となることが、HPLC 条件の最適化を目的とした繰り返し実験より報告されており[25]、それぞれ異なる保有システム (L , P_{\max}) における分析条件最適化工程の簡便化が、本手法の汎用化に向けた課題となっている。そこで、HPLC 性能を評価するためのパラメーターとして広く知られる PC を指標とすることにより、メートル長モノリス型シリカカラムによるワンショットプロテオミクスにおける HPLC 条件（グラジエント時間： t_g 、カラム長： L ）の最適化を行うこととした。

第1項 グラジエント溶出におけるカラム長の最適化

Neue らは、Snyder らによって確立された HPLC グラジエント溶出法の理論 [58][59] および一般 PC の理論式を拡張することにより、一定時間のグラジエント溶出における PC に関して、以下の理論式を確立した。

$$PC = 1 + \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \frac{B \cdot \Delta c}{B \cdot \Delta c \cdot \frac{t_0}{t_g} + 1} \quad (1-7)$$

B : アイソクラティックパラメーター ($\log k$ と移動相組成との間にある関係、つまり傾き $-\log k / \Delta c$)、 Δc : グラジエント開始時と終了時の移動相組成の変化

また、本式に対して、 t_g に加えてもう一つの最適化対象ファクターである L を導入することにより次式が得られる。

$$PC = 1 + \frac{\sqrt{L/H}}{4} \cdot \frac{B \cdot \Delta c}{B \cdot \Delta c \cdot \frac{(L/u)}{t_g} + 1} \quad (1-8)$$

ペプチドの RPLC 分析では、多くの溶質が 40% CH₃CN で溶出することから $\Delta c = 0.4$ と固定できる。上記式における B 値は、 $\ln k$ と移動相組成の関係を示すプロットの傾きより計算される可変値であるが、ペプチドやタンパク質のような巨大分子に対してこれらを実験的に求めることは困難であることから、今回は経験的に導かれた次式を用いて B 値を決定した[60]。

$$\ln B = 0.6915 \times \ln(MW) - 1.49 \quad (1-9)$$

MW : 測定対象の分子量

今回は、トリプシン消化ペプチドを用いたプロテオーム解析を対象にシミュレーションを実施することから、別の報告でも使用実績のある $B = 43.2$ ($MW = 2,000$) を採用した[61]-[63]。

Figure 1-3-1 に、 $d_p = 1 - 5 \mu\text{m}$ の粒子充填型カラムおよび MS-100H-C18 について、 $P_{\text{max}} = 20 \text{ MPa}$ の汎用 HPLC 条件下における L と PC の関係を、 $t_g = 40, 10, 1, 0.1 \text{ h}$ の 4 種の固定条件として算出した結果を示す。全ての t_g 条件およびカラム種において、至適な L 値で最大の PC が得られるベル型のグラフが得られた。例えば、20 MPa の圧力条件下で MS-100H-C18 を用いて $t_g = 40 \text{ h}$ のグラジエント溶出を実施する際、最適な L は 2-3 m と見積もられる。なお、5 μm の粒子充填型カラムの場合、40 h グラジエント溶出の際は 1-2 m のカラムを用いることにより、最大の PC を得ることができると想定されるが、 $d_p = 5 \mu\text{m}$ 以下の粒子充填型カラムのメートル長オーダーでの使用は現存のクロマトグラフの仕様上、現実的ではない。一方、0.1 h の短いグラジエント溶出を行う際は、 $d_p = 2 \mu\text{m}$ の粒子充填型カラムを用いることにより最大の PC が得られ、その L は 0.1 m 以下

の短いカラムの使用を推奨する結果であった。以上より、最大の PC を得るためには、

- ①長いカラムの使用
- ②緩やかなグラジエント溶出

の両条件を必要とすることが示唆された。また、本 PC シミュレーション法を用いることにより、最大の PC を与えるカラム種（モノリス型シリカカラム、または粒子充填型カラムの最適粒子径）、最適な L および最適 t_g を見積もることが可能であった。

次に Figure 1-3-2 に $P_{\max} = 100 \text{ MPa}$ の UHPLC システムを使用した場合のシミュレーション結果を示す。汎用 HPLC 条件下と比較して全体的に PC の増加が認められ、3 m 以上の MS-100H-C18 に対して $t_g = 10 \text{ h}$ 以上の長いグラジエント分析を行った場合にどの粒子充填型カラムと比較しても優位な分離性能（高 PC ）が得られることが予測された。ただし、 $t_g = 1 \text{ h}$ の比較的早いグラジエント溶出条件下における MS-100H-C18 の最適 PC は、 $d_p = 2 \mu\text{m}$ 以下の粒子充填型カラムを用いた場合の最適 PC と比較して大差が無く、 $t_g = 0.1 \text{ h}$ の急こう配グラジエント溶出条件下では $d_p = 1 \mu\text{m}$ の超微小粒子充填型カラムの最適 PC の方が抜群に優位な性能となる結果を得た。本結果は、これまで述べてきた「モノリス型シリカカラムは長いカラムフォーマットかつ長時間分析条件下で性能優位である」旨の特徴を、更に強調するものであった。

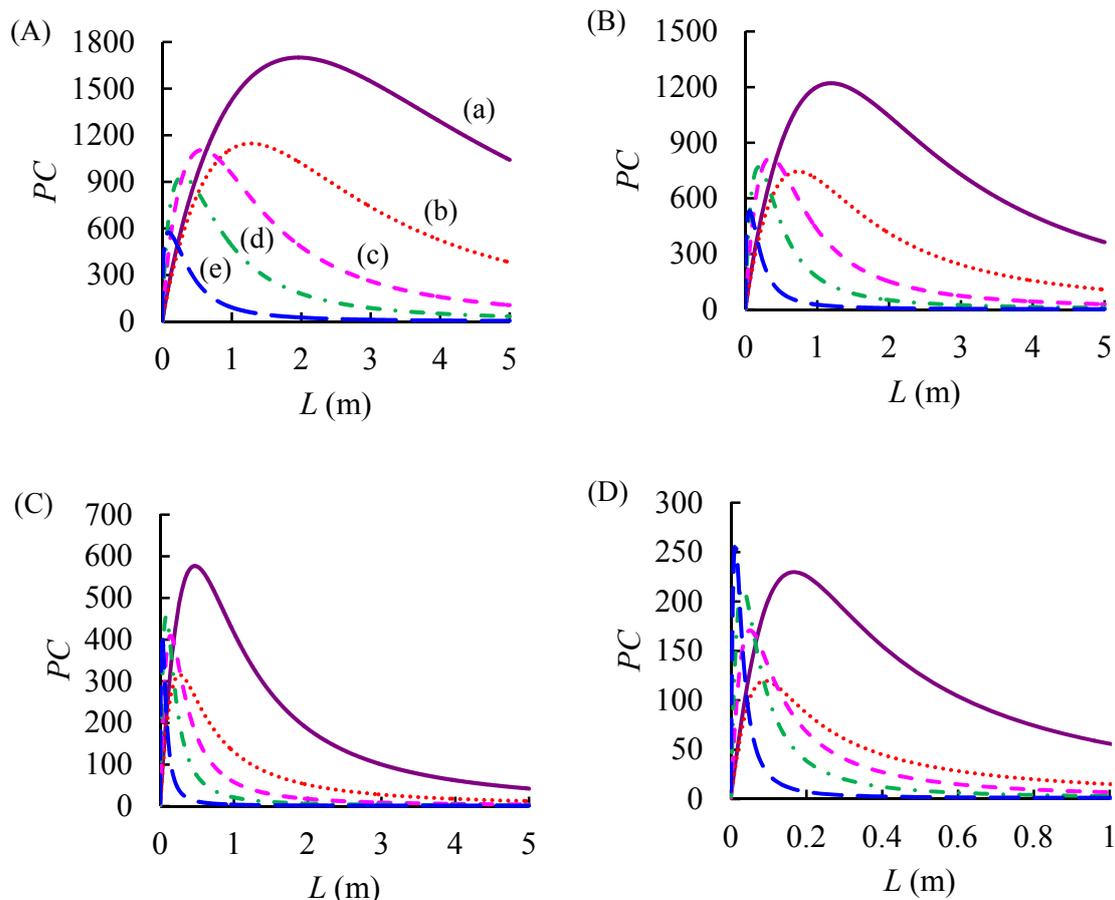


Figure 1-3-1. PC Values with Various Column Length and Types with Fixed Gradient Time under the Assumed Maximum Pressure of 20 MPa

(A) Gradient time: 40 h, (B) gradient time: 10 h, (C) gradient time: 1 h, (D) gradient time: 0.1 h, (a) solid line: MS-100H-C18, (b) dotted line: 5 μm particle-packed column, (c) dashed line: 3 μm particle-packed column, (d) dot-dash line: 2 μm particle-packed column, (e) long dashed line: 1 μm particle-packed column. Columns were evaluated with the assumed maximum pressure of 20 MPa. The diffusion coefficient of a solute = $4.5 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$, the viscosity of mobile phase = $0.00101 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ ^a, and the flow resistance factor $\varphi = 700$ were assumed for the evaluation of each column. For the estimation of PC , $B = 43.2$ and $\Delta c = 0.4$ were assumed.

^a The highest viscosity of $\text{CH}_3\text{CN}/\text{water}$ at 25 $^\circ\text{C}$

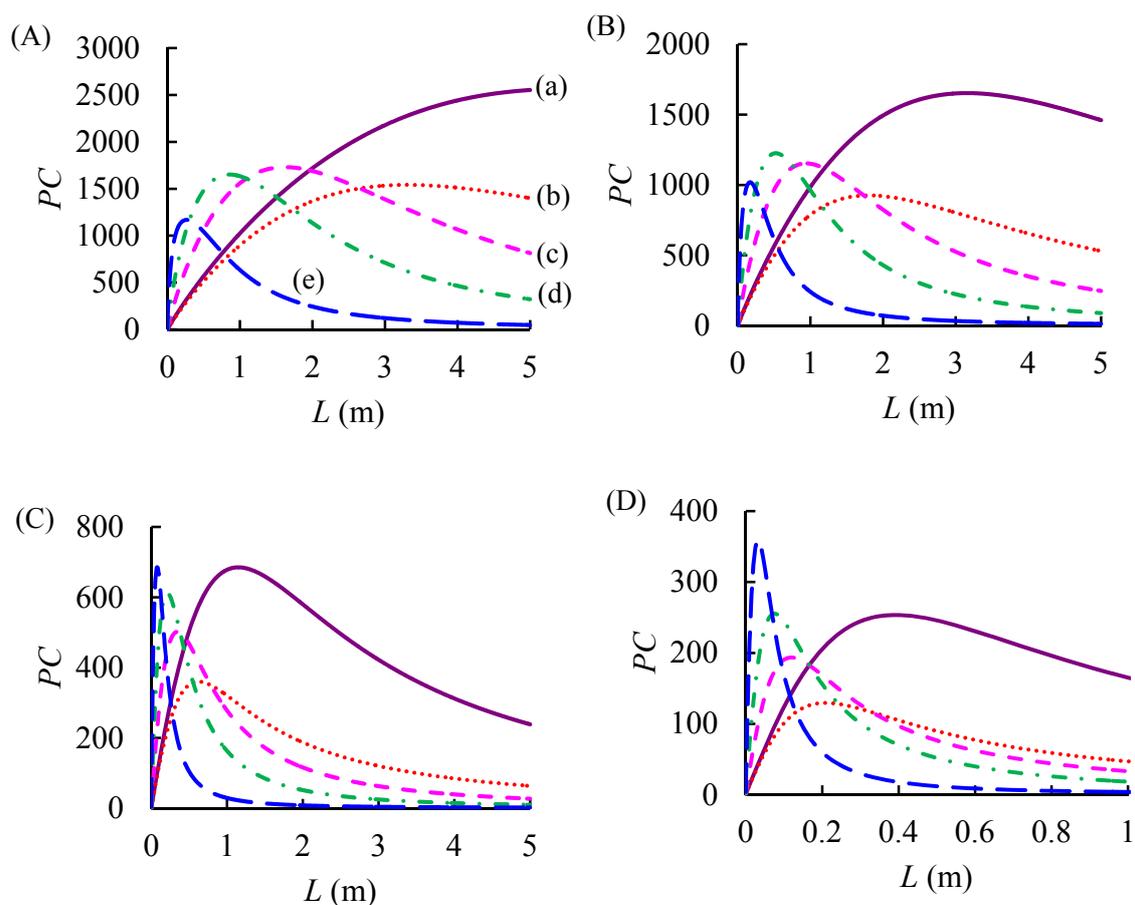


Figure 1-3-2. PC Values with Various Column Length and Types with Fixed Gradient Time under the Assumed Maximum Pressure of 100 MPa

(A) Gradient time: 40 h, (B) gradient time: 10 h, (C) gradient time: 1 h, (D) gradient time: 0.1 h, (a) solid line: MS-100H-C18, (b) dotted line: 5 μm particle-packed column, (c) dashed line: 3 μm particle-packed column, (d) dot-dash line: 2 μm particle-packed column, (e) long dashed line: 1 μm particle-packed column. Columns were evaluated with the assumed maximum pressure of 100 MPa. Other conditions were described in Figure 1-3-1.

第2項 グラジエント溶出におけるグラジエント時間の最適化

様々なカラム長を有するモノリス型シリカキャピラリーカラムを使用して HPLC 分離を行う際、それぞれのカラム毎に条件を実験的に最適化することは、特に長い時間を要する t_g 最適化に際して顕著な生産性の低下をもたらすことが懸念される。また、 t_g は一分析における分析時間に関連する重要な因子であり、できるだけ短い分析時間で最大の PC を得ることが求められる。

式(1-8)における L を固定値 ($L = 3, 1, 0.1, 0.01$ m) として、最大の PC が得られる t_g を最適化した (Figure 1-3-3)。留意すべき点として、 PC と t_g の間に直線の比例関係は得られず、長い t_g が必ずしも高い PC を発現するとは限らないことが挙げられる。例えば、 $L = 0.01$ m の $d_p = 1 \mu\text{m}$ の粒子充填型カラムを用いた場合 (Figure 1-3-3 (D))、 $P_{\text{max}} = 20$ MPa 条件下では約 0.4 h 時点で最大の PC が得られており、それ以上長い t_g を用いた分析を実施したとしても顕著な PC の増大は見られず、 PC は一定領域に達していることが示されている。また、このような L および P_{max} 条件下では、どのカラム種を用いたとしても高い PC の発現は期待されず、複雑性の高い化合物群の精密分離を目的とする HPLC 条件として選択されるべきではないことが明示されている。同様に、 $P_{\text{max}} = 100$ MPa 条件下をシミュレーションした結果を Figure 1-3-4 に示す。20 MPa 圧力条件下と比較して、全てのカラム種に対して全体的な PC の増加が確認され、MS-100H-C18 においては、 $L = 3$ m の最も長いカラム条件下で、どの t_g 範囲に対しても粒子充填型カラムと比較して優位な PC を発現する結果を得た。しかし、その値は $L = 3$ m の場合に $t_g = 30$ h 時点で既にほぼ一定領域に達しており、かつ $L = 1$ m 以下の条件では $d_p = 2 \mu\text{m}$ 以下の微小粒子充填型カラムの方が高い PC を発現することが示されている。これらの結果は、モノリス型シリカカラムに関して長いカラムフォーマットでを使用することを更に推奨するものであると同時に、 $P_{\text{max}} = 100$ MPa の UHPLC 条件下でモノリス型シリカキャピラリーカラムを使用する際は 5 m を超える更に長いカラムフォーマットでを使用することにより、その潜在能力を存分に発揮できることを示唆している。

以上の結果を統合し、MS-100H-C18 を用いて、 $P_{\text{max}} = 20$ MPa 条件下で、ペプチドをグラジエント溶出分離した際に期待される PC について、 L および t_g を変数として三次元プロットした結果を Figure 1-3-5 に示す。本プロットは L および t_g の最適化に有用である。本プロットを作成することにより、 $L = 2 - 3$ m の

MS-100H-C18 に対しては $t_g = 40$ h が最適であり、更に長い L は PC を顕著に減少させ、かつ更に長い t_g は PC を劇的に増大させることは無いことを視覚的に捕らえることが可能である。本結果は、メートル長のモノリス型シリカキャピラリーカラムを用いた「ワンショットプロテオミクス」手法を開発した岩崎らによって、実験的に求められた最適条件と合致する結果である[25]。また、同様のシミュレーションを $d_p = 5 \mu\text{m}$ の粒子充填型カラムに適用した場合、 $t_g = 40$ h 条件で $L = 1$ m が最大の PC を発現することが期待された。また、粒子充填型カラムにおいて典型的である $L = 0.01$ m 条件では、たとえ $t_g = 10$ h 以上の長いグラジエント溶出を適用したとしても、更なる PC の増大は認められない結果であった。つまり、長時間のグラジエント溶出による高い PC の発現のためには、①モノリス型シリカカラムを使用する、②メートル長のロングカラムフォーマットで使用する、③可能な限り高い圧力で操作する等の方策が必要であり、予め本手法に基づいた事前シミュレーションの実施が推奨される。

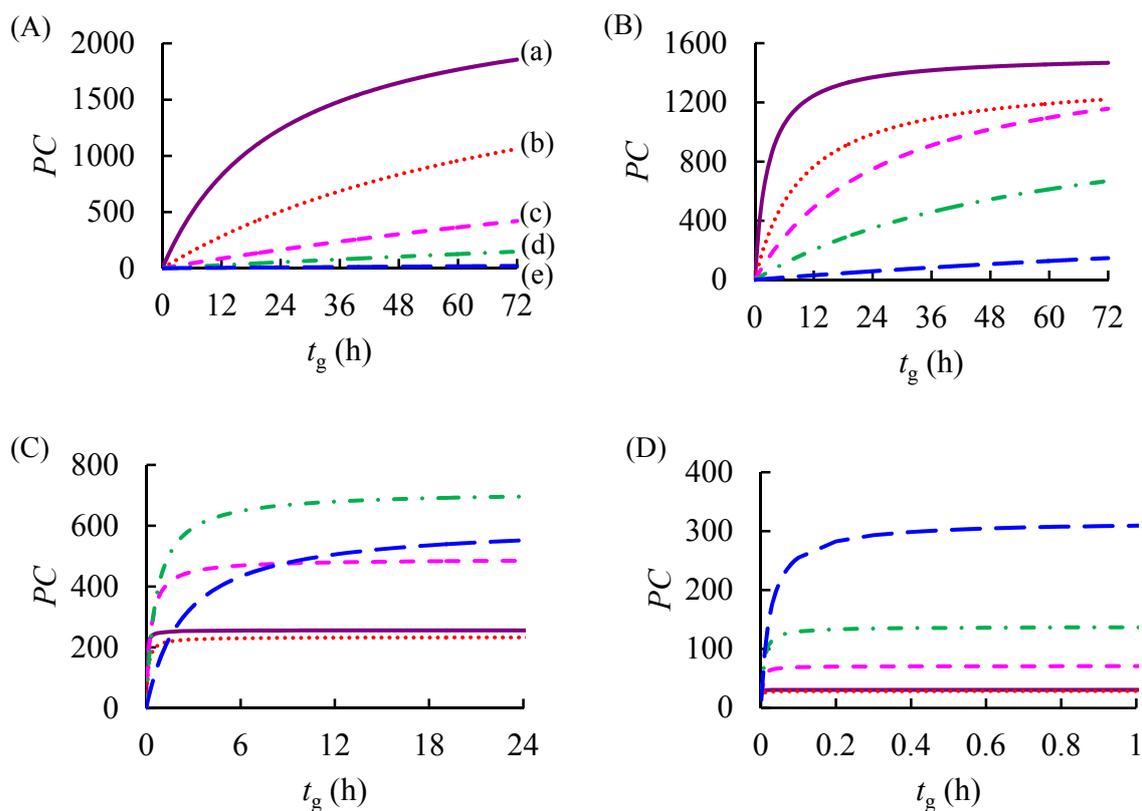


Figure 1-3-3. PC Values with Various Gradient Time and Column Types with Fixed Column Length under the Assumed Maximum Pressure of 20 MPa

(A) Column length: 3 m, (B) column length: 1 m, (C) column length: 0.1 m, (D) column length: 0.01 m, (a) solid line: MS-100H-C18, (b) dotted line: 5 μm particle-packed column, (c) dashed line: 3 μm particle-packed column, (d) dot-dash line: 2 μm particle-packed column, (e) long dashed line: 1 μm particle-packed column.

Columns were evaluated with the assumed maximum pressure of 20 MPa. Other conditions were described in Figure 1-3-1.

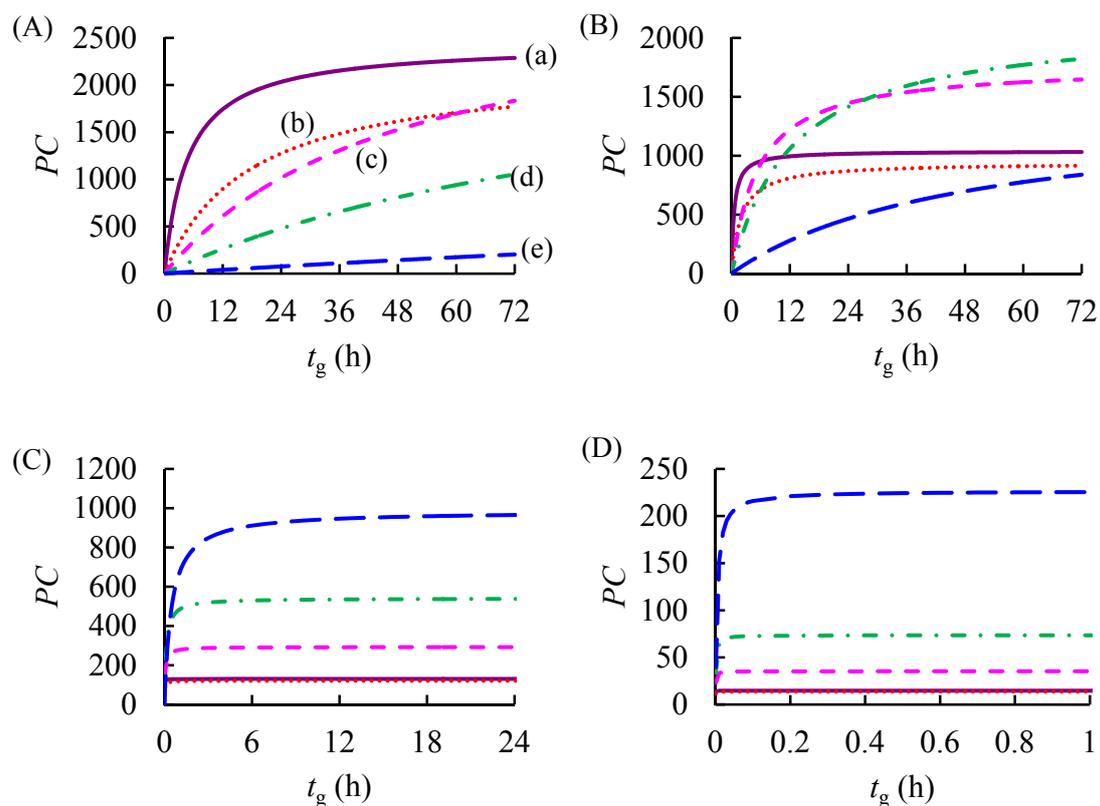


Figure 1-3-4. PC Values with Various Gradient Time and Column Types with Fixed Column Length under the Assumed Maximum Pressure of 100 MPa

(A) Column length: 3 m, (B) column length: 1 m, (C) column length: 0.1 m, (D) column length: 0.01 m, (a) solid line: MS-100H-C18, (b) dotted line: 5 μm particle-packed column, (c) dashed line: 3 μm particle-packed column, (d) dot-dash line: 2 μm particle-packed column, (e) long dashed line: 1 μm particle-packed column. Columns were evaluated with the assumed maximum pressure of 100 MPa. Other conditions were described in Figure 1-3-1.

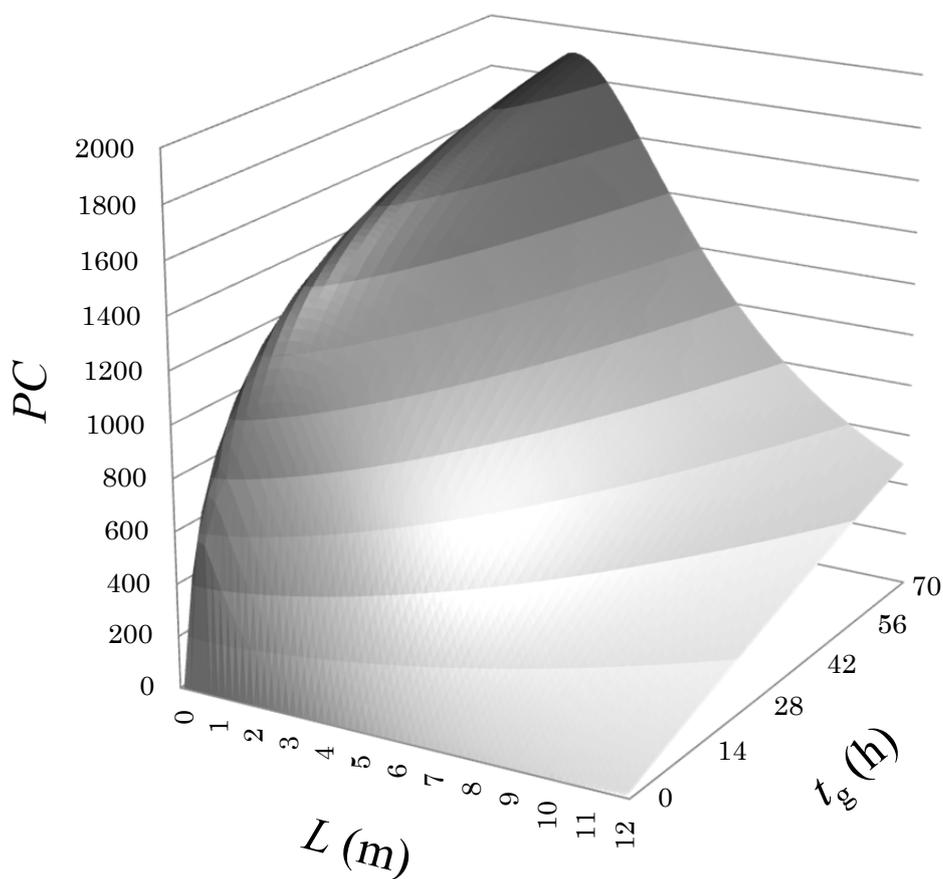


Figure 1-3-5. 3D Plot of PC Values with Changed Column Length and Gradient Time for Monolithic Silica Column under the Assumed Maximum Pressure of 20 MPa

The PC of MS-100H-C18 was evaluated with the assumed maximum pressure of 20 MPa. Other conditions were described in Figure 1-3-1.

第3項 1D-LC 条件最適化法の検証

上述の *PC* 理論に基づくシステム性能の最適化法を検証するために、ヒト肺線癌細胞 (PC-9) 中に発現しているタンパク質に対してトリプシン消化を行い、得られた複雑混合試料を、様々な t_g 条件下において nanoLC-ESI-MS 分析し、そのペプチドおよびタンパク質の同定数との関係性について考察した。用いたカラムは $L = 3 \text{ m}$ の MS-100H-C18 および $L = 10 \text{ cm}$ の汎用的長さの $d_p = 5 \mu\text{m}$ の粒子充填型カラムである。

Figure 1-3-6 に $L = 3 \text{ m}$ の長い MS-100H-C18 カラムを用いた消化ペプチドの分離クロマトグラムを示す。Figure 1-3-1 に示すように、 $L = 3 \text{ m}$ の MS-100H-C18 を 20 MPa の汎用 HPLC 条件で操作する場合、約 40 h のグラジエント溶出を行うことにより最大の *PC* が得られると予測されたことから、本条件下においてペプチドおよびタンパク質の同定数も最大化されることが期待された。実際に、これらの二種カラム (MS-100H-C18 および $5 \mu\text{m}$ 粒子充填型カラム) を用いて本理論の検証を行った結果を Figure 1-3-7(A) および Figure 1-3-7(B) に示す。予想した通り、 $t_g = 1 - 40 \text{ h}$ にかけてペプチドおよびタンパク質の同定数の増大傾向が確認され、それ以降は一定領域となる傾向であったことから、 $t_g = 40 \text{ h}$ 付近が最適条件であることが示唆された。本結果は、*PC* 理論に基づく結果に加えて、岩崎らによる実験報告とも合致する結果である[25]。一方で、 $d_p = 5 \mu\text{m}$ の粒子充填型カラムを用いた分析においては、 $t_g = 10 \text{ h}$ 時点以降で各同定数の増大が緩やかになる傾向を示し、当結果も Figure 1-3-3 で示したシミュレーション結果と合致するものであった。

以上の結果より、本研究にて策定した *PC* 理論のロングカラムフォーマットへの展開は、実際のプロテオーム解析におけるペプチドおよびタンパク質同定数を反映するものであり、極めて長い分析時間、並びに繰り返しの実験を要する HPLC 分析条件の最適化工程を、簡便化する有望な手法であることが示された。

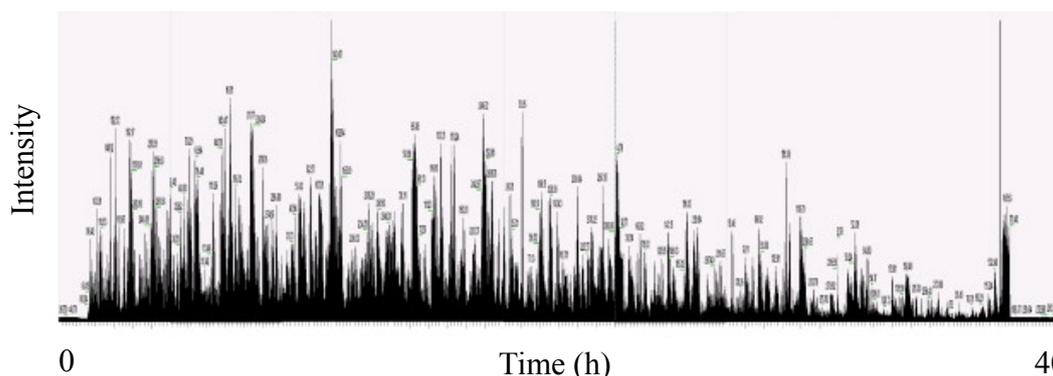


Figure 1-3-6. NanoLC-ESI-MS Total Ion Current Chromatogram of Digested Peptides by Use of 3 m Long Monolithic Silica Capillary Column with 40 h Gradient under 20 MPa Condition

Peptides from PC-9 cell cytoplasmic proteins (20 μg) separated using a column: MS-100H-C18 (3 m \times 100 μm I.D.), gradient time: 40 h, flow rate: 500 nL/min, maximum pressure: 20 MPa. The mobile phases consisted of (A) 0.2% CH_3COOH and (B) 0.2% CH_3COOH in 80% CH_3CN . A two-step linear gradient of 5 % to 40 % B over a variable time (1 to 40 h), 40 % to 100 % B for 10 min, and 100 % B for 20 min was employed. The mass spectrometer was operated in data-dependent acquisition mode to automatically switch between MS full Scan and MS2. The MS scan range was m/z 300 to 1500, and the top precursor ions were selected from the MS scan for subsequent MS/MS scans by ion trapping. The normalized CID was set to at 35.0.

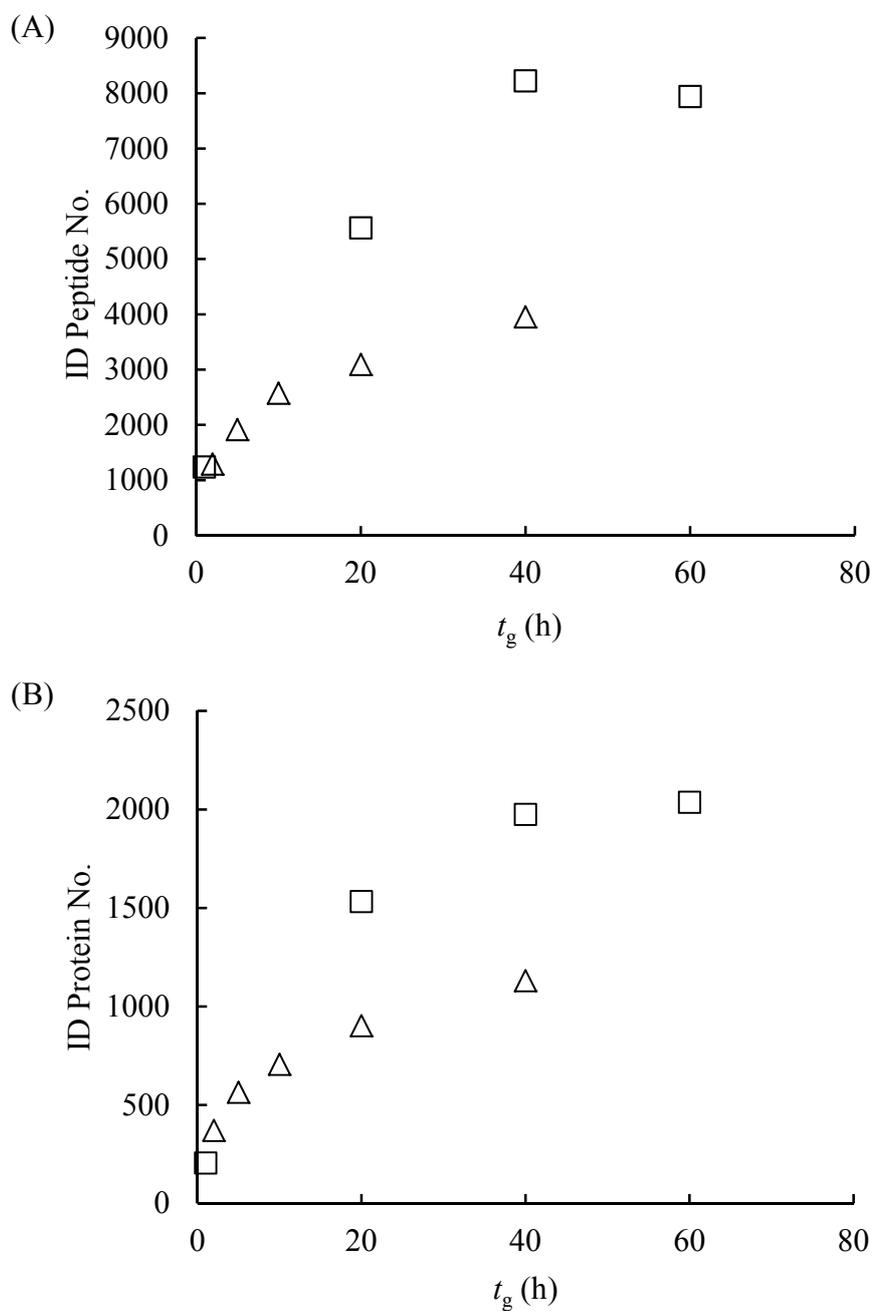


Figure 1-3-7. Identified Peptides and Proteins Number by Various Separation Conditions

(A) Peptides identification number, (B) proteins identification number,
square plot: MS-100H-C18 (3 m × 100 μm I.D.), triangular plot: 5 μm particle
(Reprosil) - packed column (10 cm × 100 μm I.D.)

第4節 2D-LCにおける条件最適化に関する検討

前節まで、モノリス型シリカカラムの特性並びにメートル長のモノリス型シリカカラムを用いた1D-LCの有用性と、最大の PC を得るための条件最適化法について述べてきたが、同じく高い分離性能をより短時間で得るための別の手法として、二つの異なるHPLCモードを組み合わせる2D-LCが挙げられる。本節で取り上げる2D-LCは、「一次元目における各分画時間内に全ての二次元目の分析を完了させるオンライン型の完全2D-LC」であり、環境分析や高分子材料分析における応用が期待されている[43][64]。本システムは、バルブを介して二つの異なるHPLCモードをオンラインで連結させた構造を有しており、一次元目の各分画時間内に全ての二次元目の分析を完了させるために、二次元目において極めて高速なHPLC分析が求められる。しかし、粒子充填型カラムは高圧化の課題を有することから、頑健性の高い汎用HPLC条件下 ($P_{\max} = 20 \text{ MPa}$) で2D-LCを操作する際にはモノリス型シリカカラムの使用が推奨されている[43]-[47]。

高い透過性を有するモノリス型シリカカラムを完全2D-LCにおける二次元目の分離媒体として用いることにより、汎用HPLC条件下で高い分離効率得ることが可能であるが、最大の PC を得るためには、分画時間 (P_M) に関連する様々な条件設定の最適化が必要となる。そこで、Murphy や Seeley らは一次元目における P_M とピーク広がり の関係について詳細な検討を行った[65][66]。その結果、2D-LCにおいて一次元目で得られた分離性能を維持するためには一つのピークに対して少なくとも3-4回の分画 (1.5σ 以下の短い分画) を取得する必要があることを報告しており、それは現在広く実施されている2D-LCの基本条件として多く採用されている。

本節では Seeley が示した分画による一次元目のピーク広がり (アンダーサンプリング現象) を考慮した2D-LC全体の PC をシミュレーションにて算出し、線速度 u , カラム長 L , そして最大の関心事である P_M を含む条件最適化に関する検討を行った。

まず、一次元目にグラジエント溶出 (グラジエント時間 $^1t_g = 60 \text{ min}$, ピーク幅 $^1t_w = 30 \text{ s}$), 二次元目に汎用HPLC条件下におけるアイソクラティック溶出 ($P_{\max} = 20 \text{ MPa}$) を用いた完全2D-LCを想定し、条件最適化のシミュレーションを行った。

一次元目のグラジエント溶出における $PC(^1n)$ は理想的には t_g をピーク幅 (t_w) で除した単純式 (t_g/t_w) で表される。しかし、実際の 2D-LC においては、一次元目のピーク幅 (1t_w) は分画の位相や P_M に依存して二次元クロマトグラム上では広がったバンドとして現れるアンダーサンプリング現象が発生するため、実際の 1n は単純式で示される計算値より低い値となる。この現象を考慮した一次元目における $PC(^1n_{\text{app-av}})$ は式(1-10)で示される[66]。

$$^1n_{\text{app-av}} = \frac{^1t_g}{^1t_{w\text{-app-av}}} = e_M \times ^1n \quad (1-10)$$

ここで、単純式から得られる 1n で $^1n_{\text{app-av}}$ を除した数値は、一次元目における理論的 $PC(=t_g/t_w)$ の残存率を意味しており、分画効率 (e_M) と称する重要なパラメーターとなる。Figure 1-4-1 に $\tau z (=P_M/\sigma)$ と Band Broadening Factor ($\langle\sigma^*\rangle$ [66]参照)、並びに e_M との関係を示すプロットを示す。本プロットを用いることにより、アンダーサンプリング現象による 1n の減衰を考慮した実際に近い 2D-LC 全体の $PC(n_{2D\text{-exp}})$ を算出することが可能となった。具体例として $^1t_g = 60$ min, ピーク幅 $^1t_w = 30$ s のグラジエント溶出における $^1n_{\text{app-av}}$ を Figure 1-4-2 に示す。これまで単純式を用いて算出してきた理論的 $PC(^1n = 120)$ と比較して、特に長い P_M 条件下にて 1n の著しい低下が生じることが明らかとなった。

次に、二次元目に汎用 HPLC 条件下でモノリス型シリカカラム (Chromolith RP-18e) および粒子充填型カラム ($d_p = 2,5 \mu\text{m}$) を用いる場合の $PC(^2n)$ について検討した。 2n は、式(1-11)によって表される。なお、式(1-11)における理論段数は、80% CH_3OH 並びに 30°C 条件下におけるアルキルベンゼンに対する van Deemter plot 式を考察する事により算出した。

$$^2n = 1 + \frac{\sqrt{^2N}}{4} \ln\left(\frac{^2t_R}{^2t_0}\right) = 1 + \frac{\sqrt{^2L/2H}}{4} \ln\left(\frac{^2t_R}{^2L/2u}\right) \quad (1-11)$$

2n : 二次元目の PC , 2N : 二次元目の理論段数, 2t_R : 二次元目の保持時間 (分画時間 P_M と同値), 2t_0 : 二次元目のホールドアップタイム, 2L : 二次元目に用いるカラム長, 2H : 二次元目の理論段高, 2u : 二次元目の線速度

本式により, $P_{\max} = 20 \text{ MPa}$ 条件下の 2u , ${}^2t_R (= P_M)$ と 2n の関係を示す三次元プロットを得ることができる。Figure 1-4-3(A)に, その三次元プロットを z 軸 (2n) 方向から観察した等高線プロットを示す。なお, 2t_R は一次元目のグラジエント溶出で想定する一般的なピーク幅 (30 s) を包含する 0 - 90 s の範囲, また線速度は実用的な $u = 0 - 12 \text{ mm/s}$ の範囲でシミュレーションを行った。その結果, モノリス型シリカカラムを用いた場合は, より長い 2t_R (すなわち, 長い P_M) かつ最も速い ${}^2u (= 12 \text{ mm/s})$ 条件下において, 最大の 2n が得られることが想定された。また, 粒子充填型カラム ($d_p = 5, 2 \mu\text{m}$) を用いた場合の等高線プロットを Figure 1-4-3(B)および Figure 1-4-3(C)に示す。前述の通り, 粒子充填型カラムには圧力上昇の課題が存在することから, 一定の制限圧力下でより速い 2u を得るための送液を行うためには 2L を短く設定する必要がある。結果として, $d_p = 5 \mu\text{m}$ の粒子充填型カラムでは ${}^2u = 9 \text{ mm/s}$ 以上, $d_p = 2 \mu\text{m}$ の粒子充填型カラムでは ${}^2u = 5 \text{ mm/s}$ 以上の高速条件下において, 2N の低下に伴う 2n の低下が生じることが想定された。

さらに, 2D-LC における全体の PC を式(1-12)により算出する。

$$n_{2D\text{-exp}} = {}^1n_{\text{app-av}} \times {}^2n = e_M ({}^1n) ({}^2n) = \left(\frac{{}^1t_g}{\langle \sigma^* \rangle > {}^1t_w} \right) \times \left[1 + \left(\frac{\sqrt{{}^2N}}{4} \right) \ln({}^2t_R / {}^2t_0) \right] \quad (1-12)$$

Figure 1-4-4 に 2u および ${}^2t_R (= P_M)$ を変数として $n_{2D\text{-exp}}$ をプロットした等高線プロットを示す。また, Table 1-4-1 に, Figure 1-4-4 から推定された最適な P_M および 2u と, その時の 2L および最大の $n_{2D\text{-exp}}$ (PC_{\max}) をまとめて示す。 PC_{\max} を与える P_M に関して, 二次元目にモノリス型シリカカラムを用いた場合の最適な P_M は 37.5 s であり, これは ${}^1t_w (= 30 \text{ s})$ から換算すると 5σ にあたる値であった。Murphy や Seeley らは 1.5σ 以下のできるだけ短い時間での分画を推奨しているが, モノリス型シリカカラムを二次元目に用いて PC_{\max} を得る目的においては, 長い P_M 条件の方が適しており, 逆にそれ以下の短い P_M 条件は $n_{2D\text{-exp}}$ を飛躍的に減少させる結果を得た。一方, 粒子充填型カラムを二次元目に用いた場合の

最適 P_M は $2 - 2.5\sigma$ であり、従来の通則に近い値であった。また、もう一点注目すべき点として、粒子充填型カラムにおける最適な 2u および 2L はモノリス型シリカカラムと比較して小さく、特に $2\ \mu\text{m}$ 以下の微小粒子を用いた粒子充填型カラムを二次元目に用いた際の PC_{max} を与える 2L は、 $1\ \text{cm}$ 以下の極めて短いものとなることが挙げられる。Table 1-4-1 によると、今回のシミュレーションに用いた3種のカラムのうち、 $2\ \mu\text{m}$ 粒子充填型カラムを二次元目に用いた2D-LCシステムが理論上最も高い PC_{max} を示すものとなったが、短いカラムを二次元目に用いた2D-LCシステムでは、二次元目の分離においてカラム外効果の影響を受けやすく、結果的に期待される PC が得られない可能性がある。また、短い P_M を設定することは多くのバルブ切り替えを必要とするため、バルブの消耗や切り替えによる定量再現性の低下など、多くの問題を引き起こすことが懸念される。モノリス型シリカカラムを用いることにより、長い 2L かつ長い P_M を2D-LCの最適条件として用いることができるならば、当問題を解消できる可能性があることから、本シミュレーション検討により得られた知見は有用であると考えられる。より実用的な条件下での今後の実検証が期待される。

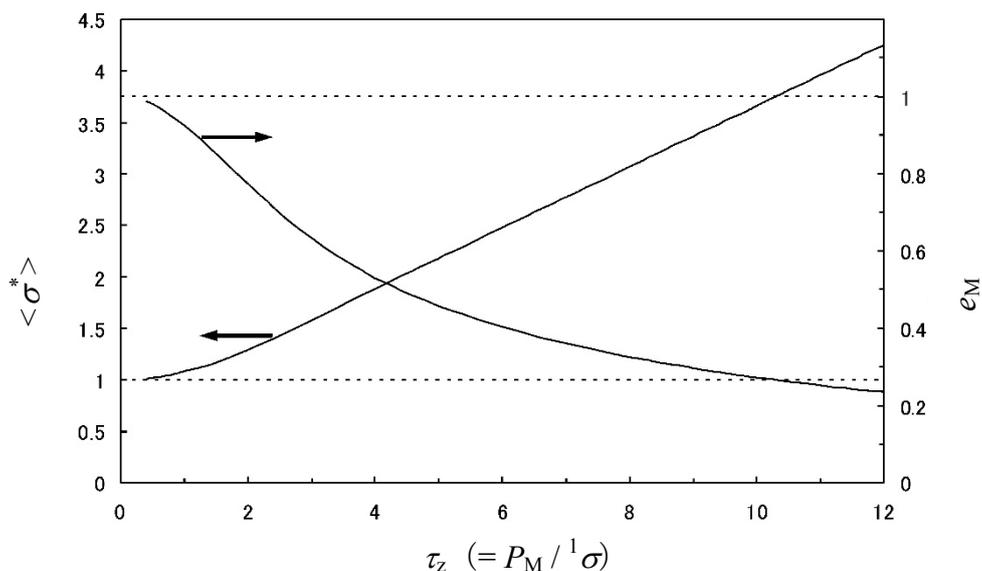


Figure 1-4-1. Plot of Band Broadening Factor, $\langle \sigma^* \rangle$, and Modulation Efficiency, $e_M = {}^1n_{app} / {}^1n = 1 / \langle \sigma^* \rangle$, against the Modulation Period in the Unit of ${}^1\sigma$

Values of $\langle \sigma^* \rangle$ were calculated by the method of Seeley [66].

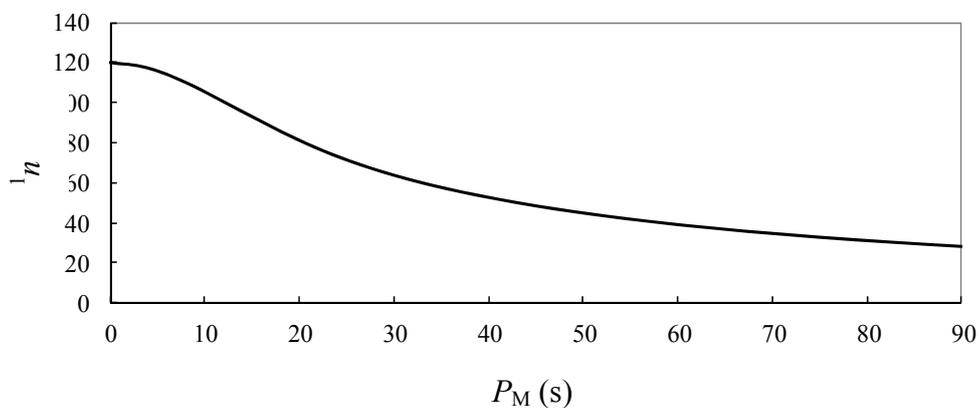


Figure 1-4-2. Plot of 1n against P_M (${}^1t_g = 60$ min, ${}^1t_w = 30$ s (${}^1\sigma = 7.5$ s))

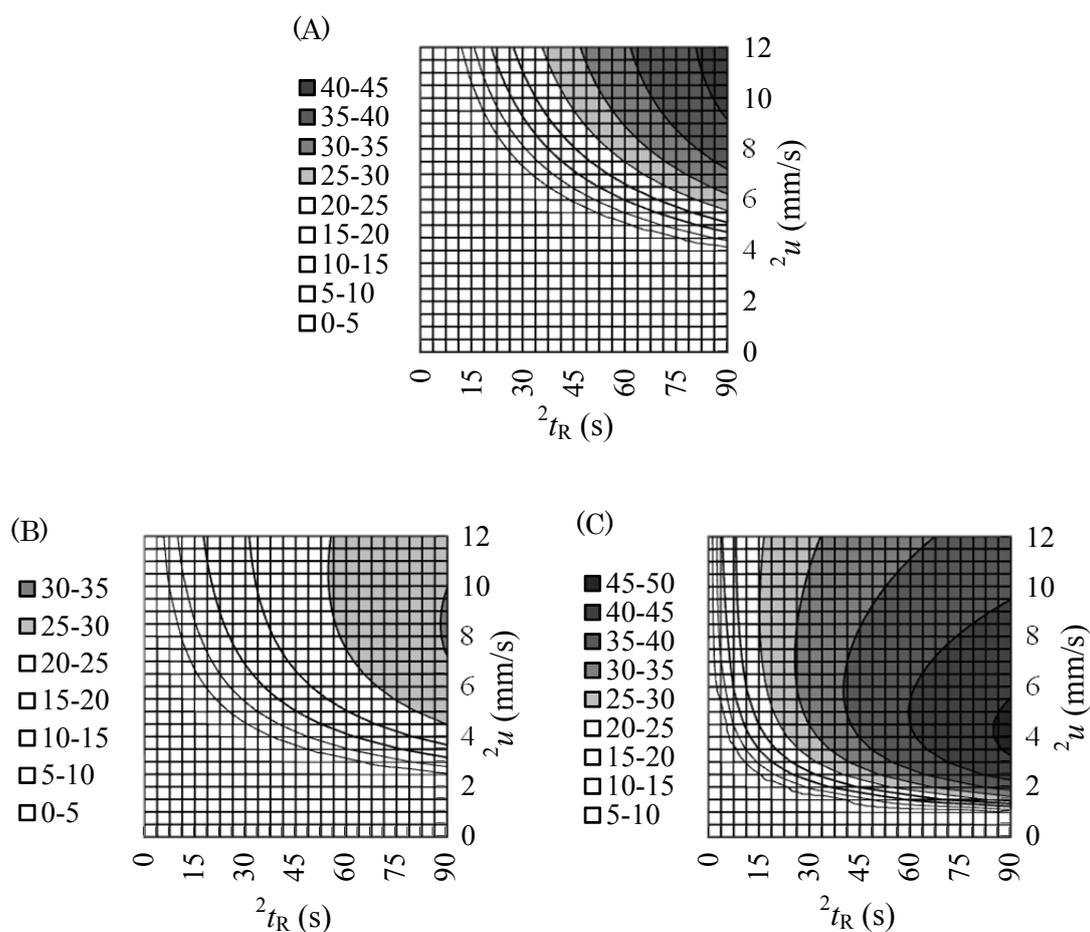


Figure 1-4-3. Contour Plot of 2n Calculated as a Function of 2u and 2t_R for Isocratic Elution, Using Various Columns under an Assumed Maximum Pressure of 20 MPa

(A) Monolithic silica column, (B) 5 µm particle-packed column, (C) 2 µm particle-packed column. The diffusion coefficient of a solute = $1 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$, the viscosity of mobile phase = 0.001 Pa•s were assumed for the evaluation of columns.

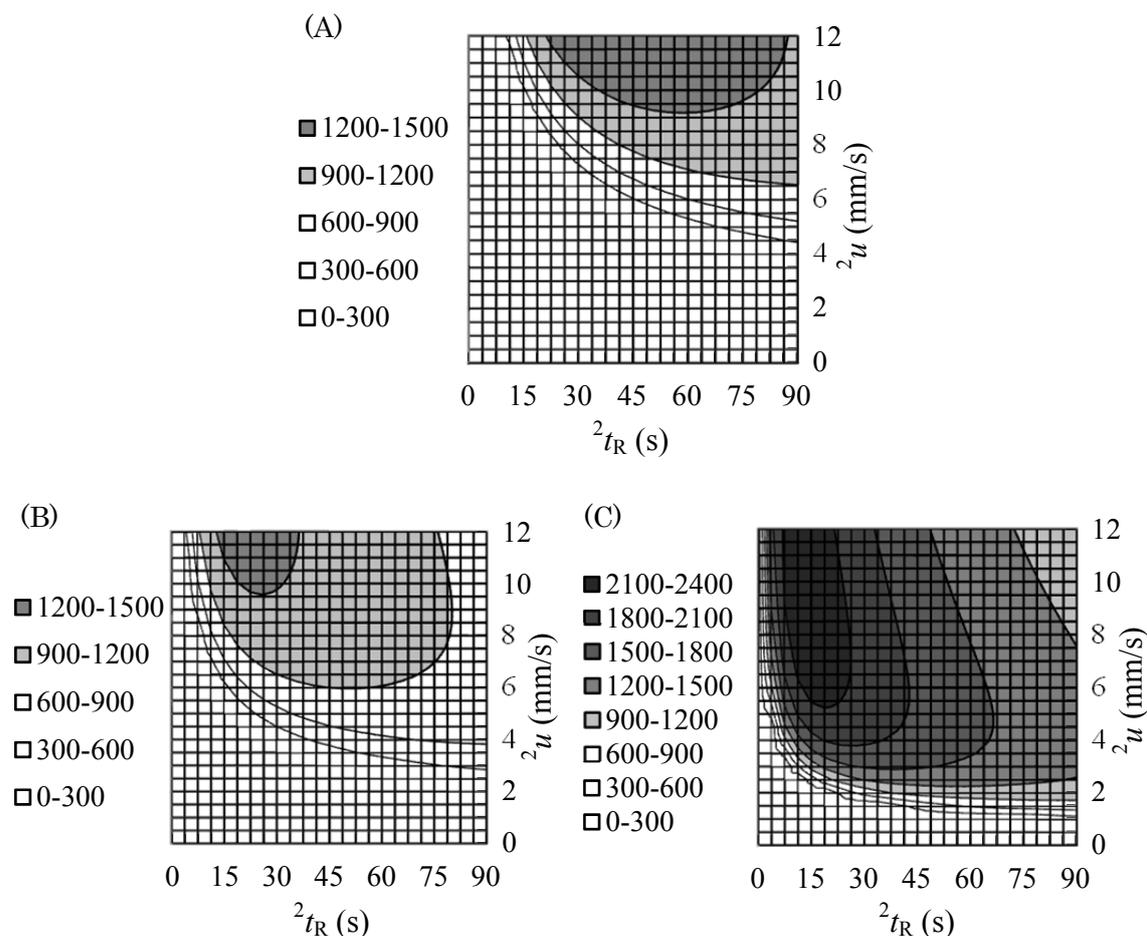


Figure 1-4-4. Contour Plot of Expected Total Peak Capacity (n_{2D-exp}) Calculated for a 2D-LC System Using Gradient Elution with ${}^1t_g = 60$ min, ${}^1t_w = 30$ s at 1st Dimension and Isocratic Elution Using Various Columns under an Assumed Maximum Pressure of 20 MPa at 2nd Dimension

(A) Monolithic silica column, (B) 5 μm particle-packed column, (C) 2 μm particle-packed column. The diffusion coefficient of a solute = 1×10^{-9} m²/s, the viscosity of mobile phase = 0.001 Pa•s were assumed for the evaluation of columns at 2nd dimension.

Table 1-4-1. Summary of Optimum Modulation Period, Linear Velocity and Maximum Total Peak Capacity Calculated for a 2D-LC System Using Gradient Elution with ${}^1t_g = 60$ min, ${}^1t_w = 30$ s at 1st Dimension and Isocratic Elution Using Various Columns under an Assumed Maximum Pressure of 20 MPa at 2nd Dimension

Column	Optimum P_M (s) (${}^1\sigma$)	Optimum 2u (mm/s)	2L (cm)	$n_{2D\text{-exp}}$ (PC_{max})
monolithic silica	37.5 (5 σ)	12 (maximum)	12	1424
5 μm particle-packed	18.75 (2.5 σ)	12 (maximum)	4	1310
2 μm particle-packed	15 (2 σ)	9	1	2312

Calculated with a $0.5 {}^1\sigma$ increment for P_M with a pressure limit of 20 MPa. Maximum $n_{2D\text{-exp}}$ values obtained in a range of 2u of up to 12 mm/s were listed.

第5節 総括

以上、モノリス型シリカカラムの性能を最大限に発揮するための HPLC 条件 (L , t_g) の最適化法について考察した。

1D-LC において、粒子充填型カラムでは達成し得ない高性能分離を得るためには、モノリス型シリカカラムのメートル長での使用が強く推奨されるが、当該メートル長カラムを用いた 1D-LC の最適条件は、驚くべきことに日オーダー（数十時間以上）のグラジエント溶出を要するものであった。数分 - 数時間オーダーの汎用的な HPLC 条件では、本メートル長モノリス型シリカカラムは真価を発揮しない。超高性能な分離を得るためには、手持ちの分析時間限度と求める分離の質のバランスについて、試験を開始する前に熟考する必要があることを強調したい。また、モノリス型シリカカラムを用いた 2D-LC における最適条件に関しても、一次元目での分画時間をできるだけ長くし、二次元目においてできるだけ長いカラムを用いることにより、全体の分離効率が最大化することが予測された。

共に、特殊かつ高価な新規 HPLC 機台の導入なしに、クロマトグラフィー理論の理解のみによって達成される HPLC システムの高性能化であり、高性能な分離分析を必要とする多くの応用研究者にとって価値ある研究成果と考えられる。

第2章 HILIC および IEC 用モノリス型シリカカラムを用いた HPLC システムの高性能化

第1章にて高理論段数を有する長いモノリス型シリカカラムによる高い分離性能の発現と、その条件最適化法に関して述べた。しかし、式(1-6)および式(1-11)には N 以外に保持係数 k (又は t_R/t_0 で表される係数) も分離に大きな影響を与えるファクターであることが示されている。第1章第2節では $k=5$ の保持がある条件を仮定した例を述べたが、例えば $k=0.1$ の保持が極めて小さい条件下においては、たとえ $N=300,000$ の高性能カラムを用いたとしても $\alpha=1.01$ の類似化合物対に対して $R_s=0.12$ となり、分離は達成されない。つまりカラム性能(理論段数)がどんなに高くても、保持がなければ良好な分離は得られない。C18 のような RPLC 用固定相は、疎水性化合物に対しては大きな保持を示すが、糖やペプチド、薬物、その代謝物は極性が高いものも多く、RPLC では保持を示さず分離が困難な場合がある。また、2D-LC を実施する際、例え分画効率を最適化したとしても、用いる二つの HPLC モード間で分離選択性の直交性が得られなければ、良好な分離は得られないことは明確である。

高極性化合物から順に保持する HPLC モードとして NPLC が古くから知られているが、移動相にヘキサン等の非水性溶媒を用いるため高極性化合物やイオン性物質は溶解性の問題が生じる。そこで、その問題を解消するために、古くは Linden らがアミノ基を有する固定相と CH_3CN - 水の混合移動相を用いて多糖を分離した例を報告している[67]。後に Alpert はこの親水性固定相と大部分が有機溶媒である水系移動相を組み合わせる HPLC モードを HILIC と定義し、様々な高極性化合物の分離に適用できることを示した[28]。HILIC は NPLC の一種であるが、移動相に水系溶媒を使用することが特徴である。これは高極性試料の溶解性の問題を解消するだけでなく、近年急速に発展している LC-MS 分析における ESI の使用を可能にし、高感度な検出を可能にする。ESI は電気伝導性の液体を細管に通し高電圧を印加することにより帯電した液滴を噴霧することにより行うイオン化法であり、電気伝導性を示さない有機溶媒のみの条件では適用できない。また一般に HILIC 条件では移動相に 50%以上の有機溶媒を含む水系の移動相を用いるため、RPLC で頻りに用いられる大部分が水系の移動相条件よりもイオン化効率が高く、最大感度が得られる利点もある[68]-[72]。

一方、RPLC および HILIC とは異なる保持挙動を示す HPLC モードとして IEC が挙げられる。RPLC における分離は主に疎水性の差によって行われるが、IEC においては化合物の電荷状態の差によって分離が生じる。IEC は RPLC では保持が困難な無機イオンや、広い範囲のイオン性高分子の分離が可能である。特にイオン性高分子であるタンパク質の分離は水系の移動相条件を使用できるため、タンパク質を未変性状態で分離分析できる可能性を持つ点で有利である。RPLC においては移動相に有機溶媒を使用するため、タンパク質の変性は避けられず、タンパク質の高次構造を識別分離することは困難である。渡邊らはモノリス型シリカキャピラリーカラムに三級アミノ基および四級アンモニウム基を有するモノマーを重合修飾することにより、リン酸基を有するヌクレオチド、酸性ペプチドおよび酸性タンパク質等の酸性物質に対して高性能な分離を発現するアニオン交換型モノリス型シリカキャピラリーカラムを調製することに成功した [73][74]。また、塩基性物質を選択的に分離する IEC として、強カチオン交換クロマトグラフィー (SCX) と弱カチオン交換クロマトグラフィー (WCX) の二つが挙げられるが、塩基性タンパク質およびペプチドを IEC で分離する際は SCX より WCX が好まれる場合が多い。これは、SCX では保持力が強すぎて溶出しない、又はピークがブロード化する、更には溶出に非常に高濃度の塩を要するという課題が生じやすいことに起因する。

本項では新規な固定相を有する HILIC および WCX 用モノリス型シリカキャピラリーカラムの開発について述べる。用いたカラム調製法 (固定相修飾法) は以下の二法である。

① シリル化修飾法 :

予め調製した未修飾のモノリス型シリカキャピラリー管内に、高極性官能基であるウレア基 (カルバモイル基) を有するシリル化剤 (ウレイドプロピルトリメトキシシラン (UPTMS)) を送液し、加熱することにより、シラノール基と縮合反応を誘起させて修飾する方法。

② 重合修飾法 :

未修飾のモノリス型シリカキャピラリーに予め二重結合を有するアンカーシリル化剤 ([3-(メタクリロイルアミノ)プロピル]トリエトキシシラン

(MATES)) を修飾した後、アクリルアミド並びにアクリル酸を親水性重合開始剤と共に管内に送液し、加熱することにより、ラジカル共重合反応を誘起させて修飾する方法[27][73][74]。

前者の方法は、骨格が予め形成されたモノリス型シリカキャピラリーカラムにシリル化剤を加熱条件下で送液するだけのシンプルな修飾法であることから、より均一な固定相が容易に得られる点で優れているが、モノリス型シリカカラムの低い保持能力という欠点を解消するためには、メートル長のロングカラムフォーマットでの使用が望ましい。また、後者の方法は、ポリマー層を固定相とすることから保持力の増大が期待され、モノリス型シリカカラムの低い保持能力という欠点を補完することが可能とする。しかし、重合による固定相量の増大過多は、カラムの詰りを誘発し、メートル長のロングカラムフォーマット並びに 100 μm I.D.以下の細いキャピラリーカラムへの修飾が困難である。

以下、重合修飾法を用いて調製したポリアクリルアミド修飾モノリス型シリカキャピラリーカラム (MS-200T-PAAm)、ポリアクリル酸修飾モノリス型シリカキャピラリーカラム (MS-200T-PAA)、およびシリル化修飾法を用いて調製したウレイドプロピル修飾モノリス型シリカキャピラリーカラム (MS-100H-UP) の3種のカラムについて、特性評価を行った。また、それらを組み込んだ nanoLC (ESI-MS) システムの糖分析に焦点を当てたメタボローム解析、並びにペプチド分析に焦点を当てたプロテオーム解析への応用の可能性について考察する。

第1節 ポリアクリルアミド修飾モノリス型シリカキャピラリーカラムの開発と応用

多くの研究分野で高極性化合物の分離分析は求められているが、その中でも特に重要な化合物が糖類である。糖類は生体内代謝で最も重要な位置を占める化合物の一つであり、メタボロミクスにおいては欠かすことのできない分析対象である。また、翻訳後修飾プロテオミクスのひとつに糖鎖修飾解析があるが、その有無、または糖鎖構造の違いによりタンパク機能が異なる場合も多く、糖鎖解析はプロテオミクスにおける一大プロジェクトとなっている。このように糖類分析の需要が高まっている一方、糖類に対する有力な分離分析手法がないのが現状である。これは糖類の極性があまりに高く、HPLCの大半を占めるRPLCでは保持を示さない上、検出器として一般によく使われている紫外分光光度計(UV)による検出が困難であることに起因している。通常、RPLCで糖類を分析する際はカラムに保持させる目的とUVや蛍光光度計による検出を可能にする目的のために、ピリジルアミノ化等の誘導体化を実施することが多く、これは反応率のバラツキに伴う真度および精度の低下や、操作の煩雑性の増加など多くの問題を抱えている。糖類を誘導体化なしで直接分析することは、このような問題の解消という側面から有効だと考えられるが、保持および検出という側面を考えると、困難な課題である。糖類を直接検出する方法としては示差屈折計の利用が考えられるが、検出感度が悪い(mMオーダー)、グラジエント溶出が適用できない、ナノ化が困難である等の問題点を有する。誘導体化なしの糖類の有効な分離検出法として強塩基条件下における解離糖のアニオン交換クロマトグラフィーとパルスアンペロメトリック電気化学検出器からなるシステムが実用化され、nMオーダーまでの分離検出を可能にしている[75]。また、カルバモイル基などの極性官能基を修飾したシリカ粒子を充填したカラムと蒸発光散乱検出器との組み合わせからなるHILICを糖分析へ応用した例も報告されている[76]。MSを検出器として糖分析に応用した例も報告されている[77]。MSをHPLCの検出器として用いる利点は、①高い検出感度(一般に、UVの1,000倍以上)、②高い選択性(特異性)、③高い定性能力(構造類推能力)が挙げられ、糖分析においても必要不可欠な検出法である。

本研究で開発したHILICシステムはnanoLC-ESI-MSをベースとしており、糖類に対しても高い検出感度での分離検出が期待される。グルコースに代表され

る中性糖は、それ自身は通常の pH 条件下では中性であり ($pK_a > 12$)、イオン化が困難であるため、誘導体化なしの状態では ESI-MS 分析による感度は一般に低いとされてきた。本節ではその不利点を解消するために、移動相に少量の揮発塩を添加することにより糖をイオン付加体としてイオン化する手法を採用している。塩は移動相に緩衝能力を持たせる働きも考慮して、LC-MS に適用可能な揮発性塩である酢酸アンモニウム ($\text{NH}_4\text{OCOCH}_3$) を用いた。ESI 印加電圧をネガティブに設定し、酢酸イオン付加糖をイオンソースで発生させることによりマスアナライザーへの導入を可能にした。なお、本節 (第一節) 並びに次節 (第二節) では MS 検出にイオントラップ型とタンデム四重極-飛行時間型 (Q-TOF) タイプの二種類の質量分析計を用いた。イオントラップを用いた場合は MS^n 分析が可能になるが、シングルステージのネガティブイオンモードでの検出を用いた場合、すべての非誘導体化糖は酢酸付加イオンとして検出された。例えばグルコースを本システムで検出した場合、(グルコースの分子量 : 180 + CH_3COOH の分子量 : 60) のプロトン脱離イオンが検出されるため、質量電荷比 (m/z) = 239 の一価イオンが計測された。Q-TOF を用いた場合は、常に四重極部に弱いアルゴン衝突を付与することにより、付加体の脱離を誘起させ、例えばグルコースの場合には $m/z = 179$ の分子イオンピークを観測した。

以降本節において、誘導体化なしの糖類の分離検出のための高性能 HPLC システムの開発について述べる。

第1項 HILIC モードにおける保持特性

Figure 2-1-1 に MS-200T-PAAm による糖分離の結果を示す。移動相には 80% $\text{CH}_3\text{CN}/13 \text{ mM } \text{NH}_4\text{OCOCH}_3$ (pH 5.5) を用いた。RPLC では分離が困難である非誘導体化糖が異性体 (スクロースおよびトレハロース) を含めて良好に分離され、高感度に検出された。検出感度に関する考察は後述する。なお、 t_0 マーカーにはネガティブ ESI-MS で容易に検出が可能で、かつ HILIC において保持を示さないドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を用いた。

HILIC 分離において最も分離に大きな影響を与えるファクターは RPLC と同様に移動相組成である。移動相組成の変化に伴いどのような保持の変化が生じるかを確認するために $\ln k$ の CH_3CN 濃度依存性を調べた (Figure 2-1-2)。水濃

度の増加に従い顕著な保持の減少が確認されたことから、このカラムは糖に対して HILIC モード特有の保持傾向を示すことが確認された。

なお、今回調製した MS-200T-PAAm はモノリス基材にテトラメトキシシラン (TMOS) のみを用いた第二世代のモノリスを用いている (実験の部を参照) [21]。第一世代との違いは、高性能 (低 H) という点だけではなく、キャピラリーカラム内に存在するシリカの絶対量の違いが挙げられる。前述の通り、モノリス型シリカカラムは低圧高性能という利点がある反面、カラム内を占めるシリカ量が少なく、従来のモノリス型シリカキャピラリーカラムでは粒子充填型カラムの 1/5 – 1/6 程度の保持しか発現できない欠点があった。原らはシランの仕込み量を従来の 1.4 倍とすることにより相比 (固定相 / 移動相体積比) を大幅に増大させることに成功しており [21], それらを HILIC 用カラムにも適用することにより高極性化合物に対しても大きな k を発現できると考えた。HPLC における k の重要性は前項で既に述べたが、本システムにおいては 80% CH₃CN 条件下で高極性二糖類のトレハロースに対して $k=4$ の十分な保持を発現しており、小さな α を有する糖異性体の更なる分離が期待された。

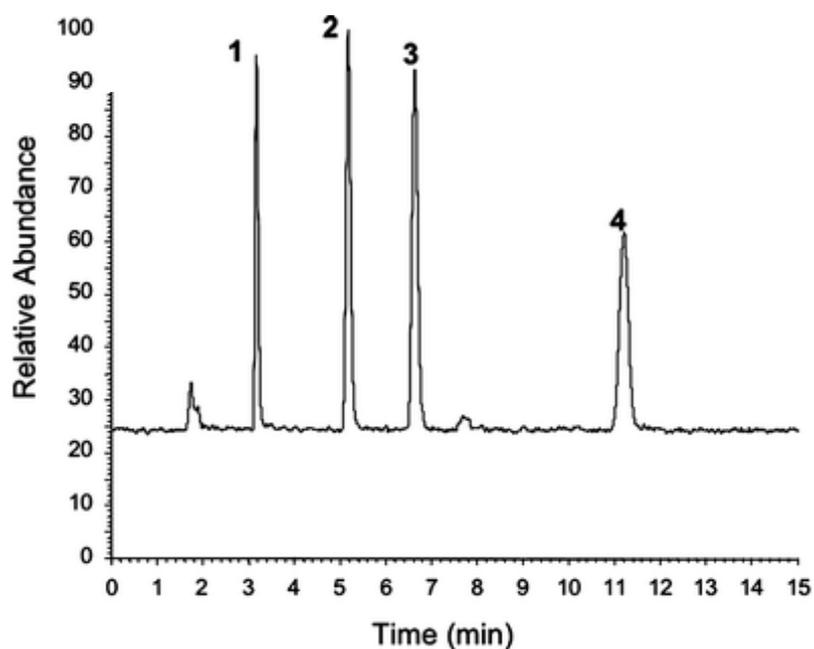


Figure 2-1-1. NanoLC-ESI-MS Total Ion Current Chromatogram of a Mixture of Mono-, Di- and Trisaccharides

Column: MS-200T-PAAm (267 mm × 200 μm I.D.), mobile phase: 80% CH₃CN/ 13 mM NH₄OCOCH₃ pH 5.5, temperature: ambient, detection: 2.0 kV negative ESI - ion-trap mass spectrometer (LTQ), solutes: 1 sedoheptulose, 2 sucrose, 3 trehalose, 4 raffinose (each 20 μg/mL), injection volume: 50 nL.

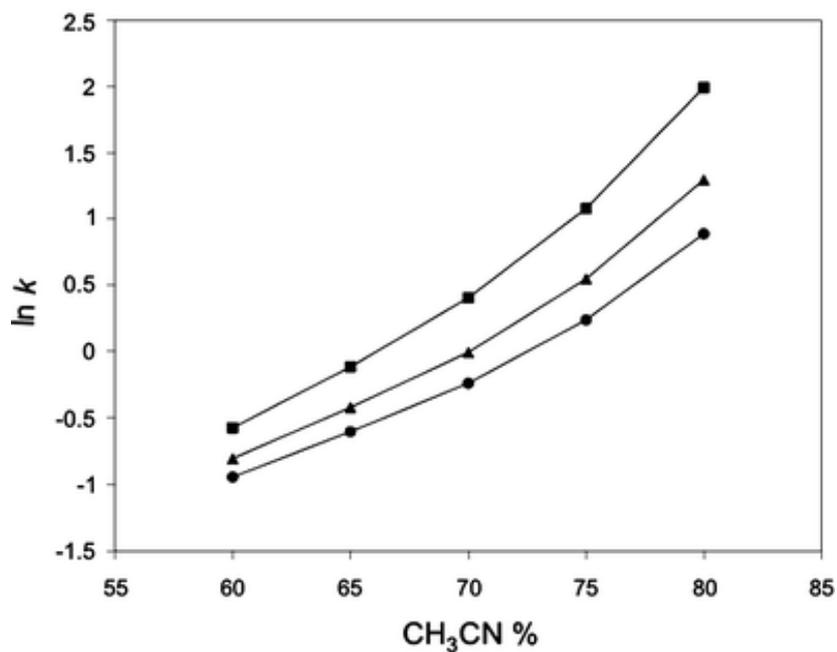


Figure 2-1-2. Plots of the $\ln k$ Values of Oligosaccharides in Various CH₃CN/Water Mixtures on a MS-200T-PAAm Column

Column: MS-200T-PAAm (195 mm × 200 μm I.D.), mobile phase: 60, 65, 70, 75, 80% CH₃CN/ 13 mM NH₄OCOCH₃ pH 5.5, temperature: 30 °C, detection: 2.8 kV negative ESI - tandem quadrupole time-of-flight mass spectrometer (Q-TOF micro), solutes: sucrose (●), trehalose (▲), raffinose (■) (each 100 μg/mL), injection volume: 50 nL.

第2項 van Deemter plot および kinetics plot による評価

Figure 2-1-3 に MS-200T-PAAm 並びに市販の HILIC 用カラムとして広く用いられている粒子充填型カラムの ZIC-cHILIC 3 μm と ACQUITY UPLC BEH HILIC 1.7 μm を用いて、ヌクレオシドを試料とした時の van Deemter plot を示す。ZIC-cHILIC 3 μm の固定相はホスホリルコリン基からなる双性イオン構造に由来して強い極性を示すことから HILIC 用カラムとして使用可能である。ACQUITY UPLC BEH HILIC 1.7 μm は未修飾シリカゲルであり、親水性およびアニオン性を有するシラノール基の特性に由来して、HILIC 用カラムとして広く活用されている。一方、今回調製した MS-200T-PAAm 固定相は中性のポリアクリルアミドで構成されている。(なお、Figure 2-1-3 中には、後述の MS-200T-PAA および MS-100H-UP に対する評価結果も合わせて記載した。本結果については後述する。)

ZIC-cHILIC 3 μm は最適線速度条件下において $H = 12 - 13 \mu\text{m}$ を示したが、 $u = 5 \text{ mm/s}$ の高速条件下においては $H = 30 \mu\text{m}$ まで急激に性能が低下した。また、ACQUITY UPLC BEH HILIC 1.7 μm は最適線速度条件下において $H = 9 - 10 \mu\text{m}$ を示しており、高速領域下における性能低下も比較的小さかった ($u = 5 \text{ mm/s}$ で $H = 13 - 14 \mu\text{m}$)。しかし、本結果は、RPLC における同一 d_p の C18 修飾粒子充填型カラムと比較して、明らかに低い性能であった。これは HILIC における流体力学的速度論が RPLC と異なること[78]に加えて、スラリー充填工程における充填均一性確保が困難であることに起因していると考えられる[79]。一方、MS-200T-PAAm に関しては、最適線速度条件下で $H = 6 - 7 \mu\text{m}$ の最も高い性能を示した。また、 $u = 5 \text{ mm/s}$ の高速領域においても $H = 14 - 15 \mu\text{m}$ を維持しており、高速分離にも適している。MS-200T-PAAm の基材に用いた第二世代モノリス型シリカキャピラリーカラムは、従来型と比較してドメインサイズ (骨格と流路の合計サイズ) がより小さく (2.2 μm)、構造の均一性が高い。均一な流路に起因する eddy 拡散項の寄与に加えて、小さな骨格に起因して固定相中 (骨格中) での試料拡散の遅れを低く抑えることができるため、従来型と比較して高性能を発揮する[21]。更に、本 HILIC 用モノリス型シリカキャピラリーカラムに関しては、特殊な表面修飾を施した後、粒子充填型カラムの製造時に度々課題となるスラリー充填工程の最適化が不要であり、予め形成されたモノリス型シリカ

骨格にコーティングを施す簡便な製造法であった点も、高性能なカラムが得られた要因と考えられる。

MS-200T-PAAm, MS-200T-PAA (詳細は後述), MS-100H-UP (詳細は後述), ZIC-cHILIC 3 μm (市販品) および ACQUITY UPLC BEH HILIC 1.7 μm (市販品) に対する kinetics plot ($P_{\text{max}} = 20 \text{ MPa}$) を Figure 2-1-4 に示す。明らかに3種のHILIC用モノリス型シリカキャピラリーカラムは粒子充填型カラムと比較して左および下領域にプロットが密集していることから、前述の高速分析条件下に加えて、長時間分析を要するメートル長のロングカラムフォーマットでその潜在能力を発揮することが示された。具体的には、MS-200T-PAAm は $t_0 = 20 \text{ s}$ の高速分析条件下で $N = 10,000$ を発現できる一方、ZIC-cHILIC 3 μm は $N = 3,000$ の発生しか見込めない。また、 $t_0 = 1,000 \text{ s}$ という長時間分析条件下において、MS-200T-PAAm は $N = 200,000$ を超える高理論段数の発生が期待され、HILICモードにおけるモノリス型シリカキャピラリーカラムの有用性が示唆された。

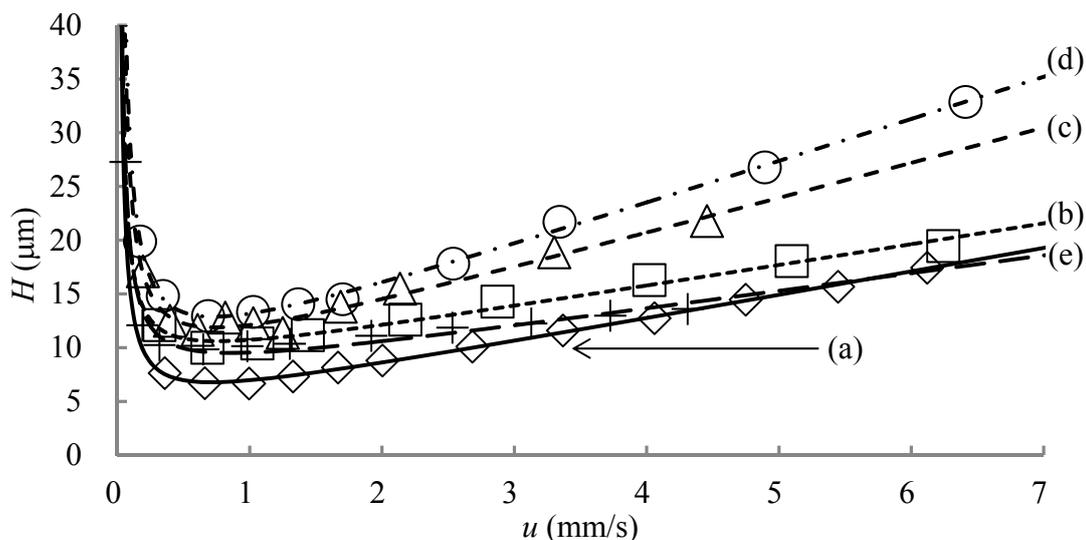


Figure 2-1-3. van Deemter Plots for Various Columns for HILIC

(a) Diamond plot (\diamond): MS-200T-PAAm in 80% CH_3CN at 30 °C, (b) square plot (\square): MS-200T-PAA in 90% CH_3CN at 30 °C, (c) triangle plot (\triangle): MS-100H-UP in 90% CH_3CN at 25 °C, (d) circle plot (\circ): 3 μm ZIC-cHILIC column and (e) plus plot (+): 1.7 μm ACQUITY UPLC BEH HILIC column in 80% CH_3CN at 30 °C column temperature. The described van Deemter curves on plots were calculated by the solver function of Excel for the van Deemter plots as the equation, $H = A + B/u + Cu$. ((a) Solid line: MS-200T-PAAm, (b) dotted line: MS-200T-PAA, (c) dashed line: MS-100H-UP, (d) dot-dashed line: ZIC-cHILIC 3 μm column, (e) long-dashed line: ACQUITY UPLC BEH HILIC 1.7 μm column.)

Table 2-1-1. Permeability, K Values for Various Columns for HILIC

Column	K (m ²)
MS-200T-PAAm	3.9×10^{-14}
MS-200T-PAA	5.1×10^{-14}
MS-100H-UP	2.1×10^{-13}
3 μ m ZIC-cHILIC	1.0×10^{-14}
1.7 μ m ACQUITY UPLC BEH HILIC	3.9×10^{-15}

Column porosities (ϵ) of 0.9 and 0.7 are assumed for monolith and particle packed columns, respectively.

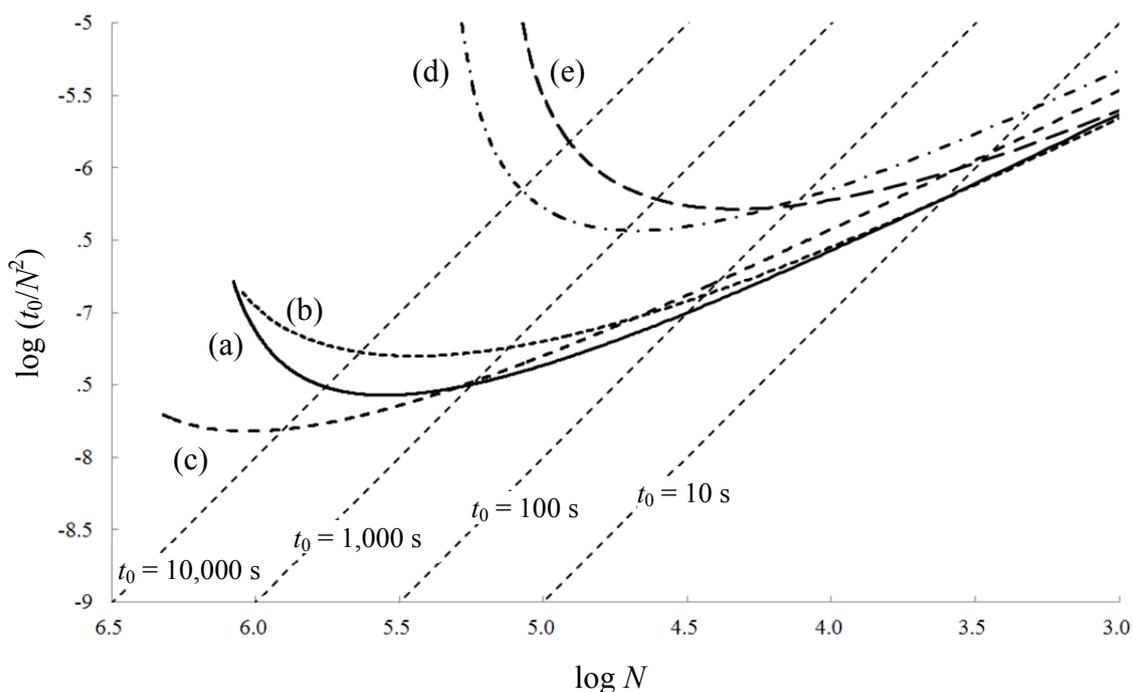


Figure 2-1-4. Kinetics Plots for Various Columns under 20 MPa Pressure Limit
 Assumed maximum pressure of 20 MPa, (a) solid line: MS-200T-PAAm, (b) dotted line: MS-200T-PAA, (c) dashed line: MS-100H-UP, (d) dot-dashed line: ZIC-cHILIC 3 μ m column, (e) long-dashed line: ACQUITY UPLC BEH HILIC 1.7 μ m column.

第3項 保持に対する温度の効果

移動相と固定相間での分配により保持が発現する RPLC のような HPLC モードにおいて、 k とカラム温度 (T) の関係は van't Hoff の式で表される。

$$\ln k = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} + \ln \phi \quad (2-1)$$

(ΔH : エンタルピー変化, ΔS : エントロピー変化, ϕ : 相比)

Alpert は HILIC による高極性化合物の保持は、大部分が有機溶媒の疎水性移動相と極性固定相の表面上に濃縮された水の層で作られる二次的な固定相との間の分配によって達成されると仮定した[28]。Figure 2-1-5 に温度を 30 °C から 80 °C まで変化させることにより得た van't Hoff plot を示す。試料として、スクロース、トレハロース、ラフィノースの非誘導体化糖を用いた。それぞれの化合物に対して、温度の上昇に伴い $\ln k$ が減少する直線関係のプロットが得られた。この関係は RPLC において一般に確認される現象と類似しており、MS-200T-PAAm による糖の分離は RPLC と同様に分配係数の違いによって行われていると考えられる。また固定相がポリメリック相である場合、温度を変化させることにより形状の変化や相転移が生じ、保持挙動に変化を与える場合があるが[54][80]、今回の MS-200T-PAAm 固定相の場合はそのような現象は確認されなかった。

式(2-1)よりそれぞれの化合物の保持による ΔH を求めることができる。Figure 2-1-5 より求めた 3 種の糖に対する保持による ΔH は、スクロースに対して -8.2 kJ/mol, トレハロースに対して -7.9 kJ/mol, 三糖のラフィノースに対して -9.7 kJ/mol であった。すべての値が負の値をとっており、糖は移動相から固定相への移動の際に発熱過程を経由していることになる。HILIC とよく対比されるものに、疎水性相互作用クロマトグラフィー (HIC) がある。HIC においては、温度を上昇させるにつれて保持が増加することが知られている[54]。すなわち今回の糖に対する HILIC とは逆の挙動を示すことが知られており、HIC と HILIC は保持のメカニズムが大きく異なる。HILIC における保持のメカニズムの仮説は様々なものが提案されているが、完全な解明は未だになされていない[29]。

次に、Figure 2-1-6 にヌクレオシド類に対する van't Hoff plot を示す。ヌクレオシドはリボース環（又はデオキシリボース環）に核酸塩基が結合した化合物であり、一種の糖類とみなすことができる。評価に用いたヌクレオシドはグアノシン ($pK_a = 10$)、シチジン ($pK_a = 4.5$) およびそれらのデオキシリボース体であり、分析条件次第で試料自身が電荷を帯びうる化合物群である。Figure 2-1-6 に示されている通り、Figure 2-1-5 と同じく温度の上昇に伴い直線的に全ての化合物の $\ln k$ 値は減少傾向にあるが、シチジン系化合物はその傾向が大きく、70 °C 付近で 2-デオキシグアノシンとシチジンの溶出順が逆転した。これは、温度変化によって溶質および移動相成分の pK_a が影響を受け、溶質のイオン化度が変化したためと考えられる。このように、HILIC モードによる分析を実施するにあたり温度管理は重要なファクターであると考えられる。

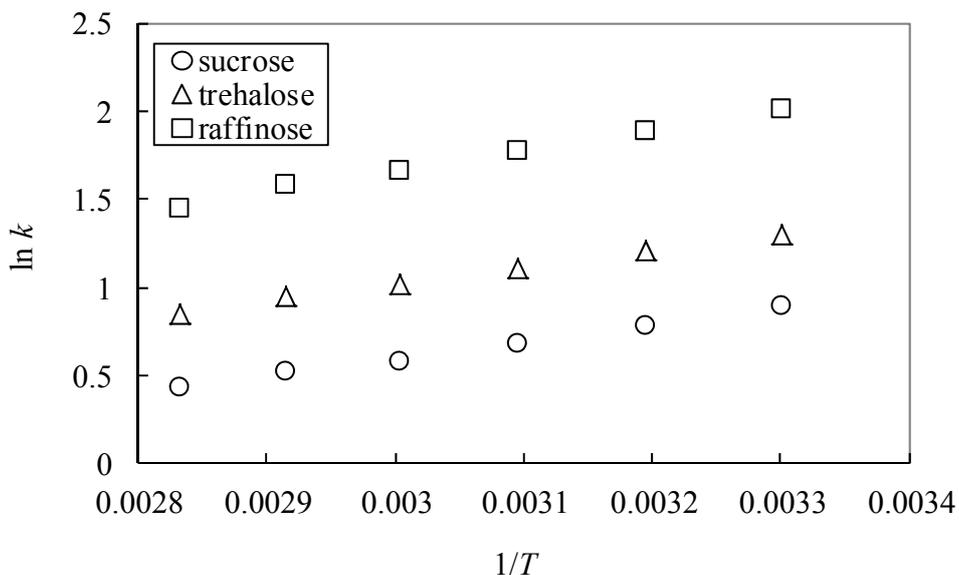


Figure 2-1-5. van't Hoff Plot of Underivatized Carbohydrates for MS-200T-PAAm

Column: MS-200T-PAAm (195 mm × 200 μm I.D.), mobile phase: 80% CH₃CN/ 13 mM NH₄OCOCH₃ pH 5.5, temperature: 30, 40, 50, 60, 70, 80 °C, detection: 2.8 kV negative ESI - tandem quadrupole time-of-flight mass spectrometer (Q-TOF micro), solutes: sucrose (○), trehalose (△), and raffinose (□) (each 100 μg/mL), injection volume: 50 nL.

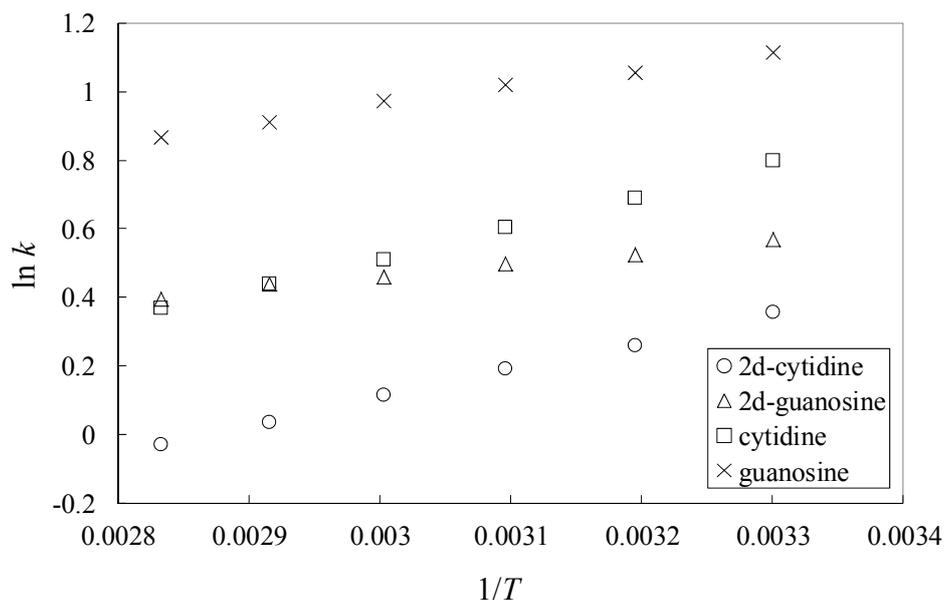


Figure 2-1-6. van't Hoff Plot of Nucleosides for MS-200T-PAAm

Column: MS-200T-PAAm (195 mm × 200 μm I.D.), mobile phase: 80% CH₃CN/ 13 mM NH₄OCOCH₃ pH 5.5, temperature: 30, 40, 50, 60, 70, 80 °C, detection: 2.8 kV negative ESI - tandem quadrupole time-of-flight mass spectrometer (Q-TOF micro), solutes: 2-deoxycytidine (○), 2-deoxyguanosine (△), cytidine (□), guanosine (×) (each 10 μg/mL), injection volume: 50 nL.

第4項 糖分離への応用

前述の通り、MS-200T-PAAm を用いることによって非誘導体化糖類を良好に分離することが可能である。Figure 2-1-7(a)および Figure 2-1-7 (b)に非誘導体化糖類をアイソクラティック条件にて更に高速分離した例を示す。 $u = 7.6 \text{ mm/s}$ の高速領域下において、良好な分離を維持しており、三糖までであれば異性体を含めて汎用 HPLC 条件下 ($P_{\max} = 20 \text{ MPa}$ 以下) で5分以内での分離分析が可能であった。また、本 HILIC 分析は室温条件下で実施しているため、還元糖であるグルコースやマルトースに関しては、アノマーの分離が生じている。これは、時に糖類の HPLC 分析を複雑化させる一因となるが、HPLC 性能の評価の観点では、幾何異性体の一種であるアノマーを完全分離する程の高性能を有しているとの見方もできる。

また、HILIC においては経時的に水濃度を増やす RPLC とは逆方向のグラジエント溶出法を用いることにより、広い範囲の高極性化合物を高い分離効率で溶出させることが可能である。Figure 2-1-8(a)にグラジエント法によるグルコースオリゴマー (1-7 量体) の分離結果を示す。室温で分離を行っているため、前項同様にアノマー分離が生じているが、広い分子量の糖類に対してシャープなピークが得られた。糖分析においては、単糖から 10 量体を超えるオリゴマー領域の糖類まで幅広いサイズの分離が求められており、今後の応用現場における本システムの適用が期待される。また、本システムは nanoLC-ESI-MS システムであることから、分離だけでなく高い検出感度も期待できる。Figure 2-1-8(b)に、更に希薄濃度の試料を分析した結果を示す。なお、本例は絶対量で各 200 pg の少量試料を $m/z = 150 - 2,000$ のフルスキャンモードで分析した結果であるにも関わらず、高いシグナル-ノイズ比 (S/N) が得られた。一般に非誘導体化糖の分析に汎用される示差屈折計における検出限界 (LOD) は 3-5 μg とされており [77], 10,000 倍以上高い検出感度が得られた。

次に、本 nanoLC-ESI-MS システムの非誘導体化糖に対する LOD を検証した。本研究で用いた MS はリニアイオントラップ型マスアナライザーを有しており、単独で MSⁿ を実施できるメリットを持つ。このようなタイプの MS を用いて高い感度並びに特異性を得るためには、ターゲットとなるプリカーサーイオンを絞り、衝突誘起解離を起こさせた後、特定のフラグメントイオンを検出する選択的反応モニタリング (SRM) 法が用いられる。今回は非還元二糖のスクロー

ス、トレハロースを対象に分離検出限界を求めるために、プリカーサーイオン $m/z = 401$ ($M + \text{CH}_3\text{COO}^-$)、フラグメントイオン $m/z = 341$ (M) を設定し、検出限界を求めた。検出限界近くの SRM クロマトグラムを Figure 2-1-9 に示す。濃度 9.4 nM の希薄サンプルを 50 nL (化合物の絶対注入量として 160 fg) という極少量の注入量で分析を行っているにもかかわらず、高い S/N 比でシャープなピークが検出された。本クロマトグラムから類推される検出限界はサンプル濃度で 5 nM 以下、絶対注入量では 100 fg 以下 (amol 領域) であり、これは従来の高感度分析法とされてきたパルスアンペロメトリック電気化学検出法 (LOD = 20 ng) の 10^5 倍以上の検出感度である[77]。今後、試料注入時点の濃縮工程を最適化することにより、さらに高い検出感度が期待される。

さらに、生体試料中の微量糖類の分離検出を検討した。植物由来試料にはグルコースやスクロースのような主要な糖類に加えて、その他多くのマトリックスが存在しており、ターゲットとなる極微量に含有される希少糖類を特別な前処理や誘導体化なしで分離検出することは容易ではない。Figure 2-1-10(a)および Figure 2-1-10(b)にトウモロコシおよび大豆中の二糖分析を実施した結果を示す。SRM 条件には前述のプリカーサーイオン $m/z = 401$ 、プロダクトイオン $m/z = 341$ のトランジションを用いており、本クロマトグラム上に現れているピークは全て二糖異性体群であると考えられる。トウモロコシ抽出物に関して、大きなスクロースピークの裾野に微量のトレハロースピークが確認された一方、大豆抽出物に関してはスクロース以外の二糖類は検出されなかった。

もう一つの例として、シロイヌナズナ抽出物を同様の二糖分析に供した結果を Figure 2-1-10(c)に合わせて示す。シロイヌナズナに対しては、多くの高極性化合物が多く抽出されており、多数の二糖異性体の分離ピークが確認された。標準品の保持時間から、スクロース、マルトース、トレハロース (図中の 1, 2 および 3 ピーク) の同定は可能であったが、その他の多くのピークについては同定不可能であった。なお、SRM 分析条件より、これらすべてのピークは二糖異性体であると推測される。

結果、多くの未知糖類や希少糖類の分離検出が可能であった点から、このシステムの有用性を確認した。今後、本システムを用いた糖を含む高極性化合物のデータベースの作成等、メタボロミクス分野での応用が期待される。

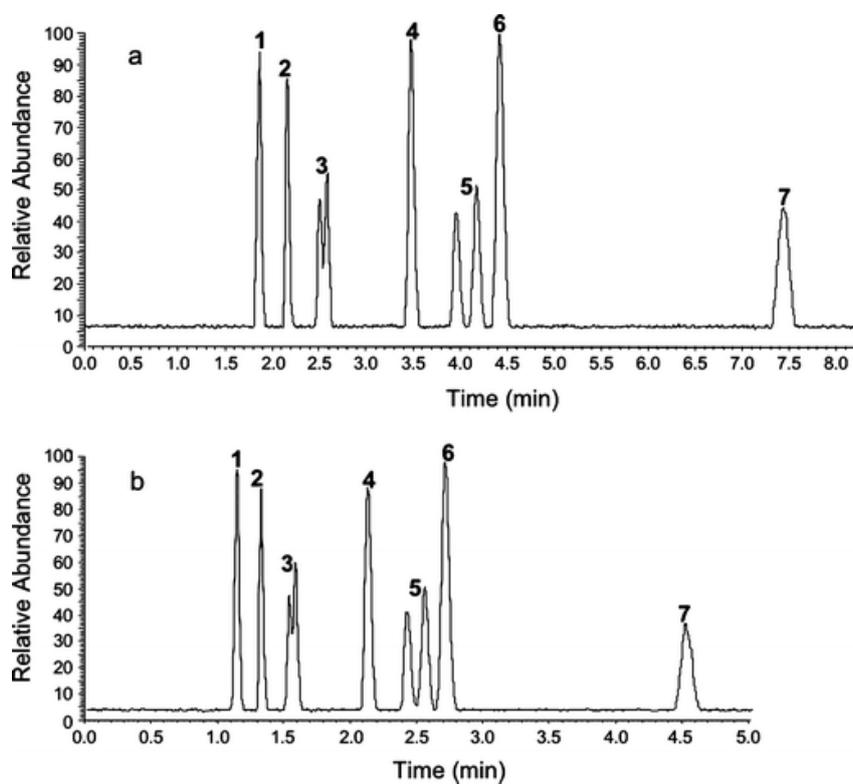


Figure 2-1-7. NanoLC-ESI-MS Base Peak Chromatograms of a Mixture of Mono-, Di-, and Trisaccharides

Column: MS-200T-PAAm (267 mm × 200 μm I.D.), mobile phase: 80% CH₃CN/ 13 mM NH₄OCOCH₃ pH 5.5, u = (a) 3.9 mm/s and (b) 7.6 mm/s, temperature: ambient, detection: 2.2 kV negative ESI - ion-trap mass spectrometer (LTQ), solutes: 1 ribose, 2 sedoheptulose, 3 glucose, 4 sucrose, 5 maltose, 6 trehalose, 7 raffinose (each 20 μg/mL), injection volume: 50 nL.

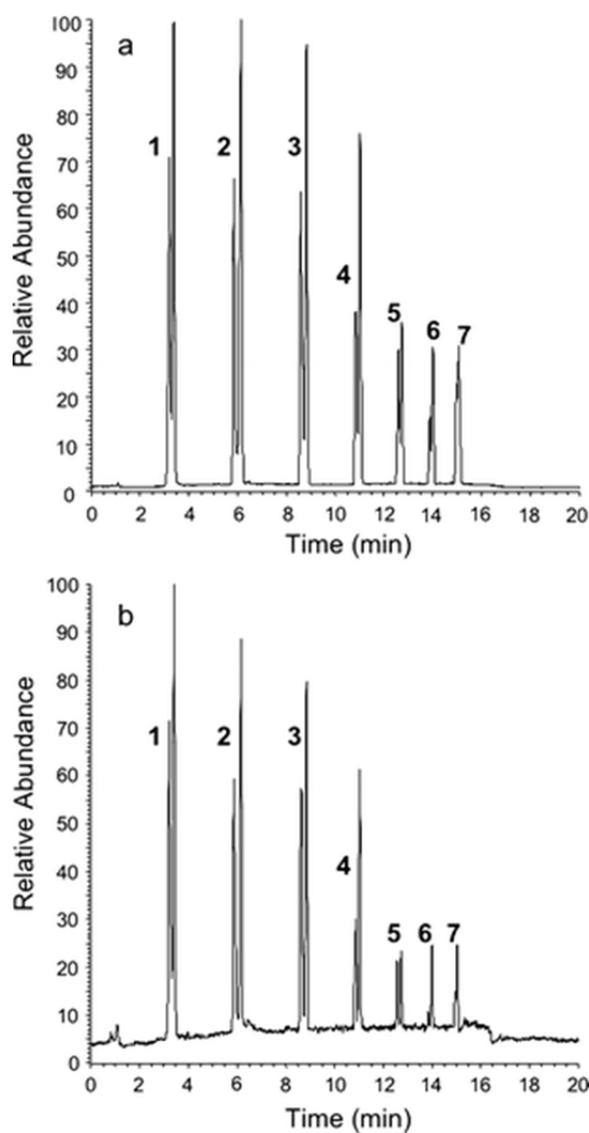


Figure 2-1-8. NanoLC-ESI-MS Base Peak Chromatograms of a Mixture of Maltooligosaccharides

Column: MS-200T-PAAm (267 mm × 200 µm I.D.), mobile Phase: 90 – 60% CH₃CN (13 mM NH₄OCOCH₃) in a 15 min linear gradient, $u = 4.2$ mm/s, temperature: ambient, detection: 2.0 kV negative ESI - ion-trap mass spectrometer (LTQ), solutes: 1 glucose, 2 maltose, 3 maltotriose, 4 maltotetraose, 5 maltopentaose, 6 maltohexaose, 7 maltoheptaose, sample concentrations (a) 20 µg/mL and (b) 4 µg/mL, injection volume: 50 nL.

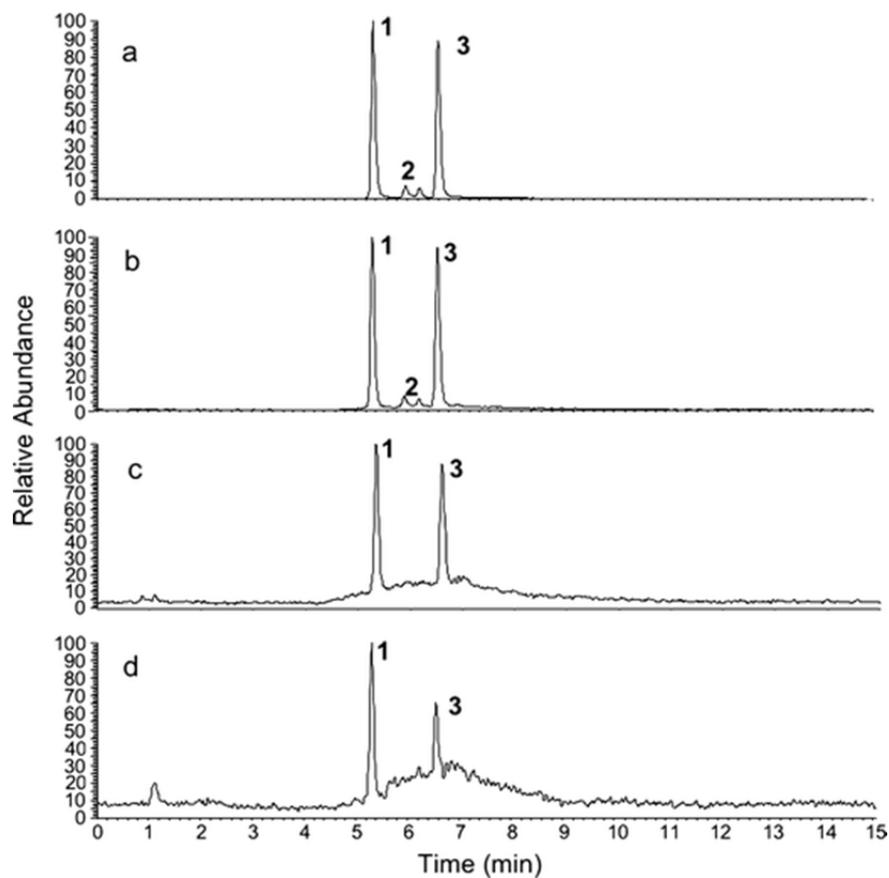


Figure 2-1-9. NanoLC-ESI-MS/MS SRM Chromatograms of a Mixture of Disaccharides.

Column: MS-200T-PAAm (267 mm × 200 μm I.D.), mobile phase: 90 – 70% CH₃CN (13 mM NH₄OCOCH₃) in 10 min linear gradients, $u = 4.2$ mm/s, temperature: ambient, detection: 2.0 kV negative ESI - ion-trap mass spectrometer (LTQ), MS: $m/z = 401$, MS/MS (SRM): $m/z = 341$, solutes: 1 sucrose, 2 maltose, 3 trehalose, sample concentrations: (a) 400 ng/mL, (b) 80 ng/mL, (c) 16 ng/mL and (d) 3.2 ng/mL, injection volume: 50 nL.

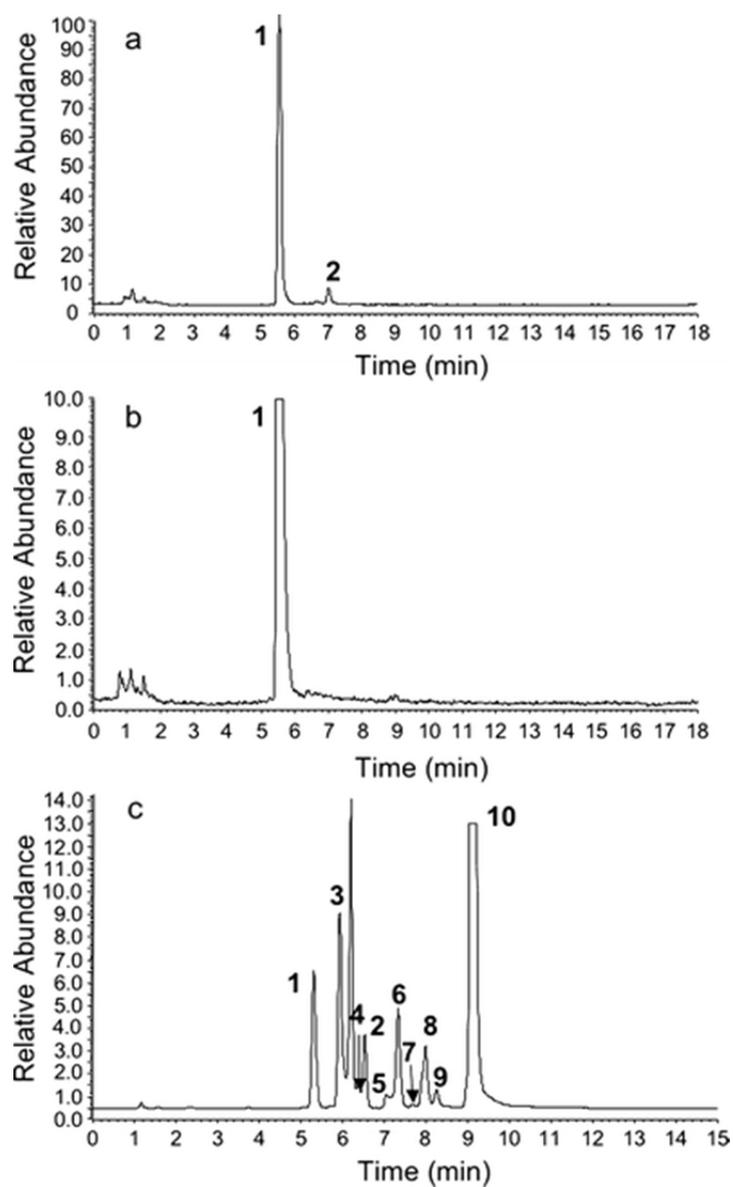


Figure 2-1-10. NanoLC-ESI-MS/MS SRM Chromatograms of Plant Extracts
The same separation-detection conditions as Figure 2-1-9 were used. Samples: (a) a corn extract, (b) a soybean extract and (c) an arabidopsis thaliana leaf extract, peaks: 1 sucrose, 2 trehalose, 3 maltose (α and β isomers), 4 – 10 unknown disaccharides, injection volume: 50 nL

第2節 ポリアクリル酸修飾モノリス型シリカキャピラリーカラムの開発と応用

前節では非解離型の親水性ポリマーであるポリアクリルアミドをモノリス型シリカキャピラリーカラムに被覆修飾し、そのカラムの特性評価と共に非誘導体化糖類の分離検出例を示した。しかし、創薬研究やメタボロミクス、プロテオミクス等の応用分野における分析対象は中性化合物に限らず、イオン性化合物も多数存在し、ポリアクリルアミド修飾モノリス型シリカキャピラリーカラム単一で全ての化合物を網羅的に分離することは困難である。分析対象により、様々に異なる特性の固定相を適切に選択する必要があることから、モノリス型シリカキャピラリーカラム固定相のバリエーションを増やすこととした。

本節では弱酸性モノマーであるアクリル酸をモノリス型シリカキャピラリーカラム内で重合させることにより MS-200T-PAA を調製し、新規 WCX カラムとしての性能を評価した。また、本固定相自身が持つ極性にも着目し、HILIC 用カラムとしての使用も検討したところ、高い分離性能、および前節におけるポリアクリルアミド修飾モノリス型シリカキャピラリーカラムとは異なる興味深いカラム特性が得られた。詳細を以下に述べる。

第1項 分離効率の評価とタンパク質分離への適用

Figure 2-2-1 に市販のカチオン交換カラムである Inertsil CX ($d_p = 5 \mu\text{m}$, 4.6 mm I.D., $L = 25 \text{ cm}$) および MS-200T-PAA による核酸塩基の分離クロマトグラムを示す。それぞれ良好な分離が達成され、その溶出順は予想通り pK_a が小さい順となった。カラム性能を評価するために N , H , セパレーションインピーダンス (E) を算出した。 E は、次式で表され、総合的なカラム性能を示すパラメーターとして、Knox らにより提唱された[53]。

$$E = \frac{t_0 \Delta P}{N^2 \eta} = \frac{\Delta P}{N} \times \frac{t_0}{N} \times \frac{1}{\eta} = \frac{H^2}{K} \quad (2-2)$$

この値は一理論段数を発生させるのに必要な時間およびカラム負荷圧を考慮

している。 E を用いることで、異なるカラム間における総合的なカラム性能の比較が可能であり、 E 値が小さいほど、高い理論段数および低圧での分離が達成されることを意味する。Table 2-2-2 に、MS-200T-PAA による核酸塩基に対する N , H , E と、比較対象として同じくカチオン交換固定相を有する市販の粒子充填型カラムである Inertsil CX の値を示す。ピークの対象性が高いウラシル、チミン、シトシンに対しては MS-200T-PAA は $H = 10 \mu\text{m}$, $E = 1,000 - 4,000$ を示しており、Inertsil CX と比較して二倍以上の高性能を示した。

モノリス型シリカキャピラリーカラムに対する固定相修飾法は、あらかじめ骨格が形成されたモノリス型シリカ基材に対して表面修飾を行うため、充填剤の不均一なスラリー充填に伴う性能低下が小さいと考えられる。また、モノリス型シリカカラムは小さな骨格径を有しているため、タンパク質のような細孔内での拡散が遅い試料に対して、粒子型と比較してより高性能を発現する[82]。以上の利点の発現を期待して、MS-200T-PAA を用いてタンパク質分離を実施した結果を Figure 2-2-2(a) に示す。 $t_g = 15 \text{ min}$ の速い塩グラジエント溶出にも関わらず、シャープなピークがタンパク質に対して得られた。溶出順も塩基性タンパク質である trypsinogen ($pI = 9.3$) と ribonuclease A ($pI = 9.4$) が大きく保持される結果であった。

タンパク質は C18 修飾カラム等を用いた RPLC によって良好に分離されることは広く知られている。Figure 2-2-2 (b) に MS-200T-C18 を用いた RPLC による同サンプルの分離クロマトグラムを合わせて示す。それぞれのクロマトグラムより算出した PC は、MS-200T-C18 において $PC = 84 / 15 \text{ min}$, MS-200T-PAA において $PC = 74 / 15 \text{ min}$ であり、RPLC とほぼ同等の分離性能を有する IEC 用カラムを得ることができた。また、これら二つのモードにおけるそれぞれのピークの溶出順が逆転していることより、これらの分離モードの直交性が確認された。

また、これまで述べてきた通り、モノリス型シリカカラムは低圧送液が可能で、高速領域下においても高性能を維持するという特徴を有する。これらの特徴が MS-200T-PAA においても維持されているかを検討するために、さらに短い t_g によるタンパク質の高速分離を検討した。結果を Figure 2-2-3 に示す。汎用 HPLC における $P_{\text{max}} = 20 \text{ MPa}$ までの高速分離条件を検討した結果、 $t_g = 15 \text{ min}$ の基本分離と比較して $t_g = 5 \text{ min}$ および 3 min の高速分析条件下でも同等の分離性能を維持することを確認した。(なお、本クロマトグラムを得るにあたり、グ

ラジエント溶出の理論に従い、 t_g の変化に合わせて反比例的に u を変更した) このような高性能 IEC 分離は従来の粒子充填型カラムでは困難であり、MS-200T-PAA の有用性を示すものである。また、キャピラリースケールでの使用により、希少なタンパク質の未変性状態を保った高性能分離 (および分取) を実施できる点で、今後の応用が期待される。

前述の例では溶出強度を上げるために塩化ナトリウムの濃度グラジエントを用いたが、その代替として $\text{NH}_4\text{OCOCH}_3$ を用いた場合の高速 HPLC クロマトグラムを Figure 2-2-4 に示す。緒言で述べた IEC - RPLC を組み合わせた 2D-LC システムは、一次元目でステップワイズのグラジエントにより数フラクションの粗分離した後に、二次元目の逆相モードで長い時間をかけて精密な分離を行うタイプがほとんどである。このタイプの 2D-LC は、システム全体の分離性能 (全体の PC) の大半を二次元目の RPLC で稼いでおり、ステップワイズ溶出法を使用している時点で、一次元目の IEC 分離を重要視していない。そこで一次元目の分離性能を十分に生かしたリニアグラジエント溶出を用い、すべての一次元目ピークに対して分画を取る完全 2D-LC システムの活用が考えられるが、一次元目の IEC に NaCl を用いた塩濃度グラジエント溶出を用いると、その不揮発性物質上 MS へと直結する二次元目にダイレクトに導入することが困難となり、脱塩ステップが分画切り替え前後に必要となる。しかし、それは P_M の極端な増大をもたらす結果となり、システム全体の性能低下が懸念される。そこで、一次元目に脱塩処理が不要な揮発性塩を用いた分離が可能であれば、一次元目の分離性能を十分に生かした完全 2D-LC を短時間で実施できる可能性が広がる。今回開発した MS-200T-PAA は $\text{NH}_4\text{OCOCH}_3$ 塩のみを用いた高速グラジエント溶出でも極めて塩基性が高い lysozyme ($pI = 11$, $MW = 14.3$ kDa) まで良好に溶出し、かつ $PC = 30 - 40 / 3$ min の高性能を維持していることから、一次元目の IEC 性能を十分に生かした IEC-RPLC-2D-LC システムの構築が可能であることが示唆された。

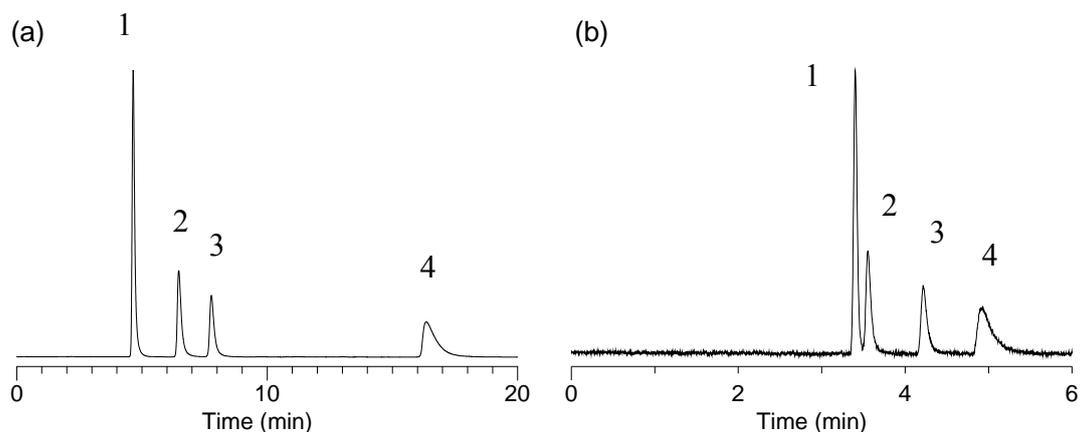


Figure 2-2-1. Separation of Nucleic Bases by Inertsil CX and MS-200T-PAA in WCX Mode

Column: (a) Inertsil CX 5 μm (250 mm \times 4.6 mm I.D.), (b) MS-200T-PAA (200 mm \times 200 μm I.D.), mobile phase: 20 mM sodium phosphate buffer (pH 6.9), temperature: ambient, detection: 254 nm, solutes: 1 uracil, 2 thymine, 3 cytosine, 4 adenine (each 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Table 2-2-2. Comparison of Column Efficiencies (MS-200T-PAA and Inertsil CX)

Parameter	Uracil		Thymine		Cytosine		Adenine	
	PAA	CX	PAA	CX	PAA	CX	PAA	CX
N	29,000	12,000	19,000	10,000	17,000	12,000	5,000	6,000
H (μm)	6.8	20	11	24	11	22	40	44
E	1,100	7,700	2,800	11,000	3,200	8,700	39,000	35,000

PAA and CX stand for MS-200T-PAA and Inertsil CX columns, respectively. The former provided permeability $K = 4.1 \times 10^{-14} \text{ m}^2$, while the value was $K = 5.4 \times 10^{-14} \text{ m}^2$ for the latter.

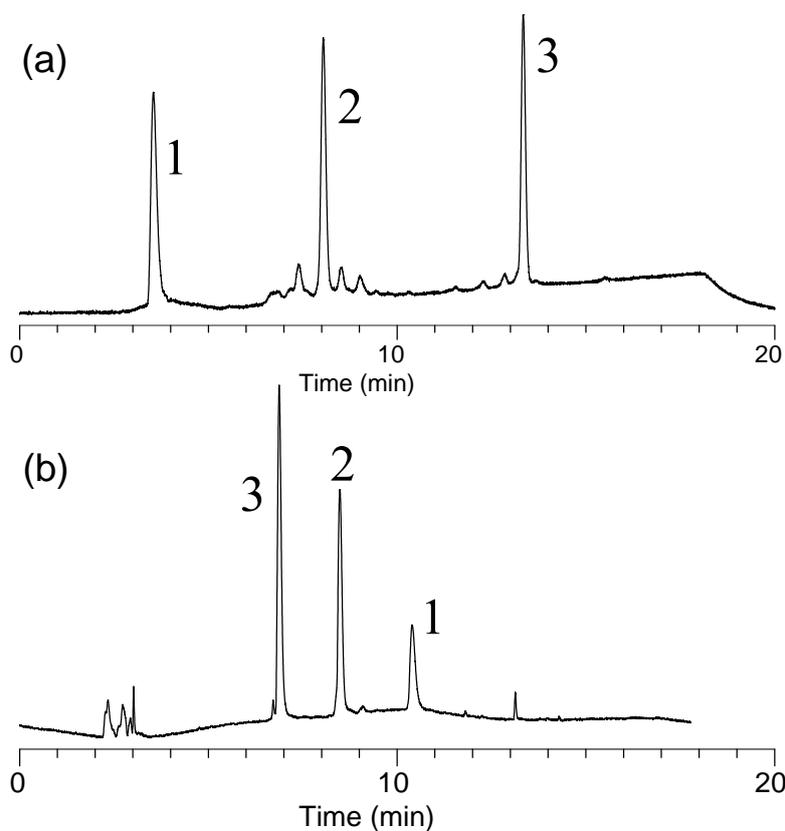


Figure 2-2-2. Separation of Proteins by a MS-200T-PAA in WCX and MS-200T-C18 in RPLC

(a) Column: MS-200T-PAA (200 mm × 200 μm I.D.), mobile phase: A 20 mM sodium phosphate buffer (pH 6.9), B 1.5 M NaCl in A, gradient profile: B 0 – 50% in 15 min, linear gradient, (b) column: MS-200T-C18 (240 mm × 200 μm I.D.), mobile phase: A water 0.2% HCOOH, B CH₃CN 0.2% HCOOH, gradient profile: B 5 – 80% in 15 min, linear gradient, solutes: 1: ovalbumin, 2: trypsinogen, 3: ribonuclease A (each 100 μg/mL), temperature: 20 °C, detection: 280 nm, injection volume: 50 nL.

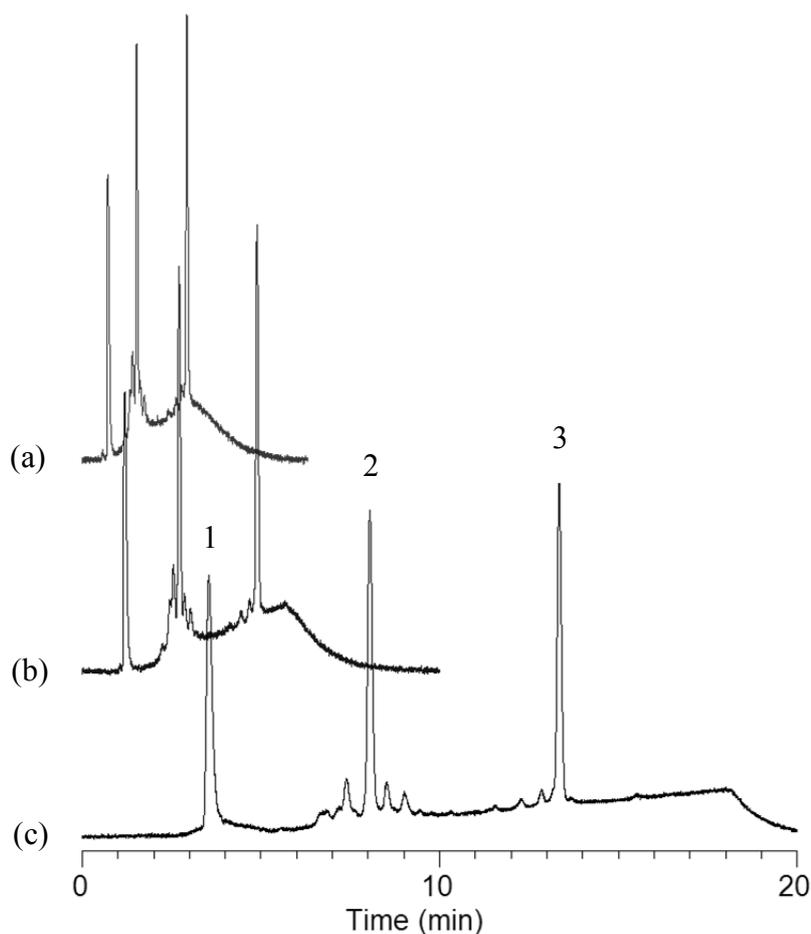


Figure 2-2-3. Fast Separation of Proteins by a MS-200T-PAA in WCX Mode

Column: MS-200T-PAA (200 mm × 200 μm I.D.), mobile phase: A 20 mM sodium phosphate buffer (pH 6.9), B 1.5 M NaCl in A, gradient profile: B 0 – 50%, linear gradient, solutes: 1 ovalbumin, 2 trypsinogen, 3 ribonuclease A (each 100 μg/mL), temperature: 20 °C, detection: 280 nm, injection volume: 50 nL.

(a) $t_g = 3$ min, $u = 4.66$ mm/s, $\Delta P = 19.6$ MPa: (b) $t_g = 5$ min, $u = 2.80$ mm/s, $\Delta P = 11.8$ MPa: (c) $t_g = 15$ min, $u = 0.94$ mm/s, $\Delta P = 3.9$ MPa.

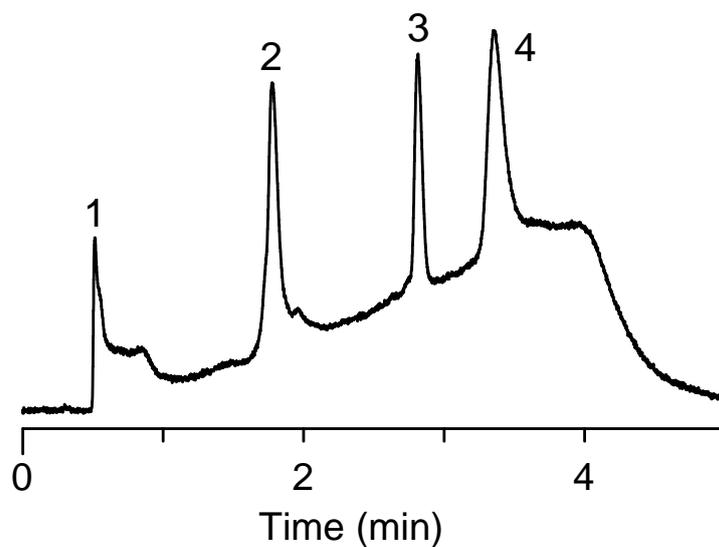


Figure 2-2-4. Separation of Proteins by a MS-200T-PAA in WCX Using $\text{NH}_4\text{OCOCH}_3$, Volatile Salt for Gradient Elution

Column: MS-200T-PAA (178 mm \times 200 μm I.D.), mobile phase: A 13 mM $\text{NH}_4\text{OCOCH}_3$ (pH 5.5), B 1.5 M $\text{NH}_4\text{OCOCH}_3$ (pH 5.5), gradient profile: B 0 – 100% in 15 min, linear gradient: Solutes: 1 ovalbumin, 2 trypsinogen, 3 ribonuclease A, 4 lysozyme (each 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), temperature: 20 $^\circ\text{C}$, detection: 280 nm, injection volume: 50 nL.

第2項 HILIC用カラムとしての検討

MS-200T-PAAの固定相は弱酸性であると同時に高極性であるため、HILIC用カラムとしての使用も可能である。第2章第1節第1項のMS-200T-PAAm固定相の特性評価と同じく、まず高極性化合物の代表である糖を用いて評価を行った。Figure 2-2-5にMS-200T-PAAによる非誘導体化糖のHILICクロマトグラムを示す。移動相には80% CH₃CN/13 mM NH₄OCOCH₃ (pH 5.4)を用いており、RPLCでは t_0 付近に溶出する3糖までを異性体を含めて良好に分離検出することが可能であった。MS-200T-PAAのラフィノースに対する k はMS-200T-PAA固定相で $k=20.5$ であり、 $k=7.3$ のMS-200T-PAAm固定相と比較して2.8倍大きな保持能力を示した。この値は移動相pH 5.5の条件下で得られた値であり、その時のMS-200T-PAA固定相はその前駆体モノマーであるアクリル酸の pK_a に基づき大部分がイオン型であったと考えられる。イオン型固定相は非常に高極性であるため、HILICモードにおける保持は大きくなると予想される。なお、非解離状態（分子型）のMS-200T-PAA固定相の保持挙動に関しては後で詳しく述べる。

Figure 2-2-5に移動相中の水濃度を増やすことによるクロマトグラム変化を示す。水濃度を増やすことにより保持が小さくなっていることから、MS-200T-PAAm同様に、MS-200T-PAAを用いた本システムはHILICモードとしての特徴を有していることが確認された。移動相組成の変化に伴いどの程度の保持の変化があるかを示すために $\ln k$ のCH₃CN濃度依存性を検討した（Figure 2-2-6）。その結果、MS-200T-PAAmと同様に水濃度の増加に従い保持が減少しており、HILICモード特有の保持挙動が確認された。

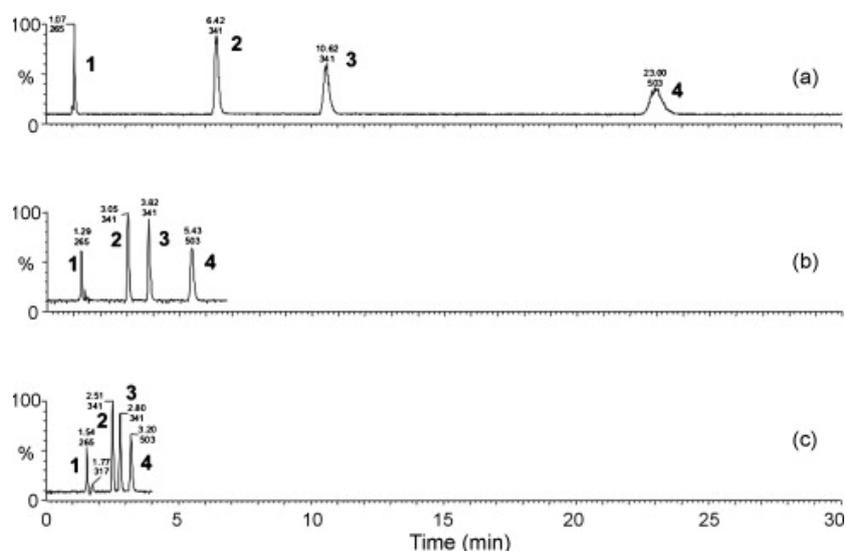


Figure 2-2-5. NanoLC-ESI-MS Total Ion Current Chromatogram of Sucrose, Trehalose, and Raffinose by MS-200T-PAA in HILIC Mode

Column: MS-200T-PAA (174 mm × 200 μm I.D.), temperature: 30 °C, detection: 2.8 kV negative ESI - tandem quadrupole time-of-flight mass spectrometer (Q-TOF micro), solutes: 1 sodium dodecylsulfate, 2 sucrose, 3 trehalose, 4 raffinose (each 100 μg/mL), injection volume: 50 nL, mobile phase: (a) CH₃CN/13 mM NH₄OCOCH₃ (pH = 5.4) = v/v 80/20, (b) CH₃CN/13 mM NH₄OCOCH₃ (pH = 5.4) = v/v 70/30, and (c) CH₃CN/13 mM NH₄OCOCH₃ (pH = 5.4) = v/v 60/40.

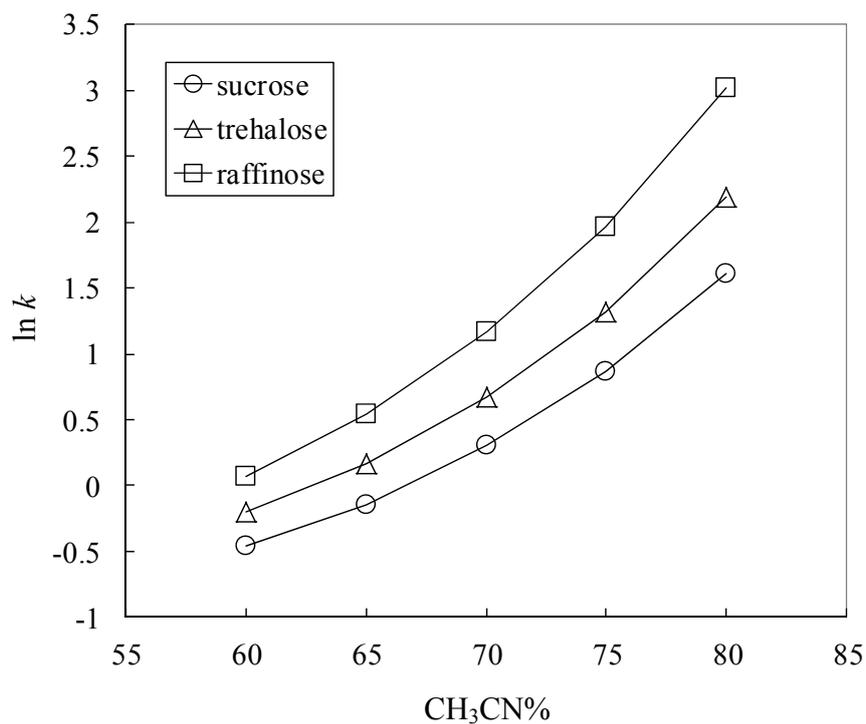


Figure 2-2-6. Plots of the $\ln k$ Values of Oligosaccharides in Various CH_3CN /water Mixtures on MS-200T-PAA

Column: MS-200T-PAA (174 mm \times 200 μm I.D.), mobile phase: 60, 65, 70, 75, 80% CH_3CN / 13 mM $\text{NH}_4\text{OCOCH}_3$ pH 5.5, temperature: 30 $^\circ\text{C}$, detection: 2.8 kV negative ESI - tandem quadrupole time-of-flight mass spectrometer (Q-TOF micro), solutes: sucrose (○), trehalose (△), raffinose (□) (each 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), injection volume 50 nL.

第3項 van Deemter plot および kinetics plot による評価

第2章第1節第2項の Figure 2-1-3 に、MS-200T-PAA の HILIC モードにおけるヌクレオシド（アデノシン）に対する van Deemter plot を示した。本カラムは最高性能のモノリス基材を用いていないにも関わらず、最適線速度条件下で $H = 10 \mu\text{m}$ 以下の高性能を示している。また、 $K = 5.1 \times 10^{-14} \text{ m}^2$ であり、市販の ZIC-cHILIC $3 \mu\text{m}$ 並びに ACQUITY UPLC BEH HILIC $1.7 \mu\text{m}$ の 5~12 倍以上の高透過性を示した。また、第2章1節3項の Figure 2-1-4 に、MS-200T-PAA の性能限界を表す kinetics plot を示す。本プロットより、 $t_0 = 20 \text{ s}$ の高速条件下において、 $N =$ 約 10,000 の理論段数を発揮し、 $t_0 = 1,000 \text{ s}$ の長時間分析条件下においては、 $N = 130,000$ 以上の高理論段数を発揮できる可能性が示唆された。一例として、Figure 2-2-7 に MS-200T-PAA を用いた高極性化合物（ヌクレオシド）の高速分離例を示す。本カラムを用いることにより、1分前後での高速の分離分析が可能となった。

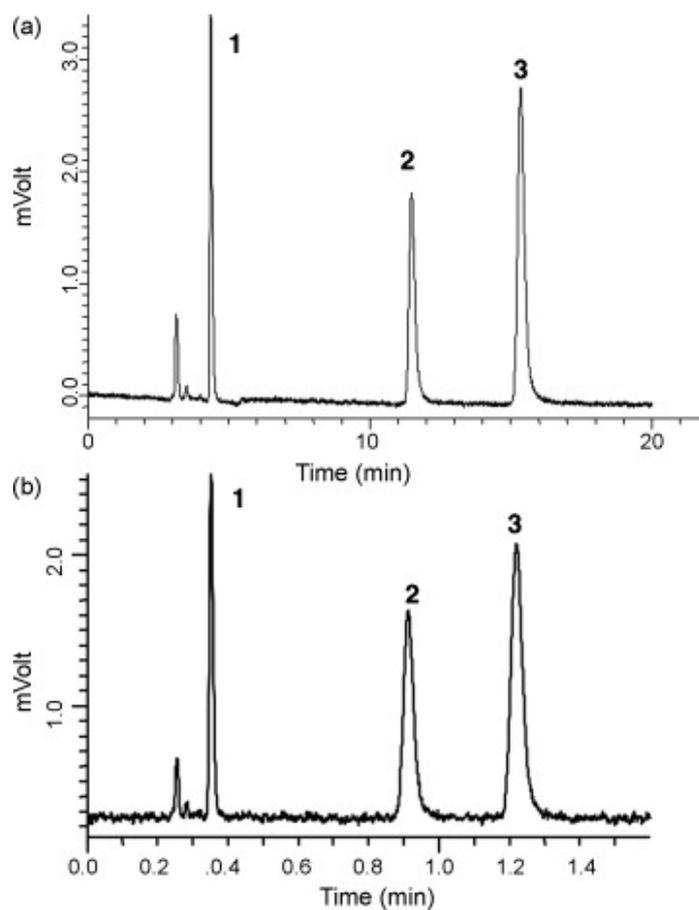


Figure 2-2-7. Chromatograms Obtained for Nucleosides

Column: MS-200T-PAA (200 mm \times 200 μ m I.D.), mobile phase: CH₃CN/water (0.2% HCOOH) = v/v 90/10, temperature: 25 $^{\circ}$ C, detection: 254 nm, solutes: 1 uridine, 2 guanosine, 3 adenosine, injection volume: 2 μ L split injection, (a) $u = 1.06$ mm/s, $\Delta P = 1.7$ MPa. (b) $u = 13.1$ mm/s, $\Delta P = 21.5$ MPa.

第4項 保持に対する温度効果

第2章第1節第4項で示した MS-200T-PAAm の糖類に対する van't Hoff プロットは、温度 30 - 80 °C 領域において直線性を示していた。同様に、MS-200T-PAA を用いた中性糖（スクロース、トレハロース、ラフィノース）に対する van't Hoff プロットを Figure 2-2-8 に示す。MS-200T-PAA に関しては直線関係が得られず、放物線状の曲線関係を得た。これは、温度の変化により固定相または溶質の構造に変化が生じていることを意味する[54]。すなわち、温度上昇に伴って MS-200T-PAA の固定相の解離状態が変化し、保持挙動に変化をもたらしたと考えられる。

次に、Figure 2-2-9 にイオン性化合物であるヌクレオシド類に対する van't Hoff プロットを示す。前述の中性糖に対するプロットと同様に、全てのヌクレオシドに対して歪な曲線プロットが得られた。pK_a = 10 の塩基性化合物であるグアノシンおよび 2-デオキシグアノシンに対しては温度 30 - 50 °C の範囲において van't Hoff プロットは負の傾きをとっている。これは式(2-1)より、保持によるエンタルピー変化値 ΔH が正の値であり、移動相から固定相への移動の際に吸熱過程を経由していることを示している。この現象は MS-200T-PAA を HILIC モードで使用した場合の保持の要因は、親水性相互作用による分配の他にイオン交換的な吸着相互作用が加わった mix モードであることを示唆する結果である。また、MS-200T-PAA においても MS-200T-PAAm と同様、温度を変化させることによりヌクレオシドの溶出順の逆転が確認された。MS-200T-PAA における温度変化によるピーク間隔（溶出順）の変化の幅は、MS-200T-PAAm より大きく、予想が困難であるため、使用の際は温度管理に細心の注意が必要である。

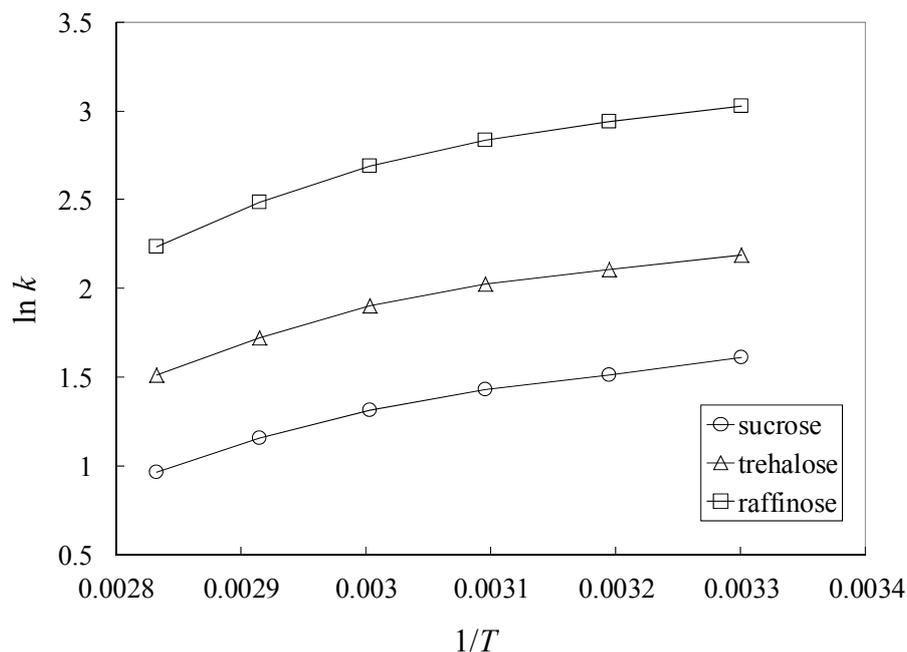


Figure 2-2-8. van't Hoff Plot of Underivatized Carbohydrates for MS-200T-PAA

Column: MS-200T-PAA (171 mm × 200 μm I.D.), mobile phase: 80% CH₃CN/ 13 mM NH₄OCOCH₃ pH 5.5, temperature: 30, 40, 50, 60, 70, 80 °C, detection: 2.8 kV negative ESI - tandem quadrupole time-of-flight mass spectrometer (Q-TOF micro), solutes: sucrose (○), trehalose (△), and raffinose (□) (each 100 μg/mL), injection volume: 50 nL.

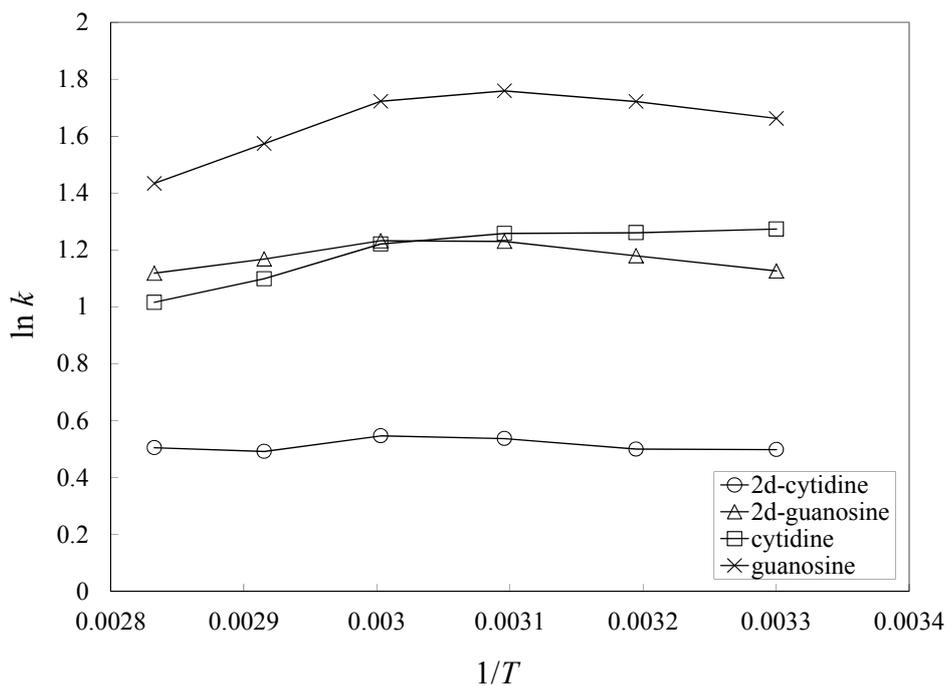


Figure 2-2-9. van't Hoff Plot of Nucleosides for MS-200T-PAA

Column: MS-200T-PAA (171 mm × 200 μm I.D.), mobile phase: 80% CH₃CN/ 13 mM NH₄OCOCH₃ pH 5.5, temperature: 30, 40, 50, 60, 70, 80 °C, detection: 2.8 kV negative ESI - tandem quadrupole time-of-flight mass spectrometer (Q-TOF micro), solutes: 2-deoxycytidine (○), 2-deoxyguanosine (△), cytidine (□), guanosine (×) (each 10 μg/mL), injection volume: 50 nL.

第5項 保持に対する移動相 pH の効果

ポリアクリル酸は弱酸性であり ($pK_a = \text{約 } 4.8$)、移動相 pH によって固定相の状態が変化することが想定される。そこで、それぞれの固定相状態 (解離型 or 非解離型) が保持挙動に与える影響について検討した (Figure 2-2-10)。最初に、非誘導体化中性糖を用い、移動相 pH を変えることによる保持の変化を確認した。中性糖は通常のシリカ系カラムを用いる HPLC で用いられる移動相 pH 条件下 (酸性 - 中性) において、分子状態が変化しない中性分子であることから、発生する保持の変化は固定相の変化に由来すると考えられる。移動相には $\text{CH}_3\text{CN} / 13 \text{ mM NH}_4\text{OCOCH}_3$ (pH 5.4, 4.7, 4.1, 3.5) = v/v 75/25 を用いた。Figure 2-2-10(a) に示すように、移動相 pH が 5.4 から 3.5 に下がるに連れて k は減少した。これは固定相状態の変化に起因していると考えられる。つまり、pH 5.4 の移動相条件下では、固定相中の官能基は解離状態にあり、高い極性状態にある一方、pH が下がるにつれて固定相中の官能基の解離が抑制され、極性状態に変化が生じることにより、 k が低下する結果となったと考えられる。参考として、MS-200T-PAAm を用いた同様の特性評価を実施した結果を Figure 2-2-10(b) に示す。MS-200T-PAAm を用いた場合は MS-200T-PAA のような移動相 pH 変化に対する k の変化は生じていない。これは、今回の pH 範囲内 (pH 3.5 - 5.4) において、MS-200T-PAAm 固定相の状態が変化していないことを示している。以上より、MS-200T-PAA を HILIC モードで使用する際は、ターゲットに対してどのような保持を得たいかを吟味し、移動相の pH 条件を厳密に設定する必要がある。

イオン性化合物を MS-200T-PAA により HILIC 分離する際には、移動相 pH の設定に特に注意を払う必要がある。例としてヌクレオシド (9 種) を異なる移動相 pH 条件下で分離した結果を示す (Table 2-2-3)。移動相には $\text{CH}_3\text{CN} / 13 \text{ mM NH}_4\text{OCOCH}_3$ (pH 5.5) 又は 0.2% CH_3COOH (pH 2.7) = v/v 90/10 を用いた。それぞれの pH 条件下において著しい溶出順および k の変化を確認した。比較として Table 2-2-3 に MS-200T-PAAm による同じ溶質の pH 5.5 および pH 2.7 条件下における k の変化を示す。MS-200T-PAAm においては MS-200T-PAA で確認された溶出順や k の著しい変化は確認されなかった。以上の結果より、MS-200T-PAA に関しては固定相が解離状態にあるのか、又は非解離状態にあるのかで HILIC モードにおける保持のメカニズムが大きく異なっていると考えられる。顕著な変化として、pH 2.7 の条件下ではグアノシン系の 2 種の化合物群の k が減少してい

る一方、シチジン系、アデノシン系の4種の化合物群の k が飛躍的に上昇している。まず、グアノシン系の k の減少に関して、pH 2.7条件下においてはMS-200T-PAAの固定相は非解離状態を取ることによる静電相互作用と親水性相互作用の減少が原因とも考えられる。しかし、もし固定相が非解離となることにより静電相互作用と親水性相互作用の両方の寄与が小さくなるのならば、全ての溶質の k も減少するはずである。しかし、アデノシン、シチジン系に関しては約5倍（2-デオキシシチジンに対しては約12倍）の k の増加を示した。MS-200T-PAA固定相の状態による保持挙動の違いは、単に静電相互作用と親水性相互作用の大きさや寄与比率の変化によるものではないことが示唆された。これをさらに決定づける保持挙動の変化として、通常のリボヌクレオシドとデオキシリボヌクレオシドの分離係数(α)の変化がある。解離状態のMS-200T-PAA固定相は、それぞれのオキシ型ヌクレオシドを大きく保持し、デオキシ型ヌクレオシドとの分離係数 $\alpha(\text{OH})$ は非常に大きな値となるが、非解離状態の固定相における $\alpha(\text{OH})$ の値は非常に小さな値又は負の値となり、デオキシ型ヌクレオシドの方が大きく保持する結果となった。解離状態と非解離状態ではヌクレオシドの核酸塩基部分の構造の違いだけでなく、糖の構造の違いも異なる相互作用機構により保持認識している可能性がある。

解離状態と非解離状態のMS-200T-PAA固定相がもたらす保持挙動の違いを決定的に示す例として還元糖のHILIC条件における分離結果をFigure 2-2-11に示す。Figure 2-2-11はpH 5.5の中性条件下における分離結果であり、固定相は解離状態をとる。還元糖であるグルコースとマルトースに対してアノマーのスプリットピークを与えており、そのアノマー分離の程度はMS-200T-PAAによるアノマー分離の程度と比較して大きい。しかし、移動相に0.2% HCOOH (pH = 2)を用いた場合、還元糖に対して単一のピークを与え、アノマー分離は全く生じない結果を得た (Figure 2-2-12)。つまり、解離状態のMS-200T-PAA固定相は大きなアノマー分離を与える一方、非解離状態の固定相はアノマー分離を与えない結果となった。以上の結果より、イオン解離状態のMS-200T-PAA固定相は、糖の微細構造を認識し異性体を分離する用途に適しているが、常温における分析では非還元糖に対してアノマー分離を示す点において不利であり、一方で非解離状態のMS-200T-PAA固定相は糖異性体のような微細な構造の違いの認識力は小さいが、幅広い範囲での分子量や体積などによる粗分離には適していると

考えられる。糖類を主要な分析ターゲットの一つとして研究を進めていく上で、これらの保持特性を熟知することは重要である。以上の結果より、MS-200T-PAAを用いた HILIC モードは、分析条件の変更により、異性体に代表される糖の微細構造を認識することに加えて、オリゴマーまでの広い分子量領域をカバーする有用な糖分離ツールになりうることが示唆された。

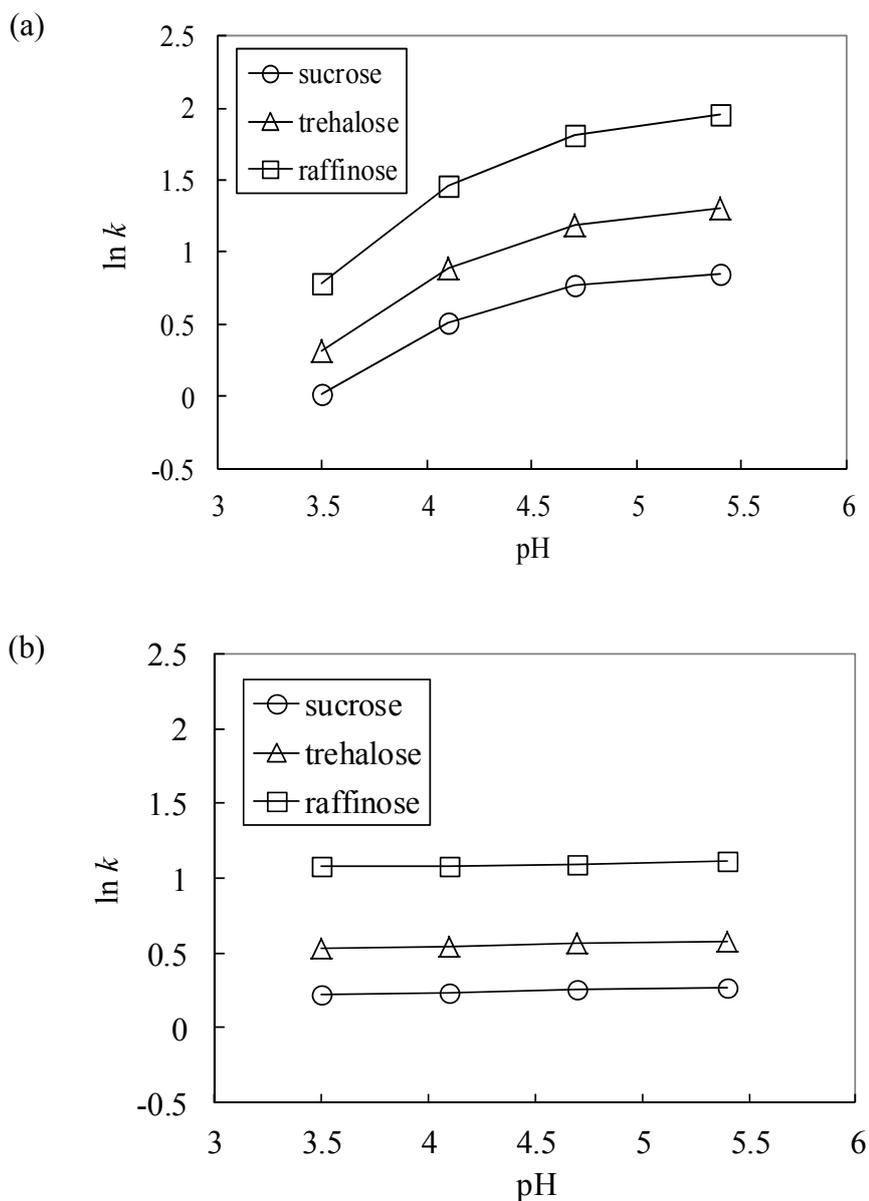


Figure 2-2-10. pH - $\ln k$ Plot of Underivatized Carbohydrates for MS-200T-PAA and MS-200T-PAAm

Column: (a) MS-200T-PAA (174 mm \times 200 μ m I.D.), (b) MS-200T-PAAm (195 mm \times 200 μ m I.D.), mobile phase: 75% CH₃CN/ 13 mM NH₄OCOCH₃ pH 5.5, 4.7, 4.1, 3.5, temperature: 30 °C, detection: 2.8 kV negative ESI - tandem quadrupole time-of-flight mass spectrometer (Q-TOF micro), solutes: sucrose (○), trehalose (△), and raffinose (□) (each 100 μ g/mL), injection volume: 50 nL.

Table 2-2-3. Elution Order and k of Nucleosides for MS-200T-PAA and MS-200T-PAAm under pH 5.5 and 2.7

Column	MS-200T-PAA				MS-200T-PAAm			
	pH 5.5		pH 2.7		pH 5.5		pH 2.7	
	k	E.O.	k	E.O.	k	E.O.	k	E.O.
tymidine	0.27	1	0.29	1	0.38	1	0.37	1
2d-uridine	0.36	2	0.37	3	0.49	2	0.47	2
2d-adenosine	0.74	3	4.27	7	0.64	3	0.57	3
adenosine	0.78	4	3.76	6	0.86	4	0.83	4
uridine	0.88	5	0.35	2	0.86	5	0.83	5
2d-cytidine	1.65	6	19.49	9	1.43	6	1.21	6
2d-guanosine	3.08	7	2.53	5	1.77	7	1.80	7
cytidine	3.57	8	18.18	8	2.22	8	1.89	8
guanosine	5.27	9	2.49	4	3.05	9	2.85	9

E.O.: Elution order, 2d: 2-deoxy

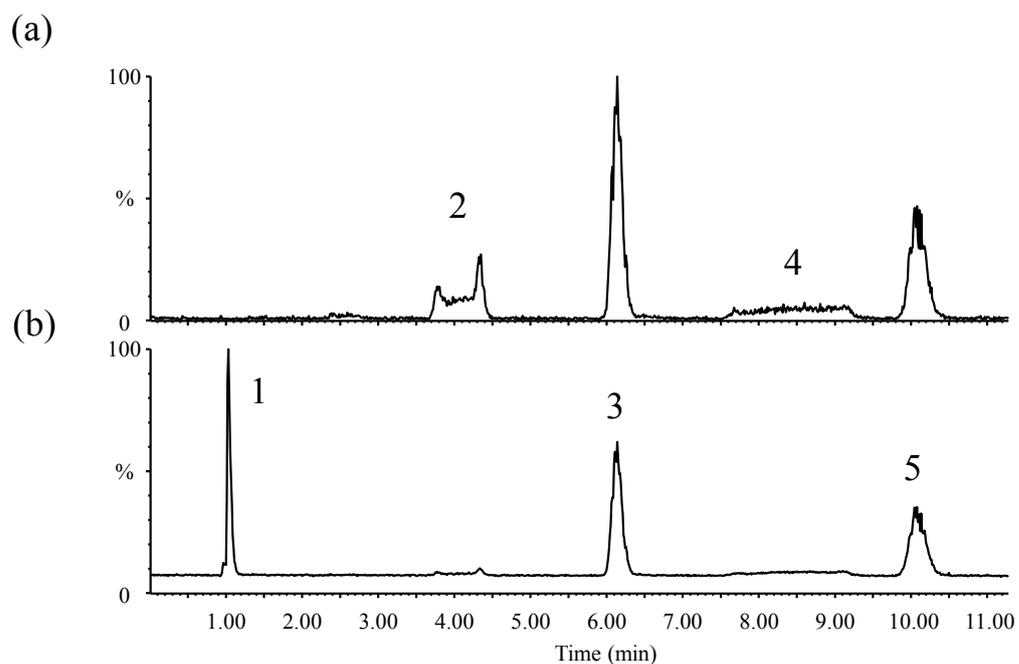


Figure 2-2-11. Separation of Glucose, Sucrose, Maltose, and Trehalose by MS-200T-PAA in HILIC mode under pH 5.5 Condition (Extract Ion Current Chromatogram (a) and Total Ion Current Chromatogram (b))

Column: MS-200T-PAA (178 mm × 200 μm I.D.), mobile phase: CH₃CN/13 mM NH₄OCOCH₃ (pH 5.4) = v/v 80/20, temperature: 30 °C, detection: 2.8 kV negative ESI - tandem quadrupole time-of-flight mass spectrometer (Q-TOF micro), solutes: 1 sodium dodecylsulfate, 2 α+β-glucose, 3 sucrose, 4 α+β-maltose, 5 trehalose (each 100 μg/mL), injection volume: 50 nL.

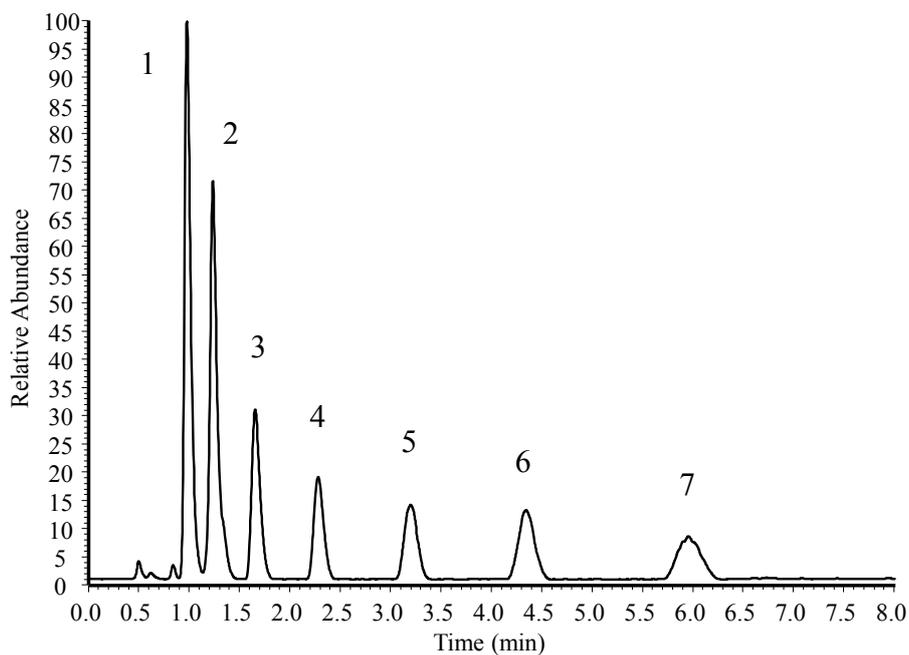


Figure 2-2-12. NanoLC-ESI-MS Base Peak Chromatogram of a Mixture of Maltooligosaccharides by MS-200T-PAA in HILIC Mode under pH 2 Condition

Column: MS-200T-PAA (146 mm × 200 μm I.D.), mobile Phase: CH₃CN/water (0.2% HCOOH, pH 2) = v/v 80/20, temperature: ambient, detection 2.2 kV negative ESI - ion-trap mass spectrometer (LTQ), solutes: 1 glucose, 2 maltose, 3 maltotriose, 4 maltotetraose, 5 maltopentaose, 6 maltohexaose, 7 maltoheptaose (each 10 μg/mL), injection volume: 50 nL.

第6項 重合修飾法における重合条件の変更による固定相量の調節

モノリス型シリカカラムにおける重合修飾法は、基材の性能を維持した高性能カラムの調製を可能にすることを述べてきた。重合修飾法のもう一つの利点としてモノマーの仕込み量を変化させることにより、調製されるポリマー層（固定相）の量を調節できる点が挙げられる。この特性はモノリス型シリカカラムの低い保持力（ k ）を改善できる可能性を有する[27]。また、本特性は、逆に保持が大き過ぎること、つまり、非可逆的な吸着が課題となる RPLC や IEC 用固定相を調製する際に、固定相を減らすことにより、 k をコントロールできるという点で有用である。

Figure 2-2-13 にアクリル酸モノマーの仕込み量を 0, 10, 30, 50 μL と変化させて調製したカラムによるピリジルアミノ化糖（PA 糖）の分離クロマトグラムを示す。また、Table 2-2-4 にサンプルとして使用した PA マルトヘプタオースの k の変化をまとめる。重合修飾前のアンカー修飾のみのカラム（MS-200T-MAS）においては全く保持が確認されなかったが、モノマー量の増加に伴い飛躍的に k が増加し、修飾限界付近のモノマー仕込み量 50 μL の MS-200T-PAA においては PA 糖に対して $k=10$ を超える大きな保持を得ることができた。

以上の結果より、モノマー仕込み量を変化させることによって、固定相の量を調製できることが確認された。これは高分子学の観点から容易に予想できることである。ではどれくらいの分子量のポリマーがどの程度の量（相比：固定相体積と移動相体積の比）で修飾されているのだろうか。

まず、固定相の量をクロマトグラフィー的に推定するために、未修飾モノリス型シリカカラムと、その同バッチの未修飾カラムに修飾製造した MS-200T-PAA カラムに対し、サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）を実施し、そのポロシティの変化を追うことにより相比を算出した。結果を Figure 2-2-14 および Table 2-2-5 にまとめる。結果、モノマー仕込み量を増やすにつれてポロシティが減少していることは明らかであり、修飾前に 88.7% あったポロシティがモノマー仕込み量 60 μL 時には 85% まで減少している。この結果から算出された相比はモノマー仕込み量 30 μL （組成 1）の場合は 0.024、モノマー仕込み量 60 μL （組成 2）の場合は 0.044 であった。ラジカル重合における速度論的計算によると、ポリマーの分子量はモノマー濃度に比例し、開始剤濃度の 1/2 乗に反比例することが知られている。今回の二つのモノマー溶液の組成は組成 1 に

対して組成2のモノマー濃度は1.9倍であり、開始剤濃度は0.97倍でほぼ同じであることを考慮すると、得られるポリマーの分子量は約1.9倍の差になると推測される。SECの結果より得られた固定相量は組成1カラムに対して組成2カラムは1.8倍と計算されたことから、高分子学の理論に沿った重合修飾がなされていることが確認された。

また、得られたポリマー固定相の分子量情報を得るためにモノマー仕込み量50 μL によって得られたポリマー（バイアル内で調製）に対してESI-TOF MSによる m/z の測定を行った。結果、 $m/z = 500 - 2500$ の領域にポリアクリル酸由来の幅広いピークが得られ、重合度（ DP ）に換算すると少なくとも $DP = 7 - 35$ のポリマーが表面修飾されていることが想定された。

Table 2-2-4. Feed Compositions for MS-200T-PAA Columns and the Retention Factors Obtained for Pyridylamino Derivatives of Maltopentaose on Each Stationary Phase in CH₃CN/ water = v/v 75 / 25 in the Presence of 0.2% HCOOH

Column	Feed composition			PA-maltopentaose
	acrylic acid (μ L)	(NH ₄) ₂ S ₂ O ₇ (mg)	water (mL)	Retention factor (<i>k</i>)
MS-200T-MAS ^a	-	-	-	0.09
MS-200T-PAA(10)	10	5	1	1.32
MS-200T-PAA(30)	30	5	1	4.41
MS-200T-PAA(50)	50	5	1	10.7

^a Monolithic silica modified with [3-(methacryoylamino)propyl]silyl group.

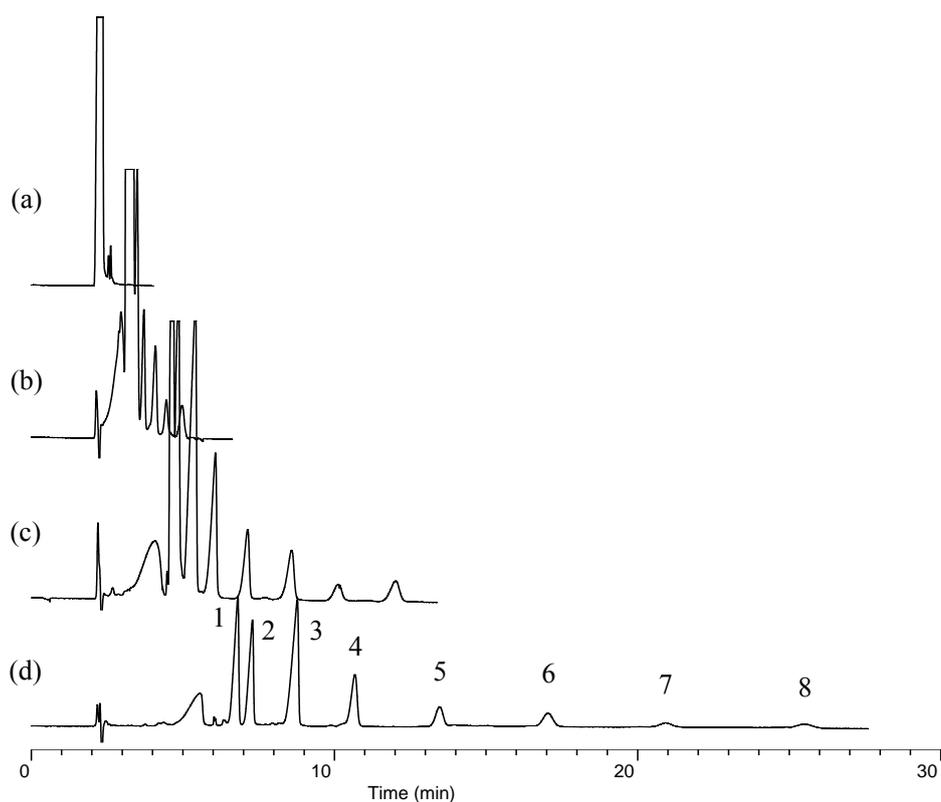


Figure 2-2-13. Separation of 2-pyridylamino (PA-) Derivatives of Glucose Oligomers by MS-200T-PAA Columns Prepared by Using 10 – 50 μ L Acrylic Acid in the Feed

Columns: (a) MS-200T-silica (200 mm \times 200 μ m I.D.), (b) MS-200T-PAA(10) (200 mm \times 200 μ m I.D.), (c) MS-200T-PAA(30) (200 mm \times 200 μ m I.D.), and (d) MS-200T-PAA(50) (200 mm \times 200 μ m I.D.), mobile phase: CH₃CN/water (0.2% HCOOH) = v/v 75/25, temperature: 25 $^{\circ}$ C, detection: 254 nm. ΔP = 3.8 MPa, solutes: 1 PA-arabinose, 2 PA-glucose, 3 PA-maltose, 4 PA-maltotriose, 5 PA-maltotetraose, 6 PA-maltopentaose, 7 PA-maltohexaose, 8 PA-maltoheptaose (each 1 mg/mL), injection volume: 2 μ L split injection (1/100).

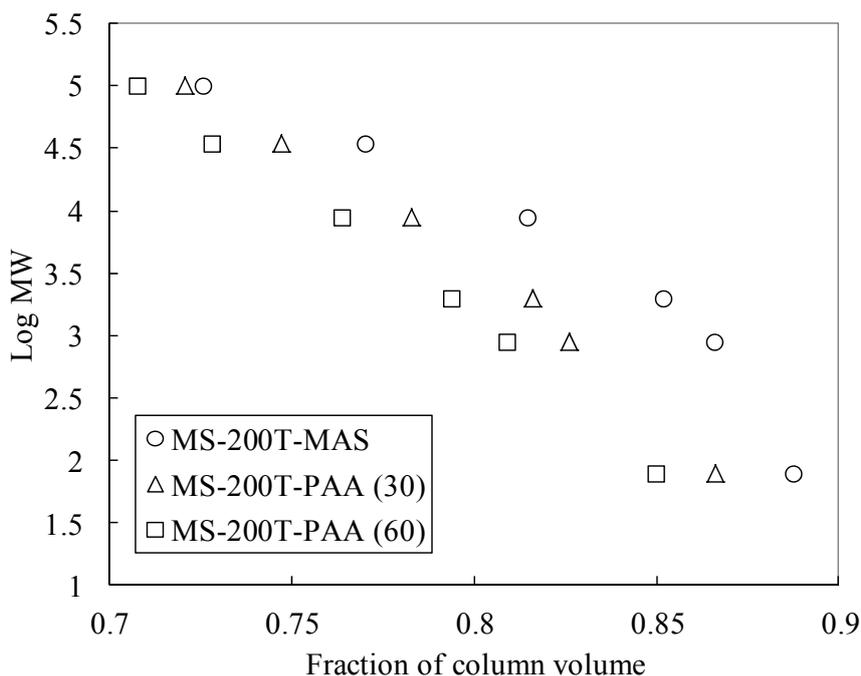


Figure 2-2-14. Calibration Curve of Size Exclusion Chromatography Using MS-200T-PAA Prepared by Various Condition (Concentrations of Acrylic Acid)

Columns: MS-200T-MAS (○), MS-200T-PAA(30) (△) and MS-200T-PAA(60) (□) (each 200 mm × 200 μm I.D.), mobile phase: tetrahydroflune, temperature: ambient, detection: 210 nm, solutes: polystyrene standard and benzene.

Table 2-2-5. Relationship of Phase Ratio and Feed Condition

Parameters	AA (0 μL)	AA (30 μL)	AA (60 μL)
Total porosity	0.887	0.866	0.85
Bonded phase	-	0.021	0.037
Phase ratio (V_s/V_m)	-	0.024	0.044

AA: acrylic acid, V_s : bonded phase (stationary phase), V_m : total porosity (mobile phase)

第7項 ペプチド分離への応用

本カラムをペプチド類の分離に応用した。結果を Figure 2-2-15(b)に示す。前述の特性評価項で言及した通り、移動相 pH は MS-200T-PAA の HILIC モードにおける分離挙動に大きな影響を与える重要なファクターである。今回評価に用いたペプチドは大小の分子量および酸性から塩基性までの幅広い pI 値を持つ標準ペプチドである。中性 pH 移動相を用いると固定相の解離型が増えることによりイオン交換系の相互作用が極端に強くなり、水濃度を増やす HILIC グラジエント溶出では全ての成分の溶出が確認されなかったため、0.2% HCOOH の酸性移動相条件を採用したところ、bradykinin や substance P のような塩基性ペプチドまで溶出した。MS-200T-C18 による RPLC と比較して、ペプチドの溶出順が異なっていることが Figure 2-2-15(a)および Figure 2-2-15 (b)に示されている。まず、疎水性アミノ酸残基が多く含まれる leu-enkephalin や met-enkephalin などの疎水性ペプチドは MS-200T-C18 カラムに強く保持されている一方、MS-200T-PAA を用いた HILIC の場合には保持はされているものの初期に溶出している。また bradykinin や substance P などの塩基性ペプチドは MS-200T-PAA に対して大きな保持を示した。これは固定相が弱酸性であることによる酸 - 塩基の静電又相互作用が 0.2% HCOOH 条件下の HILIC モードにおいても働いていることを示している。また、MS-200T-C18 にはほとんど保持されない高極性なペプチド類も MS-200T-PAA は良好に保持し、分離することが可能であった。一例として、非常に高極性で MS-200T-C18 では t_0 付近に溶出する γ -Glu-His (γ -EH) のジペプチドや Asp-Ser-Asp-Pro-Arg (DSDPR), Val-Gly-Ser-Glu (VGSE)は MS-200T-PAA を用いたグラジエント溶出において大きな保持が確認された。

またペプチドに対する HILIC モードにおいても、第2章2節1項の WCX モードで確認された高速領域下での高性能分離が確認された (Figure 2-2-15(c))。すなわち、 $t_g=3$ min という高速グラジエント条件下においても、 $t_g=10$ min と同様の分離プロファイルが得られた。今回、高速グラジエント検討について、通常ポンプ耐圧 20 MPa までしか実施していないが、平衡化時間を含めて 5 min 以内の分画で繰り返し分析を実施することが可能である。3 min のグラジエント溶出でピーク幅の平均は約 3 s であったことから $PC=60/3$ min であった。また、もう一つの応用実験として Figure 2-2-16(a)および Figure 2-2-16 (b)に MS-200T-PAA (HILIC) と MS-200T-C18 (RPLC) による phosphorylase B トリッ

シン消化物の分離クロマトグラムを示す。消化物のような複雑成分に対しても MS-200T-PAA は MS-200T-C18 と同等の高い分離性能を発揮した。Figure 2-2-16(b) における MS-200T-PAA の phosphorylase B トリプシン消化物に対する *PC* は 100 / 10 min であり、本結果は粒子径 3 μm 相当の C18 修飾粒子充填型カラムによる RPLC が発現できる最大の *PC* に近い。前述した *PC* 理論に基づく条件最適化法の適用により、更なる性能の向上が期待できる。

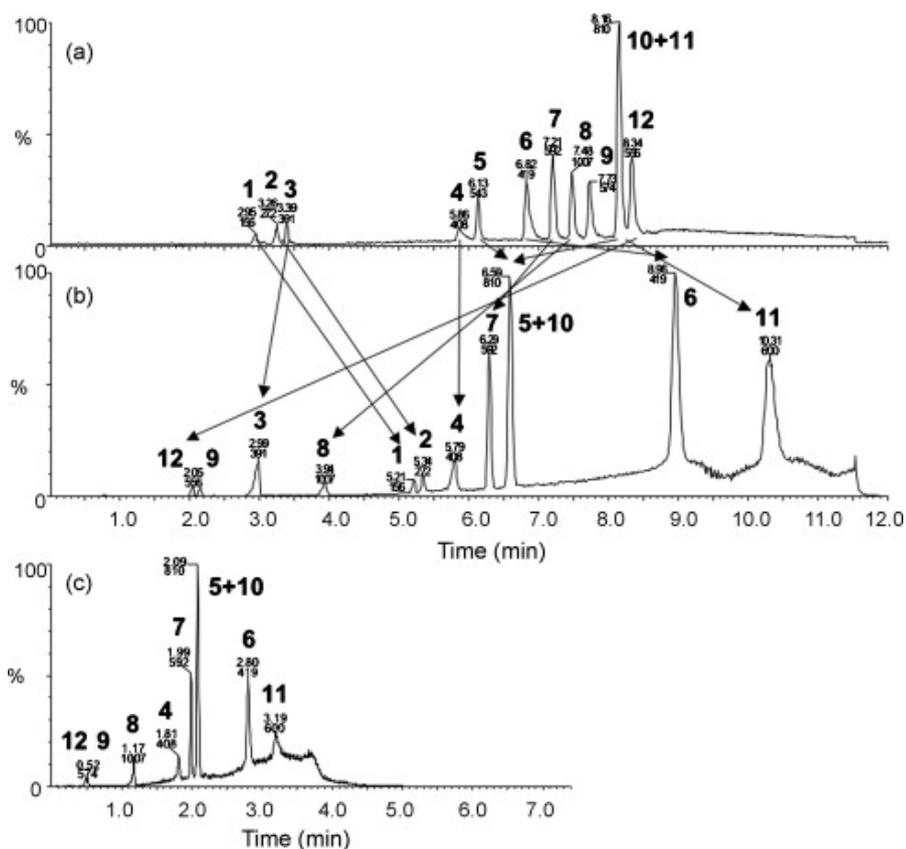


Figure 2-2-15. NanoLC-ESI-MS Total Ion Current Chromatograms of Peptides
 (a) Column: MS-200T-C18 (224 mm × 200 μm I.D.), mobile phase: 5 – 50% CH₃CN (0.2% HCOOH) in 10 min linear gradient; (b) column: MS-200T-PAA (190 mm × 200 μm I.D.), mobile phase: 90 – 10% CH₃CN (0.2% HCOOH) in 10 min linear gradient; (c) column: MS-200T-PAA (190 mm × 200 μm I.D.), mobile phase: 90 – 10% CH₃CN (0.2% HCOOH) in 3 min linear gradient followed by 0.5 min hold, ΔP: 20 MPa, detection: 3 kV positive ESI - tandem quadrupole time-of-flight mass spectrometer (Q-TOF micro), solutes: 1 γ-EH, 2 DSDPR, 3 VGSE, 4 bradykinin fragment1–5, 5 [Arg8]-vasopressin, 6 bradykinin, 7 LHRH, 8 oxytosin, 9 met-enkephalin, 10 bombesin, 11 substance P, 12 leu-enkephalin for (a) and (b), samples 4 – 12 (9 peptides) for (c), sample concentration: 2.5 μg/mL, injection volume: 50 nL.

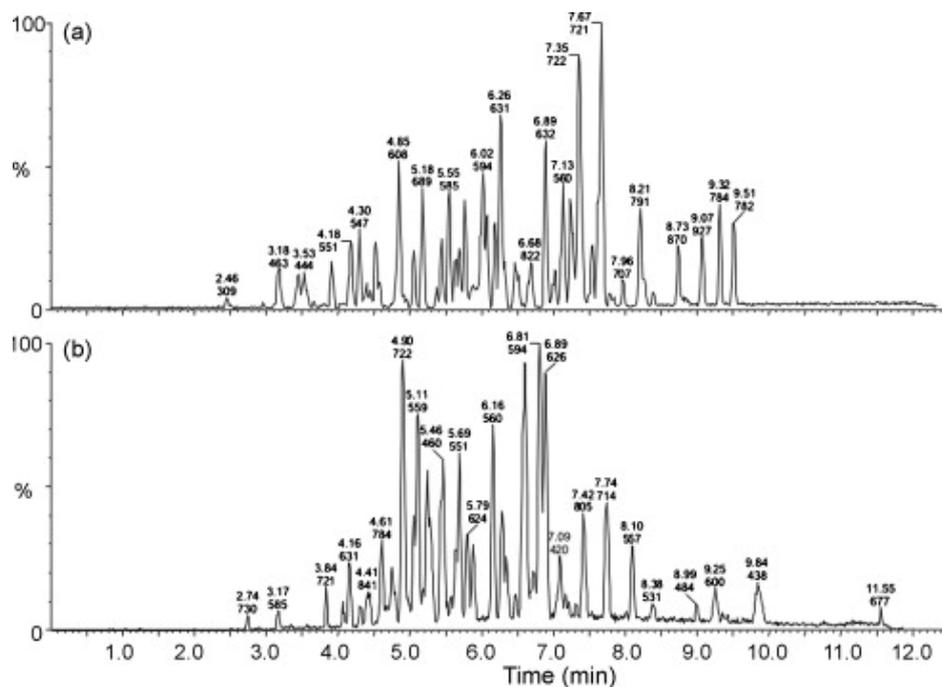


Figure 2-2-16. NanoLC-ESI-MS Base Peak Chromatograms of Phosphorylase B Tryptic Digest

Detection: 3 kV positive ESI - tandem quadrupole time-of-flight mass spectrometer (Q-TOF micro). Solute: phosphorylase B tryptic digest, sample concentration: 1 nmol/mL, injection volume: 50 nL.

(a) Column: MS-200T-C18 (238 mm × 200 μm I.D.), mobile phase: 5 – 60% CH₃CN (0.2% HCOOH) in 10 min linear gradient, (b) column: MS-200T-PAA (190 mm × 200 μm I.D.), mobile phase: 90 – 10% CH₃CN (0.2% HCOOH) in 10 min linear gradient.

第3節 ウレイドプロピル修飾モノリス型シリカキャピラリーカラムの開発と応用

前節まで、モノリス型シリカキャピラリーカラムに対する重合修飾法を用いた IEC および HILIC 用固定相の調製およびその有用性について詳細を述べてきた。重合修飾法は性質の異なるモノマーを採用することにより、様々な特性を有する固定相を容易に調製可能であり、仕込み組成を変更することにより、固定相の絶対量を容易に増減することが可能である。これらの優位点は、低い保持能力（低い k ）というモノリス型シリカキャピラリーカラムの欠点を補完するものであるが、以下の点で課題を残す。

- ✓ 重合度の増大、つまり k の増大を志向した仕込み組成では、容易にカラムの詰りが発生し、洗浄不可能となることから、特にメートル長のロングカラムフォーマットおよび 100 μm I.D.以下の内径が小さなキャピラリーカラムでの調製は困難である。

モノリス型シリカキャピラリーカラムに対するもう一つの表面修飾法として、シリル化修飾法が挙げられる。本法はシリル化剤を特定の溶媒に溶解後、加熱送液するだけのシンプルな手法であり、常に試薬の流動状態を維持しながら修飾を行うことから、メートル長のロングカラムフォーマットへの修飾の際に上述の「詰り」が発生するリスクが低い。また、メートル長カラムとすることにより、第一章で述べた高性能の発現に加えて、試料のローディングキャパシティーの増大が期待される。

以下にシリル化修飾法を用いて HILIC 用カラムを調製した結果について述べる。

第1項 van Deemter plot および kinetics plot による評価とメートル長 HILIC カラムによる高性能分離

シリル化剤として、カルバモイル基を有するウレイドプロピルトリメトキシシラン (UPTMS) を採用した。カルバモイル基は前述の MS-200T-PAAm 固定相として用いたポリアクリルアミドポリマー固定相と同様に中性でかつ高極性な官能基であり、本官能基を有するモノリス型シリカキャピラリーカラム

(MS-100H-UP) は HILIC モードでの使用が期待される。HILIC 用固定相の調製に使用可能な別のシリル化剤の代表として、アミノ基を有するアミノプロピルトリエトキシシラン (APTES) が挙げられるが、アミノ基は強い塩基性を示すことからイオン強度が弱い水系分離条件が特徴の HILIC において、酸性化合物の非特異的な吸着や、顕著なカラム寿命の低下を招くことが危惧されたため、不採用とした。また、カルボキシル基に代表される酸性の官能基を有するシリル化剤は、自身が酸触媒となり自己の縮合重合の誘起を伴うため、調製が困難である。

MS-100H-UP の HILIC モードにおけるカラム基礎性能評価として、溶質にヌクレオシド (シチジン) を用いた van Deemter plot および kinetics plot, 更には透過率 K の結果を第2章1節3項の Figure 2-1-3 および Figure 2-1-4, 更には Table 2-1-1 に示す。今回調製した MS-100H-UP は、前述の MS-200T-PAAm および MS-200T-PAA と比較してモノリス基材が異なっており、メートル長のロングカラムフォーマットへの展開を意識した高透過性を有する第一世代 hybrid モノリス基材を用いた。本基材を用いることにより、 $H-u$ 性能 (特に、高速領域下における性能) は第二世代モノリスより劣る結果となったが、MS-200T-PAAm および MS-200T-PAA と比較して2倍以上の高透過性を獲得することが可能であり、結果としてメートル長ロングカラムフォーマットによる長時間分析の最大性能は遥かに優れる結果であった。(汎用 HPLC 条件下, $t_0 = 10,000$ s, $N = 800,000$ の発現が可能)

一例として、Figure 2-3-1(A)に $L = 4$ m の長い MS-100H-UP を用いた高極性化合物 (核酸塩基並びにヌクレオシド) の高性能分離の結果を示す。また、対象として $L = 30$ cm の汎用的長さの MS-100H-UP を用いた同様の分離結果を Figure 2-3-1 (B)に示す。 $L = 4$ m のメートル長 MS-100H-UP は、核酸塩基並びにヌクレオシドに対して $N = 200,000$ 以上を容易に発現することが可能であり、センチメ

ートル長カラムでは分離不十分で一本のブロードなピークとして共溶出している化合物群に対して，完全分離を達成することが可能であった。

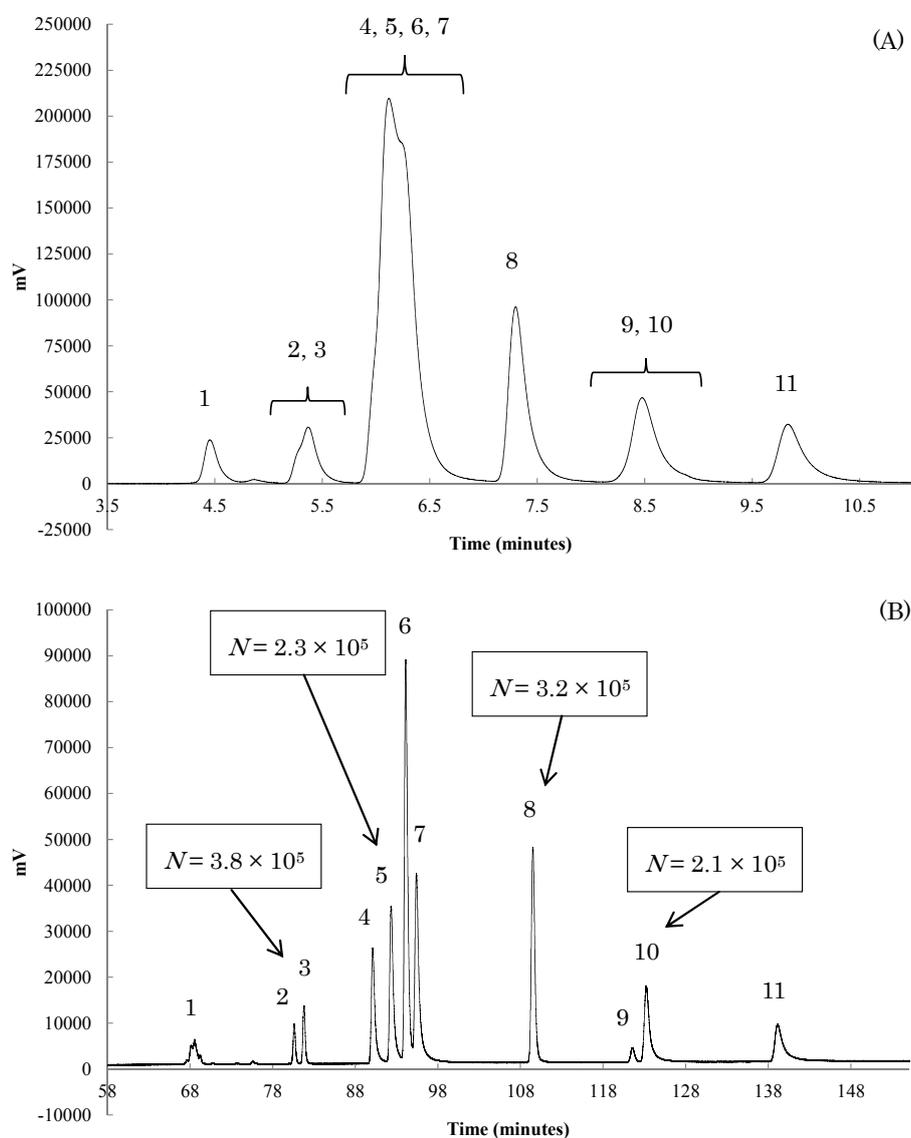


Figure 2-3-1. Chromatograms of Nucleosides Using MS-100H-UP by Changing the Column Length, 30 cm and 4 m

(A) Column: MS-100H-UP, 30 cm length x 100 μm I.D., split flow: $\Delta P = 0.9$ MPa, $u = 1.12$ mm/s, (B) column: MS-100H-UP, 4 m length x 100 μm I.D., split flow: $\Delta P = 7.3$ MPa, $u = 0.98$ mm/s, mobile phase: $\text{CH}_3\text{CN}/15$ mM ammonium acetate (pH 4.7) = 90:10 (v/v), sample: mixture of ten nucleosides (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ each), injection volume: 50 nL, detection: 254 nm, solutes: 1, toluene; 2, thymine; 3, uracil; 4, 5-methyluridine; 5, adenine; 6, uridine; 7, adenosine; 8, cytosine; 9, guanine; 10, cytidine; 11, guanosine.

第2項 ウレイドプロピル修飾モノリス型シリカキャピラリーカラムを用いたプロテオミクス試料の分離

(MS-100H-C18 を用いた RPLC との比較考察)

ヒト子宮頸癌細胞 (HeLa 細胞) 中に存在する 1 μg のタンパク質群に対してトリプシン消化を行ったペプチド混合試料を $L = 2 \text{ m}$ のメートル長 MS-100H-UP で HILIC 分離した (Figure 2-3-2)。本クロマトグラムより得られたペプチド混合物に対する PC は $t_g = 4 \text{ h}$ に対して $PC = 360$ であった。(同定されたペプチドピークの全半値幅 ($FWHM$) = 約 0.4 min, $SD = 0.3 \text{ min}$, $n = 226$) 本結果は、同じくメートル長の C18 修飾モノリス型シリカキャピラリーカラムを用いたペプチド群に対する RPLC の性能と同様の基礎性能を MS-100H-UP は有していることを意味しており、第2章2節7項で述べた MS-200T-PAA による高いペプチド分離性能に関する考察と同様の結果であった[24]。ここで MS-100H-UP が前節で述べた MS-200T-PAA と比較して優れている点として、メートル長の長いカラムフォーマットでの作成が容易である点を強調しておきたい。MS-200T-PAA や MS-200T-PAAm のような重合修飾タイプのカラムは、カラム修飾時の詰りにより、メートル長カラムの調製は困難である一方、シリル化をベースとする MS-100H-UP はシンプルな製法であるが故に、メートル長の長いカラムフォーマットでも安定した製造が可能である。また、カラム耐久性並びに保持の再現性が高く、 $t_g = 4 \text{ h}$ のような長時間グラジエント溶出を用いた繰り返し分析の結果、ランダムに選択した 14 種のペプチドに対して保持時間の $RSD = 2\%$ 以下であったことから、十分な保持再現性を有していることを確認した。

本分析により得られた HeLa 細胞中に存在する 1 μg のタンパク質群に対してトリプシン消化を行ったペプチド群の同定数は、同様の長さ ($L = 2 \text{ m}$) の MS-100H-C18 並びに同様のグラジエント時間 ($t_g = 4, 8 \text{ h}$) を用いた既存のシステム (RPLC をベースとする nanoLC-ESI-MS) による同定数と比較して同程度の結果であった。(HILIC : ペプチド同定数 = 10,562, タンパク同定数 = 2,605 個, RPLC : ペプチド同定数 = 12,118, タンパク同定数 = 2,529) また、更に興味深いことに MS-100H-UP を用いた HILIC システムによる同定ペプチドの約 40% が RPLC ベースの既存のシステムでは同定されなかったユニークなペプチドであった (Table 2-3-1, Figure 2-3-3)。本結果は、MS-100H-UP を用いた本 HILIC システムの活用により、プロテオーム解析における最先端技術として既に確立さ

れている緒言前述の「ワンショットプロテオミクス手法」[25][26]によるペプチドおよびタンパク質の同定能力を、更に拡張する可能性を示唆する。

プロテオーム解析においては一度に数千から数万の膨大な数のペプチドやタンパク質を一斉に分離することが求められるが、たとえメートル長の長いモノリス型シリカキャピラリーカラムを用いた特殊な HPLC システムを用いたとしても、一回および一段階のクロマトグラフィーで十分な分離を得ることは困難である[26]。この困難を打開するために、異なる別の分離モードを別途適用する多段階のクロマトグラフィー（2D-LC 含む）の実施が考えられるが、本手法の適用の際に重要となるファクターが「直交性」である。Gilar らは多段階の HPLC システムにおける直交性の重要性を示しており、多々ある HPLC モードの中で、RPLC と HILIC の直交性が最も大きいことを報告している[49]。Figure 2-3-4 に、MS-100H-UP を用いた HILIC と MS-100H-C18 を用いた RPLC により、共に同定されたトリプシン消化ペプチドに対する直交性プロットを示す。両軸にはそれぞれのペプチドの平準化保持時間 ($RT_{i(\text{norm})}$) をとっており、このプロットの散らばりが大きいほど二つのモード間の保持直交性が大きいことを表している。

(RT_{max} と RT_{min} は、それぞれ最も大きい又は小さい保持を示したペプチドの溶出時間を指す。)

$$RT_{i(\text{norm})} = \frac{RT_i - RT_{\text{min}}}{RT_{\text{max}} - RT_{\text{min}}} \quad (3-1)$$

Figure 2-3-4 より、大きく散らばったプロットが得られたことから、これらの二つのモード間の直交性は大きいことが示唆された。MS-100H-UP の MS-100H-C18 に対する大きな直交性は、MS-100H-C18 を用いた RPLC では分離できない試料群に対して分離を発現する可能性を高めることから、既存の「ワンショットプロテオミクス手法」によるペプチドおよびタンパク質同定数の更なる向上に向けた一つの方法として適用が期待される。

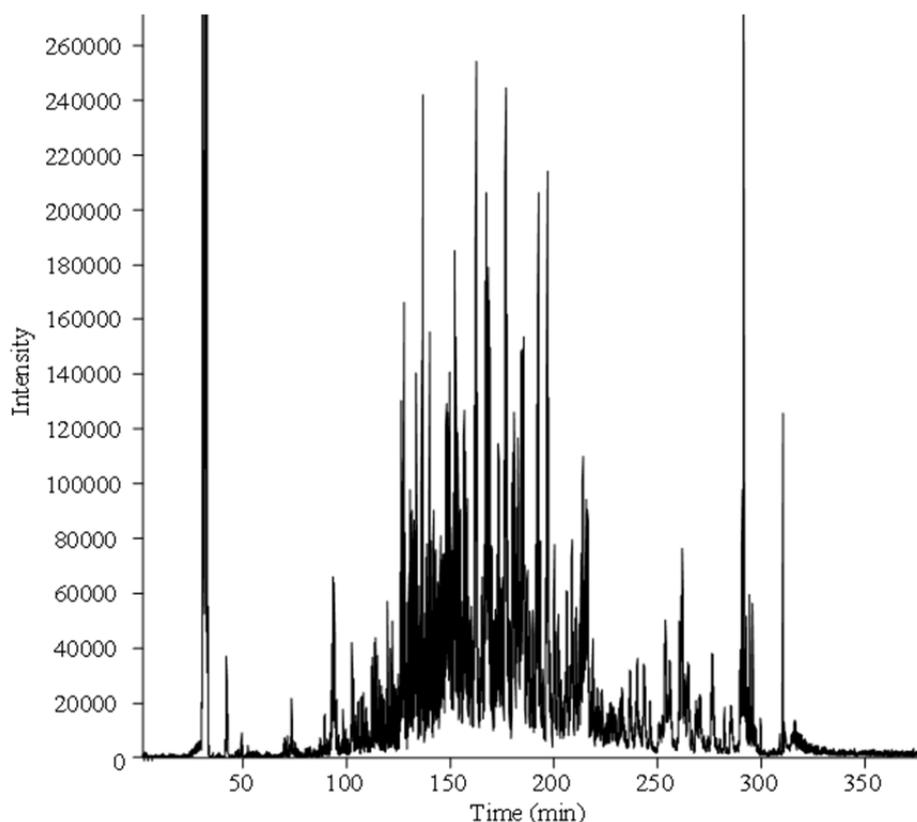


Figure 2-3-2. NanoLC-ESI-MS Base Peak Chromatogram of Tryptic Peptides from HeLa Cell Lysate Proteins, Obtained by Using 2 m-long Column of MS-100H-UP

Column: MS-100H-UP, 2 m × 100 μm I.D., sample: 1 μg of tryptic peptides from HeLa cell lysate proteins, flow rate: 500 nL/min. Mobile phases consisted of (A) 0.5% CH₃COOH in 10% CH₃CN and (B) 0.5% CH₃COOH in 95% CH₃CN. A two-step linear gradient of 100 % to 80 % B over 4 h, 80 % to 0 % B for 10 min, and 0 % B for 10 min was employed. Detection: 2.4 kV positive ESI - ion-trap mass spectrometer (LTQ). The mass spectrometer was operated in data-dependent mode to automatically switch between MS full Scan and MS². The MS scan range was *m/z* 300 to 1500, and the top precursor ions were selected from the MS scan for subsequent MS/MS scans by ion trapping. The normalized CID was set to at 35.0.

Table 2-3-1. Results of HeLa Proteome Analysis Using Various Columns

Column name	t_g (h)	Injected sample (μg)	Number of uniquely identified peptides	Number of uniquely identified proteins
MS-100-UP (2m) ^a	4	1	8072	2150
MS-100-UP (2m) ^a	8	1	7487	2127
Merged: MS-100-UP (2m) ^b	-	-	10562	2605
MS-100-C18 (2m) ^a	4	1	8358	1992
MS-100-C18 (2m) ^a	8	1	9489	2169
Merged: MS-100-C18 (2m) ^b	-	-	12118	2529

^a Single analysis was carried out.

^b Results from the two analyses ($t_g = 4$ and 8 h) were merged.

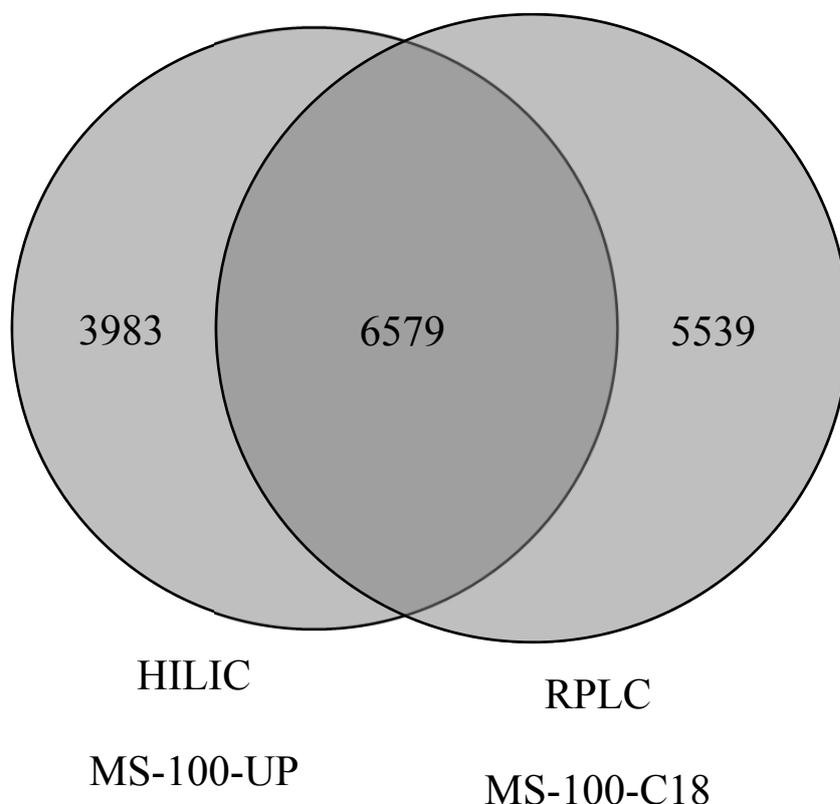


Figure 2-3-3. Comparison of the Number of Identified Peptides Obtained on the HILIC and RPLC Using MS-100-UP and MS-100-C18

Column: MS-100H-UP, 2 m × 100 μm I.D. for HILIC, sample: 1 μg of tryptic peptides from HeLa cell lysate proteins, flow rate: 500 nL/min. Mobile phases consisted of (A) 0.5% CH₃COOH in 10% CH₃CN and (B) 0.5% CH₃COOH in 95% CH₃CN. A two-step linear gradient of 100 % to 80 % B over 4 h or 8 h, 80 % to 0 % B for 10 min, and 0 % B for 10 min was employed. Column: MS-100H-C18 for RPLC, 2 m × 100 μm I.D., sample: 1 μg of tryptic peptides from HeLa cell lysate proteins, flow rate: 500 nL/min. Mobile phases consisted of (A) 0.5% CH₃COOH and (B) 0.5% CH₃COOH in 80% CH₃CN. A two-step linear gradient of 5 % to 40 % B over 4 h or 8 h, 40 % to 100 % B for 5 min, and 100 % B for 10 min was employed. Detection: 2.4 kV positive ESI - tandem quadrupole time-of-flight mass spectrometer (TripleTOF 5600). Results obtained from two analyses ($t_g = 4$ and 8 h) were merged. Other conditions including mass spectrometric condition were described in experimental section.

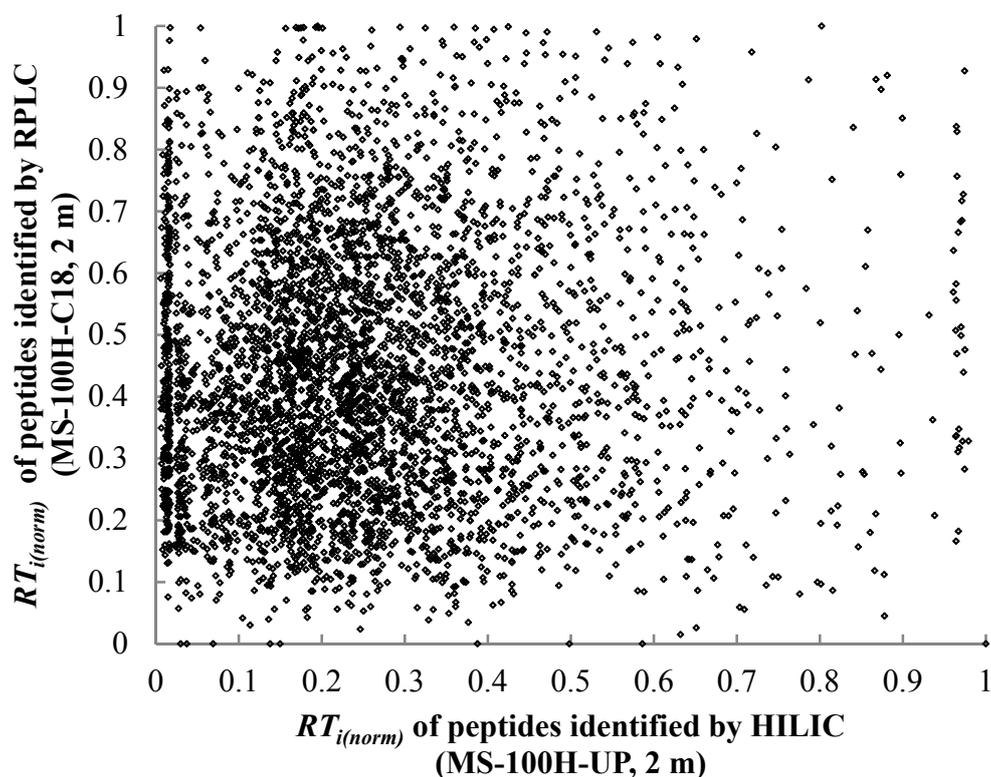


Figure 2-3-4. Orthogonality Plot of Normalized Retention Times for Identified Peptides in HILIC with MS-100H-UP and RPLC with MS-100H-C18

n = 4,282 (number of the peptides co-identified in both modes with $t_g = 8$ h, single analysis).

Column: MS-100H-UP, 2 m \times 100 μ m I.D., sample: 1 μ g of tryptic peptides from HeLa cell lysate proteins, flow rate: 500 nL/min. Mobile phases consisted of (A) 0.5% CH₃COOH in 10% CH₃CN and (B) 0.5% CH₃COOH in 95% CH₃CN. A two-step linear gradient of 100 % to 80 % B over 8 h, 80 % to 0 % B for 10 min, and 0 % B for 10 min was employed. Column: MS-100H-C18, 2 m \times 100 μ m I.D., sample: 1 μ g of tryptic peptides from HeLa cell lysate proteins, flow rate: 500 nL/min. Mobile phases consisted of (A) 0.5% CH₃COOH and (B) 0.5% CH₃COOH in 80% CH₃CN. A two-step linear gradient of 5 % to 40 % B over 8 h, 40 % to 100 % B for 5 min, and 100 % B for 10 min was employed. Other conditions were described in Figure 2-3-3.

第3項 ショットガンプロテオミクス試料を用いた保持特性の評価

前項で述べた通り、直交性を有する二つの分離モードは一段階の分離において共溶出するペプチド群を、更に分離検出する機会を増大させる。例えば、RPLCにおいて分離困難であった類似の疎水性を有するペプチドに対して、HILICでは別の化合物特性（例えば、等電点 (pI) やペプチドの親水性の指標として一般に良く用いられている *GRAVY* (Grand Average of Hydropathy) [83]) の違いを認識し、分離検出する可能性を有する。

MS-100H-UP および MS-100H-C18 を用いた HILIC および RPLC により分離溶出したペプチドの *GRAVY* プロファイルを示す。Figure 2-3-5(A) および Figure 2-3-5(B) に示す。HILIC システムにより同定されたペプチド群の *GRAVY* は、保持時間 (RTs) に対して負の相関を示し、親水性ペプチドを強く保持する傾向が明確に示された一方、RPLC ではその逆の相関が得られた。

次に、Figure 2-3-6(A) および Figure 2-3-6(B) に MS-100H-UP を用いた HILIC および MS-100H-C18 を用いた RPLC により分離溶出したペプチドの pI プロファイルを示す。HILIC システムにより同定されたペプチド群の pI は保持 RTs と顕著な相関が確認され、 pI 値が低い酸性ペプチドが塩基性ペプチドより強く保持されることを確認した。一方、RPLC システムにより同定されたペプチド群の pI と RTs の間には明確な相関が確認されなかった。これらの結果は、今回検討した MS-100H-UP を用いた HILIC モードは親水性相互作用に加えて静電相互作用が加味された静電反発親水性相互作用液体クロマトグラフィー (ERLIC) に分類されることを示唆している[84]。ERLIC は親水性相互作用に加えて静電相互作用を原動力とした分離モードであるが、直接 ESI-MS に導入できる移動相を用いる面で、静電相互作用を主な分離の原動力とする汎用の IEC と異なっており、特定のタンパク質やリン酸化ペプチドを選択的に保持する分離モードとして近年注目を集めている分離モードである。

ERLIC モードとしての MS-100H-UP の特性を更に詳細に考察するために、近年 Gilar らによって提案されたアミノ酸保持係数 (amino acid retention coefficients) を当該分離モードに対して算出並びに考察した[85][86]。アミノ酸保持係数は式 (3-2) により算出され、各アミノ酸残基がペプチドの保持にポジティブ又はネガティブに寄与しているかを明確にする。また、比較対象として、MS-100H-C18 を用いた RPLC モードにおけるアミノ酸保持係数も同時に算出し、比較対象と

した。 $(L$: ペプチドを構成するアミノ酸残基の数, b_i : アミノ酸保持係数, AA_i : 各アミノ酸残基の数, b_0 : 保持時間予測モデルの切片)

$$RT_{\text{pred}} = (1 - 0.21 \ln L) \times (\sum b_i \times AA_i + b_0) \quad (3-2)$$

HILIC および RPLC 両モードに対して得られたアミノ酸保持係数を Table 2-3-2 に示す。MS-100H-C18 を用いた RPLC とは対照的に, MS-100H-UP を用いた HILIC モードにおいて, 疎水性のアミノ酸残基 (特に Trp, Phe, Leu, Ile) はペプチドの保持に対する寄与が小さい (又は負の効果を与える) 一方, 親水性かつ酸性のアミノ酸残基である Asp や Glu がペプチドの保持に強く寄与していることが確認された。また, 注目すべきは, 親水性並びに塩基性アミノ酸残基である His, Lys, Arg がペプチドの保持時間を顕著に減少させる点であり, この点に関しては過去に報告されている一般の HILIC モード[85][86]と異なり, MS-100H-UP はペプチドに対して ERLIC モード様の保持特性を与えることを示唆している。

更に, MS-100H-UP 固定相表面の荷電 pH 状態を検証するために, 河内らによって報告された HILIC 固定相の特性評価法を適用実施した[87]。河内らの報告に従い, キサンチン誘導体であるテオフィリン ($pK_a = 8.6$) およびテオブロミン ($pK_a = 10$) を試験サンプルとして分離した結果, より酸性度が強いテオフィリンが若干強く保持される傾向 ($\alpha (k_{\text{theobromine}}/k_{\text{theophylline}}) = 0.94$) にあったことから, MS-100H-UP 固定相表面は弱い塩基性の性質を有していることが明らかとなった。一般に中性であるはずのウレイドプロピル基を修飾した MS-100H-UP の固定相表面が, 弱い塩基性を帯びている原因については定かではないが, 加熱修飾の際に一部のカルバモイル基が加水分解し, アミノプロピル体に微量変化したか, 試薬時点でアミノプロピル体不純物が含有されていたことが考えられる。ただし, その程度は $\alpha (k_{\text{theobromine}}/k_{\text{theophylline}})$ の値から判断するに極めて小さく, 酸性ペプチドの非特異的な吸着やカラムの急激な劣化は確認されなかった。

また, 前述の通り, 本システムは高濃度な有機溶媒を含む水系移動相 (イオンペア試薬不含) を用いた HILIC システムであることから, RPLC との直交性観点だけでなく, スプレー効率が高い ESI-MS 導入が可能である点で有望である [88]。Figure 2-3-7 に MS-100H-UP を用いた HILIC と MS-100H-C18 を用いた RPLC の両システムにおいて, 共に同定されたペプチドに対する MS 感度の比較を行

った結果を示す。驚くべきことに、同じカラム長を有する両システムに対して同量のペプチド(1 µg)を注入し、同グラジエント時間で分析したにも関わらず、MS-100H-UP を用いた HILIC システムにおいて、共通に同定された 4,282 個のペプチドに対して平均で約 5 倍の検出感度を得た。また、Figure 2-3-8 に示されている通り、MS-100H-UP を用いた HILIC システムは、RPLC システムにおいて低い感度で検出されたペプチドを、より選択的に高感度で検出することが可能であることから、RPLC システムでは同定されないユニークなペプチドを同定するための有用なツールになることが示唆された。

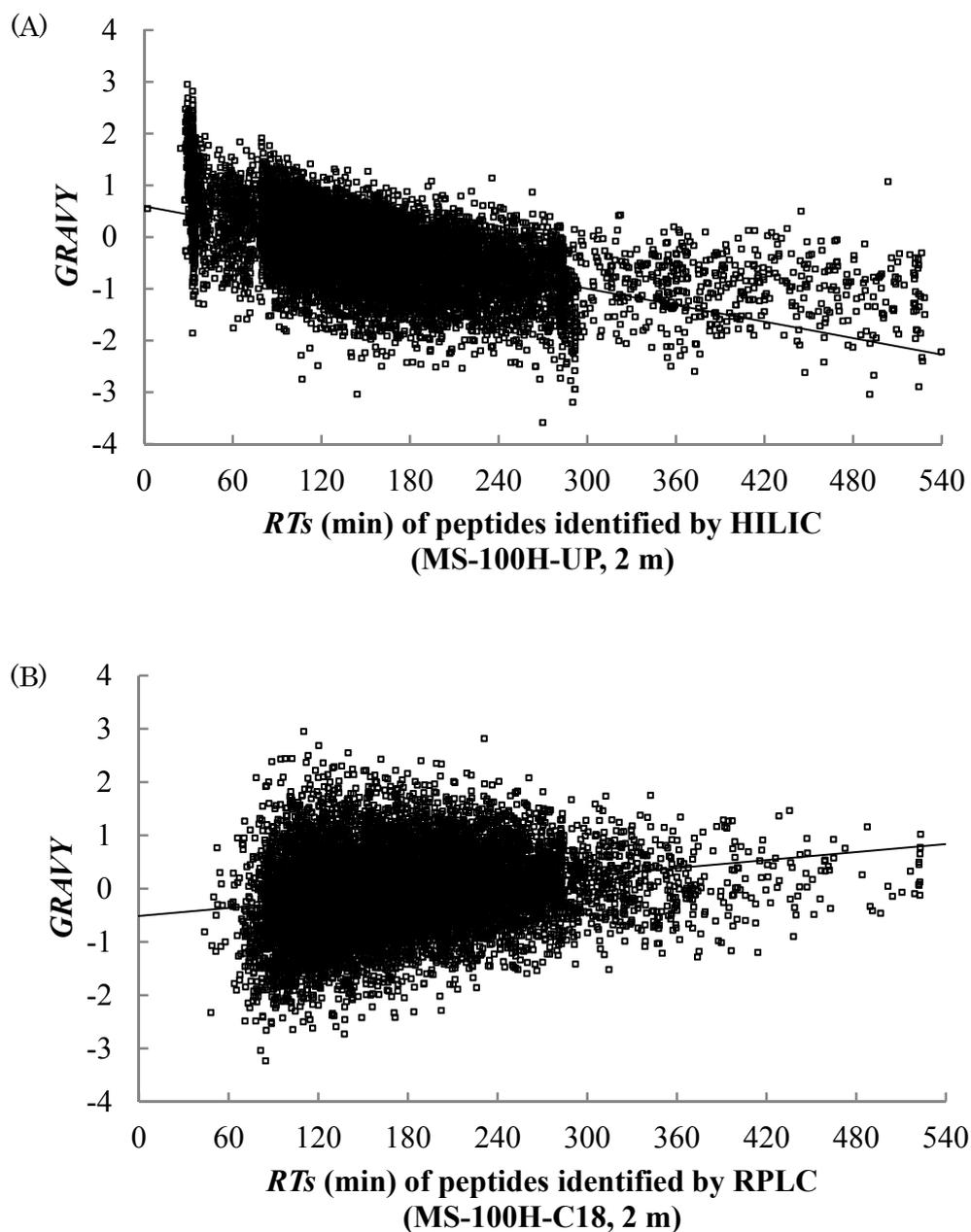


Figure 2-3-5. Plots of Retention Times and *GRAVY* Values for Identified Peptides in the HILIC Mode with MS-100H-UP and in the RPLC Mode with MS-100H-C18

Conditions were described in Figure 2-3-4.

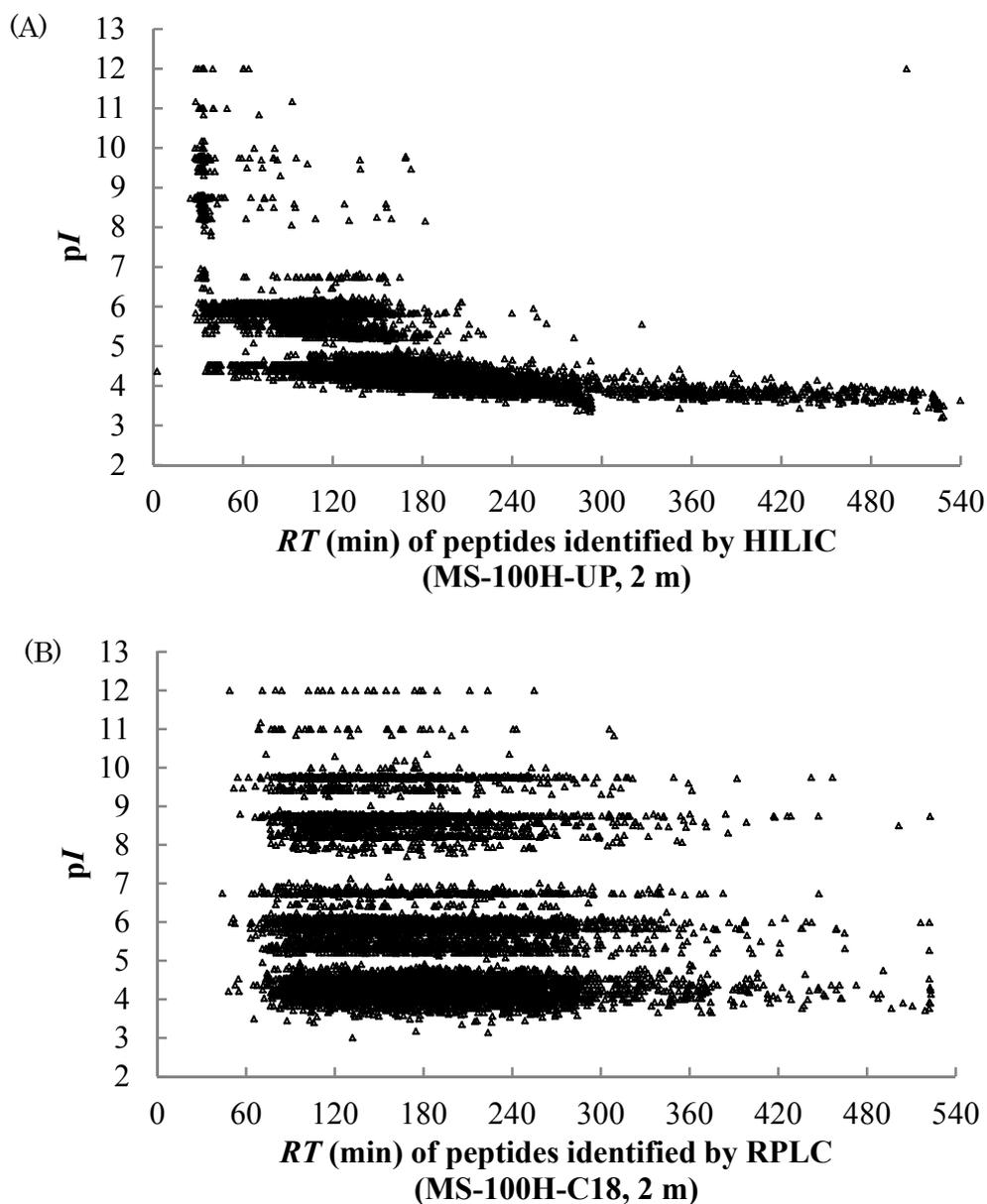


Figure 2-3-6. Plots of Retention Times and pI Values for Identified Peptides in the HILIC Mode with MS-100H-UP and in the RPLC Mode with MS-100H-C18

Conditions were described in Figure 2-3-4.

Table 2-3-2. Amino Acid Retention Coefficients for Peptide Separation by HILIC and RPLC

Amino acid residue	Retention coefficients ^a	
	MS-100H-UP (HILIC)	MS-100H-C18 (RPLC)
Ala	11.72	41.74
Arg	-75.62	-48.73
Asn	45.66	12.29
Asp	162.33	41.60
Carbamidomethyl Cys	41.42	23.83
Gln	42.11	21.76
Glu	101.93	40.80
Gly	39.44	13.66
His	-55.02	-63.12
Ile	-12.34	143.00
Leu	-14.11	159.26
Lys	-85.96	-60.77
Met	-11.10	120.20
Phe	-11.16	191.49
Pro	26.31	36.07
Ser	45.72	20.89
Thr	29.91	33.91
Trp	-8.23	218.21
Tyr	20.95	99.21
Val	-2.68	88.37
Free term, b_0	-26.17	-156.83

^a Retention coefficients were obtained by regression analysis based on the equation (3-2) for peptides identified from 8 h gradient runs..

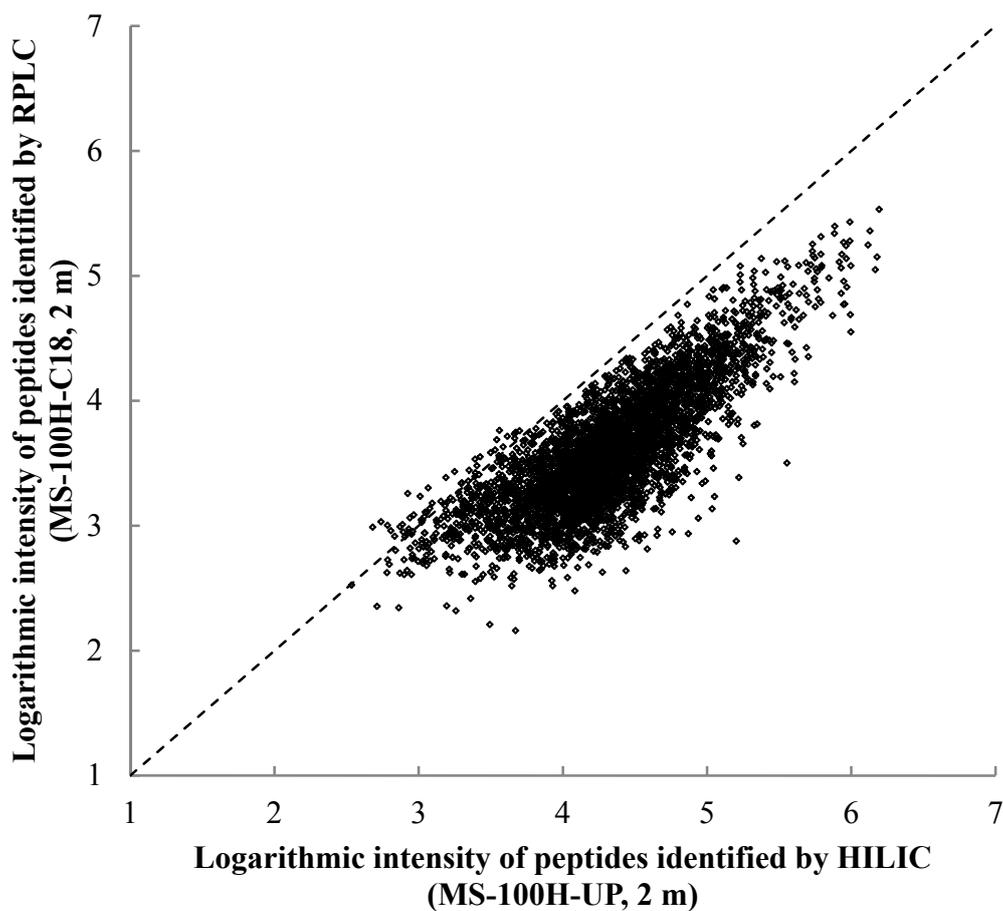


Figure 2-3-7. Comparison of MS Intensity for Identified Peptides in HILIC by MS-100H-UP and RPLC by MS-100H-C18

Conditions were described in Figure 2-3-4.

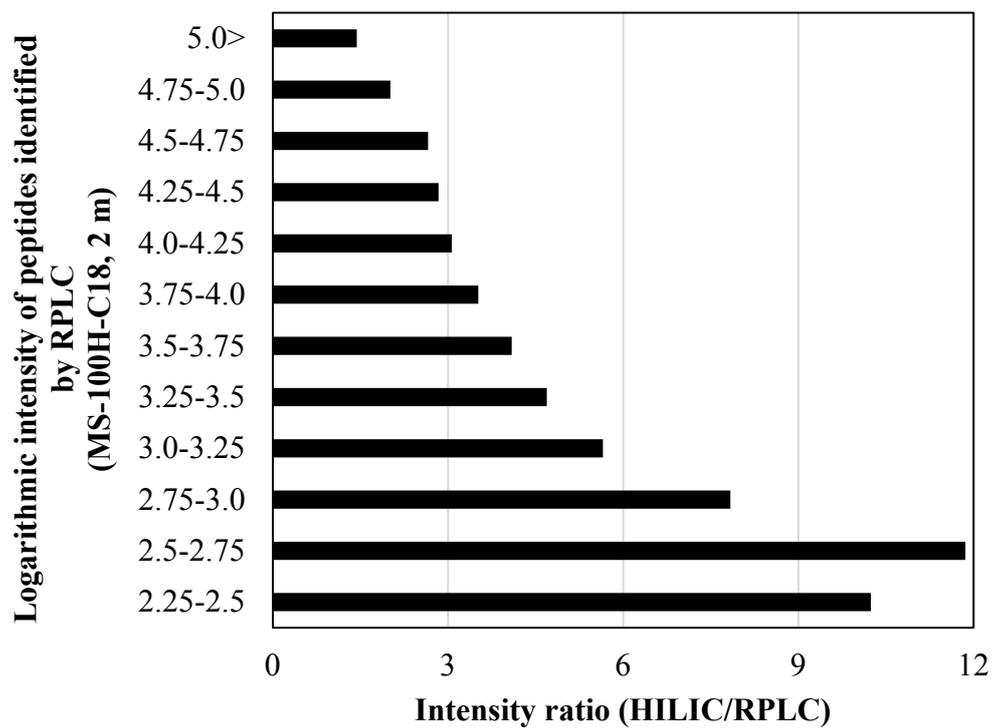


Figure 2-3-8. Intensity Ratio of HILIC/RPLC Modes against the Intensity of Peptides from RPLC System

Conditions were described in Figure 2-3-4.

第4節 総括

以上、ポリアクリルアミド修飾モノリス型シリカキャピラリーカラム、ポリアクリル酸修飾モノリス型シリカキャピラリーカラム、並びにウレイドプロピル修飾モノリス型シリカキャピラリーカラムの開発を行い、主に HILIC モードにおける応用例を取得すると共に、その有用性を確認した。

ポリアクリルアミド修飾モノリス型シリカキャピラリーカラムに関しては、一般に用いられる RPLC では分離検出が困難である非誘導体化糖類を良好に分離検出し、その性能は粒子充填型カラムと比較して高速領域下でも抜群に優位であった。また、ポリアクリル酸修飾モノリス型シリカキャピラリーカラムに関しては、その固定相表面の解離性かつ高極性の特性を利用して、IEC 並びに HILIC の両モードで活用することが可能であり、タンパク質やペプチド、糖類など様々な化合物に対して粒子充填型カラムと比較して優位な分離性能を示すことを確認した。これら2種のカラムは、ポリマーで基材表面を被覆する重合修飾法により調製されており、調製条件の変更により固定相量をコントロールすることが可能で、モノリス型シリカカラムの弱点であった低保持の側面を補うことが可能であることを強調しておきたい。

ウレイドプロピル修飾モノリス型シリカキャピラリーカラムに関しては、モノリス基材の性能を維持したメートル長フォーマットでの調製が可能であり、HILIC 用カラムとしては世界で始めて数十万段の超高理論段数を発現する高性能カラムの作成に成功した。本カラムを用いた HILIC モードはペプチドに対して RPLC モードと比較して高い保持直交性を有することから、現在主に実施されている RPLC モードをベースとするプロテオーム解析に相補的な価値を与えるものと考えられる。また驚くべきことに、本カラムを用いた HILIC モードは ESI-MS によるペプチドの検出感度を劇的に向上させたことから、今後、相補的な活用のみならず、プロテオーム解析における主力分析ツールとしての活用が期待される。

結論

C18修飾メートル長ロングモノリス型シリカカラムの適正な使用によるRPLC単独の分離性能の向上を企図して、 N 並びに PC を指標とするシミュレーションを実施することにより、HPLC条件の最適化を行った。その結果、最大の PC を得るための L および t_g に関する知見が得られ、当該シミュレーションを用いることにより、実際のショットガンプロテオミクスにおけるペプチドおよびタンパク質の同定数が最大化されることを確認した。また、高い PC を得るためのもう一つの手段である2D-LCに関して、最大の分離能 PC を発現するための条件最適化法に関する検討を実施した。その結果、適切な条件選択により更なる高性能分離の可能性を示唆する新たな知見を得た。

次に、RPLC単独では十分な保持が得られない、又は高い保持直交性を必要とする複雑な高極性化合物群の高性能分離を企図して、ポリアクリルアミド、ポリアクリル酸、並びにウレイドプロピル基を固定相とする新規HILICおよびIEC用キャピラリーカラムを開発した。これらのキャピラリーカラムを用いたnanoLC-ESI-MSシステムは、極微量の糖類に代表される高極性化合物群を誘導体化せずに分離検出が可能であり、また、タンパク質やペプチドに対してもIECおよびHILICモードで高い分離性能を示した。特に、ウレイドプロピル基を有する新規HILIC用カラムをメートル長のロングカラムフォーマットで用いた場合、その高い保持直交性と検出の高感度化に由来して従来のRPLCベースのシステム単体では同定されなかったユニークなペプチド群の同定が可能であり、本システムの相補的活用によるペプチドおよびタンパク質の同定数の向上並びに2D-LCへの将来的な展開の可能性が示唆された。

以上、モノリス型シリカカラムを用いることにより、数十万を越す理論段数の発現や数千以上のピークキャパシティーの発現など、従来型システムでは達成し得ない高性能分離の獲得が可能である旨を述べた。しかし同時に、企図する十分な分離性能を得るためには、適切なHPLC条件の選定、並びに分析対象や目的を理解した上で適切な分離モードを選択する必要である事も示した。緒言冒頭でも述べた通り、「全て」を分離することができるHPLCシステムの開発はクロマトグラファーの夢であり、それは最大の目的である人々の健康と幸福

の実現へとつながる。本研究で得た知見を存分に活用することにより、HPLC 分離性能が向上し、その夢に一步近づくことが可能である。

謝辞

本研究にあたり、終始ご懇篤なご指導、ご鞭撻を賜りました京都大学大学院薬学研究科製剤機能解析学分野教授 石濱泰先生に深く感謝申し上げます。

また、本研究の着想から遂行にいたるまで、ご指導を賜りました京都工芸繊維大学名誉教授 田中信男先生、同大学大学院准教授 池上亨先生、京都府立大学大学院教授 細矢憲先生に心より感謝申し上げます。また、国際基幹技術者養成教育プログラムによる出向を介して実験の場並びに貴重なご助言を賜りました University of California at Davis, Department of Molecular and Cellular Biology

& Genome Center の Prof. Oliver Fiehn, Dr. Nabil Saad を始めスタッフ皆様に深く感謝いたします。

本研究の機会を与えて頂いたエーザイ株式会社 内藤晴夫社長、林秀樹副社長、プロダクトクリエイション本部アンドーバーサイト研究推進担当部長 瀬戸山敦博士、ファーマシューティカル・サイエンス&テクノロジー機能ユニット グローバル製剤研究担当部長 加藤晃良博士、同ユニット シニアサイエンティフィックアドバイザー部長 浅川直樹博士、製剤研究部長 瀬能敬司様、製剤研究部製剤分析第一グループ統括課長 長田勝信様、製剤研究部製剤分析第二グループ統括課長 加藤隆様、並びに同グループ課長 鈴木康之様、横山誠博士、村松憲雄様、奈良崎竜一博士、また、筑波研究所での実験におきましてご支援賜りましたバイオマーカー&パーソナライズド・メディシン機能ユニット プレジデント 小田吉哉博士に深く感謝いたします。

また、本研究を進めるにあたり、ご協力を頂いた、京都大学大学院 薬学研究科 製剤機能解析学分野准教授 杉山直幸先生、同分野助教 若林真樹先生、同分野学生 岩崎未央博士、山名涼太様、市原駿様、鎌倉健雄様始め、製剤機能解析学分野研究室の皆様にご感謝申し上げます。エーザイ株式会社内におきましては、バイオマーカー&パーソナライズド・メディシン機能ユニット 中村立二博士、佐藤義明博士、木村剛之様に深謝申し上げます。また、京都工芸繊維大学時代に多くのご指導を頂きました原健士博士、木村宏様、小林宏資様を始め、分子機能解析研究室（現：高分子有機化学研究分野）の皆様にご感謝いたします。また、モノリス型シリカキャピラリーカラムや HPLC 装置等の備品を提供してくださいました(株)ジーエルサイエンス様に心より感謝申し上げます。

最後に、本研究にあたり、応援してくれた父 進，母 直子，義父 河合芳美，
義母 河合継子，また，最後まで支えてくれた妻 千夏に感謝します。

実験の部

1. 試薬

1.1. 溶媒および塩類

超純水 (water) : MilliQ A-10 Gradient システムにより精製したもの, 又は同等品を使用した。

メタノール (CH_3OH) : 市販品 (試薬特級) を蒸留精製したもの, 又は LC-MS グレードを使用した。

アセトニトリル (CH_3CN) : 市販品 (試薬特級) を蒸留精製したもの, 又は LC-MS グレードを使用した。

テトラヒドロフラン (THF) : 市販品 (試薬特級) に水素化カルシウム存在下で 2 時間還流した後, 蒸留精製したものを使用した。

トルエン : 市販品 (試薬特級) に水素化カルシウム存在下で 2 時間還流した後, 蒸留精製したものを使用した。

ピリジン : 市販品 (試薬特級) に水素化カルシウム存在下で 2 時間還流した後, 蒸留精製したものを使用した。

ギ酸 (HCOOH) : LC-MS グレードを使用した。

酢酸 (CH_3COOH) : LC-MS グレードを使用した。

酢酸アンモニウム ($\text{NH}_4\text{OCOCH}_3$) : LC-MS グレードを使用した。

その他, 溶媒および塩類は全て市販の試薬特級グレードを使用した。

1.2. モノリス型シリカの調製試薬

テトラメトキシシラン (TMOS) (信越化学), メチルトリメトキシシラン (MTMS) (信越化学), ポリエチレングリコール (PEG) (MW = 10,000) (ALDRICH), 尿素 (和光純薬), 酢酸 (CH_3COOH) (ナカライテスク)

1.3. シリル化剤の合成試薬およびシリル化試薬

オクタデセン (ナカライテスク), ジメチルクロロシラン (信越化学), 塩化白金酸 (ナカライテスク), ジエチルアミン (DEA) (ナカライテスク), 塩化メタ

クリロイル（和光純薬），アミノプロピルトリエトキシシラン（APTES）（チッソ），トリエチルアミン（ナカライテスク），ウレイドプロピルトリメトキシシラン（UPTMS）（Gelest）

1.4. 重合修飾固定相の調製に用いた試薬

アクリル酸（AA）（東京化成），アクリルアミド（AAm）（和光純薬），過硫酸アンモニウム（APS）（和光純薬）

1.5. HPLC の評価に用いた試薬

アルキルベンゼン類：

ベンゼン，トルエン，ヘキシルベンゼン（ナカライテスク）

核酸塩基類：

ウラシル，チミン，シトシン，アデニン（和光純薬）

ヌクレオシド類：

チミジン，ウリジン，2-デオキシウリジン，アデノシン，2-デオキシアデノシン，シチジン，2-デオキシシチジン，グアノシン，2-デオキシグアノシン（和光純薬）

糖類：

グルコース，セドヘプチュロース，スクロース，マルトース，トレハロース，ラフィノース，マトトリオース，マトルテトラオース，マルトペンタオース，マルトヘキサオース，マルトヘプタオース（ナカライテスク）

標準タンパク質：

オブアルブミン，トリプシノーゲン，リボヌクレアーゼ A，リゾチーム，牛血清アルブミン（BSA）（SIGMA）

標準ペプチド類：

SIGMA-P2693 (標準ペプチド混合物), DSDPR, VGSE, γ -EH (SIGMA), BSA トリプシン消化物, Phosphorylase B トリプシン消化物 (Waters)

ポリスチレン類 :

サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) 用標準ポリスチレン (ケムコ), ポリスチレンオリゴマーMW580 (ジーエルサイエンス)

1. 6. LC-MS による応用研究に用いた試薬

・ トウモロコシ, 大豆およびシロイヌナズナ抽出物 :

University of California at Davis, Department of Molecular and Cellular Biology & Genome Center の Prof. Oliver Fiehn から提供を受けた。(各植物凍結乾燥品に対して適量の水を加えた後に, 粉碎後, 溶媒抽出したもの)

・ ヒト肺線癌細胞 (PC-9 cell) 中タンパク質消化ペプチド :

15 cm 直径プレート上で培養した PC-9 cell (5×10^7 cell) に対して, 1 mL のリン酸緩衝液を加えて粉碎抽出後, 遠心分離を実施し, 上澄み液中に存在するタンパク質含量を定量キット (Bio-Rad) によって測定した。その後, 500 mM トリス塩酸緩衝液 pH 8.5 により pH を調節後, 8 M 濃度となるように尿素を添加した。これらの混合溶液に対して, ジチオスレイトール (DTT) (和光純薬) およびヨードアセトアミド (IAA) (和光純薬) を加えて還元アルキル化を実施した後に, PD-10 カラム (GE Healthcare Life Sciences) にて脱塩処理を実施した。その後, リジルエンドペプチダーゼ (Lys-C) (和光純薬) を加えて 37 °C 条件下で 3 h 消化した。その後, 50 mM 炭酸アンモニウム水溶液で 4 倍に希釈後, トリプシン(プロメガ)を加えて 37 °C 条件下で 24 h 消化した。トリフルオロ酢酸(TFA)により消化反応を終了後, 得られた溶液に対して, Empore C18-SD ディスクカートリッジ (3M) にて脱塩濃縮したものを試料とした。

・ ヒト子宮頸癌細胞 (HeLa cell) 中タンパク質消化ペプチド :

15 cm 直径のプレート上で培養した HeLa cell (5×10^6 cell) に対して, 1 mL の Phase transfer surfactant (PTS) 溶液^a を加え, 懸濁後, 95 °C にて 5 min 加熱した。その後, 氷冷下で 20 min 超音波抽出を行い, 得られた溶液中に存在するタ

ンパク質含量を定量キット (Thermo Scientific) によって測定した。これらの混合溶液に対して、DTT および IAA を加えて還元アルキル化を実施した後に、50 mM 炭酸アンモニウム水溶液で 5 倍に希釈後、Lys-C を加えて 37 °C 条件下で 3 h 消化した。その後、トリプシンを加えて 37 °C 条件下で 24 h 消化した。得られた溶液に対して、同量の酢酸エチルを添加し、最終濃度が 0.5% となるように TFA を添加した。遠心分離を行った後に、上層の酢酸エチル層を除去し、真空乾燥により試料を乾固した。その後、0.5%CH₃COOH 水溶液にて再溶解後、C18 Stage Tip (スチレンジビニルベンゼンシートをピペットマンチップ内に積層充填したもの) により脱塩濃縮したものを試料とした。

^a PTS 溶液 :

水, 120 mM SDC (デオキシコール酸ナトリウム), 120 mM SLS (ラウロイルサルコシン酸ナトリウム), 1 M トリス塩酸緩衝液 (pH 9.0) を 67/10/10/10 (v/v/v/v) で混合したもの。

2. 装置

2.1. モノリス型シリカキャピラリーカラムの調製

ユニット恒温槽 : THERMO MINDER DX-10 (タイテック)

オーブン : Constant Temperature Oven DN 400 (ヤマト)

恒温炉 : Muffle Furnace FP 42 (ヤマト)

2.2. HPLC および MS 装置

送液ポンプ : PU611 (ジーエルサイエンス)
: LC-20AD prominence (島津製作所)
: Agilent 1100 (Agilent Technologies)
: Ultimate3000 nano-flow pump (Thermo Scientific)

インジェクター : RHEODYNE 7725 (IDEX Health & Science)
: VALCO C4-00R-.05 (or 02) (VICI)
: HTC-PAL autosampler (CTC Analytics)

カラムオープン	: CO-631C (ジーエルサイエンス)
紫外吸収検出器	: CE-1575 UV (日本分光)
	: MU701 (ジーエルサイエンス)
UV データプロセッサ	: EZChrom Elite (ジーエルサイエンス)
質量分析計	: LTQ (Thermo Scientific)
	: Q-TOF micro (Waters)
	: TripleTOF 5600 (AB SCIEX)
MS データプロセッサ	: Xcalibur (Thermo Scientific)
	: MassLynx (Waters)
	: Analyst (AB SCIEX)
ペプチドおよびタンパク質同定・解析ソフト	: Xome (三井情報開発株式会社)
	: Mass++ (CREST - エーザイ)

3. モノリス型シリカキャピラリーカラムの調製

モノリス型シリカキャピラリーカラムの調製は、アルコキシシランの加水分解および重縮合により引き起こされるゾルーゲル法により行った[18]。

3.1. フューズドシリカキャピラリーの内壁処理

100 μm 又は 200 μm I.D., 375 μm O.D.のフューズドシリカキャピラリー (molex) に 1 M 水酸化ナトリウムを送液し、40 $^{\circ}\text{C}$ で 3 h 放置した。次に 1 M 塩酸で洗浄を行った後、超純水、アセトンの順に洗浄を行い、乾燥した。

3.2. Hybrid 型モノリス型シリカキャピラリーカラムの調製

氷冷下で PEG 1.8 g と尿素 4.0 g に 0.01 M CH_3COOH 40 mL を加えて 30 min 攪拌した。混合溶液に TMOS と MTMS の混合アルコキシシラン (3:1 v/v) を 18 mL 滴下し 30 min 攪拌を行った。混合溶液を PTFE フィルター (0.45 μm) でろ過した。この混合溶液を内壁処理済のフューズドシリカキャピラリー中に注入し、40 $^{\circ}\text{C}$ にて 24 h 反応を行いゲル化させた。次に、両端を 0.06 g/mL 尿素水に浸し

た状態でこのキャピラリーを 90 °C 加熱エージング処理し (24 h), その後 120 °C で熱処理を 4 h 行った。熱処理を行うことにより骨格の再結合, および尿素の分解により発生するアンモニアによるシリカの溶解によるメソポアの形成を行った。その後, キャピラリー内を CH₃OH で洗浄した。最後に 330 °C 電気炉内でキャピラリー内を完全に乾燥熱処理を行い, hybrid 型モノリス型シリカキャピラリーカラム^bを得た。

^b 本 hybrid 型モノリス型シリカキャピラリーカラムを第一世代モノリスと呼ぶ [21]。

3.3. TMOS 型モノリス型シリカキャピラリーカラムの調製

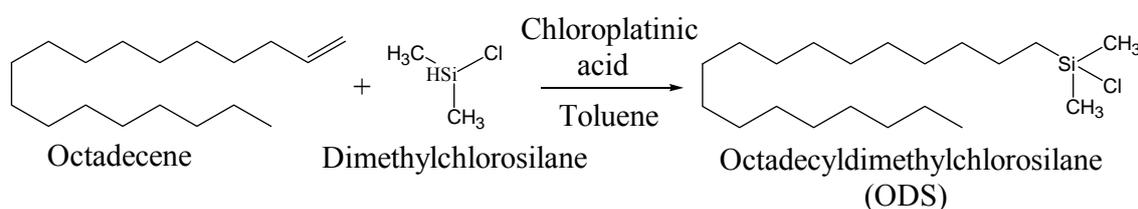
氷冷下で PEG 11.9 g と尿素 9.0 g に 0.01 M CH₃COOH 100 mL を加えて 30 分間攪拌した。混合溶液に TMOS 56 mL を加えて再び 30 min 攪拌した。その後, 混合溶液を PTFE フィルター (0.45 μm) でろ過した。この混合溶液を内壁処理済のフューズドシリカキャピラリー中に注入し, 25 °C で 24 h 反応を行いゲル化させた。次に, 両端を 0.06 g/mL 尿素水に浸した状態でこのキャピラリーを 90 °C 加熱エージング処理し (24 h), その後 120 °C で熱処理を 3 h 行った。熱処理を行うことにより骨格の再結合, および尿素の分解により発生するアンモニアによるシリカの溶解によるメソポアの形成を行った。その後, キャピラリー内を CH₃OH で洗浄した。最後に 330 °C 電気炉内でキャピラリー内を完全に乾燥熱処理を行い, TMOS 型モノリス型シリカキャピラリーカラム^cを得た。

^c 本 TMOS 型モノリス型シリカキャピラリーカラムを第二世代モノリスと呼ぶ [21]。

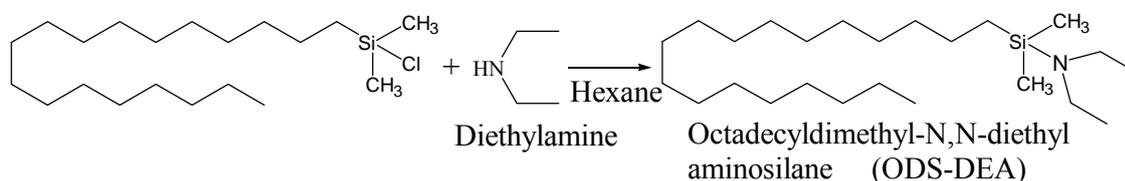
4. C18 修飾モノリス型シリカキャピラリーカラムの調製

4.1. オクタデシルジメチル-N,N-ジエチルアミノシランの合成

オクタデセン 25.24 g をトルエン約 20 mL に溶解させ, 塩化白金酸を少量加えた。これにジメチルクロロシラン 13.1 mL を滴下し約 100 °C にて 24 h 加熱還流を行った。その後, エバポレーターにてトルエン, ジメチルクロロシランを除去した後, 減圧蒸留によりオクタデシルジメチルクロロシラン (ODS) を得た。



次に、ジエチルアミン 6 mL をとり、それに ODS 4.25 g とヘキサン約 2 mL を加え 37 °C 恒温槽中で 1 h 攪拌した。生成した塩をメンブランフィルターで除去し、その後、エバポレーターでヘキサンを除去し ODS-DEA を得た。



最後に、得られた ODS-DEA を 20%(v/v)トルエン溶液として、C18 修飾シリル化剤とした。

4.2. モノリス型シリカキャピラリーカラムの ODS-DEA によるシリル化

THF, トルエンで置換した 100 μm I.D.の hybrid 型モノリス型シリカキャピラリーカラム, および 200 μm I.D.の TMOS 型モノリス型シリカキャピラリーカラムに上記の 20% ODS-DEA トルエン溶液を反応温度 80 °C 下, 1 MPa にて圧力送液した。その後, トルエン, THF の順でキャピラリー内の洗浄を行うことにより C18 修飾モノリス型シリカキャピラリーカラム (MS-100H-C18 および MS-200T-C18 と称する) を得た。

4.3. ウレイドプロピル基修飾モノリス型シリカキャピラリーカラムの調製

CH_3OH , トルエンで置換した 100 μm I.D.の hybrid 型モノリス型シリカキャピラリーカラムにウレイドプロピルトリメトキシシラン (UPTES), トルエン, ピリジン混合溶液 (体積比 v/v/v 2:3:3 又は w/v/v 1:2:2) をシリンジポンプを用いて反応温度 80 °C 又は 70 °C 下で 24 h 送液した。その後, トルエンでキャピラリー

内の洗浄を行った後、同様の操作を再度行いモノリス型シリカキャピラリーカラムのウレイドプロピル修飾（UP）を行うことによりウレイドプロピル基修飾モノリス型シリカキャピラリーカラム（MS-100H-UP と称する）を得た。

5. 重合修飾モノリス型シリカキャピラリーカラムの調製

重合修飾モノリス型シリカキャピラリーカラムは Figure 1 に示すスキームに沿って調製した。

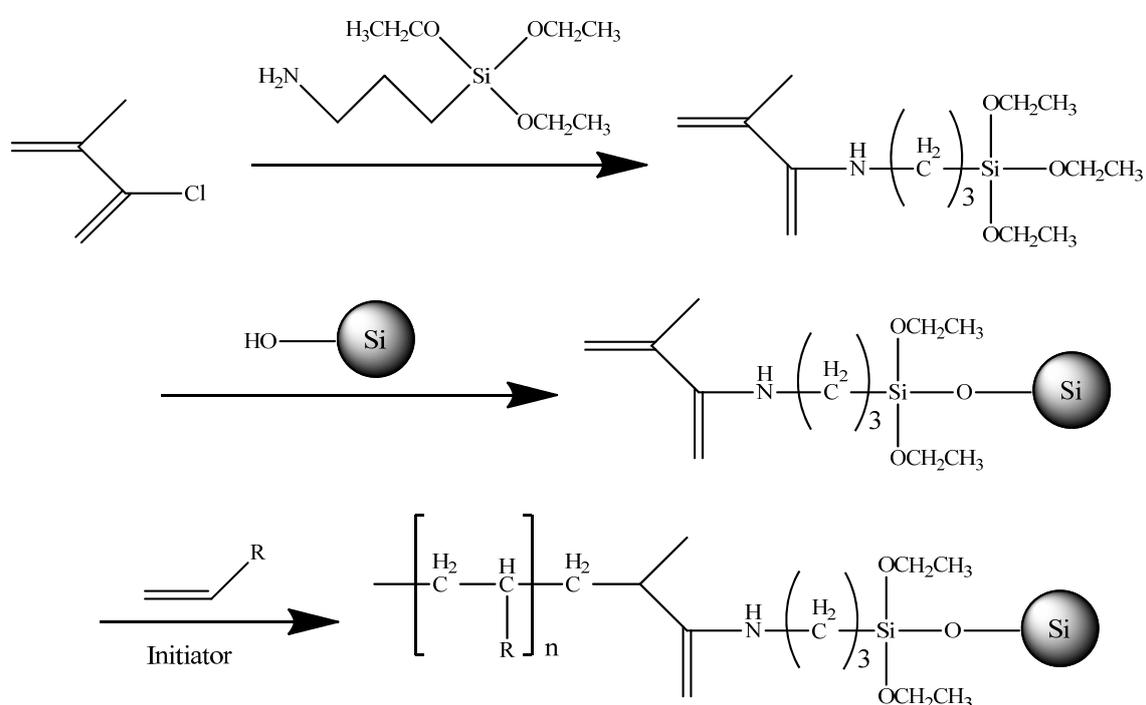


Figure 1. Preparation Scheme of Stationary Phase Consisting of Polymer Coating

5.1. [3-(メタクリロイルアミノ)プロピル]トリエトキシシランの合成

アミノプロピルトリエトキシシラン (APTES) 25 mL, トリエチルアミン 25 mL をトルエン 50 mL に溶解した。氷冷下で塩化メタクリロイル 15.6 mL とトルエン 20 mL の混合溶液を約 1 h かけて滴下した。その後、室温で 30 min 攪拌し、メンブランフィルター (2 μm) で溶液をろ過し、ろ液をエバポレーターで濃縮し、[3-(メタクリロイルアミノ)プロピル]トリエトキシシラン (MATES) を得た。得られた生成物は濃黄色の粘重な溶液であった。

5.2. モノリス型シリカキャピラリーカラムの[3-(メタクリロイルアミノ)プロピル]トリエトキシシランによるシリル化

CH_3OH , トルエンで置換した 200 μm I.D. の TMOS 型モノリス型シリカキャピラリーカラムに MATES, トルエン, ピリジン混合溶液 (同一体積比) をシリンジポンプで 24 h 送液した (反応温度 80 $^\circ\text{C}$)。その後、トルエンでキャピラリー内の洗浄を行った。同様の操作を再度行うことにより、[3-(メタクリロイルアミノ)プロピル]トリエトキシシラン修飾モノリス型シリカキャピラリーカラムを得た。(MS-200T-MAS と称する)

5.3. 重合修飾固定相の調製

重合開始剤 (過硫酸アンモニウム (APS)) を含んだモノマー溶液 (アクリル酸 (AA) 又はアクリルアミド (AAm)) を、予め水で置換した MS-200T-MAS に室温で十分量送液し、カラム内にモノマー溶液の充填を行った。その後、それぞれの重合温度に設定したウォーターバス中に両端を密栓したカラムを投入し、所定の時間重合させた。最後に HPLC ポンプにより水を負荷圧 20 MPa で送液し、キャピラリー内を洗浄することによりアクリルアミド又はアクリル酸重合修飾モノリス型シリカキャピラリーカラムを得た。(MS-200T-PAAm, MS-200T-PAA と称する)

モノマーの構造とその略号および重合条件を Table 1 にまとめた。また、カラム名称は以下の取り決めにより決定した。

(例) MS - 200 T - PAA

① ② ③ ④

① : モノリス型シリカカラム, ② : カラム内径 (μm), ③ : TMOS 型 or Hybrid 型, ④ : 固定相の種類

Table 1. Preparing Condition of Polymer Coated Stationary Phase

Column	Monomer	Monomer volume (μL or mg)	Initiator ^a (mg)	Solvent ^b (μL)	<i>T</i> ($^{\circ}\text{C}$)	Time (h)
MS-200T-PAA	acrylic acid (AA)	30 μL ^c (10, 50, 60 μL)	5	1,000	60	2
MS-200T-PAAm	acrylamide (AAm)	40 mg	5	1,000	60	1

^a Initiator: APS (ammonium persulfate)

^b Solvent: water

^c Composition of monomer was changed in the range of 10 – 60 μL to control the amount of stationary phase. (See the section, 2.2.6.) Basically, the composition of 30 μL -AA was applied to MS-200T-PAA for any application except for the section, 2.2.6.

6. モノリス型シリカキャピラリーカラムの評価とその応用

6.1. モノリス型シリカキャピラリーカラムの HPLC 評価 (1)

モノリス型シリカキャピラリーカラムの理論段数等による評価においては、RHEODYNE 7725 インジェクターを用いたスプリット注入による測定を行った。Figure 2 にスプリット注入 HPLC 装置の概略図を示す。長さ 25 cm, 200 μm I.D. カラム (内容積 8 μL) にインジェクターからダイレクトに試料溶液 10–20 nL を注入した場合、保持の小さな溶質に対して理論段数が 50%以上低下することがある[89]。100 μm I.D.のカラムにおいてはさらに影響が大きい。この程度の試料体積のバルブ注入による性能低下は、スプリット注入の活用、および、溶出強度の弱い移動相の使用によるカラムヘッド濃縮により軽減できる。

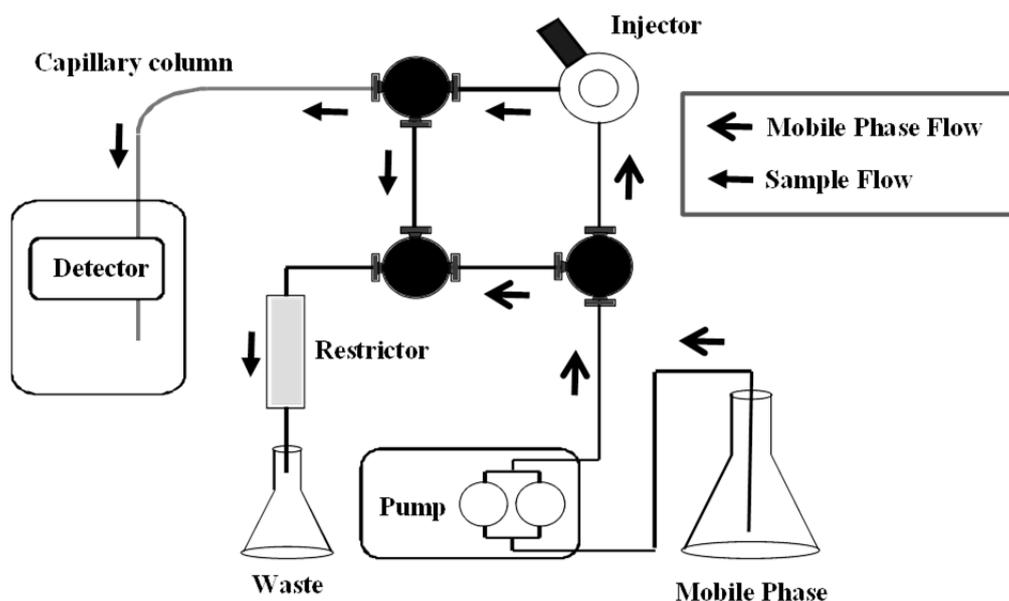


Figure 2. Outline of Split Injection HPLC System

6.2. モノリス型シリカキャピラリーカラムの HPLC 評価 (2)

固定相の保持挙動等の確認は VALCO C4-00R ナノインジェクターバルブによるダイレクト注入により実施した。また今回開発したシステムは全て nanoLC システムであるため、ナノ - マイクロオーダーの微小流量が必要となる。今回の報告では生体試料を用いた応用検討を除き、全て汎用ポンプからの通常流量をスプリットすることにより、これを実施している。検出にはカラム外効果を最小限に抑えることが可能であるキャピラリーUV 検出器を使用した。

6.3. モノリス型シリカキャピラリーカラムの SEC 評価

重合修飾によるシリカ骨格内空隙体積の変化を調べるために、SEC による検討を行った。100% THF を移動相として、ベンゼンおよび単分散標準ポリスチレンを試料溶質として用いた。この場合の測定はスプリットフロー&ダイレクト注入方式を用いた。スプリットフローによる SEC 測定のため、校正曲線の作成のためには絶えず流量の再現性を確認しながらの測定が必要になる。今回は、カラムの後ろ側に二つの検出窓を有するオフカラム (検出窓間 100 μm I.D. \times 50 cm) を連結し、ベンゼン (全透マーカー) の二箇所での UV 検出の時間差を測定する方法で流量を決定した。

6.4. モノリス型シリカキャピラリーカラムの LC-MS による評価と応用

ラベルフリーの糖類又はペプチド類の分離検出に関する検討には nanoLC-ESI-MS システムを用いた。イオンソースにはキャピラリーLC のカラム外効果を抑える目的と、高感度検出の目的のために T 型ユニオンでキャピラリーカラムと ESI スプレーチップを連結し、残った一流路部に白金線を接続することにより、そこから電圧印加する nano-ESI ソースを用いた。ESI スプレーチップには PicoTip EMITTER (FS360-50-30-D-5) (New Objective), 又は MonoSpray FS (50 μm I.D. \times 50 mm) (ジーエルサイエンス), 又は Sutter P-2000 (Novato) を用いて作成したモノリス型シリカスプレーチップエミッター (20 μm I.D. \times 50 mm) を用いた。

ペプチド類を同定する nanoLC-ESI-MS/MS 検討の際、MS スキャンレンジは LTQ および TripleTOF 5600 共に $m/z = 300 - 1500$ とした。TripleTOF 5600 の MS 設定条件に関して、MS フルスキャンを 0.25 s 実施後、続いて検出強度が強い順に 10 個の成分に対してそれぞれ 0.1 s の MS/MS 分析を実施した。同一のプリカーサーイオンを繰り返し選択する回数を低減するために、一度スキャンしたプリカーサーイオンは 12 s 間、MS/MS 分析候補から除外した。なお、衝突誘起解離 (CID) の強度は Analyst ソフトウェアに付属する自動的調節機能により設定した。

6.5. LC-MS/MS データ解析とペプチドおよびタンパク質の同定

生体試料中（本研究においては、PC-9 cell および HeLa cell）のタンパク質消化ペプチドを nanoLC-ESI-MS/MS により分析後、ピークリストおよびピークの保持時間や強度等を得るためのデータ解析のために、Mass ++ソフトウェア並びに Xome ソフトウェアを使用した。ペプチドおよびタンパク質の同定は NCBI nr および Swiss Plot データベースに対応する Mascot v2.1 又は v2.3 (Matrix Science) を活用した。データベース照合に際し、システイン残基に対するカルバミドメチル化 (アルキル化) を固定修飾として設定し、メチオニンの酸化については変動修飾として設定した。LTQ を用いた場合はプリカーサーイオンに対して 2 又は 1.2 Da, プロダクトイオンに対して 0.8 Da の mass 閾値を設定した。TripleTOF 5600 を用いた場合はプリカーサーイオンに対して 20 ppm の mass 閾値, プロダクトイオンに対して 0.1 Da の mass 閾値を設定した。なお、両実験共に、トリプシン消化に際して最大 2 個の missed cleavages を許容した。なお、Mascot スコアが 95%信頼限界以上の場合に同定ペプチドとして出力した。

参考文献

- [1] J. MacNair, K. Lewis, J. Jorgenson, *Anal. Chem.*, 69 (1997) 983
- [2] J. MacNair, K. Lewis, J. Jorgenson, *Anal. Chem.*, 71 (1999) 849
- [3] N. Wu, J. A. Lippert, M. L. Lee, *J. Chromatogr. A*, 911 (2001) 1
- [4] J. Scott Mellors, J.W. Jorgenson, *Anal. Chem.*, 76 (2004) 5441
- [5] K. Nakanishi, *J. Porous. Mater.*, 4 (1997) 67
- [6] H. Minakuchi, K. Nakanishi, N. Soga, N. Ishizuka, N. Tanaka, *J. Chromatogr. A*, 762 (1997) 135
- [7] H. Minakuchi, K. Nakanishi, N. Soga, N. Ishizuka, N. Tanaka, *J. Chromatogr. A*, 797 (1998) 121
- [8] H. Minakuchi, K. Nakanishi, N. Soga, N. Ishizuka, N. Tanaka, *J. Chromatogr. A*, 828 (1998) 83
- [9] A. Maruska, C. Ericson, A. Vegvari, S. Hjerten, *J. Chromatogr. A*, 837 (1999) 25
- [10] I. Gusev, X. Huang, C. Horvath, *J. Chromatogr. A*, 855 (1999) 273
- [11] F. Svec, E.C. Peter, D. Sykora, C. Yu, J. M. J. Frechet, *J. High Resolu. Chromatogr.*, 23 (2000) 3
- [12] E. Peter, F. Svec, J. M. J. Frechet, *Adv Mater.*, 11 (1999) 1169
- [13] S.M. Ngola, Y. Fintschenko, W. Y. Choi, T. J. Shepodd, *Anal. Chem.*, 73 (2001) 849
- [14] N. Tsujioka, N. Hira, S. Aoki, N. Tanaka, K. Hosoya, *Macromolecules*, 38 (2005) 9901
- [15] N. Ishizuka, H. Minakuchi, K. Nakanishi, N. Soga, K. Hosoya, N. Tanaka, *J. High Resol. Chromatogr.*, 21 (1998) 477
- [16] N. Tanaka, H. Nagayama, H. Kobayashi, T. Ikegumi, K. Hosoya, N. Ishizuka, H. Minakuchi, K. Nakanishi, K. Cabrera, D. Lubda, *J. High Resol. Chromatogr.*, 23 (2000) 111
- [17] N. Ishizuka, H. Minakuchi, K. Nakanishi, N. Soga, H. Nagayama, K. Hosoya, N. Tanaka, *Anal. Chem.*, 72, (2000) 1275
- [18] N. Tanaka, H. Kobayashi, K. Nakanishi, H. Minakuchi, N. Ishizuka, *Anal. Chem.*, 73 (2001) 420A

- [19] M. Motokawa, H. Kobayashi, N. Ishizuka, H. Minakuchi, N. Nakanishi, H. Jinnai, T. Ikegami, N. Tanaka, *J. Chromatogr. A*, 961 (2002) 53
- [20] K. Hosoya, N. Hira, K. Yamamoto, M. Nishimura, N. Tanaka, *Anal. Chem.*, 78 (2006) 5729
- [21] T. Hara, H. Kobayashi, T. Ikegami, K. Nakanishi, N. Tanaka, *Anal. Chem.*, 78, (2006) 7632
- [22] T. Hara, S. Makino, Y. Watanabe, T. Ikegami, K. Cabrera, B. Smarsly, N. Tanaka, *J. Chromatogr. A*, 1217 (2010) 89
- [23] T. Hara, S. Mascotto, C. Weidmann, B. Smarsly, *J. Chromatogr. A*, 1218 (2011) 3624
- [24] K. Miyamoto, T. Hara, H. Kobayashi, H. Morisaka, D. Tokuda, K. Horie, K. Koduki, S. Makino, O. Nunez, C. Yang, T. Kawabe, T. Ikegami, H. Takubo, Y. Ishihama, N. Tanaka, *Anal. Chem.*, 80 (2008) 8741
- [25] M. Iwasaki, S. Miwa, T. Ikegami, M. Tomita, N. Tanaka, Y. Ishihama, *Anal. Chem.*, 82 (2010) 2616
- [26] M. Iwasaki, N. Sugiyama, N. Tanaka, Y. Ishihama, *J. Chromatogr. A*, 1228 (2012) 292
- [27] O. Núñez, T. Ikegami, W. Kajiwara, K. Miyamoto, K. Horie, N. Tanaka, *J. Chromatogr. A*, 1156 (2007) 35
- [28] A. Alpert, *J. Chromatogr. A*, 499 (1990) 117
- [29] T. Ikegami, K. Tomomatsu, H. Takubo, K. Horie, N. Tanaka, *J. Chromatogr. A*, 1184 (2008) 474
- [30] T. Ikegami, K. Horie, J. Jaafar, K. Hosoya, N. Tanaka, *J. Biochem. Biophys. Methods*, 70 (2007) 31
- [31] T. Ikegami, H. Fujita, K. Horie, K. Hosoya, N. Tanaka, *Anal. Bioanal. Chem.*, 386 (2006) 578
- [32] H. Tanaka, X. Zhou, M. Ohira, *J. Chromatogr. A*, 987 (2003) 119
- [33] T. Yoshida, *Anal. Chem.*, 69, (1997) 3038
- [34] T. Yoshida, T. Okada, *J. Chromatogr. A*, 841 (1999) 19
- [35] T. Yoshida, *J. Chromatogr. A*, 808 (1998) 105
- [36] T. Yoshida, T. Okada, T. Hobo and R. Chiba, *Chromatographia*, 52 (2000) 418

- [37] H. Cerny, M. Affolter, C. Cerny, *Anal. Chem.*, 75 (2003) 2349
- [38] J. MacNair, K. Patel, J. Jorgenson, *Anal. Chem.*, 71 (1999) 700
- [39] K. Lan, J. W. Jorgenson, *Anal. Chem.*, 71 (1999) 709
- [40] G. Opiteck, K. Lewis, J. Jorgenson, *Anal. Chem.*, 69 (1997) 1518
- [41] D. Wolters, M. P. Washburn, J. R. Yates, III, *Anal. Chem.*, 73 (2001) 5683
- [42] A. Link, J. Eng1, D.M. Schieltz1, E. Carmack, G. Mize, D. Morris, B. Garvik, J. Yates, III, *Nat. Biotech.*, 17 (1999) 676
- [43] 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 (2004) 1273
- [44] T. Ikegami, T. Hara, H. Kimura, H. Kobayashi, K. Hosoya, K. Cabrera, N. Tanaka, *J. Chromatogr. A*, 1106 (2006) 112
- [45] 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 (2004) 897
- [46] H. Morisaka, K. Hata, J. Mima, T. tanigawa, M. Furuno, N. Ishizuka, N. Tanaka, M. Ueda, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 70 (2006) 2154
- [47] H. Morisaka, A. Kririno, K. Kobayashi, M. Ueda, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 76 (2012) 585
- [48] P. Jandera, M. Halama, L. Kolarova, J. Fisher, K. Novotna, *J. Chromatogr. A*, 1087 (2005) 112
- [49] M. Gilar, P. Olivova, A. Daly, J.C. Gebler, *Anal. Chem.*, 77 (2005) 6426
- [50] K. Wagner, T. Miliotis, G. Marko-Varga, R. Bischoff, K.K. Unger, *Anal. Chem.*, 74 (2002) 809
- [51] J. Peng, J.E. Elias, C.C. Thoreen, L.J. Licklider, S.P. Gygi, *J. Proteome Res.*, 2 (2003) 43
- [52] M. Gilar, P. Olivova, A. Daly, J.C. Gebler, *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 1694
- [53] P. Bristow, J. Knox, *Chromatographia*, 10 (1977) 279
- [54] U. Neue, *HPLC Columns, Theory, Technology and Practice*, Wiley-VCH, New York (1997)
- [55] H. Poppe, *J. Chromatogr. A*, 778 (1997) 3
- [56] G. Desmet, D. Clicq and P. Gzil, *Anal. Chem.*, 77 (2005) 4058

- [57] V. Tolstikov, A. Lommen, K. Nakanishi, N. Tanaka, O. Fiehn, *Anal. Chem.*, 75 (2003) 23
- [58] L. Snyder, J. Dolan, J. Gant, *J.Chromatogr.* 165 (1979) 3
- [59] J. Dolan, J. Gant, L. Snyder, *J.Chromatogr.* 165 (1979) 31
- [60] M. Gilar, A.E. Daly, M. Kele, U.D. Neue, J.C. Gebler, *J. Chromatogr. A*, 1061 (2004) 183
- [61] L. Snyder, M. Stadalius, C. Horvath, *High-Performance Liquid Chromatography Separations of Large Molecules: A General Model*, Academic Press, Orlando, FL (1986)
- [62] W. Hancock, R. Chloupek, J. Kirkland, L. Snyder, *J. Chromatogr. A*, 686 (1994) 31
- [63] R. Chloupek, W. Hancock, B. Marchylo, J. Kirkland, B. Boyes, L. Snyder, *J. Chromatogr. A*, 686 (1994) 45
- [64] A. van der Horst, P. Schoenmakers, *J. Chromatogr. A*, 1000 (2003) 693
- [65] R. Murphy, M. Schure, J. Foley, *Anal. Chem.*, 70 (1998) 1585
- [66] J. Seeley, *J. Chromatogr. A*, 962 (2002) 21
- [67] J. Linden, C. Lawhead, *J. Chromatogr.*, 105 (1975) 125
- [68] E. Grumbach, D.M. Diehl, D.R. McCabe, J.R. Mazzeo, U.D. Neue, *LCGC N. Am. Suppl.*, (2003) 53
- [69] V. Tolstikov, O. Fiehn, *Anal. Biochem.*, 301 (2002) 298
- [70] S. Garbis, A. Melse-Boonstra, C. West, R. van Breemen, *Anal. Chem.*, 73 (2001) 5358
- [71] M. Strege, *Am. Pharm. Rev.*, 2 (1999) 53
- [72] M. Strege, *Anal. Chem.*, 70 (1998) 2439
- [73] Y. Watanabe, T. Ikegami, K. Horie, T. Hara, J. Jaafar, N. Tanaka, *J. Chromatogr. A*, 1216 (2009) 7394
- [74] T. Ikegami, J. Ichimaru, W. Kajiwara, N. Nagasawa, K. Hosoya, N. Tanaka, *Anal. Sci.*, 23 (2007) 109
- [75] R. Townsend, M. Hardy, *Glycobiology*, 1 (1991) 139
- [76] G. Winge, H. Sandberg, *J.Chromatogr.A*, 1902 (2005) 246
- [77] Dong-Sun Lee, C. Wu, H.H. Hill Jr., *J. Chromatogr.A*, 822 (1998) 1
- [78] F. Gritti, G. Guiochon, *J. Chromatogr. A*, 1302 (2013) 55

- [79] S. Bruns, D. Stoeckela, B. Smarsly, U. Tallarek, *J. Chromatogr. A*, 1268 (2012) 53
- [80] N. Morin, *Anal. Chem.*, 70 (1998) 2819
- [81] L.R. Snyder, J.L. Glajch, J.J. Kirkland, *Practical HPLC Method Development*, John Wiley & Sons, Inc. (1988)
- [82] T. Ikegami, H. Kimura, N. Tanaka, *Bunseki*, 10 (2004) 576
- [83] J. Kyte, R.F. Doolittle, *J. Mol. Biol.*, 157 (1982) 105
- [84] A. Alpert, *Anal. Chem.*, 80 (2008) 62
- [85] M. Gilar, H. Xie, A. Jaworski, *Anal. Chem.*, 82 (2010) 265
- [86] M. Gilar, A. Jaworski, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 8890
- [87] Y. Kawachi, T. Ikegami, H. Takubo, Y. Ikegami, M. Miyamoto, N. Tanaka, *J. Chromatogr. A*, 1218 (2011) 5903
- [88] W. Naidong, *J. Chromatogr. B*, 796 (2003) 209
- [89] T. Ikegami, E. Dicks, H. Kobayashi, H. Morisaka, D. Tokuda, K. Cabrera, K. Hosaya, N. Tanaka, *J. Sep. Sci.*, 27 (2004) 1292