

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2007-507721

(P2007-507721A)

(43) 公表日 平成19年3月29日(2007.3.29)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 30/60 (2006.01)	GO 1 N 30/60 K	4 D O 1 7
GO 1 N 30/56 (2006.01)	GO 1 N 30/56 E	
BO 1 D 15/08 (2006.01)	BO 1 D 15/08	
GO 1 N 30/88 (2006.01)	GO 1 N 30/88 I O I P	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 13 頁)

(21) 出願番号	特願2006-534299 (P2006-534299)	(71) 出願人	506103773 クロンバ, インコーポレーテッド
(86) (22) 出願日	平成16年9月30日 (2004. 9. 30)		アメリカ合衆国 1 6 8 0 1 ペンシルベ
(85) 翻訳文提出日	平成18年5月26日 (2006. 5. 26)		ニア州, ステート カレッジ, コール ア
(86) 国際出願番号	PCT/US2004/032958		レイ 1 2 3
(87) 国際公開番号	W02005/032688	(74) 代理人	100091096
(87) 国際公開日	平成17年4月14日 (2005. 4. 14)		弁理士 平木 祐輔
(31) 優先権主張番号	60/507, 474	(74) 代理人	100096183
(32) 優先日	平成15年9月30日 (2003. 9. 30)		弁理士 石井 貞次
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100118773
			弁理士 藤田 節
		(74) 代理人	100122389
			弁理士 新井 栄一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 クロマトグラフィー及びサンプル調製のためのマルチキャピラリーカラム

(57) 【要約】

液体クロマトグラフィー及びサンプル調製に特に有用な、複数の、不溶性の固定相でコートされた同型のキャピラリーを含むマルチキャピラリーカラムであって、ここで固定相の厚さは、高性能を目的として個々のキャピラリーの半径に相関する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

液体クロマトグラフィーへの応用に特に有用なマルチキャピラリークロマトグラフィーカラムであって、該クロマトグラフィーカラムが、

(a) カラムの第1末端でサンプルを受け入れ、カラムの第2末端で分離されたサンプルを放出するための、クロマトグラフィーカラム内に含まれる複数のキャピラリーチューブ、及び

(b) 該キャピラリーチューブの内側をコートする不溶性の固定相であって、該固定相のコーティングが、高性能キャピラリーチューブを実現するために個々のキャピラリーチューブの半径と相関する厚さを有する前記固定相、

10

を含んでなる、前記マルチキャピラリークロマトグラフィーカラム。

【請求項 2】

前記不溶性固定相コーティングが、有機溶媒及び水性有機溶媒に不溶性である、請求項1に記載のクロマトグラフィーカラム。

【請求項 3】

前記不溶性固定相コーティングが架橋されている、請求項1に記載のクロマトグラフィーカラム。

【請求項 4】

前記不溶性固定相コーティングが、前記キャピラリーチューブの内側に化学的に結合している、請求項1に記載のクロマトグラフィーカラム。

20

【請求項 5】

前記不溶性固定相コーティングが、架橋され、かつ前記キャピラリーチューブの内側に化学的に結合している、請求項1に記載のクロマトグラフィーカラム。

【請求項 6】

前記不溶性固定相コーティングの厚さが、前記キャピラリーの半径の n 乗に比例しており、ここで n は1より大きい、請求項1に記載のクロマトグラフィーカラム。

【請求項 7】

下記の関係式が適用できる

$$d_f(r) = c_f \cdot r^n$$

(式中、 d_f = 不溶性固定相の厚さであり、 c_f = 定数であり、 r = キャピラリー半径であり、 $n > 1$ である)、請求項1に記載のクロマトグラフィーカラム。

30

【請求項 8】

前記不溶性固定相コーティングが、ポリブタジエンを含む、請求項3に記載のクロマトグラフィーカラム。

【請求項 9】

前記不溶性固定相コーティングが、ポリブタジエンを含む、請求項5に記載のクロマトグラフィーカラム。

【請求項 10】

前記不溶性固定相コーティングが、有機基 R を含み、ここで R は、脂肪族基、芳香族基、有機エレメント基、又はイオノゲン基である、請求項1に記載のクロマトグラフィーカラム。

40

【請求項 11】

前記脂肪族基が、メチル、ブチル、オクチル、オクタデシル、ジオール、シアノ、アミノ、アミド、又はグリシドからなる、請求項10に記載のクロマトグラフィーカラム。

【請求項 12】

前記芳香族基が、フェニル、直鎖ポリスチレン、又は架橋ポリスチレンからなる、請求項10に記載のクロマトグラフィーカラム。

【請求項 13】

前記有機エレメント基が、直鎖又は架橋ポリシロキサンからなる、請求項10に記載のクロマトグラフィーカラム。

50

【請求項 14】

前記イオノゲン基が、トリアルキルオルガニルアンモニウム、カルボキシル又はオルガニルスルホン酸からなる、請求項 10 に記載のクロマトグラフィーカラム。

【請求項 15】

前記不溶性固定相コーティングが、さらにペプチド部分を含む、請求項 1 に記載のクロマトグラフィーカラム。

【請求項 16】

前記固定相コーティングが、さらに大環状の糖ペプチド部分を含む、請求項 1 に記載のクロマトグラフィーカラム。

【請求項 17】

前記固定相コーティングが、さらにタンパク質部分を含む、請求項 1 に記載のクロマトグラフィーカラム。

10

【請求項 18】

前記固定相コーティングが、さらに抗体部分を含む、請求項 1 に記載のクロマトグラフィーカラム。

【請求項 19】

前記キャピラリーチューブの内径が、約 $0.1\ \mu\text{m}$ ~ 約 $100\ \mu\text{m}$ である、請求項 1 に記載のクロマトグラフィーカラム。

【請求項 20】

前記カラムの外径が、約 0.1mm ~ 約 1m である、請求項 1 に記載のクロマトグラフィーカラム。

20

【請求項 21】

前記カラムの長さが、約 0.1mm ~ 約 2m である、請求項 1 に記載のクロマトグラフィーカラム。

【請求項 22】

前記カラムが、溶融シリカで形成されている、請求項 1 に記載のマルチキャピラリークロマトグラフィーカラム。

【請求項 23】

前記カラムが、ガラスで形成されている、請求項 1 に記載のマルチキャピラリークロマトグラフィーカラム。

30

【請求項 24】

液体クロマトグラフィーへの応用に特に有用なマルチキャピラリークロマトグラフィーカラムを作製する方法であって、該方法が、

(a) カラムの第1末端でサンプルを受け入れ、カラムの第2末端で分離されたサンプルを放出するための複数のキャピラリーチューブを含むクロマトグラフィーカラムに固定相溶液を導入するステップ、

(b) 同時に該カラムを、該溶液の蒸発を促進する環境に曝すステップ、

(c) 前記固定相を架橋し又は該キャピラリーチューブの内側に化学的に結合するステップ

を含んでなり、該固定相が、高性能キャピラリーチューブを実現するために個々のキャピラリーチューブの半径と相関する厚さを有する、前記方法。

40

【請求項 25】

前記固定相を架橋し、かつ前記キャピラリーチューブの内側に化学的に結合することをさらに含む、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

前記溶液の蒸発を促進する前記環境が、加熱された区域又は真空である、請求項 24 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

50

本発明は、液体クロマトグラフィー及びサンプル調製に特に有用なマルチキャピラリーカラムに関する。さらに本発明は、複数の、不溶性固定相でコートされた同型のキャピラリーを含むマルチキャピラリーカラムに関する。ここで該固定相の厚さは、個々のキャピラリーの半径と関連している。

【背景技術】

【0002】

クロマトグラフィーは、化合物の複雑な混合物を分離するための基本技術である。この分離は、移動相中のサンプルを、固定相を含むカラムに通すことによって達成される。クロマトグラフィーは、移動相の物理的状态によって、2つの種類、すなわち、ガスクロマトグラフィー（「GC」）及び液体クロマトグラフィー（「LC」）に分類される。ガスクロマトグラフィー及び液体クロマトグラフィーのどちらにおいても、2種類のカラムを用いることができる。すなわち、充填カラム及びキャピラリーカラムである。充填カラムは、充填材で満たされたチューブからなる。固定相は、充填材の表面に設けられる。キャピラリーカラムにおいては、固定相はキャピラリーの内壁上に直接設けられる。キャピラリーカラムは、充填カラムを超える重要な利点を提供する。

10

【0003】

ガスクロマトグラフィーにおいては、大部分の解析は、キャピラリーカラムを用いて行われる。ガスクロマトグラフィー用のキャピラリーカラムは、標準のクロマトグラフィー装置と適合する、単一幅の(single wide)キャピラリー（内径約0.5mm）から作られる。これらのカラムは、その中に含まれるキャピラリーの数に基づいてさらに区別される。モノキャピラリーカラムは単一のチューブからなる。一方、マルチキャピラリーカラムは多数のチューブを含み、高いサンプル容量(sample capacity)を可能とする。

20

【0004】

粘性が低いため、気体中の分子の拡散は非常に速い。気体と比較すると、液体はずっと粘性が高い。液体中の分子の拡散は、気体中と比較すると、10,000~100,000倍遅い。迅速な物質移動を提供するため、液体クロマトグラフィーに用いられるキャピラリーカラムの直径は、非常に小さくしなければならず、通常は20 μ m以下である。極めて小さい大きさ及び非常に低いサンプル容量のため、単一種の複数のキャピラリーから作られた液体クロマトグラフィー用のキャピラリーカラムは、標準装置と適合せず、日常的な液体クロマトグラフィー解析に用いることはできない。

30

【0005】

液体クロマトグラフィー用の不溶性固定相を作製する方法は周知である。これらの方法の大部分は、固定相の、クロマトグラフィー担体表面への化学的結合に基づく。しかし、液体クロマトグラフィーへの応用において、マルチキャピラリーカラムの使用は、技術上の問題によって制約されてきた。主な制約は、幅の広いキャピラリー中の移動相の線流速が、幅の狭いキャピラリー中の流速より高いことである。仮に相比、すなわち固定相膜の厚さに対するキャピラリー半径の比が、全てのキャピラリーについて同じであるとすると、サンプルは幅の広いキャピラリー中でより速く移動するであろう。その結果、マルチキャピラリーカラムの効率は、常にシングルキャピラリーカラムの効率に対して劣る。

40

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

従って、液体クロマトグラフィーにおいて使用するための、高いサンプル容量を有する効率的なマルチキャピラリーカラムに対する必要性があった。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明は、液体クロマトグラフィー及びサンプル調製のために特に有用な、非常に効率的なマルチキャピラリーカラムである。カラムは、複数の、不溶性固定相でコートされた同型のキャピラリーを含む。固定相の厚さは、高性能を目的として個々のキャピラリーの半径と関連している。

50

【0008】

本発明の別の実施形態は、クロマトグラフィー及びサンプル調製において用いるためのマルチキャピラリーカラムを作製する方法である。このような方法においては、マルチキャピラリーカラムを固定相溶液で満たす。固定相溶液をその後、カラムの末端へと移動させる。それと同時に、カラムを加熱された区域又は真空中をゆっくり移動させ、溶媒の蒸発を促進する。付着後、固定相を架橋し、及び/又はキャピラリーの壁に化学的に結合させて、該固定相を移動相に対して不溶性とする。

【発明を実施するための最良の形態】

【0009】

液体クロマトグラフィーへの応用におけるマルチキャピラリーカラムの使用は、技術上の問題により制約されてきた。基本的な問題は、マルチキャピラリーロード中のキャピラリーの直径が、均一ではあるが全く同一ではないことである。結果として、移動相は、幅の広いキャピラリー中では幅の狭いキャピラリー中より速く動く。従って、マルチキャピラリーカラムの効率は、シングルキャピラリーカラムの効率より劣る。そこで、高性能のマルチキャピラリーカラムを製造するためには、固定相付着のための適切な技術を用いることが重要である。

【0010】

本発明は、液体クロマトグラフィーに特に有用な、高性能のマルチキャピラリーカラムについて説明する。該マルチキャピラリーカラムはまた、ガスクロマトグラフィー、超臨界クロマトグラフィー、電気クロマトグラフィー、キャピラリー電気泳動、固相抽出、ヘッドスペース解析、サンプル濃縮、及びサンプル脱塩などの応用に有用である。

【0011】

図1を参照すると、本発明によるマルチキャピラリーカラム10の断面が示されている。マルチキャピラリーカラム10は、複数の同型のキャピラリーチューブで貫かれたロッドを含み、該キャピラリーチューブは、カラム10の第1末端で移動相中のサンプルを受け入れ、カラムの第2末端で分離されたサンプルを放出する。各キャピラリーチューブの内側は、不溶性固定相でコートされ、該固定相の厚さは、個々のキャピラリーチューブの半径と関連する。このことは、本発明のマルチキャピラリーカラム10が、固定相の厚さがキャピラリーの半径と関連していない従来技術のマルチキャピラリーカラムよりも、実質的に高い効率を有することを有利に保証する。茲に示された相関関係に由来するこの改善された性能は、マルチキャピラリーカラム10を効果的かつ効率的なツールとして液体クロマトグラフィーへの応用に用いることを可能とする。

【0012】

図2には、本発明のマルチキャピラリーカラム10の作製方法が示されている。該方法は、例えばポンプ手段を用いた、固定相溶液のマルチキャピラリーカラムへの導入を含む。固定相溶液がマルチキャピラリーカラムの末端の方へ移動するにつれて、該カラムは同時に、加熱された区域（例えばオープン）、真空又は溶媒の蒸発を促進する他の環境中へと移動する。幅の広いキャピラリー中の溶液はより高速であるため、幅の広いキャピラリー上に付着した固定相の膜は、より狭いキャピラリー上に付着した固定相の膜より厚い。付着後、固定相は架橋され、及び/又はキャピラリーの内壁に化学的に結合される。本発明のプロセスにより、固定相の物質が移動相（例えば、有機溶媒及び水性有機溶媒）に対して不溶性となる。

【0013】

個々のキャピラリー中で固定相の厚さを変えることによって、液体クロマトグラフィーの応用において高性能を有するカラム10が得られる。

【0014】

茲に用いられるチューブ及びロッドの製造に好適な材料としては、例えば、ガラス、溶融シリカ、金属（例えば、ステンレススチール）及びプラスチック（例えば、PEEKポリマー）がある。液体クロマトグラフィーへの応用には、多数のキャピラリーチューブ（例えば、数千）を用いることがしばしば望ましいが、本発明のマルチキャピラリーカラム10に

10

20

30

40

50

は、何本のキャピラリーチューブを用いてもよい。マルチキャピラリーカラム10は、様々な寸法のキャピラリーチューブと共に用いることができることもまた理解されるであろう。例えば、キャピラリーチューブの内径は約0.1 μ m~約100 μ mでよい。カラム10の外径は約0.1mm~約1mmでよく、一方該カラムの長さは約0.1mm~約2mでよい。

【0015】

以下、固定相の厚さとキャピラリー半径との間の重要な関係について、さらに詳細に説明する。

【0016】

ポアズイユの法則によれば、幅の広いキャピラリー中の移動相の速度は、狭いキャピラリー中の移動相の速度より速い。その結果、サンプルはマルチキャピラリーカラムからブロードピークの形で溶出される。この現象は、ピークブロードニングとして周知である。

10

【0017】

この問題を解決するために、すなわち、マルチキャピラリーカラムのクロマトグラフィー効率を最適化するために、本発明者らは、固定相の厚さを個々のキャピラリーの半径と相関させた。固定相を設ける間、より幅の広いキャピラリーの内面にはより大量に定着させる。逆に、より狭いキャピラリーの内面にはより少量を定着させる。結果として、キャピラリーは疑似均一性を達成し、マルチキャピラリーカラム10の効率は実質的に向上する。本発明者らによって、高いピーク効率に関する下記の関係式が導かれた：

$$d_f(r) = c_f \cdot r^n \quad (\text{式1})$$

固定相膜の厚さ d_f は、キャピラリー半径 r の n 乗に比例する。ここで、 $n > 1$ であり、 c_f は定数である。

20

【0018】

最高のピーク効率を達成するために、固定相の厚さ d_f は、キャピラリー半径 r の3乗に比例しなければならない。

【0019】

ガスクロマトグラフィーへの応用には、前述の関係式を用いて可溶性固定相（例えば、ポリジメチルシロキサン）をマルチキャピラリーカラムの表面に付着させる。しかし、可溶性固定相は液体クロマトグラフィーにおいて使用することはできない。これらの相は、移動相の流れと共に簡単に洗い流されるだろう。液体クロマトグラフィー用の固定相は、移動相に対して不溶性でなければならない。

30

【0020】

本発明は、液体クロマトグラフィーに適した不溶性固定相を有するマルチキャピラリーカラム10の作製のために、固定相の厚さと個々のキャピラリーの半径との相関関係を利用したものである。本発明の方法において用いられる実験的な取り組みは、3つのステップを含む：

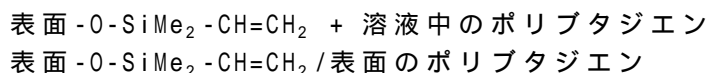
I. 例えばビニルジメチルエトキシシランなどの、二重結合を含有する有機ケイ素化合物を用いたキャピラリー壁の化学修飾。反応スキームは下記に示される。

【0021】



40

II. 膜の厚さをキャピラリー半径と相関させることを目的とした、残留二重結合を含有する可溶性固定相のキャピラリー表面への付着。このような固定相の代表例は、ポリブタジエンである。直鎖ポリブタジエンの物理的付着のためのスキームは、下記に示される（図2を参照）：



50

III. キャピラリー壁への架橋及び結合による固定相の固定化。このプロセスは、固定相の残留二重結合とキャピラリー表面上に位置する二重結合との間の反応に基づく。反応は、重合開始剤の存在下、高温で行われる。このステップは、下記のとおりを示すことができる：

表面 -O-SiMe₂-CH=CH₂ / 表面のポリブタジエン

表面 -O-SiMe₂-CH₂-CH₂-ポリブタジエン (架橋、結合しており、不溶性)

【実施例 1】

【0022】

キャピラリー表面の修飾

トルエン中のビニルジメチルエトキシシラン10%溶液を50μL/分で6時間ポンプで送り、清潔で乾いた、直径10μmのキャピラリーおよそ4000本で貫かれた外径1.1mm×100mmのマルチキャピラリーガラスロッドに105で通す。このカラムをトルエン、アセトン及びメタノールですすぎ、窒素流で乾燥する。

10

【実施例 2】

【0023】

ポリブタジエンの付着

実施例1に記載のとおり調製されたマルチキャピラリーカラムを、100mlペンタン中の100mgのポリブタジエン(分子量3,400)と0.5mg過酸化ジクミルとからなる溶液で満たす。溶液を5μL/分でポンプで送り込む一方、カラムの反対の末端を、150に加熱されたオーブンの内側に入れ、該カラムを0.5mm/分の線速度で動かす(図2)。

20

【実施例 3】

【0024】

ポリブタジエンの固定化

実施例2に記載のとおり調製されたマルチキャピラリーカラムを、遅い窒素流の下200で4時間加熱する。ポリ(エチレングリコール)、直鎖及び架橋ポリスチレン、並びに架橋ポリジメチルシロキサンを含むマルチキャピラリーカラムもまた、調製される。

【実施例 4】

【0025】

オクタデシル(C-18)固定相

トルエン中のオクタデシルトリエトキシシラン10%溶液を10μL/分で6時間ポンプで送り、清潔で乾いた、直径20μmのキャピラリーおよそ4000本で貫かれた外径2.3mm×300mmのマルチキャピラリーガラスロッドに105で通す。溶液をポンプで送り込む一方、マルチキャピラリーカラムの反対の末端は、150に加熱されたオーブン内を、0.5mm/分の線速度で動かす。該カラムをトルエン、アセトン及びメタノールですすぎ、窒素流で乾燥する。

30

【0026】

トルエン中のフェニルトリメトキシシラン10%溶液を用いて、フェニル基をもつ固定相を調製する。トルエン中の3-アミノプロピルトリメトキシシラン10%溶液を用いて、アミノ基をもつ固定相を調製する。トルエン中の(3-グリシドキシプロピル)トリメトキシシラン10%溶液を用いて、グリシド基をもつ固定相を調製する。メタノール中のN-トリメトキシシリルプロピル-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド10%溶液を用いて、陰イオン交換固定相を調製する。トルエン中の2-(4-クロロスルホンルフェニル)エチルトリメトキシシラン10%溶液を用いて、陽イオン交換固定相を調製する。

40

【実施例 5】

【0027】

トリプシンの固定化

7.5Mの尿素(HClでpH4.74)中に1.5%トリプシン及び0.4Mジシクロヘキシルカルボジイミドを含有する溶液を、実施例4に記載のとおりアミノプロピル基で官能基化されたマルチキャピラリーカラムを通して、50μL/分で1時間ポンプで送り込む。マルチキャピラ

50

リーカラムを、尿素の7.5M溶液及び水で洗浄する。

【0028】

同様の手順がアビジン、ペプシン及びオボアルブミンの固定化に用いられる。

【実施例6】

【0029】

(ウラシル+フルオレン+フェナントレン)混合物の液体クロマトグラフィー分離

図4を参照して、(ウラシル+フルオレン+フェナントレン)混合物を、標準HPLC付属部品を用いて、Shimadzu HPLC機器に取り付けられたマルチキャピラリーカラム10上で分離する(図3A)。クロマトグラフィー条件及びクロマトグラムを、図4に再現して示す。クロマトグラムは、約1.8分でウラシルのピークを示し、約2.1分でフルオレンのピークを、約2.4分でフェナントレンのピークを示す。

10

【0030】

本実施例は、典型的な有機混合物を3分未満で分析することができる、本発明のマルチキャピラリーカラムを用いたHPLCの応用例証する。

【実施例7】

【0031】

ペプチドの脱塩及び分画

図5を参照して、ウシ血清アルブミンの酵素的加水分解によって得られた3 μ L量の100pモル/ μ Lペプチド混合物を、実施例4に記載のとおり調製された長さ10cmのC-18カラムに導入する。サンプルを、室温において100 μ L/分で、100 μ Lの脱イオン水を用いて溶出し、続いて30 μ Lの40%アセトニトリル/水で溶出する。3 μ Lの40%アセトニトリル/水画分を収集し、大気圧マトリックス支援レーザー脱離/イオン化質量分析(「MALDI」)によって分析する。画分3及び画分6の質量スペクトルを、図5に示す。

20

【0032】

本実施例は、複合ペプチド混合物の質量スペクトル分析前の、本発明のマルチキャピラリーカラムの分画能を例証する。

【実施例8】

【0033】

HPLC解析のためのサンプル濃縮

図6を参照して、HPLC分析及びGC分析の前に、実施例4に記載のとおり調製された、直径40 μ mのキャピラリーおよそ1000本を含む外径2.3mm×長さ100mmのマルチキャピラリーC-18カラムを用いて、サンプルを濃縮する。現在、固相抽出(「SPE」)カートリッジとして周知の非常に短いHPLCカラムが使用されている。SPEカートリッジと比較すると、マルチキャピラリーカラムはずっと速く、簡単で再利用可能である。図6A-B及び図8は、SPEカートリッジと対比した本発明のマルチキャピラリーカラムの比較を示す。

30

【0034】

本実施例は、サンプル調製において、本発明のマルチキャピラリーカラムをSPEカートリッジと有効に代替することができることを明確に示す。

【実施例9】

【0035】

ガスクロマトグラフィー分析のためのヘッドスペース濃縮

ガスクロマトグラフィー分析前のヘッドスペースサンプル濃縮に用いる、実施例4に記載のとおり調製された、直径20 μ mのキャピラリーおよそ4000本を含む外径2.3mm×長さ100mmのマルチキャピラリーカラムであるC-18カラムを、図7に概略的に示す。標準100 μ L HPLCシリンジを用いて、マルチキャピラリーカラムを通して約5回空気を出し入れする。液体の上方の有機揮発性化合物をマルチキャピラリーカラムに吸着させる。この吸着ステップの後、該マルチキャピラリーカラムを取り外し、100 μ Lのメタノールで溶出する。メタノール抽出物をガスクロマトグラフィーで分析して、揮発性溶媒を検出する。

40

【0036】

この実施例は、ヘッドスペース分析の従来の方法と比較して、本発明のマルチキャピラ

50

リーカラムの方が容易で、速く、簡単な代替方法であることを示す。

【0037】

実施例1~9は、本発明によるマルチキャピラリーカラム10の幅広い応用を示す。従って、該マルチキャピラリーカラムが、高いサンプル容量を有し、かつ既存のクロマトグラフィー装置と適合性がある、非常に効率的なカラムであるということが理解できる。マルチキャピラリーカラム10は、液体クロマトグラフィーへの応用（例えば、HPLC分析）に特に有用であると同時に、該カラムは、本発明の範囲から逸脱することなく多数の関連用途に用いることができる。これらの応用は、限定するものではないが、ガスクロマトグラフィー、超臨界クロマトグラフィー、電気クロマトグラフィー、キャピラリー電気泳動、固相抽出、ヘッドスペース分析、サンプル濃縮、及びサンプル脱塩などを含む。

10

【0038】

上述の応用の具体的な例としては、例えば下記のもの挙げられる：
有機化合物の液体クロマトグラフィー分離、機器分析前の複雑な混合物の分画、質量スペクトル分析前のペプチド混合物の分画、機器分析前のサンプルの脱塩、機器分析前のペプチド溶液の脱塩、タンパク質溶液の脱塩、サンプル濃縮、質量スペクトル分析前のペプチド濃縮、及び揮発性サンプルのヘッドスペース濃縮。

【0039】

本発明は、実施例及びその好適な実施形態に関して特に示され、記載されているが、当業者には、本発明の精神及び範囲を逸脱することなく形態及び細部における様々な改変を作ることができることと理解されるであろう。

20

【図面の簡単な説明】

【0040】

【図1】本発明の一実施形態によるマルチキャピラリークロマトグラフィーカラムの断面図であり、カラムの個々のキャピラリーが示される。

【図2】本発明の一実施形態によるマルチキャピラリークロマトグラフィーカラムにおける固定相の付着のスキームを図示する。

【図3A】HPLCへの応用に用いられるマルチキャピラリークロマトグラフィーカラムの斜視図である。

【図3B】サンプル調製に用いられる、異なる大きさのマルチキャピラリーカラムの斜視図を示す。

30

【図4】本発明によるマルチキャピラリーカラムにおけるウラシル、フルオレン、フェナントレン混合物の分離を示すクロマトグラムである。

【図5】図5A及び5Bは、複合ペプチド混合物の脱塩及び分画におけるマルチキャピラリーカラムの性能を示す質量スペクトルである。

【図6A】サンプル濃縮におけるマルチキャピラリークロマトグラフィーカラムの性能を示すクロマトグラムである。

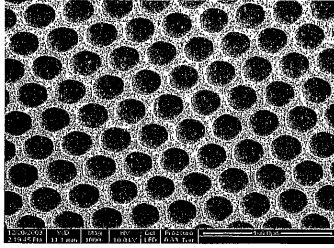
【図6B】サンプル濃縮におけるSPEカートリッジの性能を示す比較を提供する。

【図7】本発明の一実施形態による、揮発物を含有する水性サンプルのヘッドスペース分析のためのマルチキャピラリークロマトグラフィーカラムを図示する。

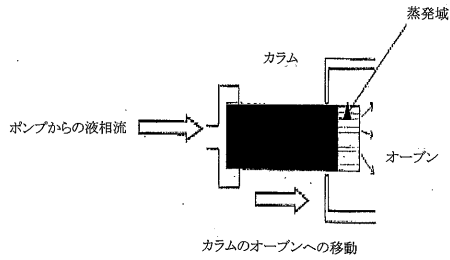
【図8】従来の固相抽出カートリッジに対する、本発明の一実施形態によるマルチキャピラリークロマトグラフィーカラムの性能を示す比較表である。

40

【 図 1 】



【 図 2 】



【 図 3 A 】



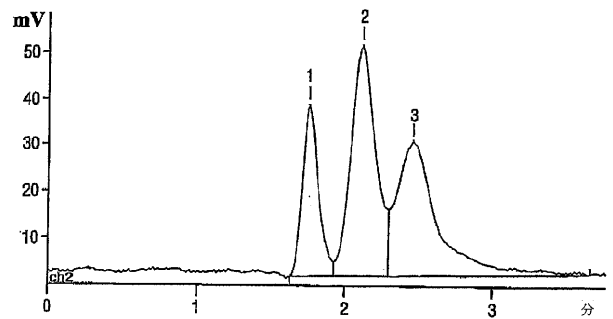
【 図 3 B 】



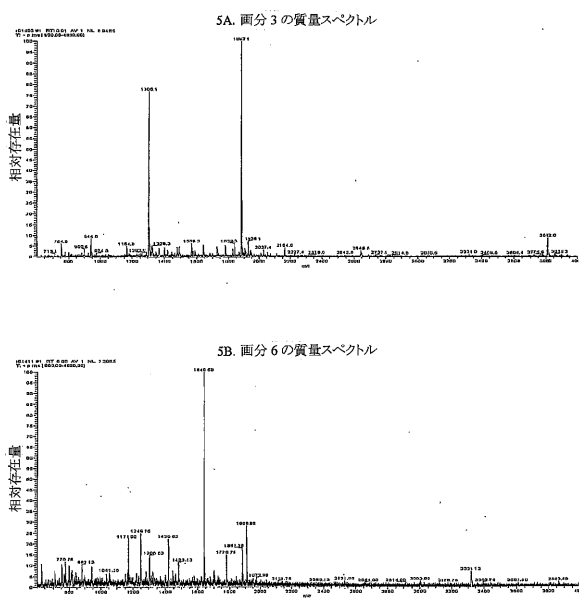
【 図 4 】

マルチキャピラリーカラム: 外径 2.3mm×300mm、
 内径 20 μ m のキャピラリー4000 本
 固定相: オクタデシルシリル
 移動相: 20% アセトニトリル/水
 検出: 254 nm

サンプル: ウラシル+フルオレン+フェナントレン
 流量: 0.3 mL/分
 温度: 25 $^{\circ}$ C



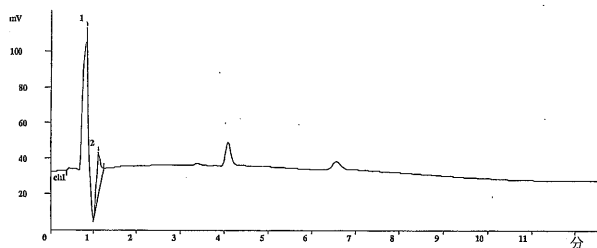
【 図 5 】



【 図 6 A 】

マルチキャピラリーカラム: 外径 2.3mm×100mm、
 内径 40μm のキャピラリー4000 本
 固定相: C-18
 検出: 254 nm
 HPLC カラム: Klassix C-18 (ODS)
 移動相: 40%アセトニトリル
 温度: 35℃

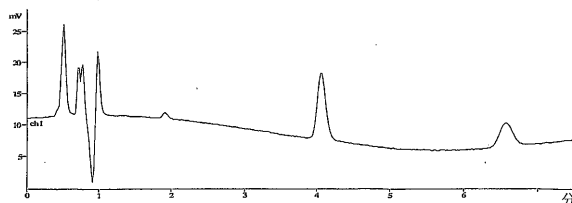
サンプル: マウンテンデュー飲料(カフェイン)
 量: 5μL
 容積: 4.6×50 mm (5μm)
 流量: 1.0 mL/分
 圧力: 3.8 Mpa



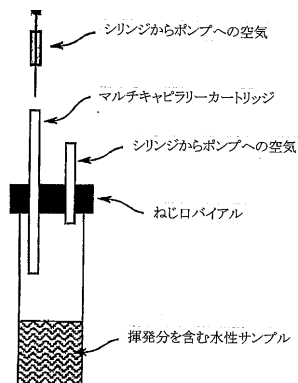
【 図 6 B 】

SPE カートリッジ: C-18, 200mg
 サンプル: マウンテンデュー
 量: 5μL
 容積: 4.6×50mm (5μm)
 流量: 1.0 mL/分
 圧力: 3.8 Mpa

検出: 254 nm
 HPLC カラム: Klassix C-18 (ODS)
 移動相: 40%アセトニトリル
 温度: 35℃



【 図 7 】



【 図 8 】

No.	特性	SPE カートリッジ	マルチキャピラリーカラム
1	収集時間	20~40 分	5 分以下
2	量	1~5 ml のサンプルを使用	わずかに 100 - 200 μl のサンプル
3	抽出物の処理	抽出量 5~20ml。解析のために蒸発させることが必要	抽出物の濃縮又は蒸発は不要
4	調整	調整することはできない	メタノール及び水での 2 分以内の洗浄により調整される
5	再利用	再利用することはできない	抽出されるサンプルに応じて何度も (少なくとも 50~100 回) 再利用することができる
6	サンプル中のシリカ粒子	サンプル中に微細なシリカ粒子がある可能性	サンプル中にはシリカ粒子又は他の粒子はない
7	自動サンプリング適合性	自動サンプリング中では使用できない	自動サンプリングに容易に適合する
8	フィールドユース	運びにくく、高価な機器/付属品を必要とする	シリンジのみを必要とする

表 1.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US04/32958
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : B01D 15/08 US CL : 210/635, 656, 198.2, 500.23, 502.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 210/635, 656, 198.2, 500.23, 502.1 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 4,957,620 A (CUSSLER et al) 18 September 1990 (18.09.1990), column 2, lines 27-33.	1-26
Y	US 5,160,627 A (CUSSLER et al) 03 November 1992 (03.11.1992), column 2, lines 44-57.	1-26
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 02 December 2004 (02.12.2004)		Date of mailing of the international search report 08 DEC 2004
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer Ernest G. Therkorn <i>E. Therkorn</i> Telephone No. (571) 272-1700 <i>Fen</i>

 フロントページの続き

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 ベローブ, ユーリ, ピー.

アメリカ合衆国 1 6 8 0 3 ペンシルベニア州, ステート カレッジ, グレン ロード 4 5 9

(72) 発明者 パンターノ, カルロ, ジー.

アメリカ合衆国 1 6 8 6 5 ペンシルベニア州, ペンシルベニア ファーネス, ダイブラー ロード 2 6 4

(72) 発明者 シデルニコフ, ヴラディーミル エヌ.

ロシア連邦 6 3 0 1 1 7 ノボシビルスク, ロシスカヤ ストリート 1 0, アpartment 1 8 0

(72) 発明者 ラマチャンドラン, サブラマニア

アメリカ合衆国 1 6 8 0 3 ペンシルベニア州, ステート カレッジ, クリックルウッド サークル 2 6

Fターム(参考) 4D017 BA07 CA13 CA14 CA17 CB10 DA03 EA05