

Technical Review

## 超高速液体クロマトグラフシステムLaChromUltra

伊藤正人，豊崎耕作，清水克敏

### Ultra High-Speed Liquid Chromatograph System, LaChromUltra

Masahito Ito, Kosaku Toyosaki, Katsutoshi Shimizu

Hitachi High-Technologies Corporation 882 Ichige, Hitachinaka-shi, Ibaraki-ken 312-8504 Japan

#### Abstract

We have developed Ultra High-Speed Liquid Chromatograph Systems, LaChromUltra. In order to achieve high speed analyses by reverse phase chromatography, we use columns with 2-micrometer packing particles of silica gel. The columns have good properties of both high number of theoretical plates and high column permeability. LaChromUltra system is suitable for the columns. The system consists of gradient elution pumps and autosampler with high pressure resistance of 60 MPa, and several detectors with high speed response of 10 ms.

**Keywords:** ultra high-speed liquid chromatograph; 2-micrometer particle; reverse phase chromatography; number of theoretical plates; column permeability; high speed response.

#### 1. 緒言

バイオ分野では生命現象の解明が深まり新薬の研究開発が活発に行われている。また食の安全に対する意識も高まり食品関連の分析ニーズも増加している。近年このような背景のもと分析処理の迅速性が求められており、従来の1/10倍、1分間レベルの分析時間を実現する「超高速液体クロマトグラフLaChromUltra<sup>TM</sup>」を開発した（Figure 1）。本システムは、高いパーミアビリティのカラムを搭載することにより、移動相の送液圧力が比較的低い分析条件で運転することができ、超高速液体クロマトグラフである。汎用の分析から高圧力の分析までの高い運転信頼性が確保されており、高分離分析から高速分析まで幅広く適応できる特長がある。粒径2  $\mu$ m充填剤を用いる高性能カラムの能力を最大限に引き出す



**Figure 1.** Ultra High-Speed Liquid Chromatograph, LaChromUltra<sup>TM</sup>

ため、システム最大圧力を60 MPa（当社比1.5倍）に強化し、検出・収集スピードを10 ms（当社比5倍）まで高速化

〒312-8504 茨城県ひたちなか市市毛882 株式会社日立ハイテクノロジーズ 那珂事業所

Tel : 029-354-1970

Fax : 029-354-1971

E-mail: ito-masahito@naka.hitachi-hitec.com

するなど各モジュールの性能を向上することにより、従来の液体クロマトグラフでは到達し得なかった高速・高分離性能を実現する。

## 2. 実験装置

実験に使用した日立超高速液体クロマトグラフは、L-2160 U形高压グラジエントポンプシステム、L-2200 U形オートサンプラ、L-2300形カラムオープン、L-2400 U形UV検出器、L-2455 U形ダイオードアレイ検出器、EZChrom Elite™ for Hitachiデータ処理システムから構成される。カラムはLaChromUltra C18 (2 μm) カラム 2 mm i. d. × 50 mm, LaChromUltra C18 (3 μm) カラム 4.6 mm i. d. × 100 mm, LaChromUltra C18 (5 μm) カラム 4.6 mm i. d. × 150 mmを使用した。移動相はアセトニトリルHPLCグレード(和光純薬工業)を用いた。

LaChromUltraは様々な観点から高速・高分離化に必要な性能向上を図った。

### (1) システム圧力

L-2160 U形ポンプは吐出圧力を従来の1.5倍の60 MPaに向上した。また性能向上のため、プランジャ・シール、チェック弁、圧力センサやポンプヘッドの構造を新規に設計した。L-2200 U形オートサンプラについても、ニードル、注入ポートおよび注入バルブの耐圧力性能を引き上げた。

### (2) 検出信号・データ収集時間

L-2400 U形UV検出器は、クロマトグラム時間が短くなることに伴い、レスポンス(過渡応答時定数)を0.01 s (10 ms) にまで高速化した。これに伴いデータ処理システムEZChrom Elite™ for Hitachiは、ピークのデータポイント数を確保するためにデータ収集時間を10 ms (100 Hz) サンプリングまで対応可能とした。同様に高速性能を有するL-2420 U形UV-VIS検出器、L-2455 U形ダイオードアレイ検出器、L-2485 U形蛍光検出器も開発した。

### (3) カラム外の広がり

超高速分析では、カラム体積が比較的小さく分離性能も向上しているため、サンプル注入量が1~3 μL(従来比1/10~1/3)と小さくなり、クロマトグラムの成分ピークを形成する濃度バンドの体積も小さくなる。このためピーク形状は配管チューブなど流路系内部体積での拡散の影響を大きく受けやすい。この拡散影響を低減するためにオートサンプラ上の注入から検出器のフローセルまでの内部体積を小さく設計した。例えば内径0.1 mmの細いチューブを採用し、検出器は低容量の3 μLフローセルを標準装備とした。

### (4) グラジエント溶出法

一般にグラジエント溶出法を用いる場合、タイムプログラム上で移動相を切り替えても、その移動相が実際にカラムに到達するまでに遅れの時間が発生する。この遅れをうむ体積はデュエルボリュームと呼ばれている。超高速分析ではグラジエント溶出法の妨げになるデュエルボリュームを極力小さく

することが要請される。LaChromUltraシステムでは、ポンプにある2液移動相の混合ポイントからカラムまでの流路内部体積も低減し、さらに低容量の200 μLミキサも標準装備とした。

またデュエルボリュームを考慮し、注入より先にグラジエント溶出を開始させ、注入の動作工程を一定時間遅らせる先行グラジエント機能も選択可能とした。先行グラジエント機能により、サンプル注入後、即、切替えの移動相をカラムに送り込ませることができ、高い検出強度のシャープなピークが得られることになる。

### (5) カラム温度

分析の高速化の手法として、カラム温度を比較的高めにし、移動相の粘度を下げることでカラムの圧力損失を抑える方法もとられている。汎用のL-2300形カラムオープンでは室温から65℃までカラム温度が設定可能である。L-2350形カラムオープンを使用すれば、さらに85℃まで温度を上げることができる。

## 3. 結果と考察

### (1) 高速化の手法

保持時間 $t_R$  (s) は非保持時間 $t_0$  (s) と $(k+1)$  の積である。ここで $k$  は保持係数である。最近の液体クロマトグラフィーの高速化は $t_0$  の最小化を基本戦略として実施されているとすることができる。実際の高速分析法では $k$  を小さくする場合もあるが、 $k$  が移動相、固定相、およびサンプル溶質の複雑な相互作用に起因しているため、結局、高速化を分析法ごとに検討することになり、一般化には適していないからであろう[1]。

$$t_R = t_0 (k+1) \dots (1)$$

$t_0$  の最小化による高速化方法をFigure 2により説明すると、移動相がカラムを通り過ぎるために要する時間 $t_0$  が短くなれば、自ずとそれ以降に分離されるピーク(保持係数 $k = 0, 1, 2, 3, \dots$ ) もそれに比例し速く溶出することができるということである。

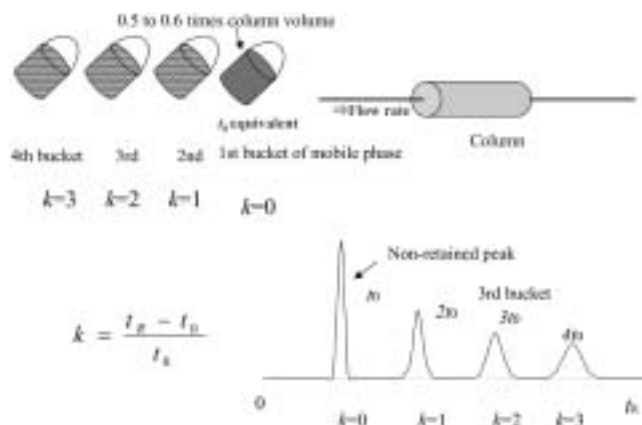


Figure 2. Idea to achieve high speed analyses

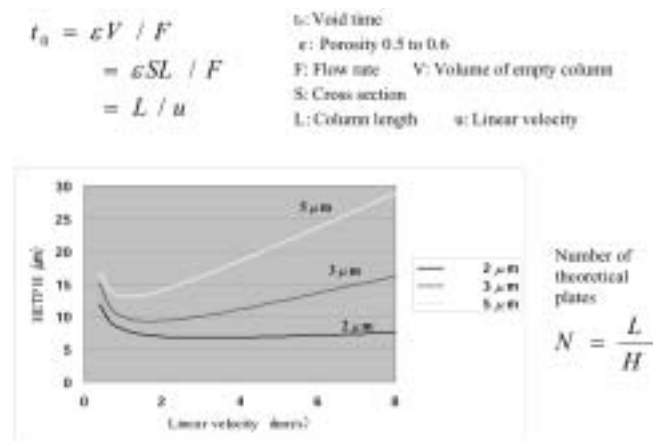


Figure 3. van Deemter Plot

$t_0$ を最小化するためにはカラム体積を小さくするか、流量を増加するかいずれかの方法がとれる。より本質的にはカラムの断面積と空隙率の寄与を考慮から外すことができ、カラム長さ $L$  (m) を短くするか、線速度 $u$  (m/s) を引き上げるかのいずれかの手法をとることになる。

$$t_0 = L/u \dots (2)$$

## (2) 理論段数の要請

ここで理論段数 $N$  (式3) を検討しなければならない。

$$N = L/H(u) \dots (3)$$

カラム長さ $L$ を短くする手法では、 $N$ を維持するように理論段高さ $H$  (m) を小さくしなければならない。Figure 3に粒径2, 3, 5  $\mu\text{m}$ 充填剤のvan Deemter Plotを示す。粒径2  $\mu\text{m}$ は、3と5  $\mu\text{m}$ に比較し全体的に低い $H$ が得られるためカラム長さ $L$ を短くできる充填剤として最適である。

高速化のため線速度 $u$ を引上げる場合にもvan Deemter Plotを考察する必要がある。粒径5  $\mu\text{m}$ では、 $u$ を $H$ の極小値を超えても引上げていくと、理論段高さ $H$ が線速度 $u$ に対し直線的に増加し悪化する。この直線的増加領域では線速度 $u$ を速くしていても $N$ が悪化してしまい、非保持時間 $t_0$ を効率良く縮めることができない。簡単に言えば $u$ を10%大きくすると $H$ が10%近く増加してしまう。この場合 $N$ を維持するためには式3により $L$ を10%程度伸ばさざるを得ず、結局 $t_0$ は式2によりほとんど元の値に戻ってしまうからである。

一方、粒径2  $\mu\text{m}$ は粒径5  $\mu\text{m}$ に比べ線速度 $u$ を引上げていく手法が有効である。粒径2  $\mu\text{m}$ は、かなり速い $u$ の時に粒径5  $\mu\text{m}$ と同様 $t_0$ が縮め辛くなるものの、実際使用する線速度(5 mm/s付近)では理論段高さ $H$ がほぼ一定とみなされるので高速化に適している。線速度 $u$ を引上げて理論段高さ $H$ がさほど悪化しないことは粒径2  $\mu\text{m}$ のカラムのもうひとつの特長である。但し粒径2  $\mu\text{m}$ を用いて線速度 $u$ を引上げていく場合にも、システム圧力の制限はかかってくる。

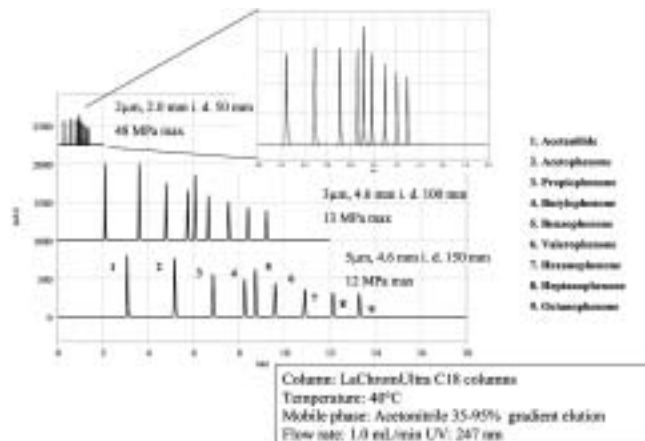


Figure 4. Method transfer of alkylphenone analysis

## (3) 圧力の制限

カラムの圧力損失 $\Delta P$  (Pa) は線速度 $u$ やカラム長さ $L$ に比例する。

$$\Delta P = \frac{\eta \eta L}{K} \dots (4)$$

ここで $\eta$ は粘度 (Pa $\cdot$ s),  $K$ はカラムパーミアビリティ ( $\text{m}^2$ ) である [2]。液体クロマトグラフにはシステム圧力に上限がある。過剰に大きな $u$ や過剰に長い $L$ は、それぞれ不必要に $\Delta P$ を増大させるため、極力抑えるべきである。

粒径2  $\mu\text{m}$ のカラムは、カラムパーミアビリティが $7 \times 10^{-15} (\text{m}^2)$ と大きく透過性が良好であり、サブ2  $\mu\text{m}$ 級の充填剤に比較し30~50%低い圧力損失が得られる特長がある。

例えば理論段数 $N$ を2倍に上げようとするとき、カラム長さ $L$ を2倍にしなければならない。この場合線速度 $u$ でそのまま送液していても、非保持時間 $t_0$ が2倍かかってしまう。またシステム圧力が制限されていると、このままでは圧力損失が2倍かかってしまうため $u$ を1/2倍にせざるを得ず、結局は $t_0$ が4倍になってしまう。圧力制限下では分離性能 $N$ を向上すると、その向上率のおおむね2乗に比例する分析時間を要することになる。

粒径2  $\mu\text{m}$ のカラムでは、圧力の制限を考慮し適正な線速度 $u$ を設定することにより、所望の $N$ を得るためのカラム長さ $L$ が式3により求められ、非保持時間 $t_0$ の最小値が式2により決定される。

## (4) 分析法の応用例

超高速液体クロマトグラフシステムの応用例としてカラムパーミアビリティの高いLaChromUltra C18 (2  $\mu\text{m}$ ) カラムを用いた高速分析の例を示す。この充填剤は、オクタデシル基を持つ一般的な逆相クロマトグラフィー用シリカゲルであり、シリーズには分析法の移行性確保のために化学的な特性の等しい粒径2, 3, 5  $\mu\text{m}$ のラインナップを揃えた。

Figure 4はアルキルフェノンの分析例である。高速分析には粒径2  $\mu\text{m}$ を、分析時間がかかる高分離分析には粒径5  $\mu\text{m}$

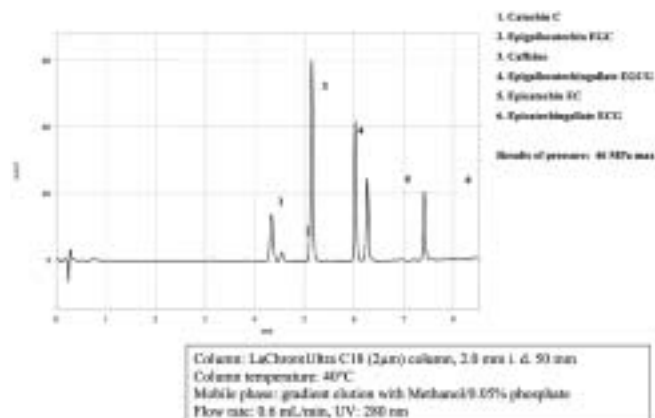


Figure 5. High-speed analysis of catechin

を用いた．高速分析から高分離分析へ，あるいは逆に高分離分析から高速分析へと粒径を換えることにより容易に分析法を移行することができる．

昨今，カテキン類は健康飲料・食品などに含まれ成分分析のニーズが増しているが，類縁物質との分離が比較的難しい天然低分子化合物である．粒径 2  $\mu\text{m}$  カラムを用いることにより高速でかつ高分離に分析ができた (Figure 5)．

ダイオードアレイ検出器を用いる分析例として，食品中色

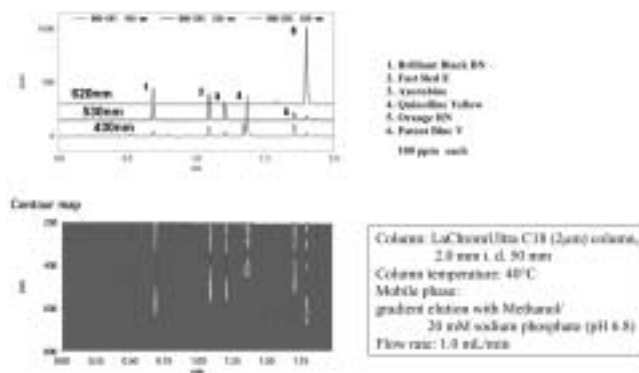


Figure 6. High-speed analysis of dye by Diode Array Detector

素の一斉分析を示す (Figure 6)．430, 530, 620 nmの各波長にそれぞれ吸光度スペクトルの異なる色素が検出され，高速に一斉分析することができた．

## 文献

- [1] 津田孝雄「クロマトグラフィー 第2版—分離のしくみと応用—」丸善 (1995)
- [2] Bristow, P.A.; Knox, J.H. *Chromatographia* **1977**, *10*, 279–289.