

Technical Review

超高速液体クロマトグラフィーシステム X-LC™
(Extreme Liquid Chromatography System) の特長とアミノ酸分析への応用

坊之下雅夫, 佐藤泰世, 宮路敏彦, 岩谷敬仁, 山口高歩, 東館栄, 齋藤宗雄

Feature of Extreme Liquid Chromatography System X-LC™
and Application to Ultra High-Speed Separation of Amino Acids

Masao Bounoshita, Yasuyo Sato, Toshihiko Miyaji, Keijin Iwaya,
Higashidate Sakae, Takayuki Yamaguchi and Muneo Saito

JASCO Corporation, 2967-5 Ishikawa-cho, Hachioji-shi, Tokyo, 192-8537 Japan

Abstract

Ultra high-speed liquid chromatography has become increasingly popular in HPLC. In general, conventional HPLC separation has been performed on columns packed with 5 μm particles. However, conventional HPLC requires a long analysis time and a large amounts of solvents. In case of ultra high-speed liquid chromatography, shorter columns typically 50 – 100 mm in length and 2 mm I.D. packed with ultra micro-particles, of which particle size is less than 2 μm, are used. X-LC (extreme liquid chromatograph) offers higher efficiency and sensitivity, and reduction of organic solvents without sacrificing separation efficiency. We outline the new generation HPLC equipment X-LC that can be used for ultra high-speed liquid chromatographic separation. We also discuss the analysis of amino acids using the X-LC system, utilizing a combination of precolumn derivatization with OPA (orthophthalic aldehyde) and separation on a 2-μm dia C18 column with fluorescence detection.

Keywords: Ultra high-speed liquid chromatography, X-LC, Extreme liquid chromatography, Amino acids, precolumn derivatization, OPA, preheat-coil, High-Throughput

1. 緒言

液体クロマトグラフィーは, M.S.Tswettがクロロフィルを分離してから約100年経過し, その間にいくつかの重要な技

術的進歩を遂げて現在に至っている. 特に1969年にJ.J.Kirklandらが開発, 発表した表面多孔性充填剤は, 当時としては, 高い分離能力を有していた. その後, 全多孔性充填剤が

JASCO Corporation, 2967-5 Ishikawa-cho, Hachioji-shi, Tokyo, 192-8537 Japan

Tel : 0426-46-4109

Fax : 0426-60-7513

E-mail: masao.bounoshita@jasco.co.jp

開発され、高圧送液ポンプや高感度検出器などの高速液体クロマトグラフの高性能化とともに、10 μm から年々粒子径が小さくなり、現在は3 μm 、5 μm が主流となっている。このように分離カラムと装置が共に発展しながら、分離分析機器として、医薬、生化学、バイオ、環境、高分子、合成など化学のほとんどの分野を網羅する広い分野で利用され、高速液体クロマトグラフィーとして、飛躍的に普及してきた。このような進歩の源は、高速液体クロマトグラフィーが、分離性能の向上と分離時間の短縮化、そして、分離した成分の高い検出能力（高感度検出、選択的検出、高い同定能力など）が常に求められていたためと考えられる。

近年、2 μm 前後の超微小粒子充填カラムとこれらを使用できる性能を備えた装置システムが開発、市販され、超高速液体クロマトグラフィーとして利用され始めている。

この超高速液体クロマトグラフィーは、高い線速度領域の移動相流量でも、高い分離効率を維持したまま、高感度、短時間測定が実現できる手法であり、van Deemterの式から充填剤粒子径を小さくすることにより、その可能性は示されていた[1]。しかし、超高压ポンプ、カラム外効果を最小とする検出器、バルブ、配管、高速データ処理などを必要とするため、最近まで商品としては実現していなかった。

本稿では、我々が開発した超高速液体クロマトグラフィーとして、高い能力を活用、実現できるシステムである弊社Extreme Liquid Chromatography System “X-LC™”の特長と応用例を紹介する。

2. 超高速液体クロマトグラフィーを実現できるシステム

2 μm 以下の微小粒子充填カラムを使用した超高速液体クロマトグラフィーは、5 μm 粒子充填カラムと比較して、同じ分離度を示すクロマトグラムを約1/5～1/10、場合によっては、1/20程度の短時間で得ることができる。また、カラムの内径を小さくしたセミマイクロカラムを用いることにより、内径4.6 mmのコンベンショナルHPLCで使用するカラムと同数の検体を測定するときに消費する溶液量と比較すると移動相溶液の使用量も1/10～1/20に削減することができる。さらに、測定に使用する試料注入量も約1/10程度で同等の感度を得る測定が実現できる能力を備えている。

このような能力を十分に引き出し、実現することができる超高速液体クロマトグラフは、次のような性能を有する設計が施されていることが必要となる。

- 1) 非常に幅の狭いピーク（ピーク容量が小さい）に対応できる設計、すなわち、カラム外効果によるピークの広がりを抑えたシステム流路
- 2) ピークが短時間に溶出するため、これを適確に検出できる高速データ出力機能を備えた検出器
- 3) 微小粒子充填カラムを高い線流速で測定するために必要な高耐圧性能を備えた送液ポンプと試料注入機構と流路設計

では、弊社超高速液体クロマトグラフィーシステムX-LC™を例として紹介する。

2.1 カラム外効果によるピークの広がりを抑えたシステム流路の設計

超高速液体クロマトグラフィーで得られるピーク容量は、使用するカラムのサイズが内径2 mm、長さ50 mm程度、2 μm 前後の充填剤粒子径の場合、数 μL ～数十 μL 程度と少ない。そのため、ピークが通過するカラム管内以外の流路によるバンドブロードニングの発生を抑える必要がある。例えば、インジェクターや検出器のセル、インジェクターからカラム入口までの配管やカラム出口から検出器までの配管などである。超高速液体クロマトグラフィーシステムX-LC™では、流路の配管は、内径0.1 mmのステンレス配管（高い耐圧性が必要な部分）または、内径0.065 mmのPEEK樹脂配管（耐圧性が不要な部分）を使用している。インジェクターから検出器までのボリューム（カラムを除く）は、トータル20 μL 以下と少ない。UV検出器のセル容量も2.0 μL と小さく、高感度検出とピークの広がりへの対応に適切に設計されている。また、これらの配管の接続部は、小さなデッドボリュームも生じないように配管の切断面（接触面）をダイヤモンドカッターにより正確に垂直にカットし、断面を鏡面に仕上げている。これらの配管は、配管キットとして弊社から供給されている。

2.2 幅の狭いピークを正確に検出できる高速データ出力機能を備えた検出器

超高速液体クロマトグラフィーでは、溶出するピークは、ピーク幅1～5秒程度で溶出する。このような幅の狭いピークを正確に検出する必要がある。通常、ピークは、検出器の応答速度により、その形状に影響を受けることは、すでに知られている。そのため、超高速液体クロマトグラフィーに使用される検出器は、50から100ポイント/秒程度の高速サンプリングが必要となってくる。Figure 1は、検出器のレスポンスを変化させたときのピーク形状の変化を示しているデータである。レスポンスが遅いときは、ピーク形状がゆがみ、カラムがシャープなピークとして分離してもその性能を生か

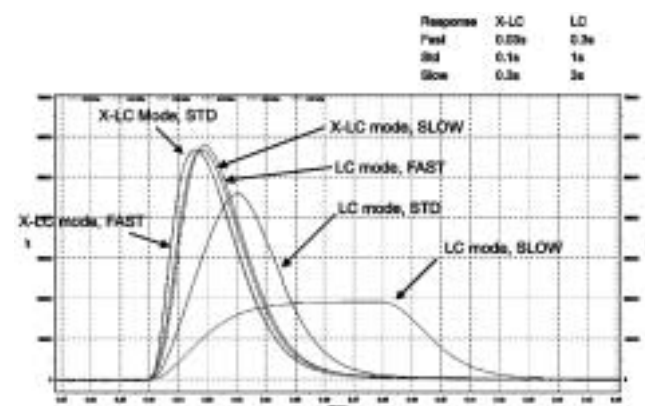
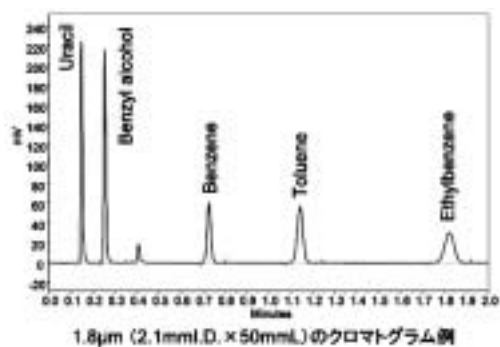


Figure 1. 検出器のResponseの違いによるピーク形状の変化



(測定条件)
 流 量 : 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 mL/min
 移 動 相 : 水 / アセトニトリル = 50 / 50
 カラム温度 : 25
 検出波長 : 254 nm (X-LCmode, FAST)
 実験に使用したカラム : Silica-ODS
 粒子径 (1.8, 2.0, 3.0, 5.0 μm), 内径 (2.0または, 2.1 mm),
 長さ (50 mm)
 サンプル : Uracil, Benzyl Alcohol, Benzene, Toluene, Ethyl Benzene
 混合試料を 1 μL injection

Figure 2-1. H-u曲線作成の測定条件と実測データ例

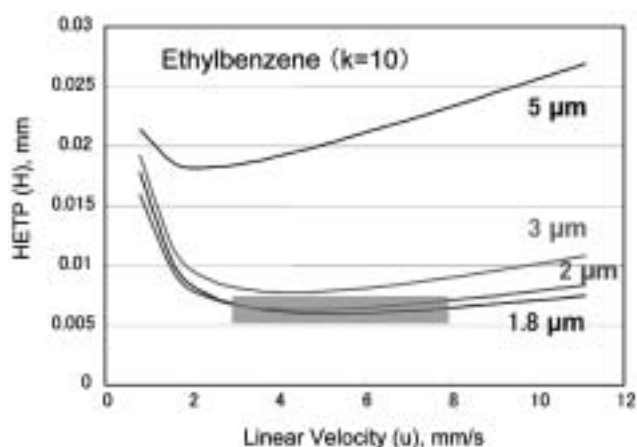


Figure 2-2. 充填剤粒子径別市販カラムのVan Deemter Plots (実測例)

することができない。従って、データ処理装置にも、同等の高速データ取り込み速度が必要となる。

超高速液体クロマトグラフィーシステムX-LC™に使用している検出器は、UV検出器では、100ポイント/秒、蛍光検出器では、50ポイント/秒の高速出力に対応し、シャープなピークに対応することができる。

2.3 微小充填剤カラムを高い線流速で測定するために必要な高耐圧設計

充填剤粒子径の異なるカラムの分析時の圧力は、その粒子径や溶離液の種類、温度などによって異なる。一般的には、カラムの圧力は、流量とカラムの長さに比例し、充填剤の粒子径の二乗に反比例する。そのため、小さな粒子径の充填剤を充填したカラムは、カラム圧力が高くなる。超高速液体クロマトグラフィーに使用できる2 μm前後の市販の充填剤カラムは、耐圧性能に優れている。

これらのカラムの性能を生かすために必要な常用の圧力

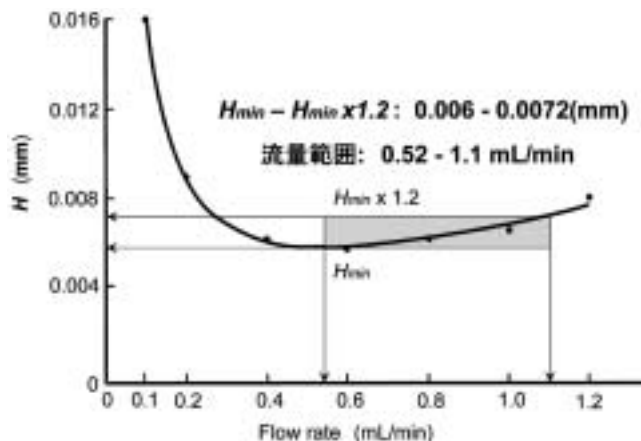


Figure 3. 適切な理論段高(H)を維持する流量範囲 (1.8 μm 充填剤カラム)

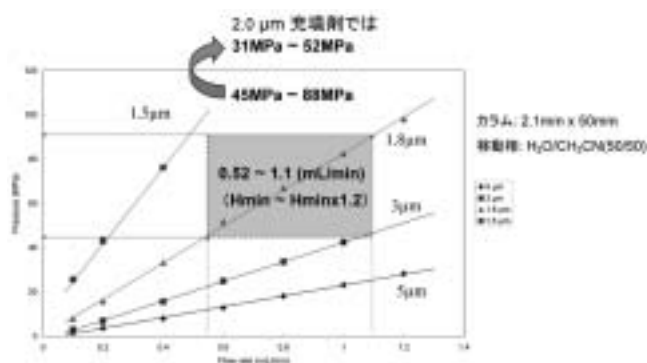


Figure 4. 充填剤粒子径別カラム圧力と流量の関係

が、どの程度であるかを実測した。Figure 2-1, 2-2は、平均粒子径1.8, 2.0, 3.0, 5.0 μmの充填剤 (カラムサイズは、I.D. 2.1 mmφまたはI.D. 2.0 mmφ, カラム長さは50 mm, 充填剤のメーカーは異なる。表示したクロマトグラムは、1.8 μm充填剤カラム, 25 の例) にアセトニトリル/水 (50/50) を移動相とする溶離液を送液して、各カラムのH-u曲線を作成したデータである。このデータから1.8 μmの充填剤カラムについて、移動相流量と理論段高さの関係をプロットしたグラフをFigure 3に示す。この結果から、理論段高の最小値とその20%程度低下までの流量範囲は、0.52~1.1 mL/minの流量であることがわかる。Figure 4は、今回実験に使用した各種粒子径の充填剤カラムの流量とカラム圧力を示したグラフである。Figure 3により示された適切と思われる流量範囲での1.8 μm充填剤カラムの圧力は、45~88 MPa程度になることがわかった。また、2.0 μmのカラムでも適切な圧力範囲が31~52 MPa程度になる。今回の実験の溶離液は、アセトニトリル/水系を使用したがる、粘度が高くなるメタノール/水系などの場合は、カラム圧力もさらに高くなることが予想される。

従来から使用している通常のHPLCシステムのポンプは、50 MPa程度の耐圧性能を有しているが、オートサンブラなどのバルブの耐圧性能は、一般的には、35 MPaから40 MPa

程度である。すなわち、従来システムでは、2.0 μm のカラムでも理論段高さが最小値である適切な流量での使用が、耐圧性能の限界に近いところでシステムを使用することになってしまう。これは、ポンプのプランジャーシールの耐久性なども含めかなり厳しい使用条件となる。このような理由から、弊社超高速液体クロマトグラフィーシステム*X-LC*TMの送液ポンプとオートサンブラは、100 MPaの耐圧性能を有し、よく使用される30~60 MPaの圧力範囲でも、このような高性能カラムの性能を余裕をもって引き出せる設計となっている。

2.4 超高速液体クロマトグラフィーシステムとして便利な装備

超高速液体クロマトグラフィーで使用されるグラジエント溶出法は、高圧混合グラジエントシステムが採用されている。この理由は、短い分析時間の中でのグラジエント溶出を行うため高い追従性が必要とされると同時に迅速な溶媒の切替時の置換性も高速分離においては、重要な影響を与えるためである。しかしながら、混合しにくい溶媒やUV吸収が大きく異なる溶媒の混合などが必要な場合もあり、高性能なミキシングと溶媒置換性能の高いグラジエントミキサーが必要となる。超高速液体クロマトグラフィーシステム*X-LC*TMは、2ポンプまたは、3ポンプの高圧混合グラジエントシステムを組み合わせることができ、ダイナミック方式による高い効率のミキサーが接続されている。このダイナミックミキサーは、ミキシングチャンバーを容易に交換することができ、50 μL から800 μL までの各種チャンバーを選択することができるように設計されている。

そのほか、溶離液の温度をすばやくカラム温度と同じにするプレヒートコイル、カラムの耐久性を向上させるためのインラインフィルターなどが用意され、種々の試料および、測定条件において便利に利用できる周辺装置が準備されている。

3. 超高速液体クロマトグラフィーによるアミノ酸分析への応用例

超高速液体クロマトグラフィーを用いて各種試料を測定した応用例は、多く報告されている。我々は、本誌Technical Review (2006年)にて、米国薬局方 (USP 27 (2004), Page 1654) に掲載されている抗結核薬 Isoniazid, Rifampin, Pyrazinamide のグラジエント溶出法による短時間測定を報告した [2]。結果として、従来法による測定時間約9分に対して、1.4分での測定が可能となり、約1/7の短時間測定ができ、さらに、USPに定められている規定値として指定されている分離度 $R > 4$ (Not less than 4) に対して、IsoniazidとPyrazinamide間で $R = 4.2$ 、PyrazinamideとRifampin間で $R = 37.2$ を得られ、規定値を越えることができた。

今回は、オルトフタルアルデヒドを用いた自動プレカラム誘導体化アミノ酸の高速分離について紹介する。

アミノ酸の組成分析は、食品、医薬品分析、タンパク質科学からメタボローム研究など多くの分野で高速液体クロマトグラフィーを使用して測定されている。その分析方法として利用されている分離、検出法は、プレカラム誘導体化 (オルトフタルアルデヒド、ダブシルクロライド、ダンシルクロライド、NBD-Fほか) 後、逆相系カラムによる分離、または、イオン交換カラムによる分離後、ポストカラム誘導体化 (オルトフタルアルデヒド、ニンヒドリン) による蛍光検出や可視紫外分光検出など種々の方法が実施されている。

ここで紹介する応用例は、高感度検出が容易にできるオルトフタルアルデヒド (OPA) によるプレカラム誘導体化法を採用し、蛍光検出器付の超高速液体クロマトグラフィーによるアミノ酸17成分の高速分離である [3]。分離は、2 μm の超微粒子を充填したC18カラム (2.0 mm \times 50 mmL) を用いたグラジエント溶出法を行うことによるアミノ酸17成分の高速分離を検討した。その結果、約7 minで分離することができ、従来の5 μm 粒子充填カラムでの分析時間38 min (当社比) と比較して、約1/5の分析時間の短縮化を実現し、さらに溶媒の消費量をグラジエントの再生時間も含めて、約1/10に削減することができた。ここで用いるOPAを使用したプレカラム誘導体化は、オートサンブラ (JASCO *X-LC*TM 3059 AS) の自動プレカラム誘導体化機能を利用している。

〔実験〕

システムは、日本分光製 超高速液体クロマトグラフ (*X-LC*TM; Extreme Liquid Chromatograph) を使用した。蛍光検出器は、50 data points/secの高速データ出力に対応し、ピークの拡散を抑えたXLCセルを装備した*X-LC*3120 FPを接続した。測定は、和光純薬工業㈱から購入したアミノ酸混合標準液H型と0.01 mol/Lの塩酸水溶液に溶解したシステイン酸とトリプトファンを添加し、各アミノ酸が20 pmol/ μL 濃度に調製した標準試料を用いて行った。プレカラム誘導体化は、1%OPA溶液、0.4 Mホウ酸緩衝液 (pH 9.0)、2-メルカプトエタノールを0.5:1:0.01に混合した反応試薬溶液20 μL と上記方法にて調製したアミノ酸標準試料100 μL を約30秒間混合して行った。この誘導体化した標準溶液を*X-LC*システムに1 μL 注入し、グラジエント溶出法により分離を行った。分離および検出条件を以下に示す。

測定条件

Eluent A: 1.0 M citrate buffer (pH 5.8) 3.5 mL in 1 L of H₂O

Eluent B: 1.0 M citrate buffer (pH 5.8) 3.5 mL in 1 L of CH₃CN/C₂H₅OH/H₂O (30/30/40)

Gradient condition : 1 cycle 10 min

A:B = 90:10 $\xrightarrow{0.2 \text{ min}}$ 90:10 $\xrightarrow{2.2 \text{ min}}$ 72:28 $\xrightarrow{2.5 \text{ min}}$ 72:28 $\xrightarrow{4.6 \text{ min}}$ 42:58

$\xrightarrow{5.0 \text{ min}}$ 42:58 $\xrightarrow{6.1 \text{ min}}$ 23:77 $\xrightarrow{6.15 \text{ min}}$ 0:100 $\xrightarrow{7.0 \text{ min}}$ 0:100 $\xrightarrow{7.05 \text{ min}}$ 90:10

Flow rate: 0.6 mL/min

Column: X-PressPak V-C18 (2- μm dia., 2.0 mm I.D. \times 50 mm)

Column temperature: 40
 Detection: Fluorescence; Ex 345 nm, Em 455 nm; Gain × 100

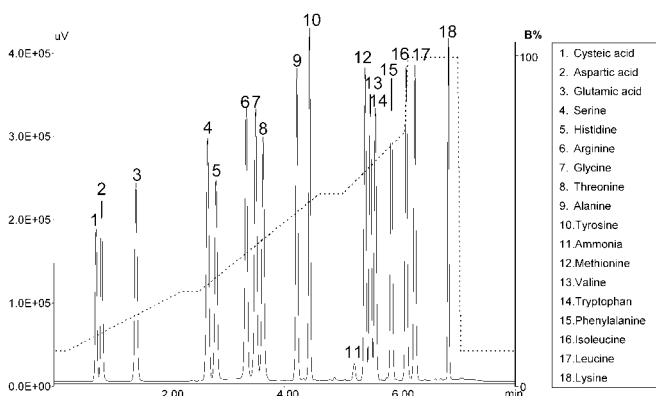


Figure 5. Analysis of standard mixture of 17 amino acids (20 pmol/μL each)
 This analysis was performed under the optimized conditions. Broken line indicates gradient profile (B%).

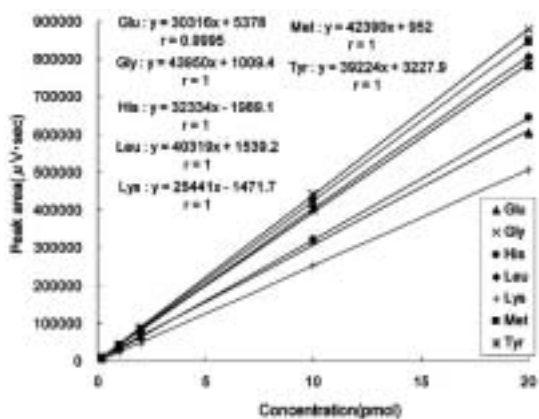


Figure 6. Linear dynamic ranges for 7 amino acid derivatives
 This figure indicates linear dynamic range for arbitrary chosen amino acid derivatives. Correlation coefficients (r) were also calculated for 7 amino acid derivatives ranging from 0.2 to 20 pmol. Excellent linearity was obtained.

【結果と考察】

Figure 5は、*X-LC™*を用いて標準試料を測定して得られたクロマトグラムである。17成分のアミノ酸が7分以内に分離でき、5 μm充填剤による従来のHPLCを用いた測定が38分であることから、測定時間を約1/5に短縮することが可能となった。さらに、溶媒の消費量は、グラジエントの再生時間も含めた1試料の測定あたり、60 mLから6 mLと約1/10に削減することができた。

保持時間とピーク面積の再現性は、17成分のアミノ酸（各20 pmol）について10回の連続分析の結果から算出した。その結果、良好な再現性が得られ、保持時間における相対標準偏差は0.048 - 0.429%、ピーク面積における相対標準偏差は0.546 - 1.90%だった。アミノ酸誘導体化合物の直線性をFigure 6、検出限界をTable 1に示す。相関係数 (r) は7成分

Table 1. Detection limit for 18 amino acid derivatives

| Amino acid | S/N=3 | Amino acid | S/N=3 |
|---------------------|---------|-----------------|---------|
| | fmol/μL | | fmol/μL |
| Cys-SO ₃ | 48.7 | Tyr | 20.9 |
| Asp | 40.9 | NH ₃ | 434.4 |
| Glu | 37.3 | Met | 23.6 |
| Ser | 30.5 | Val | 25.7 |
| His | 37.1 | Trp | 27.1 |
| Arg | 27.2 | Phe | 24.4 |
| Gly | 27.3 | Ile | 23.5 |
| Thr | 30.4 | Leu | 23.4 |
| Ala | 23.7 | Lys | 21.6 |

Highly sensitive detection was realized by the use of the fluorescence detector; the detection limit (S/N=3) was between 21 and 49 fmol/μL.

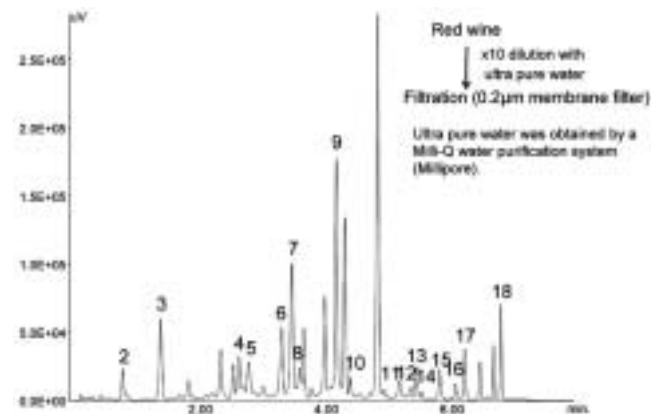


Figure 7. Analysis of amino acids in red wine
 This wine is a cooking wine.

のアミノ酸誘導体化合物の分析結果から算出し、0.2 - 20 pmolの間で良好な結果が得られた。蛍光検出器を用いたことで、高感度な検出が可能になり、検出限界値 (S/N=3) は21 - 49 fmol/μLと良好な値が得られた (Table 1)。実際の食品に適用した実試料の応用データをFigure 7 (赤ワイン), Figure 8 (アミノ酸を添加した清涼飲料水), γ-アミノ酪酸 (GABA) などの標準試料を加えた20種類のアミノ酸の測定例をFigure 9に示す。超高速液体クロマトグラフィーに蛍光検出器の利用が可能であり、逆相系カラムを用いた多成分の短時間高速分離に適用できることが確認できた。

4. 結言

超高速液体クロマトグラフィーシステム*X-LC™*は、つぎのようなコンセプトを基に開発した装置である。

- 1) 超高速・高分離クロマトグラフィーに対応できるシステム
- 2) 多くの分析対象成分の測定に対応できるシステム
- 3) コンベンショナルHPLCと同様の使い勝手 (高いメンテ

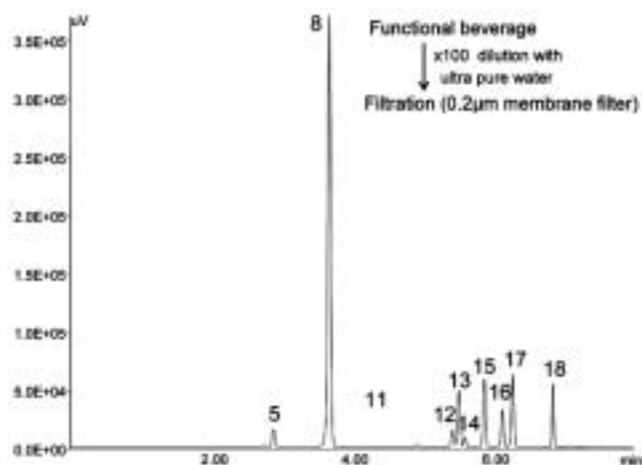


Figure 8. Analysis of amino acids in functional beverage
This beverage contained 9 essential amino acids, i.e., His, Thr, Met, Val, Trp, Phe, Ile Leu and Lys.

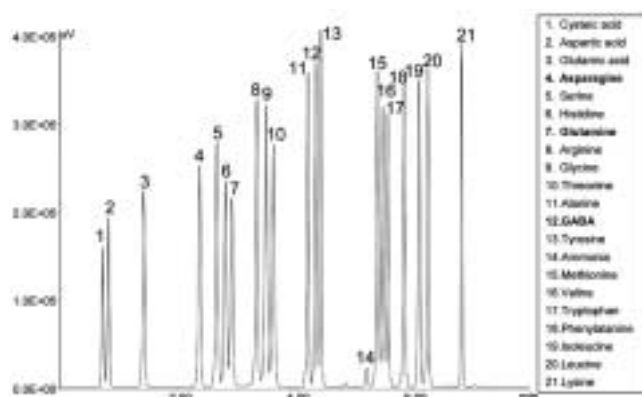


Figure 9. Analysis of standard mixture of 20 amino acids containing GABA (20 pmol/μL each)
GABA (γ -aminobutyric acid) is an important inhibitory neurotransmitter in the central nervous system and essential for brain metabolism and function. Asparagine and glutamine are contained in this standard sample besides GABA. The analysis conditions are the same as shown in Fig. 5.

ナンス性, 各種オプションパーツなど)

- 4) コンベンショナルHPLCとしても使用できる.
- 5) 高いコストパフォーマンス

このようなコンセプトから, 本システムは, つぎのような目的でも使用することができる. 通常の分析時間と同じでも高い理論段数のカラムを使用する測定, すなわち, sub 3.0 μ mの粒子径のカラムでも150 mmや250 mmという長いカラムを使用する分析などである. この場合, カラム圧力が40 MPa以上と高くなっても本システムにとっては, 問題なく使用することができる. また, カラム圧力は, 低いままで, 高速分

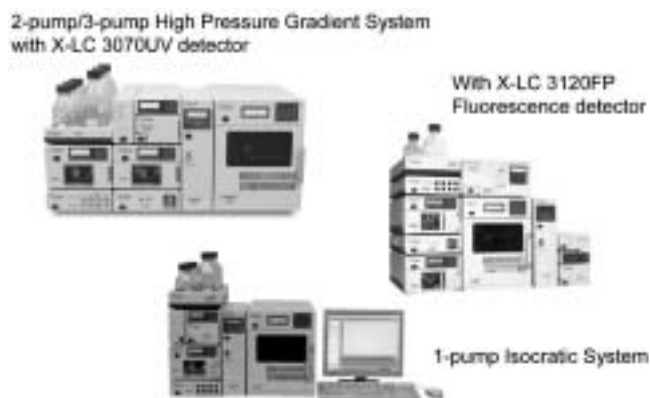


Figure 10. 各種モジュールを組合せて構築したX-LCのシステム例

離を行うモノリスカラムについても, カラムの内径を小さくしたセミマイクロタイプへの対応が行われ, このようなカラムを用いて得られるシャープなピークの高速分離にも, 本システムを適用することができる.

また, 超高速液体クロマトグラフィーが, 多くの分析対象成分の測定に対応できるためには, 分離においては, 各種カラムが開発されることはもちろんである. さらに, 検出においては, 各種試料の検出や現在実施しているコンベンショナルHPLCで使用している検出器が使用できるようになることが, その一つの条件となる. 紫外可視検出器をはじめとして, 蛍光検出器, そして4波長同時検出ができる4- λ 紫外可視検出器, さらに光学活性物質の選択的検出ができる円二色性検出器などを利用した例も近いうちに報告できるようになる. また, ポンプ(3台), 検出器などのモジュールを組み合わせたシステムを構築できるため, 3ポンプ高圧混合グラジェントシステムや1ポンプ定組成送液システムなど分析目的に適したシステムを構築し, 入手しやすい価格の構成システムを使用して実験することができる.

今後も種々の超高速液体クロマトグラフィー用カラムの性能を利用できるシステムとして, 進化させていくと同時に, 各種アプリケーションの紹介を行い, 次世代のHPLCシステムとして, ご利用していただけるよう発展させていきたいと考えている.

References

- [1] Jorgenson, J.W.; Anal. Chem., **1997**, 69, 983
- [2] Bounoshita, M.; Miyaji, T.; Iwaya, K.; Higashidate, S.; Yamaguchi, T.; Saito, M.; *Chromatography* **2006**, 27, 3, 131
- [3] Sato, Y.; Silverman, C.; Bounoshita, M.; Miyaji, T.; Okamura, K.; Iwaya, K.; Yamaguchi, T.; and Saito, M.; *PITTCON 2006 Abstract*.