

Technical Review

超高速液体クロマトグラフと高速高分離分析用カラムの開発

国広沖之，早川禎宏，丸山秀三

Development of the Ultra Fast Liquid Chromatograph and the analytical column for high speed and high resolution analysis

Okiyuki Kunihiro, Yoshihiro Hayakawa, and Shuzo Maruyama

LC Business Unit, Analytical & Measuring Instruments Division, Shimadzu Corporation

1, Nishinokyo-Kuwabaracho Nakagyo-ku, Kyoto, 604-8511, Japan

Abstract

We developed Prominence UFLC as Ultra Fast Liquid Chromatograph and Shim-pack XR-ODS as ultra fast analytical column necessary to achieve higher speed and higher separation by using optimized particle size 2.2 μm . Prominence UFLC with Shim-pack XR-ODS columns enables users to shorten analysis time drastically and easily without extremely high pressure, while maintaining the high separation efficiency of conventional columns and system performance features such as reproducibility, carryover and durability. Prominence UFLC is applicable to a wide range of customers as a highly reliable, and flexible, fast LC system that does not require specialized components.

Keywords: ultra fast LC, optimized particle size, high speed and high separation, sample diffusion outside analytical column

【緒言】

分析業務の生産性向上のため，分析の高速化に対するニーズが高まっている．高速液体クロマトグラフィー（HPLC）においては，分離性能，感度，正確さや精密さなどの基本性能や装置の汎用性，操作性，さらには堅牢性の確保が分析の高速化においても重要なポイントであり，これらを維持しつつ高速化を図る必要がある．単純に分析時間を短縮するためには，移動相の流速（線速度）を速くする，またはカラムの長さを短くすれば良いが，現在広く用いられている粒子径5 μm の充填剤を用いたカラムでは，いずれもカラムの分離効率が低下（理論段数が低下）してしまう．また充填剤の

粒子径の微細化により，分離を維持したまま分析の高速化が図れるが，過度に微細化した充填剤では，カラム圧が大きくなるため，専用の高耐圧システムが必要になり，開発した分析法の汎用性や装置の操作性を損なうことになる．

本稿では，HPLCにおける分析の高速化を考える上でのポイントと，それに基づき開発したHPLCシステムおよび分析カラムについて述べる．

【充填剤粒子径の最適化】

超高速分析を行う上でのキーポイントは，充填剤の粒子径を微細化したカラムを用いて分析するという点である．

〒604 8511 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1 株式会社島津製作所 分析計測事業部 LCビジネスユニット

Tel : 075-823-1274

Fax : 075-811-8187

E-mail: kunihiro@shimadzu.co.jp

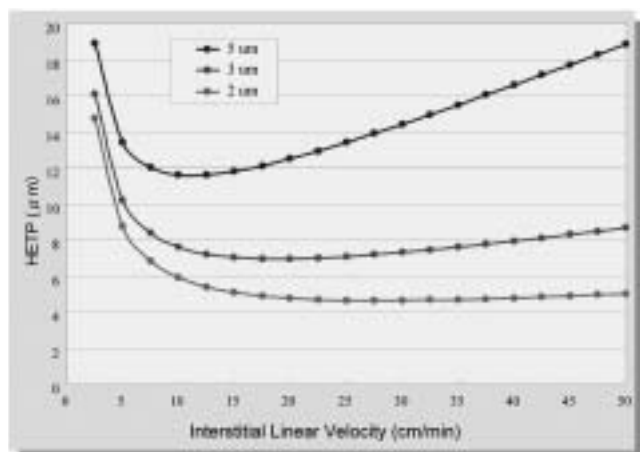


Figure 1. Relationship of linear velocity of mobile phase and HETP at each particle size

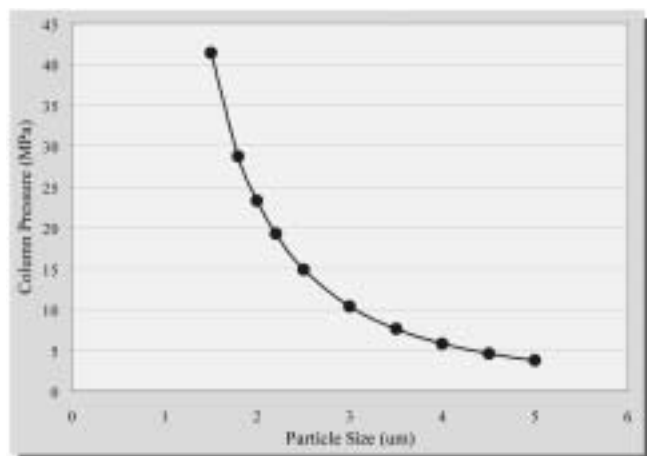


Figure 2. Pressure loss of the columns at each particle size

Fig 1は、粒子径の異なる3つの充填剤における移動相線速度と理論段高さ (HETP) との関係を示す。充填剤の微細化に伴い理論段高さ (1理論段を得るために必要なカラム長さ, HETP) は小さくなっていることがグラフから確認できる。これは、カラムの長さを短くしても高い理論段数を確保できることを意味している。理論段高さ (H) と移動相流量 (移動相線速度, v) との関係は、以下のvan Deemter式により表すことができる。

$$H = A \cdot dp + B/v + C \cdot dp^2 \cdot v$$

この式から分かるように、成分分子が移動相と固定相間を移動する際の遅れに起因する物質移動抵抗の項 (C) は、粒子径の二乗に支配されるため、充填剤の粒子径が小さいカラムでは、移動相の線速度 (v) を高めても低い理論段高さを維持させることが可能となる (注: van Deemter式の第1項は、充填剤粒子間隙の多流路形成に起因する渦巻拡散の項 (A), 第2項はカラム軸方向に対する成分分子の拡散に起因する分子拡散の項 (B))。また最小理論段高さ (Hmin) と最小理論段高さを得るときの最適移動相流量 (v_{opt}) を先

Table 1. Theoretical plate number achieved with 30 MPa conditions

粒子径 (μm)	最適線速度 (cm/min)	到達カラム長さ (mm)	到達理論段数
1.5	38.70	29	8,697
2.0	29.03	69	15,462
2.5	23.22	134	24,159
3.0	19.35	233	34,790
3.5	16.59	369	47,352
4.0	14.51	551	61,848
4.5	12.90	785	78,276
5.0	11.61	1,077	96,638

述のvan Deemter式により充填剤粒子径の関数として導くと、以下の式のようになる。

$$H_{min} = \{A + 2 \cdot (B \cdot C)^{1/2}\} \cdot dp$$

$$v_{opt} = (B \cdot C)^{1/2} / dp$$

これらの式より、最適な移動相流量は、粒子径に反比例し、最小理論段高さは粒子径に比例することから、粒子径の微細化が超高速分析には欠かせない要素となることが理解できる。

しかしながら、充填剤の微細化はカラム圧力損失の増大をもたらす。このカラムにおける圧力損失 (ΔP) は、移動相の粘性などの係数 (ρ)、カラム長さ (L) および、移動相線速度 (v)、粒子径 (dp) から以下の式で表すことができる。

$$\Delta P = \rho \cdot L \cdot v / dp^2$$

この式からカラム圧力は、同じ理論段数を得ることができるカラムの長さでその粒子径に最適な移動相流量で送液したとき、充填剤粒子径の二乗に反比例して増大するため、過度に微細化した充填剤を用いた場合、カラム長さを長くすることによる分離の改善 (理論段数の確保) や最適線速度での使用が困難になり、高速高分離の両立が難しくなる (Fig 2)。また、超高压下での分析は、移動相と充填剤との摩擦熱が増大し、カラム断面での温度勾配が大きくなるため、理論どおりのカラム効率を得ることができないという面もある。更に、装置の堅牢性の観点で見た場合でも、耐圧性を高めた装置では、高压に耐えるために消耗品の寿命が短くなる傾向があるため、できるだけ低い圧力で超高速分析が可能なシステムが望まれる。

Table 1は、各粒子径の充填剤を詰めたカラムを最適移動相線速度で使用したときにカラムにかかる圧力が30 MPaとなるカラム長さとそのカラム長さで得られる理論段数を示す。この表から通常のHPLCシステムの耐圧 (30 MPa) での使用を考えたとき、充填剤の粒子径が大きくなるほど、カラム長さを長くすることができ、より高い理論段数を得るこ

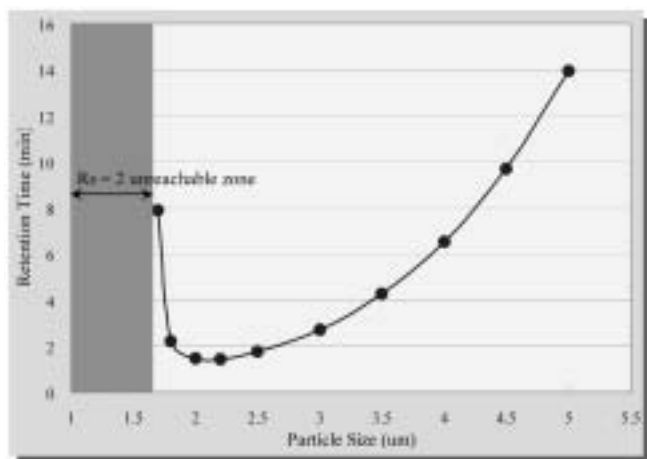


Figure 3. Relationship of retention time and particle size necessary to achieve $R_s=2$ under 30 MPa

とが分かる。Fig 3は、各粒子径の充てん剤を充てんしたカラムを用いて、分離度 (R_s) = 2 が得られる保持時間と粒子径との関係を示す (粒子径 5 μm , カラム長さ 150 mm, 理論段数 12000 となる汎用 HPLC カラムによる分析で分離度 (R_s) = 2 が得られる保持時間が 30 分となる 2 成分をもとに計算)。分離度 (R_s) と理論段数 (N)、分離係数 (α) および保持係数 (k) との関係は、下記の式により表すことができる。

$$R_s = 1/4 \times N^{1/2} \times ((\alpha - 1)/\alpha) \times (k/(k + 1))$$

分離係数 (α) を一定と仮定すると、分離を得るためには理論段数 (N) または保持係数 (k) を大きくする必要がある。Table 1 に示すように粒子径の大きな充てん剤では、高い理論段数を得ることができるが、移動相の線速度が低く、かつカラム長さも長いために非保持容量 (デットボリューム) が大きくなり、必要な保持係数 (k) を得るための時間は長くなる。一方、粒子径が小さい充てん剤では理論段数が低いために保持係数 (k) を大きくする必要があり、結果として分析時間は長くなる。また、保持係数 (k) を大きくしても $k/(k + 1)$ の項としての値は 1 に収束するので、理論段数が低い場合には結果的に分離が得られなくなる。

このようにカラムの圧力損失と獲得できる理論段数およびピークの見分度という観点から、最適な粒子径を見てみると、2.0 から 2.5 μm の粒子径が高速高分離には適していることが分かる。そこでわれわれは、分析の高速化と高分離、装置の汎用性などの両立を実現するため、2.2 μm を採用した超高速分析用カラム Shim-pack XR-ODS を開発した。Fig 4 は、Shim-pack XR-ODS による分析時間の短縮化の例を示す。Shim-pack XR-ODS では充てん剤の微細化により、汎用カラム (Shim-pack VP-ODS : 4.6 μm , 150 mm) と比較して 1/2 のカラム長さで約 3 倍の移動相線速度においても同等の理論段数が得られ、分離を維持しつつ分析時間を 1/5 以下に短縮することができた。また、Shim-pack XR-ODS は、30 MPa 以下のカラム耐圧で使用できるため、高耐圧の専用

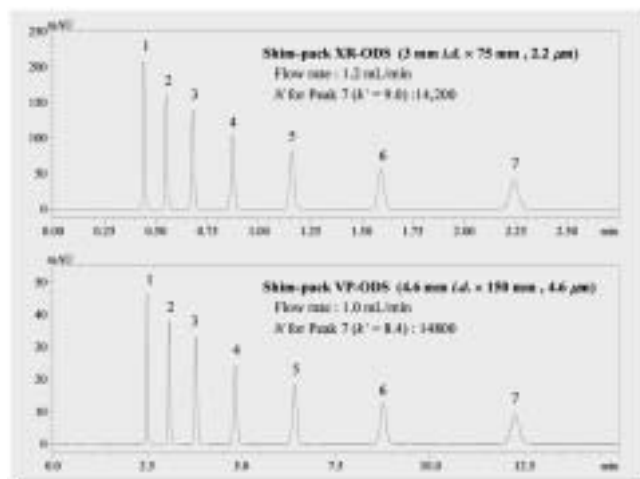


Figure 4. Chromatogram of alkylphenones using Shim-pack XR-ODS (upper) and Shim-pack VP-ODS (lower) (Chromatographic Conditions : mobile phase: Water/Acetonitrile (3/7, v/v), temperature: 40 °C, detection: 245 nm, peak#: 1. acetophenone, 2. propiophenone, 3. butyrophenone, 4. valerophenone, 5. hexanophenone, 6. heptanophenone, 7. octanophenone)

システムを用いなくても分析の高速高分離を達成することが可能となる。

【超高速分析に対応したシステム】

超高速分析におけるシステムへの要件としては、カラム外拡散を抑制することが一番のポイントとなる。一般的に内径が太く長い配管を使用するほどサンプルの拡散は大きくなり、クロマトグラム上のピーク分離が悪くなる。またサンプルの拡散は、理論段数の高いカラムや低い移動相流量での分析および溶出の早い (保持時間が短い) ピークほど影響が大きくなる。そのため、超高速分析に対応したシステムは、サンプルの拡散を抑えるために内径の細い配管やセミマイクロ対応のセルを装備している。また、汎用分析用のカラム容量と超高速分析用のカラム容量との容量比をもとに最適なグラジエントミキサを装備しており、グラジエント分析における保持時間の弱い成分の分離改善や分析時間の短縮化を図っている。

超高速分析においても、分析本来の基本要件である保持時間やピーク面積の再現性の確保は重用である。特に短時間で有機溶媒の濃度を変化させるグラジエント分析において高い保持時間の再現性を得るためには、送液の安定性や混合効率はもちろんのこと、高速の濃度変化に追従できることが送液ポンプに求められる。Prominence UFLC の送液ポンプは、マイクロプランジャによる高速駆動と自動脈流補正機能で安定した送液を可能にするとともに、0.1 秒の時間分解能と 3 nL の送液分解能により、超高速分析でも高いグラジエント性能を発揮することができる。また超高速分析では、カラム内径が小さいカラムでの分析が主流となるため、試料注入量を少な

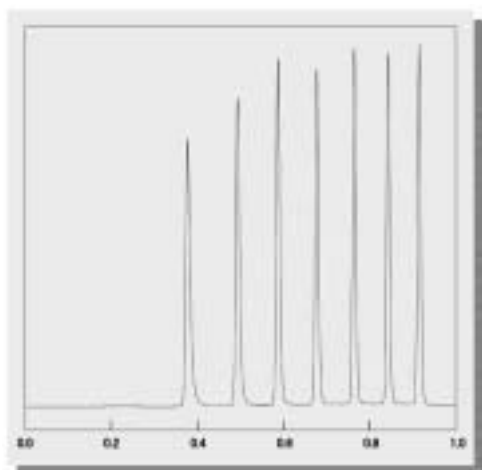


Figure 5. Chromatogram of alkylphenones using Prominence UFLC and Shim-pack XR-ODS
(Chromatographic condition : mobile phase: A:water, B:acetonitrile 0 min (50 % B) 0.55 min (95 % B) 0.70 min (95 % B), flow rate: 1.5 mL/min, temperature: 40 °C Detection: 245 nm)

Table 2. Reproducibility of retention time and peak area at each peak (n=6)

Compounds	Retention time		Peak Area	
	Average	%RSD	Average	%RSD
Acetophenone	0.377	0.076	49018	0.193
Propiophenone	0.493	0.072	47260	0.167
Butyrophenone	0.587	0.070	49199	0.055
Valerophenone	0.677	0.065	45277	0.138
Hexanophenone	0.763	0.082	46613	0.186
Heptanophenone	0.842	0.087	43975	0.205
Octanophenone	0.914	0.080	48978	0.200

くることが多く、低注入量での面積再現性がカギとなる。Fig 5とTable 2にアルキルフェノン7成分を流量1.5 mL/minでグラジエント分析(2 µL注入)したときのクロマトグラムと保持時間とピーク面積の再現性(n=6)を示す。これらの機能によりProminence UFLCは、超高速分析においても高い保持時間およびピーク面積値の再現性を確保することが可能なシステムであることが分かる。

一方、超高速分析に対応したシステムには、当然のことながら装置の堅牢性も求められる。分析時間の短縮化に伴い、オートサンプラのバルブやポンプのプランジャーシールなどの消耗品の交換頻度が高くなるシステムでは、結果として装置の使用頻度を下げる要因となってしまう。Fig 6とTable 3は、システムの耐久性データを示している。Prominence UFLCは、10万回以上の注入回数であっても初期状態と同等の高い保持時間およびピーク面積値の再現性を得ることができ、消耗部品の高い耐久性でより安定したデータを得ることが可能である。

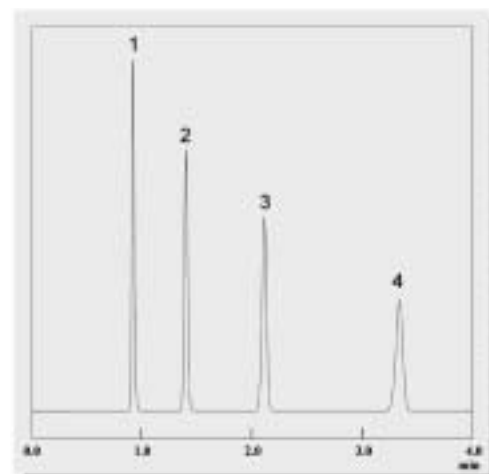


Figure 6. Chromatogram of alkylphenones after 100,000 injections
(Chromatographic condition: mobile phase: water/acetonitrile (1/1, v/v), flow rate: 1.25 mL/min, temperature: 40 °C Detection: absorbance at 245 nm)

Table 3. Reproducibility of retention time and peak area at each peak after 100,000 injections (n=6)

Compounds	Retention time		Peak Area	
	Average	%RSD	Average	%RSD
1. Acetophenone	0.916	0.089	312670	0.059
2. Propiophenone	1.398	0.058	315739	0.045
3. Butyrophenone	2.111	0.030	336428	0.063
4. Valerophenone	3.341	0.031	296609	0.040

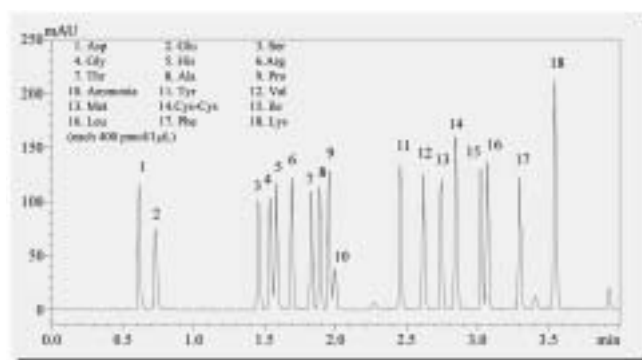


Figure 7. Chromatogram of PTC-amino acids derivatives using Shim-pack XR-ODS
(Chromatographic Conditions : mobile phase: 10 mmol/L (potassium) phosphate <pH 7.0> for A and acetonitrile for B (A/B: 95/5 for 0.3 min then 95/5 to 60/40 in 3.4 min), flow rate: 1.2 mL/min, temperature: 40 °C, detection: absorbance at 254 nm)

【超高速分析でのアプリケーション例】

ここでは、Prominence UFLCとShim-pack XR-ODSを用いた超高速分析でのアプリケーション例として、PTC-アミノ酸18成分を分析したときのクロマトグラムを示す(Fig 7)。

18成分の分離を維持したまま，4分以内に溶出させることができ，通常分析の約1/6に分析時間の短縮が図れることが分かる．

【まとめ】

超高速分析の目標は，システム耐圧を上げることではな

く，短時間で多検体処理を可能にする生産性の向上にある．Prominence UFLCとShim-pack XR-ODSとの組み合わせは，HPLC分析に求められる本来の基本性能である，保持時間やピーク面積の再現性，分離や感度，装置の汎用性などを犠牲にすることなく，高速高分離を実現するために最も適した分析システムである．