

Technical Review

液体クロマトグラフにおける送液系

*伊藤 正人¹、加地 弘典²

Liquid Delivering System in Liquid Chromatograph

Masahito Ito^{1*}, Hironori Kaji²¹Hitachi High-Technologies Corporation

882 Ichige, Hitachinaka-shi, Ibaraki-ken 312-8504 Japan

²Hitachi High-Tech Manufacturing & Service Corporation

1040 Ichige, Hitachinaka-shi, Ibaraki-ken 312-0033 Japan

Abstract

We introduce the technical content concerning the pump of HPLC. We have three aspects; those are the mechanism of the pumps, the gradient elution system, and the measuring methods of performance on the liquid delivering system. Regarding pumps, we explain the one stroke pump, the single plunger pump, the parallel two-plunger pump, and the series two-plunger pump. And we show the low-pressure gradient elution system and the high-pressure gradient elution system. Finally, we add the validation on instruments and the maintenances.

Key words: high performance liquid chromatograph (HPLC); ultra-high performance liquid chromatograph (UHPLC); Nano flow pump; low-pressure gradient elution; high-pressure gradient elution

1. 緒言

本特集は、HPLC 機器ハードウェアについて体系的に技術内容をまとめるのが狙いである。本稿では送液系、即ちポンプおよびその周辺技術にフォーカスし、計測・動作原理から出発して、いくつかの構造・作用方式の差異、特徴を紹介する。

ポンプとは、日本工業規格[1]によると「移動相（溶離液）を送液する装置」とある。一般的なポンプ外観を Figure 1 に示す。1970年代、HPLC が登場して以来、移動相はより高い圧力で送液されるようになった[2]。ポンプの吐出圧力を高めることにより、当時、比較的粒径の小さな充填剤（粒径が

約10 μ m）が詰められた流動抵抗の大きなカラムに対しても高い流量の移動相を送り込めたわけである。このHPLCの考え方は現在まで受け継がれ、高圧ポンプは、吐出圧力5～20MPaの範囲で広く利用されてきた。また2004年以降のUHPLCの展開はこのHPLCの考え方の延長線上にあると見なすこともできる。充填剤の粒径が約2 μ mになり流動抵抗が著しく大きなカラムに対し、いわゆる超高压ポンプと呼ばれる60MPa以上の吐出圧力で送液することにより流量（正確には線速度）を上げ、高速でかつ高分離のLCを実現した[3]。

¹株式会社日立ハイテクノロジーズ 那珂事業所
〒312-8404 茨城県ひたちなか市市毛882

Tel: 029-276-6152

Fax: 029-272-2175

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

²株式会社日立ハイテクマニファクチャ&サービス
〒312-0033 茨城県ひたちなか市市毛1040

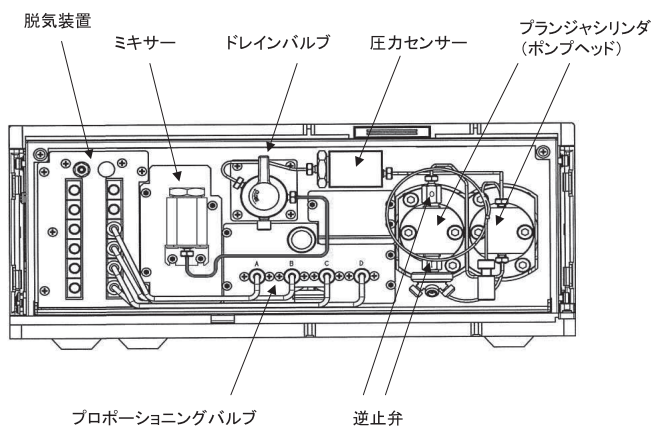


Figure 1. ポンプ外観

2. ポンプの基本的なメカニズム

ポンプは移動相を (a) 任意の設定流量で (b) 特定の圧力上限値まで送液できなければならない。また必要に応じて (c) グラジエント溶離も利用可能でなければならない。そして性能の良し悪しとしては (d) かたよりの小さい正確な流量で (e) ばらつきの小さい精密な流量で送液することが評価される。詳しくは日本分析機器工業会規格に試験方法の規定がある[4]。また (f) 脈流は小さなことが望ましいが、これは保持時間の再現性を向上するばかりでなく、グラジエント溶離法に関連する性能にも直接的に影響する。さらに脈流はポストカラム誘導体化法の利用時に、ベースラインの変動要因にもなる。グラジエント溶離システムに関して、詳しくは後述する。

ポンプの役割とは、一言で言って、高い吐出圧力の能力をもって、移動相を低脈流の状態でも正確に且つ精密に広い流量設定範囲で送液するものと言うことができる。

(1) ワンストローク方式ポンプ

まず、低脈流の実現であるが Figure 2 に示すようなワンストローク (ひと押し) 方式ポンプが考え方の切り出しとしては簡単である。確かに一分析分の移動相総量を送液できる場合、ワンストローク方式ポンプは、送液 (押し出し) 工程から吸引工程への切り替えを一分析中に生じさせないため、最初から最後まで滑らかに送液でき有効である。この方式はナ

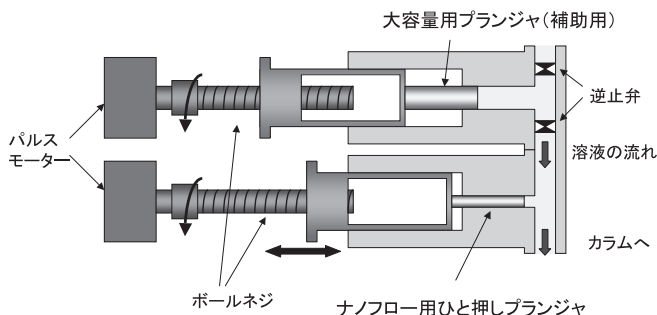


Figure 2. ワンストローク方式ポンプ

ノ LC 用ポンプとして実用化されている。

しかし通常の HPLC の場合、流量 1 ml/min で 10 分間もの比較的長い時間、滑らかに送液する必要があり、移動相 10 ml 以上を一回で吸引しシリンダ内に溜め込まなければならない。ワンストロークの円柱体積が 10 ml のポンプを想定する場合、断面積を大きくすると最大吐出圧力 (Pa) に比例して過大な吐出力 (N) が必要となる。また一方、断面積を小さくしようとするとストローク長がポンプ装置に納められるような現実的な長さにはならない。このような理由のため実際の HPLC 用ポンプでは、一分析の時間内に複数回、移動相の吸引・吐出工程を繰り返す往復動型ポンプを必然的に採用することになる。往復動型ポンプの場合、ポンプ吸引から吐出工程、あるいは吐出から吸引工程への切り替わりのタイミングに送液の滑らかさが低下する。これが脈流を生む最大の原因である。

脈流を低減するために幾つかの方式の往復動型ポンプが考案された (表 1)。

表 1 ポンプ方式の分類

	シングルプラン ジャ方式	2プランジャ パラレル方式	2プランジャ シリーズ方式
ボールネジ方式	(1)ワンストローク方式		
カム方式	(2)往復動型	(3)往復動型	(4)往復動型

(2) シングルプランジャ方式ポンプ

シングルプランジャのカム方式ポンプは、比較的安価に製造できる利点がある伝統的なものである。往復動の 1 サイクルの中で吸引工程を迅速に済ませ、吐出工程は 1 サイクルの大部分の時間を使って一定のスピードで吐出するようなカムを設計する。しかし、この急速吸引工程を極力、短時間にしても周期的な圧力降下は少なからず生ずる。この脈流現象を低減するために、現実的には比較的大型のダンパーを用いて送液を平滑化することになる。またモーターを等速で回転させる場合、液体体積の圧縮補償ができないため、気泡の混入や移動相-カラム系などの流動負荷が変化することに伴い流量の正確さが確保しづらい短所もある。圧縮補償とは、プランジャの並進運動エネルギーが圧力上昇に消費される分を補

い、正確な流量を送液するための機能である。

(3) 2プランジャ・パラレル方式ポンプ

脈流を低減する工夫として2プランジャ方式ポンプがある。まず2つのプランジャ往復動の位相を180°ずらす、いわゆるパラレル方式がある。一方のプランジャシリンダが吸引工程中は、他方は吐出工程にあるのが単純な発想である。この状態を交互に繰り返すことで一定の流量を送液することができると考えられる。一般にシングルプランジャ方式ポンプより脈流は低減できるものの、実際は相互の工程間を移行する遷移時間に送液圧力の変動が生ずる可能性があり、圧縮補償の課題もシングルプランジャ方式同様に残る。脈流をさらに低減するためにモーターを2個用いて、独立に制御する方式もある。また120°ずつ位相差を持たせた3本のプランジャを用いるポンプは、さらに低脈流を狙うパラレル方式の拡張版ととらえることができる。

(4) 2プランジャ・シリーズ方式ポンプ

2プランジャ方式には、脈流低減と圧縮補償を実現するためにシリーズ方式とも呼べる複雑な制御方法を駆使するものもある (Figure 3)。パラレル方式は2本のプランジャが対等な役割を果たすのに対し、シリーズ方式では吸引側にある第1プランジャシリンダが主要であり、吐出側の第2プランジャが第1プランジャによる送液を補正する関係にある。

カム角度に対する各部の動作を Figure 4 に示す。カム角度に対応するフェーズを三つに区分する。簡単に言うと、フェーズ1で第1プランジャシリンダが1サイクル分の全移動相を吸引し、第2プランジャシリンダのみがその間、一定の流量での吐出を担う。フェーズ2では第1と第2プランジャシリンダがそれぞれ設定流量の半分ずつ送液を分担する。最後のフェーズ3は第1プランジャシリンダが設定流量より多めに吐出し、その間、第2プランジャシリンダが次のサイクルのため過剰分の移動相を吸引する。つまりフェーズ3は第1プランジャシリンダの吐出量と第2プランジャシリ

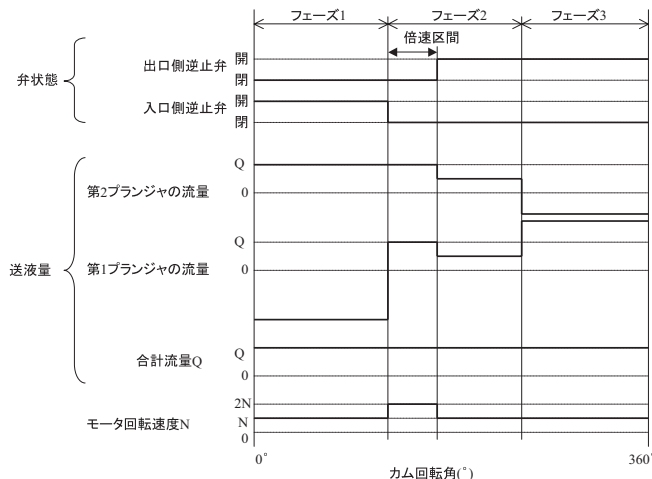


Figure 4. シリーズ方式ポンプの送液メカニズム

ンダの吸引量の差し引き量で、設定流量を送液する工程である。この三つのフェーズを繰り返すことで滑らかな送液を実現する。実際は、フェーズ1からフェーズ2へ移行する遷移過程でモーターを2倍速く高速回転させる倍速制御と呼ばれる工夫が採用されている。この倍速制御を行うことにより脈流の低減と移動相の圧縮補償が実現できる。送液圧力をポンプ内の圧力センサーによりモニターし、一定の圧力に達した時点で倍速状態から通常状態に回転速度を落とすような制御が実行されている。シリンダ内に吸引した液体をプランジャで押出す時、プランジャの変位が液体の圧縮分にも供される。ここで圧力センシングを通じて、シリンダ内の圧力が吐出圧力に達するまでに要する時間を測定することにより、的確な圧縮補償がなされるわけである。液体の加圧が完了してシリンダ内の圧力が吐出圧力と同じになった時に吐出側の逆止弁を開いて、移動相が送り出される。

この他にも各種方式のポンプが実用化されている。組み合わせる分類項目として①プランジャの数、及び②駆動方式が挙げられる。モーターからプランジャまでの駆動方式には、前述のカム方式と、モーターの回転方向とプランジャの並進運動方向が一致するボールネジ方式がある。③複数プランジャの場合、さらに分類できる (表1)。それは前述のパラレル方式か、シリーズ方式かのいずれかの方式である。言い換えれば、各プランジャがそれぞれ対等か、あるいは主要なプランジャが存在するかの違いである。

ポンプに関する技術的な項目をいくつか補足する。まず体積弾性係数を解説する。圧縮補償とも密接に関連するが、例えば吐出圧力を50MPaに上げようとする液体の体積弾性係数を考慮しなければならない。プランジャにより押し込む流体の圧力を10%上昇しようとした時に、気体であればシリンダ体積を10%圧縮する必要があるが、液体の場合はずっと小さな体積変化率で圧力は上昇する。実際は圧力上昇に必要

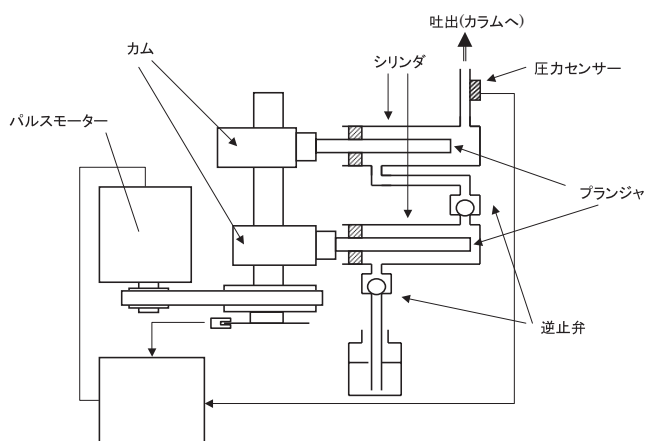


Figure 3. 2プランジャ・シリーズ方式ポンプ

な体積圧縮率を決定する固有の物性値が存在する。これは体積弾性係数 (Pa) と呼ばれ、液体毎に異なる。例えば20℃のメタノールの場合、体積弾性係数は比較的小さく 0.94×10^9 Pa である。これは、メタノールの圧力を仮に100MPaまで上げようとする、液体の体積を約10%圧縮しなければならないことを意味している。水の場合は、体積弾性係数は 2.2×10^9 Pa (20℃) であり、体積圧縮率は比較的小さい。メタノールは最も圧力を上昇させ難い移動相のひとつである。言うまでもなくUHPLCでは特にこの圧縮補償が重要な課題であるため、圧縮補償に優位なポンプ方式が採用される。すなわち2プランジャ・パラレル方式か2プランジャ・シリーズ方式のポンプである。

次にボールネジ方式ポンプは、かなり高価ではあるが、ワンストローク方式以外にも採用可能である。カム方式に比べてストローク長を自在に変化できる特長がある。液体の種類、混合比、温度により体積弾性係数が変化するので、本来、圧縮補償分に寄与するストローク長もそれに応じて変化させなければならない。カム方式はストローク長が一定なので、回転速度に緩急をつけて制御することになり、送液サイクル時間が変化する可能性がある。一方、ボールネジ方式ポンプはストローク長が可変なのでプランジャの並進運動の速度に緩急がつけられ、制御方法によっては送液サイクル時間を一定に確保することができる。

送液系の主要な周辺装置に脱気装置がある。脱気装置の方式には、真空方式やヘリウム・パージ方式などがある。真空方式は、気体を透過することのできる膜を用いて液体中の溶存気体を真空側へ排気する方法である。ヘリウム・パージ方式は、溶存気体をヘリウムガスに置換する方法である。一般に溶存気体を除去することにより検出器のノイズやベースライン状態の改善を目的に使用されることが多い。また、ポンプへの気泡の影響を低減し流量を安定化させることや、グラジエント溶離システム全体への気泡による微妙な影響を低減し移動相の混合比制御を安定化させる効果も期待できる。ポンプに気泡が入り込むと送液できない場合がある。この場合、吐出側からシリンジを用いてポンプ内部に呼び水を吸引する必要があるが、脱気装置を使用すれば気泡の混入を防止することができる。グラジエント溶離システムで有機溶剤と水が混合すると気泡が発生する場合がある。この場合も脱気装置は気泡の発生防止に有効である。

最後にポンプの弁について説明する。ポンプの弁は、最重要部品のひとつである。従来から、一般的に用いられている逆止弁は、圧力の高い側から低い側にボールが移動して弁をふさぐ構造である。しかし、昨今ではこのような受動的な応答性では、動作に少なからず遅れが生じるため、UHPLCなど精密で迅速性を要求される制御には向かない状況もある。そこで従来からオートサンプラで使用されている高圧擦合せ弁が、最近、ポンプでも採用される場合がある。溝を持つローターがステーターに対し回転し、流路切り替え弁として

機能する。高圧擦合せ弁は、かなり高価ではあるが、能動的な動作ができるため、タイムテーブルに従いmsオーダーの高速の切り替え動作が可能となる。

3. グラジエント溶離システム

グラジエント溶離とは、日本工業規格[1]によると「複数の移動相(溶離液)を用い、時間的にその組成を変化させるための制御部と混合溶液を均一にするためのミキサー部からなり、設定できる混合比の範囲が広く、濃度が正確で精密であることが望ましい。」とある。

グラジエント溶離の性能評価方法については、ポンプのようには業界で未だ定まっているとは言いがたい。ポンプの類推で表現すれば、二つの溶媒の混合に関して、(a)任意の混合比が設定可能で、(b)設定値からのかたよりの小さい正確な混合比で、(c)混合比を繰り返し設定する場合、ばらつきの小さい精密な混合比で送液することが評価される。またポンプの脈流に相当する指標として、一定の混合比で送液する場合、例えば1分間、(d)リップル(混合比の最大最小差)の小さな均一な移動相の送液が好ましい。特にUHPLCではグラジエント溶離の応答性が速いものが望まれている。二つの溶媒のミキシングポイントからカラム入口までの配管等内部体積をデュエルボリュームと呼び、(e)このデュエルボリュームの小さなシステムが迅速な移動相の切り替えを実現する。混合移動相の均一化を図るためにミキサー容量を安易に増やすとデュエルボリュームを増加させてしまう。混合移動相の均一性とデュエルボリュームは相反するものとして認識し、注意しなければならない。

グラジエント溶離の役割とは、一言で言うと、任意の混合比を小さなリップル状態で正確に且つ精密に、さらに必要に応じて小さなデュエルボリュームで送液するものと言うことができる。

グラジエント溶離システムは、高圧グラジエント溶離システムと低圧グラジエント溶離システムの二種類に分類される[5]。

(1) 低圧グラジエント溶離システム

低圧グラジエント溶離システムは、ポンプ1台で複数の溶媒が混合できる特長がある (Figure 5)。簡単に言えば、ポンプの吸引工程の時間を百分率で分解し、その吸引時間に占める割合で移動相の混合比を配分する方式である。移動相がポンプ吸引側で高圧状態になる前に異種の溶媒が接するため、低圧グラジエント溶離と呼ばれる。実際はミキサーにより溶媒が均一に混合されるので、低圧グラジエント溶離も混合の場合は高圧グラジエント溶離と同様に高圧流路内である。

低圧グラジエント溶離システムでは、混合する溶媒は吸引側の低圧流路で混合比を配分する。このため比例配分するプロポーショニングバルブには低圧タイプの電磁弁が使用できる。比例配分に直接的に影響する弁開閉の時間精度や起動信

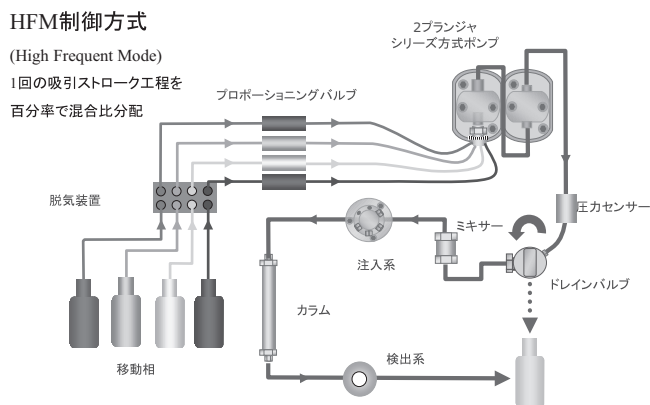


Figure 5. 低圧グラジエント溶離システム

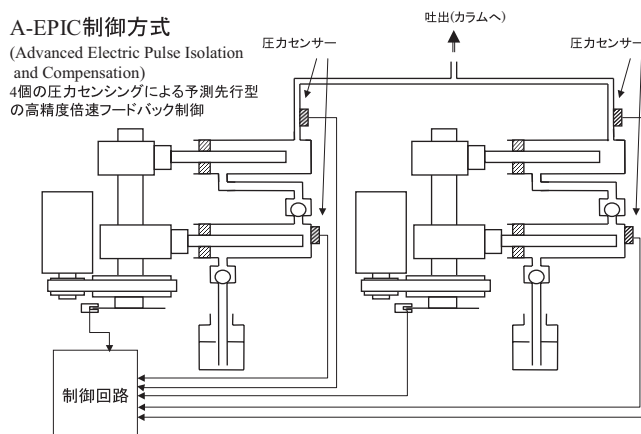


Figure 6. 高圧グラジエント溶離システム

号に対する応答性に関して、高性能な電磁弁が要求される。最近、電磁弁の性能と時間などに関する制御精度が向上し、プランジャ動作サイクル1回の吸引ストロークを理想的に百分率に比例分配することができるようになった (Figure 5)。

(2) 高圧グラジエント溶離システム

高圧グラジエント溶離システムは2液を混合する場合、2台のポンプが吐出した後、高圧流路内で異種の溶媒が初めて接する (Figure 6)。このため、高圧グラジエント溶離と呼ばれる。例えば、流量1.0ml/minで水70%とアセトニトリル30%を混合する場合、水を送液するポンプ1が流量の70%の0.7ml/minを、アセトニトリルを送液するポンプ2が30%の0.3ml/minを分担し送液することになる。移動相に濃度勾配をつける場合は、ポンプ1とポンプ2の総流量を一定になる条件下で、タイムプログラムにより各ポンプの流量比率を変化させるように制御する。

高圧グラジエント溶離では合流部分 (ミキシングポイント) から配管の軸方向に連続的に異種の溶媒が接しているのに対し、低圧グラジエント溶離では吐出後の配管内に異種の溶媒が断続的に並んでいる。このため一般的に高圧グラジエント溶離のほうが、ミキサー容量が比較的小さくて済む。特

にUHPLCではグラジエント溶離の応答性が速いものが望まれ、デュエルボリュームの小さなシステムとして高圧グラジエント溶離システムが多用されている。低圧グラジエント溶離の場合、デュエルボリュームはミキサーだけではなく、ポンプ内部のプランジャシリンダ体積も加算されるため一般に高圧グラジエント溶離より大きくなる。しかしながら最近では、低圧グラジエント溶離システムの利点を重視し、プランジャシリンダ体積を極力、微量化する試みもある。

グラジエント溶離システムは、異種の溶媒が混合されるため、溶媒の粘度や体積弾性係数がプログラム時間に沿って変化したり、ばらついたりする。ポンプは圧力をモニターしながらプランジャ動作をフィードバック制御しているため、これらの混合溶媒に関連した物性変化が少なからず制御に影響を与えることがある。このため複数個の圧力センサーを搭載することによりポンプ流路内部の圧力センシングの位置を最適化し、混合溶媒によるフィードバック制御への影響を低減する方法が採用されている (Figure 6)。

(3) ナノ LC 用グラジエント溶離システム

ナノ LC では、総流量が通常の HPLC に比べ 4 ~ 5 桁少ないため、グラジエント溶離システムの実現は困難を極める。

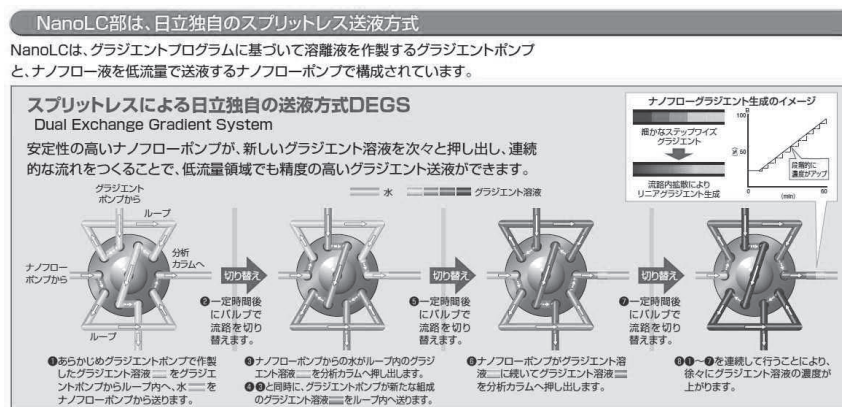


Figure 7. ナノフローグラジエント溶離システム

Figure 7 にこの課題を解消する流量50nL/min スケールのナノ LC 用グラジエント溶離システムを紹介する。ナノフローポンプには二つのループ（ループ A とループ B）を持つ高圧10方バルブが接続されている。汎用タイプの低圧グラジエント溶離ポンプから濃度勾配を持つ移動相を高圧10方バルブに送液する。例えば、まずループ A に10%濃度の移動相を満たす。高圧10方バルブを切り換えて、20%濃度の移動相をループ B に満たしている間に、ループ A の移動相（10%濃度）をカラム側に送液する。次にループ A に30%濃度の移動相を送液している間にループ B の移動相（20%濃度）をカラム側に送液する。ループ A とループ B の往復切り換え動作を繰り返すことにより、汎用の低圧グラジエント溶離ポンプで形成された濃度勾配移動相をナノフロースケールの微量流量で送液することが可能となった。ナノフロースケールでは階段状に混合比を切り替えることで、実際、移動相は配管内で軸方法に拡散しリニアグラジエント溶離のような混合比プロファイルを描く[6]。

4. 送液系への要請事項

(1) 機器バリデーションの評価方法

ポンプとグラジエント溶離の性能について要求される主な機器のバリデーション項目について列挙し、その測定方法を示す。

- ①流量正確さ（真度）として、単位時間の吐出流量（体積）のかたよりを実測するには二つの方法がある。
 - 質量法（天秤）：密度により質量を体積に変換するために室温測定も必要となる。
 - 体積法（メスシリンダ、メスフラスコ）：体積を直接、測定する。

②流量再現性（精度）は、標準試料を複数回繰り返し測定し保持時間再現性（相対標準偏差）を求める。あるいは前述の質量法や体積法により複数回吐出流量を測定することもできる。これらを流量精度の相対標準偏差（RSD）に相当させる。

③グラジエント溶離正確さ（真度）は、A、B 液の階段状プロファイル（5, 10, 50, 95, 100%）を形成し、100%の吸光度を基準として、各ステップの混合比のかたよりを測定する。混合比の実測パーセント値と設定パーセント値の差をポイント値として示す。例えば、A 液に純水、B 液に紫外線の吸収を持たせるため数 mg/L カフェイン水溶液を用いる。

④グラジエント溶離再現性（精度）は、A、B 液の階段状プロファイル（5, 10, 50, 95, 100%）を形成し、複数回繰り返し混合比のばらつき（RSD）を各ステップで測定する。

⑤グラジエント溶離リップルは、A、B 液の一定混合比（例えば50%）を設定し、一定時間（例えば1分間）、吸光度を測定する。その時間内の混合比変動の最大値と最小値の差（ポイント値）を測定する。

⑥圧力のノイズレベルは、ポンプから出力される「圧力モニター」の信号をデータ処理装置に記録し測定する。

(2) 保守・点検の項目

ポンプの保守に関する項目を以下にまとめる。機器のバリデーションを実施された装置は、良好な保守・点検を実施してこそ、その性能を維持することができる。

- ①溶媒フィルタ（ソルベントフィルタ）の洗浄
- ②ポンプヘッドの洗浄：シール交換、プランジャの洗浄

表2 ポンプ用交換部品

装置と保守点検項目	目的/役割	点検サイクル（目安）
溶媒フィルタ （ソルベントフィルタ）	溶液中のごみが、脱気装置や、電磁弁、ポンプに入るのを防ぐ。 注意：ステンレス鋼（SUS）フィルタは酸性溶液に対して、また、セラミックフィルタはアルカリ溶液に対しては使用しない。	3 か月毎に超音波洗浄する。
ポンププランジャ・シール	プランジャシリンダの高圧を保ち、液漏れを防ぐ。注意：シール材質によっては、ヘキサンなどの有機溶媒で膨潤するものがある。	3 か月毎にシールを交換する。
ポンプ逆止弁 （チェック弁）	送液のためポンププランジャーと同期して開閉する弁である。吸入、吐出チェック弁が誤動作すると流量が不安定になる。	誤動作する場合、逆止弁ユニットごとポンプから外し分解して、超音波洗浄する。
ポンプ出口側流路フィルタ	ポンプシールの磨耗により発生する屑によるつまりを防ぐ。	年に1回フィルタを外し、超音波洗浄する。

- ③逆止弁（チェック弁）の洗浄
- ④ドレインバルブ内の洗浄：シールの交換、パッキングの交換、流路フィルタの洗浄
- ⑤ダンパーの洗浄
- ⑥グラジエント溶離用部品の洗浄：バルブ（電磁弁）の洗浄、ミキサーの洗浄

最後に、定期的交換が必要な部品は、あらかじめ予備品を備えておくことを勧める。些細な交換部品がないために、HPLC装置が運転できず、実験が滞ることになる。“備えあれば憂い無し”という諺の通りである。

5. まとめ

送液系としてポンプ、グラジエント溶離システムの各種動作方式について解説した。また、送液系に関連する周辺技術として、ポンプ、グラジエント溶離システムに期待される性能や、機器バリデーションの評価方法、保守・点検について

も述べた。ユーザーにはこれらの基礎知識を、液体クロマトグラフの機種選定のみならず、日頃の装置操作・管理にも役立てていただきたい。

文献

- [1] 日本工業規格, 「液体クロマトグラフ分析のための通則」, JIS K0124: **2002**.
- [2] J. J. カークランド編, 「高速液体クロマトグラフィー」, 講談社, **1972**.
- [3] Ito, M.; Toyosaki, K.; Shimizu, K. CHROMATOGRAPHY **2007**, 28, 101–104.
- [4] 日本分析機器工業会規格, JAIMAS0005: **2008**.
- [5] 日本分析化学会関東支部編, 「高速液体クロマトグラフィーハンドブック 改訂2版」, 丸善, **2000**.
- [6] Deguchi, K.; Ito, S.; Yoshioka, S.; Ogata, I.; Takeda, A. *Anal. Chem.* **2004**, 76, 1524–1528.