

超高速液体クロマトグラフィー対応 ODSカラムとガードフィルターの開発

大阪事業所 西岡 亮太・金子 弘

1 はじめに

HPLC (high-performance liquid chromatography) を直訳すると“高性能液体クロマトグラフィー”となるが、日本では“高速液体クロマトグラフィー”の用語が定着している¹⁾。“High-performance”には、定量精度や操作性など種々の意味が含まれるが、多くのクロマトグラファーが、HPLCの特長の中で、“高速”を最も重視しているとも言える。HPLCには30年以上の歴史があるが、これまで、更に高速化しようとする種々の試みがなされてきた。それには、充填剤の微粒子化、カラムのダウンサイジング、モノリス型シリカ連続体の使用などが挙げられる。充填剤の微粒子化に伴って、カラムの理論段高さは小さくなり短いカラム長で高理論段が達成されるため、短時間で測定が可能となるが、カラム圧は粒子径の二乗に反比例して増大する²⁾。そのため、従来のHPLC装置では粒子径3 μm までが限度とされてきた。

PITTCON 2004において、Waters Corporationから粒子径2 μm 以下の充填剤と高耐圧LCシステムを組み合わせた高速分析用のLCシステムが発表された³⁾。その後、島津製作所やAgilent Technologyなどの分析機器メーカーが相次いで

高耐圧仕様のLC装置を発売し、これらの装置を使用して高速分析を行うLC法が、今後、急速に普及する可能性が出てきている。この手法はHPLCの一種ではあるが、高耐圧仕様ではない従来のHPLC(以下、コンベンショナルLCと略記)に比べて画期的な高速化が達成されるので、HPLCとは区別した名称が用いられている。例えば、新幹線において、同じ軌道上を走るが、“ひかり号”が“のぞみ号”になった位の大きなブレークスルーと言える。現時点では、いくつかの呼称が使用され、今後、用語が統一、改称される可能性もあるが、“UHPLC(Ultra high-performance liquid chromatography)”がより一般的と思われる。この日本語訳として、“超高速液体クロマトグラフィー(以下、超高速LCと略記)”が用いられているので、本稿でもこの用語を用いた。

2 超高速LC用カラムの開発方針

超高速LCとは、一般には、粒子径2.5 μm 以下の充填剤と高耐圧LCシステムを使用するHPLCと定義される。超高速LCではコンベンショナルLCと比べて、システム圧は2倍~6倍程度になるが、同等の分離を得るための分析時間は1/5~1/10程度に短縮できる。現在、市

販されている超高速LCシステムは、①最大耐圧100MPaのLC装置と粒子径1.7~1.8 μm カラムの組み合わせ、②最大耐圧60MPaのLC装置と粒子径2.0~2.5 μm カラムの組み合わせ、の2種類に大別できる。充填剤の粒子径が小さいほど高理論段数が得られるが、システム圧が高くなりカラムや装置への負荷が大きくなる。通常分析では、多くの場合、2~2.5 μm のカラムで十分な高速化が達成でき、また、装置メンテナンスの容易さや汎用性の面で、最近では、②のシステムが普及しつつある。

当社では、上記②のシステムに対応する超高速LC用カラムを開発する方針とし、その目的に合致する粒子径として、最大耐圧60MPaのLCシステムに対応しやすく、低カラム圧と高理論段数を両立できる2.0 μm (付近)を中心とする粒子径のシリカゲル基材を選択した。中心粒子径や粒度分布は、各メーカーでまちまちであるが、これがカラム圧や理論段数の差の要因の一つとなっている。当社カラムは粒子径がそろったシリカゲル基材を使用しているが、一般に粒度分布がシャープであるほど、微粉部分が少なくカラム圧上昇が抑えられ、また均一に充填できるため高理論段数が得られやすくなるという特長がある。当社で

は、顧客ニーズを踏まえて、これまで粒子径 3 μ m カラムで培ってきたカラム製作技術を改良して低カラム圧と高理論段数を両立させること、及び、同一充填剤で粒子径の異なるカラムをラインアップし、コンベンショナル LC で開発した分離メソッドを超高速 LC に移行しやすくすること、の2点を製品開発の目標とした。

3 SUMIPAX[®] ODS D-SWIFTER の特長と分離例

今回、当社で開発した“SUMIPAX[®] ODS D-SWIFTER”と、他社から市販されている主な超高速 LC 用カラムの圧力損失と理論段数の比較を表 1 に示す。当社製品は、充填剤の粒度分布をそろえたことに加え、カラム製作に種々の工夫を凝らしたことで、超高速 LC 用カラムとしては、市販カラムの中で最も低いレベルのカラム圧を達成できた。図 1 は SUMIPAX[®] ODS D-SWIFTER におけるメタノール/水系、アセトニトリル/水系の溶媒組成とカラム圧の関係を表している。カラム圧が上がりやすいメタノール/水系の移動相においても、圧力の上昇を抑えることが可能であり、移動相選択の制約が少ないことが示された。また、線速度と理論段高さの関係を図 2 に示すが、線速度 0.5 ~ 5mm/sec (内径 2mm カラムの場合、流速約 0.1 ~ 1.0mL/min) の間で理論段高さはほぼ一定であった。一般に、微粒子径の充填剤では、流速を上げても理論段高さの変化が少なく理論段数の低下が少ないことが特長であ

表1 市販されている超高速LC用カラムの比較

	SUMIPAX [®] ODS D-SWIFTER	A社	B社	C社	D社	E社
粒子径 (μ m) (メーカー公表値)	2	2	2	2	2未満	2未満
カラム圧 (MPa)	22.0	23.7	35.5	25.9	38.0	36.2
理論段数	8,300	7,500	7,900	7,400	7,300	7,300
ナフタレン保持時間 (min)	2.89	2.90	3.94	2.28	2.08	2.52

<測定条件> カラムサイズ: 2mm.i.d.×50mm, 移動相: メタノール/水 (60/40), 流速: 0.4mL/min
 注) カラム圧, 理論段数, 保持時間は, 当社測定データ

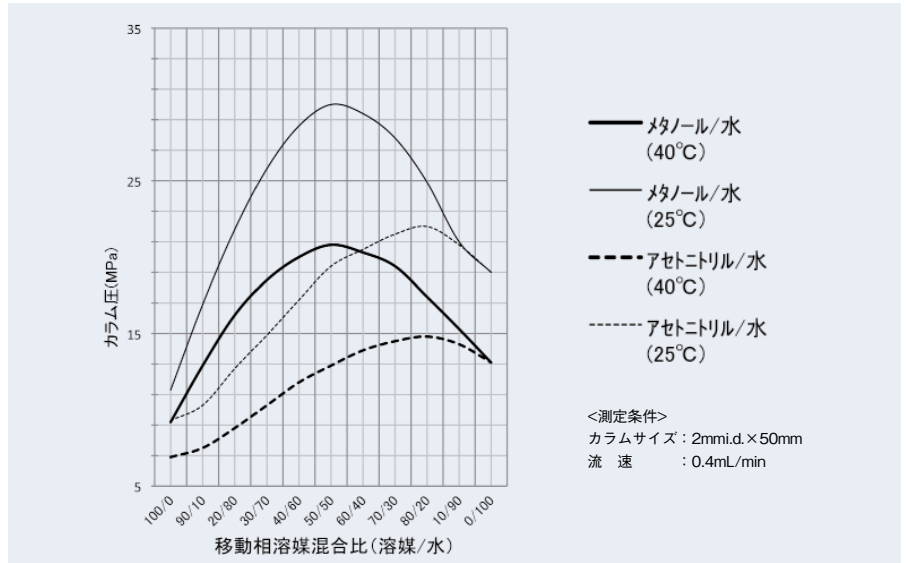


図1 SUMIPAX[®] ODS D-SWIFTERにおける移動相組成とカラム圧の関係

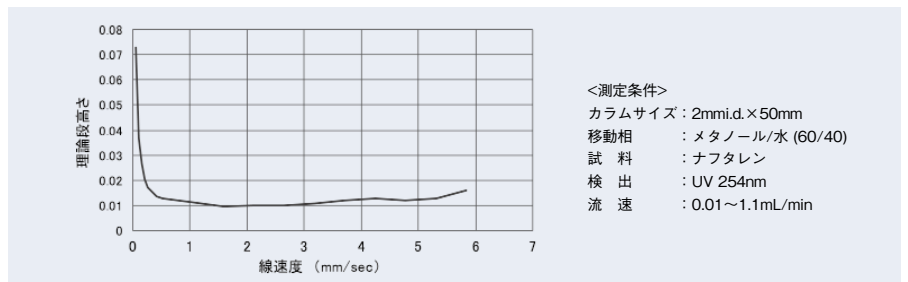


図2 SUMIPAX[®] ODS D-SWIFTERにおける線速度と理論段高さの関係

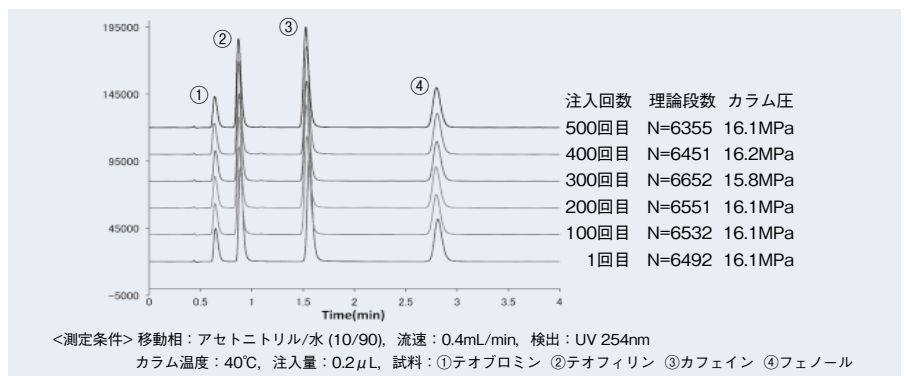


図3 SUMIPAX[®] ODS D-SWIFTER 繰り返し注入時の耐久性試験

り⁴⁾、微粒子径の短いカラムを用いた高流速で測定することでハイスループット分析が可能になる。カラムの耐久性に関しては、500回の注入まで、カラム圧や分離に変化がないことを確認した(図3)。

ODS 充填剤の種類として、“同一充填剤で粒子径の異なるカラムをラインアップする”という観点から、すでに粒子径 5 μ m 及び 3 μ m のカラムを販売している ODS D シリーズと同じスペックの充填剤を使用した。表 2 に ODS D シリーズの物性値を示すが、この充填剤はシリカゲル基材の細孔形状に特徴があり、ODS 基導入率を低めに制御しているため、水系の割合が大きい移動相を用いて高極性化合物を適度に保持するという特性を有する。また、シリカゲル基材中の金属不純物含量を極めて低値に管理しているため、配位性化合物の測定にも最適で、図 4 はこのような配位性化合物の測定例である。また、多成分の高速分離の例として、CNET (O-(4-シアノ-2-エトキシベンジル) ヒドロキシルアミン) -アルデヒド誘導体⁵⁾ 混合試料の分離例を図 5 に示す。コンベンショナル LC で用いられる粒子径 5 μ m カラムと比べて分析時間を約 1/4 以下に短縮でき、分離パターンにも問題ないことが確認できた。この例では、従来のカラム (粒子径 3 μ m) から超高速 LC 用カラム (粒子径 2 μ m) への切り替えがスムーズに行えることが示されるが、同様に逆のメソッド移行、すなわち“分析条件を超高速 LC で検討してから、コンベンショナル LC に対応する”ことも問題なく行えると言える。

SUMIPAX[®] ODS D-SWIFTER では、長さ 5cm のカラムを用いて流速を調整した場合、カラム圧をコンベンショナル LC の最大耐圧であ

表2 SUMIPAX[®] ODS Dシリーズの物性値

SUMIPAX [®] ODS	粒子径 (μ m)	細孔径 (Å)	比表面積 (m ² /g)	細孔容積 (mL/g)	C含量 (%)	使用pH 範囲	金属不純物 (ppm)
Dシリーズ	2, 3, 5	130	280	1.0	15	2.5~7.5	10ppm以下

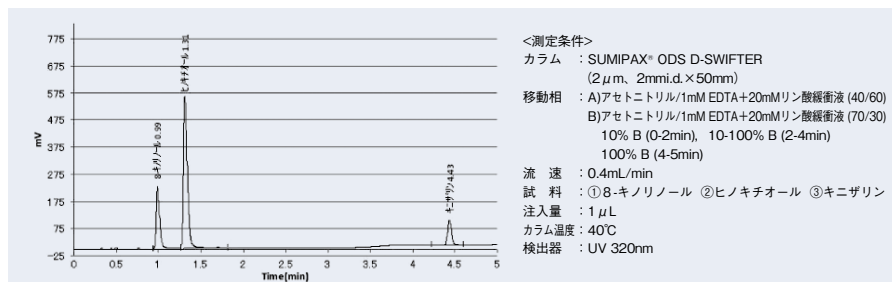


図4 SUMIPAX[®] ODS D-SWIFTERによる配位性化合物 (8-キノリノール、ヒノキチオール、キニザリン) の測定例

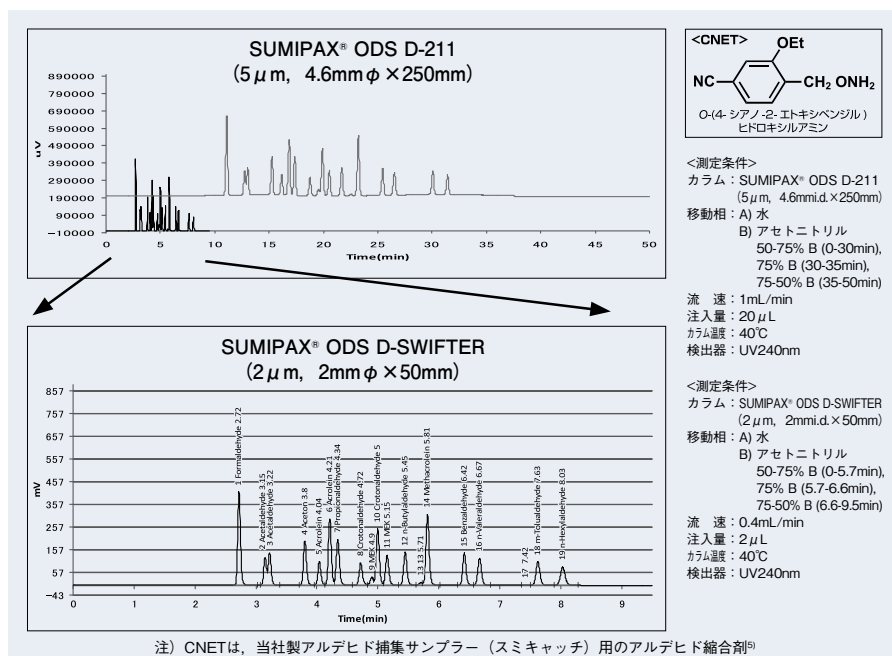


図5 CNET-アルデヒド誘導体混合試料の測定における粒径5 μ mカラムと2 μ mカラムの比較

る 20MPa 以下に抑えることができる。そのため、高圧仕様ではないコンベンショナル LC にも使用することが可能で、粒子径 3 μ m カラムより高い理論段数が得られる (表 3・図 6)。本来の性能を発揮するには超高速 LC を使用するの望ましいが、低カラム圧のメリットを生かし、LC 装置を変更せず分析時間の短縮や溶媒の目的に、あるいは LC/MS フロント用に有効に活用できることが大きな特長である。

4 超高速 LC 用ガードフィルター

超高速 LC では、微粒子径の充填剤を高圧で使用するので、カラム先端での目詰まりや吸着でカラム劣化が起こるリスクは大きいと言えるが、現在、超高速 LC 用として専用に市販されているガードカラムやガードフィルターは少ない。超高速 LC 用ガードフィルターには、①圧損が低い、②耐圧性が高い、③接続時に分離の変化がない、等の特性が要求されるが、当社で販売している多孔質

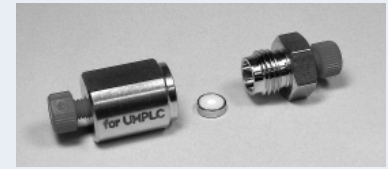
ガラス製ガードフィルターは、均一の細孔径を有する多孔質ガラスを素材としており、その要求を満たす最適の素材と考えられる。しかし、コンベンショナル LC 用に設計されたフィルターを超高速 LC に適用すると、ホルダー内のデッドボリュームの影響で、理論段数の低下が起こることがある。超高速 LC 用途にホルダーのハウジング部分の設計を見直し、内部の流路を可能な限り小さくした結果、理論段数の低下もなく、耐圧性に優れた超高速 LC 用のガードフィルターを開発することが出来た (図7)。

5 おわりに

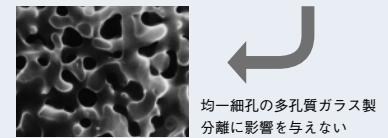
超高速 LC は、登場してから約 5 年

であり、本格的に普及するにはもう少し時間が必要であるが、すでに成品や製薬関係の研究開発部門では、HPLC 分析メソッドの開発に多用されつつある。それに伴い超高速 LC におけるニーズも多様化し、ODS 以外のカラムを含めて、コンベンショナル LC 並みのカラム種類のラインアップが必要になると予想される。

“LC” が “HPLC” になったのは、高耐圧充填剤の開発がブレークスルーになった⁶⁾ 様に、LC 技術の進歩は、圧力克服の歴史であったと言ってもよい。当社では、独自のカラム製作技術に基づいた“低カラム圧”をキーワードとし、多様化したお客様のニーズに対応する製品の改良、開発を今後も進めて行きたい。



SUMIPAX® Filter 超高速 LC 用
ホルダーの設計を変更し、超高速 LC 用に最適化



	理論段数 (n=6 平均)	カラム圧
フィルターなし	17,913	39.8
SUMIPAX® Filter 接続	17,213	39.8

<測定条件>
カラム：SUMIPAX® ODS D-SWIFTER 2mmi.d.×100mm
移動相：メタノール/水 (60/40)
流速：0.4mL/min、ナフタレンの理論段数を算出

図7 SUMIPAX® Filter 超高速LC用の外観

表3 コンベンショナルLCにおけるD-210SLPとD-SWIFTERの性能比較

SUMIPAX® ODS	測定例 (1)		測定例 (2)		測定例 (3)	
	理論段数	カラム圧	理論段数	カラム圧	理論段数	カラム圧
D-210SLP (3 μm)	4,100	6.6	5,200	5.4	4,200	2.9
D-SWIFTER (2 μm)	6,100	14.2	6,700	9.8	5,200	5.1

測定例 (1) 試料：ナフタレン、移動相：メタノール/水 (70/30)、流速：0.2mL/min (カラムサイズ：2mmi.d.×50mm)
測定例 (2) 試料：ケンフェロール、移動相：アセトニトリル/リン酸水溶液(pH2.5) (30/70)、流速：0.2mL/min
測定例 (3) 試料：p-ヒドロキシ安息香酸プロピル、移動相：アセトニトリル/3%酢酸水溶液 (40/60)、流速：0.1mL/min

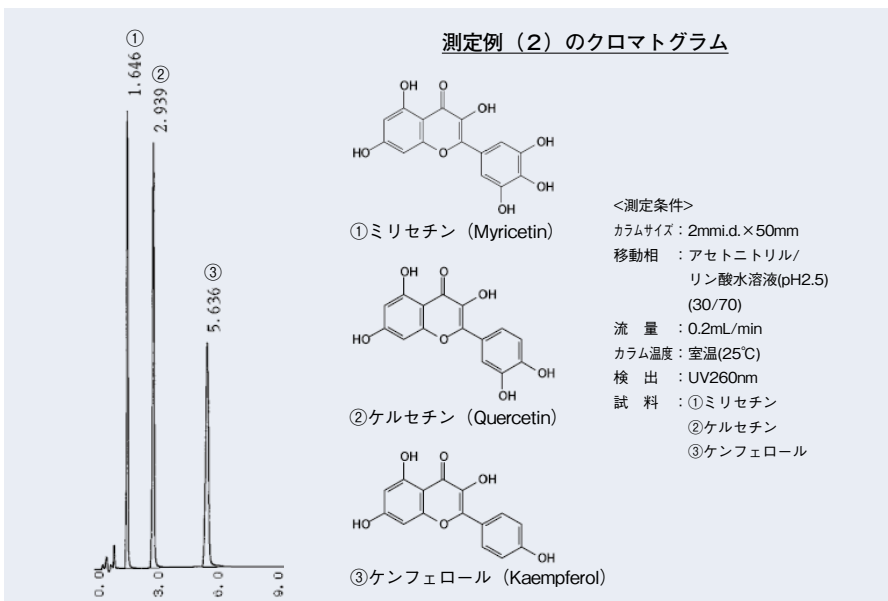


図6 コンベンショナルLCでのSUMIPAX® ODS D-SWIFTERの使用例

文献

- 1) 日本工業規格 “高速液体クロマトグラフィー 通則”, JIS K 0124 他
- 2) 国広, 早川, 丸山, Chromatography, 28 (2), 95, (2007)
- 3) 日本ウォーターズ株式会社 Web Site (2009現在). (http://www.waters.com/waters/home.htm?locale=ja_JP)
- 4) 日本分析化学会 液体クロマトグラフィー研究懇談会編, “液クロの巻”, p38, 筑波出版会, (2004) 他
- 5) 北坂, 島尻, 杉原, SCAS NEWS, 2005-1, 11, (1995)
- 6) 日本分析化学会 関東支部編, “高速液体クロマトグラフ分析”, 産業図書, (1982) 他



西岡 亮太
(にしおか りょうた)
大阪事業所



金子 弘
(かねこ ひろし)
大阪事業所