

Technical Review

液体クロマトグラフィーにおける超高速・超高分離技術の確立

江崎達哉, 田中直美

New Foundation of Ultra-High-Speed and Separation Technologies on Liquid Chromatography

Tatsuya Ezaki, Naomi Tanaka

日本ウォーターズ株式会社 東京都品川区北品川1-3-12

Abstract

The resolution needs to be compromised if the run time needs to be shortened in the traditional HPLC analysis as fast LC. To shorten the run time, the column length should be shorter and the mobile phase flow rate should be faster. But the resolution can be lower at the same time. "Van Deemter's law" explains the resolution can be maximized using theoretically suitable mobile phase flow rate. Also it shows the smaller column particle brings higher resolution. But it was so difficult to develop the LC columns and the hardware, which had higher resistance to pressure. Waters BEH technology and UPLC system technology made such ideal separation technology possible.

Keywords: Ultra Performance LC, UPLC, HPLC, Fast LC, UV, Van Deemter's Law

1. 緒言

HPLCによる分離分析では、分析時間の短縮と分離度の向上は両立しえない関係にある。分析時間を短縮するには、カラム長さを短くする、移動相の流速を速めるなどの手法があるが、その代償として分離度 (R_s) が低下する (図1)。最も高い分離度を得るためには、最適な流速を使用する必要がある。この基本的な原則は、van Deemterの法則[1]を利用することにより説明できる。LCの新たな可能性を示唆するM.L.Leeの報告[2][3]や、J.W.Jorgenson[4]の報告では、よりカラム充填剤の粒子径を小さくすることで、より良

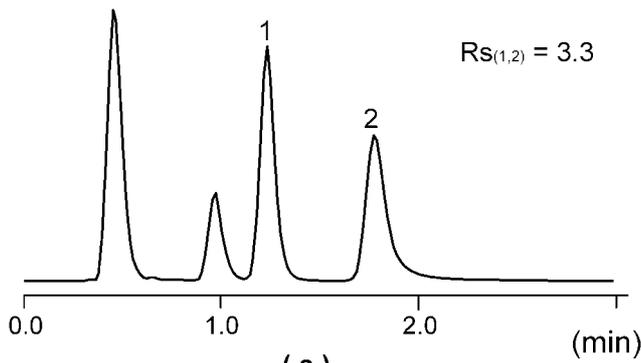
い分離が実現されている。これも、またvan Deemterの法則を利用することにより容易に説明できる。van Deemterの法則における異なる粒子径 (10, 5, 3.5及び1.7 μm) での移動相線速度と理論段高 (HETP) の関係を図2に示す。図2から粒子径を小さくすると、理論的に最適な線速度が高まる特性が見られ、特に1.7 μm の粒子径では高い線速度の広い領域において高いカラム効率が得られることがわかる。すなわち、粒子径1.7 μm のゲルを充填したカラムを用いることで、これまでのLC分析で両立しえなかった分離と分析時間の関係を変えることができる。しかしながら、この理論をLC

日本ウォーターズ株式会社 東京都品川区北品川1-3-12

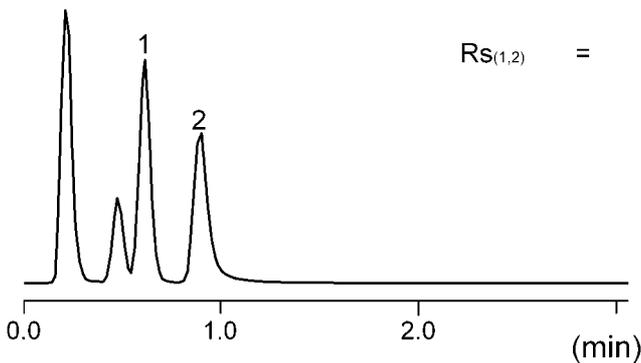
Tel : 03-3471-7192

Fax : 03-3471-7118

E-mail: tatsuya_ezaki@waters.com



(a)



(b)

図1 4.6 mm I.D. x 50 mm 5 μm ODSカラムにおける分離度 (R_s)と移動相の流量との関係を示すクロマトグラム
(a) 移動相流量が2.0 mL/分におけるクロマトグラム
(b) 移動相流量が3.0 mL/分におけるクロマトグラム

システムとして実現するためには、ポンプ、検出器及び、カラム充填剤の改良及び開発が必要であり、その詳細について報告する。

2. 技術的な課題

図2から、カラム充填剤の粒子径を小さくすることにより分離能が向上することを示したが、理論にそった結果を得るためには、同時にいくつかの技術的な課題を解決しなければならない。そのひとつは、さらに微小な粒子がカラムに充填されることでその充填密度が高まり、その結果として移動相送液時の背圧が高まることである。これまでのHPLCシステムでは、その最大使用圧力が5000 psi程度であるから3 μmの粒子径のカラムでは100~150 mmのカラム長さが実用上の限界であった。また、粒子径2 μm程度のゲルを合成しても、シリカベースの充填剤では、それ自体の耐圧が5000 psi程度であることから高圧下では使用できない。これらの課題を解決するには、LCシステム及びカラム充填剤の耐圧を改善し、さらに高圧下での充填技術を確認しなければならない。

粒子径が小さくなると理論段高が向上し、ピーク幅が狭まるすなわち、より濃縮されて検出されることになる。したがって、感度の向上も付加的に期待されるが、その結果を得

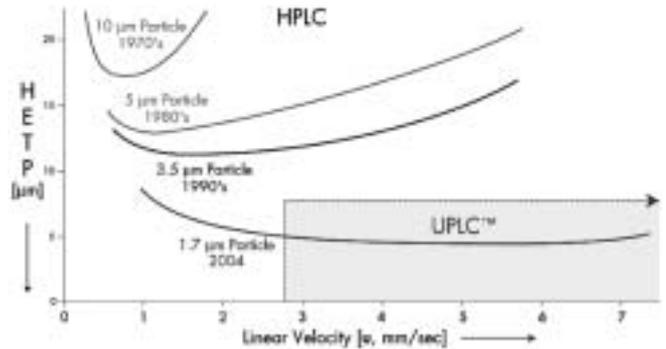
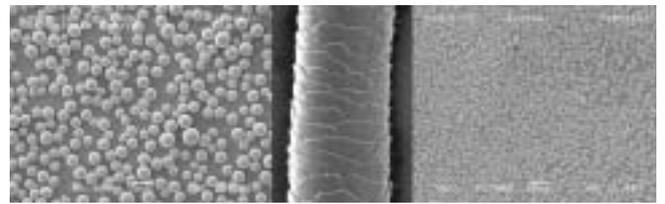


図2 van Deemterの法則における各充填剤粒子径での理論段高 (HETP) と線速度の関係



(a) (b) (c)

図3 LC用充填ゲルと毛髪のSEM画像 (×1000)
(a) 5.0 μmシリカゲル
(b) 人の毛髪
(c) 1.7 μm BEH Technologyによる高耐圧ゲル

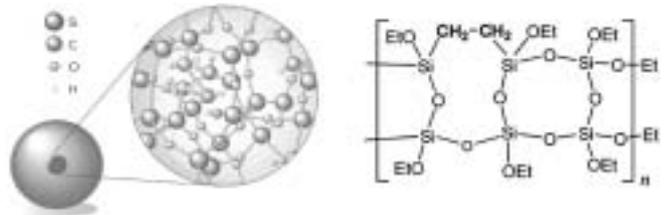


図4 BEH Technologyによる高耐圧ゲルの化学的構造

るためには、2つの課題がある。ひとつは検出器のデータ取り込み速度を高めること、もうひとつは光学系の検出器においてダイナミックレンジと感度を犠牲にすることなくセル容量を小さくすることである。

以降、高速分離LCとして世界で最初に上市されたWatersのUltra Performance LC® (UPLC®)におけるこれらの課題に対する対策について詳細を示していく。

2.1. カラム充填ゲルの改良と高速分離用カラムの開発

2 μm以下の粒子径が均一なゲルを合成し、厳密な規格が得られるよう再現性よく充填すること自体も困難な課題である。図3に、ラボでよく用いられる5 μmのゲルと1.7 μmのゲルの違いを同じ倍率で撮影した毛髪のSEM写真とともに示す。細孔がない粒子は機械的な強度は増すが、その表面積が減ることで負荷量とピークキャパシティが落ち、粒子径を小さくしてカラム効率を高める意義を損なうことになる。HPLCと同等の負荷量を維持し、それ以上のキャパシティを

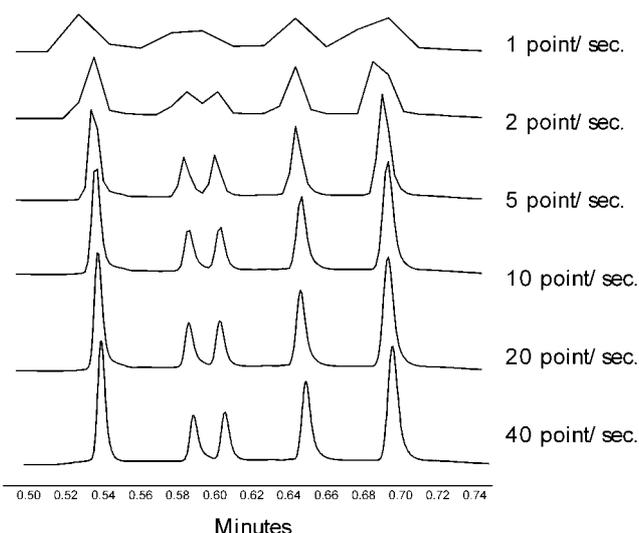


図5 高速LCにおけるサンプリングレートによるクロマトグラムの変化

得るには、多孔性でなければならない。Watersは、多孔性であっても機械的強度が高く、耐アルカリ性の高いゲルであるエチレン架橋されたポリエトキシシラン（BEH Technologyによる高耐圧ゲル：図4）を開発し、この高耐圧ゲルに関する特許[5]を取得した。このゲルは、20000 psi以上の耐圧性を有しているので、充填密度を容易に最適化できるだけでなく、分析時における粒子破碎による閉塞などのトラブルが起きにくい。また、小さな粒子ほど充填する素管の内壁は滑らかである必要があり、エンドフィッティングは目詰まりしないようにするだけでなく、配管内径とのバランスでその厚さを最適化した設計にしなければならない。

参考までに、これまでにHPLCによる分析に使用されたと報告されている最小の粒子径は0.67 μm である[6]。

2.2. 送液ポンプの開発

高圧下において種々の溶媒でグラジエント分析を行うことを想定した場合、広い圧力範囲において溶媒圧縮率を補正できる必要がある。UPLCシステムにおける送液ポンプは、独立駆動のプライマリーピストンチャンパーとアキュウムレーターピストンチャンパー各1基を一式とした2式による高圧グラジエントシステムである。各吐出部に配置された圧力トランスデューサーからの情報を連続的にフィードバックし、各ピストンの動作速度に反映することが、より高精度で安定した送液を可能にする。また、プランジャーシールなどの各シール部位では厳格な機密性を得るために、加工精度や研磨技術を高める必要がある。

2.3. 光学系検出器

2 μm 前後の粒子径のカラムを利用したLCシステムで得られるピークの半値幅は、理論上1秒程度になる。ピークを波形解析において、再現性よく正確に認識できるだけの十分なデータポイント（1ピーク中に15ポイント）がピーク内にカウントされるよう、検出器では高いサンプリングレートで

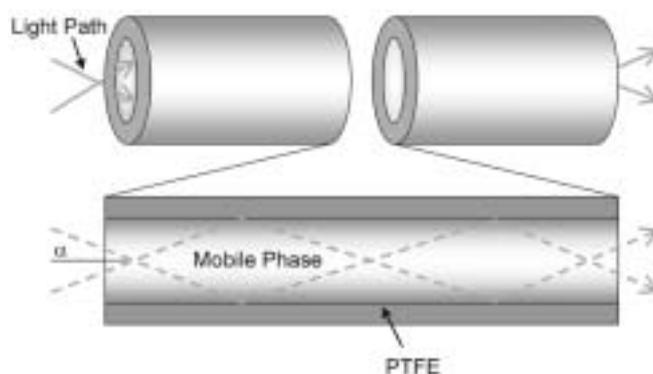


図6 超高速高分離LCにおける低容量セルの構造

データを取り込む技術が必要となる。図5に、サンプリングレートによりどのようにクロマトグラムが変化するかを示す。図3から遅くとも10 Hz以上、好ましくは20 Hz以上でデータを取り込む必要があることがわかる。

また、2 μm 前後の粒子径のカラムにおける分離という利点を有効に維持するには、光学系検出器セル内における拡散を最小限に抑える必要がある。セル容量を抑えるためには、一般的に光路長を短くするか、受光面を狭めるしか方法がない。しかし、光路長を短くした場合には感度が犠牲になり、受光面を狭めた場合には検出に用いられるUVの強度が弱まりダイナミックレンジが犠牲となる。UPLCでは、どちらも犠牲にすることなく μL 以下のセル容量を実現した。光路長は従来通りの10 mmであるが、図6に示すPTFEでコーティングされたセルを用い、受光面に対して斜めに入ってきたUVも全反射により有効に活用する。これにより、従来のLCと変わらないUV強度を得ることができ、十分なダイナミックレンジが確保される。

2.4. トータルシステムと配管接続

微粒子カラムによる分離性能を最大限に引き出すためには、セル容量だけでなくシステム容量を低減する必要がある。UPLCシステムでは、各ユニット間などを結ぶ配管長が最短となるよう位置関係を設計の段階から考慮した。

また、高圧下で使用されることを考慮すると、配管接続部位におけるシール性は重要である。接続部位では、フェルールの固定される箇所の配管外面をよく研磨し、シール性を高めている。これにより、弱い力でも十分にシールし、繰り返し使用することができる。

3. 高速分離LCへのメソッド移管

同じ長さのカラムであれば、充填剤の粒子径を小さくすることで分離能を高めることができる。粒子径 (d_p) を小さくすると同時に長さ (L) を比例関係で短くしていくと分離能は同等となる。そこで、分析を短時間化することを目的とする場合のメソッド移管の事例と分離改善を目的としたメソッド移管について計算例を示す。

3.1. 分析の短時間化を目的としたメソッド移管

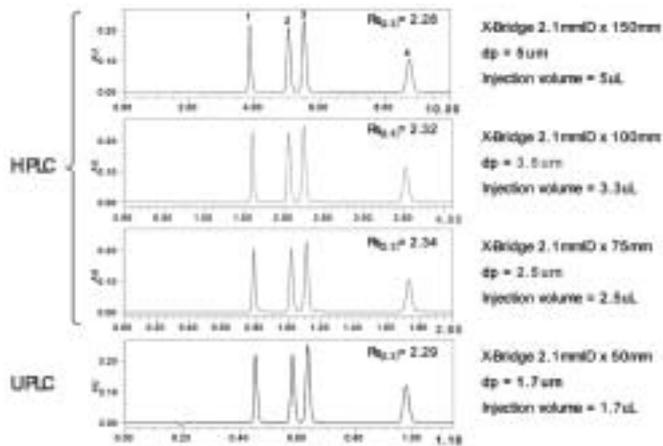


図7 分離度 R_s を維持した超高速LCへの分析法移管

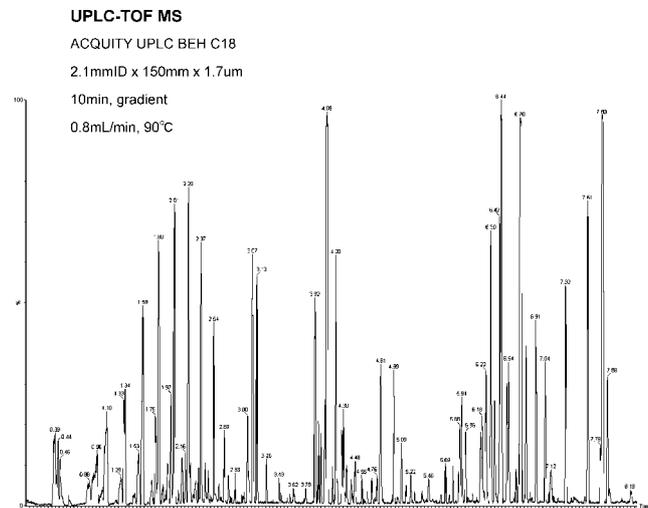


図8 朝鮮人参から抽出された成分の超高速高分離LCによる分析事例

分析時間を短くする目的で、HPLCからUPLCへメソッド移管する場合には、 L/dp の値を保つようにカラム長さを決定する。

HPLCで用いているカラムの長さが150 mmで、充填剤粒子径が5 μm の場合に L/dp は、

$$L/dp = 150 / 0.005 = 30000$$

となる。粒子径が1.7 μm のカラムを用いる場合には、

$$L = 30000 \times dp = 30000 \times 0.0017 = 51 \text{ mm}$$

50 mmのカラムを選択すればよいことになる。

この理論に基づきメソッド移管をおこなった場合のクロマトグラムを図7に示す。充填密度を各粒子径に応じて最適化することで、理論どおりのメソッド移管が可能になる。

3.2. 分離改善を目的としたメソッド移管

分離度を高める目的で、HPLCからUPLCへメソッド移管する場合には、 L/dp の値が高まるようにカラム長さを決定する。分離度はカラム長さの平方根に比例するので、4.1.で計算した事例を基準に考えると、粒子径1.7 μm の微粒子カラムであっても10 cm以上の長さを必要とする。ここで、シス

テム耐圧及び、カラムに用いる充填ゲルの耐圧を高めることの必要性和重要性が明確になる。参照するためのクロマトグラムとして、分離能の極めて高い15 cmカラムで朝鮮人参中の成分を抽出した成分(天然物)を分析した事例を図8に示します。

4. おわりに

UPLCを用い分離を改善することは、メタボローム研究における多成分で構成される試料の分析[7][8]に有効であるだけでなく、夾雑物質の多い食品または環境中に残留する農薬のLC-MS分析[9][10]においても有効である。また、分析時間を短縮することは、ハイスループットスクリーニングを必要とする創薬の基礎研究において有用である[11][12]。

分離という観点から、このHPLCにおける高速、分離分析技術を考えてみると、キャピラリーGCが発表され、10年かからずにパッキドカラムからキャピラリーカラムへの移行が進んだことを思い浮かべる人は少なくないであろう。今後、製造業においては、より厳格な品質管理、より高い生産性、さらには迅速な開発が要求され、その厳しい環境においてLCの高速・分離技術がより活用されることを期待している。

References

- [1] J.J. van Deemter, F.J. Zuiderweg, and A. Klinkenberg, *Chem. Eng. Sci.*, **1956**, 5.
- [2] N.Wu, J.A. Lippert and M.L. Lee, "Practical Aspects of Ultra-high Pressure Liquid Chromatography", *J.Chromatogr.* **2001**, 911.
- [3] N. Wu, D.C. Collins, J.A. Lippert, Y. Xiang and M.L. Lee, "Ultrahigh Pressure Liquid Chromatography/ Time-of-Flight Mass Spectrometry for Fast Separations", *J.Microcol.* **2000**, Sep. 12, 462.
- [4] Anton D. Jerkovich, J. Scott Mellors and James W. Jorgenson, "The Use of Micrometer-Sized Particles in Ultra Pressure Liquid Chromatography", *LCGC North America* **2003**, 21 (7)
- [5] US. Patent No. 6, 686, 035 B 2.
- [6] J.M. Cintron, L.A. Colon, "Organo-silica Nanoparticles Used in Ultrahigh-Pressure Liquid Chromatography", *The Analyst*, **2002**, 127, 701-704.
- [7] Yin P, Zhao X, Li Q, Wang J, Li J, Xu G, "Metabonomics study of intestinal fistulas based on ultra performance liquid chromatography coupled with Q-TOF mass spectrometry (UPLC/Q-TOF MS).", *J Proteome Res.*, **2006**, 5, 2135-2143.
- [8] Wang G, Hsieh Y, Cui X, Cheng KC, Korfmacher WA, "Ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometric determination of testosterone and its metabolites in

- in vitro samples.”, *Rapid Commun Mass Spectrom.*, **2006**, *20*, 2215–2221.
- [9] Kovalczuk T, Jech M, Poustka J, Hajslova J, “Ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry: A novel challenge in multiresidue pesticide analysis in food.”, *Anal Chim Acta.* **2006** Sep 1, *577*, 8–17.
- [10] Mezcuca M, Aguera A, Liberia JL, Cortes MA, Bago B, Fernandez-Alba AR, “Application of ultra performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry to the analysis of priority pesticides in groundwater.”, *J Chromatogr A.* **2006**, *1109* (2) 222–227
- [11] Mensch J, Noppe M, Adriaensen J, Melis A, Mackie C, Augustijns P, Brewster ME, “Novel generic UPLC/MS/MS method for high throughput analysis applied to permeability assessment in early Drug Discovery.”, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.*, **2006**.
- [12] Wren SA, Tchelitcheff P, “Use of ultra-performance liquid chromatography in pharmaceutical development.”, *J Chromatogr A.* **2006**, Jun 30, *1119* (1–2), 140–146.