

## 製品紹介

## 汎用型高速液体クロマトグラフ HLC-803 の応用

渡 辺 秀 夫  
相 浦 淳

## Some Applications of the TSK HLC-803 Liquid Chromatograph

Hideo WATANABE  
Makoto AIURA

汎用型液体クロマトグラフ HLC-803 が、東洋曹達 HLC シリーズの1つとして発表された。この機器の応用について紹介する。

1. はじめに
2. 機器の概要
3. カラムの作成
4. 測定の準備
5. 標準的測定法
6. 高感度測定
7. グラディエント装置<GE-2>との接続
8. 全波長 UV-VIS 検出器<SF-770>及び RI 検出器<RI-8>との接続
9. 全波長 UV-VIS 検出器<SF-770>及びグラディエント装置<GE-2>を合せて接続
10. さいごに

## 1. はじめに

種々の目的の高速液体クロマトグラフが発表されてきたが、溶離条件の設定に多くの実験を要するのが一般的である。分配吸着あるいはイオン交換クロマトグラフィでは、複数の機器を設置し、より分析能力の向上を目指すのが、1つの進むべき方向であろう。このためには、いかに安価に、いかに簡単にだれでも操作できる高速液体クロマトグラフが必要となってくる。この目的に沿って開発された汎用型液体クロマトグラフ <HLC-803> は、どのような機器が適当であるか、機器の開発にあたり、使用するサイドから検討を加え、どのような思想のもとに設計されたか述べてみたい。

## 2. 機器の概要

まず、最終的にでき上った、HLC-803 のブロックダイアグラムを Fig. 1 に示す。

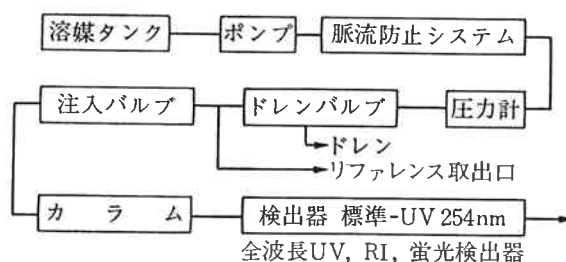


Fig. 1 HLC-803 の流路系

このシステムの開発にあたり、使用する立場から主に留意した点を列記すると、

- 1) 溶媒タンクの位置はどうあるべきか。
  - 2) 脈流防止システムの使用とその自由度。
  - 3) ドレンバルブの必要性。
  - 4) 注入バルブの仕様。
  - 5) 注入バルブの位置はどうあるべきか。
  - 6) リファレンス回路の必要性。
  - 7) 周辺機器を使用する場合、その性能を十分に発揮させるためには。
  - 8) カラムの取付方法。
  - 9) 高分離能カラムの性能を十分に利用できるような装置の広がりをもっと最小にするにはどうしたらよいか。
  - 10) ポンプの流速範囲はどの程度を考えるべきか。
- HLC-803 システムが、ユーザーの立場から、どのような検討のもとに、あるいは、どのような思想のもとに

設計されたか、充填から測定までの過程を以下に述べる。

### 3. 充填カラムの作成

高速液体クロマトグラフィには、分配吸着、イオン交換、排除クロマトの3つの方法があるが、排除クロマト(GPC, GFC)は、有機溶媒系、水溶媒系とも、高分離能カラムを必要とするため、測定者自身が作成することは一般に不可能であるが、分配吸着型あるいは、イオン交換型は測定者自身が作成するのが一般的でありかつ目的に応じた充填カラムを製作することができる。充填は測定スタートであり、これを軽視すると測定条件の選定の際、苦勞することになる。2つのクロマトグラムをみてみよう。

同径カラムに同じ充填剤を充填した2本のカラムによる同じ溶離条件で測定したクロマトグラムであるが、イ)のクロマトグラムは良好な分離を示しているが、ロ)の方は不十分である。この程度の差は単に充填によってのみでも起り得る。ロ)のクロマトグラムは更に分離しなければならぬため、溶離条件をかえ分離したものを Fig. 3 に示す。

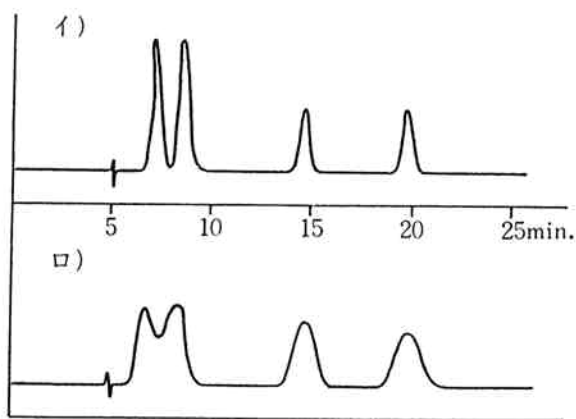


Fig. 2 分離能の異なるカラムによるクロマトグラム

分配吸着クロマトグラフィにおいては、溶離後の選択で分離することができる場合が多いが、カラムの充填が悪い時、折角分離することができて、Fig. 3のように分析時間をいたずらに長くし、かつピークをブロードにするため、感度的にも損失を多くしてしまうことが多

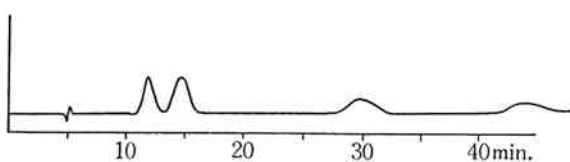


Fig. 3 充填不良カラムによる分離

い。又、カラムさえ良ければ必要ないグラディエント装置を必要とすることはよく経験することである。

分配吸着型あるいはイオン交換型の TSK—GEL を充填する立場から見ると、次の四法に大別できる。

[1] シリカ系のように膨潤収縮がない充填剤

LS—310 SIL, LS—410—ODS SIL, LS—470—OH SIL, IEX—260—SA

[2] ポーラスポリマー系充填剤を逆相系あるいは水系で測定する場合

LS—110—STYRENE ~LS—170—STARCH

IEX—210—SC ~IEX—240—WA

[3] ポーラスポリマー系充填剤をヘキサンやクロロホルムのような低粘度有機溶媒で充填する場合

LS—130—ME ESTER ~LS—170—STARCH

[4] イオン交換用充填カラムの作成

[1] の場合

膨潤収縮がないため、自由に溶媒交換しても、カラム性能を損うことがない。このため測定の際の溶媒をあまり考慮せず、充填に都合の良い方法で充填するのが一般的である。スラリー法で充填する場合、充填剤とある程度の親和性を持ち、かつ低粘度溶媒で、充填すれば、簡易な、充填装置でカラムが作成できる。又充填の際はできるだけスラリーの濃度を下げれば、低圧でおこなえるため、高流速で充填できる。一般的にこの場合は、充填のみを考えれば良いことは、カラム作成にとっては魅力的である。Table 1 に代表的な、シリカ系の充填法を示す。シリカ系充填剤は、測定においても、膨潤度が少ないため、自由に溶離液が選べるため、少容量のカラムを使用することが多いが、4 mmφ×30 cm で代表した。

[2] の場合

一般に測定溶媒は粘度が高く、溶媒により膨潤収縮があるため、測定使用溶媒に近い系で充填しなければならない。又有機溶媒の量を測定の際、激しく変化させることは、長期的にみればカラム寿命を短くすることになるため、カラムの分離能を上げ、溶媒組成の変化をできるだけ少なくする方が賢明である。従って比較的長いカラムを使用することが多い。粘度、カラム長を考えれば必然的に低流速充填となり、スラリー濃度は充填時間なども考え高くなり、かつ特別な分離能を要する時以外は、10 μ あるいは、15 μ の充填剤の方が使い易い。

[3] の場合

ポーラスポリマーを、有機溶媒系で使用する場合、低粘度溶媒を使用するのが多く、高流速で流すことができかつ、水を使用することが、稀であるから、LS—110, LS—111 のように比較的膨潤収縮の大きい充填剤でもこ

Table 1 シリカ系充填剤の代表的充填法

カラムサイズ 4 mmφ × 30 cm

充填剤	粒 径	ス ラ リ ー 液	スラリー濃度	充 填 流 速
L S-310	5 μm	クロロホルム4-エタノール1	15%V/V	4 ml/min
310	10 μm	"	"	7 "
L S-410	5 μm	テトラヒドロフラン	"	5 "
410	10 μm	"	"	10 "
L S-470	5 μm	クロロホルム4-エタノール1	"	4 "
470	10 μm	"	"	7 "
IEX-260	10 μm	CH <sub>3</sub> CN 80 H <sub>2</sub> O 20	"	5 "

Table 2 ポーラスポリマーを逆相系あるいは水系で使用する場合の代表的充填法

カラムサイズ 4 mmφ × 60 cm

充 填 剤	粒 径	ス ラ リ ー 液	スラリー濃度	充 填 流 速
L S-110	10 μ	H <sub>2</sub> O 65 CH <sub>3</sub> CN 35	40%V/V	2 ml/min
110	15 μ	"	"	3 ml/min
111	10 μ	H <sub>2</sub> O 20 CH <sub>3</sub> CN 80	"	2.5 ml/min
111	15 μ	"	"	4 ml/min
120	10 μ	H <sub>2</sub> O 70 CH <sub>3</sub> CN 30	"	2 ml/min
120	15 μ	"	"	3 ml/min
130	10 μ	"	"	2 ml/min
130	15 μ	"	"	3 ml/min
140	10 μ	"	"	2 ml/min
140	15 μ	"	"	3 ml/min
160	10 μ	H <sub>2</sub> O 90 NaCl 1% CH <sub>3</sub> CN 10	"	1.7 ml/min
160	15 μ	"	"	3 ml/min
170	10 μ	"	"	1.4 ml/min
170	15 μ	"	"	2.5 ml/min
170*	10 μ	THF 80 H <sub>2</sub> O 20	"	1.5 ml/min

\* 糖, 配糖体分析用

Table 3 ポーラスポリマーを有機溶媒系で使用する場合の代表的充填法

カラムサイズ 4 mmφ × 60 cm

充 填 剤	粒 径	ス ラ リ ー 液	スラリー濃度	充 填 速 度
L S-130	5 μ	n-ヘキサン80 エタノール20	40%V/V	2.5 ml/min
130	10 μ	"	"	5.0 "
140	5 μ	"	"	2.5 "
140	10 μ	"	"	5.0 "
150	5 μ	"	"	3.0 "
150	10 μ	"	"	6.0 "
160	5 μ	"	"	2.5 "
160	10 μ	"	"	5.0 "
170	5 μ	エタノール10 クロロホルム20 n-ヘキサン70	"	2.0 "
170	10 μ	"	"	4.0 "

の点に留意しなくてもよい。

かつこのような系では、非極性の充填剤 LS-110, LS-111, LS-120 は使用する例は少ない。

低粘度溶離液では、圧力も小さく、かつ充填剤にかかる応力も小さいので分離に重点をおき小さい粒径を使用するのが、有機溶媒系で測定する際は、良好なクロマトグラムが得られるポイントの1つである。

[4] の場合

TSK-GEL IEX-200 シリーズのイオン交換型充填剤は高速液体クロマトグラフィ用充填剤として設計されており、塩濃度などにより膨潤収縮が極めて少ないため、可動栓型カラムなどは不要であり一般のカラムに充填し、塩濃度を変化させることができる。一般的に充填条件は下記の通りである。

Table 4 イオン交換用充填剤の充填法

充填剤	スラリー液	スラリー濃度	充填速度
IEX-210	0.1M NaCl 90 + CH <sub>3</sub> CN 10	45%	2.2 ml/min
IEX-220	"	"	"
IEX-230	"	"	"
IEX-240	"	"	"

以上のように、TSK-GEL は、多くの種類と、3種の粒径をもち、目的に応じて使用できるように設計されているが、その反面、充填においても幅広い充填速度が必要となっている。一方 HLC-803 は、その簡易性、及び安価性が1つの特徴となっているが、充填のために、他のポンプあるいは充填装置が必要となれば高価なものになってしまう。

従って、簡易なパッカーを用意すれば、HLC-803 本体で測定だけでなく、充填もできるよう設計しなければならない。即ち、カラム作成も測定の一部、はじまりであるという基本にたち、実際の測定では使用しないような高流速でも応用できるポンプを使用することに決定した。

#### 4. 測定の準備

充填が終ると前準備は終了、測定にとりかかる。溶離液を作成し、少し温度を上げ脱ガス、系内を充填に使用した溶媒と交換しなければならない。

しかし、脱ガスが不十分であればポンプ入口側は減圧となり、ガスを発生し易い。これは溶離液槽を上部に置けば解決するのは、容易に考え得る。簡単なことであるが、使用する側からみれば重要なことである。“小さな親切”，溶離後は上部に置ける場所を設置した。

次に測定にとりかかるには、前に使用した溶媒をより早く測定したい溶離液にかえなければならない。流速を大きくし、交換すれば良いのだが、カラムを損傷する可能性が大きい。

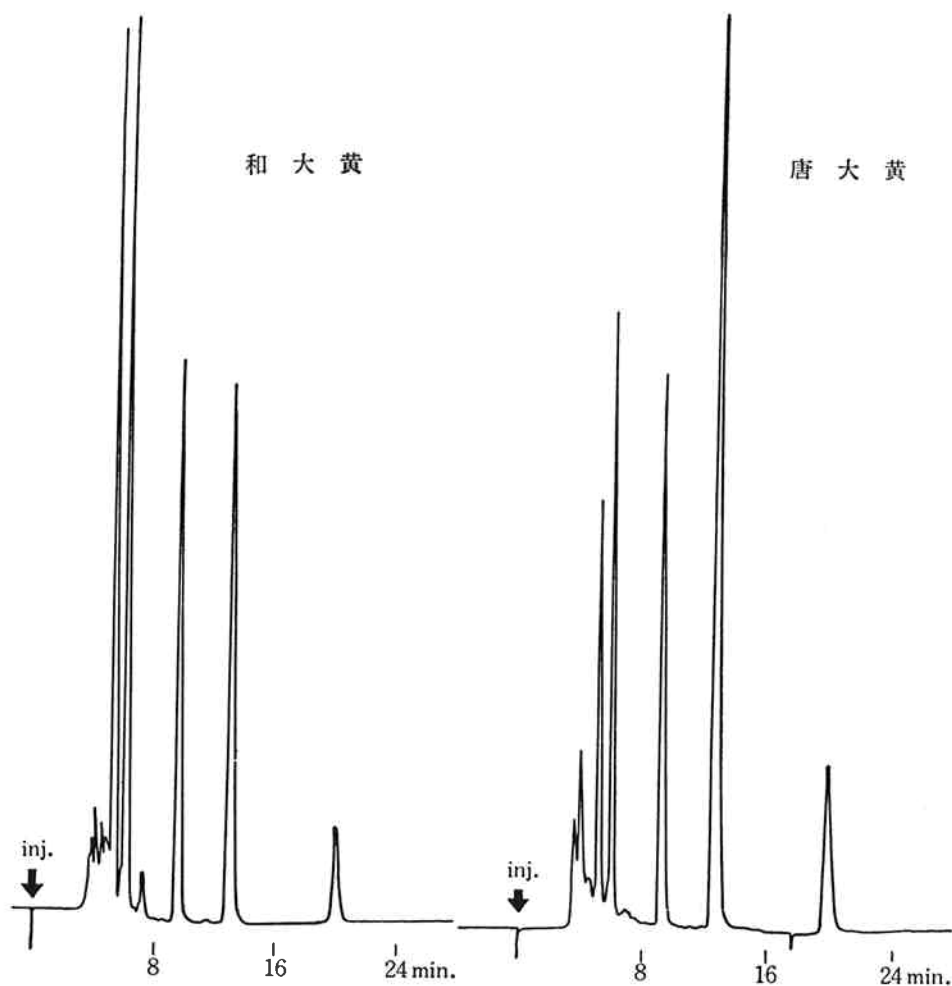
そこでカラムの前に前面から操作できるドレンバルブを採用した。ワンタッチで外部へ液を出し、液体クロマトの現在における困難な面、溶離液の選択を一秒でも早くできるように工夫した。

#### 5. 標準的測定

前記のようにして作成したカラムをまず取付ける。HLC-803 は、簡単に取付けられるよう、押し込み方式となっている。一般にシリカ系のカラムやイオン交換系のカラムは、短かい場合が多く、ポラスポリマー系では、長いカラムを使用するケースが多い。又、排除クロマトグラフィの測定では複数のカラムを使用するのが普通である。測定するカラムの長さ、あるいは数により、注入バルブの位置は変化し得なければ、長いリードパイプを必要とし、折角の高分離能カラムも、価値を減少してしまう。この目的のため、HLC-803 の注入口はスライド方式となっている。注入バルブを測定上都合の良いカラムに合った位置に自由にスライドし、カラムを設置する。流速を 1 ml/min 前後に設定し、全電源を ON にする。カラムの状態などにより、時間は異なるが、安定後測定を始める。このようにして、HLC-803 の標準仕様で、かつ、もっとも一般的である逆相クロマトグラフィ用充填剤、TSK-GEL LS-410 ODS-SIL (オクタデシルシラン化学結合型)、P-5 (5 μ±1 μ) を使用し、測定した例を Fig. 4 に示す。

Fig. 4 の分析例では、溶離後は、メタノールなど、シリコン等を溶解あるいは膨潤させない溶媒であるため、定量性を考えなければセプタムインジェクターでもバルブインジェクターでもかまわない。次のクロマトグラムは、液体クロマトグラフィにおける最も一般的な充填剤であるシリカゲル (TSK-GEL LS-310-SIL) 粒径 5 μ を使用した測定例を Fig. 5 に示す。

このような有機溶媒系の測定では、セプタムインジェクターの使用は極めて難しい。ヘキサン、アルコールの系でも、シリコンはもとより、フッ素系樹脂でも寿命は短い。クロロホルム、メチレンクロライド、テトラヒドロフランなどの系では、シリコン樹脂は、溶解の可能性があり、フッ素系樹脂でも膨潤する。このようなことを考え、インジェクターは、全溶媒性のバルブインジェクターの採用を決定した。又、マイクロシリンジの性能にもよるが、バルブインジェクターの方が、注入精



試料 唐大黄 和大黄抽出物  
 カラム LS-410 5 $\mu$  4mm $\phi$ ×30cm  
 移動相 メタノール 95 水 5 酢酸 0.3

Fig. 4 LS-410による生薬の分析例

度が良いことも事実であろう。

## 6. 高感度測定

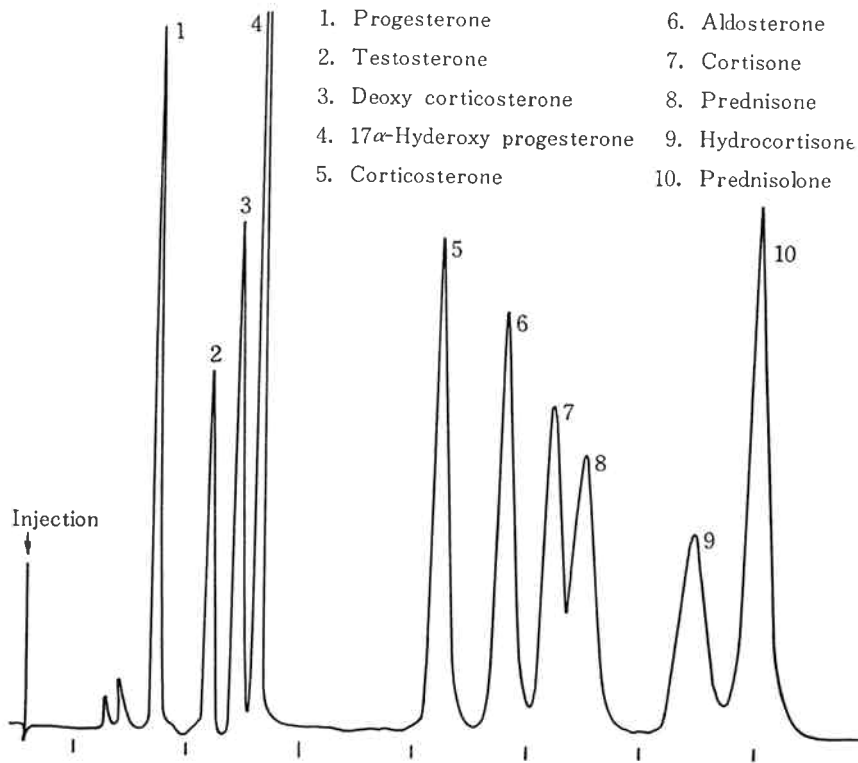
高感度で測定するには、脈流は妨害となる。特に低粘度溶媒を使用する際は顕著である。一般の測定するときには脈流は気にならなくても、高感度で測定する時には、必ず妨害になるといえよう。このため脈流防止システムは独自のものを開発、HLC-803は高感度で測定できるシステムとなっている。カビ毒、アフラトキシンを、TSK-GELのポーラスポリマーLS-160及び球状シリカゲル（共に5 $\mu$ ）を固定相として測定、充分の感度が得られることがわかった。なおポーラスポリマーで $k'$ を小さくし高理論段で分離する方法とシリカゲルで短いカラムを用い $k'$ を大きくして分離する双方の

例を示す。又、この場合、可視領域365nmを使用すれば更に感度は増すが、このクロマトグラムは、HLC-803の標準仕様254nmで測定したものである。

## 7. グラディエント装置GE-2との接続

東洋曹達が独自に開発した、ノズルフラッパー方式、GE-2と接続して使用する場合、脈流防止システムは標準の使用法では、その容積のため、充分なグラディエント効果は得られない。しかし、高感度測定の場合には流路に対し、スルーシステムをとっているが、簡単にバイパス方式に、接続ができるようになっており、かつこの場合でも、脈流防止効果を有している。

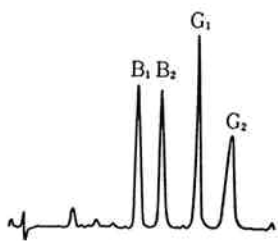
この方法によれば、注入口までの容積も少なく、グラディエント装置の性能を十分に活用できる。



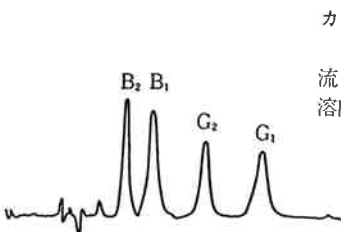
- |                                      |                   |
|--------------------------------------|-------------------|
| 1. Progesterone                      | 6. Aldosterone    |
| 2. Testosterone                      | 7. Cortisone      |
| 3. Deoxy corticosterone              | 8. Prednisone     |
| 4. 17 $\alpha$ -Hydroxy progesterone | 9. Hydrocortisone |
| 5. Corticosterone                    | 10. Prednisolone  |

カラム LS-310 5 $\mu$  4mm $\phi$ ×60cm  
 溶離液 n-ヘキサン/ エタノール 90/10 酢酸 1 トリエチルアミン 1

Fig. 5 球状シリカ (5 $\mu$ ) によるステロイドの分析例



カラム LS-310 5 $\mu$   
 4mm $\phi$ ×30cm  
 流速 1ml/min.  
 溶離液 クロロホルム 75  
 インオクタン 25  
 インプロパノール 1



カラム LS-160 5 $\mu$   
 4mm $\phi$ ×60cm  
 流速 1ml/min.  
 溶離液 ヘキサン 60  
 クロロホルム 40  
 トリエチルアミン 0.1  
 酢酸 0.1

Detector UV 254nm 0.02 OD  
 Sample 各 100ng.

Fig. 6 アフラトキシンのクロマトグラム

この方法で、ポリスチレンオリゴマーを測定した結果を Fig. 7 に示す。

### 8. 全波長UV-VIS検出器及びRI検出器との接続

HLC-803 は任意の検出器と接続できるためにも、注入バルブはスライド方式となっている。即ち、検出器をHLC-803 と並べて設置、注入を上部からおこなうことができる。この方法では、カラム出口からの容積が少ないため高分離カラムでも、その性能を十分に活用することができる。この方式で、全波長 UV-VIS 検出器 SF-770 及び示差屈折計 RI-8 を接続し測定した結果を Fig. 8 及び Fig. 9 に示す。

これまでの例に示したような、紫外吸収検出器の場合は、リファレンス流路は、特別な場合を除き必要としない。しかし、示差屈折型の液体クロマトグラフィ用検出器のように、万能型検出器を使用する際は、リファレンスを使うのが一般的である。このような測定のために、簡単な接続回路の変更で、リファレンスカラムあるいは回路を取付けられる方式を採用した。Fig. 9 はこの流路

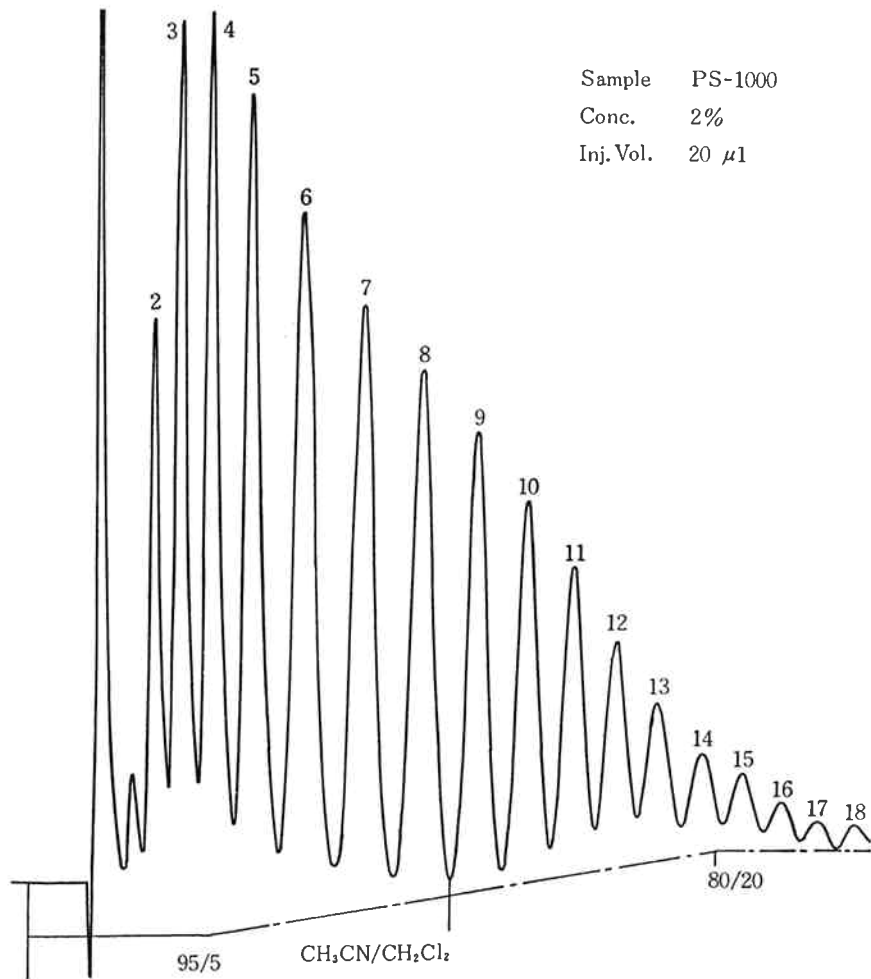


Fig. 7 ポリスチレンオリゴマーのグラディエント溶離によるクロマトグラム

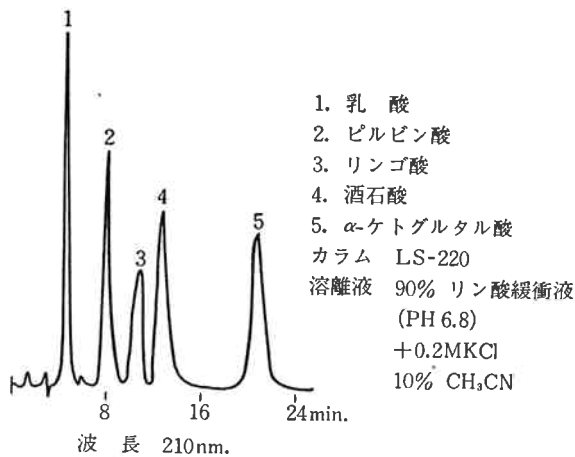


Fig. 8 全波長 UV-VIS 検出器による測定例

で測定した結果である。

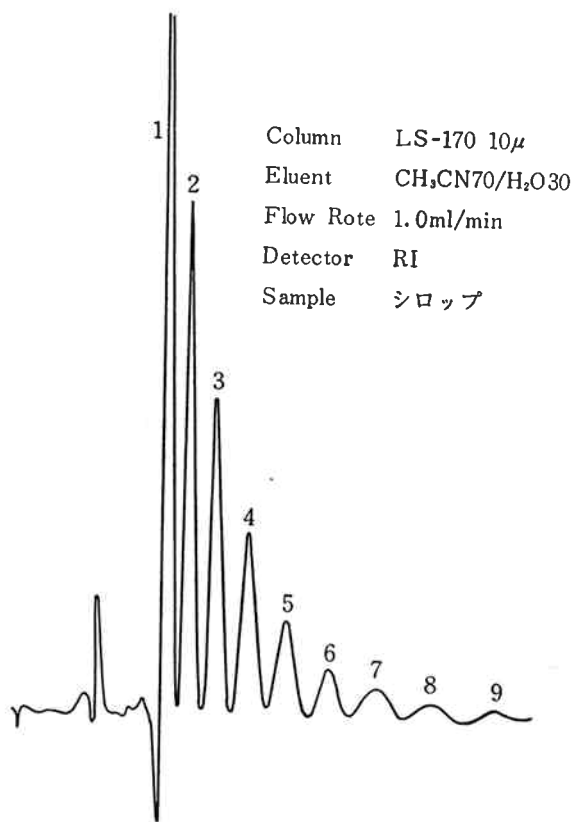
### 9. 全波長UV-VIS検出器及びグラディエント装置GE-2を合せて接続

更に、複数の周辺機器を同時に接続できるのはいうまでもない。装置は、溶離液供給は左側、溶離液出口は右側に配置されているので、グラディエント装置を左側、全波長 UV-VIS 検出器を右側に設置すれば、最少のデッドボリュームで、その性能を使用できるようになっている。この二つの、装置を接続し、脂肪族系のポリエステルオリゴマーを測定した結果を Fig. 10 に示す。カラム性能が、十分に生かされているのがわかる。

### 10. さ い ご に

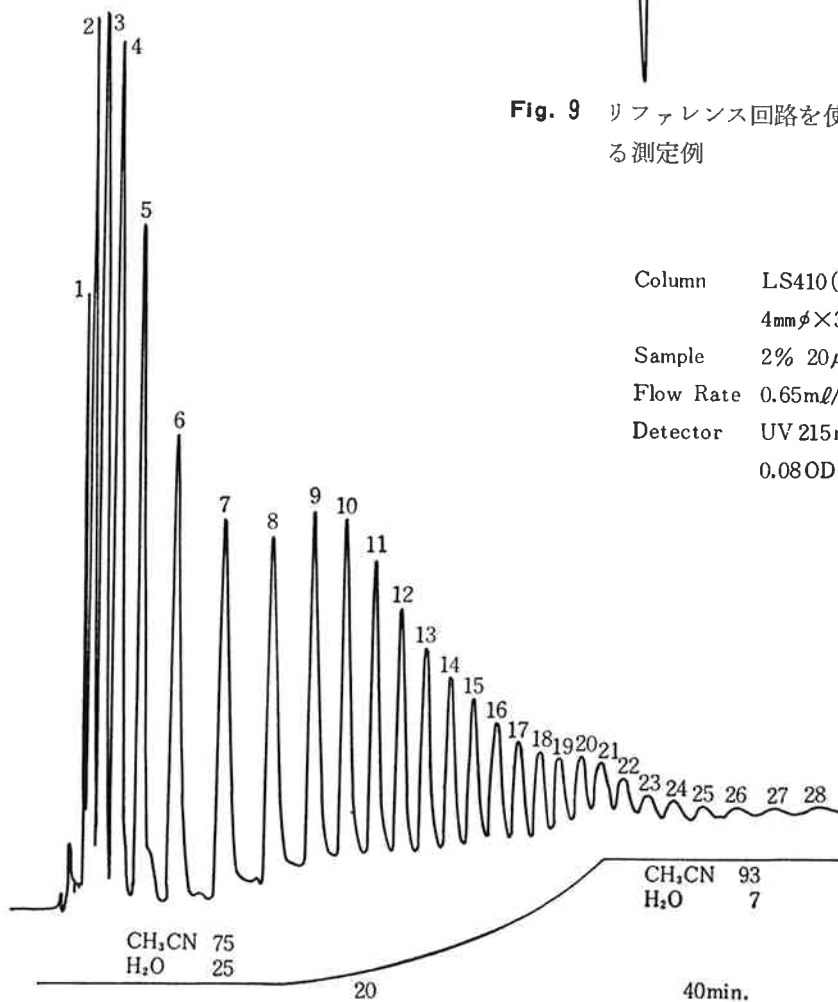
最近液体クロマトグラフィは更に発展の方向にあり、簡易型から高級機種、あるいは、高温型 GPC や分取クロマトグラフなど多くの機種が発表されてきました。今

回は機器の開発にあたり、使用面からの検討の一部を紹介し、製品紹介にかえさせていただきます。東洋曹達 HLC シリーズは、更に発表の予定ですが、使用する側からの要望と機器としての優秀さを合わせ持つ検討法を続け、更に高性能の液体クロマトグラフを開発していきたいと思ひます。



Column LS-170 10 $\mu$   
 Eluent CH<sub>3</sub>CN70/H<sub>2</sub>O30  
 Flow Rate 1.0ml/min  
 Detector RI  
 Sample シロップ

Fig. 9 リファレンス回路を使用し RI 検出器による測定例



Column LS410 (5 $\mu$ )  
 4mm $\phi$ ×30cm  
 Sample 2% 20 $\mu$ l  
 Flow Rate 0.65ml/min.  
 Detector UV 215nm  
 0.08OD

CH<sub>3</sub>CN 75  
 H<sub>2</sub>O 25

CH<sub>3</sub>CN 93  
 H<sub>2</sub>O 7

20

40min.

Fig. 10 ポリエステルオリゴマーの分離