

最近の高速液体クロマトグラフィー

海	野	益	郎
松	崎		充
北	村	隆	司
高	橋	裕	明
高	松		享
渡	辺	秀	夫
相	浦		惇

Recent Advance in High Performance Liquid Chromatography

Masuo UMINO
Mitsuru MATSUZAKI
Takashi KITAMURA
Hiroaki TAKAHASHI
Touru TAKAMATSU
Hideo WATANABE
Makoto AIURA

New approaches to the ultra-fast and high resolution chromatography are reviewed. Also described are recent advances in liquid chromatography instrumentation.

1. はじめに

高速体クロマトグラフィー (HPLC) は、対象化合物の広さ、自動化の容易さ、操作の容易さ、データ解析の容易さ、そして、実用的な感度と迅速性等により、主に定量手段として汎用されるに至っているが、HPLCを構成する各機能部品 (ポンプ、検出器、データ処理装置、試料前処理装置等) と HPLC 関連技術 (前処理技術、充てん剤製造技術、自動化のための技術、超高速化のための技術等) の発達により、さらに高感度化、高速化 (高分解能化) 及び簡便化が図られている。

ここでは、これらの技術の動向を中心として、最近の HLC® 製品と TSK-GEL® について述べる。

2. 最近の HPLC 用検出器の進歩

HPLCが幅広い分野で使用されるようになるに従っ

て、要求される検出器の種類、性能も多様化し、現在では多くの種類のかつ種々の性能を有する検出器が市販されている。また最近の開発動向も多様化し、現在市販されている検出法の高性能化はもとより、新しい検出法も次々と発表されているが、1) 簡易、小型化、2) セルのマイクロ化、3) 高感度化、4) より多くの情報が得られる検出法の開発などの報告が多く見受けられる。ここでは HPLC 用検出器として多く使用されている吸光検出法、蛍光検出器などを例に最近の検出法の進歩について述べる。

〔1〕 吸光検出法の進歩

吸光検出器は HPLC が開発して以来、最初の10年間で2万台は生産されており、HPLC用検出器の75%以上を占めていた¹⁾。吸光検出法では励起光源の波長を紫外

1) Liquid Chromatography Detector edited by Thomas M. Vickrey marcel dekker, inc. (1983)

光から可視光まで適当に選択することにより、多くの物質に適用できる。かつ溶媒自身の温度、圧力などによるベースラインの変動も、示差屈折計などに比較すると少なく、比較的簡易にかつ高感度に測定できるために、多くの種類の検出器が市販されている今日においても、最も多く使用されている。

HPLCの創始期においては低圧水銀灯を光源とする固定波長(254nm, 280nm)などの吸光検出器が使用されていたが、現在では紫外光領域から可視光まで自由に選択できるグレーティング分光方式の吸光検出器が使用されることが多い。特に多くは紫外光(UV)領域で使用するためUV検出器として使用されている。一般には紫外領域では光源として重水素放電管、可視領域ではタングステンランプが使われるが、最近では重水素放電管を光源として、ランプの交換なしに可視領域まで測定できる検出器も発表されている²⁾。

吸光検出法においては、セルの入射光量; I_0 、及び透過光量; I を測定し、ランベルトベアの法則に従って吸光度; A (単位; Absorbance Unit, AU)を測定している。

$$A = \log I_0/I = \epsilon c l \dots \dots \dots 1.1$$

ϵ ; 分子吸光係数 (l/mol·cm)

c ; 試料濃度 (mol/l)

l ; セル長 (cm)

当初の吸光検出器においては、この吸光度のノイズレベルは 10^{-3} ~ 10^{-4} AU オーダーであったが、最近では 5×10^{-6} AU 程度の検出器も市販されるようになった。

通常の吸光検出法ではこの吸光度が 10^{-4} AU 変化した場合、検出している信号; I の変化はわずか0.023%であり、 I_0 と I は極めて高い精度で測定する必要がある。最近この I を測定せず、吸光によって発生する熱を測定する吸光検出法が報告されている。セル内で発生した熱を測定する方法では、溶媒の吸光度が 10^{-4} である場合(水ではおおまかにこの程度)、 10^{-4} AUの吸光度変化で検出している信号は倍増する。従って“熱”を検出する吸光検出法では通常の吸光検出法に比較し、高感度化が容易であることが予想される。この“熱”を測定する吸光検出法は最近多く報告されているが、光音響検出法と熱レンズ吸光検出法に代表される。

光音響検出法は約100年前に電話の発明で有名なA.G. Bellらによって発明された光音響効果に基づいている³⁾。光音響効果は、光を吸光物質に断続的に照射した場合、容器内で熱パルスによる圧力変化が誘起され、音波が発生する現象である。この光音響検出法は沢田らに

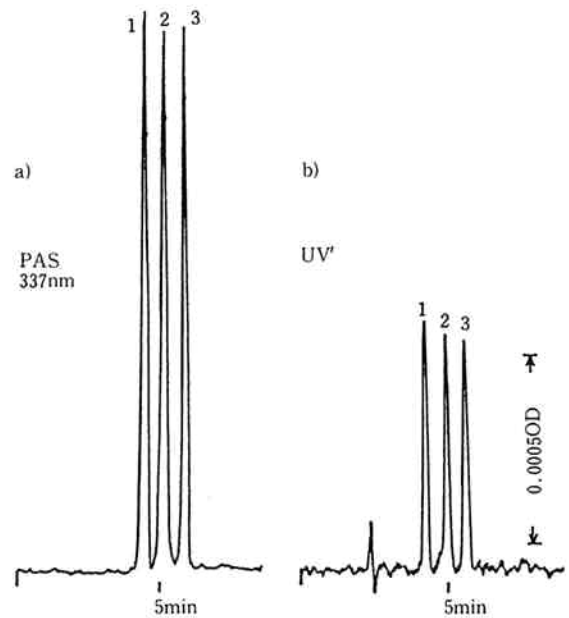


図1 光音響検出と吸光検出による色素類の測定

a) 光音響検出法 (PAS)

b) 吸光検出法 (UV) 337nm

測定条件: カラム: TSKgel ODS-120A

溶離液: メタノール

試料: 1. 2'-Cl-DAAB

2. 3'-Cl-DAAB

3. 4'-Cl-DAAB

DAAB: dimethyl amino azobenzene

よって持続光レーザー*1を光源として初めてHPLCに応用された。その後、窒素レーザーなどのパルスレーザーなどを光源とする検出器も報告され、種々のレーザーが応用可能であると考えられる。図1に窒素レーザー(337nm)を光源として3つの色素を測定した光音響検出法によるクロマトグラムと通常の吸光検出法による同波長でのクロマトグラムを示しているが、約50倍の感度、 5×10^{-7} AU程度のノイズレベルで測定できることが理解できる⁶⁾。

熱レンズ吸光検出法は1964年、ベル研究所のJ. P. Gordonらによって報告された⁷⁾熱レンズ効果に基づいている。入射光ビーム内で吸光によって熱が発生、その温度変化により通過ビーム付近の物質の屈折率変化を生じる。その結果、ビーム中心から屈折率勾配ができ見か

4) S. Oda, T. Sawada, Anal. Chem., 53, 471, (1981).

5) E. Voightman, J. D. Winefordmer J. Liq. Chromatogr., 5, 2113 (1982)

6) 未発表

*1; 連続的に発振しているレーザーで瞬間的に発振するパルスレーザーと区別される。

7) J. P. Gordon, R. C. C. Léite, R. S. Moore Bull. Am. Phys. Soc., [2] 9, 501 (1964)

2) 東洋達工業株式会社カタログ“UV8000”(1984)

3) A. G. Bell Am. J. Sci., 20, 305, (1880)

け上レンズが形成される。この熱レンズを測定する熱レンズ吸光検出法は Harris らにより初めて HPLC に応用された⁹⁾が、光音響同様 10^{-7} AU 程度の雑音レベルが報告されるようになった⁹⁾。

光音響検出法、熱レンズ吸光検出法とも通常光では信号が弱く、レーザーを用いて初めて高感度化が可能になる。従って今後レーザーの発展とともに実用化が行なわれると予想されるが、単に高感度だけでなく、レーザー焦点の微少さからセルのマイクロ化の点でも期待される。セルのマイクロ化は後述する UHPLC* 技術にとって重要な問題である。

[2] 蛍光検出法及びその他の検出法の進歩

蛍光検出法は吸光した物質がエネルギーを放出する過程において放射する光を測定する検出法である。一般に光吸収物質のエネルギー放出過程は熱と光の過程が競合しており、どちらかといえば熱で放出されることが多い。従って蛍光検出法は吸光検出法に比較し、対象物質は少ないが、本質的にバックグラウンド要因が少なく超高感度分析法に適しており、微量成分の測定に応用されることが多い。蛍光検出法においては、発光した微弱光成分を測定しているため、吸光検出法とは異なり光強度の大きいキセノンランプが紫外、可視領域共使用されることが多く、対象物質は少ないが、吸光検出法の 100 倍以上の感度を持つのが一般的である。

吸光検出器同様、最近の HPLC 用蛍光検出法にもレーザー光源を利用した超高感度化の試みが多く報告されている。レーザーを利用した HPLC 用蛍光検出法は 1977 年 Zare らにより初めて報告された¹⁰⁾がレーザーの光強度の強さだけでなく、焦点の微小さも利用している。その他レーザーは単色性、偏光性、パルス性などにも特徴を持ち、これらの特徴を利用した超高感度化の試みがつぎつぎと発表され、アトモル (10^{-18} モル) の測定も可能となってきている。

吸光検出器、蛍光検出器を中心に最近の進歩について述べたが万能検出器である示差屈折計の感度向上も著しく、電気化学検出器、電気伝導度検出器も高感度検出法として注目されている。光散乱検出器や多波長を同時に測定できるマルチチャンネル吸光検出器では単に濃度だけでなく分子量や定性機能を持つ検出器として注目されている。更に、高度の定性機能を持つ質量分析計、蛍光に並ぶ感度を持つ化学発光検出法の報告例も多くなってきた。このように HPLC 用検出器は急速に発展しており、送液、分離部分の進歩とも相俟って更にその応用範囲が広がるものと考えられる。

3. UHPLC へのアプローチと充てん剤の進歩

最近、充てん剤の微細化による分析時間の短縮 (超高速度化) 及び、マイクロボアカラムに代表されるカラムデザインの検討による分離能の向上 (超高分解能化) が図られている。一方、特に蛋白質用の充てん剤の開発並びに光学異性体分離用の充てん剤の開発も盛んである。

ここでは、超高速液体クロマトグラフィー (UHPLC) へのアプローチと蛋白質及び光学異性体用充てん剤について述べる。

[1] 超高分解能分離

分離すべき成分の数が 100 種を越える場合、理論段数が一万数千段程度のピークキャパシティー¹¹⁾¹²⁾の低い従来型のカラムでは、この様な成分の分離は困難となり、さらに理論段数の高いカラムが必要となる。

$$N = \frac{K_o}{\eta D_m} \cdot \frac{d_p^2}{h\nu} \cdot \Delta P \quad (1)$$

(1)式で示すように理論段数 (N) の大きさは、カラム充てん剤の粒径 (d_p)、圧力損失 (ΔP)、換算理論段高 (h) 換算流速 (ν)、溶離液の粘度 (η)、試料の拡散係数 (D_m) などに依存する¹³⁾。至適換算流速 ($\nu \approx 3$) 付近では、Knox¹³⁾の式より $h\nu \approx B^{**}$ と近似できる。すなわち、一定圧力損失下で最大の理論段数を得るには粒径の比較的大きな充てん剤を用いた長いカラムを用いて、至適換算流速付近でクロマトグラフィーを行えばよいことがわかる。しかし、従来型のカラム (内径約 4 mm, 長さ約 30 cm, 理論段数 15,000 程度) を何本か連結してもその長さに比例した理論段数が得られない事が知られている¹⁴⁾。これはカラム断面での温度分布の不均一性¹⁵⁾あるいはカラムの壁効果¹⁴⁾によって説明されているが、内径の小さなカラムを使用することによってこの問題は解決される。Scott¹⁶⁾等は粒径 $20\mu\text{m}$ の充てん剤を内径 1 mm, 長さ 1 m のカラムにしたマイクロボアカラムを数本連結して数十万段の理論段数を達成している。図 2 に

8) R. A. Leach, J. M. Harris, J. Chromatogr., 218, 15 (1981)

9) C. E. Buffett, M. D. Morris, Anal. Chem., 54, 1824 (1982)

* UHPLC: Ultra HPLC (超高速液体クロマトグラフィー)

10) G. J. Diebold, R. N. Zare, Science, 196, 1439 (1977)

11) J. C. Giddings, Anal. Chem., 39, 1027 (1967)

12) E. Grushka, Anal. Chem., 42, 1142 (1970)

13) J. H. Knox, J. Chromatogr., 15, 352 (1977)

**B は Knox のパラメータを示す。

14) P. Kucera, G. Manius J. Chromatogr., 216, 9 (1981)

15) H. Poppe, J. C. Kraak, J. Chromatogr., 282, 399 (1983)

16) R. P. W. Scott, P. Kucera, J. Chromatogr., 169, 51 (1979)

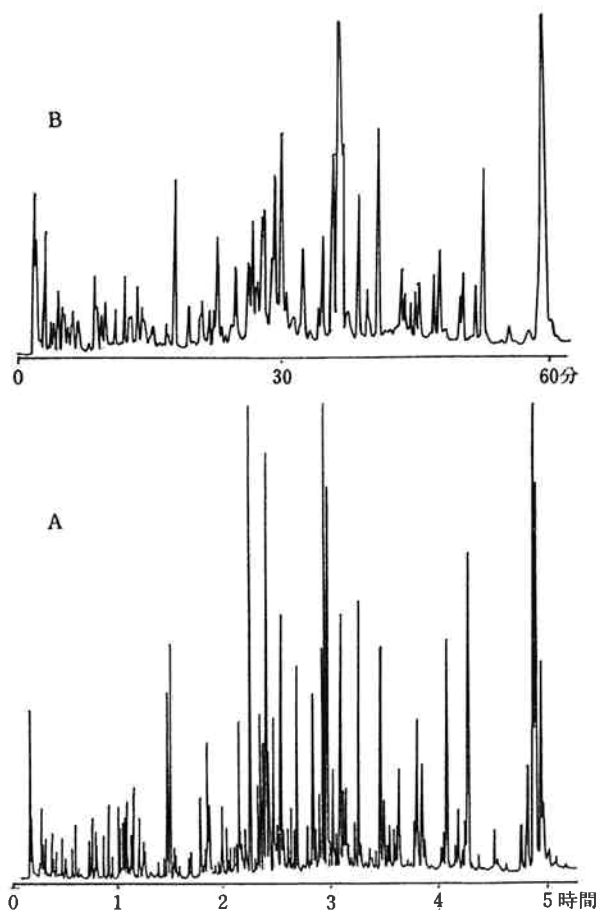


図2 CM- α -Chymotrypsinogen のトリプシン分解物の分離

- A. 5 μ m ODS (2mm i.d. \times 60cm) 0.15ml/min
 B. 6 μ m ODS (4.6mm i.d. \times 12cm) 0.8ml/min

分子量約26,000の蛋白質の酵素分解物を内径 2 mm, 長さ60cmのマイクロボアカラム (充填剤 TSKgel ODS-80T_M, 5 μ m) で分離した例を示す¹⁷⁾。120 成分以上のペプチドが分離しており従来のカラムと比較して分解能が圧倒的に優れている事がわかる。すなわち通常の測定条件である程度分析時間を犠牲にすれば超高分解能は達成可能であると思われる。マイクロボアカラムの他に中空キャピラリーカラム等を用いた方法も検討されているが、紙面の都合で割愛した。

〔2〕超高速分離

分離の迅速化を図るためには換算流速の大きいところでクロマトグラフィーを行なう必要がある。換算流速の大きい領域では, Knox の式より $C \approx h\nu$ と近似でき, 達成できる理論段数は(2)式で与えられる。 t_0 は素通りの

$$N = \frac{t_0 \cdot D_m}{C \cdot d_p^2} \quad (2)$$

時間, C は Knox のパラメータを示す。(2)式より超高速でしかも高い理論段数を達成するためには, 粒径の小

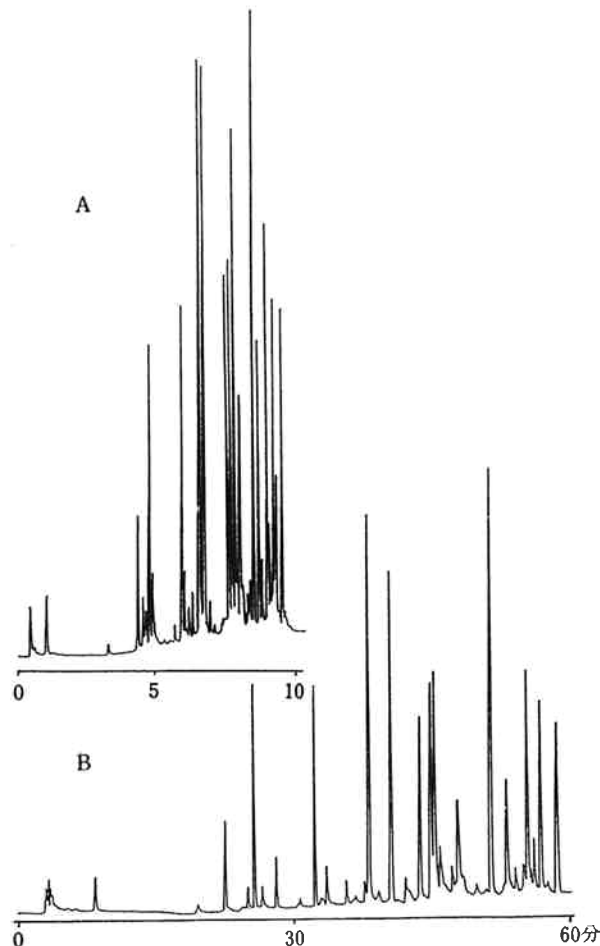


図3 CM-Lysozyme のトリプシン分解物の分離

- A. 3 μ m ODS (4mm I.d. \times 75cm), 1.5ml/min
 B. 6 μ m ODS (4.6mm I.d. \times 30cm), 0.8ml/min

さい充填剤を充填した短いカラムが必要となることが理解できる。この考えに基づいて Scott¹⁸⁾, Snyder¹⁹⁾等は, 数十秒で分離の完了する超高速液体クロマトグラフィーを報告している。図3は蛋白質の酵素分解物を高速分離用 ODS カラム (内径4.6mm, 長さ75mm, 3 μ m) と従来の ODS カラム (内径4.6mm, 長さ300mm, 6 μ m) を用いて分離し, その分離能と分離時間を比較した結果である。高速分離用カラムでは分離時間は通常のカラムの約1/6でしかも同等の分離が得られており, 分離の迅速化の点において従来のカラムより圧倒的に優れていることが理解できる。すなわち, 溶質の拡散速度が小さい物質の高速化は充填剤粒径の微細化により比較的容易に達成可能であることが理解できる。一方, 充て

- 17) 笹川立, 橋本勉 蛋白質・核酸・酵素 印刷中。
 18) E. Katz, R. P. W. Scott, J. Chromatogr., 253, 159 (1982)
 19) R. W. Stout, J. J. De Stetano, L. R. Snyder, ibid., 261, 189 (1983)

ん剤の粒径を一定とした場合に高速化を達成する方法として、溶質の拡散速度を大きくすることのできる超臨界流体クロマトグラフィーと液化流体クロマトグラフィーが検討されている²⁰⁾。高温・高圧化でのクロマトグラフィーであるために、汎用化されるためには種々解決すべき問題点が残されているが、その特徴から今後の発展が期待されているクロマトグラフィーである。

〔3〕 充てん剤の進歩

架橋デキストランゲルに代表される軟質ゲルに依存していたゲルろ過クロマトグラフィー (GFC) モードの高速化は、硬質ゲル^{21~24)} の登場により達成され実用化されるに至っている。すなわち、HPGFC (高速ゲルろ過クロマトグラフィー) モードが汎用され始め、工業的規模での分離精製技術としても脚光を浴びようとしている²⁵⁾。一方、蛋白質を分離するクロマトグラフィーモードには、GFC の他に、IEC (イオン交換クロマトグラフィー), HIC (疎水性相互作用クロマトグラフィー), そして RPC (逆相クロマトグラフィー) モードがあるが、最近これらの分離モード用の高速用充てん剤も相次いで開発上市された。IEC モード用充てん剤として、

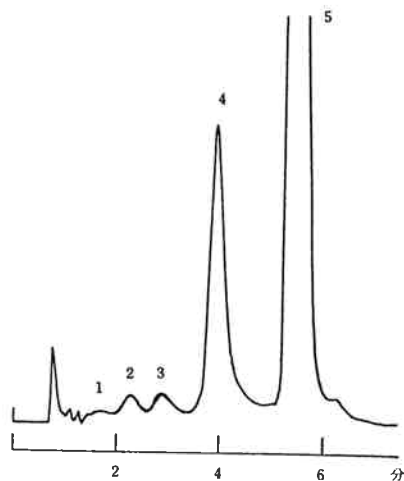


図4 グリコヘモグロビンの分離

試料：溶血液 (200倍希釈)
 1. Hb A_{1a}, 2. Hb A_{1b}, 3. Hb F, 4. Hb A_{1c}, 5. Hb A_o
 カラム：TSKgel Glyco (4mm i.d.×15cm)
 溶離液：市販グリコヘモグロビン用溶離液
 流速：1.0ml/min, 温度：23°C, 検出：415nm
 装置：HLC-723 GHb (Glycopak)

まず HPGFC 用充てん剤 SW グレードを担体とした

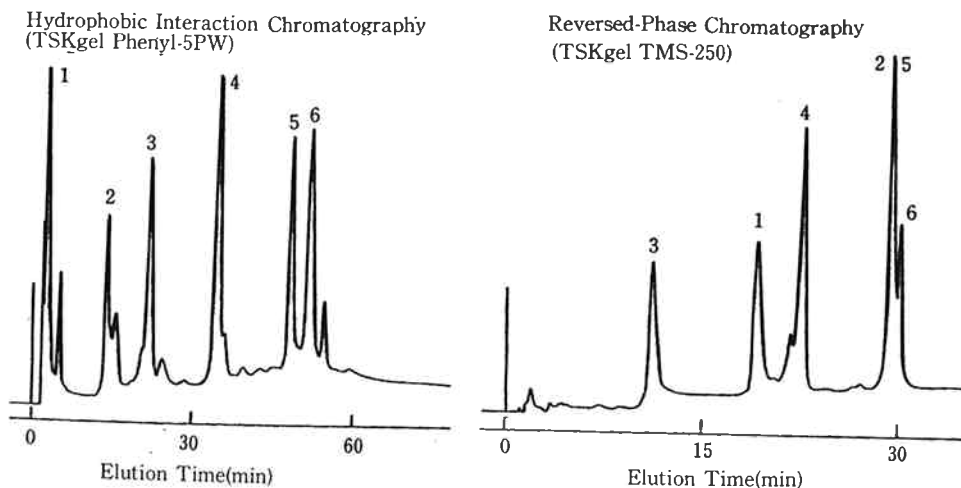


図5 HIC と RPC との比較

試料：1. チトクロムC, 2. ミオグロビン, 3. リボヌクレアーゼ, 4. ソゾチーム, 5. α-キモトリプシノーゲン, 6. α-キモトリプシン

溶離条件：A 1.7M (NH₄)₂ SO₄/0.1M PB(pH7.0) $\xrightarrow{\text{リニアグラジエント 60分}}$ 0.1M PB(pH7.0) 流速 1ml/min
 B 0.05%TFA/10%CH₃CN 水溶液 $\xrightarrow{\text{リニアグラジエント 40分}}$ 0.05%TFA/50%CH₃CN 水溶液, 流速 1ml/min

20) 竹内豊英, 石井大道 化学の領域増刊 183号, 59 (1983)

21) K. Fukano, K. Komiya, H. Sasaki, T. Hashimoto., J. Chromatogr., 166, 47 (1978)

22) S. Rokushika, T. Ohkawa, H. Hatano, J. Chromatogr., 176, 456 (1979)

23) T. Hasihmoto, H. Sasaki, M. Aiura, Y. Kato, J. Poly. Sci. Poly. Phys. Ed., 16, 1789 (1978)

24) Y. Kato, H. Sasaki, M. Aiura, T. Hashimoto, J. Chromatogr., 153, 546 (1978)

25) H. Sasaki, K. Sakamot, K. Matsubar, T. Matsuda, Y. Kato, 同誌, 同号(1985)

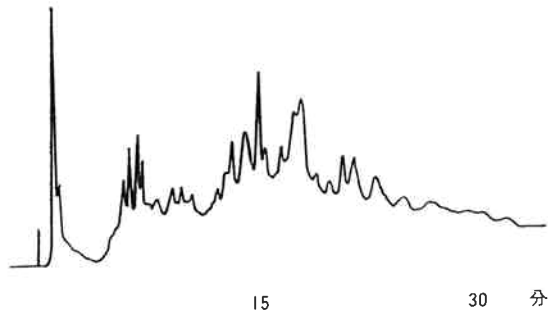


図 6 RPC による蛋白質の分離

試料: Yeast Enzyme Concentrate (50 μ g)
カラム: TSKgel Phenyl-5PW RP(4.6mm i.d. \times 7.5cm)

溶離条件: 0.05%TFA/5%CH₃CN 水溶液 リニア
グラジエント 0.05%FA/20%CH₃CN水溶液 リニア

2分
グラジエント 0.05%TFA/60%CH₃CN 水溶液
32分
流速: 1ml/min 検出: UV 220nm 温度24°C

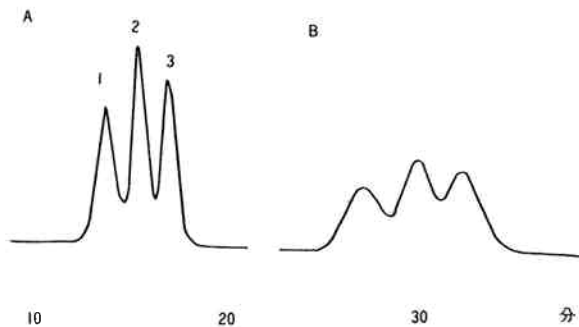


図 7 PWXL と PW の比較

試料: ポリエチレンオキシド (0.4mg/ml)

1. SE 150, 2. SE 30, 3. SE 8

カラム: A G 6000 PW \times L + G 3000 PW \times L
(7.8mm i.d. \times 30cm \times 2)

B G 6000 PW + G 3000 PW
(7.5mm i.d. \times 60cm \times 2)

溶離液: 0.1M NaCl, 流速: 1.0ml/min, 温度50°C
装置: HLC-802 A

シリカ系充てん剤が実用化されている²⁶⁾²⁷⁾²⁸⁾。しかし、シリカ系であるために特に pH8 以上においてその使用が制限される面があり、化学的に安定でかつ親水性の高い硬質の IEC 用充てん剤の開発が待たれていた。加藤らは、SW グレードと同じように HPGFC モードで汎用されている PW グレードの中で、高分子量化合物の分離に適した細孔径を有する G5000PW に DEAE (ジエチルアミノエチル) 基²⁹⁾及び SP (スルホプロピル) 基³⁰⁾を導入した蛋白質用の HPIEC 用充てん剤を開発した。その結果蛋白質のみならず DNA の高速高分離

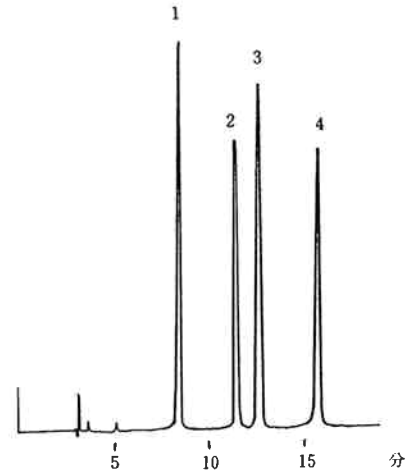


図 8 アミノ酸誘導体の分離

試料: 1. d-DNB-Val(OMe), 2. β -DNB-Val(OMe)
3. d-DNB-Phe(OMe), 4. β -DNB-Phe(OMe)

カラム: 光学異性体用カラム A (4.6mm i.d. \times 25cm)

溶離液: エタノール/ジクロロメタン/n-ヘキサン =
3/12/40

流速: 1ml/min, 温度: 25°C, 検出: 254nm

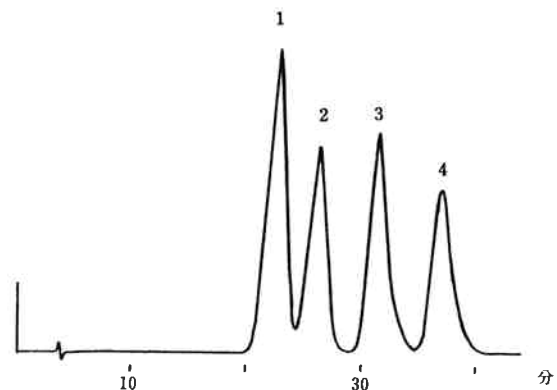


図 9 アミノ酸の分離

試料: 1. d-Asp, 2. d-Thr, 3. β -Asp, 4. β -Thr

カラム: 光学異性体用カラム B (4.6mm
i.d. \times 25cm)

溶離液: 0.25mM, 硫酸銅水溶液

流速: 1ml/min, 温度: 25°C, 検出: 254nm

が可能となった³¹⁾。図 4 に糖尿病の診断に有用とされて

26) 海野益郎, 小宮克夫, 渡辺秀夫 分析化学 29 (10), 670 (1980)

27) K. Komiya, Y. Kato, K. Furukawa, H. Sasaki, H. Watanabe 同誌 25(2), 115 (1981)

28) Y. Kato, K. Komiya, T. Hashimoto, J. Chromatogr., 246, 13 (1982)

29) Y. Kato, K. Nakamura, T. Hashimoto J. Chromatogr., 266, 385 (1983)

30) Y. Kato, K. Nakamura, T. Hashimoto, *ibid.*, 294, 207 (1983)

31) Y. Kato, K. Nakamura, T. Hashimoto, *ibid.*, 265, 342 (1983)

いるグリコヘモグロビンの分離例を示す。分子量の比較的高いヘモグロビン類の単時間での高分離が可能となり臨床面で汎用されるに至っている。HIC は蛋白質が変性しない状態での疎水性に基づいて蛋白質を分離するモードであり、RPC は変性した蛋白質の疎水性で分離するモードである。同じく G 5000 PW にフェニル基を約 0.1mmol/ml 化学結合した充てん剤が前者に、それよりも多量にフェニル基を導入した充てん剤³³⁾が後者に適していることが明らかになった。図 5 に HPHIC 用充てん剤である TSKgel Phenyl-5PW とシリカ系 HPRPC 用充てん剤である TSKgel TMS-250 の比較例を示す。試料として用いた各蛋白質の溶出挙動から HIC と RPC の分離機構が異なることが理解できる。図 6 に最も新しい HPRPC 用充てん剤 TSKgel Phenyl-5PW RP³³⁾ の応用例を示す。蛋白質の HPRPC 用として汎用されている化学結合型シリカゲルの化学的安定性と特異的吸着性を改良した充てん剤として将来汎用されると思われる。これらと平行して PW グレードの微粒化が図られていたが、時期を同じくして PW の XL グレードが上市された。図 7 に従来品と XL グレードとの比較例を示すように GFC モードにおいて尚一層の高速化が達成されている。従って、XL グレードを担体とすることにより、IEC, HIC, RPC モードにおいても高速化が図られることが容易に推定できると思われる。

生理活性の異なる光学異性体の分離は、分析レベルと同様に精製レベルにおいても重要な問題である。図 8, 図 9 に上市予定の光学異性体用充てん剤でのアミノ酸誘導体及びアミノ酸の光学異性体の分離例を示す。1 種類のカラムですべての光学異性体を分離することは困難と思われるが、普遍性の高い光学異性体用充てん剤の開発は今後さらに重要となるとと思われる。

4. HPLC 用送液ポンプの進歩

この 2 年間の公開公報をまとめてみると、ポンプの送液原理に関する特許申請は少く、制御方式に関するものが多い。すなわち、依然として重力をエネルギー源としたチェック弁を用いるプランジャー方式の送液ポンプが主流であって、この方式の最大の欠点である脈動の改善のための種々の試みがなされているのが現状である。すなわち、コストの面からみると重力を利用するチェック弁方式が安価であり、高圧での再現性においてはプランジャー方式が優れていると思われる。従って、当分の間はこの方式が主流を占めるとと思われる。

現在市販されている HPLC 用のポンプのプランジャーの動作は、レシプロケイティング (RP) 動作とクイックリターン (QR) 動作に分類できる。この動作を単

独で行って送液するのがシングルプランジャーポンプであり、同期をとって送液するのがダブルまたはマルチプランジャーポンプである。それぞれ一長一短があり、目的に応じて選択することの方が重要である。

前述した超高感度、超高速、超高分解能を実現し、さらに高精度、簡便性、自動化を図るためにも送液部は重要な役割を担っている。超高感度を達成するためには脈流に対する配慮が必要であると同様に超高速には高圧下での再現性が、超高分解能には低流速での再現性が重要である。以上の要求を満たし、さらに拡張性を考慮した(汎用性が高い)、かつコスト及びスペースパフォーマンスを達成した送液ポンプが望ましいことは言うまでもないが、これらの要求をある程度満足したと思われるポンプが上市された。1プランジャー/1モータ/1マイクロコンピュータを基本単位としたポンプで、2単位を内蔵した、そして4単位までを独立あるいは同期させて制御可能なコントローラ付きのポンプである³⁴⁾。従って、QR モード、RP モード、あるいはテトラモードの

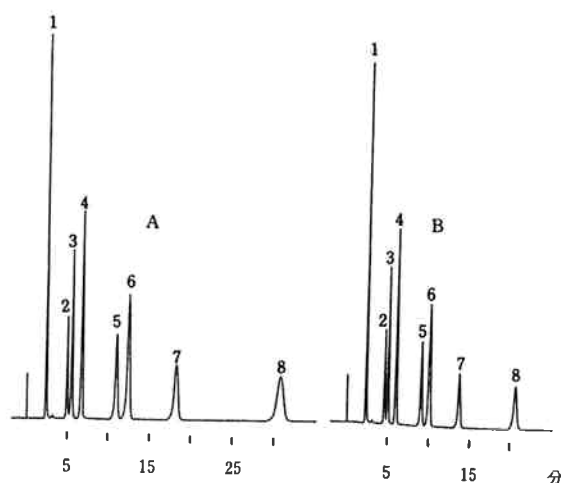


図10 流量グラジエントの応用例(1)

試料: 1. シトミン, 2. ヒポキサンチン, 3. ウリジン, 4. チミン, 5. イノシン, 6. グアノミン, 7. チミジン, 8. アデノシン

カラム: TSKgel ODS-80T_M (4.6mm i.d.×15cm)

溶離液: 2%CH₃CN/0.1M NaH₂PO₄

検出: UV 260nm, 装置: CCPM & UV-8000

流速: A ; 1.0ml/min

B ; 1.0ml/min $\xrightarrow{20分}$ 2.0ml/min

圧力: A ; 100kg/cm²,

B ; 100kg/cm² \rightarrow 200kg/cm²

32) Y. Kato, T. Kitamura, T. Hashimoto, J. Chromatogr., 292, 418 (1984)

33) in preparation

34) 東洋曹達工業(株)リーフレット "CCPM"

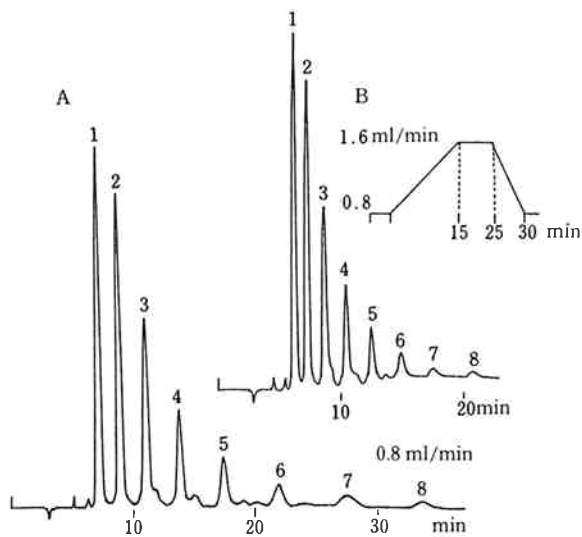


図11 流量グラジエントの応用例(2)

試料：シロップ

カラム：TSKgel NH₂-60 (4.6mm i.d.×25cm)

溶離液：CH₃CN/H₂O=55/45

検出：屈折率 1.6×10⁻⁶RIUFS, 装置：CCPM & RI-8000

流速：A ; 0.8ml/min

B ; 0.8ml/min $\xrightarrow{2.5分}$ 0.8ml/min $\xrightarrow{12.5分}$

1.6ml/min $\xrightarrow{10分}$ 1.6ml/min $\xrightarrow{5分}$

0.8ml/min

送液が可能であり、結果として流量グラジエントあるいは吐出グラジエントも可能である。図10に新製品 TSK gel ODS-80T_M を用いた時、図11に示差屈折計を用いた時の流量グラジエントの応用例を示す。図12*は流速 50μl/min において溶離液組成を連続的に変化するリアグラジエント溶出法を適応した時の再現性の評価結果（データ処理装置のアウトプット）である。コンピューターでコントロールするポンプの特徴は、拡張性、再現性だけでなく脈流の低減化、流量精密さの向上にも認められており³⁵⁾、コンピュータ関連技術の進歩及び新材料の開発等により送液ポンプの性能、価格、そして拡張性はさらに改善されていくと思われる。

5. データ処理技術の進歩

クロマトグラフィー分野のデータ処理として古くより、クロマトグラムの面積/高さにより定量計算を行なう LC 処理と、分子量の決定やパターン分析を行なう GPC 処理がある。これらの処理を行なうデータ処理装置は、近年のマイクロコンピュータの大幅な性能向上や高密度 LSI メモリの出現、プリンタプロッタ、フロッピディスク、CRT ディスプレイなど周辺機器のインタフェースの容易性など、コンピューター技術の進歩と

コスト低減などを背景に飛躍的な進歩を遂げている。特にレコーダの機能であるクロマトグラムの記録と計算結果の打ち出しが、一枚のレポートとして得られるようになり飛躍的に普及した。一方、従来の方法に対し、レーザー光を用いた光散乱光度計、UV 多波長検出器、ラジオアイソトープ検出器など新しい検出器の開発や、小型高速分離カラムの採用など分析技術の進歩と応用技術の急速な拡大は、さらに高度な処理機能をデータ処理装置に要求することとなっている。また同時に、使用者の立場からは、測定の実施から結果の記録、解析、考察、レポートの作成、発表までを短期間に行なう必要性が、ますます高まっており、必要な時に必要な測定と、結果の図式化、視覚化を行ない、必要な書式でレポートを行なうデータ処理装置が望まれていると思われる。

このような時代の要求に適合するデータ処理機能として、○クロマトグラムの波形記憶と外部記憶装置へのフェイリング機能、○再計算機能の充実と計算結果及び生データの比較機能、○結果の図式化（視覚化）○多彩なレポート機能、○ハードウェア（通信）、ソフトウェア（BASIC 言語）等のフレキシビリティの付与などが考えられるが、ここでは上記機能を備えた比較的新しい光散乱光度計のデータ処理法の一例を紹介する。

レーザーを用いた低角度光散乱光度計 (LALLS**) は、HPLC の一つのモードである SEC (Size Exclusion Chromatography) との組み合わせにより、特に高分子化合物の絶対分子量が把握できること、分岐高分子の分岐度、あるいは共重合体の組成比の解析に有用である^{36~40)}ことから、そのためのデータ処理は、パラメータ設定部、データ収集部、解析部、レポート部から構成されている。

〔1〕パラメータの設定部

パラメータの設定は、ディスプレイとキーボードとの

35) 大阪工研協会 第9回新しい分析技術講演会要旨 (1985)

* ここで用いたカラム、オートサンプラー、検出器のセルは特製のものである。

* LALLS : Low Angle Laser Light Scattering

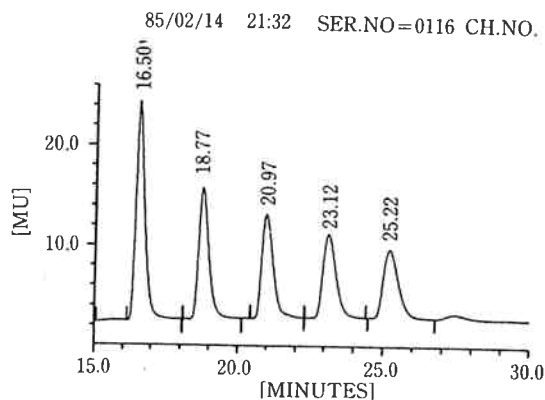
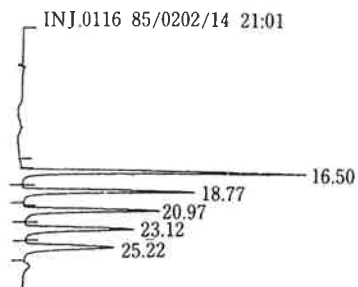
36) A. C. Ouano, W. Kaye, J. Polymer, Sci., Poly Chem. Ed., 12, 1151 (1974)

37) 福田三寿, 福富誠, 馬場信行, 加藤芳男, 有近健二, 相浦惇, 橋本勉, 同誌, 23, 111(1979)

38) T. Kato, A. Kanda, A. Takahahi, I. Noda, S. Maki M. Nagasawa, Polymer J., 11, 575 (1979)

39) K. Kameyama, T. Nakae, T. Takagi, Biochim. Biophys. Acta, 706, 19 (1982)

40) 大沼宏, 小高忠男, 分子量及び分子量分布委員会予稿集 (1980)



85/02/14 21:33 JOB FILE 4 50 ul/min D.GRAIDENT
 SAMPLE No. 0 NAME: BENZOATE ESTER SERIAL No.0116
 CHANNEL No. 1 METHOD: EXTERNAL STANDARD STANDARD SAMPLE
 No. 1 SAMPLE 10 OF 10

NO.	MK	NAME	TIME	IDT	AREA	HEIGHT	WIDTH	A-%	CONC-1	CONC-2	DG
1B		P-OH-Ety	16.50		4.80644E+02	21.8	19.6	30.15	1.000	1.000	
2B		Mety-B	18.77		3.21328E+02	13.2	22.4	20.15	1.000	1.000	
3B		Ethyl-B	20.97		2.87946E+02	10.4	25.4	18.06	1.000	1.000	
4B		Propyl-B	23.12		2.58891E+02	8.4	28.8	16.24	1.000	1.000	
5B		Butyl-B	25.22		2.45507E+02	6.8	33.6	15.40	1.000	1.000	
TOTAL									100.00	5.000	5.000

STATISTICS REPORT

NO. 1 STANDARD SAMPLE METHOD: EXTERNAL STANDARD IDT-FILE 4
 NO. OF INJECTIONS: 10

NO.	NAME	TIME	AREA	HEIGHT	WIDTH	
1	P-OH-Ety	16.52	4.75251E+02	21.6	19.6	AUARAGE
		0.07	6.60807E+00	0.32	0.21	STD.DIU
		0.44	1.39	1.50	1.09	%STD.DIU
2	Metyl-B	18.88	3.22999E+02	13.2	22.4	AUARAGU
		0.08	4.66219E+00	0.22	0.24	STD.DIU
		0.44	1.44	1.67	1.09	%STD.DIU
3	Ethyl-B	21.01	2.93830E+02	10.4	25.6	AUARAGE
		0.07	5.80648E+00	0.14	0.26	STD.DIU
		0.33	1.98	1.38	1.03	%STD.DIU
4	Propyl-B	23.19	2.60968E+02	8.2	29.6	AUARAGE
		0.06	4.60298E+00	0.11	0.52	STD.DIU
		0.25	1.76	1.32	1.76	%STD.DIU
5	Butyl-B	25.31	2.44414E+02	6.8	33.8	AUARAGE
		0.06	3.16447E+00	0.11	0.57	STD.DIU
		0.25	1.29	1.65	1.68	%STD.DIU

図12 低流速での再現性

- 試料: 1. p-ヒドロキシ安息香酸エチルエステル
 2. 安息香酸メチルエステル
 3. 安息香酸エチルエステル
 4. 安息香酸プロピルエステル
 5. 安息香酸ブチルエステル

カラム: TSKgel ODS-80T_M
 (1mm i.d. × 25cm)

溶離液: A ; CH₃CN/H₂O = 20/80

B ; CH₃CN/H₂O = 80/20

A $\xrightarrow{20分}$ B $\xrightarrow{5分}$

B $\xrightarrow{5分}$ A

検出: UV 254nm. 0.16

セル容量: 1 μ l

注入量: 0.5 μ l

送液モード: QRモード

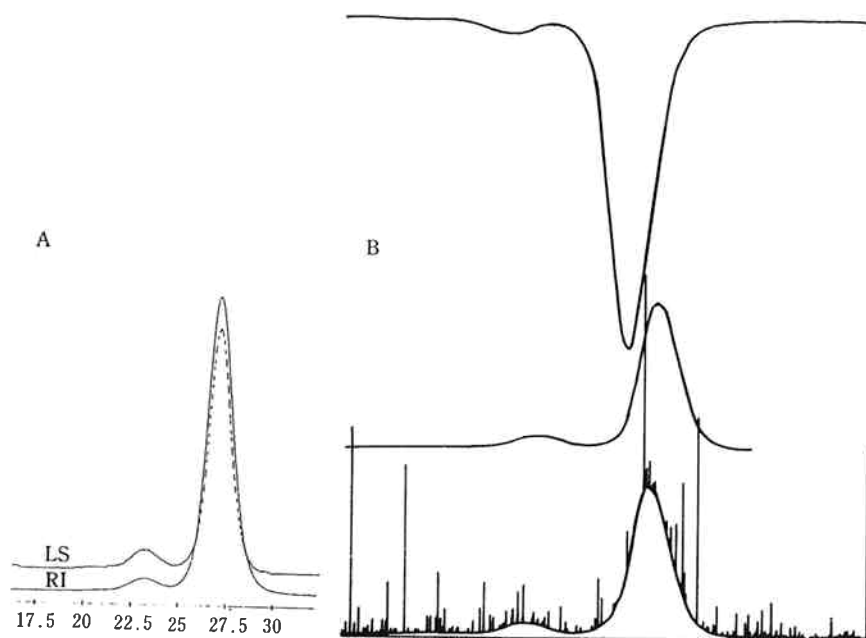


図13 フィルタリング処理結果

A: データ処理結果 (フィルタリング処理後)

B: 生データ (フィルタリング処理と処理後)

測定条件

試料: トランスフェリン, カラム: G 3000 SW (7.5mm i.d.×60cm)

溶離液: 0.2M リン酸緩衝液 (pH 6.9)

装置: <CCPD+LS-8000+RI-8000>+<IF-8000+PP-8000+CP-8090>

会話形式で行なわれるが, 新しい手法として絶対的に必要なパラメータとオプション指定によるパラメータは, 優先度に応じ段階的なカラー表示で行なわれ, 操作性の改善が図られている。

〔2〕 データ収集部

LALLS により得られる信号は, 分子量と濃度の積に比例した信号であり, また RI* の信号は, 濃度に比例していることより, 両検出器の同時測定から絶対分子量の計算が可能となる。ところが, LALLS からの信号の中に他の検出器では問題とならない溶離液及び試料中のゴミに起因するスパイク信号が混在することがあるために, スパイク信号のみを完全に除去する必要がある。従って LALLS 信号の高速サンプリングによるデジタルフィルタリング機能が必要である。図13に LALLS/RI の生データとフィルタリング処理結果を示すように正確なデータ収集が可能となっている。

〔3〕 データ解析部

LALLS の計算機能として 1) 絶対分子量の決定, 2) 分岐高分子の分岐度の定量, 3) 単分散高分子 (蛋白質, 核酸等) 混合試料中の成分 (ピーク) 毎の分子量の

決定がある。1), 2)の解析にあたり絶対分子量を正確に求める必要があるが, このために分子量と溶出容量との関係について次式を用いた関数近似を行なっている。

$$\log M = a_0 + a_1 V + a_2 V^2 + a_3 V^3 + \frac{a^4}{(V - V_0)^2}$$

ここで, M は分子量を, V は溶出容量, V_0 は排除限界溶出容量を示す。分岐高分子の分岐度解析にはユニバーサル検量線 ($[\eta] \cdot M$ と溶出容量の関係) と目的とする試料の線状高分子に関する粘度式 ($[\eta] = KM^a$) との関係が用いられている。分岐度の解析法は倉田等の総説⁴²⁾に詳しい。

〔4〕 レポート部

レポート機能としては, クロマトグラム, 溶出曲線, 微積分分子量分布, 分岐度曲線, 固有粘度比曲線などの CRT ディスプレイ及びプリンタプロッタへのグラフ出力と絶対分子量及び分子量分布データの打出しがある。

* RI: Refractive Index

41) 高松享, 第33回高分子討論会予稿集 33巻 (10), 2855 (1984)

42) 倉田道夫, 非線状高分子の溶液論共重合体の合成と物性 (化学同人), 7 (1967)