報 文

マイクロカラム液体クロマトグラフィーにおけるガス圧を利用する 階段状勾配溶離のための送液システムの開発

竹内 豊英^{®*}, Lee Wah LIM^{*}

Gas-pressure-driven stepwise-gradient elution system for microcolumn liquid chromatography

Toyohide TAKEUCHI and Lee Wah LIM^{*}

^{*}Department of Chemistry, Faculty of Engineering, Gifu University, 1-1, Yanagido, Gifu 501-1193

(Received 11 July 2001, Accepted 14 September 2001)

Stepwise-gradient elution was carried out with a gas-pressure-driven flow system. The system was assembled from a gas cylinder, a 6-way selection valve, an injection valve (or a sample-enrichment system), a separation column, a UV detector and a syringe pump. Eluents with different compositions were supplied by pressure applied from an argon gas cylinder; switching the 6-way selection valve changed the eluent composition. The syringe pump located downstream of the detector regulated the flow rate of the eluent. The relative standard deviation of the retention time was 0.4-0.6% for isocratic elution as well as for two-step gradient elution. The system was applied to the separation of phthalates and alkylbenzenes.

Keywords : gas-pressure-driven flow; stepwise-gradient elution; postcolumn-controlled flow system; microcolumn liquid chromatography.

1 緒 言

溶媒勾配溶離は、広範囲にわたる試料成分を1回の操作で効率良く分離するために液体クロマトグラフィー(LC)で広く用いられてきている手法であり、分析時間の短縮、分離度の改善及び溶出時間の遅い成分の検出感度の改善に特に有効である。勾配溶離はマイクロカラムLCでも有効であるが、市販の勾配システムは、まだほとんど普及していない。マイクロカラムLCが登場した段階から現在に至るまで、多くの場合、コンベンショナルLCシステムから供給される移動相の一部を導入するスプリット方式によって、低流量下での勾配溶離を達成してきた¹⁾。

マイクロカラムLCにおいて、二つの六方切り替えバルブを用いる簡易的な階段状勾配溶離システムが提案されている²⁾。それによると、組成の異なる溶液がループに満たされ、1台のポンプを使用してループ内の溶液を圧送す

ることによって、勾配溶離が達成されている。この方法では、バルブ切り替え時に流量が減少し、流量の正確さと再現性に問題がある。定圧モードでポンプを使用することができれば、この問題は避けられるが、移動相のカラム透過性の経時変化や、移動相組成の変化に基づく粘性の変化が、流量の変化につながる事が考えられる。

3台のポンプを使用した階段状勾配溶離も報告されている³⁾。この場合、2台のポンプが分離カラムの上流側にセットされ、1台のポンプが検出器下流側にセットされる。分離カラム上流側2台のポンプのうち1台は、定圧モードで作動し、残りの1台は定流量モードで作動する。これらの2台のポンプには組成の異なる溶液が満たされている。検出器下流側のポンプは吸引方向に作動し、分離カラムを通過する移動相の流量を制御する。すなわち、分離カラム上流側ポンプ2台の流量の合計が、検出器下流側のポンプの流量と一致する。ここで、定流量ポンプの流量を時間的に変えることによって、組成の異なる移動相が供給されることになる。このシステムでは、移動相組成切り

^{*} 岐阜大学工学部: 501-1193 岐阜県岐阜市柳戸 1-1

Fig. 1 Diagram of gas-pressure-driven postcolumn-controlled flow system (A) and sample enrichment system (B)

1: gas cylinder; 2: 6-way selection valve; 3: injection valve; 4: separation column; 5: UV detector; 6: syringe pump; 7: enrichment column; 8: 6-way switching valve; 9: sample solution

替え時の流量減少はないが、3台のポンプを使用する点がコスト的に問題である。

最近では、電気浸透流を利用したサブ $\mu\text{l}/\text{min}$ の流量下での勾配溶離システムが開発され、ナノ LC 及びキャピラリー電気クロマトグラフィーにおいて利用されている^{4)~11)}。しかし、これらの勾配システムでは5~10 $\mu\text{l}/\text{min}$ の流量を達成することはできない。

本研究では、1~10 $\mu\text{l}/\text{min}$ の流量範囲で簡便に達成できる、勾配溶離システムの開発を目標とした。

2 実 験

2.1 装 置

開発したガス圧送液ポストカラム制御フローシステムは、アルゴンガスボンベ、Upchurch Scientific 製 M-445 型六方マイクロ選択バルブ、インジェクター、分離カラム (内径 0.32 mm × 長さ 50 又は 100 mm)、日本分光製 UV-1575 UV 検出器及び検出器下流側にセットしたシリンジ型ポンプからなる。シリンジ型ポンプには東電機工業製 MF-2 型を用い、イトー製 MS-GAN050 型ガスタイトシリンジ (0.5 ml) を装着した。試料の注入には、日本分光製 ML-522 型マイクロバルブインジェクター (0.2 μl) 又は Upchurch Scientific 製 M-435 型マイクロインジェクショ

ンバルブを用いた。後者はプレカラム濃縮に用いた。濃縮カラムは、内径 0.25 mm のポリテトラフルオロエチレン (PTFE) 管より作製し、充填長さは 10 mm とした。アルゴンガスの二次圧の調整には Tescon 製 26-1014-24 型圧力ゲージを使用した。データは、日本フィルコン製 CAC データ処理装置を使用した。

Fig. 1 に流路系及び試料導入系を示した。六方選択バルブ及び六方切り替えバルブに装着する連結管には、内径 50 又は 75 μm × 外径 375 μm の溶融シリカキャピラリーを用いた。六方選択バルブのそれぞれのポートに、内容積 0.2 又は 0.8 ml の PTFE 管からなるループを取り付け、2 個の四方ジョイント及び 1 個の T ジョイントでこれらのループを連結し、アルゴンガスボンベからの圧力が、6 個のループに同時にかけられるようにした。六方選択バルブを切り替えることによって、このうちの一つのループ内の移動相を分離カラムに圧送できる流路系となっている。

マイクロカラムは、内径 320 μm の溶融シリカ管から既報¹²⁾に従って充填したものを使用した。本研究で使用した固定相は、化学物質評価研究機構製 L-column ODS (5 μm 粒子径) 及び野村化学製 Develosil LOP ODS (30 μm 粒子径) で、前者は分離カラムの固定相として、また後者は濃縮プレカラムの固定相として用いた。

2.2 試 薬

アセトニトリル及び蒸留水はナカライテスク製の HPLC 用のものを使用した。他の試薬は、試薬特級のものを使用した。ベンゼン、トルエン、アルキルベンゼン及びフタル酸エステルは、ナカライテスク又は東京化成製のものを使用した。多環芳香族炭化水素類は、ナカライテスクより入手した。これらの試薬は、特に処理は施さずそのまま用いた。

3 結果及び考察

3.1 単一溶媒溶離における再現性

多環芳香族炭化水素を試料成分として、単一溶媒溶離モードにおける試料成分の保持時間及びシグナルの再現性を評価した。Fig. 1 においてマイクロバルブインジェクターを用い、六方選択バルブは切り替えることなく、連続 6 回同一条件で測定をした。移動相として 70% アセトニトリル水溶液を用い、0.8 ml の内容積を有するループを使用した。入り口圧力は、20 kgf/cm^2 とし、検出器下流側に設置されたシリンジポンプの流量は 4.2 $\mu\text{l}/\text{min}$ とした。

結果を Table 1 に示した。保持時間の再現性は、相対標準偏差 (RSD) として 0.4% 程度となった。ピーク面積及びピーク高さの再現性は、良いもので 0.6% 程度、悪いもので 4% 程度であった。Table 1 の条件下では、圧力損失は約 15 kgf/cm^2 であった。すなわち、シリンジポンプ

Table 1 Repeatability of retention time and signals for six successive measurements

Analyte	Retention time		Peak area		Peak height	
	Mean/min	RSD, %	Mean/mV s	RSD, %	Mean/mV	RSD, %
Naphthalene	4.68	0.46	780	4.1	48.9	2.2
Fluorene	6.67	0.43	155	1.4	80.4	1.4
Phenanthrene	7.64	0.44	129	0.64	63.0	0.87
Anthracene	8.28	0.41	176	2.9	75.9	3.0

Inlet pressure: 20 kgf/cm²; Flow rate: 4.2 µl/min; Injection volume: 0.2 µl; Wavelength of UV detection: 254 nm

にかかる圧力は、約 5 kgf/cm² である。

3.2 入り口圧力の影響

試料成分の保持時間は、原理的には入り口圧力に無関係に一定となるはずである。入り口圧力を 20～30 kgf/cm² と変化させたときの、試料成分の保持時間並びに検出器のノイズ測定したところ、検討した範囲では、入り口圧力の影響をほとんど受けないことが分かった。分離カラムの圧力損失が約 15 kgf/cm² であるので、検出器フローセルにかかる圧力は 5～15 kgf/cm² と変化していることが考えられる。また、ピーク面積やピーク高さも入り口圧力に依存しないことが分かった。更に、定流量ポンプを使用して測定した各試料成分の保持時間と、本法によって得られた保持時間がほぼ一致することが分かった。

3.3 階段状勾配溶離における再現性

Fig. 1 のシステムを用い、階段状勾配溶離における試料成分の保持時間の再現性について検討した。フタル酸エステル類を一段階の勾配溶離で分離する系について検討した。75% アセトニトリル水溶液でスタートし、5.5 分で 100% アセトニトリルに溶離液を切り替える場合について検討した。入り口圧力を 20 kgf/cm² と一定に保ち、検出器下流側のポンプ流量を 4.2 µl/min とした。ジブチルフタレート (DBP) とジ-2-エチルヘキシルフタレート (DEHP) を連続 6 回分離したところ、保持時間の平均値はそれぞれ 4.67 分及び 11.70 分であり、再現性は、RSD でそれぞれ 0.59% 及び 0.45% であった。一方、ピーク面積及びピーク高さの再現性は、それぞれ 4.3% 及び 2.4% であった。上記の条件下での再現性は、単一溶媒溶離モードと同等であることが分かった。

3.4 フタル酸エステル及びアルキルベンゼンの階段状勾配溶離

Fig. 2 は、フタル酸エステルの一段階勾配溶離例を示している。ここでは、入り口圧力を 18 kgf/cm² に保ち、6.5 分でアセトニトリルの濃度を 75% から 100% に切り替えた場合である。8.5 分付近に現れているベースラインのドリフトは、移動相の組成変化に基づくものである。2 分の

Fig. 2 Stepwise gradient separation of phthalates

Separation column: L-column ODS, 100 × 0.32 mm i.d.; Precolumn: Develosil LOP ODS, 10 × 0.25 mm i.d.; Eluent: acetonitrile-water (75 : 25) switched to 100% acetonitrile in 6.5 min; Flow rate: 4.2 µl/min; Inlet pressure: 18 kgf/cm²; Wavelength of UV detection: 204 nm; Sample: 1 ml containing 20 ng/ml for each phthalate: diethyl phthalate (DEP), benzyl *n*-butyl phthalate (BBP), di-*n*-butyl phthalate (DBP) and di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP)

遅れは、分離カラムの間げき体積及び連結部のデッドボリュームによるものである。なお、Fig. 2 には検討成分以外にも幾つかピークが観察されているが、これは使用したフタル酸エステル並びに蒸留水中に含まれる不純物によるものと考えられる。

フタル酸エステルは、実際試料中には低濃度で存在することが考えられることから、マイクロカラム LC 用六方バルブ (M435) を使用し、プレカラム濃縮の適用性について検討した。各成分の濃度は 20 ng/ml で、1 ml をプレカラムに通過させた後、六方バルブを切り替えることによって試料成分を分離カラムに導入したものである。濃縮カラムに捕そくされた成分は、移動相によって逆洗されるため、直ちに狭いバンドとして分離カラムに導入されるものと考えられる。六方バルブを使用してもピーク幅の増大はほとんどなく、本システムは、水中のフタル酸エステルの高感度定量に有効であることが分かった。Fig. 2 の条件下で、S/N = 3 におけるジエチルフタレート (DEP)、ベンジル

Fig. 3 Stepwise gradient separation of alkylbenzenes
Separation column: L-column ODS, 50 × 0.32 mm i.d.; Eluent: 70% (0 to 2 min), 80% (2 to 4 min), 85% (4 to 6 min), 90% (6 to 8 min), 95% (8 to 10 min), 100% acetonitrile (10 min to the rest); Flow rate: 8.3 μ l/min; Inlet pressure: 25 kgf/cm²; Wavelength of UV detection: 210 nm; Sample: 0.2 μ l containing 0.03% (v/v) for each analyte, the numbers refer to the carbon number of the alkyl chain of each analyte

ブチルフタレート (BBP), DBP 及び DEHP の検出限界は、それぞれ 27, 47, 70 及び 94 pg/ml であった。

Fig. 3 は、アルキルベンゼンの勾配溶離例を示している。入り口圧力を 25 kgf/cm² に保ち、シリンジポンプの流量は 8.3 μ l/min としたものである。アセトニトリルの濃度を 70～100% に 2 分ごとに 5 段階切り替えており、10 分以降は 100% アセトニトリルの単一溶媒溶離となっている。なお、Fig. 3 で用いた分離カラムの長さは 50 mm であり、移動相組成の変化に基づくベースラインの変化はバ

ルブ切り替え後、約 1 分に現れている。なお、ベースラインがドリフトしている際にピークが出現する場合には、定量性が悪くなることが考えられる。これは、連続勾配溶離法と比較して階段状勾配溶離法の劣点である。

本法で開発したガス圧を利用したポストカラム制御階段状勾配溶離システムは、マイクロカラム LC において簡便で正確な流量を達成できることが分かった。六方選択バルブ及び六方切り替えバルブの併用によって階段状勾配溶離とプレカラム濃縮を可能とするシステムを開発することができた。

文 献

- 1) S. J. Van der Wal, F. J. Yang: *J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.*, **6**, 216 (1983).
- 2) T. Takeuchi, T. Niwa, D. Ishii: *J. Chromatogr.*, **405**, 117 (1987).
- 3) T. Takeuchi, D. Ishii: *J. Chromatogr.*, **239**, 633 (1982).
- 4) C. Yan, R. Dadoo, R. N. Zare, D. J. Rakestraw, D. S. Anex: *Anal. Chem.*, **68**, 2726 (1996).
- 5) D. Figeys, R. Aebbersold: *Anal. Chem.*, **70**, 3721 (2000).
- 6) M. R. Taylor, P. Teale: *J. Chromatogr. A*, **768**, 89 (1997).
- 7) M. R. Taylor, P. Teale, S. A. Westwood, D. Perrett: *Anal. Chem.*, **69**, 2554 (1997).
- 8) C. G. Huber, G. Choudhary, C. Horváth: *Anal. Chem.*, **69**, 4429 (1997).
- 9) J. N. Alexander, IV, J. B. Poli, K. E. Markides: *Anal. Chem.*, **71**, 2398 (1999).
- 10) A. S. Lister, C. A. Rimmer, J. G. Dorsey: *J. Chromatogr. A*, **828**, 105 (1998).
- 11) J. P. Kutter, S. C. Jacobson, N. Matsubara, J. M. Ramsey: *Anal. Chem.*, **70**, 3291 (1998).
- 12) T. Takeuchi, D. Ishii: *J. Chromatogr.*, **213**, 25 (1981).

要 旨

マイクロカラム液体クロマトグラフィーにおいて、ガス圧を利用した階段状勾配溶離のための送液システムの開発を行った。システムは、ガスボンベ、六方選択切替バルブ、インジェクター又はプレカラム濃縮システム、分離カラム、UV 検出器及び 1 台のシリンジポンプから構成されている。移動相は、ガス圧によって圧送され、検出器下流側に設置されたシリンジポンプにカラム溶出液が導入される。カラム入り口圧力は、設定流量に必要な圧力を超える値に保たれ、検出器下流側のシリンジポンプの吸引速度が本システムの流量となる。六方選択バルブにはループが取り付けられ、ループにはあらかじめ組成の異なる移動相が満たされている。その結果、バルブを切り替えることによってアルゴンガス加圧下で瞬時にループ内の組成の異なる移動相を分離カラムに供給することができる。本方式は、移動相組成の変化やカラム透過性の経時変化の影響を受けることなく一定流量を保つことができる。単一溶媒溶離並びに階段状勾配溶離による試料成分の保持時間の再現性は、相対標準偏差として 0.4～0.6% となった。開発したシステムは、フタル酸エステル及びアルキルベンゼンの階段状勾配溶離に応用することができた。