

01 HPLC を始める前に：HPLC の基礎

HPLC の歴史

1906～1907年にTswettは、吸着剤にチョーク粉末(CaCO_3)を用いて葉緑素が緑色と黄色に分離することを発見しました。そしてTswettはこの方法を「クロマトグラフィー(chromatography)」と名付けました。「chromatography」の語源は、ギリシア語の「色」を意味する「chroma」と、「描く」を意味する「graphos」に由来しています。

その後、この吸着クロマトグラフィー以外に、逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィーが創始され、1971年にKirklandが、高速液体クロマトグラフィー(HPLC: High Performance Liquid Chromatography)の開発につながる完全多孔性球状充填剤の製造に成功しました。これによって今日では重要な分析法の1つであるHPLCの基礎が確立しました。

HPLC 装置

HPLC装置は基本的に以下に示した構成になっており、移動相(カラムに保持されているサンプルを溶出させるために流す液体。詳細はp.7参照)の流れに沿って移動相貯槽、脱気装置、ポンプ、インジェクター(オートサンプラーまたは、マニュアルインジェクター)、カラム、検出器、データ処理器の順に配置されています。ポンプによって移動相を送りだし、インジェクターより移動相中にサンプルを注入してカラムに送り、カラムでサンプルを分離します。分離されたサンプルの成分がカラムから出てきたところを検出器で検出し、データ処理器がクロマトグラムとして描き出します。このクロマトグラムより、さまざまなデータを読み取ります。

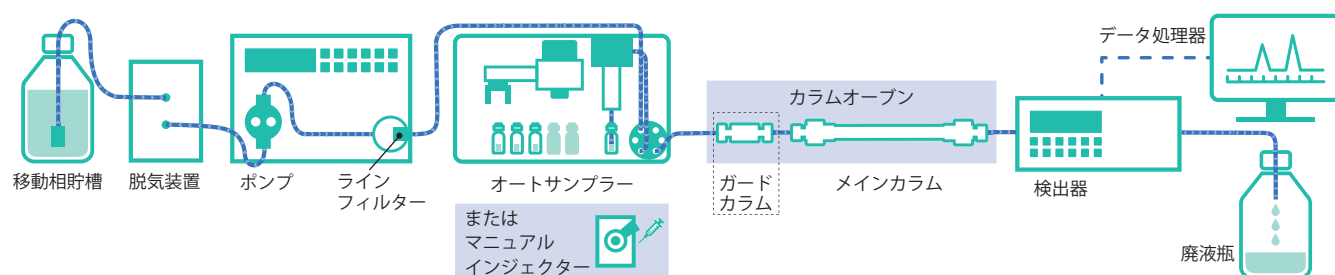


図 1. HPLC の基礎装置構成

移動相貯槽	通常ガラス製瓶や三角フラスコが用いられます。移動相中の不溶性物質の吸入を防止するため、サクションフィルターを取り付けた吸入口を移動相貯槽に入れます。
脱気装置 (デガッサー)	移動相には気体が溶存しています。この気体が流路中で気泡となり、ベースラインの安定に影響をおよぼします。脱気装置は移動相貯槽とポンプの間に接続して、移動相の脱気を行います。
ポンプ	移動相を一定流量、あるいは、一定圧力で送液します。ポンプを2台接続することにより、高圧グラジエント溶離が可能になります。
インジェクター	マイクロシリンジを使って、移動相中に分析するサンプルを注入します。サンプルを自動的に注入することのできるオートサンプラー(オートインジェクター)も数多く用いられています。
カラム	カラム: ステンレス製やガラス製などのクロマト管に充填剤が詰められたものです。カラムの両端には、充填剤が流出しないように多孔質焼結フィルターがついています。インジェクターから注入されたサンプルを分離します。 ガードカラム: メインカラムを保護するために使用します。詳細は「3) ガードカラムの選択と効果」p.57参照
カラムオープン (カラム恒温槽)	カラムの温度を一定に保ちます。HPLCではカラムの温度コントロールが重要で、 $\pm 0.5^\circ\text{C}$ 以内に保つことが望ましく、水もしくは空気の循環恒温槽が多用されています。
検出器	カラムから溶離したサンプルの各成分を検出し、電気信号に変換します。
データ処理器	検出器から得られた電気信号をデータ処理し、クロマトグラムとして目に見えるようにします。ピークの保持時間・面積・理論段数などのデータが自動計算されます。現在ではPCが汎用されています。

01 HPLC を始める前に : HPLC の基礎

クロマトグラム

カラムからサンプルが流れ出る現象を溶離と言い、サンプルがカラム中に注入されてから溶離するまでに要した時間を保持時間と言います。その保持時間を横軸に、サンプルの濃度分布を縦軸に表したものをクロマトグラム (図 2) と言います。このクロマトグラムから以下のデータが読み取れます。

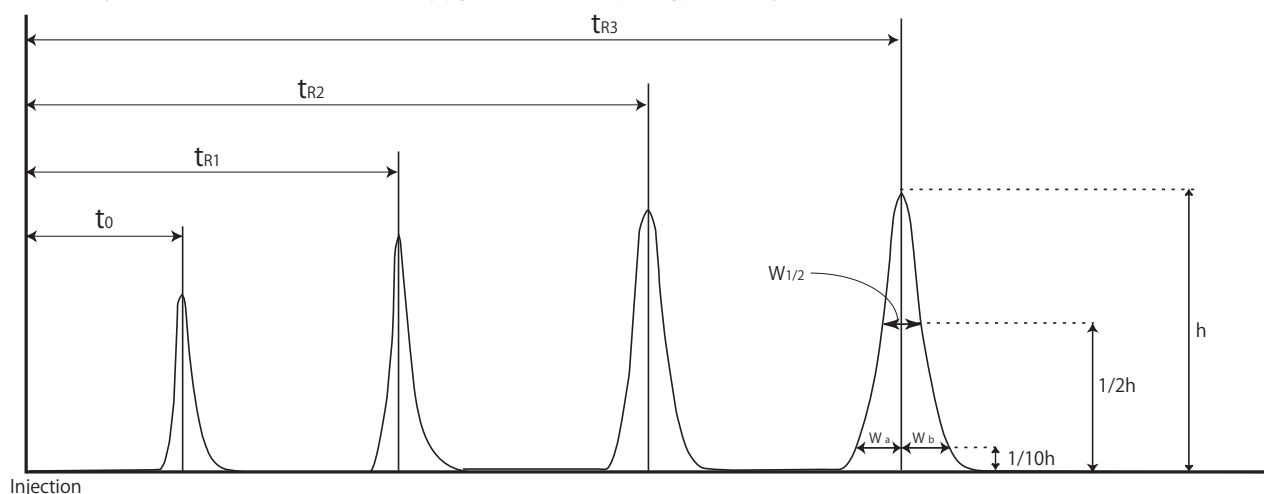


図 2. クロマトグラム

(1) t_0 (Hold up time)	ホールダップタイム
	固定相に全く保持されない物質の溶出時間。逆相クロマトグラフィーではウラシルの溶出時間がよく用いられます。
(2) t_R (Retention time)	保持時間
	ピークトップからベースラインに垂線を下ろし、その交点から分析開始点までの時間
(3) h (Peak height)	ピーク高さ
	ピークトップからベースラインに下ろした垂線の長さ
(4) $W_{1/2}$ (Peak width at half height)	半値幅
	ピーク高さの半分でのピーク幅
(5) k (Retention factor)	保持係数、 $k = (t_R - t_0) / t_0$
	この値が大きいほど、サンプル中の各成分が固定相に長く保持されたことを示しています。保持係数は、同一条件下 (充填剤、移動相、温度) において、各成分で同じ値を示します。
(6) N (Theoretical plate number)	理論段数、 $N = 5.54 (t_R / W_{1/2})^2$
	カラムが複数の段から構成されていて、その一つ一つで分離が起こっていると考えたとき、その段の数を計算した値です。この値が大きいとカラムの性能が高いことを示します。充填剤の粒子径や充填状態に左右されます。
(7) S (Peak asymmetry)	ピーク対称性、 $S = W_b / W_a$
	W_a : ピーク高さの $1/10$ で垂線から前のピーク幅 W_b : ピーク高さの $1/10$ で垂線から後ろのピーク幅 この値が 1 のとき最も対称性の良いピークとなり、1 より大きいとテーリング、小さいとリーディングしていることを示します。テーリングやリーディングは、充填剤の性能や充填状態が悪いときだけでなく、分析条件がサンプルに適していないときや負荷量が多すぎるときにもみられます。
(8) α (Separation factor)	分離係数、 $\alpha = k_2 / k_1$ (k_1 , k_2 はサンプルの各成分の保持係数)
	この値が大きいと、2 つのピークのピークトップが離れていることを示します。
(9) R_s (Resolution)	分離度、 $R_s = (\sqrt{N} / 4) \cdot \{(\alpha - 1) / \alpha\} \cdot \{k_2 / (1 + k_2)\}$
	2 つの成分が分離できているかどうかの目安となる数値です。 R_s が 1.5 のときに 2 つのピークがほぼ完全に分離された状態であり、それよりも小さければ、ピークの一部が重なっていることを示しています。

01 HPLC を始める前に：HPLC の基礎

HPLC の分離モードと特長

HPLC の分離モードは基本的に次のように分類されています。

● 順相クロマトグラフィー

シリカゲル、アルミナなどの吸着剤を充填剤に用います。サンプルは充填剤に対する吸着力の相違によって、おののおの異なった速度で移動することにより分離され、充填剤に吸着しやすいサンプルほど、移動速度は遅くなります。

● 逆相クロマトグラフィー

サンプルは移動相と固定相に分配され、この二相間への分配の相違による移動速度差によって分離されます。固定相に分配されやすいほど、サンプルの移動速度は遅くなります。充填剤には、シリカゲルに化学結合基(オクタデシル基、オクチル基、フェニル基、シアノ基など)を結合したものが多用されています。これらは熱や加水分解には安定ですが、強酸・強塩基性移動相では不安定であるため、使用することはできません。化学結合基の種類や導入率、エンドキャップ処理などが分離に影響します。

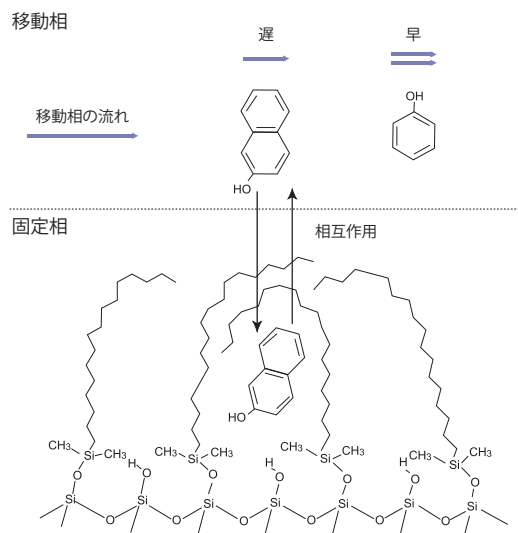


図 3. 分離の様子(逆相)

● 親水性相互作用クロマトグラフィー

親水性相互作用クロマトグラフィー(HILIC)は順相クロマトグラフィーの一種です。HILICでは高極性官能基のシリカゲルなどが用いられ、有機溶媒比率が高い移動相で分離を行います。逆相クロマトグラフィーとは反対に、親水性の低い(疎水性の高い)成分から先に溶出します。したがって、逆相モードで保持されにくい高極性化合物の分析ができます。また、揮発性の高い有機溶媒含量が高い移動相を使用することから LC-MS 分析にも適した分離モードです。

● イオン交換クロマトグラフィー

固定相であるイオン交換体の官能基に対イオンが結合して中和状態になっており、荷電したサンプルは固定相に結合している対イオンとイオン交換反応を行います。サンプルは固定相への親和性の相違による移動速度差によって分離されます。充填剤にはデキストラン交換体、セルロース交換体、ポリスチレン交換体などがあります。イオン交換基は、陽イオン交換と陰イオン交換に大別されます。分離性能を左右するイオン交換容量はイオン交換体粒子の形状や種類によって異なります。

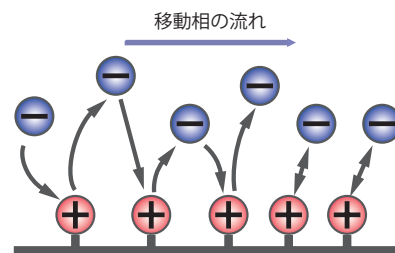


図 4. 分離の様子(イオン交換)

● サイズ排除クロマトグラフィー

充填剤の細孔径より小さいサンプルは細孔内に浸透し、細孔径より大きいサンプルは細孔内に浸透しないことを利用し、サンプルの大きさ(分子量)によって分離されます。主に高分子化合物(分子量 2,000 以上)の分離に用いられます。充填剤にはデキストラン、ポリアクリルアミドなどの有機系の膨張型ゲルとシリカゲル、ガラスなどの無機系ゲルがあります。デキストラン、ポリアクリルアミドは親水性の高いゲルです。機械的強度は弱いですが、アルカリ耐性があるため、アルカリ条件下での分析も可能です。一方、シリカゲルは、アルカリ条件下では使用できないという欠点がありますが、高い理論段数が得られ、機械的強度も高いです。

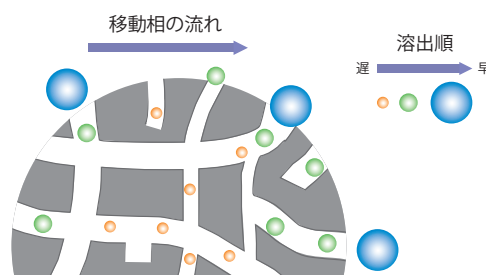


図 5. 分離の様子(サイズ排除)

移動相溶媒

HPLC の移動相として選択、使用する際の留意点を以下に示しました。

1. サンプルの成分を溶解できる。
2. 混和性が良い。
3. 検出妨害がない。
4. 可能な限り、低粘度の溶媒を使用する。
5. カラム温度と溶媒の沸点との温度差を十分に取り。
6. 安全性が高い。
7. 安価である。
8. HPLC グレードを使用する。

次に、分離モード別に移動相としての選択指針を下に示しました。

● 順相クロマトグラフィー

一般には低極性溶媒に、より高い極性の溶媒を混合し、その混合比率の変化で分離係数 (p. 5 参照) を調節します。その際、溶媒の極性の尺度である溶媒強度^{*1} や溶解度パラメーター^{*2} を参考にします。主に、ヘキサン、酢酸エチル、エタノール、クロロホルム、トルエンが使用されています。

*1 カラム内に保持したサンプルの成分を溶出するときの溶媒の溶出力を表します。サンプルの成分を早く溶出させる溶媒は、遅く溶出させる溶媒より「溶媒強度が強い」と言います。

*2 物質の溶解性に用いられる値

● 逆相クロマトグラフィー

水、メタノール、アセトニトリル、テトラヒドロフランが多用され、これらの混合比率で分離係数を調節します。また、イオン性物質を含有するサンプルをシリカゲル担体の充填剤で分析する場合、pH 2 ~ 7.5 の範囲内の移動相を使用します。この範囲外で使用すると酸性側では固定相の剥離、塩基性側ではシリカゲルの溶解を生じます。pH 調整には過したりん酸緩衝液、酢酸緩衝液などが使用されます。

● 親水性相互作用クロマトグラフィー

高濃度のアセトニトリルを含む水または緩衝液が用いられます。緩衝液には、揮発性の塩である酢酸アンモニウムや、ギ酸アンモニウムが使用されます。また、電荷をもつ HILIC 固定相の場合、サンプルとの静電的相互作用に基づく選択性を有します。静電的相互作用の強さは、塩濃度によって調整できます。

● イオン交換クロマトグラフィー

水に緩衝液を添加し、塩濃度 (イオン強度) および pH で分離係数を調節します。イオン強度が増加するにつれてサンプル成分が早く溶出します。また、陰イオン交換の場合は pH を低くすると分離係数が減少し、陽イオン交換の場合は逆に増大します。陰イオン交換ではアンモニア、アミン類などの陽イオン性緩衝液を、陽イオン交換では酢酸塩、ギ酸塩、くえん酸塩などの陰イオン性緩衝液を使用します。

● サイズ排除クロマトグラフィー

一般には単一溶媒を移動相として使用し、分離係数を調節するために移動相溶媒を変えることはありません。非水系ではテトラヒドロフラン、クロロホルム、トルエン、ジメチルホルムアミドなどが使用されます。水系では緩衝液を希釈して使用し、移動相の pH やイオン強度を調節することで吸着、分配、イオン交換などの作用を抑えます。

01 HPLC を始める前に：HPLC の基礎

定量分析法

クロマトグラムのピーク面積あるいはピーク高さからサンプルの成分の組成または含有量を算出するには絶対検量線法や内標準法などが使用されています。詳細は「高速液体クロマトグラフィー通則」(JIS K 0124 : 2011)をご覧ください。

● 絶対検量線法

- (1) 分析対象成分の標準液を3段階以上の濃度^{*1}に調製します。
- (2) 各希釈標準液の一定量を導入しクロマトグラムを記録してピーク面積を測定します。
- (3) 導入された希釈標準液中の分析対象成分の量を横軸に、ピーク面積を縦軸にして図6に示すような検量線を作成します。なお、検量線は測定点を代表するように引きます。
- (4) 同一条件の下でサンプルを導入し、クロマトグラムを記録し、ピーク面積(y)から検量線によって分析対象成分の量(x)を求め、サンプル中の濃度を算出します。

この方法は、全測定操作を厳密に一定条件にして行わなければなりません。
この測定方法を外標準法ともいいます。

*1 内検量線が原点を通る直線であることがあらかじめ確かめられている場合は、分析対象成分の濃度を一点だけとしてこれを導入した場合の A_x/A_s を測定し、これに基づいて検量線を求めてもよい。

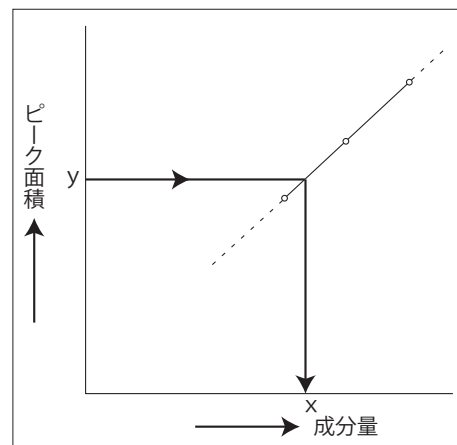


図6. 絶対検量線法による検量線

出典：(JIS K 0124 : 2011) 10.4 絶対検量線法 図 15

● 内標準法

- (1) 一定濃度の内標準物質^{*2}を含む、3段階以上の濃度の分析対象成分希釈標準液を調製します。
- (2) 各希釈標準液を一定量導入し、クロマトグラムを記録してピーク面積を測定します。
- (3) 導入された分析対象成分の量(M_x)と内標準物質の量(M_s)との比(M_x/M_s)を横軸に、分析対象成分のピーク面積(A_x)と内標準物質のピーク面積(A_s)との比(A_x/A_s)を縦軸にして、図7に示すような検量線を作成します。なお、検量線は測定点を代表するように引きます。
- (4) サンプル溶液に、希釈標準液とほぼ同じ濃度になるように内標準物質を既知量添加^{*3}した測定用サンプル溶液を調製します。このとき、分析対象成分のピーク面積(A_x')と、内標準物質のピーク面積(A_s')との比(A_x'/A_s')が検量線の範囲内になるようにします。この測定用試料溶液を希釈標準液と同一条件の下で導入してクロマトグラムを記録します。
- (5) クロマトグラムから分析対象成分のピーク面積(A_x')と内標準物質のピーク面積(A_s')との比(A_x'/A_s')を算出し、検量線から分析対象成分量と内標準物質の量の比を求め、導入された内標準物質の量から分析対象成分の量を算出します。これからサンプル中の分析対象成分の濃度を求めます。

*2 内標準物質には、分析対象成分および化学的性状が類似した安定な物質で、そのピークが分析対象成分ピークの位置になるべく近く、サンプル中の成分ピークとも完全に分離するものを選択する。

*3 サンプル溶液に内標準物質を添加したとき、分析対象成分と内標準物質の濃度に変化を生じさせる沈殿などの化学変化があってはなりません。

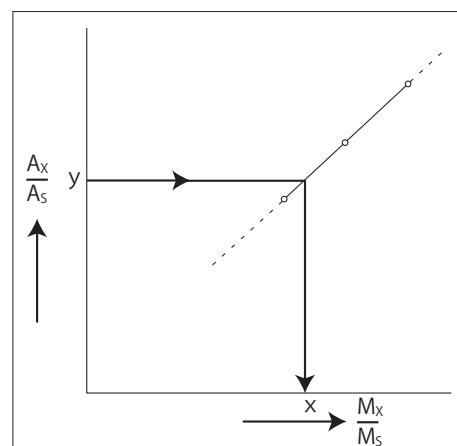


図7. 内標準法による検量線

出典：(JIS K 0124 : 2011) 10.5 内標準法 図 16