最新機器分析講座 (第IV講)

J. Jpn. Soc. Colour Mater., 78 [9], 435-440 (2005)

高速液体クロマトグラフィー

林 守正*

1. 緒言

ロシアの植物化学者 Michael Tswett を創始者とするクロマトグラフィーは、その名の由来が示すとおり、色素の分離を起源としている。その後、J. J. Kirkland らによって現在の高速液体クロマトグラフィー (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) の基礎が築かれていくが、初期のクロマトグラフィーの発展はまさに色素分離の歴史と言っても過言ではない。多くの色材がそうであるように、試料が液体として得られれば原則としてどのような物質も分析対象になるという応用範囲の広さが HPLC の最大の利点であり、あらゆる分野で使用される機器分析法に発展した原動力となっている。

本稿では、その HPLC について、色素分析への応用を織りまぜながら概説する。

2. HPLC の原理

HPLC は固定相と移動相と呼ばれる二つの相に対する物質の分布状態の差を利用した分離分析法である。固定相とは微細な固体粉末の表面に形成された薄層を指し、移動相とはこの固定相上を流れる液体を指す。このような動的条件下において、試料中の各成分は、相への溶解度や分子の大きさに応じて、それぞれ異なった分布平衡を示す。その結果、固定相上を移動する速度に差が生じ、相互に分離されることになる。これが HPLC の原理であるが、さらに図を用いて、試料成分がどのように分離されていくかをもう少し詳しく説明する。

図-1 は HPLC によって試料中の各成分が分離されていく過程を模式的に描いたものである。縦長に描かれた管状のものはカラムと呼ばれ、ステンレススチール製 (または樹脂製) の管に球状固体粉末が充てんされている。このカラムの入口から移動相が送液ポンプによって絶えず一定の流量で送り込まれる。カラムの入口付近にある試料注入器から試料が注入されると、試料は移動相とともにカラムに入り、試料中の各成分は固体表面の固定相と移動相の間を行き来しながらカラム内を移動していく。カラム内での物質の移動はそれが移動相中に存在するときのみ生じるので、移動相に分布しやすいものほど速く、逆に固定相に分布しやすい

ものほど遅くなる。こうして、各成分はカラム内で分離され、カラム出口から順次溶出する。

この分離されていく過程をカラムの後方に接続された検出器でモニターすると、図-2 のようなグラフが得られる。これをクロ

図-1 HPLC における分離の模式図

図-2 HPLC による典型的なクロマトグラム

平成 17. 7. 6 受理

High Performance Liquid Chromatography
Morimasa HAYASHI

*株式会社島津製作所分析計測事業部 LC ビジネスユニット
京都府京都市中京区西ノ京桑原町 1 (〒604-8511)

〔氏名〕 はやし もりまさ
〔現職〕 (株)島津製作所分析計測事業部
LC 担当プロダクトマネージャ
〔趣味〕 読書, 音楽鑑賞
〔経歴〕 昭和 54 年京都大学薬学部卒業
同年島津製作所入社 ~現職。

マトグラムと呼ぶ。成分が溶出するまでの時間（保持時間）や単位成分濃度あたりのピーク面積は分析条件に応じた成分固有の値となるので、分析はピークの保持時間を定性的指標に、ピーク面積（またはピーク高さ）を定量的指標にして行われる。目的成分の保持時間、単位ピーク面積あたりの成分濃度は、あらかじめ含有量が既知の標準試料（通常は可能な限り高純度に精製した分析対象物質の溶液）を分析しておき、得られたデータを基準とする。

HPLCでは以上に述べた原理に基づいて分析対象成分を定性、定量する。ただし、定性的指標となる成分の保持時間は分析条件や使用状態によって変化する相対的な尺度であり、厳密な言い方をすれば、HPLCで定性分析を行うことはできない。そのうえ、試料中にある夾雑成分が目的成分とまったく同じ保持時間を示す場合もあり、ピークが単一成分によるとは限らない。しかしながら、多くの場合、目的成分を取り巻く環境はある範囲内に限定され把握できることから、十分な基礎実験を行っておけば、かなりの確からしさをもって定性的評価を下すことができる。

一方、定量は標準試料のデータから作成される検量線（濃度とピーク面積の関係）に基づいて行われる。これには外部標準法と内部標準法がある。外部標準法では分析対象物質標準試料の検量線から直接定量する。これに対し、内部標準法では分析対象物質に近似した構造の内部標準物質を試料に添加し、分析対象物質と内部標準物質との濃度比とピーク面積比の関係（検量線）から定量する。内部標準法は試料注入量の誤差や試料前処理の回収率を補正する目的で用いられる。

3. 分離モード

物質の保持は移動相および固定相の両相に対する分布平衡といった化学的な特性、分子の大きさといった物理的な特性によって決定される。HPLCでは利用する特性に応じていくつかの分離モードに基づくクロマトグラフィーが用意されている。

3.1 逆相クロマトグラフィー

分散力を中心とした疎水相互作用を利用した分離モードで、応用範囲が広く、最も広く使用されている。代表的なカラムはシリカゲルの表面をオクタデシル基で化学修飾したカラム（ODS, C18などの名称で市販されている）で、このほかにC8, TMS (Trimethyl), Phenylなどがある。保持力の強さは炭素数が減るにつれて弱くなるが、構造認識能は向上する。Phenylについては芳香族化合物に対して選択性がある。移動相には水または緩衝液とメタノール、アセトニトリルなどの有機溶媒との混合液が用いられる。有機溶媒の濃度が高くなると物質の保持は弱くなる。イオン性化合物に対してはpHで保持を調整する。

逆相クロマトグラフィーでは、炭化水素化合物は強く保持される。芳香族より脂肪族のほうが、脂肪族でも不飽和より飽和のほうが保持が強い。炭化水素を母格にして、それにアルキル基（-R）、クロール（-Cl）などの疎水性基が結合すると保持が強まり、水酸基（-OH）、カルボニル基（=CO）、ニトロ基（-NO₂）などの親水性基が結合すると保持が弱まる。カルボキシル基（-COOH）、アミノ基（-NH₂）などでは、それが解離すると極端に保持が弱まる。

3.2 順相クロマトグラフィー

双極子に基づく親水相互作用を利用した分離モードで、逆相クロマトグラフィーとは対の関係にある。逆相クロマトグラフィーが主流となっている現在ではあまり用いられなくなったが、糖の分離などには効果的である。また、水を含有する移動相が好ましくない場合に使用されることがある。代表的なカラムはシリカゲルを充てんしたカラム（SIL）で、その表面をシアノプロピル基やアミノプロピル基で化学修飾したCN, NH₂も使用される。移動相には通常、ヘキサンとエタノール、テトラヒドロフランなどの有機溶媒との混合液が用いられる。極性有機溶媒の濃度が高くなると物質の保持は弱くなる。イオン性化合物に対しては有機酸などの添加で保持を調整する。

順相クロマトグラフィーでは、炭化水素化合物は保持されなにかきわめて保持が弱い。とくに脂肪族炭化水素はほとんど保持されない。炭化水素に水酸基（-OH）、カルボニル基（=CO）、ニトロ基（-NO₂）などが結合すると保持されるようになり、カルボキシル基（-COOH）、アミノ基（-NH₂）などでは極端に保持が強まる。

3.3 イオン交換クロマトグラフィー

イオン結合に基づくイオン相互作用を利用した分離モードで、酸、塩基などのイオン性化合物の分離に用いられる。カラムにはスルホン基（SO₃H）、カルボキシル基（COOH）、アミノ基（NH₂）、アンモニウム（N⁺R₃）を導入したシリカゲルまたは各種樹脂が用いられる。移動相は緩衝液が中心で、イオン強度（緩衝液濃度）やpHで保持を調整する。必要に応じて緩衝液にメタノール、アセトニトリルなどの有機溶媒を混合することもある。

イオン交換クロマトグラフィーは便宜上、陽イオン交換と陰イオン交換に分けられるが、いずれも、価数が大きいイオンほど強く保持される。同じ価数のイオンであれば、イオン半径が大きいほど保持が強い。

3.4 排除クロマトグラフィー

化合物の分子量（サイズ）や正味電荷の差を利用した分離モードで、カラム充てん剤から排除されやすい（充てん剤の細孔に浸透しにくい）物質ほど早く溶出することからこの名称が与えられている。

排除クロマトグラフィーのうち、分子サイズの差に基づく場合をサイズ排除クロマトグラフィーといい、主に高分子の分離に使用される。応用分野によってゲル浸透クロマトグラフィー（GPC）やゲルろ過クロマトグラフィー（GFC）と呼ばれることがあるが、分離モードとしては同一である。カラムにはポリスチレン、ポリビニルアルコール、ポリアクリレートなどの樹脂充てん剤が広く用いられている。移動相は試料の溶解性を考慮して選択されるが、有機高分子ではテトラヒドロフラン、クロロホルムなどの有機溶媒が、たんぱく質などの生体高分子の場合は緩衝液が一般的である。

一方、正味電荷の差を利用する排除クロマトグラフィーはイオン排除クロマトグラフィーと呼ばれ、もっぱら有機酸などのイオン性化合物相互の分離に用いられている。カラムにはスルホン化ポリスチレンを用い、りん酸、過塩素酸などの水溶液を移動相にする。

4. HPLC の構成

HPLC に用いる装置をクロマトグラフと呼ぶが、これは個々に独立した機能をもつユニットから成り立っている。図-3 にその構成を示す。カラムを含め、移動相送液ポンプ、試料注入器、カラムオープン、検出器およびデータ処理装置が基本となるユニットで、その基本システムに各種の付属装置が用途に応じて付加される。

以下に基本ユニットについて詳述する。

4.1 送液ポンプ

移動相をカラムに送り込むユニットで、カラムの流れ抵抗に抗して、高圧下、一定流量で脈動の少ない送液が可能のように設計されている。通常、二つのシリンダを配置し、プランジャの位相を180度ずらして移動相の吸引、吐出の行程を繰り返す駆動方式が採用されている。

市販されている送液ポンプには、二つのプランジャを並列に配置したタイプと直列に配置したタイプがある。図-4 および図-5 に両者の流量特性を示す。前者では二つの有効シリンダ内容積(単回吐出量)が等しく、後者では後方の有効シリンダ内容積が前方の半分になっている。

4.2 試料注入器

試料をカラムに導入するユニットで、ここから所定量の試料を

図-3 HPLC の構成

注入する。かつてはマイクロシリンジを用いるマニュアルインジェクタが広く使用されていたが、現在では一連の試料を自動的に注入するオートサンプラが主流になっている。人的誤差がなく、通常、RSD 0.5%以下の注入精度が得られる。検出感度の向上とLC-MSの普及にともない、最近ではキャリーオーバー（注入した試料の一部が残存し、次の試料の分析に影響する現象）の抑制が重視され、その程度がオートサンプラの性能指標となりつつある。

4.3 カラム

表面が化学修飾されたシリカゲルや各種樹脂（粒径3-10 μm ）をステンレススチールなどの管に充てんしたもので、これが分離の場となる。充てん剤の種類によって分離モードが異なり、目的に応じて使い分ける。

4.4 カラムオープン

カラムを一定の温度に保つユニットで、温度は分離に影響を及ぼす重要な要素であるため、カラムをある一定の温度に置くことで分離状態の改善や再現性の向上を図る。通常、カラム温度が高いほどカラムの保持力は低下する。

4.5 検出器

カラムから溶出する成分を検出するユニットで、吸光度検出器、蛍光検出器、示差屈折検出器、蒸発光散乱検出器、電気化学検出器、電気伝導度検出器などがあり、成分の物性や分析目的に

図-4 並列デュアルプランジャ方式送液ポンプの流量特性

図-5 直列デュアルプランジャ方式送液ポンプの流量特性

図-6 オートサンプラ（全量注入方式）の流路図

応じて選択する。

a. 吸光度検出器

吸光度検出器は分子内の原子価電子の励起に基づく吸光度を測定する検出器で、測定できる物質の範囲が広いうえに選択性も得られることから、現在、最も多く使用されている。二重結合、とくに共役二重結合をもつ化合物が対象となり、物質によっては 10^{-15} mol/L 程度の検出限界を得ることができる。一般には分光型の吸光度検出器が用いられるが、吸収スペクトルが同時に測定できるフォトダイオードアレイ検出器も普及し、利用されている。

b. 蛍光検出器

蛍光検出器は光照射によって励起一重項状態のいろいろな振動準位 ($S_1, S_2, \dots$) に遷移した分子が内部転換 (S_1 のゼロ点振動準位への遷移) を経て基底状態 (S_0) に戻るときに発する光の強度を測定する検出器で、汎用される検出器のなかで最も高い感度と選択性を得ることができる。物質によっては 10^{-16} mol/L 程度の検出限界が得られるので、微量成分の検出に好んで用いられる。対象となる物質は多環芳香族化合物、インドール化合物など蛍光性を示すものに限られるが、近年の誘導体化試薬に関する研究の進歩にともない、その応用範囲は拡大している。

c. 示差屈折検出器

示差屈折検出器は試料成分を含有する移動相と移動相自身との屈折率の差を求める検出器である。物質に普遍的性質を指標とするので、無機物、有機物を問わず、どのような物質も検出することができる。しかしながら、これは同時に選択性がないことを意味しており、使用にあたっては目的成分が夾雑成分と完全に分離されていなければならない。また、グラジエント溶出法 (分離に利用する化学的性質が互いに関係離れた複数の物質を一斉に分析する際に、移動相組成を経時的に変化させて、分離状態を維持しつつ分析時間を短縮する溶出法) が適用できず、検出限界も 10^{-9} g/L 程度であるために、ほかに適当な検出方法がない場合に限りて使用されることが多い。ただし、物質の構造にかかわらず質量の関数として応答量を取り扱うことができるので、GPC による分子量分布測定にはもっぱら使用されている。

d. 蒸発光散乱検出器

蒸発光散乱検出器は加熱して微粒子となった目的成分に光を照射し、その散乱光を測定する検出器で、昇華しにくい高沸点化合物が対象となる。検出限界は 10^{-11} g/L 程度で、吸光度検出器や蛍光検出器には劣るが、示差屈折検出器と同様に汎用性に優れ、グラジエント溶出法にも応用できるので、示差屈折検出器に代替するものとして期待されている。ただし、移動相を気化させることが条件となるために、不揮発性の緩衝液が使用できないなどの制約がある。

e. 電気化学検出器

電気化学検出器は電極表面で起こる電荷移動反応に伴う電流を測定する検出器で、特異性が高く、条件によっては 10^{-15} mol/L 程度の検出が可能である。ただし、測定される電流には泳動電流も加わるので、グラジエント溶出法には適用できない。対象は電気化学的に活性な化合物 (酸化反応ではフェノー

ル化合物、芳香族アミン、複素環化合物、還元反応ではニトロ化合物やキノン体) に限られる。なお、電気化学検出器には、電極反応効率によりアンペロメトリーとクーロメトリーの二つのタイプがある。

f. 電気伝導度検出器

電気伝導度検出器は試料成分を含有する移動相と移動相自身との電気伝導度の差を測定するもので、イオンに共通の検出器であり、条件によっては 10^{-12} mol/L 程度の検出が可能である。有機、無機を問わず、イオン性化合物が対象となるが、主にイオンクロマトグラフィーの検出器として使用されている。

4.6 データ処理装置

検出器からの信号を記録し、クロマトグラムを得るための装置である。記録のみならず、ピークの面積を積算して定量計算する機能をもつ。最近では、パーソナルコンピュータを用いてデータの処理や機器の制御を行うクロマトグラフィーデータシステムが普及している。

図-7 水溶性タール色素のクロマトグラム

分析条件: カラム, STR-ODS-II (150 mm×4.6 mm i.d.); 移動相, 20 mmol/L リン酸 (アンモニウム) 緩衝液 pH6.9 と 2-プロパノールの混合液 (25/1, v/v) およびアセトニトリル (アセトニトリル 5% から 70% までのグラジエント溶出); 流量, 1.0 mL/min; 温度, 40°C; 検出, 吸光度。

ピーク: 1, 黄色 4 号; 2, 赤色 2 号; 3, 青色 2 号; 4, 黄色 203 号(a); 5, 赤色 102 号; 6, 黄色 403 号; 7, 黄色 5 号; 8, 黄色 203 号(b); 9, 赤色 227 号; 10, 赤色 40 号; 11, 黄色 202 号; 12, だいだい色 207 号; 13, 赤色 503 号; 14, 赤色 504 号; 15, 緑色 401 号; 16, 赤色 230 号; 17, だいだい色 402 号; 18, 青色 1 号; 19, 赤色 502 号; 20, 赤色 3 号; 21, 黒色 401 号; 22, だいだい色 201 号; 23, 赤色 106 号; 24, 緑色 201 号; 25, 赤色 104 号; 26, 黄色 407 号; 27, 黄色 406 号; 28, 赤色 105 号; 29, 赤色 506 号; 30, かつ色 201 号; 31, 紫色 401 号; 32, 赤色 401 号; 33, 赤色 213 号; 34, 黄色 402 号。

図-8 ヘアマニキュアの三次元クロマトグラム
分析条件：カラム，Shim-pack VP-ODS (150 mm×4.6 mm *i.d.*)；移動相，20 mmol/L リン酸（アンモニウム）緩衝液 pH6.9 およびアセトニトリル（アセトニトリル 10% から 70% までのグラジエント溶出）；流量，1.0 mL/min；温度，40℃；検出，吸光度。
ピーク：1，黄色 203 号；2，赤色 227 号；3，黒色 401 号；4，だいだい色 205 号；5，紫色 401 号。

図-9 ヘアマニキュアから検出された黒色 401 号の吸収スペクトル（スペクトル類似度）

5. HPLC の応用例

HPLC はさまざまな分野で使用されているが，色材関係も例外ではなく，食品^{1,2)}，化粧品^{3,4)}，繊維^{5,6)}に含まれる色素およびその中間体の定量に応用されている。

図-7 に水溶性タール色素 33 成分のクロマトグラムを示す。逆相クロマトグラフィーにより分離し，フォトダイオードアレイ検出器を用いて 8 波長で検出したものである。フォトダイオードアレイ検出器は，このような多波長検出以外に，標準物質とのスペクトル類似度やピーク純度を数理的に評価する機能があり，試料成分の確認定量に有用と考えられている。

図-8 にヘアマニキュアの分析例を示す。色素各成分の同定は保持時間に加えて，図-9 のように標準物質とのスペクトル類似度で確認されている。

6. HPLC の今後

HPLC が分析機器として登場して以来，30 年あまりが経過した。技術的には完成の域に達したと言われるが，用途においては現在でも拡大の一途をたどっている。とくに LC-MS の急速な普及にとともに，マイクロ HPLC と分離の高速化が重要なテーマとなっている。ここでいうマイクロ HPLC とはカラム内径を 1 mm 以下に細管化し，50 μ L/min 以下の流量で分析する技術（通常の内径 4.6 mm，流量 1 mL/min 前後のクロマトグラフィーをコンベンショナル HPLC と呼ぶ）で，質量感度と MS のイオン化効率の向上により高感度化を図ることを目的としている。一方，分離の高速化はカラム充填剤を微細化し，移動相線速度を高めて分析時間の短縮を図る技術である。いずれもいつかの克服すべき課題があるが，今後の主流になる分離技術として注目されている。

7. FAQ

Q 1 定量にはピーク面積とピーク高さのどちらを指標にするのがよいのか。

A 1 ピーク高さは保持時間の変動やピーク形状の変化の影響を受けやすい。ピーク面積は，分離が不十分な場合に誤差が大きくなるという問題があるが，保持時間やピーク形状が変化しても影響を受けない。そのため，通常はピーク面積を指標にして定量することが多い。

Q 2 室温で分析する場合でもカラムオープンが必要か。

A 2 空調設備が整っていて室温を絶えず一定に保てる試験室であれば不要だが，そのような環境をつくり出すことは不可能に近い。また室温という曖昧な温度規定では再現性の点で問題がある。季節や時刻，試験室によらず安定した分析結果を得るためには，たとえ室温付近の分析温度であっても，カラムオープンを使用するのが好ましい。

Q 3 吸光度検出器では測定波長をどのように設定するのか。

A 3 通常は目的化合物の極大吸収波長を設定する。感度が高いうえに，波長ズレが生じてその影響が少ないからである。極大吸収波長が複数ある場合は，多少，感度が犠牲になっても検出の選択性が高まるので，できるだけ長波長側の極大吸収波長を選択するのがよい。

Q 4 移動相にはどのようなグレードの溶媒を使用するのがよいのか。

A 4 分析内容にもよるが，溶媒の純度が低いとベースラインの変動や不明ピークの原因になるので，できるだけ高純度の溶媒を用いるべきである。HPLC 用の各種溶媒が市販されているので，それらを利用すればよい。

Q 5 分離が不十分なとき，どのような手順で改善するのか。

A 5 まず，移動相の溶出力を落として化合物の保持を強めてみる。それで改善しなければ，溶媒の種類を変えてみる。酸や塩基が目的化合物なら，移動相の pH を変更するのも効果的である。それでも十分な分離が得られないなら，カラ

ムの種類や長さを検討する。

文 献

- 1) J. F. Lawrence, F. E. Lancaster, H. B. S. Conacher : *J. Chromatogr.*, **218**, 168 (1981).
 - 2) J. P. Chaytor, R. L. Heal : *J. Chromatogr.*, **368**, 450 (1986).
 - 3) J. W. M. Wegener, H. J. M. Crünbauer, R. J. Fordham, W. Karcher : *J. Liq. Chromatogr.*, **7**, 809 (1984).
 - 4) J. W. Wegener, J. C. Klamer, H. Govers, U. A. Th. Brinkman : *Chromatographia*, **24**, 865 (1987).
 - 5) D. K. Laing, R. Gill, C. Blacklaws, H. M. Bickley : *J. Chromatogr.*, **442**, 187 (1988).
 - 6) R. M. E. Griffin, S. J. Speers, T. G. Kee : *J. Chromatogr. A*, **674**, 271 (1994).
-