

HPLC基礎(理論編)

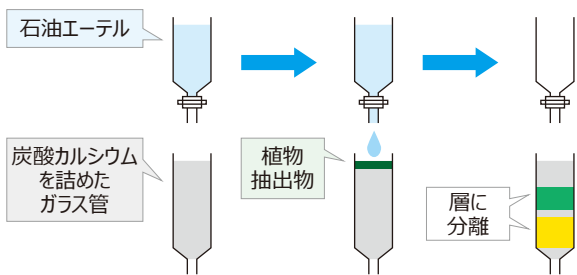
はじめてHPLCに携わる方、改めて基礎を学びたい方…クロマトグラフィーについての基礎をまとめました。ここでは用語の説明など、理論的な内容に絞って掲載しています。

Keywords クロマトグラフィー クロマトグラフ クロマトグラム 定性分析 定量分析 分離モード カラム

基礎1 クロマトグラフィーとその目的

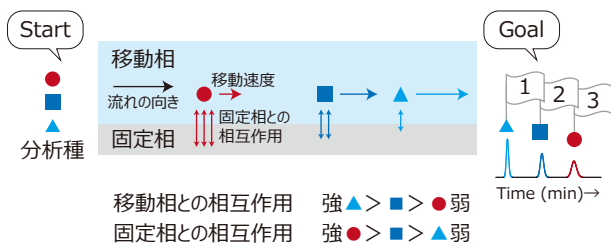
■ クロマトグラフィーとは

20世紀はじめにTswettが植物抽出物から、着色した層を分離した方法を、ギリシャ語のChroma(色)+Graphos(描く)に因んで、クロマトグラフィー(Chromatography)と名づけられました。



手法・方法	クロマトグラフィー	Chromatography
装置・機器	クロマトグラフ	Chromatograph
記録の結果(チャート)	クロマトグラム	Chromatogram

クロマトグラフィーとは、分析種を固定相及び移動相との相互作用の差を利用して分離する方法です。



移動相により次のように分けられます。

	LC: 液体クロマトグラフィー 液体クロマトグラフ	GC: ガスクロマトグラフィー ガスクロマトグラフ
移動相	液体	気体
固定相	充填剤	充填剤, 液相

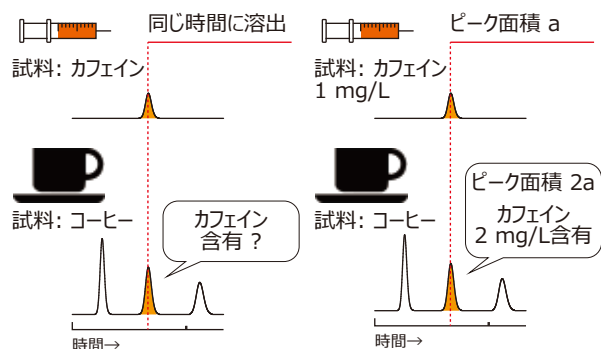
LCは、技術進歩に伴い、次のように呼ばれています。

HPLC: High Performance Liquid Chromatography (Chromatograph) 高速液体クロマトグラフィー(高速液体クロマトグラフ) 液体をカラムに通過させ効率よく分離・検出する方法又は機器
UHPLC: Ultra High Performance Liquid Chromatography (Chromatograph) 超高速液体クロマトグラフィー(超高速液体クロマトグラフ) 粒子径2 μm前後(サブ2 μm)の微細充填剤を用いることによって、 HPLCをさらに高速化、高分離化をはかった方法又は機器

■ クロマトグラフィーの目的

クロマトグラフィーの目的は、大きく次に分けられます。

- ① 含有する成分は何か(定性分析)
- ② どのくらいの量が含有されているか(定量分析)
- ③ ある成分を取り出す(分取)



① 定性分析のイメージ

② 定量分析のイメージ

定性分析

1. 成分と標準試料の保持時間が一致する
2. 実試料に標準試料を添加しても保持時間が変化せず、異常なピーク幅の増加が認められない
3. 原理の異なる検出器や手法を使用しても、同様の結果が得られる

定量分析

ピーク面積もしくは高さを算出し、含有量を求めます。

絶対検量線法(外標準法)	内標準法
<ul style="list-style-type: none"> ・ 試料に含まれている目的成分が分離していればよい ・ 注入誤差、調製誤差が生じやすい 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 注入誤差、調製誤差が低減 ・ 内標準物質の選定が難しい ・ 内標準物質が試料中に含まれない ・ 内標準物質と分析対象成分の分離が必要
<p>分析種と同じ成分の既知濃度によるピーク面積又はピーク高さによる検量線</p>	<p>一定の内標準物質を含む3~4段階の希釈標準液による面積比による検量線</p>

基礎2 HPLCの分離モード

■ 分離モードの種類

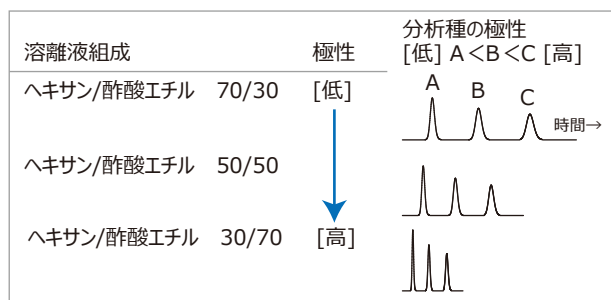
HPLCには次のような分離モードがあります。

分離モード	特徴
分配クロマトグラフィー	固定相と移動相との分配平衡に基づく分離
吸着クロマトグラフィー	無機酸化物固定相による溶質の吸着平衡に基づく分離
イオン交換クロマトグラフィー	イオン交換体とイオン性溶質との静電的相互作用による分離
サイズ排除クロマトグラフィー	高分子充填剤のネットワーク又は細孔による分子ふるい作用に基づく分離
アフィニティークロマトグラフィー	生物由来の分子識別能による分離

順相分配クロマトグラフィー

固定相: 極性の高い修飾基を導入 シリカ シリカ+アミノプロピル シリカ+シアノプロピル など	溶離液(移動相): ヘキサン、ペンタン、2-プロパノール、メタノールなどの極性の異なる有機溶媒の混合溶媒を使用
---	--

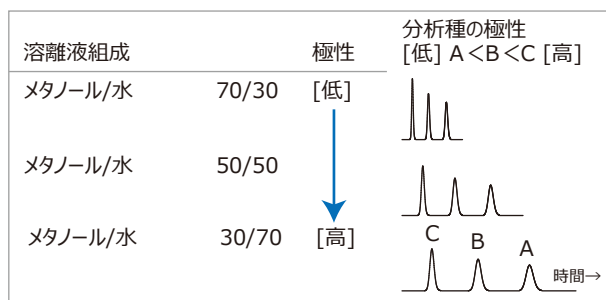
極性 : 固定相 > 溶離液
 極性の高い溶離液 : 溶出力が強い(保持が弱い)
 極性物質(極性置換基を有する) : 溶出力が弱い(保持が強い)



逆相分配クロマトグラフィー

固定相: 疎水性の修飾基を導入 C18(ODS) C8 C4 など	溶離液(移動相): アセトニトリル、メタノールなどの有機溶媒と水又は緩衝液の混合溶液を使用
---	--

極性 : 固定相 < 溶離液
 極性の低い溶離液 : 溶出力が強い(保持が弱い)
 非極性物質(疎水性物質) : 溶出力が弱い(保持が強い)

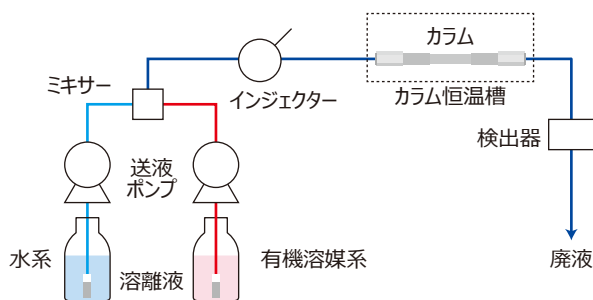


逆相イオン対クロマトグラフィー

逆相分配クロマトグラフィーで、分析種がイオン性物質(解離性物質)の場合、イオン対を組むことができ、かつ疎水性をもつ試薬を対イオンとして添加した緩衝液を使う方法。

基礎3 クロマトグラフ

■ HPLC装置の概要



■ 送液部(送液ポンプ)

送液法には2種類あります。

イソクラティック溶離法	グラジエント溶離法
<ul style="list-style-type: none"> 単一組成の溶離液を用いる 保持時間の再現性に優れる 極性の異なる分析種の分離に時間を要する 	<ul style="list-style-type: none"> 時間の経過に伴い、溶離液の組成を変化させる 分析時間が短縮 保持の強い成分の追出しや洗浄操作が簡便 分析毎に、カラム内を最初の組成に戻すのに時間を要する

■ 試料導入部(インジェクター)

種類	特徴
マニュアルインジェクター	<ul style="list-style-type: none"> マイクロシリンジで試料を量り取る、またはループに試料を満たして、手で導入する方法 手入れが簡単 人的誤差が生じる
オートインジェクター	<ul style="list-style-type: none"> 自動でニードルで試料を量り取る メーカーにより試料採取方法(吸引量、ループで計量など)は異なる 洗浄回数や洗浄液組成などに注意 操作が簡便で、多くの試料を自動で分析できる

■ 主な検出部(検出器)

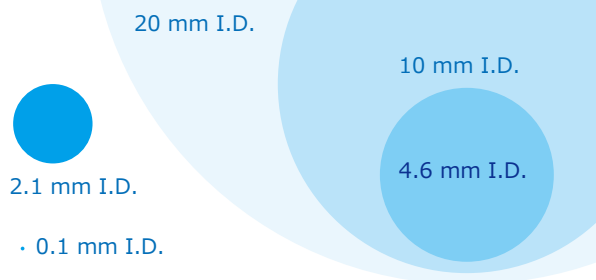
種類	特徴	検出レベル
吸光度検出器(UV)	<ul style="list-style-type: none"> サンプルと溶離液の紫外線吸収の差を利用して検出 紫外～可視部に吸収を有する物質に使用でき、汎用検出器 	ng
フォトダイオードアレイ検出器(PDA)	<ul style="list-style-type: none"> 紫外から可視にわたる波長領域での吸光度情報を得ることが可能 吸光度・時間・波長の三次元で表示 	ng
示差屈折率検出器(RI)	<ul style="list-style-type: none"> 溶離液とサンプルセルの屈折率の差を利用して検出 UV吸収を持たない物質に使用 	μg
蛍光検出器(FL)	<ul style="list-style-type: none"> 蛍光成分をキセノンランプ等で励起させて検出 UVより高感度、かつ高選択性 	pg
質量分析計(MS)	<ul style="list-style-type: none"> 物質をイオン化し、m/zに応じて分離した後、これを検出 生体関連物質(タンパク質など)や微量物質 	fg

基礎4 カラム(逆相クロマトグラフィー)

■ 内径による分類

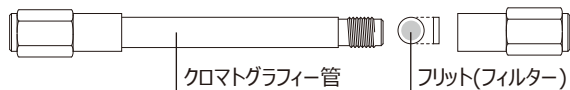
内径	分類
1 mm未満	マイクロカラム
1 mm以上、3 mm未満	セミマイクロカラム
3 mm以上、10 mm未満	汎用カラム
10 mm以上、50 mm未満	セミ分取カラム

内径0.1 mm未満のカラムを「ナノカラム」、内径10 mm以上を「分取カラム」と分類することもあります。



■ カラムの構造

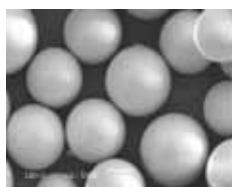
クロマトグラフィー管から中身の充填剤が出ないように両端にフリットを装着しています。クロマトグラフィー管は、不活性かつ十分な強度をもったステンレス材質が一般的です。



■ 充填剤

充填剤の基材には、シリカ、シリカ骨格にメチル基やエチレン基を導入したハイブリッドシリカ、ポリスチレンなどがあります。

これらを基材として、表面に様々な修飾基を導入して化学結合したものが充填剤になります。



高純度球形シリカ(SEM)

■ カラムの種類

シリカ基材を充填剤に用いた主なカラムの種類です。他に、アルキル鎖長が異なる、C30、C4、C1(TMS)などがあります。

種類	特徴
ODSカラム(C18カラム)	<p>炭素数18のアルキル基を導入したカラムです。逆相クロマトグラフィーでは多く用いられています。使用例も多くあり、汎用性の高いカラムです。疎水性相互作用により分離分配します。</p> <p><chem>CCCCCCCCCCCCCCCCCC[Si]</chem> Octadecyl (C18)</p> <p><i>L-column</i> シリーズでは以下が対応します。 <i>L-column3</i> C18, <i>L-column2</i> ODS, <i>L-column</i> ODS, <i>L-column</i> ODS-P</p>
オクチルカラム(C8カラム)	<p>炭素数8のアルキル基を導入したカラムです。C18カラムより保持が小さいので、脂溶性物質を早く溶出させたい場合に用いられます。疎水性相互作用により分離分配します。</p> <p><chem>CCCCCCC[Si]</chem> Octyl (C8)</p> <p><i>L-column</i> シリーズでは以下が対応します。 <i>L-column3</i> C8, <i>L-column2</i> C8, <i>L-column</i> C8</p>
フェニルカラム	<p>フェニル基若しくはフェニル基にフェニルアルキル基を導入したカラムです。疎水性相互作用とπ-π相互作用により分離分配します。</p> <p><chem>CCCCCc1ccccc1[Si]</chem> Phenyl-Hexyl</p> <p><i>L-column</i> シリーズでは以下が対応します。 <i>L-column2</i> C6-Phenyl</p>

一般にファーストチョイスとして、ODSカラムを選択します。

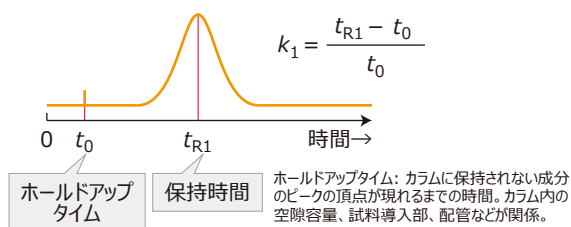
フェニルカラムなど、『疎水性相互作用+ α 』で分離分配する修飾基を導入したカラムを選択すると、C18カラムやC8カラムとは異なる分離挙動が得られる場合があります。

基礎5 クロマトグラム

クロマトグラムから得られる数値と、その算出方法です。

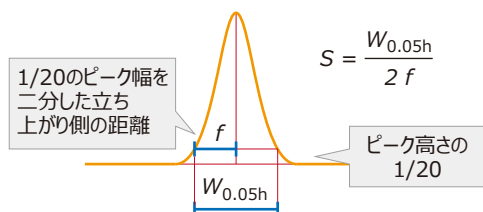
■ 保持係数 k : retention factor, capacity factor

保持の大きさを示す係数です。ホールドアップタイムで除しているため、機器間やカラム間を比較をするときに用いられます。



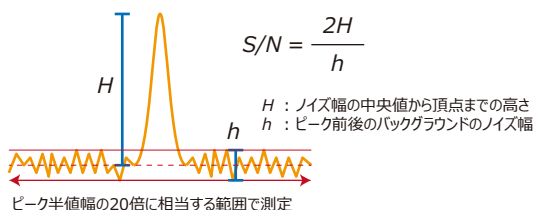
■ シンメトリー係数 S : symmetry factor

ピークの対称性を示す係数です。対象物質の吸着やカラム劣化が生じたとき、シンメトリー係数は大きくなります。



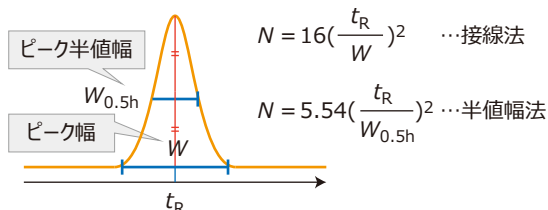
■ SN比 (又は S/N) : signal to noise ratio

シグナルとノイズとの比です。検出下限又は定量下限を表示するときに併記されます。



■ 理論段数 N : theoretical plate number

カラム効率を示す指標のひとつで、分離能を示す値です。

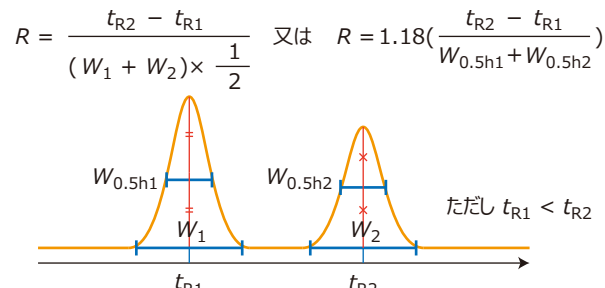


リーフレット内容に関してのお問合せは、東京事業所クロマト技術部又は最寄りの代理店までご連絡ください。

■ 分離度 R (又は R_s) : resolution

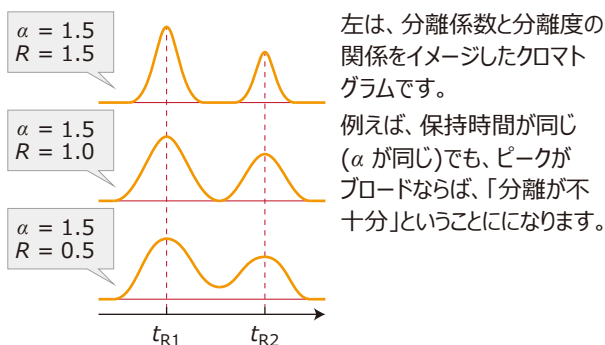
隣接している2つのピークが、どの程度分離しているかを、理論段数及びピーク対称性を考慮した示す値です。

分離度が1.5以上で、ピークが完全に分離している(ベースライン分離)ことを意味します。



分離を示す値に「分離係数 α : separation factor」があります。カラム長さや充填剤の粒子径に依存しないので、充填剤と試料に対する選択性の比較に有効です。

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t_{R2} - t_0}{t_{R1} - t_0}$$



左は、分離係数と分離度の関係をイメージしたクロマトグラムです。

例えば、保持時間が同じ (α が同じ) でも、ピークがブロードならば、「分離が不十分」ということになります。

このように、得られたクロマトグラムを数値化することで、客観的に結果を捉えることができます。

これらの値は、プログラムにより自動計算して算出されますが、規格や試験法、例えば日本薬局方 (JP)、USP (米国薬局方)、EP (ヨーロッパ薬局方) などで、算出方法が異なる場合がありますので確認しておきましょう。

参考文献

JIS K 0124: 2011 高速クロマトグラフ分析通則
 JIS K 0214: 2013 分析化学用語(クロマトグラフィー部門)
 高速液体クロマトグラフィーハンドブック/丸善
 逆相高速液体クロマトグラフィー/株式会社東京化学同人
 液クロ虎の巻・龍の巻・彪の巻・犬の巻・武の巻/筑波出版会
 第十七改正日本薬局方

CERI 一般財団法人 化学物質評価研究機構
 Chemicals Evaluation and Research Institute, Japan
<https://www.cerij.or.jp>



東京事業所 クロマト技術部
 e-mail chromato@ceri.jp

TEL 0480-37-2601 FAX 0480-37-2521
 〒345-0043 埼玉県北葛飾郡杉戸町下高野1600番地