

## HPLC基礎(逆相クロマトグラフィー実践編)

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。ここでは実際にHPLCを使うために最低限必要で、実践的な内容に絞って掲載しています。今回は、とが解説をサポートします。

**Keywords** 溶離液 有機溶媒 水 検出波長 極性 分配係数 イオン性物質 緩衝液

### 溶離液

#### ■ 溶離液(eluent)

溶離液とは、カラムに保持されている分析種を、展開・溶出させる移動相として用いる液体のことです。逆相クロマトグラフィーでは、有機溶媒と水を混合したものが用いられます。

ここでの『溶離液』は『移動相』と同義として使用しています。

#### ■ 有機溶媒 アセトニトリル v.s. メタノール

**吸光度: アセトニトリル(低い) > メタノール(高い)**

低波長で分析するとき、メタノールの方が吸収が大きいためSN比が小さく、ノイズが大きいためグラジエント分析や微量成分の分析には向きません。HPLC用の溶媒を選択するとSN比を改善することができます。

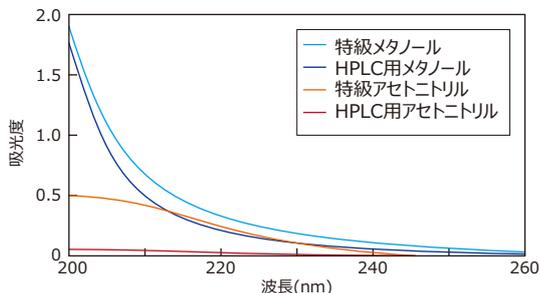
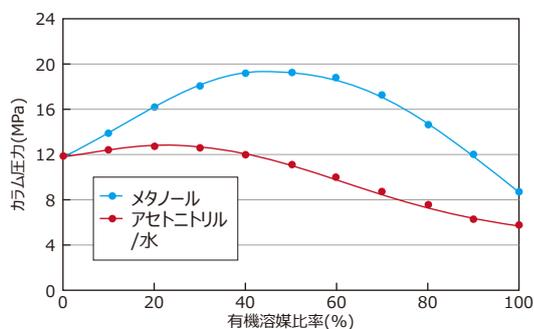


Fig.1 有機溶媒(種類・用途別規格)の吸収スペクトル

#### ■ カラム圧力: アセトニトリル(低い) > メタノール(高い)

有機溶媒比率が50%付近のとき、メタノールはアセトニトリルの約2倍のカラム圧力になります。



[Analytical conditions]  
Column: L-column2 ODS, 3 μm; Size: 4.6 mm I.D., 150 mm L.  
Flow rate: 1 mL/min; Temp.: 30°C

Fig.2 有機溶媒比率とカラム圧力

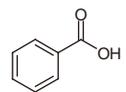
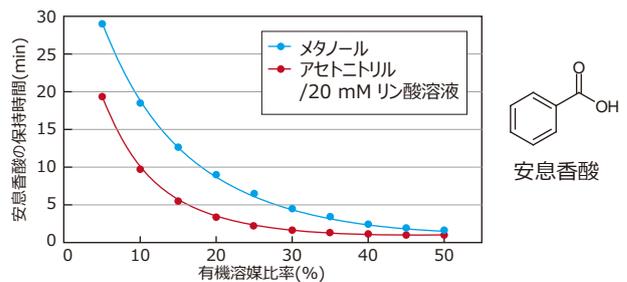
THF(テトラヒドロフラン)、2-プロパノール、エタノールは、アセトニトリルより、溶出力が大きく、カラム圧力はメタノールより高くなります。

 カラム圧力が高いことは、いけないことですか。

カラム圧力が高いというより、圧力変動が大きい方が、カラム劣化を促進します。取扱説明書に記載の範囲内で使用していても、同様です。また、LCシステムにも負担がかかります。そのため、なるべく低いカラム圧力での使用を薦めています。

#### 溶出力: アセトニトリル(大) > メタノール(小)

同じ比率のとき、メタノールを用いた方が保持時間が大きくなります。



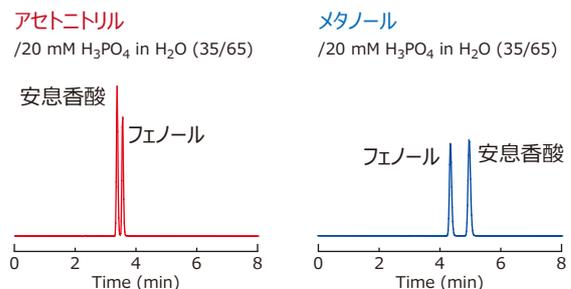
[Analytical conditions]  
Column: L-column2 ODS, 3 μm; Size: 4.6 mm I.D., 50 mm L.  
Flow rate: 1 mL/min; Temp.: 40°C; Detection: UV 254 nm

Fig.3 有機溶媒比率と保持時間

#### 分離パターンの違い

安息香酸とフェノールの分析例では、アセトニトリルを用いた場合、安息香酸が先に溶出するのに対して、メタノールではフェノールが先に溶出します。

有機溶媒の種類及び比率と、保持時間の関係は物質によって異なるので、有機溶媒の種類を変えたとき、分離パターンが変わり、分離が改善することがあります。

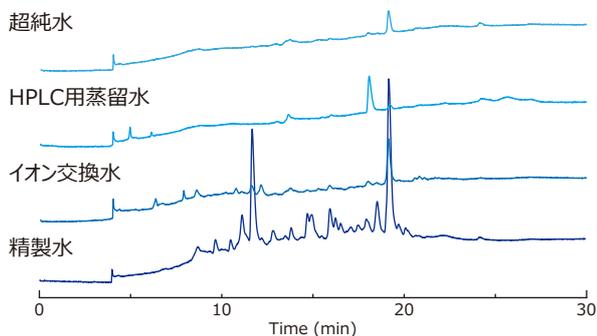


[Analytical conditions]  
Column: L-column ODS, 5 μm; Size: 4.6 mm I.D., 150 mm L.  
Flow rate: 1 mL/min; Temp.: 30°C; Detection: UV 254 nm

Fig.4 有機溶媒と溶出順序の比較

## ■ 水

溶離液として用いる水の規格によって、グラジエント時のベースラインが違います。これら不純物は、クロマトグラムのゴーストピークとして分析の妨害となります。有機溶媒比率が低いと、不純物はカラムに蓄積され、カラム劣化につながります。



[Analytical conditions]  
Column: L-column ODS, 5  $\mu$ m; Size: 4.6 mm I.D., 150 mm L.  
Eluent: A: CH<sub>3</sub>CN, B: H<sub>2</sub>O; A/B, 10/90-100/0 (0-30 min)  
Flow rate: 1 mL/min; Detection: UV 210 nm

Fig.5 水(用途別規格)の種類とベースライン

有機溶媒も水も、グレードが高い方がいいのですか。

適したグレードを選択しましょう。例えば、安定剤を含まないHPLC用THFは、開封後、放置しておく、酸化により紫外吸収が増加してしまいます。安定剤(BHT: ジブチルヒドロキソトルエン)が添加されているものは、酸化はしませんが、BHTの紫外吸収がある250~300 nmでの分析には適していません。

超純水は、空気に触れれば空気中の不純物をどんどん取り込んでしまいます。いくら不純物の少なくグレードの高い試薬を使っても適切な保管・管理をしなくては、無駄になってしまいます。

## 検出波長(吸光光度検出器: UV)

液体クロマトグラフィーの代表的な検出器に吸光光度検出器があります。フローセルを通過する成分の特定波長における吸光度と時間から二次元データが得られます。

フォトダイオードアレイ(PDA)は、どう違うのですか。

フローセルの後に分光させてそれぞれの波長における吸収スペクトル及び時間から、三次元データが得られます。一度で最適な検出波長を求めることができ、スペクトルによる同定に便利です。



最適な検出波長とは、目的成分の最大吸収波長付近に決定するのが基本です。イオン性物質は溶離液のpHによって、吸収スペクトルが変わります。実際に使う溶離液中での吸収スペクトルを把握しておきます。

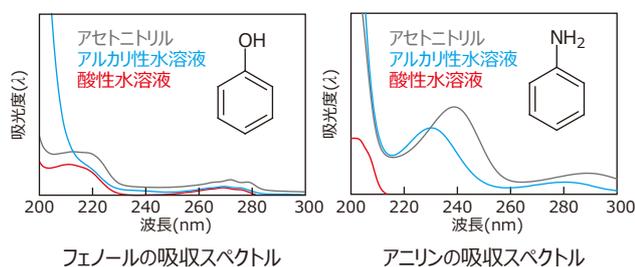
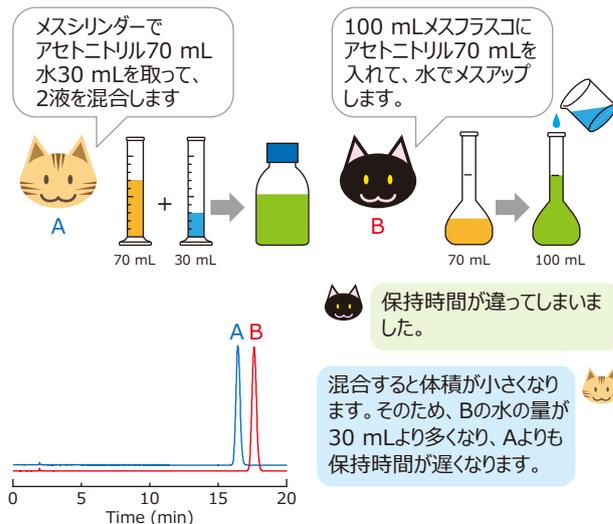


Fig.7 溶液中における吸収スペクトル

## ■ 溶離液の調製

アセトニトリルと水を7対3の割合で調製します。



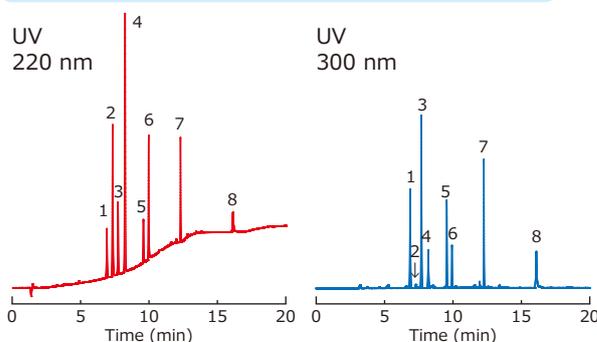
[Analytical conditions]  
Column: L-column ODS, 5  $\mu$ m; Size: 4.6 mm I.D., 150 mm L.  
Flow rate: 1 mL/min; Temp.: 40°C; Detection: UV 254 nm  
Sample: p-Terphenyl

Fig.6 調製方法の違いとクロマトグラム

溶離液の調製手順は正確に明記することで、再現性のよい結果が得られます。またアセトニトリルと水を混合すると吸熱反応により温度が下がります。メタノールと水を混合すると発熱反応により温度が上がります。混合後しばらく放置してから使用します。

Fig.8は、ゴム製品に使われるアミン系老化防止剤の分析です。グラジエント溶離法では、検出波長が220 nmにおいて溶離液の組成の変化でベースラインが右上がりになりますが、各成分が感度よく検出されています。300 nmにすると、ベースラインは安定しますが、小さくなるピークがあります。

保持時間の確認ならピークが高い方が有利で、微量成分の定量はベースラインが安定していた方が有利です。分析の目的に合わせ、かつ目的成分が吸収のある波長を選択します。



[Analytical conditions]  
Column: L-column2 ODS, 3  $\mu$ m; Size: 4.6 mm I.D., 150 mm L.  
Eluent: A: 10 mM CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> in CH<sub>3</sub>CN, B: 10 mM CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> in H<sub>2</sub>O  
A/B, 50/50-100/0-100/0 (0-10-20 min)  
Flow rate: 1 mL/min; Temp.: 40°C; ; Detection: UV 220 nm, 300 nm  
Inj. vol.: 10  $\mu$ L; Sample: 老化防止剤  
1. IPPD; 2. ETMDQ; 3. DPPD; 4. PAN  
5. N-(1,3-Dimethylbutyl)-N'-phenyl-p-phenylenediamine; 6. DNPD;  
7. 4,4'-Bis(a,a-dimethylbenzyl) diphenylamine; 8. ODPA

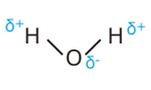
Fig.8 検出波長の違い

# 分析する物質の性質を知る

## ■ 極性

極性物質とは、物質の成分原子としてO, N, Clなどの電気陰性度の大きな原子を含み、電荷の偏りが生じ、正負の電荷の重心が一致しない物質です。

逆相クロマトグラフィーの場合、非極性物質は、保持時間が大きくなります。カラムから確実に溶出するように、有機溶媒比率を高くする、又は、極性の低い有機溶媒を用います。

極性物質	非極性物質
例: H <sub>2</sub> O 	例: CH <sub>4</sub> 
親水性、極性溶媒に可溶	疎水性、疎水性溶媒に可溶
[極性: 高] 水>メタノール>アセトニトリル>THF>ヘキサン [低]	

## ■ 分配係数(Pow)

物質の疎水性を表す値に分配係数があります。水と1-オクタノールの二相の溶媒への分配比率から求められます。log Powが大きいと物質の疎水性は大きくなります。

逆相クロマトグラフィーの場合、log Powが大きい物質は、保持時間が大きくなります。カラムから確実に溶出するように、有機溶媒比率を高くする、又は、極性の低い有機溶媒を用います。

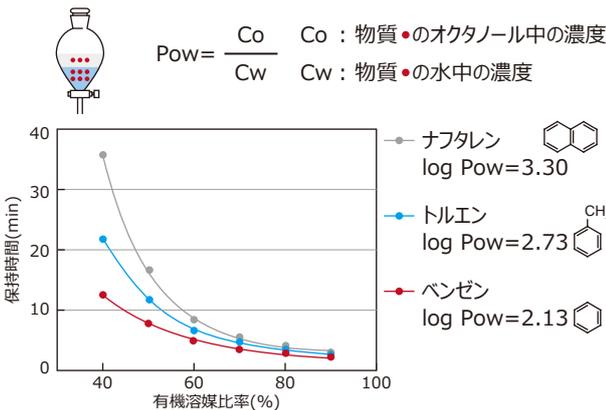


Fig.9 有機溶媒比率とlog Powの異なる物質の保持時間

## ■ イオン性物質(解離性物質)

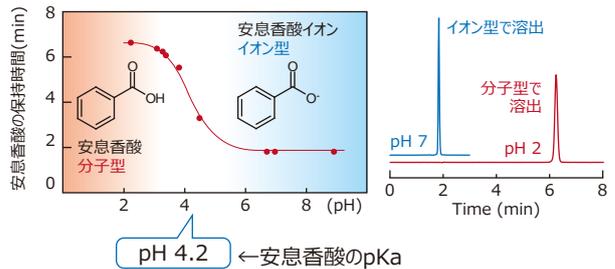
イオン性物質は、溶液中で解離しやすい物質です。溶液中では解離によって生じたイオン型と解離していない分子型が、平衡を保ちながら共存しています。

酸性物質	塩基性物質
pKa(酸解離定数)より高いpHで、イオン型が多く存在 → 保持が弱い	pKa(酸解離定数)より高いpHで、分子型が多く存在 → 保持が強い
低いpHで、分子型が多く存在 → 保持が強い	低いpHで、イオン型が多く存在 → 保持が弱い
主な官能基: 芳香族水酸基 -OH	主な官能基: 第一級アミン -NH <sub>2</sub>
リン酸基 -PO <sub>3</sub> H	第二級アミン -NH
カルボキシル基 -COOH	第三級アミン -N-
スルホ基 -SO <sub>3</sub> H	第四級アンモニウム -N+-

LC TR Vol.12

イオン性物質の場合、保持時間やピーク形状の再現性をよくするために、溶離液に緩衝液を用いて、目的成分の解離状態を一定にして分析します。

例えば、安息香酸(pKa=4.2)は、pH 4.2より高いpHで安息香酸イオンが多く存在し、pH 4.2より低いpHで安息香酸分子が多く存在します。



[Analytical conditions]  
 Column: L-column ODS, 5 μm; Size: 4.6 mm I.D., 150 mm L.  
 Eluent: CH<sub>3</sub>CN/Aqueous solution (25/75)  
 Flow rate: 1 mL/min; Temp.: 40°C; Detection: UV 254 nm

Fig.10 pHと保持時間(安息香酸)

LC TR Vol.12

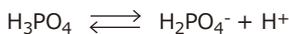
緩衝液のpHを変えることで、イオン性物質の保持時間をコントロールすることができます。

# 緩衝液

緩衝液って何ですか。

緩衝液とは、弱酸とその共役塩基(弱塩基と共役酸)との混合溶液で、酸又は塩基を加えたとき、pHをあまり大きく変化させないような溶液です。

例えば、リン酸は溶液中で次のような平衡状態にあります。



平衡定数Kaは、以下のように示されます。

$$Ka = \frac{[H_2PO_4^-][H^+]}{[H_3PO_4]} \quad pH = pKa + \log \frac{[H_2PO_4^-]}{[H_3PO_4]}$$

[ ]内: 各成分の濃度

つまり、pHを「1」変えるには、リン酸分子とリン酸イオンの濃度を10倍変えなければいけません。酸や塩基を加えても、溶液のpHはあまり変化しない、ということです。

このような働きを「緩衝作用」、その作用を示す尺度を「緩衝能」といい、緩衝能のある溶液を「緩衝液」といいます。

リン酸は緩衝能範囲が広く、低波長でUV吸収が低いので、緩衝液として、頻りに使われます。

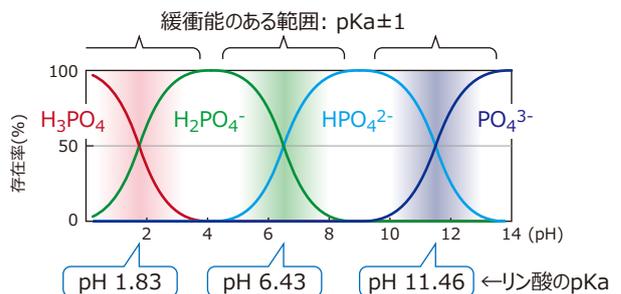


Fig.11 イオン型と分子型の存在率(リン酸)

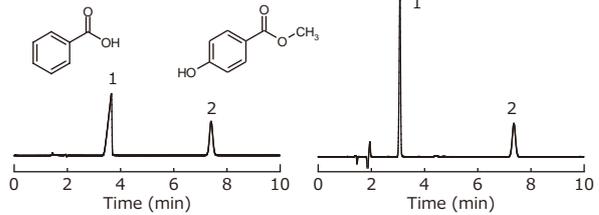
🐱 リン酸は緩衝能範囲が広いですね。どのpHでも使えるのですか。

いいえ。例えば、pH 4付近では緩衝能がありません。緩衝能のないpHでは、Fig.12の左のクロマトグラムの安息香酸のように、ピークが歪んでしまいます。

緩衝能のあるpHで使用しましょう。

緩衝能なし 20 mM リン酸溶液 pH 4.4  
緩衝能あり 20 mM 酢酸溶液 pH 4.4

1. 安息香酸(pKa=4.2) 2. メチルバラベン(pKa=8.5)



[Analytical conditions]  
Column: L-column2 ODS, 5 μm; Size: 4.6 mm I.D., 150 mm L.  
Eluent: CH<sub>3</sub>CN/Aqueous solution (25/75)  
Flow rate: 1 mL/min; Detection: UV 254 nm

Fig.12 緩衝能の有無とクロマトグラム

LC TR Vol.10

## 応用(塩基性物質の分析)

塩基性医薬品のプロプラノロール(pKa=9.45)は、pH 9.45より高いpHでプロプラノロール分子が多く存在し、pH 9.45より低いpHでプロプラノロールイオンが多く存在します。

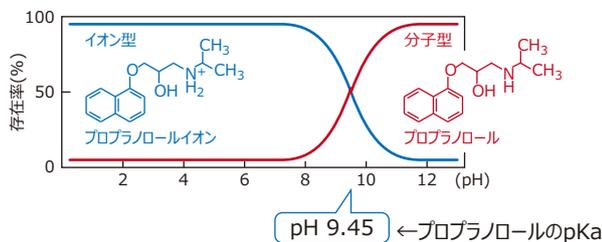
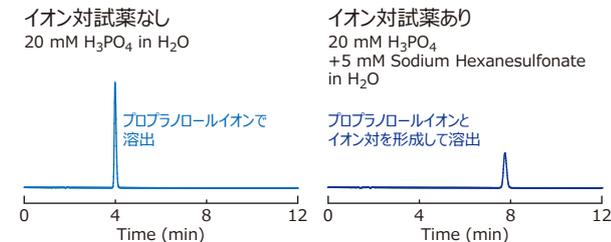


Fig.13 イオン型と分子型の存在率(プロプラノロール)

一般的な市販カラムの使用可能なpH範囲では、塩基性物質はイオン型で分析するしかありません。イオン型では保持が弱いので、イオン対試薬を添加して保持を強めます。



[Analytical conditions]  
Column: L-column ODS, 5 μm; Size: 4.6 mm I.D., 150 mm L.  
Eluent: CH<sub>3</sub>CN/Aqueous solution (30/70)  
Flow rate: 1 mL/min; Temp.: 40°C; Detection: 220 nm

Fig.14 pHと保持時間(プロプラノロール)

LC TR Vol.12

🐱 塩基性物質は分子型として分析できないんですか。

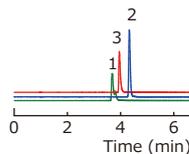
いいえ。高pHで耐久性のあるカラムを使えば、分子型として分析できるので、保持が強くなります。

pH 12まで使用できる L-column3 を使用した例を紹介します

L-column3 なら、単純な溶離液組成で、シャープなピークが得られます。いままでにない、新たな分析の可能性が広がります。

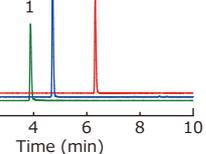
pH 7  
5 mM CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> in H<sub>2</sub>O

イオン型で溶出



pH 10  
5 mM NH<sub>3</sub> in H<sub>2</sub>O

分子型で溶出



[Analytical conditions]  
Column: L-column3 C18, 2 μm; Size: 2.1 mm I.D., 100 mm L.  
Eluent: A)CH<sub>3</sub>CN, B) Aqueous solution; A/B, 0/100-50/50 (0-10 min)  
Flow rate: 0.3 mL/min; Temp.: 40°C  
Inj. vol.: 0.5 μL; Detection: ESI-MS/MS(+)  
Sample: 1. Famotidine; 2. Cimetidine; 3. Ranitidine

Fig.15 抗潰瘍剤(H<sub>2</sub>ブロッカー)

Application No.3018

🐱 これで一人で分析できますね。

カラム温度や注入量など、まだまだ大事な項目があります。下記の文献などを参考にしてみてください。

🐱 …はい。

\*\*\*\*\*

### 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

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。

**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@cerij.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