

クロマトグラフィーの基礎

藤 崎 真 一

1 クロマトグラフィーの原理

1.1 クロマトグラフィーとは

クロマトグラフィーとは、混合物（試料）と固定相・移動相との相互作用の差異を利用して、混合物を分離・検出する手法である。固定相と移動相は、それらの界面を隔てて接触しており、一定の状態に変化しない平衡状態にある。川に例えると、固定相が川底で、移動相が流れている水である。クロマトグラフィーでは、このように、分離の場が二つの相に分かれており、一方を固定相（動かない相）と呼び、他方を移動相（一方向に一定速度で動く）と呼ぶ。クロマトグラフィーの創始者はロシアの植物学者 M. Tswett と言われており、Tswett はガラス管に炭酸カルシウムを詰め、葉緑素に石油エーテルを流して着色した層を分離し、これを「クロマトグラフィー」と命名した¹⁾。

1.2 液体クロマトグラフィーとは

液体クロマトグラフィー（liquid chromatography, LC）とは、液体を移動相として用いるクロマトグラフィーである。また、固定相としては、固体もしくは固体表面に官能基を化学結合させた細かい粒子（充填剤）が用いられる。これを円筒管に充填したものをカラムと呼ぶ。試料としては、基本的には、移動相中で安定に溶解できる物質が使用可能である。液体クロマトグラフィーは、ガスクロマトグラフィーで分析できない不揮発性物質や熱分解しやすい物質も分析できることが利点である。また、試料はカラムに液体の状態を導入する。

1.3 カラムによる分離とシステム構成

カラムを用いた分離の過程を説明する。移動相をカラム入口から導入すると試料中の各成分は、カラム内の固定相と移動相との間で様々な相互作用の影響を受け、下流に早く到達するもの、もしくはカラム内部に留まりなかなか移動しないものに分かれるため、移動速度に差が

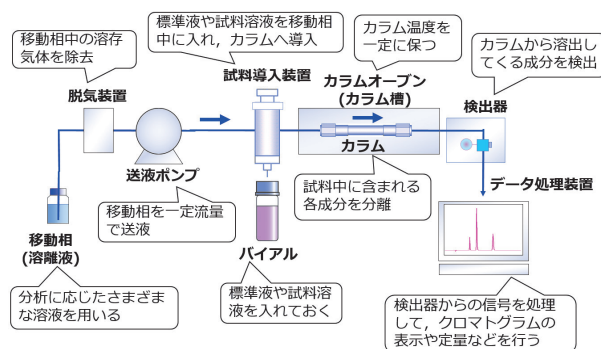


図1 HPLCで用いられる装置構成

生じる。例えばカラム出口に試料濃度に応答する検出器を設置しその信号をモニターすると、カラムに注入された混合物が各成分に分離され、異なる時間に溶出することがリアルタイムで測定できる。横軸に時間、縦軸に試料濃度を取ってプロットした波形をクロマトグラム、各成分で構成されるガウス分布形状をピークと呼ぶ。分離能向上を目的としたカラム充填剤の微粒子化に伴い、カラムで生じる圧力が上昇し、移動相を専用ポンプで送液するシステムが誕生した。高速液体クロマトグラフ（high-performance liquid chromatograph, HPLC）の装置構成の一例を図1に示す。通常、移動相は送液ポンプにより、最下流の検出器まで一定速度で送られる。また、試料導入装置により、複数成分が混合した試料がカラムに注入され、分離が行われる。カラム出口に接続した検出器で分離された試料をモニターし、各成分の定性・定量が可能である。

2 クロマトグラムの読み方

ここでは、クロマトグラムから求められる各種のパラメーター（第十八改正日本薬局方第一追補²⁾に準ずる）について解説する。詳細は日本薬局方を参照のこと。

保持時間 (t_R)

試料の注入から溶出した試料の最大ピークまでの経過時間。

保持容量 (V_R)

次式によって定義される, ある成分が, 溶出するために必要な移動相の容量.

$$V_R = t_R \times F$$

t_R : 保持時間

F : 流量 (mL/min)

ホールドアップタイム (t_M)

カラムに保持されない成分の溶出に必要な時間.

ホールドアップボリューム (V_M)

次式によって定義される, カラムに保持されない成分の溶出に必要な移動相の容量.

$$V_M = t_M \times F$$

t_M : ホールドアップタイム

F : 流量 (mL/min)

保持係数 (k)

次式によって定義され, 試料が固定相にどの程度強く保持したかを表す.

$$k = (t_R - t_M) / t_M$$

t_R : 保持時間

t_M : ホールドアップタイム

分離係数 (α)

次式によって定義される, 隣り合う二つのピークから計算された保持比.

$$\alpha = k_2 / k_1$$

k_1 : 最初のピークの保持係数

k_2 : 2 番目のピークの保持係数

分離度 (R_s)

次式によって定義される, 二つのピークがどの程度分離しているかを示すパラメーター.

$$R_s = 1.18 (t_{R2} - t_{R1}) / (w_{h1} + w_{h2})$$

t_{R1}, t_{R2} : それぞれのピークの保持時間. ただし, $t_{R1} > t_{R2}$

w_{h1}, w_{h2} : それぞれのピークの高さの midpoint におけるピーク幅

理論段数 (N)

次式によって定義される, カラム性能 (カラム効率) を示す数値.

$$N = 5.54 (t_R / w_h)^2$$

t_R : 被検成分のピークの保持時間

w_h : ピークの高さの midpoint におけるピーク幅

理論段高さ (H)

次式によって定義される, カラムの長さ と理論段数の

比.

$$H = L / N$$

L : カラム長さ (μm)

N : 理論段数

シンメトリー係数 (AS)

次式によって定義される, クロマトグラム上のピークの対称性の度合いを示すもの.

$$AS = W_{0.05} / 2d$$

$W_{0.05}$: ピークの基線からピーク高さの 1/20 の高さにおけるピーク幅

d : $W_{0.05}$ のピーク幅をピークの頂点から横軸へ下ろした垂線で二分したときのピークの立ち上がり側の距離

SN 比 (S/N)

次式によって定義される, ピーク高さとノイズ幅の比率.

$$S/N = 2H/h$$

H : 対象物質のピークの基線 (バックグラウンドノイズの中央値) からのピーク高さ

h : 対象物質のピークの前後における試料溶媒又は溶媒ブランクのクロマトグラムのバックグラウンドノイズの幅

3 液体クロマトグラフィー用吸光度検出器の原理

3.1 吸光度検出法の原理

ここでは, LC クロマトグラムの取得に用いられる代表的な検出法である吸光度検出法について述べる. 分析対象成分において有機化合物は, 紫外から可視の波長領域にて光を吸収するが, その吸収の波長帯は分子構造の違い等に依存する. 吸光度検出器は, セル部において, 移動相に溶解した分析対象成分に特定波長の光を照射し, 成分 (吸光物質) 通過前後での光の減少度合いを測定する.

3.2 吸光度検出器の構造

HPLC において最も汎用的に用いられる, 紫外可視吸光度検出器 (UV-VIS 検出器) とフォトダイオードアレイ検出器 (photodiode array detector, PDA 検出器) の構造を, それぞれ図 2 及び図 3 に示す. UV-VIS 検出器では, 光源のランプから射出された光は, 回折格子 (グレーティング) により特定の波長の光に分光される. その後, リファレンス側とサンプル側へ分割され, 一方は, リファレンス側の検出器へ, 他方は, セルを通過しサンプル側の検出器へ照射される. 吸光度はセルを通過した光量とリファレンスの光量から検出器内部で算出さ

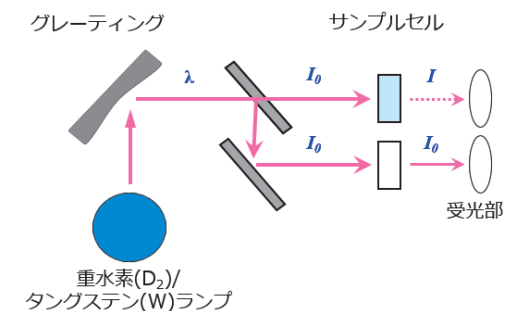


図2 紫外可視吸光度検出器（UV-VIS 検出器）の構造

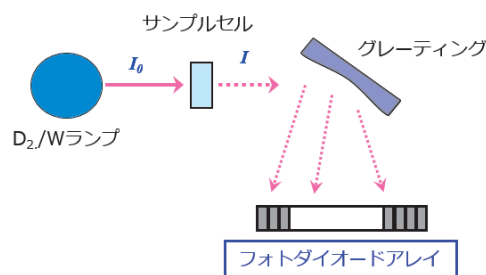


図3 フォトダイオードアレイ検出器（PDA 検出器）の構造

れ、データ処理装置に出力される。UV-VIS 検出器から得られるクロマトグラムは、特定の波長における時間と分析対象成分濃度（吸光度）の二次元情報である。一方、PDA 検出器においては、ランプから射出された光はセルの通過後に分光される。PDA 検出器ではリアルタイムで UV スペクトルを取得していることとなり、得られるデータは時間、波長、分析対象成分濃度（吸光度）の三次元情報である。

3.3 スペクトルによる定性能力の向上

3.2にて述べた通り、PDA 検出器を用いることで、分析対象成分の三次元のデータを得ることができる（図4）。例えば、横軸を時間、縦軸を吸光度とすると特定波長でのクロマトグラム（図4上）を描画することができ、ま

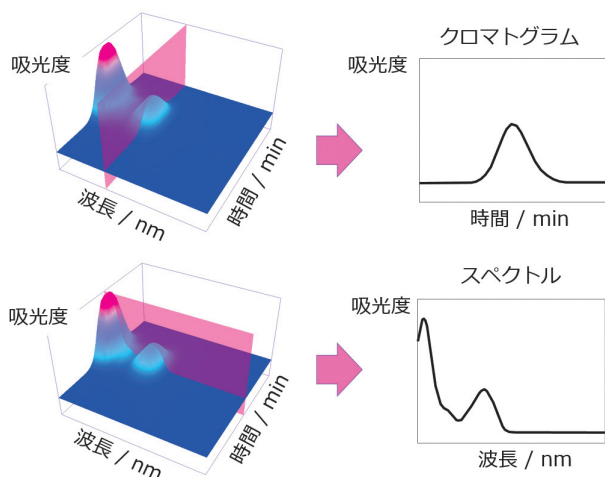


図4 PDA 検出器で得られるクロマトグラム及びスペクトル

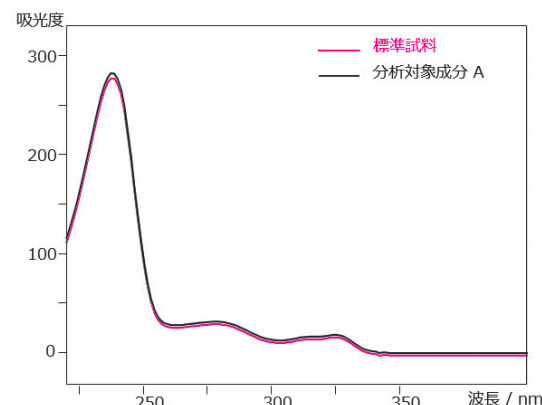
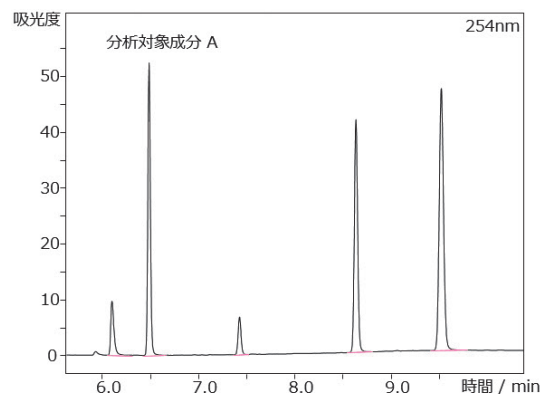


図5 スペクトルを用いたピーク同定（上：分析対象成分 A のクロマトグラム、下：分析対象成分 A の標準試料のスペクトルによる同定）

た、横軸を波長とすると、特定時刻でのスペクトル（図4下）を描画できる。UV-VIS 検出器を用いた場合、ピークの定性情報は保持時間のみであるが、PDA 検出器では、保持時間に加え、標準試料のスペクトルと検出された成分のスペクトルの比較が可能（図5）なため、ピーク同定能力の向上が可能である。また、標準試料のスペクトルを事前に登録しデータベースを構築し、検出されたピークの UV スペクトルとの一致度を検索することもできる。

4 定性・定量について

4.1 定性・定量とは

定性とは試料溶液中にどのような成分が含まれているかを調べることであり、HPLC においては、標準試料のピーク保持時間との一致度で定性を行い、先述の通り UV スペクトルによる補完も可能である。また、定量とは、試料溶液中に含まれる成分の量を求めることである。定量は、検出器の信号強度（UV 検出の場合、特定波長のクロマトグラムのピーク高さや面積値）に基づき実施される。濃度既知の標準試料を分析し、そのピーク面積値と試料濃度との関係を求める。この関係を表したグラフは検量線と呼ばれ、目的成分の定量はこの検量線に基づいて行われる。

4.2 検量線（外部標準法）に基づく定量手順

外部標準法とは、濃度既知の標準試料で検量線を作成し、未知試料を定量する方法である。外部標準法による定量順序を下記に示す。

- ①標準試料を複数段階の濃度に調製した後分析し、ピーク面積値を測定する。
- ②標準試料の濃度を横軸に、ピーク面積値を縦軸に取り、図6に示す検量線を作成する。多くの場合、最小二乗法による直線近似が用いられる。
※単一濃度の標準試料で作成した検量線を1点検量線、 n 個の濃度で作成した検量線を「 n 点検量線」と呼ぶ。
- ③試料溶液（濃度未知）を分析し、ピーク面積値を測定する。
※このときの分析条件は、標準試料の分析条件と同じ。
- ④ピーク面積値（検量線の縦軸）から目的成分の濃度（検量線の横軸）を算出する。

正確な定量結果を得るために、検量線の直線性は事前に評価されるべきである。また、目的成分の定量は、直線性が確認された濃度範囲内にて行う必要がある。外挿（検量線の範囲外での計算）は避け、目的成分の濃度が検量線の濃度範囲を逸脱した場合は、試料を希釈する等して検量線の濃度範囲内に収まるよう再測定する。

外部標準法以外にも、標準試料で検量線を作成する際に内部標準物質を一定量添加し、測定対象成分と内部標準物質のピーク面積比を基に検量線を作成し定量を行う、内部標準法という定量手法も存在する。対象成分や試料中の夾雑成分のピークと保持時間が重複しない内部

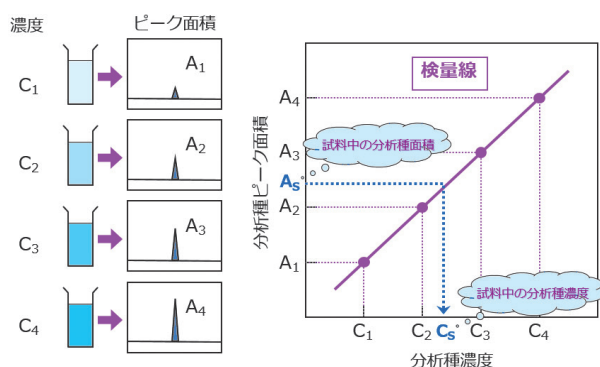


図6 検量線（外部標準法）

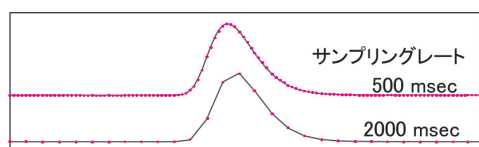


図7 サンプリングレートとピーク形状

標準物質の選定が必要だが、注入量誤差の影響を排除できる等の利点がある。

5 データ採取・解析時の留意点

5.1 サンプリングレート及び時定数が定量値に与える影響

「サンプリングレート」は、検出器から送られてきた信号を、データ処理装置が受け取る頻度を定めるパラメーターである。サンプリングレートの周期が長い場合、検出器からの信号変化を追従できなくなり、ピーク形状がいびつになる（図7）。一方で、サンプリングレートの周期を短くすると、ピーク形状が滑らかになり、幅の狭いシャープなピークも検出できるようになる。ただし、不必要に短くし過ぎるとデータ容量が過剰になるため、定量結果に影響しない適切なサンプリングレートを選択する必要がある。ピーク成分の正確な定量には、一つのピークに対して20～30点程のデータ取得が望ましい。したがって、検出されたピークの中で、最も幅の狭いピークについて、ピーク幅の1/20～1/30程度となるように設定するのが適切である。

「時定数」は、検出器信号のデジタルフィルタ処理性能のパラメーターである。信号の応答速度に関与するため、ピークやバックグラウンドノイズの形状を変化させる。適切に設定すれば、バックグラウンドノイズを低減し良好なSN比を得ることができる。図8に時定数が50 msec、1500 msecでのクロマトグラムを示す。時定数が大きい場合バックグラウンドノイズは低減するが、その反面ピーク形状が悪化し分離が悪くなる。特に高速高分離分析の場合は、必要な分離が得られる範囲でバックグラウンドノイズを考慮しながら時定数を設定することが好ましい。

5.2 波形処理が定量値に与える影響

クロマトグラムに対して適切な波形処理を適用することで、目的成分ピークを抽出し、そのピークから得られる情報を解析することができる。波形処理は、目的成分の定性・定量や不純物の検出等の用途において、測定されたクロマトグラムから正確な情報を得るために必要なステップである。例えば、医薬品の品質管理において、

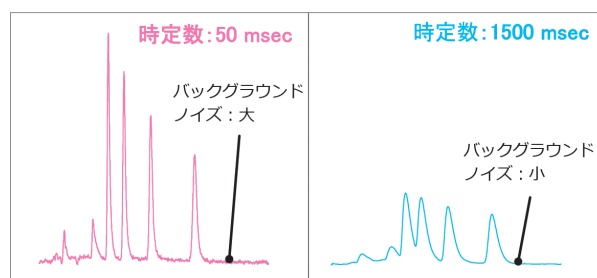


図8 時定数とピーク形状

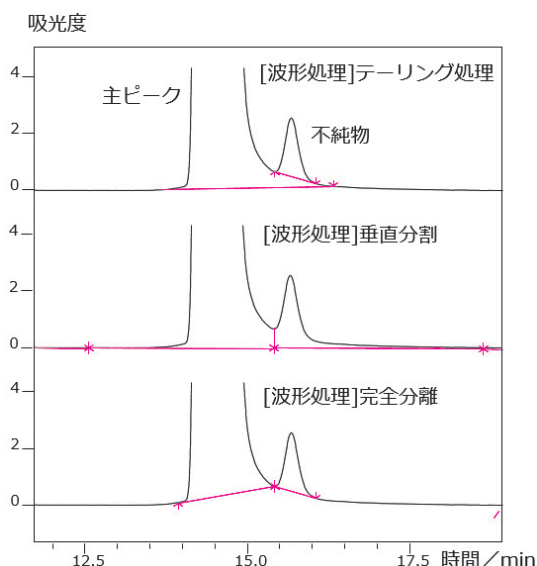


図9 不純物ピークに対する波形処理

表1 不純物ピークに対する定量結果（面積百分率法）

	テーリング処理	垂直分割	完全分離
Main Peak	99.840	99.704	99.839
Impurity	0.160	0.296	0.161

不純物ピークはしばしば主ピークの裾野に表れるため、不純物ピークを波形処理し、正しく検出することは不純物の正確な定量のために重要である。図9及び表1に不純物ピークの波形処理の違いが不純物の定量値（面積百分率法）に与える影響を示す。波形処理は、目的によって適切に選択する必要があるが、波形処理の違いが定量結果に影響を及ぼす可能性があることを理解することは重要である。

5.3 未分離ピークが定量値に及ぼす影響

試料溶液中のある成分の定量を目的として分析した際に、図10（上）のような各成分が未分離の状態のクロマトグラムが得られることがある。各成分が未分離の状態では、正確な面積値が得られないため、定量の信頼性を確保することが困難である。この場合、各ピークの分離を改善するため、移動相やカラムや各種LCパラメーター（グラジエント条件やオープン温度等）を変更し、分離を再検討することが望ましい。一方で、分析条件の変更には試験法の再バリデーションが必要とされる場合や、そもそも試験法の変更が認められていない場合など、試験法の変更は必ずしも有効な手段ではない。これに対し、PDA検出器の三次元データを活用した新しいデータ解析手法として、i-PDeA II（Intelligent Peak Deconvolution Analysis II）の適用³⁾⁴⁾が考えられる。i-PDeA IIとは multivariate curve resolution alternating least squares（MCR-ALS）法によるデコンボリューション

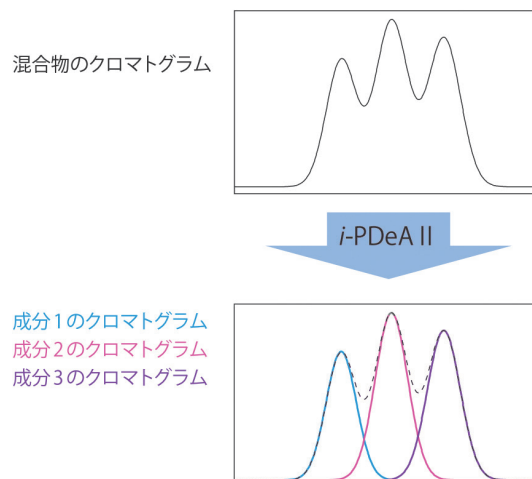


図10 i-PDeA IIで得られるクロマトグラム

ン機能で、PDA検出器で取得したデータについて、カラムでの分離が困難な複数成分が重なったピークを各成分ピークに分離する機能である（図10下）。本機能を活用することで未分離ピークの検出が可能となり、分離検討に要する時間を削減したり、定量を補完したりする役割を果たすことが可能である。未分離ピークの視覚化以外にも、高濃度成分のテーリング上に溶出する微小ピークの検出や定量等への活用も期待される⁵⁾。

6 まとめ

クロマトグラフィーの原理と読み方、定量・定性及びデータ解析について概要を述べると共に、新技術についても解説を加えた。分析化学者のクロマトグラフィーの更なる活用のきっかけになれば幸いである。

文 献

- 1) K Sakadynsky. : *J. Chromatogr.*, **49**, 2 (1970).
- 2) 厚生労働省：第十八改正日本薬局方第一追補（<https://www.pmda.go.jp/rs-std-jp/standards-development/jp/0192.html>）, (accessed 2023.9.29).
- 3) 柳沢年伸：フォトダイオードアレイ検出器の新しい分析手法 i-PDeA II の原理と概要（https://www.an.shimadzu.co.jp/sites/an.shimadzu.co.jp/files/pim/pim_document_file/an_jp/technical/technical_reports/19781/c190-0400.pdf）, (accessed 2023.9.29).
- 4) S. Arasea, K. Horie, T. Kato, A. Noda, Y. Mito, M. Takahashi, T Yanagisawa : *J. Chromatogr. A*, **1496**, 35 (2016).
- 5) D. Vecchietti, A. Nishio, Y. Fujita, T. Yoshida, T. Yanagisawa, D. Kou : *J. Chromatogr. A*, **1678**, 463364 (2022).



藤崎 真一（FUJISAKI Shinichi）
株式会社島津製作所分析計測事業部ライフサイエンス事業統括部 LC ビジネスユニット。（〒604-8511 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1）。大阪大学大学院基礎工学研究科機能創成専攻修士課程。修士。《現在の研究テーマ》分析法開発支援ソフトウェアの開発。《趣味》海外旅行。