

装 置

工場での大規模な分取用クロマトグラフから、反応の進行を調べる小さな薄層クロマトグラフまで、クロマトグラフィーは汎用性の高い分析法の一つで、対象となる化合物はきわめて広範である。中でも高速液体クロマトグラフィー（HPLC）は、LC と言えば HPLC を指すようになっているほど汎用されている。生体から得られる試料の多くが水溶性物質であり、食品、医薬品などでも水溶性化合物を対象とする場合、水を主たる移動相とする逆相 HPLC が最も汎用されている。今年のミニファイルは、第 1 回と、第 2 回は HPLC の装置について、第 3 回以降は、HPLC を中心に、分析の対象となる化合物群ごとに、参考となる資料をまとめることにした。

取り上げる化合物は、分析される頻度が高いもの、あるいは、最近注目されている化合物を主とする。また、新たに開発されたカラム（固定相）や、新しい（より高感度な）検出法があるときは、それらも記載することにした。

クロマトグラフィーを装置の面から分類すると、表 1 のようになる。

HPLC 装置はポンプとサンプル注入装置、カラム、検出器、記録装置があれば、最低限のことはできる。カラムの温度を一定に保つ必要がある場合には恒温槽が必要になるし、分析の途中で溶媒組成を変えること（グラジエント溶出）が必要なら、そのための仕組みが必要となる。最近では、ポンプ単体に

表 1 ファインセラミックス用微粉末の化学分析方法規格（JIS）

クロマトグラフ法の名称	装 置	備考
ガスクロマトグラフィー (GC 複合装置)	ガスクロマトグラフ GC/MS など	
液体クロマトグラフィー (LC 複合装置)	高速液体クロマトグラフ (HPLC) 常圧液体カラムクロマトグラフ 専用液体クロマトグラフ LC/MS など	1) 2)
薄層クロマトグラフィー		3), 4)
超臨界流体クロマトグラフィー	超臨界流体クロマトグラフ	
その他 ペーパークロマトグラフィー 向流分配クロマトグラフィー 遠心クロマトグラフィー	向流分配クロマトグラフ 遠心クロマトグラフ	5)

備考 1) 大気圧、またはベリスタポンプなどを使用。2) アミノ酸分析計、糖分析計、イオンクロマトグラフ、分取専用装置など。3) 様々な担体の薄層と展開槽を使用。高分離能を有する。4) 高性能薄層クロマトグラフィー（HPTLC）もある。5) 濾紙と展開槽を使用。

も簡単な制御機構を備えているものが多い。また、システムコントローラーを備え、試料の自動注入（オートサンプラーが必要）、および複数台のポンプの流量や検出器の条件設定などもプログラミングできる装置もある。

以下に HPLC 装置の基本となるポンプ、検出器などについて簡単にまとめる。

1 ポンプ

ポンプは、吐出流量の違いによって 4 タイプある。0.1 μl～数 10 μl/min くらいの微量の送液を安定して実現する目的で作られたマイクロポンプ、あるいはこれよりもやや流量の多いセミマイクロ流量ポンプ、1 ml/min の流速を中心とした通常のポンプ、分取（ときに、カラムの充填）を目的とする 10 ml/min 以上（～1000 ml/min）の分取用ポンプがある。金属イオンの影響を避けるために、イナーナ仕様という、送液部分に金属の使用を廃したものが多く見られるようになった。

2 試料注入装置

試料注入装置は、Rheodyne 社のロータリーバルブがほとんど独占状態で、自動注入装置（オートサンプラー）にも、同社の製品が使用されていることが多い。

3 カラム

カラムは分析目的に応じて固定相を選択する。内径 4～4.6 mm、長さ 15 cm のステンレス製カラムに ODS (octadecyl silica gel) が充填された逆相カラムを使用することが多い。ODS も、基材のシリカゲル、オクタデシル基の導入法、残存シラノール基の処理法により、耐 pH 域や保持が異なる。また、最近ではプラスチックビーズに疎水性基を導入して、高い pH の溶離液を用いることができるものもある。アルキル鎖も、メチル基、オクチル基、C30 基、あるいはフェニル基など疎水性基の構造が異なる固定相も入手できる。また、粒状の固定相ではなく、ポーラスな円柱状に担体の形状を成形したものは、低圧でよい分離を示すとして歓迎されている。

金属イオンの影響を嫌う場合には、ステンレス製ではなく、PEEK 製のカラムもある。

極性基を有する固定相としては、アミノプロピル基、ジオール基、ニトリル基を導入したシリカゲルがある。その他、耐圧性はあまり高くはないが、ポリアクリレートに種々のタンパク質を結合させたもの、光学異性体の分離を目的としたカラムや、イオン交換能を利用する固定相もある。アフィニティークロマトグラフィー用の反応性結合基をもった担体も市販されている。

4 検出器

最も基本的な汎用検出器は紫外線（UV）検出器である。最

表2 主な HPLC 装置のメーカー、ラインアップと製品のホーム・ページ (必ずしもトップページではない)

メーカー	ポンプ				検出器 (備考)								ホーム・ページ
	マイクロ	セミマイクロ	通常	分取	UV	蛍光	化学発光	電気化学	電気伝導	示差屈折	旋光度, CD	MS	
日立ハイテック ジーンズ	—	○	○	—	○	—	—	—	—	—	—	○	www.hitachi-hitec.com/science/lc/lachrom_elite.html
日本分光	○	○	○	○	○	○	○	○	—	○	○	—	www.kagaku.com/jasco/
日本ウォーターズ	—	○	—	—	○	○	—	○	—	○	—	○	www.waters.co.jp/html/prod/
島津製作所	—	○	○	○	○	○	—	—	○	○	—	○	www.an.shimadzu.co.jp/products/lc/lc-vp/lc-vp.htm
昭和電工	—	—	○	—	○	○	—	○	○	○	—	—	www.sdk.co.jp/shodex/japanese/db:htm
横河アナリティカル システムズ	○	○	○	○	○	○	—	—	—	○	—	○	www.chem.agilent.com/cag/country/jp/products/pcol181.htm
東ソー	—	○	○	—	○	—	—	—	—	○	—	—	www.tosoh.co.jp/hp_inx.htm
資生堂	—	○	—	○	○	○	—	○	—	—	—	—	www.shiseido.co.jp/s9904hlc/html/indexp.htm
日本ダイオネクス	—	○	○	—	○	—	—	○	○	—	—	—	www.dionex.co.jp/seihin.html

近は、ホットダイオードアレイを用いた三次元クロマトグラムを描出することが可能な検出器も普及している。

ほかに、蛍光検出器、化学発光検出器、電気化学的検出器、示差屈折 (RI) 検出器、旋光度検出器、CD 検出器などがある。後述する質量分析器を検出器とする LC/MS の装置が普及し始めている。また、化合物によっては、ほとんど光吸収を示さないものもあり、この場合には化合物を事前に (プレカラム) 誘導体化したり、カラムによる分離後 (ポストカラム) に誘導体化を行うことがある。このためには、反応試薬を送液するためのポンプ、混合器、反応コイル (時に恒温装置も) が別途に必要となる。

5 デガッサー

ポンプの吸入時の陰圧、あるいは温度の変化によって溶離液中に溶存する空気から気泡が発生することがある。気泡の発生は送液、検出の障害となる。デガッサーは、溶離液内に溶存する気体を除去する目的で使用されるが、溶離液をフィルターメンブランで減圧下に汎過して用いる場合は不要であろう。特に、有機溶媒と水溶液の混合溶媒系を用いるときには有効である。デガッサーとしてはメンブランを用いるものが普及しているが、ヘリウムガスによる方法もある。

6 ハイフェネーテッド装置 (複合装置)

高分子や多くの成分の中から微量なものを検出し、確認するためには、質量分析器を検出器に用いる LC/MS がよい。また、ICP 検出器を利用する LC-ICP もある。いずれも HPLC 装置と検出器とをつなぐインターフェースの性能が重要である。

7 価格

ポンプはおよそ 60~100 万円、インジェクター部分が別売の場合、20 万円、オートサンプラーだと 100 万円、UV 検出

器が 80~100 万円くらいである。これにデータプロセッサーが必要であるが、同じメーカーのものであれば使いやすい反面、高価な場合もある。パソコンのソフトを用意している製品もある。グラジエント溶出、カラム恒温槽が必要となる場合には、各モジュールを制御するシステムコントローラーがあったほうが操作性はよくなるが、さらに高価になる。

アミノ酸分析計、糖分析計、イオンクロマトグラフなど、専用装置として販売されるものは、ルーチン分析に特化した仕様なので、経済性を比較することは難しい。

表2に主な HPLC 装置メーカーのポンプならびに検出器のラインアップの状況を示した。個々の装置の性能、仕様などは、記載のホームページを参照されたい。ウォーターズ社など、技術情報の充実した HP もあるので参考となる。

8 ミクロ化と今後の方向性

HPLC は、現在ミクロ化に向かっていると思われる。しかし、担体粒子径をこれ以上ミクロ化しても、送液する方法では単位長さあたりの理論段数の向上は期待できず、電場を利用して化合物を移動する方法である電気泳動法に分離法の原理を譲ることになる。

今後は同一の装置でマイクロ HPLC とキャピラリー電気泳動 (CE) のいずれも実施できるような汎用器に向かう可能性がある。別売の電気泳動装置を組み込むことで、CE を実現できる装置も現われている。

もう一つは、ハイフェネーテッド法の進展である。塩を用いない溶離液の使用を可能とする固定相の開発とインターフェースの精力的な開発があいまって、LC の検出器に MS を用いることは当たり前となってきた。今後は、LC/MS/MS のように、化合物の構造に関する情報を入手する方向に向かい、さらに分離性能と、定量性が追求されるようになるであろう。

[共立薬科大学 阿部芳廣]