

# HPLCとGCを上手に使用するための基礎科学

古屋 俊樹

HPLC (high performance liquid chromatography, 高速液体クロマトグラフィー)とGC (gas chromatography, ガスクロマトグラフィー)は混合物を各成分に分離する手法である。そもそもクロマトグラフィーとは何か。クロマトグラフィー (chromatography) はChromaとGraphosを組み合わせた語で、ギリシャ語でそれぞれ色と記録を意味する。1906年に、植物色素を分離するために開発したロシアの植物学者Tswettにより名づけられた。最初の使用例では炭酸カルシウムを詰めた管に石油エーテルを流して、植物色素を分離したとのことである<sup>1-3)</sup>。クロマトグラフィーでは、動かない相 (固定相) と一方向に流れる相 (移動相) の二相を利用して混合物を分離する。例として、AとBの二成分が含まれている混合物を考えよう (図1)。混合物を二相系の左端に導入する。すると、固定相に存在しやすい成分はそこに留まっていようとするために流されにくく、逆に移動相に存在しやすい成分は流されやすいため速く移動する。AとBは化学構造が異なる、すなわち物性が異なるので化合物固有の移動度を示す。図1では化合物Bの方が移動相に存在しやすい、もしくは固定相に存在しにくいことになる。分離したものを右端で待ち構えて検出すれば、Bの方が先に検出され、また量が多いことも容易にわかる。横軸に時間、縦軸に検出強度を示した図をクロマトグラムという (図1下)。

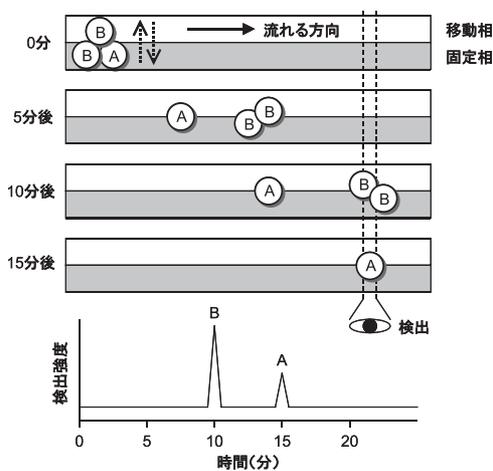


図1. クロマトグラフィーの原理

固定相と移動相の組合せにより多様なクロマトグラフィーが開発されているが、中でもHPLCとGCは汎用性が高く、特に開発・改良が進んでいる技術・装置で、有機化合物などを効率的に分析できる。その名の通り、HPLCは移動相に液体、GCは気体を利用することを特徴とし、固定相を内包するカラムに移動相を流して混合物を分離する。HPLCとGCでは分離の原理も異なり、前者は有機化合物の極性の違いを、後者は揮発性 (沸点) の違いを主に利用して分離する。装置の主要な箇所は共に、「移動相の流速を制御する部分 (HPLCの場合はポンプ、GCの場合はガスボンベと調整器)」「試料を導入する部分 (インジェクター)」「試料を分離する部分 (固定相を内包するカラム)」「試料を検出する部分 (ディテクター)」から構成されている。簡単にいうと、①カラムで分離して、②検出器で検出する、という原理である。HPLC、GCでは、いかに試料をきれいに分離し、いかに感度よく検出するかとの二点がとくに重要であり、これらの点を中心に解説する。

## カラムで分離する

試料をきれいに分離するためには、固定相と移動相の物理化学的性質や分離の原理を理解しておく必要がある。以下、HPLCとGCそれぞれについて説明する。

**HPLC** HPLCでもっとも頻繁に利用されている固定相は、オクタデシルシリル基を結合させたシリカゲルの粒子を充填したカラムで、ODSカラム (octadecylsilylの略) やC18カラム (炭素数18の意) と呼ばれている (図2)。オクタデシルシリル基の構造を見てわかるように疎水性の高い低極性の固定相で、試料中の有機化合物は疎水性相互作用によりカラムに保持される。よって、低極性の化合物ほどカラムに保持されやすくなるため、溶出が遅くなる。移動相には、極性化合物の水やメタノール、アセトニトリルなどを用いる。HPLC装置の種類により、一つの瓶に入っている移動相をポンプで流すタイプと、二つの瓶に入っている移動相をポンプで流して流路上で混合するタイプがある。前者では、水と有機溶媒 (メタノールやアセトニトリル) の比率を検討し、化合物のカラムへの保持を調節する。水より極性の低い有機

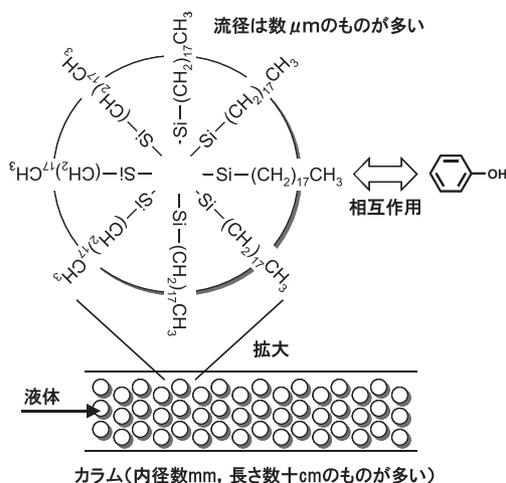


図2. ODSカラムの模式図

溶媒の比率が高いほど、化合物はカラムに保持されにくくなるため、溶出が早くなる。このように一定の比率の移動相を流す方法をイソクラティック溶出という。これに対して、二種類の移動相を流路上で混合するタイプでは、時間とともに有機溶媒の割合を高めることが可能であり(グラジエント溶出)、極性の大きく異なる化合物を効率的に溶出させることができる。試料をきれいに分離するためには、化合物の極性に応じて高極性の化合物から重なることなく順次溶出するように、移動相の比率を検討することが重要である。

移動相に関しては、pHを調節することも重要である。たとえば、カルボキシ基を有する酸性化合物は、移動相のpHが中性～塩基性領域だとH<sup>+</sup>を解離する。すると、化合物はマイナスの電荷を帯びた高極性のイオンとなり、低極性のカラムには保持されにくくなる。よって、ギ酸などを添加することにより移動相のpHを酸性領域に調節する必要がある。アミノ基を有する塩基性化合物を分析する場合には、逆のことを考慮する必要があるが、ODSカラムの基材であるシリカゲルは塩基性領域では溶解しやすく、カラムを使用可能なpH領域を説明書であらかじめ確認すべきである。

以上、ODSカラムについて説明したが、ODSカラムは低極性なので、アミノ酸や有機酸、糖のような高極性の化合物を分析する場合には、高極性カラムやイオン交換カラムが用いられ、各メーカーから多様なカラムが市販されている。たとえば、有機酸と糖の場合には、Shim-pack SCRカラム (Shimadzu社製) で分析できる。また、後述するように誘導体化してODSカラムで分析する方法もある。とくにアミノ酸の場合には、誘導体化して分析することが多い。

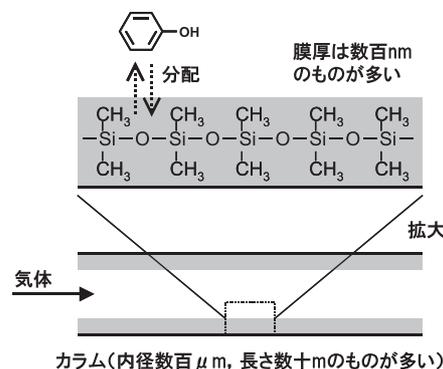


図3. ポリジメチルシロキサンをコーティングしたキャピラリーカラムの模式図

**GC** GCの固定相は、HPLCカラムのように粒子を充填したカラム (パックドカラム) と、固定相を内壁にコーティングしたカラム (キャピラリーカラム) の二種類がある。GCに関しても多様なカラムが市販されているが、有機化合物全般の分析にもっとも頻繁に利用されている固定相は、ポリジメチルシロキサンという液体の無極性高分子を内壁にコーティングしたキャピラリーカラムである(図3)。この場合、カラム内は気体と液体の二相からなり、試料中の有機化合物は気体の移動相と液体の固定相への分配を繰り返しながら移動する。ポリジメチルシロキサンは液体といっても、流動性が低く、内壁に結合されているのでカラムから流出してしまうことはない。分離の原理は、気化しない無極性溶媒に分析したい化合物が溶けている様子を思い浮かべるとわかりやすい。ある温度で、もしくは温度を上げていくと、揮発性の高い(あるいは沸点の低い)化合物から気化していく。GCではこのことがカラムの中で起こっており、揮発性の高い(沸点の低い)化合物ほど気体の移動相に分配されやすくなるため、溶出が早くなる。時間とともにカラムの温度を上げていくと、沸点の大きく異なる化合物を効率的に溶出させることができる。

移動相には一般に、不活性ガスであるヘリウムや窒素、アルゴンを用いる。不純物はカラムや検出に悪影響を及ぼすことがあるので、高純度のガスを用いる。酸素は反応性が高く高温でカラムに損傷を及ぼすので、空気への混入には注意する必要がある。起動時は、移動相の不活性ガスに充分置換してからカラムの温度を上げる。停止時も、カラムの温度が下がってから移動相の流れを停止する。

また、液体試料を分析する場合には、ある程度の量の溶媒も注入することになるが、溶媒としては、揮発性のメタノール、酢酸エチル、クロロホルム、ヘキサンなど

が用いられる。生体関連試料は水溶液のことがしばしばあるが、水に溶けている分析対象が低極性化合物の場合には、酢酸エチルなどの水と分かれる溶媒で抽出するか、固相抽出により溶媒置換して分析する。抽出困難な高極性化合物（低分子のアルコール、アルデヒド、ケトン、脂肪酸など）の場合には、後述の極性カラムで直接分析することも可能である。ただし、水溶液では、溶液が酸性や塩基性の場合や不揮発性の塩を含む場合には、カラムや装置に損傷を及ぼすので注意する必要がある<sup>2)</sup>。また、カラムの種類や分析条件によっても損傷を及ぼすことがあるので、水分分析の際はカラムの説明書や分析例をあらかじめ確認することも重要である。

GCでは、その原理から気化しない化合物を分析することはできない。とくに、アミノ酸や有機酸、糖のような高極性化合物は一般に気化しにくいので、後述するように誘導体化して分析する必要がある。また、気化する芳香族や脂肪族化合物でもカルボキシ基や多数のヒドロキシ基を有する極性化合物は、前述の無極性のポリジメチルシロキサンには保持されにくいためにピークが広がってしまう。この場合にも、誘導体化して分析する、もしくは極性カラムで分析することもできる。微～中極性のカラムとしてはポリジメチルシロキサンのメチル基をフェニル基に置換（5～50%）したものなどが、高極性のカラムとしてはポリエチレングリコールをコーティングしたもの（たとえば、DB-WAX, Agilent社製）が市販されている。極性カラムは、無極性カラムでは分離困難な沸点の近い化合物同士を分離する際にも有効なことがある。

### 検出器で検出する

試料を感度よく検出するためには、検出器の種類や検出の原理を理解しておく必要がある。以下、HPLCとGCそれぞれについて説明する。

**HPLC** 吸光度検出器は、化合物の光を吸収する性質に基づいて検出する装置で、HPLCでもっとも一般的に利用されている。光源ランプの種類（重水素ランプは主に紫外領域、タングステンランプは可視領域）や機種にもよるが、紫外から可視領域（200～800 nm）の吸光度を測定できる。しかしながら、すべての有機化合物がこの領域の光を吸収できるわけではない。たとえば、二重結合のないアルカンには吸収を示さない。化学構造中に、カルボニル基C=O、ベンゼン環、あるいは共役二重結合が存在するかが吸収を示すかどうかの目安になる。カルボニル基C=Oとベンゼン環は、単独では紫外領域に吸収を示す。共役二重結合とは、二重結合と単結

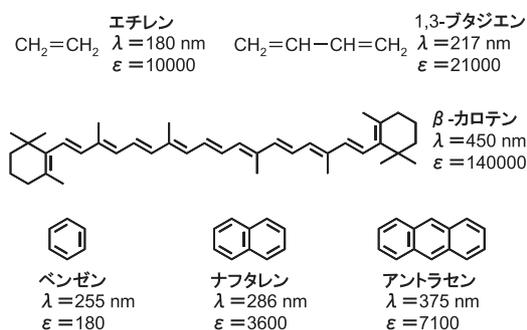


図4. 共役系化合物。λは吸収極大波長、εはモル吸光係数（ $\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ）を示す。

合の交互の繰り返し構造であり（ベンゼン環も共役二重結合からなる）、共役系が長いほど吸収波長が長くなる傾向にある（図4<sup>4)</sup>。これは、簡単にいうと、共役系の電子は動きやすい状態にあり、小さいエネルギーの光、すなわち長い波長の光を吸収して遷移できるためである。化合物がどの程度の量の光を吸収するかは、1 mol/L溶液の吸光度（モル吸光係数）で表すが、共役系が長いほど、この値が大きくなる傾向にある（図4<sup>4)</sup>。つまり、共役系が長い化合物は吸光度検出器で検出しやすい。

吸光度検出器では、一つもしくはいくつかの波長を選択して分析する。分析対象の化合物がどの波長の光をよく吸収するかを知るためには、文献を調べるか、移動相に溶かした化合物の吸収スペクトルを紫外可視分光光度計であらかじめ測定して、吸収極大波長を調べておくことよい。また、フォトダイオードアレイ検出器は高価だが、あらゆる波長を一度に分析でき、各時間に対応する吸収スペクトルを表示できるため便利である。

吸光度検出器では、移動相の光の吸収にも注意する必要がある。移動相の有機溶媒としてメタノールとアセトニトリルがよく用いられるが、一般的な試薬には紫外領域に吸収を示す不純物が含まれていることがあるので、HPLCグレードの試薬を用いる。また、メタノールはアセトニトリルと比較して安価だが、200～230 nmの低波長領域においては、メタノールは吸収を示すので、アセトニトリルを用いた方がバックグラウンドは小さくなる<sup>3)</sup>。

光の吸収が弱い有機化合物を分析する場合には、他の検出器で分析する必要がある。有機酸はカルボニル基を有するので吸光度検出器で分析できるが、環状の糖はカルボニル基も共役二重結合も含まないので、その分析には示差屈折率検出器がよく用いられる。示差屈折率検出器は、化合物の屈折率の違いに基づいて検出する装置で、多くの化合物を分析できるが、感度はあまり高くない。高感度で分析したい場合には、後述するように誘導体化

して分析する方法もある。

**GC** 水素炎イオン化検出器 (flame ionization detector, FID) は、有機化合物を水素および空気と混合して燃焼させた際に生じる水素炎に基づいて検出する装置で、GCでもっとも一般的に利用されている。水素炎中では有機化合物に由来するイオンが生じ、このイオンを電流として検出する。電流の大きさ、すなわち感度は有機化合物の炭素数におおよそ比例する。炎光光度検出器 (flame photometric detector, FPD) は、有機硫黄化合物および有機リン化合物を選択的に検出したいときに役に立つ装置である。水素炎イオン化検出器と同様に、有機化合物を水素および空気と混合して燃焼させる。有機硫黄化合物を分析するときは、水素炎中で生じる硫黄に由来する化学種の発光 (394 nm) を光電子倍增管で検出する。有機リン化合物の場合には、リンに由来する化学種の発光 (526 nm) を検出する。熱伝導度検出器 (thermal conductivity detector, TCD) は、化合物を熱伝導度の変化に基づいて検出する装置である。移動相の気体のみと比較して、移動相の気体に化合物が含まれている場合には熱伝導度が増加し、この変化を電気信号に変えて検出する。熱伝導度検出器は、初期にはもっとも一般的に利用されていたが、感度があまり高くないため、現在では水素炎イオン化検出器の方が多く利用されている。しかし、熱伝導度検出器は他の装置では検出困難な無機ガスも検出できるため、今でも重要である。

移動相の気体は検出器を考慮して選択する必要がある。水素炎イオン化検出器や炎光光度検出器ではヘリウムに加えて安価な窒素がよく用いられる。熱伝導度検出器では、熱伝導率が大きいヘリウムが感度の面で有利なため、高価だがよく用いられる。

### 誘導体化して分離や感度を改善する

分析対象の化合物によっては、カラムに保持されず分離困難なことや、十分な感度が得られないことがある。この場合には、前述のようにカラムや検出器の種類を検討する必要があるが、それでも改善できなかつたり、高価なために他のカラムや検出器を入手できなかつたりすることもある。化合物の誘導体化は、分離や感度を改善するための有効な手法である。以下、HPLCとGCそれぞれについて説明する。

**HPLC** 誘導体化とは、分析対象の化合物に他の化合物を結合させることである。そのため、分析対象の化合物は、他の化合物を結合させるための官能基 (カルボキシ基、アミノ基、ヒドロキシ基、カルボニル基など) を有している必要がある。この官能基に、固定相と親和

性の高い化合物や光をよく吸収する化合物を結合させることによって、分離や感度を改善できる。たとえば、アミノ酸の場合には、イソチオシアン酸フェニルでアミノ基を誘導体化すれば、ODSカラムで分離し、吸光度検出器による254 nmの検出により分析できる。また、Marfey's試薬でアミノ基を誘導体化すれば、ODSカラムで分離し、340 nmの検出により分析できる。最近では、AccQ-Tag (Waters社製) もアミノ酸分析に使われている。

光を吸収する化合物ではなく、光を吸収してさらに光を放出する蛍光物質を利用して誘導体化すれば、より高感度な分析が可能となる。たとえば、糖の場合には、2-アミノピリジンで還元末端を誘導体化すれば、極性カラム (たとえば、TSKgel Amide-80, 東ソー社製) で分離し、励起波長310 nm、蛍光波長380 nmの検出により分析できる。ただし、蛍光物質を利用する場合には、蛍光検出器が必要となる。これらの試薬の他にも吸光検出用と蛍光検出用の誘導体化試薬は、多様なものが市販されている。

**GC** GCでは、分析対象の化合物を高温で気化させて分析するが、カルボキシ基、アミノ基やヒドロキシ基を有する化合物は、極性による化合物同士の相互作用が働いて気化しにくいことや、官能基の影響で熱安定性が低いことがある。また、これらの官能基を有する化合物は、カラムに非特異的に吸着してしまうことや、無極性のカラムには保持されにくいことがある。GCでは、これらを改善するために官能基を保護する目的で誘導体化を行う。

カルボキシ基を有する有機酸や脂肪酸の場合には、トリメチルシリルジアゾメタンなどの試薬でエステル化することによりカルボキシ基を保護できる。また、カルボキシ基、アミノ基やヒドロキシ基を有する化合物の場合には、トリメチルシリル (TMS) 化試薬 (たとえば、BSTFA) でシリル化することによりこれらの官能基を保護できる。この他にもアシル化などの方法があり、GCに関しても多様な誘導体化試薬が市販されている。

### おわりに

本稿では、HPLCとGCの分離と検出に関する基礎科学を概説した。HPLCとGCの性能は向上し続けており、応用分野も広がっている。生物の分野では、質量分析装置と組み合わせることによりメタボロミクスに応用されている<sup>5)</sup>。たとえば、HPLCを質量分析装置と組み合わせることで活用することにより、トマトから869もの成分が検出されている<sup>6)</sup>。

HPLCとGCそれぞれに、分離と検出に制限があるが、

カラムと検出器, さらには誘導体化試薬の開発により, どちらの装置でも多様な化合物を分析できるようになってきている. ただし, HPLCとGCは高価なため簡単には購入できず, どちらの装置で分析するかは, 研究室で実際に使用可能な装置やカラムの種類に依存することも多いのが現状である. 本解説が分析方法の選択や上手に分析するための一助となれば幸いである. また, HPLCとGCの分析のさらなる詳細に関しては, 書籍も多数市販されているためそちらも参照されたい<sup>7,8)</sup>.

文 献

- 1) 岡澤敦司: 生物工程, **93**, 345 (2015).
- 2) 保母敏行ら: ガスクロ自由自在Q&A 準備・試料導入編, 丸善出版 (2007).
- 3) 中村 洋: 液クロ彪の巻, 丸善出版 (2003).
- 4) 中原勝儼: 色の科学, 培風館 (1999).
- 5) 福崎英一郎ら: 生物工程, **84**, 218 (2006).
- 6) Iijima, Y. *et al.*: *Plant J.*, **54**, 949 (2008).
- 7) 中村 洋: 液クロを上手につかうコツ, 丸善出版 (2004).
- 8) 代島茂樹ら: 役にたつガスクロ分析, 医学評論社 (2010).