

Technical Review

高速液体クロマトグラフ用検出器

紫外可視吸光検出器、フォトダイオードアレイ検出器、 蛍光検出器、示差屈折率検出器、蒸発光散乱検出器

*坊之下 雅夫、鹿又 健

Detectors for High-Performance Liquid Chromatograph

Masao Bounoshita, Takeshi Kanomata

JASCO Corporation

2967-5 Ishikawa-machi, Hachioji-shi, Tokyo 192-8537, Japan

Abstract

There are various detection methods used in HPLC. Each detection method has advantages, strengths, drawbacks, and limitations. This chapter describes the principles of widely used detection methods, i.e., ultraviolet-visible adsorption; photo diode-array; fluorescence; refractive index; evaporative light-scattering. Basic designs of typical commercial detectors are also explained.

Key words: Ultraviolet-visible Adsorption Detector, Photo Diode-Array Detector; Fluorescence Detector, Refractive Index Detector, Evaporative Light-Scattering Detector, Detector Characteristics

1. 緒言

分離分析における検出は、分析種の分離と同様に、重要な工程の一つである。高速液体クロマトグラフィー (HPLC) においては、様々な物理的、化学的原理などを利用した各種検出器が利用できる状況となっている。分析種の特長や分析目的に適した検出法の選択、選定は、精度の高い測定を行うための重要なポイントの一つとなる。

本稿では、HPLC に比較的多く使用されている紫外可視吸光光度検出器、フォトダイオードアレイ検出器、蛍光検出器、示差屈折率検出器、蒸発光散乱検出器の5つの検出器に焦点を当て、基本原理、検出器の特徴や構造例、進歩してき

ているいくつかの技術などについて紹介する。なお、検出器の名称については、市販の装置には、種々の呼び方があるが、ここでは、JIS K-0124高速液体クロマトグラフィー通則 [1]や JIS K-0214分析化学用語 (クロマトグラフィー部門) [2]にできるだけ則した名称にて記載する。

1.1 HPLC 用検出器の発展の方向

HPLC におけるハードウェアの一部である検出器は、カラムから分離、溶出した分析種を検出、データ処理装置へ信号を出力し、クロマトグラムを得るためのデバイスであり、現在、多く使用されている検出器については、その基本的な原

日本分光株式会社
〒192-8537 東京都八王子市石川町2967-5
Tel: 042-646-4119
Fax: 042-660-7513
E-mail: masao.bounoshita@jasco.co.jp

理や特徴は、開発された当時からほとんど変わっていない。

しかし、検出器は、多くの夾雑物を含む試料中の微量な分析種を高感度、かつ選択的に高い精度で安定して検出できることを目標の一つとして進化している。同時に、分析目的によっては、種々の成分を汎用的に高感度検出できることなども求められている。また、分析精度の向上や定性的な情報のクロマトグラムへの付加のためには、スペクトルなどの定性的な情報を加えた検出も必要とされ、コンピュータ技術の発達とともに、このような機能を有する検出器を容易に使用できる環境となっている。

さらに、HPLCは、カラムのダウンサイジング化（セミマイクロ HPLC、マイクロ HPLC など）や超高速液体クロマトグラフィ（UHPLC）による高効率分離が容易に実現できるようになり、検出器もこれらに対応できるように改良されてきている。本稿では、このような側面も合わせて触れたい。

なお、新しい方式による検出器など（コロナ荷電化粒子検出器、凝縮核形成光散乱検出器などのエアゾルベース検出器）も近年、いくつか登場し、市販されているが、ここでは、それら検出器群の基本的な特徴を備える蒸発光散乱検出器について記載する。

いくつかの成書[3][4][5]に検出器の基本的なことが掲載されているので参考にしてほしい。

1.2 HPLC 用の検出器に求められる事項

現在、HPLC の検出器に基本的に求められる項目と HPLC の進歩と共に、検出器（または、検出法）に求められる特徴や能力について、簡単に列挙してみる。a) 高感度検出、b) 汎用的または、選択的な検出、c) 分析種の量と検出器の応答量にリニアリティーがあり、良好な定量性を有する検出、d) 実験室温度などの外的な要因や移動相流速、溶媒や試薬類による影響が少なく高い安定性と使い勝手の良い検出、e) 容量の小さなピークに対して、セルなどでのカラム外効果による拡がりへの影響が少ない検出、f) 短時間に溶出するシャープなピークに対して高速レスポンスによる的確な検出、g) 溶出した分析種のピークに対しての定性的な情報（スペクトルなど）も得ることができる検出、h) 分取精製のために分析種のピークを回収できるような非破壊な検出、などである。分析目的によっても必要とされる項目は異なってくる。

2. 紫外可視吸光度検出器 (Ultraviolet-visible Adsorption Detector)

紫外可視吸光度検出器は、HPLC に最も多く使用されている検出器である。多くの有機化合物は、紫外から可視の波長領域において光を吸収し、分子構造の違いなどによって、その波長帯と吸収の強度が異なる。この特性を利用して分析種が吸収する波長の光を用いた検出を行うことができる。検

出器は、40年以上前に、分光光度計の技術を利用して開発され、現在まで発展してきたが、HPLC 専用に設計された分光器とフローセル、そして電気信号処理系を備えたノイズの少ない高感度な紫外可視吸光度検出器が使用できる。

2.1 原理

吸光検出法の原理は、基本的に分光光度計と同様に「ブーゲーベール (Bouguer-Beer) の法則」(この名称の詳細は、日本工業規格の分光光度計, JIS K0225:2004の解説[6]に記載されている。日本では、ランバート-ベールの法則 (Lambert-Beer) と呼ばれることが多いが、ISO 6286には、ブーゲーベール (Bouguer-Beer) の法則と掲載されている。同じ法則の呼び方が変更されている。)である。この法則の原理図を Figure 1 に示した。測定される試料溶液が入っているセルに光を照射した時、入射光 (I) と透過光 (I_0) の強さから吸光度 A が求められる。吸光度 A は、光路の長さ (l) と溶液中の吸収物質の濃度 (c) に比例する。光路長 1 cm で、かつ分析種濃度が 1 mol/L のときの比例定数をモル吸光係数と呼び、 ϵ で表わす。特定の条件において、モル吸光係数は物質固有の値となる。この法則は、溶液中の吸収物質の濃度と吸光度が比例関係にあることを示している。

HPLC においては、分析種がカラムに保持・分離した後、溶出し、カラム出口に接続されている検出器のフローセルにて、ピークとして検出される。定量方法は、濃度既知の標準溶液を測定し、その成分の濃度とピークの応答量（ピーク面積値または、高さ値）との関係を求めた検量線を作成しておく、同じ条件下での濃度未知の試料溶液中の分析種を測定し、そのピーク応答量と検量線から濃度の算出が可能となる。

ブーゲー・ベールの法則 (ランバート・ベールの法則)

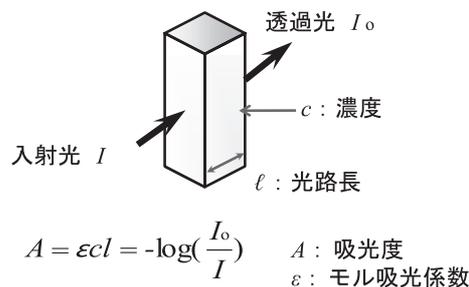


Figure 1. 吸光度検出の原理

2.2 検出器の構造

紫外可視吸光度検出器の光学系例を Figure 2 に示す。現在、主として市販されている紫外可視吸光度検出器には、光源ランプとして、重水素ランプ (D2) およびタングステンランプ (W) の2つの光源を装備しているタイプと D2 ランプを1つだけ装備しているタイプがある。通常、紫外領域

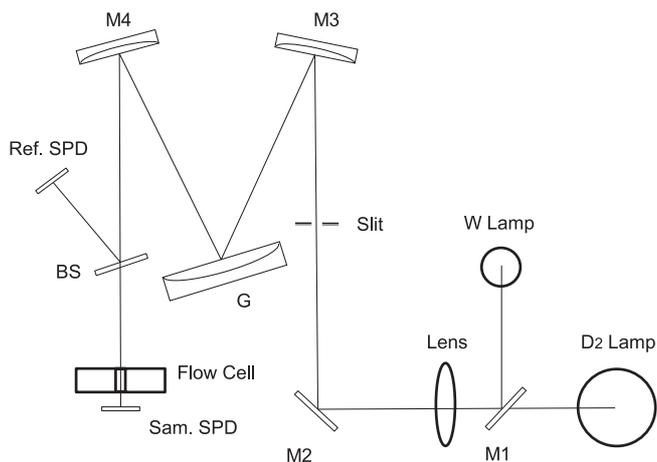


Figure 2. 紫外可視吸光度検出器の光学系の例

(通常180~370nm付近)では、D2ランプを、また、可視光領域(通常370~900nm付近)では、Wランプを使用することが望ましいが、D2ランプだけ搭載している検出器でも、600~700nm近くまでの検出波長が設定できるようになっている。D2ランプの可視光領域の光量は、非常に少ないため、この波長領域で高感度検出を行う場合は、Wランプを使用した方がよい。

光源のD2ランプまたは、Wランプから出射された光は、検出波長が紫外光領域か可視光領域を使用するかによって、ミラー(M1)により切替えられる。ミラー(M2、M3)やスリットなどを通して、グレーティング(G)によって検出波長成分に分光される。検出波長は、グレーティングの角度によって換えることができる。その後、ビームスプリッター(BS)へ導かれてリファレンス側とサンプル側に分割される。一方は、リファレンス側の検知器(Ref. SPD)へ、他方は、フローセルを通過し、サンプル側の検知器(Sam. SPD)

に照射される。通過した光は、検知器のシリコンフォトダイオードの受光部に当たり、光の強度が測定される。吸光度は、フロー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計算処理され、吸光度に比例した信号として、データ処理装置に出力される。

このような波長可変型の検出器の中には、グレーティング(G)の角度を振りながら2つの波長の検出を行い同時に2つのクロマトグラムを出力できるタイプの検出器がある。さらに、グレーティングを回転させて、溶出しているピークの波長を走査(スキャン)することによりスペクトルを測定できる検出器もあり、これにより、移動相条件下における目的成分の吸光スペクトルを測定できる。これらの中には、移動相溶媒送液時のベースラインのスペクトルを差引く機能やスペクトルの解析機能なども搭載している装置もある。

2.2.1 フローセル

フローセルは、一般的にZ型の流路を有するタイプが多く使用されている。典型的な例をFigure 3に示す。コンベンショナルHPLC用としては、セルの光路長5~10mm、セル容量4~20μL程度のもが多く採用されている。超高速液体クロマトグラフィーによる高速化やカラムのダウンサイジングによるマイクロ化のために、0.5μL~5μL程度の小容量のものが用意されている装置もある。また、移動相溶媒の組成を変化させるグラジエント溶出法を行っている時のベースラインの変動(屈折率の変化などの影響を小さくするために)などを低減させるためにセル内への光の入口と出口の径が異なるテーパ型、出入口に半球型のレンズを付けて、直線光を利用するセル、光ファイバーを用いて、光を入射する光ファイバーセル、高感度化を行うために光路長の長いタイプの内面反射型セル(light-pipe flow cell)、さらに、高感度検出時などに温度変化に対しての影響を小さくするための温

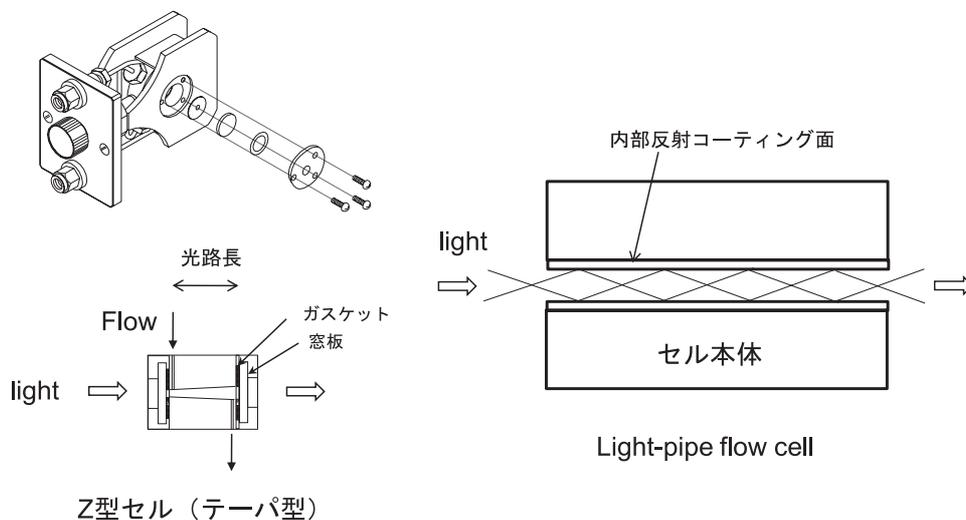


Figure 3. 紫外可視吸光度検出器のZ型セルと light-pipe flow cell の構造例

調機能付きセルなど、光学系や電気系の改良だけではなく、セルの設計においてもノイズやドリフトの低減、ピークの拡がりの低減、高感度検出、分離条件によるベースライン変動の影響低減などの技術が大きく進歩している。

2.2.2 レスポンス：応答速度による影響

Figure 4 にレスポンスの違いによるピーク形状の変化例を示す。検出器のレスポンスは、カラムから溶出するピークのシャープさ（時間）によって適切な値を設定する必要がある。応答速度が遅いとノイズは減るが、ピーク高さが低くなる、幅が広がる、ピーク位置が遅れるなどの弊害がある。UHPLC などの高速な測定においては、検出されるピークが、短時間に溶出するため、検出のレスポンスを速くする必要がある。通常、時定数、データポイント/秒、ヘルツ (Hz) などで表示される。デジタルノイズフィルター機能により、クロマトグラムのデータを取り込んだ後、検出器内やデータ処理装置による演算処理により、ノイズの低減を行える検出器も多く市販されている。しかし、演算処理を行うノイズ低減法は、見掛け上のクロマトグラムのピークの溶出位置が遅くなることもあり、ピークの位置を確認しながら分画分取を行う場合には注意が必要となる。

2.3 特徴

紫外可視吸光度検出器は、 10^{-10} g (ng～サブ ng) 程度の最小検出感度を有し、通常の感度においては、温度や流速の影響も少なく安定して使用できる。その特徴として、次のような長所と短所が挙げられる。長所としては、a) 紫外から可視光の波長領域において光を吸収する有機化合物が多いことから、検出器として使用できる適用範囲が広い。b) ブレーカーの法則が成立する範囲では、分析種の濃度とピークの応答量との関係が直線的であるため、定量計算が容易。c) グラジエント溶離法が可能。d) 検出波長を選択することによって検出対象となる物質の範囲（すなわち、検出の選択

性) や感度を調節することが可能。e) 基本的に分析種を非破壊で検出するため、検出器の出口にてピークが溶出する時間範囲だけ溶出液を分取することで、分取精製目的にも使用可能。f) 検出器の安定が速く、温度などの外的要因にも影響されにくい。g) 検出器の基本設計は、分光光度計と同じであり、構造的にも比較的簡単、機差が小さい。

一方、短所としては、つぎのようなことが挙げられる。h) 紫外可視の波長領域に吸収を持たない化合物には適用できない。i) 紫外領域に吸収をもつ有機化合物の種類が多いため、特定の化合物だけを選択的に検出するのが困難な場合がある。j) 溶離液には、検出波長において吸収を持つような有機溶媒や試薬を用いることが制限される。k) 多くの HPLC 用検出器の吸光度の直線範囲がおおよそ 2 ABS 以下のため、分析種の濃度が濃くなり、吸光度が高くなると検量線のリニアリティが無くなり、検量線が曲がることになる。l) 溶離液に使用されている溶媒や試薬自体に吸収がある場合は、一般に 200nm 付近で強い吸収を持つため、溶離液中の溶存空気の影響を受けやすくなり、不安定なベースラインやゴーストピークなどの現象が発生することがある。

適切な検出波長の設定は、分析種の紫外可視スペクトルの情報を基にできるだけ長波長側の吸収極大値を設定することが基本ではある。これは、試料中に存在する妨害成分の影響を受けにくくすると同時に高い測定再現性を得るためには留意する必要がある。しかし、吸収強度などの関係から、高感度検出を行いたい場合には、短波長側の検出波長を設定し、測定を行うこともある。

分析種の検出波長を推定する参考としては、一般的には、分析種の分子構造中にベンゼン環や共役の二重結合を有する場合は、230～280nm 程度の波長領域に吸収を有することが多く、アゾ基などの発色団を構造中に有する場合は、可視光領域に吸収を有する場合がある。しかし、適切な波長を選択するためには、移動相条件下の分析種の紫外可視スペクトルを利用することを推奨する。

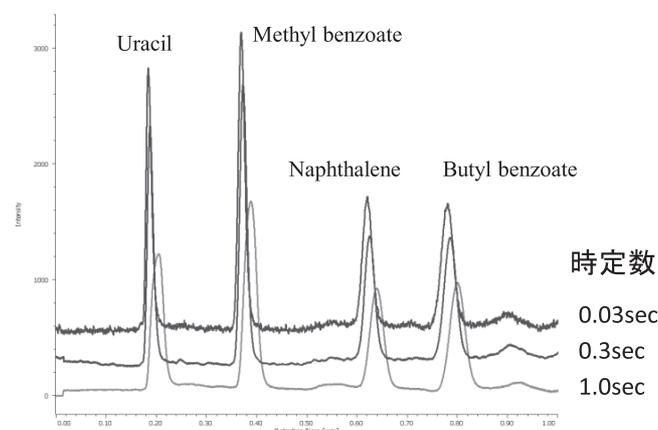


Figure 4. 時定数の違いによるピーク形状とベースラインノイズの変化例

2.3.1 検出へ影響を与える要素

紫外可視吸光度検出器を HPLC で使用する場合は、ベースラインの安定性やピークの応答量、ゴーストピークの出現に関して注意を払う必要がある。溶離液や試料溶解溶媒中の溶存空気は、210nm などの短波長領域を使用した検出において、ピークとして出現（マイナス方向の場合もある）することがある。また、グラジエント溶出時には、溶媒の屈折率の変化などに留意する必要がある。

3. フォトダイオードアレイ検出器 (Photo Diode Array Detector)

3.1 原理

フォトダイオードアレイ検出器の検出の原理は、基本的に、紫外可視吸光度検出器と同じである。しかし、通常の

紫外可視吸光光度検出器から得られるデータは、時間軸とピークの応答量（吸光度）の二次元であるが、フォトダイオードアレイ検出器の場合は、スペクトル情報も一緒に得ることができるため、クロマトグラムは、時間軸とピークの応答量とスペクトルの三次元のデータとなる。これは、溶出した成分のスペクトルという定性情報が含まれ多くの利点を有する。

3.2 検出器の構造

通常の紫外可視吸光光度検出器においては、光源から出射された光をグレーティングタイプの分光器にて分光した後、特定の波長の光をフローセルに入射しモニターする。これに対し、フォトダイオードアレイ検出器は、光源から出射された光（白色光）をセルに入射し、セルを通過した光をグレーティングタイプの分光器にて分光し、その光の波長帯をそのまま検知器が複数個並んでいるフォトダイオードアレイを用いてモニターし、広い波長領域の光を一度に連続的に検出する。

フォトダイオードアレイ検出器の代表的な光学系の配置例を Figure 5 に示す。ヨウ素封入タングステンランプ (W) と重水素ランプ (D2) の光源から出た光は、スリットを通過し、集光ミラー (M1) により、フローセルに集光される。フローセルを通過した光は、M2、M3、スリットを通過し、グレーティング (G) により分光され、ダイオードアレイ上にスペクトルパターンが結像される。

フォトダイオードアレイの素子数は、512または、1024個（この2つのタイプが主流）が用いられている。素子数は、検出の波長範囲（一般的には、190nm~600nm程度、~900nmと広い波長領域まで対応している検出器もある）や分解能な

どに関係する。

フォトダイオードアレイ検出器の波長分解能は、分光器自体のスペクトルバンド幅と、測光波長範囲のスペクトルパターンをどれだけの数の素子に分割しフォトダイオードアレイで測光するかによって決まる。注意すべき点は、分光器のスペクトルバンド幅と測定波長範囲に対するフォトダイオードアレイの素子の割当のいずれか性能が低い方で検出器としての分解能となることである。したがって、フォトダイオードアレイの素子数のみで波長分解能の判断をすることはできない。

3.3 特徴

フォトダイオードアレイ検出器は、分析種の溶出時間、吸収スペクトルとその強度を同時に測定した三次元クロマトグラムのデータを得ることができる。このデータは、溶出してきたピークの時間軸方向でのスペクトル変化を解析することが可能なため、溶出してきたピーク中に異なったスペクトルが存在するか、すなわち、複数の成分を含んでいるかどうかを確認することができる。これは、ピーク純度の検定などに利用することができる。

フォトダイオードアレイ検出器は通常、コンピュータと接続され、装置コントロールやデータの記録、解析が行われる。得られたデータは、コンピュータを利用したデータ解析ソフトにより、分析目的やそのデータの用途に応じて様々な解析や種々の表示ができる。フォトダイオードアレイ検出による一般的な表示は、等高線表示 (contour map, Figure 6 参照) と三次元クロマトグラム (3-D Chromatogram, Figure 7 参照) がある。等高線表示などについては、検出した波長領域のクロマトグラム全体を見渡すことができ、多成分同時検出や不純物などの未知ピークの溶出位置やスペクトルの確認などが実施できる便利なものとなる。また、スペクトルを利用した解析としては、溶出したピークに他のスペクトルを有する成分が重なっているかなどを確認することができるため

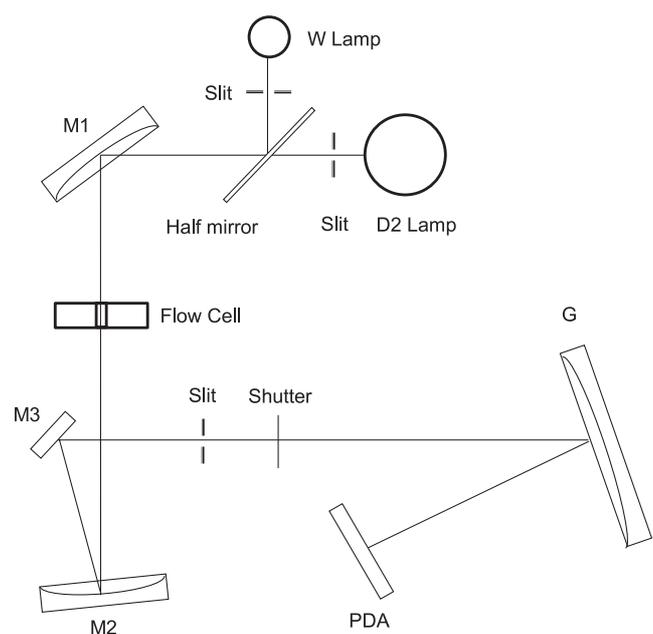


Figure 5. PDA 検出器の光学系の例

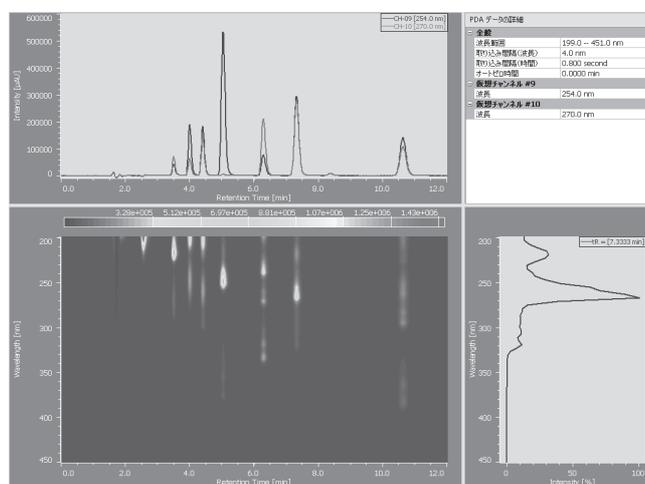


Figure 6. PDA 検出器の出力例 (等高線表示、スペクトルなど)

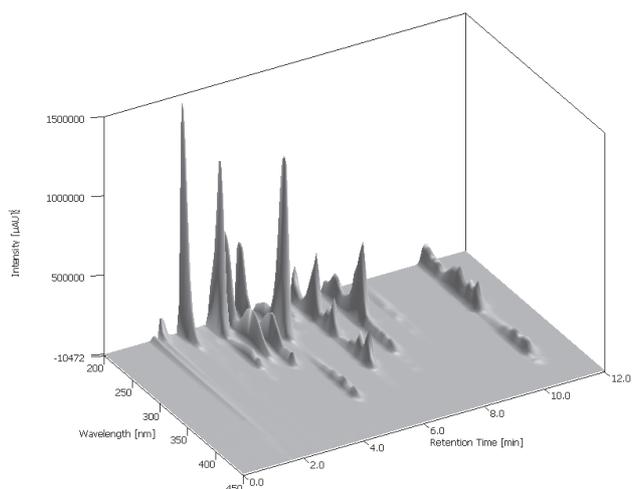


Figure 7. PDA 検出器の出力例 (三次元クロマトグラム)

ピーク純度の検定や標準試料のスペクトルを登録したデータベースなどの構築やこれらのデータを利用した検索やスペクトルの一致度の検定など多くの解析機能を有する。

4. 蛍光検出器 (Fluorescence Detector)

4.1 原理

物質が紫外・可視領域の光を吸収した時に、その物質の分子内の電子状態に変化が発生する。有機分子のエネルギー準位の模式図を Figure 8 に示す。光の吸収は、 S_0 (基底状態) から、 S_1 、 S_2 、 S_3 ・・・の一重項励起状態の種々の振動状態への電子遷移である。この現象が、吸光光度法で測定される吸収スペクトルとなる。 S_2 、 S_3 の励起状態にある分子は、分子間衝突などにより、 S_1 の最低振動状態に遷移する。これは、内部転換と呼ぶ無輻射遷移であり、エネルギーは、熱に変わっている。蛍光は、 S_1 の最低振動状態から S_0 の種々の振動状態への遷移における発光となる (Kasha の法則)。従って、蛍光は、励起光 (吸収光) より長波長側の光 (Stokes の法則) となる。一般的には、吸光スペクトルと蛍光スペクトルは、Figure 9 に示したように、ほぼ鏡像関係に近い形状となる。

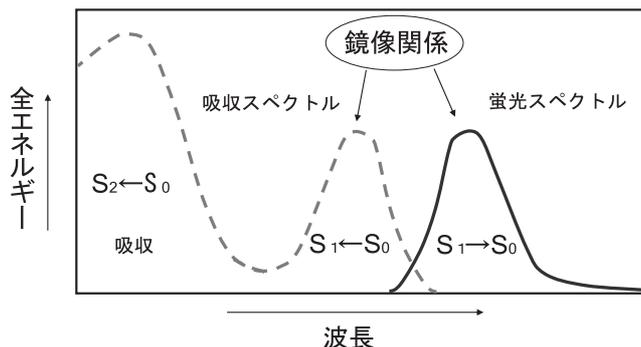


Figure 9. 吸収スペクトルと蛍光スペクトルの関係

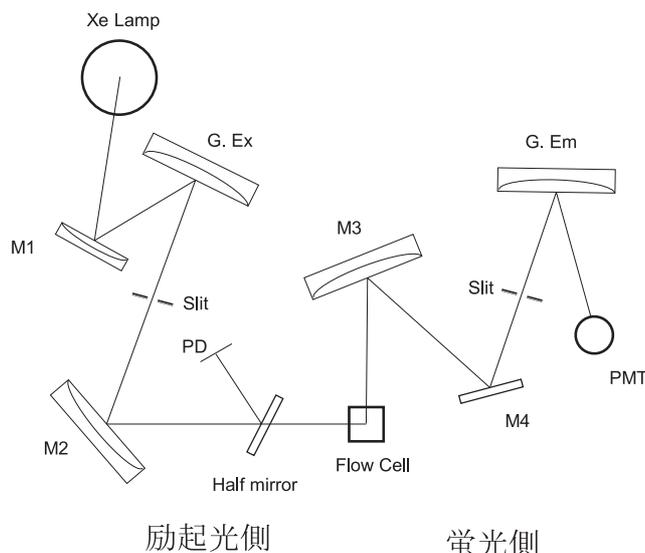


Figure 10. 蛍光検出器の光学系の例

4.2 検出器の構造

蛍光検出器の光学系の例を Figure10に示す。光源は、キセノンランプ (Xe) が多く使用されている。ランプより射出した光は、球面鏡 (M1) により集光されて励起側分光器に入り、励起光側グレーティング (G. Ex) により分光されて特定波長の光のみ励起光として出射スリットを通過する。この光は、球面鏡 (M2) により集光されフローセル内の試料溶液を照射する。フローセル内に試料溶液が入り、発光した蛍光は、蛍光側分光器に入り、球面鏡 (M3)、ミラー (M4) で集光、反射されたのち、蛍光側グレーティング (G. Em) により分光されて検知器 (光電子増倍管: Photomultiplier Tube; PMT) に入り、蛍光強度 (Intensity) が測定される。

4.2.1 セル

蛍光の感度は、セルの容量や構造などに大きく依存する。一般的にセルの容量は、8~20 μ L程度が多く、UHPLCやセミマイクロHPLC用として低拡散 (低容量) タイプのセルなども用意されている。また、温度による分析種の蛍光強度の

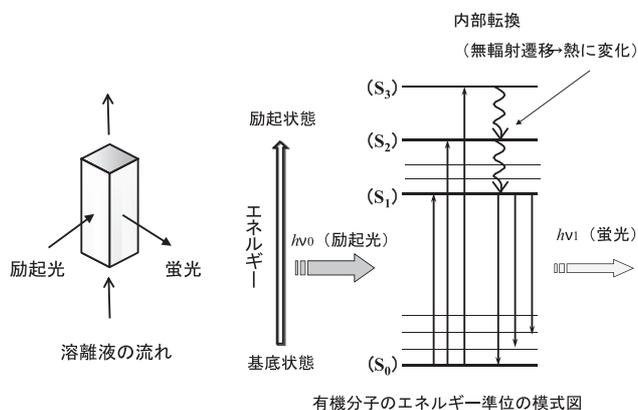


Figure 8. 蛍光検出の原理

変化などによる経時的な安定性の向上、検出の再現性などを向上させるために、装置内温度測定機能やセル温調機能を備えた検出器も市販されている。

4.3 特徴

蛍光検出の最大の特徴は、蛍光を有する物質のみ検出し、励起波長、蛍光波長という2つの波長を選択することから、高感度かつ選択的な検出を可能とする。検出感度は、通常の紫外可視吸光光度検出器の10~100倍の高感度が得られ、 10^{-12} g (pg~数100fg) 程度の高感度測定ができるのがその特徴である。現在、多くの分析種のHPLCを使用した検出法として、実用的に使用されている。蛍光を有さない分析種に対しては、誘導体化法（ポストカラム誘導体化法、プレカラム誘導体化法）を利用して、蛍光検出に適用している。

蛍光検出器の検出波長は通常、紫外可視領域の吸収の大きいところを選択し励起波長として設定することが一般的である。しかし、極大吸収が必ずしも強い蛍光を示す適切な励起波長とは限らない。短波長領域よりも長波長領域の波長を選択する方が、高い選択性を有する検出波長となる。励起と蛍光波長を適切に選択するためにも、分析種の移動相溶媒中での励起および、蛍光スペクトルを参考にすることは重要である。

4.3.1 蛍光検出へ影響を与える要因

蛍光強度は、種々の要因によって、変化する。例えば、移動相のpHによって、イオン性を有する分析種の解離が変化することにより、蛍光強度が変わることが知られている。また、一般的に分析種の存在する溶液温度についても高い場合は、蛍光強度が小さく、温度が低い場合は、蛍光強度が大きくなる。さらに、移動相溶媒中に存在する試薬にも蛍光強度

を弱くするクエンチングを起こす成分などもあり、留意する必要がある。

5. 示差屈折率検出器 (Refractive Index Detector)

示差屈折率検出器は、HPLC用検出器の中では、数少ない汎用検出器として使用されている。紫外可視吸光光度検出器や蛍光検出器などが適用できない糖類、アルコール類やサイズ排除クロマトグラフィーにおける高分子化合物などの検出に有効に利用されている。

5.1 原理

HPLCにおける移動相溶媒とカラムから溶出した分析種が移動相溶媒に溶解している溶液では、屈折率の差（示差屈折率）があり、これを測定する検出器が示差屈折率検出器である。この屈折率の差は、分析種の濃度に比例した応答量となり、この屈折率の差を検出する。そのため、極めて汎用性が高く移動相とほぼ同じ屈折率を有する分析種以外は、検出することができる。

偏向型示差屈折率検出器の検出原理を Figure11に示す。このタイプの検出器では、断面が三角形のフローセル中での光の屈折を利用してリファレンス側溶媒とサンプル側溶媒との屈折率差を検出する。

n_s : 試料溶液の屈折率

n_r : リファレンス溶媒の屈折率

θ : 偏向角 (この角度は、増幅されているため、実際の大きさは 10^{-2} 以下の角度である。)

i : 仕切りの角度 (セルの形状で決まる。)

この光路に対して屈折の法則を適用し $\theta \ll 1$ と仮定した場合

$$\theta = \tan i (n_s - n_r) / n_r \quad (式 1)$$

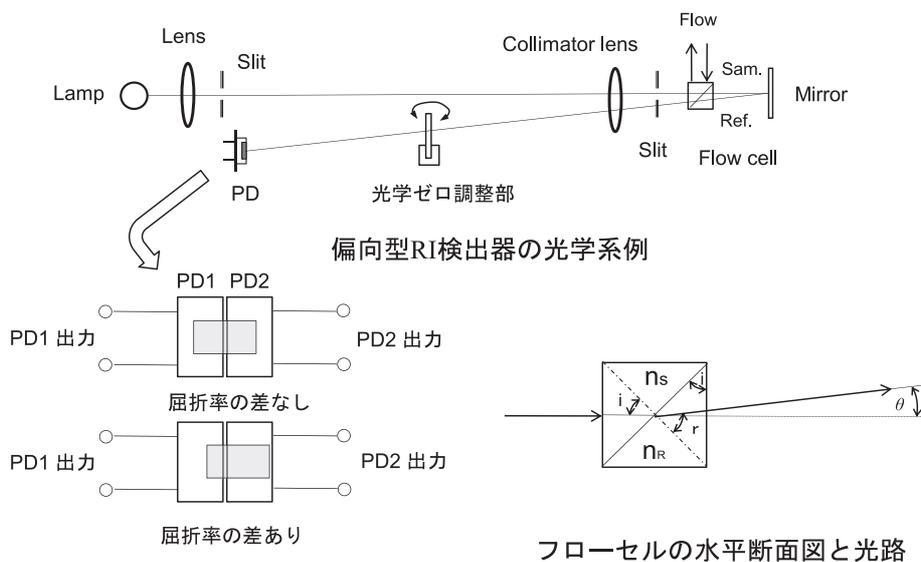


Figure 11. 示差屈折率検出器の光学系例と検出原理

すなわち、偏向角はリファレンス側溶媒の屈折率とサンプル側溶媒の屈折率との差に比例する。両者の屈折率差を求めることにより、検出することができる。

5.2 検出器の構造例

現在は、ほとんどの検出器に偏光型が採用されている。偏向型示差屈折率検出器の光学系の例を Figure 11に示す。この図において、光源から発した測定光は、スリットとレンズ、コリメータレンズそして、検出セルを通過する。この検出セルは、対角線上に置かれた測定光を透過する板により仕切られたサンプル側セル室とリファレンス側セル室とを備えており、サンプル側セル室を流れる試料を含む溶離液の屈折率がリファレンス側セル室に封入された溶離液の屈折率との間に差が生じると、検出セルを通過する光は、屈折率差に比例して偏向される。検出セルを出た測定光は、ミラーで折り返され、再度検出セル、コリメータレンズ、光学ゼロ調整部を経て受光素子に到達し、スリットの像が結像される。受光素子は、図に示すように近接して置かれた二つの受光部 (PD1, PD2) を持っており、参照セル室の溶離液の屈折率と試料セル室の試料室を含む溶離液の屈折率が同じ場合、二つの受光部には、同一面積 (同一光量) の光像が形成されるように位置が調整されている。したがって、参照セル室の溶離液の屈折率と試料セル室の試料を含む溶離液の屈折率に差が生じると光像が偏向し、PD1とPD2の受光部に形成される光像の面積 (光量) に差が生じる。このようにして、二つの受光部から得られる電気信号の差から、参照セル室の溶離液の屈折率と試料セル室の試料を含む溶離液の屈折率の差を測定することができる。

このタイプの示差屈折率検出器は、他の方法 (反射型や干渉型) に比較すると高感度かつダイナミックレンジが広く、検出セルの汚れに対してもあまり影響を受けないという特徴があり、もっとも広く用いられている。しかし、紫外可視吸光度検出器や蛍光検出器と比較すると、屈折率検出器の直線性の範囲は、それほど広くなく、また感度も低い。屈折率は1~1.75の範囲で使用する。一般的には、分析種の絶対量として、 10^{-8} g (数 μ g~サブ μ g) 程度の感度を示す。

偏光型の検出器のセルは、石英ガラス製が多く、容量は、8~15 μ L、30~60 $^{\circ}$ C程度に温調ができるような機構が装備されている。セルの耐圧は、吸光度検出器よりも低く、0.1MPa程度で、一般的には、複数の検出器を直列に接続する場合は、下流側に接続する。光源ランプは、タングステンランプまたは、LED光源が使用されている。

なお、示差屈折率検出器は、温度の影響や密度変化 (脈流) の影響を受けやすい。現在、市販の示差屈折率検出器のノイズレベルは、 $2\sim 3\times 10^{-9}$ RIUである。たとえば、温度に関しては、屈折率の変化は、水では、 10^{-4} RIU/ $^{\circ}$ C、有機溶媒では、 10^{-3} RIU/ $^{\circ}$ Cとなる。したがって、高感度検出 (ノイズレベル 10^{-8} 以下) には、 $10^{-4}\sim 10^{-5}$ RIU/ $^{\circ}$ Cの温度安定性が

必要となるため、現在の検出器では、セル部も含めた温調とともに、移動相溶媒のセルに入る前の熱交換部などが設置されている。

5.3 特徴

示差屈折率検出器は、紫外可視吸光度検出器や蛍光検出器が利用できないような糖類、アルコール、無機イオンのように紫外線吸収が全くないか、極めて低い試料を分析する場合、試料の紫外吸収帯において溶離液に吸収がある場合、および、試料の分子量にかかわらず注入された試料の質量とクロマトグラムのピーク面積の関係が大きく変わらないことが求められるポリマーのサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) などにおいて、広く用いられている。また、示差屈折率検出器は、すべての試料が検出できるという特徴をもつ反面、紫外可視吸光度検出器とは異なる特徴を持っている。通常、移動相溶媒の屈折率よりも溶出してきた分析種が溶解している移動相溶媒の屈折率が大きい場合は、プラス側の極性にピークを出力し、移動相溶媒よりも屈折率が低い場合は、マイナス側にピークが出力される。さらに、溶離液の組成が変化するグラジエント溶出法は適用できない。

6. 蒸発光散乱検出器 (Evaporative light scattering detector: ELSD)

蒸発光散乱検出器は、移動相溶媒よりも揮発性の低い不揮発性の成分の検出を行うことができる。カラムから溶出してきた移動相溶媒を蒸発させ、分析種の粒子に照射した光の散乱を検出する検出法により、不揮発性の成分を検出する。示差屈折率検出器と比較しても検出器の安定性も良く、糖類、脂質類、アルコール類、界面活性剤高分子などの紫外可視吸光度検出器が適用できない、または、適用しにくい成分の分析やグラジエント溶出法を必要とするような測定に使用できる検出器である。

6.1 原理と検出器の構造

蒸発光散乱検出器の検出原理は、カラムからの溶出液を噴霧・加熱することにより揮発性溶離液を蒸発除去し、残存した不揮発性物質の微粒子に光を照射することにより生じる散乱光を測定し検出することである。ELSDの検出の機構は、大きく分けて、1)カラム溶出液の噴霧、2)溶離液の蒸発、3)不揮発性成分による光散乱の検出の3段階に分けることができる。

カラムから溶出した分析種は溶離液といっしょに、ネブライザー部からガスフローがコントロールされたネブライザーガス (窒素や空気) とともに噴霧される。微小な液滴は、ネブライザーガスの流れと一緒に温度調節された蒸発管 (エバポレーター、ドリフトチューブとも呼ばれる) に導かれる。このとき、液滴の大きさには分布があり、ベースラインノイズの原因となる大きな液滴や一部の液滴は、選択的に分離

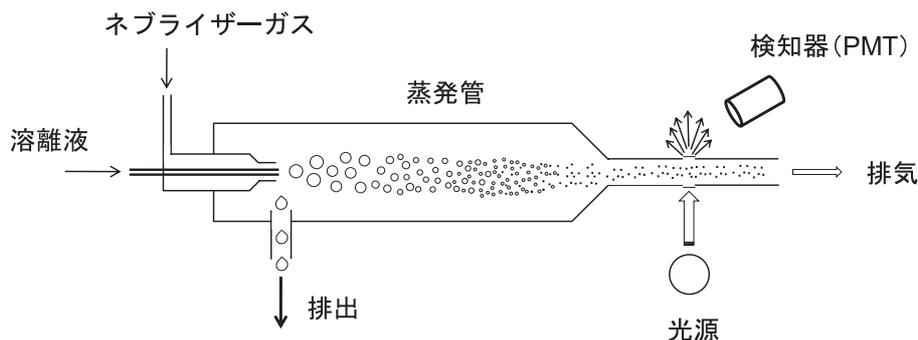


Figure 12. 蒸発光散乱検出器の構造例

(スプリット)され、排出管へ流れ、液体のまま排出される。

霧状になったカラム溶出液は、次に温度調節(加熱)された蒸発管の中に送られる。この蒸発管の中を通過している間に、熱により揮発性の溶離液は蒸発して検出されなくなり、排気管を通じて検出器外へ出される。不揮発性物質(厳密には加熱温度で蒸発しない物質)は、溶離液が蒸発した後、微粒子として残り、蒸発管の出口の検出部に送られる。蒸発管には、短く細い直管や長いコイル状の管などのタイプがある。

検出部は、光源ランプ(LED、タングステンランプ、レーザーなど)とその照射角に対して低い角度をつけて検出器の光電子増倍管(PMT)が設置されている。検出の光は、微粒子が出ていない時には、散乱されないため光電子増倍管には、入射されず、微粒子が検出部に入ってくることにより照射光が散乱されて光電子増倍管に入射し、その強度が測定される。検出部の構造の模式図を Figure 12に示す。

このような原理により、カラムからの溶出液中に含まれる不揮発性物質は、基本的にすべて検出されることになる。これは、分析種の分子構造などの特性により、検出感度が違う吸光度検出や蛍光検出とは、異なり、示差屈折率検出器と同様に選択性の低い検出器である。

6.2 特徴

蒸発光散乱検出器の一般的な長所としては、以下の項目があげられる。

a) 基本的には、不揮発性物質ならすべてを検出できるため汎用性が高い。b) 物質の粒子による散乱光強度を測定するため、物質の構造特性による感度差が少なく、量比についての情報が得られる。c) 示差屈折率検出器と比較すると室温変化の影響を受けにくい。d) 装置の安定性が高く、ベースラインの安定が短時間。e) グラジエント溶出法が適用できる。f) 感度が示差屈折率検出器と比較して、約5~10倍程度高い。g) 溶媒ピークの妨害を受けないなどである。

短所としては、h) 移動相溶媒中に不揮発性の塩、酸、塩基、試薬などが入っている場合は、使用できない。i) 検出

される物質と散乱光強度に直線関係がないため、一次関数の検量線は、近似的に一部しか利用できない。通常は、両対数(log-log)の検量線を作成して利用する。従って、定量限界や検出限界などの計算には、注意が必要である。j) 一部の半揮発性物質については、蒸発管内にて気化してしまうこともあり、感度、再現性の低下などを生じる場合がある。k) 設備として、ポンプやN₂ガス発生機などのネブライザーガスの供給源が必要となる。

なお、半揮発性物質の測定時には、蒸発管の設定温度などによっては、ピークが小さくなってしまう場合がある。このような場合に、蒸発管の温度を冷却することにより、ピーク大きさを小さくすることを防ぐことができる場合がある。このような機能を備えた検出器も市販されている。

分析種の検出条件は、移動相条件や分析種の特性によって、ネブライザーガスの流量、ネブライザー部の温度、蒸発管の温度などの適切な設定が必要となる。

イオン性物質などの測定時には、移動相溶媒に揮発性の酸(トリフルロ酢酸、ギ酸など)や塩基(トリエチルアミンなど)、塩(酢酸アンモニウムなど)などを使用できることがある。場合によっては、質量検出器用のイオンペーパー試薬なども使用されている。

6.3 検出特性

蒸発光散乱検出器は、分析種の粒子による散乱光を検出するため、物質と散乱光強度の間に直線関係がない。検出される散乱光強度は、式2で表わされ、検出される散乱光強度は検出部を通過する粒子のべき乗関数となるため、カラムに注入した分析種の量に対する検出器の応答は、一次関数ではなく指数関数での応答となる。式2の両辺の対数を取ると式3で表わすことができる。式3は、検出される散乱強度の対数と分析種の量の対数は、一次関数となることを示している。したがって、定量測定に蒸発光散乱検出器を用いる場合には、得られた信号強度と注入した分析種の物質を両対数でプロットした検量線を作成して定量計算を行う。(Figure 13参照)

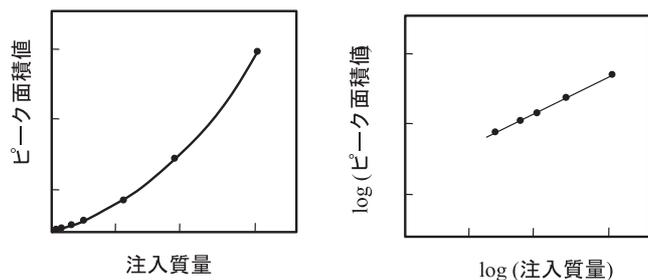


Figure 13. 蒸発光散乱検出器の検量線の特徴

$$PA = a \cdot M^b \quad (\text{式 2})$$

$$\text{Log } PA = b \log M + \log a \quad (\text{式 3})$$

PA：検出される散乱光強度（ピークの応答量）

M：分析種の量

a：レスポンスファクター

b：傾き

a、b は、粒子の大きさ、分析種の濃度・性質、ネブライザーガスと溶出液の流量や流速、蒸発温度などの分析・検出条件の要因によって決まる定数

このような特性を有する蒸発光散乱検出器では、検出器の応答が直線的ではないため、分析種の応答信号量とノイズ幅とがおおむね等しい場合は、単純な割り算で比較的正確な S/N が得られる。しかし、その比が大きい場合は濃度と応答信号量の関係を加味し、ノイズレベルと応答信号量をそれぞれ濃度換算してから、S/N を計算する必要がある。

すなわち、検出限界や定量限界をピーク高さとノイズによ

る S/N 比を利用して算出した場合、分析種の濃度の値が異なることにより、これらの数値が変わり、正確な値を求めている場合があるので注意が必要である。

7. おわりに

HPLC には、多種多様な検出器が利用できる強みがあり、分析目的や分析種の特性、分析試料の状態などによって適切な検出器を選ぶことが安定した正確な分析を行える鍵となる。新たな分析種の分析条件の確立や現在測定している分析種の分析条件の改定を行う場合には、分離条件以上に検出器や検出法に対する知見が必要となる。

文献

- [1] 日本工業規格，高速液体クロマトグラフィー通則，JIS K0124: 2002.
- [2] 日本工業規格，分析化学用語（クロマトグラフィー部門），JIS K0214: 2006.
- [3] L. R. Snyder, J. J. Kirkland, J. W. Dolan, Introduction to Modern Liquid Chromatography Third Edition, John Wiley & Sons, Inc., 2010.
- [4] 日本分析化学会関東支部編，「高速液体クロマトグラフィーハンドブック」，丸善，2000.
- [5] 中村 洋監修，「ちょっと詳しい液クロのコツ 検出編」，丸善，2006.
- [6] 日本工業規格，分光光度計，JIS K0225: 2004.