

13

高速液体クロマトグラフィー

クロマトグラフ法（クロマトグラフィー chromatography）は、混合物から特定の物質（成分）を分離するための1方法である。今日では、分離した成分を何らかの検出法と組み合わせることによって、定性および定量を行うシステム化された分析方法となっている。クロマトグラフィーは、移動相の種類の違いにより、液体クロマトグラフィー（LC）、ガスクロマトグラフィー（GC）および超臨界流体クロマトグラフィー（SFC）に大別されるが、どれを選択するのかは、分離対象物の性質や分子サイズ等に依存する。本書では液体クロマトグラフィーについて取り扱うことにし、第13章で、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）、第14章でイオンクロマトグラフィー（IC）の分離機構ならびに検出法や定量法を解説する。

クロマトグラフィー、クロマトグラフ、クロマトグラム

クロマトグラフィーは分析方法、クロマトグラフは用いる装置、クロマトグラムは得られた応答曲線を指す。

イオンクロマトグラフィー

イオンクロマトグラフィーは、主にイオン交換分離に基づく液体クロマトグラフィーの一種であるが、特に、無機イオン種や有機酸イオン等を効率的に分析するために開発された。

高速液体クロマトグラフィー (high performance liquid chromatography, HPLC)

HPLCは、高圧液体クロマトグラフ (high-pressure liquid chromatograph) の誕生により始まった。日本工業規格では、HPLCは高性能液体クロマトグラフィーではなく、高速液体クロマトグラフィーが正式名称となっている。[日本工業規格 JIS K0124 : 2011 高速液体クロマトグラフィー 通則 General rules for high performance liquid chromatography]

13-1 Tswett の原理と Kirkland の充填剤

ロシアの植物学者ツベット (M. S. Tswett) は、緑葉成分の研究を進める中で、緑葉成分が混合物であること、葉緑素が複数の種類を持つことに着目した。その際、葉緑素の成分の溶媒に対する溶解性や混合物の分離に関する考え方を実験に反映した結果、ろ紙（セルロース）や炭酸カルシウム、ケイ酸塩などを葉緑素の吸着の場として、それらの溶解のための溶媒を組み合わせ「分離」(=原理)を発見した。薄層および液体クロマトグラフィーの基本原理となるツベットの研究は、固定相と移動相の概念を生み出した。

その後70年を経て、1971年にカーランド (J. J. Kirkland) がいわゆる“硬い”微粒子をつくることで、充填剤の新たな概念が生まれた。彼は世界初の球状充填剤を開発し、微小粒子（ $\sim 5 \mu\text{m}$ ）の完全多孔性充填剤の製造プロセスを確立した。それまでは、液体クロマトグラフィーの移動相（液体）の流れは重力に基づく自然滴下であったので、カラム通過に時間が長くなり、成分帯が拡散して分離が悪くなるが多かった。新たに開発された充填剤は、送液ポンプによる加圧に耐えるので、移動相を高速で流すことが可能となった。液体クロマトグラフィー用カラムの性能は飛躍的に向上し、今日の高速液体クロマトグラフィー (high performance liquid chromatography, HPLC) の装置開発につながった。

13-2 クロマトグラフィーの充填剤

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) に用いられる充填剤には、全多孔性型 (ポーラス型) と表面多孔性型 (ペリキュラー型) がある。全多孔性型 [図 13.1 (a)] の充填剤には、シリカゲルやポーラスポリマーがあり、直径 2 ~ 30 μm の球形粒子で多孔性である。このうちポーラスポリマーとしては、スチレン-ジビニルベンゼン共重合体の微粒子が主に用いられる。表面多孔性型 [図 13.1 (b)] の充填剤は、30 ~ 40 μm の不活性な核の表面に、厚さ 1 ~ 2 μm 程度の多孔性シリカやアルミナ等をコーティングしたものをいう。また、化学結合型 [図 13.1 (c)] とよばれる充填剤は、全多孔性粒子に対して化学的に修飾基を結合させたものをいう。

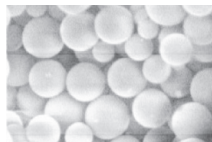


図 13.1 充填剤粒子の模式図

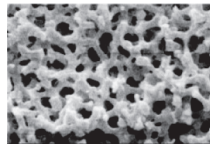
充填剤としての粒子とその要素を考えると、1) 形状：破砕形や球形などの形状は、充填後のカラムの安定性に影響する。2) 粒子径：微量分析用に 1 ~ 5 μm のサイズから、分取用として数十 μm のサイズがあるが、充填の密度 (g/cm^3) に影響する。3) 粒度分布：粒度の分布幅が狭いほど良い分離につながる。

これらの要素は、充填時の容易さ、カラム圧、カラムの性能 (ピーク形状、理論段数など) および充填状態時 (充填後) の安定性に影響してくる。粒子径が 1/2 になると、理論段数は 2 倍になるが、カラム圧 (送液時の圧力) は 4 倍になる。さらに、4) 細孔径とその分布 (平均細孔径: 5 ~ 20 nm) と比表面積 (50 ~ 500 m^2/g) との間には相関があり、同一細孔径であれば、比表面積の小さいほど粒子内の空隙率が小さく、比重が大きい。同一比表面積であれば、細孔径の小さい方が、粒子内の空隙率が小さく比重が大きくなる。細孔径の影響は、高分子の試料 (= 分析種) に対して顕著であり、大きい細孔径であれば、細孔内拡散が容易である。また、多孔質粒子を充填したカラムでは、多孔質層に留まる時間が長いため、低分子化合物を強く保持させることができる。しかし、固定相での分子移動が遅い高分子化合物では逆に試料バンドが広がる原因となり、結果的にピーク形状が悪化してしまう。

次に、充填剤としてのモノリス型シリカゲルとその特徴について述べる。上述の多孔質球状シリカゲルとは異なり、2種類の大きさの（二重細孔構造に基づいた）細孔を有する棒形状の一体型シリカゲルをモノリス型シリカゲルという（図 13.2 参照）。これを充填したモノリスカラムは、シリカが網目状の構造となっており、構成するシリカ骨格が細く、多孔質の層も薄くなっている。そのため、移動速度が遅い高分子化合物であっても試料バンドが拡散しにくく、その結果として粒子充填型よりも良好なピーク形状が得られると考えられている。たとえば、タンパク質は分子量が大きいので、細孔径の小さい粒子充填カラムではピーク形状が崩れる傾向がみられるが、モノリス型カラムを用いるとその構造のため高分子化合物であってもピーク形状が崩れにくく、細孔径の大きな粒子充填カラムよりも優れた分離性能を示す。



多孔質
球状シリカゲル粒子



モノリス型
シリカゲル

図 13.2 球状シリカゲル粒子とモノリス型シリカゲルの拡大図
(GL Sciences Inc., LC Technical Note, LT116 (2012).)

13-3 分離機構に基づく液体クロマトグラフィーの分類

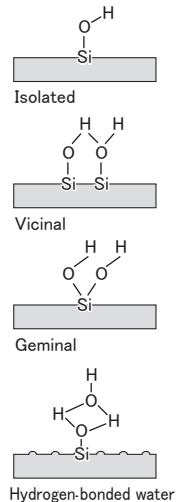
分離機構に基づいた分離方法を分離モードという。分離モードは、吸着クロマトグラフィー、分配クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィーおよびアフィニティクロマトグラフィーに分類される。次に各分離モードについて、分離機構に基づく対象物の固定相への保持のメカニズムを考える。

(a) 吸着クロマトグラフィー

吸着クロマトグラフィーは、固体粒子表面の吸着力（＝吸着点に保持される程度）を利用して、対象物を分離する方法である。この固体粒子を吸着剤というが、固定相として用いる吸着剤としては、シリカゲル、セライト*1、アルミナ、フロリジル*1、活性炭等の無機材料や、ポリスチレン、ポリアクリルアミド等の有機材料が用いられている。

シリカゲルでは、表面のシラノール基が主な吸着部位であり、対象物との水素結合によって吸着が起こるために、その状態の違いによる吸着性の大小が分離に反映される*2。

アルミナ表面では、誘起双極子モーメントが働くことにより対象物の吸着



シラノール基の様々な状態
および水との水素結合

*1 セライト (celite) は、炭酸ナトリウムを添加して焼成した珪藻土である。フロリジル (florisil) は、ケイ酸マグネシウムを粒子状にしたものをいう。

*2 シリカゲル表面のシラノール基の状態は上図のように3分類される。第4図は、孤立シラノール基が水と水素結合した状態を示す。