機器分析-I

高速液体クロマトグラフィー・概説

仁木 栄次・渡辺 訓行

東京大学工学部工業化学科 (東京都文京区本郷 7-3-1)

Introduction to High Performance Liquid Chromatography

Eiji NIKI and Noriyuki WATANABE

Department of Industrial Chemistry, Faculty of Engineering,
University of Tokyo
(7-3-1, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo)

はじめに

クロマトグラフィーとは固定相と移動相の2相へ溶質がなんらかの相互作用によって分布するとき、その分布の差異の程度に応じて溶質の相互分離をはかる方法である。分離分析化学において最も体系化された方法論の1つであるといつてよいであろう。固定相に固体または液体、移動相に液体を用いるのが液体クロマトグラフィー(LC)であるが、今世紀の初めに、その最初の試みを見いだすことができる。高速液体クロマトグラフィーとは従来のLCに比べて著しく迅速に分離分析できるように種々の点で改良されたものの総称で、1969年にKirklandにより高速用充てん剤が開発されて以来、わずか10年であるが急速に進歩しつつある分野である。High Performance Liquid Chromatography, High Pressure Liquid Chromatography, High Speed Liquid Chromatography, などいくつかの呼び方があるがHPLCと略称する場合も多い。本稿でもHPLCと略称することにする。その特徴を列記すると、(1)迅速に分離分析ができる、(2)分離性能がよい、(3)多種の分離様式(モード)がある、(4)高感度検出の可能なことが多い、(5)適用範囲が広い、(6)不安定な化合物でも比較的穏やかな条件下で分析できる、(7)必ずしも試料の誘導体化の必要がない、などであろう。これらの特徴は、高压に耐える高性能充てん剤、高压定流量ポンプ、高感度検出器、高压配管系などの開発によってひらかれた。特にその広範な適用性によって応用はここ2、3年、ガスクロマトグラフィーを凌駕するいきおいにある。またHPLC用水系GPCゲルが開発されたことによって、生体試料の分離分析への適用がふえ、臨床検査への広範な取り入

れへの期待と相まって、めざましい展開をとげつつある。Analytical Chemistryに掲載された論文件数を比較してみると、3年前の1976年には、ガスクロ関係61件、HPLC関係24件であったのが、今年1年間では、ガスクロ49件、HPLC59件という具合に明らかに逆転していることがわかる。今後ともこの傾向が続くものと思われる。先にあげた特徴も一般的にいつてそういえるということであって、個々については多様な高度な要求がどんどん出てきて、場合によってはまだまだ不足ということはいくらでもあるであろう。

1 HPLC システムの構成

HPLC システムの構成は、ポンプ、カラム、検出器が主要な柱となり、他に溶媒タンク、試料注入器、脈流消去用ダンパ、圧力計、流量計、記録計、配管、などからなる。そのブロック図を図-1に示す。目的によっては、この他に、溶媒組成を時間的に変化させる溶媒グラジエント装置や、一巡ループを作つて分離の向上をはかるリサイクル装置が付け加わる。ポンプはHPLCにおいて、最も重要な部品の1つで、システムに移動相を安定に、一定流量で流すために用いられる。HPLCに移動相を流すためには大きな圧力がある。150 kg/cm²以下の圧力で使うことが多いが、時にはそれ以上の吐出圧力が必要となる。最大吐出圧力として350 kg/cm²と称するポンプが平均的である。従来、多く使われてきたのはMilton-Roy型のシングルプランジャー型のピストンポンプであるが、これには脈動が伴うためダンパーを用いて脈動を減少させる必要があった。ダンパーにはブルドン管や空カラムと細管コイルの組み合わせが使われる。これは電子回路でいえばCRのフィルターに相当

図-1 HPLC システムの基本構成

する。脈動はカラムの抵抗でもかなり軽減されるが、検出器によっては微小な脈流が雑音になるのでできるだけ除くのがよい。最近では脈動を吸収する機能をもつマルチプランジャー型ポンプなど、高価ではあるが使いやすく高性能な送液システムが利用できるようになった。

試料注入器にはマイクロシリンジによるセプタム注入方式とバルブによるループ注入方式がある。前者は液量を任意に選べる利点はあるが、高圧では(50 kg/cm²以上では)注入が難しくなる。また何回か使用するとシリンジの針先きにゴムくずがつまったり、配管に混入して流路がつまるなどのトラブルが生じる欠点がある。一方、後者はループによって注入量は一定に固定されるが、その再現性は良い。高圧にも充分耐え、使いやすいレオダイン社製のループ注入器が多用されるようになってきたようである。

カラムは実際に試料成分の分離が行われる場所で、微小粒径の充てん剤が詰められている。分配、吸着、イオン交換クロマトの分析用カラムとしては、内径 2~4 mm、長さ 25~60 cm のステンレス管またはガラス管を、GPC 用では内径 7.5 mm、長さ 60 cm のステンレス管を 1 本ないし数本つないで用いることが多い。移動相の流量は 0.5~2 ml/min で用いられ、圧力損失は充てん剤の粒径やカラムの長さによるが 30~150 kg/cm² で使うことが多い。

試料注入部とカラム、カラムと検出器を結ぶ配管は、この中での無駄な溶質バンドの広がりを防ぐため、内径の小さい管でできるだけ短くする必要がある。

細管中での広がりとは次式で与えられる。

$$\sigma = 460 \times S \times \sqrt{\frac{LQ}{D}} \dots\dots\dots (1)$$

ここで σ は溶質が細管中を流れる間に起きる移動相中

への広がり (μl)、 S は細管の断面積 (cm^2)、 L は細管の長さ (cm)、 Q は移動相の流量 (ml/s)、 D は移動相中での溶質の拡散係数 (cm^2/s) である。この式は細管の入口でパルス状に注入された溶質が出口でもつ広がりを移動相の体積として表したものである。いくつかの管径について計算すると表-1 のようになる。

表-1 細管中でのピークの広がり ($D=10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ の場合)

内径 (mm)	ピークの広がり σ (μl)
0.5	165.0
0.4	105.6
0.2	26.4

ただし、 $L=20 \text{ cm}$ 、 $Q=1 \text{ ml/min}$

理論段数 6,000 のカラムについて、ある溶質の保持容量を 15 ml とすると、カラムによる広がり σ は約 200 μl (次節参照) となる。この値は現在の HPLC では比較的良好な部類に属するものであるが、試料注入以後の配管による広がりには注意しなければならないことがわかる。内径 0.4~0.2 mm のステンレス細管がよく用いられる。

カラムを出たところでは圧力が大気圧近くに返るので、溶解していた気体が気ほうとなって発生することがあり、検出に邪魔となるから、溶媒をあらかじめ脱気しておくのが望ましい。超音波をかけながら減圧するのが容易な方法である。ポンプと溶媒タンクの間に溶媒フィルターを、ポンプとカラムの間にラインフィルターを入れることはつまりぬトラブルを避けるために有効なことである。HPLC 用検出器として要求される性能は、高感度、万能性または特異性、速応性、微小容量 (10 μl 以下)、安定性、操作性 (使いやすさ) などであろう。紫外吸収検出器 (UV) と示差屈折率検出器 (RI) が従来から最もよく用いられているものである。UV 検出器は高感度、特異的検出器と呼ぶものである。一方、RI 検出器は溶媒と溶質の屈折率の差によるもので、ほとんどすべての溶質に感度を有する万能型検出器であるが、感度的には若干不足と思われる場合が多い。この外によく用いられるものとしてけい光検出器、電気化学的検出器がある。これらはいずれも高感度、特異的検出器と呼ぶものである。検出器については稿を改めて述べる。

2 理論的基礎

HPLC においては、試料中の各成分をいかに速く、どれだけ純粋に分離するかということが最終の目的になる。重なっているピークを相対的にずらすか、あるいはピーク自体をシャープにして分離をはかるか、とる手段はいくつかあるであろう。これらを考えていくためにクロマトグラフィーを記述するいくつかの式と術語に簡単にふれておこう。図-2 の 2 つのピークからなる典型的

図-2 HPLC クロマトグラム

なクロマトグラムをもとに話を進める。

2.1 保持容量, キャパシティブクター, 分離係数

固定相といかなる相互作用もない溶質成分はカラムを素通りして最初に出てくる。試料を注入してから, この素通りした溶質が溶出するまでに流れた溶媒の体積はカラム中で充てん剤によって占められていない体積に等しく, 間げき容量と呼ばれる。固定相となんらかの相互作用をする溶質は必ず, 間げき容量よりも後に溶出する。間げき容量を V_0 , ある溶質の保持容量を V_1 とすると, 保持力を表すパラメーターである質量分布比 (キャパシティブクターと呼ばれることが多い) k' は次式で与えられる (k' は D_m で表されることもあるが, 移動相中の拡散係数とまざらわしいのでここでは用いない)。

$$k'_1 = \frac{V_1 - V_0}{V_0} \quad \dots\dots\dots (2)$$

与えられた溶媒, カラム, 操作条件下では k' は溶質固有の値を示し, 定性のための裏づけとなる。 k' の範囲としては, $0 < k' < 10$ にとられるのが適当である。

式 (2) を保持容量に関した式に変形すると,

$$V_1 = V_0 (1 + k'_1) = V_0 + K_1 V_s \quad \dots\dots\dots (3)$$

$$\left(k'_1 = K_1 \frac{V_s}{V_0} \right)$$

ここで K は分配係数, V_s は固定相の容積である。 V_s は実験的に求めにくいので K よりも k' の方が取り扱いやすいが, GPC では逆に K を用いる方がわかりやすい。2つの溶質のキャパシティブクターの比は分離係数 α と定義され, この2成分を分離するカラムの選択性を示す尺度になる。

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} = \frac{V_2 - V_0}{V_1 - V_0} \quad \dots\dots\dots (4)$$

$\alpha=1$ とはピークが重なることを意味し, なんら分離が行われない。最近の HPLC では, $\alpha=1.05$ という小さな分離係数でも充分な分離が行われている。

2.2 理論段数

カラムの良否は, カラム効率, 定量的には次式の理論段数として表される。

$$N = \left(\frac{V}{\sigma} \right)^2 = 16 \left(\frac{V}{W} \right)^2 \quad \dots\dots\dots (5)$$

V はある溶質の保持容量, σ は溶出曲線をガウス型の正規分布曲線とみなした時の標準偏差, W はベースラインにおけるピークの広がりであり ($W=4\sigma$), ピークの両側の2つの変曲点でひいた接線のベースラインとの交点の間隔である。変曲点と接線は正確には決め難いので, W の測定にはある程度の任意性が残る。そこで次の方法がすすめられる。ピークの形状をガウス曲線と仮定すると半値幅 Γ と W との間には $W=1.70\Gamma$ の関係があり, 実際のクロマトグラムから容易に求められる半値幅を用いて次式で計算するのがよい。

$$N = 16 \left(\frac{V}{1.70\Gamma} \right)^2 \quad \dots\dots\dots (5')$$

ピークの広がり小さく, 形がシャープになれば, 理論段数の高い効率のよいカラムが得られたということになる。分配, 吸着やイオン交換カラムではフィートあたり 6,000 段以上, GPC カラムではフィートあたり 8,000~10,000 段以上のものが得られる。理論段数の算出は用いる溶質によって違ってくる。特に GPC では, 溶離範囲内のピークの半値幅はそれほど変わらないので, 遅れて溶出するものに対して理論段数は高めの値を示す。充てんが難しいので, 充てんされたカラムとして市販されている GPC カラムでは, 小さな分子サイズの溶質であるアセトンやベンゼンを用いて理論段数が算出されているようである。

2.3 分離度

2つのピークの分離の程度は分離度 R と定義され, 保持容量の差をバンド幅の平均で除したものである。

$$R = \frac{V_2 - V_1}{\frac{1}{2}(W_2 + W_1)} \quad \dots\dots\dots (6)$$

分離度はまた次式でも与えられる。

$$R = \frac{1}{4}(\alpha - 1)(\sqrt{N}) \left(\frac{k'}{k' + 1} \right) \quad \dots\dots\dots (7)$$

この式から, どのように分離度をあげるべきかの指針がえられる。最も直接的には N を増すことである。そのためにはカラムを長くすればよい。同じカラムを2本接続すると分離度は $\sqrt{2}$ 倍向上するが, 同じ流速を保つためには, ポンプは2倍の吐出圧力を必要とし, 2倍の時間がかかり, 検出器の同じ応答をうるためには感度を $\sqrt{2}$ 倍しなければならない。カラムを長くしないで N を増すには後に述べるように流速を下げる方法がある。この方法では時間はかかるがポンプの吐出圧は減少し, 検出器の応答を増す利点がある。分離度をあげる別の方法は k' を増すことである。溶媒の項で述べるように, 溶媒組成を調節することによって k' を変えることができる。 $R > 0.8$ が定量に差し支えない分離度といわれる。

2.4 理論段高さ, カラムにおけるピークの広がり

カラム長さ L を理論段数で除した値は理論段高さと呼ばれる。すなわち $h=L/N=\sigma^2/L$ この値が小さいほど、広がり小さいピークを与える効率のよいカラムである。各広がりに対する原因の理論的考察から理論段高さは、一般に次式で与えられる。

$$h = \frac{2\tau D_m}{v} + \frac{qk' d_s^2 v}{(1+k')^2 D_s} + \frac{1}{2\lambda d_p} + \frac{D_m}{\omega v d_p^2} \dots\dots\dots (8)$$

ここで v は移動相の線速度、 D_m 、 D_s は溶質の移動相及び固定相での拡散係数、 d_s は固定相厚み、 d_p は充填剤の粒子径である。第1項は溶質の移動相中での縦方向の拡散による広がり起因するものである。 τ は充填剤によって拡散が妨げられることに対する補正である。 D_m を $10^{-5} \sim 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ 、 v を $0.1 \sim 1 \text{ cm/s}$ と考えると、第1項による寄与は $2 \times 10^{-3} \text{ mm}$ 以下と小さく、HPLC では通常無視される。第2項は固定相での溶質の拡散に基づく広がりによるものである。 q は固定相の形状に関する係数で、厚さ d_s の薄膜では $2/3$ 、半径 d_s の全多孔性球に対しては $2/15$ という値が与えられている。第3項は移動相の不均一な流れによって生ずる広がり、溶質の横方向の拡散によって生ずる広がりによるもので、これらは協同的に作用しあうので1つの項にまとめられる。 λ は充填剤の形状と充填状態に依存する係数、 ω は横方向への溶質の移動距離、粒径などに依存する因子である。流速に対する理論段高さを概念的に描くと図-3 のようになる。流速が大きくなると理論段高さは単調に増加する。

図-3 理論段高きの移動相流速依存性

図-4 に流速以外は同一条件で測定した GPC クロマトグラムの1例を示す。流速が増すと分離の低下と広がりによる検出器の応答の低下がみられる。

低流速範囲では式(8)の第3項の流速に依存する部分だが、高流速範囲では第3項の流速に依存しない部分と第2項が主な寄与をする。

式(8)からわかることは、充填剤の粒径が小さいほど、また移動相及び固定相内での溶質の拡散速度が大きいほど、理論段高さが小さくなることである。

図-5 に粒径の相違によるクロマトグラムの変化の例をあげる。粒径の増加と共に、分離度が低下することが

図-4 移動相流速による分離能の比較

図-5 充填剤粒径の違いによる分離能の比較

わかる。図-6 に、カラム温度を変えた時の GPC クロマトグラムの変化を示す。温度以外は同一条件で測定されたものである。カラム温度の上昇により、明らかに分離度の向上と検出器応答の増加がみられ、溶媒粘度の減少、溶質の拡散速度の増加による効果に帰せられる。

3 充填剤

HPLC の分離様式は、4 種類に大別できる。すなわち、

図-6 カラム温度の違いによる分離能の比較

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, ゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) である。これらの分離様式を適用するにあたっては, 1つの分離様式のみで, 他の分離様式が関与しない条件を選択するのが望ましいが, 実際には2種類以上の分離様式が同時に働くことも多く, また様式自体, 正確に規定することが困難な場合も多い。逆に, これらのことを積極的に利用する場合もありうる。

HPLC においては, 充てん剤粒子の形状, 粒径, 粒径分布, 内部構造のコントロールが重要であり, 多様な目的に沿って, 粒子を構成する基材と空孔内部表面の化学的性質に関して高度な化学的修飾が施されている。

シリカゲルとポラスポリマーが基材として主に用いられている。GPC をのぞくと, HPLC 用のポラスポ

リマーは我が国で主として開発されたものであり, さまざまな用途にあわせた基材の異なるものがメーカから提供されている。上記4つの分離様式に対応した充てん剤がある。HPLC 用充てん剤の例を表-2 にあげる。

充てん剤は一般に固定相と固定相を保持する保持体粒子から構成される。GPC や吸着クロマトでは保持体粒子そのものが固定相としての機能をもつ。固定相として移動相溶媒に溶け合わない液体を用いる, いわゆる液々分配型クロマトが, そのカラムの不安定性のゆえにあまり用いられなくなり, 分配型といえ, 化学結合型充てん剤が主体となってきた。化学結合型充てん剤は元来, 分配用液体固定相を物理的に被覆した充てん剤の欠点を改善するために研究されたもので, 分配クロマト用充てん剤とみなされることが多いが, 実際の分離機構については, まだわからないところもあり, 保持体表面の極性, 吸着性を改質したものであるとみれば, 吸着クロマトの一種と考えた方がよいのかもしれない。また, ポラスポリマー充てん剤 TSK-LS-110~170 も, 一応, 分配クロマト用充てん剤と称されるようであるが, 分配固定相の役割もはっきりしないし, 明らかに吸着効果も働いているようで, どちらと区別するのか難しい。

保持体粒子は図-7 のように, 全多孔性型と表面多孔性型に大別される。表面多孔性型は 20~50 μ m のガラス球に微細なシリカゲルを約 1 μ m の厚さに付着させたものである。

この外にペリキュラ型と呼ばれる, ガラス球の表面に薄く橋かけ高分子層を被覆した構造のものがある。これらは式 (8) の第2項の d_s を小さくするというこで, 初期の HPLC 用充てん剤として開発されたが, 粒子径が大きいことと, 試料負荷量が小さい欠点があっ

表-2 HPLC 用充てん剤の例

分離様式	基材など	例	用途
GPC	有機溶媒系 (ポリスチレン)	Styragel (Waters), TSK-HG シリーズ Shodex-A-800 シリーズ	合成高分子の分子量分布, オリゴマー, 有機化合物一般。
	水溶媒系 (デンプン, シリカなど)	TSK-PW シリーズ, SW シリーズ Shodex Ionpak S-800 シリーズ, OH シリーズ	水溶性高分子, タンパク質, 糖類, ペプチド, 酵素などの生化学物質。
分配用	ポラスポリマー系	TSK-LS-110~170, Shodex HP 125, 225 日立 # 3010, 3020, 3030 など	医薬品, 界面活性剤, 食品添加物, 糖類, 抗生物質, 多環芳香族など。
	シリカ系-化学結合型	Permaphase ODS, Zorbax ODS (DuPont) μ -Bondapak/C ₁₈ (Waters), Lichrosorb RP-18 (Merck), TSK-LS-410, Shodex ODS pak-F-411, 日立 # 3050, 以上いずれも ODS	医薬品, 抗生物質, 香料, 一般化成品, 多環芳香族など多岐にわたる。
吸着用	シリカ	Zipax, Zorbax (Du Pont), Corasil, μ -Porasil (Waters), Lichrosorb SI 60 (Merck), TSK-LS-310, Shodex Silicapak-E-411	ステロイド, 芳香族脂溶性ビタミンなど。
イオン交換用	ポラスポリマー系	TSK-IEX-200 シリーズ, Shodex Ion Exchanger, 日立 # 2610, 2632 など	核酸, アミノ酸, 有機酸, アミンなどイオン化する物質
	シリカなど	Lichrosorb KAT, AN (Merk), Zipax SAX, SCX (Du Pont) Partisil-SAX, SCX (Whatman), TSK-IEX-260 SASIL	

TSK: 東洋曹達, Shodex: 昭和電工

図-7 HPLC 用充てん剤の形状

て、あまり使われなくなった。一方、全多孔性型は粒子径を小さくすることによって、主として式(8)の第3項の寄与を小さくすると同時に、80~100 Å の内部空孔を多数もった、単位体積あたり表面積の大きなもので、試料負荷量を比較的多くできるので、最近ではほとんどこの型の充てん剤が使われている。表面積は分配、吸着用で 200~800 m²/g、GPC 用で 50~300 m²/g である。

前節に述べたように、粒径が小さいと分離能が高く、かつ分離能の流速依存性が小さい長所がある。一方、欠点として、圧力損失が大きくなること、試料負荷量を多くできないことがあげられる。粒径が大きいと全く逆のことがいえる。また、粒径分布が広いと、この両方の欠点をあわせもつことになる。従って、より良い充てん剤として、狭い粒径分布が要求される。現在、5 ± 1 μm あるいは 15 ± 2 μm 程度の分布のものが市販されている。粒子内部孔径については、大きくても小さくてもピークを広げる原因となり、分離能の流速依存性を大きくするので、HPLC 用として最適の孔径が存在する。また、負荷量については粒径が大きい方が有利である。

HPLC 用充てん剤として粒径以外に必要なことをあげる。第1に十分な機械的強度をもつことである。すでに述べたように、小さな粒径の充てん剤をつめたカラムに高速で移動相を流すには高压が必要である。50 kg/cm² 以上の高压になるのが普通で、このような高压で充てん

剤が変形したり、破壊されたりするとカラムの透過性が低下するばかりでなく、空びきが生じたり、不規則な流れが起こってピークの広がりをひきおこす。

第2に粒子の均一性である。形の均一性と狭い粒径分布が要求される。カラムに充てんしやすくなるばかりでなく移動相の流れを均一にしてピークの広がりを防ぐのに効果がある。球形の充てん剤が用いられることが多く、粒径分布の小さいものが手に入るようになった。

第3に使用する移動相溶媒によって膨潤収縮しないことが望ましい。シリカゲルではこのようなことはないが、ポーラスポリマーではある程度、避けられないことで、使用にあたっては注意しなければならない。

4 移動相溶媒の選択

多種類の充てん剤に対して、非常に多くの移動相溶媒の組み合わせがありうるのが、HPLC の大きな魅力であり、わずかな溶媒組成のコントロールにより分離を達成するのは一種の精妙な芸術ともいえる。しかし、ふりかえって初心者からみると、何んとわずらわしい、複雑なという印象を受けるに違いない。使う機器分析の立場からすると、いくつかの少数の選びうる溶媒があって、それだけですべての目的にかなうという方がどんなによいかもわからない。HPLC がだれにでも使える分析機器であるためには、分離機構の定量的解明とそれにひき続く溶媒組成の決定が、この方向で行われる必要もあるであろう。

移動相溶媒としては、サンプルを溶かすものであること、充てん剤との組み合わせにおいて十分な分離を達成しうるものであること、検出器に邪魔とならないか好都合なものであること、圧力が高くならないようにできるだけ粘度の小さいこと、安定なこと、取り扱い上安全なことなどが要求される。表-3 に HPLC でよく使用される溶媒とその特性をあげる。粘度は大きいと圧力損失が大きいだけでなく、溶質の拡散係数を小さくするため

表-3 HPLC によく用いられる溶媒

溶 媒	η	RI	UV (nm)	bp (°C)	ε°
水	1.0	1.33	210	100	大
メタール	0.60	1.33	210	64.7	0.95
アセトニトリル	0.37	1.34	210	81.6	0.65
エタノール	1.20	1.36	210	78.3	0.88
プロパノール	2.3	1.38	210	97.2	0.82
ジオキサン	1.54	1.42	220	101	0.56
テトラヒドロフラン	0.55	1.41	220	66	0.45
ジクロロメタン	0.44	1.42	230	39.8	0.42
クロロホルム	0.57	1.44	245	61.1	0.40
ヘキサン	0.32	1.37	210	68.7	0.01
イソオクタン	0.37	1.40	210	99.2	0.01

η: 粘度 cP, RI: 屈折率, UV: 使用限界波長, bp 沸点, ε°: アルミナによる吸着クロマトグラフィーの溶媒強度

カラム効率を低下させる。安定性という点からすると、よく用いられるテトラヒドロフラン (THF) やクロロホルムは必ずしも取り扱いやすい溶媒とはいえない。クロロホルムはある種のステンレス配管や溶接部位などを腐食させて配管の目づまりを起こさせることがあり気をつけなければならない。THF は変化しやすく湿気を吸いやすいので、GPC 測定中に正体不明のピークがあらわれることはしばしば経験することである。

極性のある固定相、例えばシリカゲルに極性の低い溶媒、例えばヘキサンを組み合わせる方式を順相クロマトグラフィーと呼ぶ。溶媒極性の指標として、例えば Snyder らによって与えられた溶媒強度パラメータ ϵ^0 が使われる。この数値の大きなものほど、極性の大きな、強い溶媒と考えられる。順相クロマトグラフィーでは、非極性の溶質成分ほど早く溶出し、溶媒の極性が大きくなるほど、溶質成分の溶出は早まる (k' が小さくなる)。この時、溶媒の極性を大きくするために、非極性のヘキサンに少量のエタノールなどを加えることによって調節する。

すなわち、順相クロマトグラフィーでは、保持力のある比較的極性の溶質を、溶媒極性を大きくすることによって溶出を早め分離をはかるのが一般的な考え方である。

これに対して、極性の低い固定相に極性の大きい溶媒を組み合わせる方式は逆相クロマトグラフィーと呼ばれる。例えば ODS-シリカゲルとメタノールの組み合わせである。逆相クロマトでは、極性の大きな溶質成分ほど早く溶出し、溶媒極性を大きくすることにより、溶質成分の溶出が遅れる (k' が大きくなる)。ODS-シリカはシリカゲルの表面に疎水性の直鎖脂肪族であるオクタデシル基が共有結合したものである。溶質の疎水性部位はこの疎水性のオクタデシル基とより大きな親和性を示し、溶質の親水性部位 (極性部位) は極性溶媒に親和性を示す。従って、極性の大きな溶質ほど移動相溶媒とともに早く溶出する。

逆相クロマトでは、比較的保持力のある極性の小さな溶質を、溶媒の極性を大きくして溶出を遅らせ、分離をはかるというのが一般的な考え方である。逆相クロマトでは、一般に、溶媒極性をメタノールやアセトニトリルなどの有機溶媒に水を加えることによって調節する。

以上のことから溶質成分の出る順序は、順相クロマトと逆相クロマトでは全く逆になることがわかる。

これらのことをまとめて表-4 に示す。また、これらの関係を図-8 に描く。水平軸の上下で、順相クロマトと逆相クロマトを区別する。左回りに溶媒極性が大きくなる。

溶質の極性は縦軸に示され、上ほど極性が大きい。保持容量は水平方向に示され、右へ行くほど k' は大きく

表-4 順相、逆相クロマトグラフィーの比較

	順相クロマトグラフィー	逆相クロマトグラフィー
充てん剤の極性	大 例：シリカゲル	小 例：ODS-シリカゲル ポリスチレンゲル
溶媒極性	小～中 例：ヘキサン～ヘキサン／メタノール	中～大 メタノール～メタノール／水
溶出順序	非極性溶質から溶出	極性溶質から溶出
溶媒極性を増加する時	k' 減少	k' 増加

図-8 順相-逆相クロマトグラフィーの溶媒及び溶質の極性との関係

なる。

溶出の順序については、溶媒の極性からみる外に、溶質の溶媒への溶解度を変化させるとみることもできる。

例えば、逆相クロマトでは、水を加えることにより脂

図-9 順相-逆相クロマトグラフィーの比較

溶性溶質の溶解度が減少するため、溶出が遅れるとみることできる。

順相及び逆相クロマトグラムの例として女性ホルモンの分離について図-9 に示す。溶出順序が順相、逆相で全く逆転していること、溶質の極性と溶出順序とがそれぞれ一致していることを理解できる。環につくヒドロキシル基の数が多いほど、溶質の極性は増大するとみてよいであろう。

溶媒極性の大小以外に、溶媒の性格を区別するのに、貧溶媒、良溶媒といういい方をするところがある。これは前にもふれた溶質の溶解度を基準にしてのことと考えてよいであろう。分離能をあげて、かつ最終的に良溶媒となることが、溶媒及び充てん剤の選択の目安の一つとしてあげられる。

今回は、HPLC の基礎的な背景をできるだけ平易に述べた。次回には検出器を中心にふれる予定である。

(昭和 54 年 11 月 29 日受理)

文 献

一般的参考書として以下の本をあげておく。

J.C. Giddings, "Dynamics of Chromatography", Marcel Dekker (1965)

J.J. Kirkland ed. "Modern Practice of Liquid Chromatography", Wiley (1971)

L.R. Snyder, J.J. Kirkland, "Introduction to Modern Liquid Chromatography", Wiley (1974)

波多野博行編, "高速液体クロマトグラフィー", 南江堂 (1973)

波多野博行ら, "液体クロマトグラフィーとその応用", 講談社 (1974)

波多野博行, 花井俊彦, "実験高速液体クロマトグラフィー", 化学同人 (1977)