高速液体クロマトグラフィー

高速液体クロマトグラフィー（以下高速 LC）は従来の LC の欠点である分析時間のかかる点を高性能の充填物の開発により、GC とほとんど同じ程度の分離能と分析時間を得ることが可能になった。すなわち吸着型、分配型、イオン交換型では内径 2～3 mm、長さ 50～100cm のカラムに 5～30 μ の粒の揃ったペリキュラー（表面多孔質）型または全多孔質型の充填物を使用（分配型ではこれに固定液相を化学結合させたものを使用）して固定相とし、単一溶媒、混合溶媒またはグラジエント（こう配）方式による溶媒を移動相として 30～350 kg/cm² の圧力で 1～2 ml/min の流速で分離を行なう。紫外、可視部に吸収のある試料には紫外吸収計を、その他一般用としては示差液体屈折計を検出器として記録する。検出器の性能は GC に比して劣り、今後の開発が望まれる。高分子物の分子量分布に必要な GPC も、高速 LC の技術を取り入れ、従来 200 分以上かかるものが、その 1/10 程度に短縮されたが、さらに高速 LC の GPC 用の高性能のゲルの開発が必要である。

武 内 次 夫*

1. 緒 論

ソビエトの学者、Tswett が植物色素の分離にクロマトグラフィーの手法を初めて使用したのが 1903 年であるから、それからすでに 70 年を経過している。この最初の技術はカラム法による液体クロマトグラフィー（以下 LC と略す）であった。この方法は分離に時間を要するので、その後これの改良別法としてプレート法が開発された。すなわちペーパークロマトグラフィーであり、薄層クロマトグラフィーである。一方移動相に気体を使用するガスクロマトグラフィー（以下 GC と略す）が実用化されるにおよび、これが分離性能がよく、分離に要する時間が短く、かつ分離物の検出が高感度に精度よく行なわれる点、さらに気体試料の分析も可能の点から、大いに実用されかつ大きな進展をみせた。しかし GC に適する試料は気体または気体にしうる液体または固体に限定される。熱を加えて気体になるまでに分解するものや、気体に変え得ない試料は不適当である。これらの試料も GC で行なうための工夫、すなわち試料を気化しうる誘導体に変える方法など研究されているが、このような化学

反応を併用することなく行なう方法としてカラム法による LC が GC の進展とともに見直され、この方法の近代化が研究され、その結果アミノ酸分析計やゲルパーミエーションクロマトグラフィーが開発され、さらに高速液体クロマトグラフィー（以下高速 LC と略す）が開発された。現在の高速 LC による分離能や分析時間は、ほとんど GC に匹敵し、検出器の性能のみが劣る程度にまで進展した。生命現象の解明と関連し、今後の発展が予想される生体試料、生化学試料、臨床検査試料など、従来 GC で不適当なこれら試料に対し、高速 LC が果す役目は非常に大きいことが予想される。

LC を分離を行なう原理によって、吸着型、分配型、分子篩型、イオン交換型に分類する。クロマトグラフィーには固定相と移動相の二つの相があり、この二相の間に試料の各成分が分配される割合が異なることにより分離が行なわれる。今 A、B、C の三成分よりなる試料があると仮定する。この三成分が固定相の二相に分配される割合が A が移動相より固定相により多く分配され、C は固定相より移動相により多く分配され、B は両者の中間とすると、固定相の存在するカラムを移動相が通過したとき、C は移動相とともに容易に移動するに反し、A は固定相に親和性が強く、あまり移動し得ない。B は A と C との中間である。した

* Tsugio TAKEUCHI 名古屋大学（工学部 464 名古屋千種区不老町）教授・工博
High Speed Liquid Chromatography

がって移動相を十分移動させ、すなわち各成分を溶出させるとCは最も早く溶出し、つぎにBが溶出し、最後にAが溶出する。吸着型の場合は固定相としてカラムに充テンするものが一般に広い表面積をもった吸着体であり、液-固クロマトグラフィーまたは吸着液体クロマトグラフィーと呼ばれる。分配型の場合は固定相として担体に保持された液体が使用され、担体としては広い表面積を持った不活性体を使用される。これを液-液クロマトグラフィーまたは分配液体クロマトグラフィーと呼ばれる。分子篩型の場合は固定相として分子篩の役をするゲルをカラムにつめる。生化学者はゲルろ過法 (Gel Filtration)、高分子化学者はゲルパーミエーションクロマトグラフィー (Gel Permeation Chromatography 以下 GPC と略す) の名称を使用するが多いが、いずれも上記の原理によるもので、総称してゲルクロマトグラフィーという。イオン交換型は固定相として有機または無機のイオン交換体を使用する。これをイオン交換クロマトグラフィーと呼ばれる。

高速 LC では試料の種類により、上記充テン物を選択して、混合成分の分離を行なうが、いずれの場合にも、分離能を劣化させることなく、迅速分析を行なうために、細いカラムを使用して細かい高性能充テン物を充テンし、早い速度で移動相を流すように工夫する。低分子の有機混合物を分離するによく使用される上記吸着型、分配型カラムについていえば、カラムの内径 2~3 mm、長さ 50~100 cm に高性能の充テン物を充テンして、移動相の液体を 1~2 ml/min の流速で流す。このため移動相に 60~350 kg/cm² の圧力をかける。

高性能の充テン物として、最初ペリキュラー型の充テン物が開発され、高速 LC に使用して成果を得た。ペリキュラー型の充テン物とは後述するように表面多孔性型ともいうべきもので、剛度の大きい芯として、大きさの揃ったガラスビーズ (たとえば直径 30 μ) を用い、その表面に極微小のガラス粉末を海綿状に付着 (たとえば厚さ 1 μ 程度) させるか、または腐食によりガラス表面を粗状にする。このようにすると表面の

みが分離に有効で、内部は分離に利用されない。このような微粒子を充テンすると、なぜ高性能でかつ分離に要する時間を短縮できるかについて述べる。クロマトグラフィーで分離に要する時間は固定相と移動相との間で拡散平衡に達するに要する時間に支配される。従って LC に要する分析時間が GC におけるより長いのは試料成分の移動相中における拡散係数が気体と液体で異なることによるわけで、これは本質的なものである。この欠点を補うには拡散する距離や容積をより小さくすればよい。従って充テン物を細かくし、かつ充テン物を密着させるとその間を流れる移動相中の試料の拡散する長さや容積をはなはだしく小さくすることが可能である。また固定相の充テン物も表面のみ分離に働くペリキュラー型では、充テン物の内部まで試料成分が拡散する必要がなくなり、固定相と移動相の間で拡散平衡に達する時間を短縮し、従って迅速分析が可能となる。さらに充テン物をペリキュラー型より均一多孔質の 5~10 μ のより小さい粒子の粒の揃ったシリカゲルやその表面に固定液液体を化学結合させたものなどを使用することにより、分析時間を短縮しながら、その容量や分離効率をさらに上げることがわかってきた。結果的には薄層クロマトグラフィーのシリカゲルの粒子の大きさをさらに小さくして粒の大きさを揃え、充テンして、移動相の通過速度を速くするために加圧したものである。

高速 LC に適する吸着型充テン物、分配型充テン物、イオン交換充テン物については、かなり性能のよい物が開発され、市販されている。ところが高速 LC に適する分子篩型充テン物としては、比較的低分子物の分離に使用する有機ゲルは開発され、市販されているが、高分子物の分子量分布測定などに使用する有機ゲルについては目下開発に努力している段階で、今後の発展を待たねばならない。これは高速 LC を行なうためには、カラムへの加圧が必要である、高分子物分離用の有機ゲルは一般に低分子物分離用ゲルよりも加圧による変形が起こりやすいため高速では困難の点が多い。しかし GPC を従来よりも測定時間短縮の高速化の要望に答えるため、高速 LC に適する有機ゲルの開発も促進され、かなり進展しているので、その模様については後述する。

GC については移動相の種類としては水素、ヘリウム、アルゴン、窒素が最も多く使用され、充テン物も気体試料を除いてはほとんど分配型のものが多い。分離性能はよく、検出器の性能もよく、分析時間も短い。従って GC に適する試料については GC で分析するのが望ましい。高速 LC は、GC に匹敵する分離性能を有するようになってきたが、分離を行なうた

武内次夫氏 昭和13年東京大学工学部応用化学科卒業、昭和18年東京大学工学部講師。昭和26年山梨大学工学部教授昭和33年名古屋大学工学部教授。専門はクロマトグラフィー、原子スペクトル分析に関する研究など、趣味はスポーツ (ゴルフなど)。

第1表 多孔質型充テン剤

品名	使用法	大きさ(mμ)	表面積(m ² /g)	その他	
シリカ	Bio Sil A	L S, L L	20~40	200	不規則形, Bio Rad Varian 製
	Merckosorb (Lickrosorb)	L S, L L	10~40	200	不規則形, E. Merck 製 Varian, E. M. Lab. 製
	Micropak	L S, L L	~10	500	Varian 社製
	Porasil A (Spherosil XOA)	LS, GPC	37~75	—	球状, Waters 社製
	Porasil B (Spherosil XOB)	L L	37~75	—	球状, Waters 社製
	Sile X	L S	36~45	300	不規則形, Perkin Elmer 製
	Woelm	L S, L L	18~32	500~600	粒子のそろった不規則形 Woelm 製
アルミナ	Zorbax	L S	4~6	大	du Pont 製
	Woelm	L S, L L	18~30	200	不規則形, Woelm 製
	Bio Rad AG	L S, L L	<74	200	不規則形, Bio Rad 製
樹脂	Poragel	LL, GPC	—	—	不規則多孔質ポリスチレン Waters 製
	Hitachi gel	L S, L L	25	—	不規則多孔質ポリスチレン 日立製
化学的結合 Durapak				エステル型であるのでこの結合は加水分解を受けやすく、熱にも不安定	
{ OPN Carbowax n-オクタン }		L L	35~75	—	{ Porasil にエステル型結合 水, アルコール不可 熱不安定, Waters 製
			75~125	—	
				—	

めの移動相と固定相の組合せの選択が重要で、従って高速 LC では GC ほど最適条件を容易に求めることは、現段階では困難である。従って GC に適しない試料を高速 LC で分析するのが望ましい。高速 LC では移動相の種類を各種選択することができ、かつ固定相の種類との組合せを最適のものを選択することにより、GC に適しない試料の分析が可能になる。GC の場合には、カラムを恒温で行なう以外に昇温装置を取り付けることにより、測定できる試料の範囲を拡大している。一方 LC の場合には移動相として液体を使用するのであるから、あまりカラム温度を変化させることは GC に比し、困難である。しかし高速 LC では移動相として単一の溶媒のみでなく、混合溶媒の使用も可能であり、さらに展開中に移動相の組成を徐々に変えることのできる、いわゆるグラジエント装置を使用することが可能である。これにより、LC で分離できる試料範囲を大きく拡大できる特長がある。このようにして GC、および高速 LC は両者が競争状態に在るのではなく、両者が相補って、この両者の方法を適用することによって、ほとんどすべての試料を分析することが可能となる。GC についてはほとんど完成した分析法に近いといえるが、LC については、検出器を除き、GC に近い分離能、分析時間には達したが、まだ今後の発展をまたねばならぬ面も多い。LC の分

離については、いちばん大切なことは上記したように、充テン剤の高性能化と充テン剤である固定相と移動相の組合せの選択である。これはいずれもなかなかむずかしい問題であるが、今後の進展を期待したい。ことに後者の問題は両者の選択をうまく行なうと、グラジエントの使用と併せて大きな成果が期待しうる。また高速 LC の検出器のさらに各試料に対し万能的でかつ、高感度でかつ、安定なものが必要である。

2. 装置の概要

装置は移動相になる溶媒を貯める貯槽、溶媒を送りだす高圧ポンプ、試料注入部、分離カラム、検出器、記録計よりなる。

このうち最も重要な部分は分離カラムである。移動相を流す線速度を大きくしてもカラムの分離段数が落ちない充テン物の完成が重要である。高速 LC では上記したようにカラムの内径 2~3 mm、長さが 50~100cm のカラムを用い、移動相の溶媒は、分析時間を短縮するために 4000~6000 ml/cm²/hr の速度で流す。(従来の LC では 100~200 ml/cm²/hr 程度であった) 従ってポンプによってカラムまでの径路には 60~350 kg/cm² の圧力をかけなくてはならない。従ってカラムおよび配管は通常ステンレス鋼の管を用い、接続部も同質の金輪をはめてネジで締めつける。

第2表 ベリキュラー型充テン剤

	品名	使用法	大きさ(mμ)	表面積(m ² /g)	その他	
シリカ活性	Corasil I	L S, L L	37~50	7	一重層 Waters 製	
	〃 II			14	二重層 Waters 製	
	Pellosil HS, HC	L S, L C	37~44	HS 4 HC 8	HC より容量大 Reeve Angel 製	
	Perisorb A	L S, L L	30~40	~10	Corasil に似る E. Merck, Varian, E. M. Lab. 製	
	Vydac	L S, L L	30~44	12	平均孔 57Å メタノールによる極性大のもの不可 Applied Sci 製	
シリカ不活性	Liqua Chrom	L L	44~53	<10	不規則形, シリカガラス Applied Sci 製	
	Zipax	L L	25~37	~1	ガラス表面にシリカの薄膜 表面不活性で L S には不可 du Pont 製	
	Perisorb B	L L	30~40	—	Perisorb A を表面不活性にしたもの	
コーティング	Zipax-HCP	L L	25~37	~1	Zipax の表面を飽和炭水素ポリマーで被覆, 逆相 L L 用 du Pont 製	
	Zipax-CNT	L L	25~37	~1	Carbowax	du Pont 製
	BOP				β, β'-DDPN	
	PAM				ナイロン	
	ANT				シアノエチルシリコーン	
	TMG	トリメチレンジグリコール				
Pellidon	L L	55~65	~1	ガラス球をナイロン被覆 <50°C Reeve Angel 製		
アルミナ	Pellumina HS	L S, L C	37~44	HS 4	ガラス球をアルミナで被覆 Reeve Angel 製	
	〃 HC			HC 8		
	Permaphase-ODS	L L	25~37	<1	Zipax にオクタデシルシリコーンを結合逆相用, 水, 熱に安定	
	〃 -ETH				Zipax にシリコーンエーテル結合, 水, 熱に安定, du Pont 製	
化学結合	Durapak/corasil	L L	37~50	~7	Corasil の表面をエステル化, アルコール, 水, 熱に不安定	
	Carbowax 400				Permaphase-ODS に似る	
	Corasil-ODS				Waters 社製	

また充テン物をささえる口過板も海綿状のステンレス板を用いる。カラムの圧力が 100 kg/cm² 以下のときは外側に保護管をつけた肉厚のガラス管やテフロンパイプなども使用可能である。カラムの前の配管は通常内径 0.5 mm, カラムを出てからの配管は通常 0.25 mm 程度のものを用いる。カラムの外側に一定温度の水を流したり, 一定温度の加熱容器に入れたりしてこれによりカラムの温度を一定にすることによって再現性のあるデータを得ることができるようにする。温度制御の精度は約 $\pm 0.2^\circ\text{C}$ といわれている。

試料注入法は GC の場合と同様, Loop 方式と注射器注入方式がとられる。後者の場合, セプタムにマイクロシリンジを使用すると内圧が 50 kg/cm² 以上になるとマイクロシリンジの円筒が押し戻されたり, 漏水が生ずるため, このような場合にはポンプの運転

を一時止めて後に注入する。前者のループ注入方式の場合は後者の場合より, より高圧の場合でも注入可能といわれている。

2-1 固定相

分離で重要なのはカラム内の固定相と移動相の選択である。固定相としてはベリキュラー型(表面多孔性型), 全多孔質型があり, 両者をそれぞれ L-S, L-L に使用する以外に固定相液体を上記固体上に化学的に結合させたものも使用する。これは移動相を流した時にも固定相液体が流出しないように化学的結合をさせたもので L-L として使用する場合に都合がよい。全多孔性型は第1表のごときもので直径 5~40 μ 程度のものが用いられ, 粒子がより細くなると, 表面積がより増大し, かつ L-S, L-L の平衡が早く成り立って都合がよいが, 細くなるにつれて移動相の流速

第3表 液体クロマトグラフィーの検出器

	単 位	フルスケール感度	試料感度	セル容量 (μ l)
紫外外部吸収部	吸光度 (AU)	5×10^{-3}	5×10^{-10} g/ml	10
紫外可視分光光度計	吸光度 (AU)	1×10^{-2}	1×10^{-9} μ	8
ケイ光光度計	ケイ光強度 (FAU)	10^{-3}	10^{-11} g/ml	10
分光ケイ光光度計	ケイ光強度 (FAU)	10^{-4}	10^{-10} μ	3
示差屈折計	屈折率 (RIU)	10^{-5}	5×10^{-7}	2
ポーログラフ	マイクロアンペア (μ A)	2×10^{-3}	10^{-9} μ	10
熱吸収計	度 ($^{\circ}$ C)	5×10^{-3}	10^{-9} g/sec	9
フレームイオン化検知器	アンペア (A)	10^{-11}	10^{-8} g/sec	—
電導度計	マイクロモー (μ mho)	5×10^{-2}	10^{-8} g/ml	1.5

第1図 高圧ポンプの各種

を上げるためには高圧を使用しなければならない。これに対しペリキュラー型は第2表のごときのもので剛度の大きい芯として、大きさの揃ったガラスビーズ（たとえば直径 30μ ）を用い、その表面に極微少のガラス粉末を海綿状に付着（たとえば厚さ 1μ 程度）させるか、または腐食によりガラス表面付近を粗状にする。この表面に通常 $0.5 \sim 2\%$ 重量の固定相を物理的に被覆するか、または化学的に結合させる。このようにすると試料が内部へ深く浸入することがなく、従って L-S または L-L の平衡状態に達する時間が著しく速くなる利点がある。固定相液体を担体に物理的に被覆したときはその一部は移動相に溶けて流出する。この場合これを防ぐため分離カラムの前に同じ固定相を詰めたプレカラムを使用する。化学的に結合させたものではこの心配がないので、このような処置は必要がない。

上記以外にイオン交換樹脂を物理的に表面被覆したものに du Pont 社製の Zipax-SAX（強イオン交換）、-SCX（強陽イオン交換）、-WAX（弱イオン交換）があり、化学的に結合させたものには Permaphase-AAX（強陰イオン交換）がある。また Bio-Rad lab 製の Aminex などもある。

高速 LC 用の分子篩としては、ポリスチレン-ジビニルベンゼン共重合体ゲルのような有機物と多孔性ガラスビーズのような無機物が開発されている。有機低分子用としてはおおむね目的を達しているが、高分子

物用にはさらに開発が必要である。

2-2. 溶媒

LC では GC と異なり移動相溶媒を広範囲に選択できるのが大きな特長である。とくに移動相として単一溶媒を使用するばかりでなく、混合溶媒を使用したり、単一移動相に徐々に第2の溶媒を添加する、いわゆるグラジエント溶出（こう配溶出）を行なうことが、適用可能な試料範囲をはなはだしく増大する。GC においては昇温装置によって試料の適用範囲を増大するに反し、LC では可変の温度範囲は小さい。しかし GC では移動相の可変の範囲が小さいに反し、LC ではこれを有効に利用して分離困難な多成分よりなる試料の分離を可能ならしめている。

適用する溶媒の範囲も水からベンゼン、四塩化炭素まで極性の差によって各種のものが使用可能であり、さらに酸、アルカリなど各種水素イオン濃度の使用可能であり、さらに塩濃度、塩の種類などの違いによって移動の相の性質を自由に使いわけうる。また液体が溶かしうる試料の量はガス体のそれと比較してかなり高濃度に達しうることも、GC と LC の分離度と与える影響が異なる点である。

通常使用する溶媒は市販の特級品で十分間に合うが、クロロホルムに安定剤として入れてあるエタノールや変性アルコールのように混入物があるときは注意しなければならない。また高速 LC では溶媒にかかる圧の変化が激しいので、中に溶け込んでいるガスが気泡となって分離や測定を妨害することが多いので、使用前に減圧、加温操作で脱気する必要がある。

2-3. 高圧ポンプ

大きく分けて、モーター駆動式のものと、ガス圧駆動式のものに分類できる。前者に属するものはさらにピストン型（シングルピストン、ダブルピストンなど）スクリー型、ダイヤフラム型に分かれる。それぞれの送液の原理を第1図に示す。

1) Du Pont UV Detector

2) RI Detector (示差屈折計)

イ) Waters Associates, Inc. R-400

ロ) du Pont 830 形液体クロマトグラフ用検出器

3) Varian Aerograph ミクロ吸着

サーミスター検出器

4) パイニカム社の Wire-FID (検出器)

イ) 針金型検出器

ロ) 同上の改良型

第2図 各種検知器

2-4. 検出器

液体クロマトグラフィー検出器として用いられているものの性能をあげると第3表のようである。

高速 LC に最もよく用いられているのは UV 検出器であるが、試料中の成分が紫外、可視部に吸収のあるものに限られるわけである。紫外部に吸収のない試料に対しては RI を使用するが、UV に吸収のある場合には一般に UV の方が感度がよい。特に移動相にグラジエント溶出を行なうときは RI は不適当である。これらの点から、高速 LC ではさらに感度の高い、どの試料成分にも適する万能型検出器の開発が要望されている。この一つの可能性として Wire-FID (GC における水素炎イオン化検出器の高速 LC への適用したもの) がパイニカム社から市販されている。カラムからの溶出物をステンレス線の上に付着させ、つぎに

窒素気流中でこれを加熱して溶媒を除去後、空気とともに加熱炉で燃焼させて CO_2 と H_2O にする。この CO_2 は H_2 とともにニッケル触媒上で反応してメタンとし、このメタンを水素炎イオン化検出器すなわち FID で検出する。現在はカラムからの溶出液中の 1% 程度しかステンレス線に付着せず、大部分はそのまま溶出しているので、分離成分の回収は可能であるが、検出の方はまだ十分な感度がえられない。溶出物をさらに多くして検出感度向上させる工夫が発表されているが、まだ十分な成果は得ていないのが現状である。

3. 応用例

分子篩を使用する高速 LC の例は、分子量 2000 以下のオリゴマーやその他の有機成分を分離する充填物はわが国でも日立、東洋曹達、昭和電工などが開発

第3-1図 ポリスチレンオリゴマーの分離

第3-2図 標準ポリスチレンの分離例

しているが、それよりも高分子物の分子量分布測定用の高速 LC 用の充填物、すなわちゲルの開発はまだ不十分である。しかし東洋曹達では、従来 GPC として 200 分以上かかるものが、移動相に 30~100kg/cm² の圧力をかけることにより、測定時間を 1/10 に短縮し、20分程度に測定のできる有機充填物の開発に成功した。ポリスチレンオリゴマーの分離例¹⁾を第3-1 図に示す。これは4 フィートの長さのカラムでの測定で約11量体までのピークが現われている。また標準ポリスチレンの分離例を第3-2 図に示す。これはプレッシャケミカルズ社製標準ポリスチレン 110,000 ; 51,000 ; 10,000 ; 2,030 の混合物であり、測定時間は約 30 分である。

文 献

- 1) 東洋曹達研究報告 : 17, No 1, 40 (1973)
- 2) 同上 : 17, No 1, 43 (1973)

島津デュポン 高速液体クロマトグラフ

国内における高速液体クロマトグラフ需要の大半を満たし、広くその性能にご好評を得てまいりました、デュポン高速液体クロマトグラフを国産化しました。性能、仕様はすべてそのまま引きつがれています。大幅なコストダウンを計りましたので、一段とお求めやすくなりました。

- デュポン社が開発の高性能充填剤 "Zipax" "Permaphase" "Zorbax" の使用により、画期的なクロマト効率が得られます。
- 定流量性の最も高い定圧制御方式を用いています。
- 定圧制御方式の採用により、大口徑カラムによる大量高速分取が可能です。
- グラジェント溶出分析においても、再現性と操作性は抜群です。
- 豊富な付属装置により、幅広い用途に応じられます。

島津製作所

科学計測事業部

●カタログご請求・お問合せはもよりの営業所へ
 東京 296-2106 / 大阪 373-6550 / 福岡 271-0331 / 名古屋 563-8111 / 広島 48-4311 / 京都 211-6161 / 札幌 231-8811 / 仙台 21-6231 / 神戸 331-9661 / 大分 36-4226

604 京都市中京区西ノ京桑原町 1 (075)811-1111