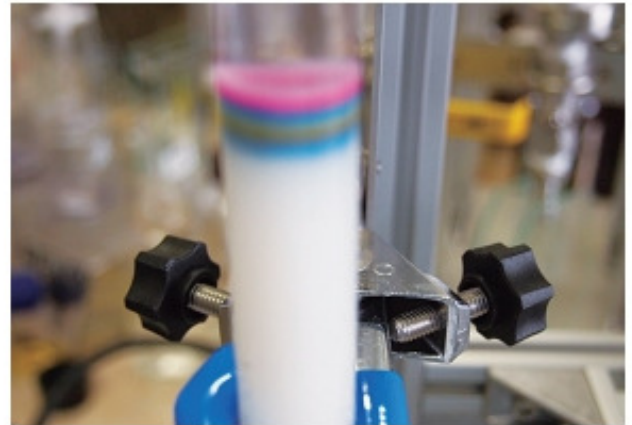




混合色素



試料添加



分離パターン その1



分離パターン その2



分取ボトル 分取した色素

まえがき

液体クロマトグラフは、大学の研究室、企業の研究所で研究目的に有効に活用されている。クロマトグラフィーは、1903年、ポーランドの M.S.Tswett によって開発された分離技法である。その当時としては画期的な着想によるものであったため理解されにくく、そして周辺機器も未発達であったため研究には活用されなかった。しかし、時代が近年の科学社会に至り、科学の研究成果が世の中を大きく変化させるようになってきた。その研究成果の判定技法としての分析法にクロマトグラフィーは大変有効な技法として発展してきた。自然科学分野、生命科学分野における研究にはなくてはならない技法、装置となってきた。

“技術を身につけ、装置を使いこなすためにはどのような勉強をすればいいのだろう”と考えたことが本書執筆のきっかけとなった。

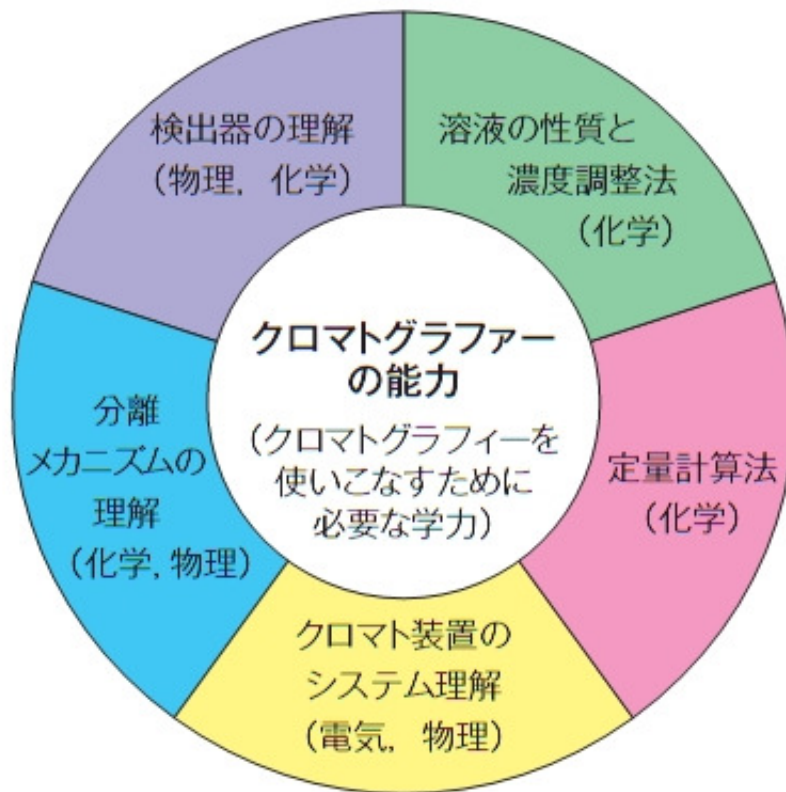
筆者が若い頃のある暑い日、企業の研究所の涼しい部屋で若い助手2人と働いていたところ、同僚がやって来て、“こんな涼しい部屋で優雅に働けていいなあ！この装置の資格を持っているんだらう”と言った。その時、“クロマトグラフィーの指導ができてるのは、どんな能力、知識が必要なのか”と思った。それから、時間をみつけては、日々、クロマトグラフィーの基礎的な勉強に勤しんだ。それが本書の内容の土台になっている。下書きを準備していた昨年正月に坂口守彦先生(京都大学名誉教授)より“分析はどの分野の研究にとっても基本となるもの、より研鑽を望む”という年賀状をいただき、その重要性を確信し、より筆が進むこととなった。

次頁に示した「クロマトグラファーの能力」を参考にして本書で学んでいただければ、きっと良いクロマトグラファーになられると考えている。クロマトグラファーとはクロマトグラフィーを駆使する技術者である。

M.S.Tswett の言葉——“すべての科学の進歩は技術の進歩による”

2013年2月

松下 至



グラフの面積比は必要性の比率を示す

1

液体クロマトグラフィーの原理図と分離原理

1.1 液体クロマトグラフィーのフロー図と装置

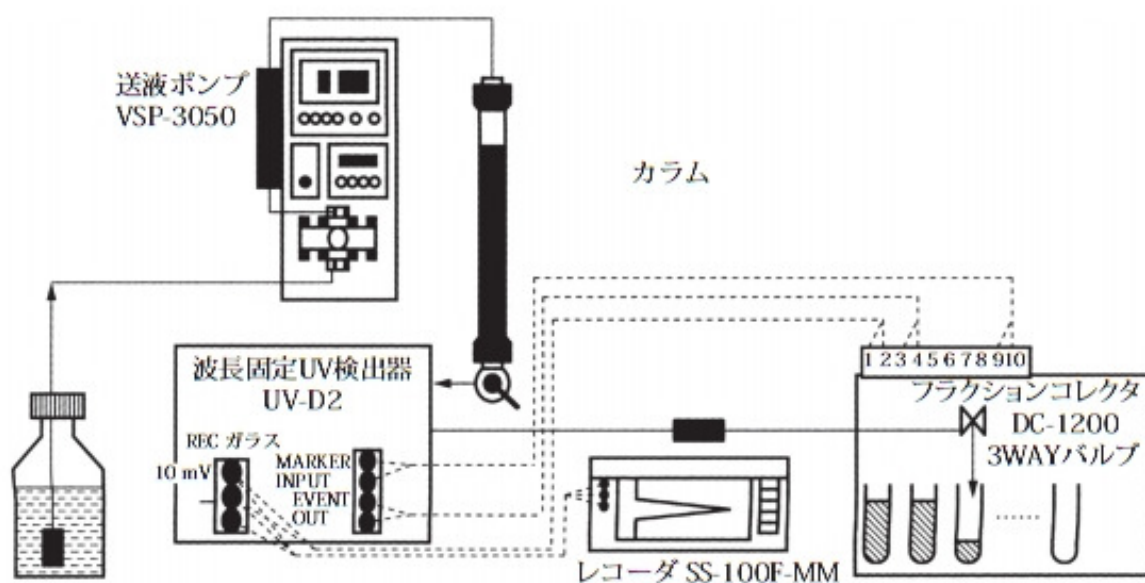


図-1.1 HPLCのフロー図(東京理化器械製)

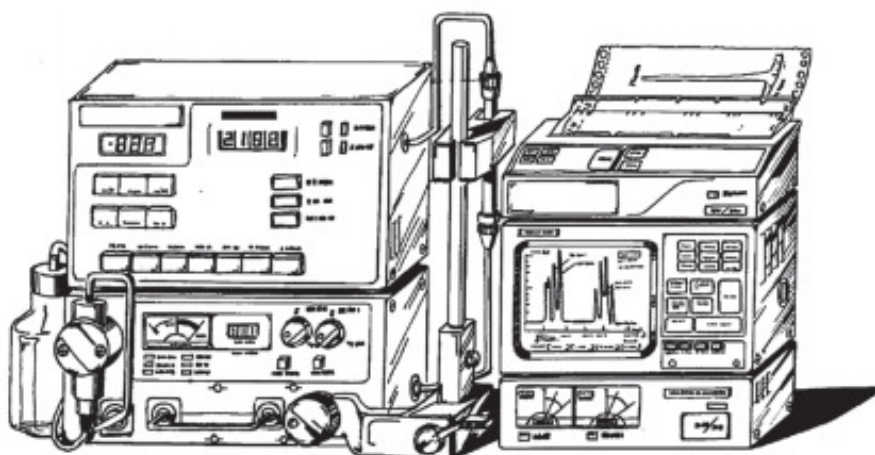


図-1.2 機器化されているクロマトグラフ

1.2 操作法

装置をあらかじめ調整した後、別に規定する条件で検出器、カラム、移動相を用い、移動相を一定流量で流してカラムを規定の温度で平衡にした後、別に規定する方法で調製した検液または標準液、もしくは比較液をマイクロシリンジまたは試料バルブを用いて試料導入部から注入する。分離された成分を検出器により検出し、記録装置を用いてクロマトグラムとして記録させる。試料の確認は、保持時間が一致すること、または標準試料を添加してピークの幅が広がらないことで行う。定量は、ピーク高さ、またはピーク面積を用いて行い、通常は内部標準法によるが、適当な内部標準物質の得られない場合は絶対検量線法による。

クロマトグラフ (chromatograph)、クロマトグラフィー (chromatography)、クロマトグラム (chromatogram) の意味

クロマトグラフは分析装置を、クロマトグラフィーはその装置を用いた手法を、クロマトグラムはその装置から得られた分析データ (チャートあるいはグラフ)、を意味する。

1.2.1 内部標準法 (Internal standard method)

別に規定する内部標準物質の一定量に対して標準被検成分を段階的に加えた標準液を数種類調製する。この一定量ずつを注入して得られたクロマトグラムから、標準被検成分のピーク高さまたはピーク面積と、内部標準物質のピーク高さまたはピーク面積との比を求める。この比を縦軸、標準被検成分量を横軸にした検量線を作成する。この検量線は、通常、原点を通る直線になる。

次に同量の内部標準物質を加えた検液を別に規定する方法で調製し、検量線を作成した時と同一条件でクロマトグラムを記録させ、被検成分のピーク高さまたはピーク面積と、内部標準物質のピーク高さまたはピーク面積との比を求め、検量線を用いて定量を行う。

内部標準法は、試料の注入量等を厳密に一定にしなくてもよいので、一般的に用いられる。

内部標準物質の選定は、①試料のピークと重ならず、頂点が近いものであること、②化学的に安定で、試料や溶媒と反応しないものであること、③純品の入手が容易

2

クロマトグラフィーの 分離メカニズム

2.1 クロマトグラフィーの種類

クロマトグラフィーは、種々の考え方により区分することができる。そして、現在も毎年、新しい分離メカニズムが開発されている。ここでは、現在汎用されているクロマトグラフィーを分離されるメカニズムに従って説明する。

a. **ゲルろ過クロマトグラフィー** 充填剤の網目の中へ出入りしながら流れていく小さな分子は、ゲル内へ入り込めない大きな分子よりも早く溶出してくる。分子の拡散によって溶出順位が決まる。

b. **イオン交換クロマトグラフィー** イオン性化合物とイオン性の残基を導入した充填剤との間に生じるイオン交換現象を利用する。

c. **イオンクロマトグラフィー** イオン交換樹脂を用いてイオン反発、吸引力を利用して行う。検出器、電導度計を用いるのが特徴である。低濃度のハロゲン、硫酸イオン等のイオン種は、交換容量のきわめて低いイオン交換体を用いて行う。イオン性反発を利用するイオン排除クロマトグラフィーもある。

d. **吸着クロマトグラフィー** シリカゲル等の表面との間では静電的な引力、あるいは水素結合による相互作用による保持力の大きさによって差が生じ、分離することができる。

e. **分配クロマトグラフィー** 溶質の一部を固定相へ、そして残りを移動相へ分配できる。分配の割合は、それぞれの相への溶質の溶解度により定まる。固定層に対して溶解度の高い物質ほど保持されやすく、溶質は遅くなる。溶質の固定相および移動相への溶解度は、それら3者の極性に左右される。固定相の極性が高いものを順相分配クロマトグラフィー、溶離液の極性が高いものを逆相分配クロマトグラフィーと言う。

f. **アフィニティクロマトグラフィー** 充填剤に親和性のある物質を結合させておくと、そのものとの親和性により分離可能となる(生化学的な性質の利用)。

3

液体クロマトグラフィーに 使用する溶離液作製法

液体クロマトグラフィーは、カラム中に適当な充填剤を詰めた固定相に、移動相である液体をポンプ等で加圧して通すことによりカラムに注入された固定相に対する保持力の差を利用して混合物のそれぞれの成分に分離、分析する方法である。液体である試料、あるいは溶液にできる試料に適用できる。確認試験、純度試験、定量法等に用いられ、現在、分取法としても活用されている。これらの目的を達成するためには、溶離液の作製を確実に行うことが重要である。溶離液の作製精度によってクロマトグラフィーのパラメータに差が生じてくることになる。

3.1 溶離液の作製法

液体クロマトグラフィーでの分離は、カラムとこの溶離液との分配差、吸着差等によって行われる。そのため、溶離液の作り方を学ぶことは大切である。大別すると、水溶系、緩衝液系、有機溶媒系になる。

水溶系の溶離液を用いるクロマトグラフィーはかなり多く、逆相分配系のクロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、イオンクロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィーに利用される。水を主としているので、水の種類、質について考慮する必要がある。表-3.1に純水の

表-3.1 純水の純度数値

項目	数値	理由
無機物	0.1~10 M Ω ·cm 以上の比抵抗の水	クロマトグラム上のベースラインの安定性の向上
有機物	TOC レベル 100 ppb 以下の水	クロマトグラム上のベースラインの安定性の向上
含有粒子の基準 (微生物も含む)	0.2 μ m 以上の粒子をできる限り含まない水をいい、純水に含まれる不純物の量は 0.05 μ g/L 以下	カラムの性能維持、カラムの寿命の長期化

4

分配クロマトグラフィーでの分離メカニズムを理解するための実験

現在、クロマトグラフィーで汎用されている分配クロマトグラフィーは、使用率では90%以上である。特に逆相分配系クロマトグラフィーが多く使用されている。そこでこの章では、その分離メカニズムについて実験を通して学び、習得することにする。そして、同時に分離メカニズムを理解するための基礎数学についても触れることにする。

4.1 実験課題1 フラッシュクロマトグラフィー(ODSカラム)による食物色素の分離(口絵参照)

4.1.1 クロマトグラフィー条件

試料：①食用青色2号，②黄色5号，③緑色1号，④赤色106号。

カラム：ガラス製(径1.2 cm，長さ20 cm)。

充填剤：ナカライテスク製のODS-OPEN。

溶離液：0.05 mol リン酸水素アンモニウム，55%メタノール水溶液。

カラム洗浄液：100%メタノール。

4.1.2 実験操作

- ① ガラス製カラム(径0.7 cm，長さ20 cm)に充填剤，ナカライテスク製ODS-OPENを0.05 mol リン酸水素アンモニウム，55%メタノール水溶液によりスラリー状にしてカラム上部より流し込む。約12 cmくらいになってから下部のコックを閉めて静置する。
- ② 上部の液を充填剤すれすれまで流してから，試料を1.0 mLしみ込ませる。
- ③ しみ込んだ後，下部のコックを開け，溶離液を加えて溶出させる。溶出液の色調リングを順次ボトルに分取する。

9

HPLCによる分子量測定法

9.1 カラムクロマトグラフィー

カラムクロマトグラフィーによる分子量測定法は、電気泳動法と組み合わせてより精度良く分子量を求める方法である。カラムにはその分子量測定範囲がメーカーによって記されてある。それを参考に実験者が求めたい分子量に合わせて選択することになる。その例を表-9.1に示す(アマシャムファルマシアジャパン, Gel Filtration, 1994)。

表-9.1 Sephadex の特性

ゲルタイプ	乾燥ビーズサイズ (μm)	分画範囲		膨潤定数 (mL/g)
		球状タンパク質 (Da)	デキストラン (Da)	
Sephadex G-10	40~120	~ 700	~ 700	2~3
" G-15	40~120	~ 1,500	~ 1,500	2.5~3.5
" G-25 Coarse	100~300	1,000~ 5,000	100~ 5,000	4~6
" G-25 Medium	50~150	1,000~ 5,000	100~ 5,000	4~6
" G-25 Fine	20~ 80	1,000~ 5,000	100~ 5,000	4~6
" G-25 Superfine	10~ 40	1,000~ 5,000	100~ 5,000	4~6
" G-50 Coarse	100~300	1,500~ 30,000	500~ 10,000	9~11
" G-50 Medium	50~150	1,500~ 30,000	500~ 10,000	9~11
" G-50 Fine	20~ 80	1,500~ 30,000	500~ 10,000	9~11
" G-50 Superfine	10~ 40	1,500~ 30,000	500~ 10,000	9~11
" G-75	40~120	3,000~ 80,000	1,000~ 50,000	12~15
" G-75 Superfine	10~ 40	3,000~ 70,000	1,000~ 50,000	12~15
" G-100	40~120	4,000~150,000	1,000~100,000	15~20
" G-100 Superfine	10~ 40	4,000~100,000	1,000~100,000	15~20
" G-150	40~120	5,000~300,000	1,000~150,000	20~30
" G-150 Superfine	10~ 40	5,000~150,000	1,000~150,000	18~22
" G-200	40~120	5,000~600,000	1,000~200,000	30~40
" G-200 Superfine	10~ 40	5,000~250,000	1,000~150,000	20~25

10

化学と数学と物理の知識

10.1 比例計算

化学の計算法の中で一番よく出てくるのが比例計算である。4:2=8:4である。簡単に言うと、内側と外側の数字を掛けた値は等しい、 $4 \times 4 = 8 \times 2$ ということである。

例題 10-1 ある溶液の吸光度 (E) は 0.25 で、カフェインが 5 mg 入っている。10 mg 入っている溶液の吸光度はいくらになるか、計算せよ。

解答 吸光度と濃度は比例しているので、

$$0.25 : 5 = x : 10$$

$$0.25 \times 10 = 5 \times x$$

$$5x = 2.5$$

$$x = 0.5$$

ポイントは！

クロマトグラフィーによる定量分析には比例計算を用いて解くことが多い。また、溶離液作製の計算は、ほとんど比例計算である。例えば、500 mL 中に 0.25 g の食塩が入っているとすると、同じ濃度の食塩水を 750 mL 作製するには、 $500 : 0.25 = 750 : x$ で、750 mL 中に 0.375 g 食塩を混合すればよいことになる。

10.2 log とルートの計算

$\log_{10} 100 = 2$, $\log_{10} 10,000 = 4$ である。これは 10 の何乗であるかが答えになる。 $100 = 10 \times 10 = 10^2$ で 2、 $10,000 = 10 \times 10 \times 10 \times 10 = 10^4$ で 4 になる。この log はグラフや統計処理の際に重宝する道具である。すなわち、膨大な数字処理するのに便利である。100 は 2 になり、10,000 は 4 で表すことができる。