

高速液体クロマトグラフィー (I)

飯 渕 千 春・五 十 嵐 脩*

高速液体クロマトグラフィーは、従来より使われている液体クロマトグラフィーと同様の原理に基づきながら、ガスクロマトグラフィーがもつ利点を取りいれて、短時間内に高精度分離分析を行うことを目標として開発されたものである。

従来の液体クロマトグラフィーは、多種類の試料に応用できるが分離に数時間から数日間を要するのがふつうであり、しかも試料としてある程度の量を必要とするので、分析手段としては適当でなく、むしろ、混合物からいろいろな物質の分離・単離・分画を目的として用いられることが多い。一方、ガスクロマトグラフィーは、分析を目的として開発されただけあって、短時間に微量の試料を高精度で分離および同定ができるので、分析用機器として威力を発揮してきたが、試料が気体もしくは気化する物質であることが必須条件であるために、試料として妥当である種類は限られており、しかもその多くは気化する誘導体を調製するなどの前処理を行ってはじめて試料になりうるという難点をもつ。これに対し、高速液体クロマトグラフィーは、このようなガスクロマトグラフィーの特徴のうちの分析手段としての長所を従来の液体クロマトグラフィーに導入して、分離時間の短縮と微量分析を可能にした液体クロマトグラフィーであり、次のような特徴をもつ。

- 1) 一検体の分離・分析に要する時間は数分から十数分程度で、短時間で分析が終了する。
- 2) 分離がよく、分析精度が高くしかも再現性に富む。
- 3) μg のオーダー以下の量の試料の分析が可能である。
- 4) カラムの活性化等の前処理、後始末が不要かまた

は簡便である。

- 5) ほとんどあらゆる化合物が前処理なしに試料の対象となりうる。

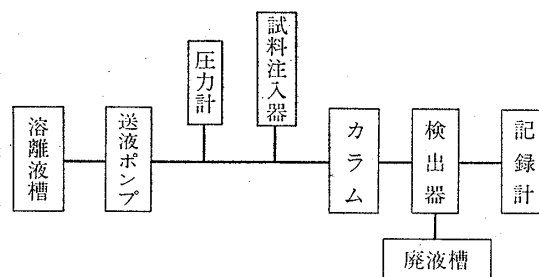
これらの利点は短時間内に反復分析が行えることを示しており、微量の検体を多数用いてデータを集計する今日的な研究の要請にかなうものである。

高速液体クロマトグラフィーは実用化されてからまだ10年そこそこであるが、既に諸分野に幅広く普及し、各種化合物の分離同定に非常に貢献している。

第1図に高速液体クロマトグラフ(装置)の略図を示すが、ガスクロマトグラフィーと類似の自動化された形式をとっているのが特徴である。

ところで、カラムとは、そこで試料が各成分に分離される場のことで、クロマト管とよばれる金属性の管中に固定相および移動相とよばれる2相が存在しており、これら全体をひっくるめてカラムとよんでいる。

固定相とは、文字どおりカラムに固定されている物質のことで、固体もしくは不活性固体に支持された液相をさしている。高速液体クロマトグラフィーの固定相は、充填剤と称して市販されているが、この場合は支持体を



第1図 装置模式図

* お茶の水女子大学生生活環境研究センター

も含めて充填剤とよんでいる。高速液体クロマトグラフィーには、従来の液体クロマトグラフィーに使用されている固定相は後章で述べる理由から適当でなく、用いられない。移動相とはその名のようにカラムを移動していき、試料を運搬、展開、溶出して分離を遂行させる溶媒のことで、溶離液ともよばれる。したがって液体クロマトグラフィーとは、移動相として液体を用いるクロマトグラフィーの総称ということができる。一方、移動相として気体を用いる場合がガスクロマトグラフィーであるが、このとき気体は液体と違って拡散速度が大きくまたカラムの移動抵抗が小さいので、平衡を保ったままカラムを移動していく速度を格段に大きくすることができるので、その結果分離に要する時間が数分から数十分に短縮される。平衡の概念については後述する。上記のことは、液体クロマトグラフィーにおいても平衡を保ちながら移動相の速度を大きくすることができれば、分離時間を短縮できることを示している。

溶離液は、第1図のようにポンプで加圧することで高速度で移動していくが、このとき用いられる送液ポンプは、流速の微量調節が可能で、性能の高いことが必須となる。実験時の溶媒には40~400kg/cm²の圧力がかかるので、溶媒の流路やカラムには、高圧にも耐えうる金属管が用いられている。

試料の注入はふつうマイクロシリンジを用いるが、高圧下で定量的に行うためにセプタム型、セプタムレス型、6方バルブ型などいろいろのものがある。

注入された試料は溶媒とともにカラムに運ばれ、そこで各成分に分離されたのちカラム外に溶出されると、直ちに検出器で溶出液の濃度が測定され、その結果は記録紙にクロマトグラムとして記録される。検出器には、分光光度計、蛍光光度計、示差屈折計、フレイムイオンによる分析など、試料にあわせて多種類のものが用いられる。このとき、実験系のなかに測定を妨害する物質の存在しないことを確認しておく必要がある。紫外吸収の場合は、波長可変のものと254nmに固定した場合の2種類があり、後者は前者の10倍の感度で検出できる。

記録計は検出器の測定にすばやく反応するものが用いられる。クロマトグラムは縦軸に濃度、横軸に溶出時間がめられるが、横軸は溶出体積に換算された値が示されることも多い。

本章では、高速液体クロマトグラフィーの特徴を解説することを目的として、

- I. 異種物質が液体クロマトグラフィーで分離される原理
- II. 高速液体クロマトグラフィーでは分離に要する時

間が、一般の液体クロマトグラフィーに比べて大幅に短縮される理由

- III. 分析が短時間で終了するにもかかわらず、高速液体クロマトグラフィーでは高度な分離がなされる理由

の順に記述する。

I. 分離の原理——なぜ分離されるか

高速液体クロマトグラフィーで異種物質が互いに分離される機構は高速液体クロマトグラフィーに特異的なものではなく、従来から用いられている液体クロマトグラフィーと全く同一の原理に基く。高速液体クロマトグラフィーが他の液体クロマトグラフィーと異なる点は、分離に要する時間が驚異的に短いこと、分離の精度が圧倒的によいこと、の2点に代表される。

従ってここでは始めに液体クロマトグラフィーの分離の原理をのべることにする。

試料とカラムの間には、相互作用とよばれるある力が働いている。その作用は、試料である化合物およびカラムの性質によって異なるものであり、同一カラムにおいても個々の化合物が有する官能基の種類や数、また非極性基の種類や数、大きさなどによって作用は異なってくる。このような作用の差が化合物がカラムを移動する速度(線速度ともいう)の差をもたらし、分離を行わせる直接の原因となる。この作用の生じる機構から液体クロマトグラフィーは下記の4つに分類されることが多い。

吸着クロマトグラフィー
(adsorption chromatography)

分配クロマトグラフィー
(partition chromatography)

イオン交換クロマトグラフィー
(ion exchange chromatography)

アフィニティークロマトグラフィー
(affinity chromatography)

しかしここでは作用の種類は重要ではないので、一括して「作用」として扱うことにする。

ところで作用と移動速度(線速度)との関連は(1)式であらわされる。

$$z = u \times R \quad (1)$$

z : 化合物のカラム内移動速度(線速度)
[cm/min]

u : 溶媒のカラム内移動速度(線速度)
[cm/min]

R : 化合物の全分子数のうち移動相に分布している分子数の割合 [—]

(1)式はある化合物の移動速度 z が、固定相および移動相に分布している全分子のうち移動相中に存在する分

高速液体クロマトグラフィー (I)

子の割合 R に比例した一定値をとることを示している。ここで分子の両相における分布の比率は、化合物の固定相および移動相に働く相互作用の比率を反映している。つまり (1) 式は、化合物の移動速度が化合物の作用すなわち性質によって決まった一定値をとっていることを示している。実際 (1) 式から以下のことがわかる。

移動相には分布する(作用する)が固定相には全く分布(作用)しない化合物の場合は、 $R=1$ であるから、化合物の移動速度は、移動相の速度と同一となり、化合物は溶媒とともにすどおりして溶出される。また、固定相にも分布(作用)する化合物の場合は、 $R<1$ となり、そのぶん速度は減少し、すどおりの成分に比べて遅れて溶出される。従って固定相に分子が多く分布する(固定相と強く作用する)化合物ほど遅れて溶出されることがわかる。固定相にのみ分布する(溶離液とは作用せず固定相にのみ作用する)極端な場合は、 $R=0$ であるから、どんなに溶媒を流しても化合物は決して溶出されることはない。以上のことから、異種物質の分離は、両相における分子の分布(作用の割合)が異なる化合物ほどよい分離が期待できる。クロマトグラフィーにおいて性質の異なる物質ほどよく分離されるのはこのことによる。

ここで化合物分子が固有の一定の比率で固定相と移動相に分布していることを、平衡が成立しているという。化合物がカラムを移動していく間、常に平衡が成立していることがクロマトグラフィーの必須条件である。なぜなら非平衡の状態では、分子の分布比は一定にならないので(R が一定だから)、(1) 式によると化合物の移動速度が変動する。このことは再現性がなくなり、分離パターンの予測もできなくなることを示している。

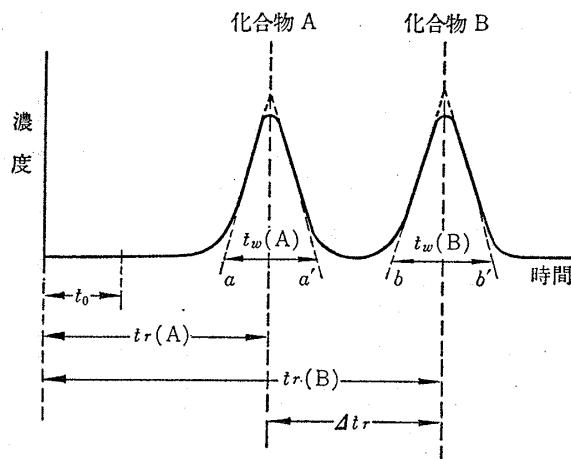
平衡が成立しているにもかかわらず分離が不十分な場合は、各化合物のカラムにおける分子の分布比を変えて、移動速度の差を増大させ、分離に導く。この分子の分布の比を変える操作を、平衡をずらすという。平衡をずらすには次の 3 つの方法がある。

- ① 固定相の材質を変える
- ② 移動相の組成、種類を変える
- ③ 温度を変える

このうち少なくとも 1 つを採用すればよい。実際には、まず最も簡便で効果の大きい、固定相は同じにして 2 の方法に従って、溶媒を変えて検討する場合が多い。

II. なぜ時間が短縮されるか

理想的にクロマトグラフィーが行われると、溶出された化合物のクロマトグラムは第 2 図のようにガウス分布を示し対称的なベル型となる。試料がカラムの先端に注入されて分離が開始された時点から化合物が分離後溶出



第 2 図 クロマトグラム

されてくるまでのことを試料がカラムに保持されていると称し、その間の時間を保持時間(Retention time)といい t_r であらわす。これはクロマトグラムでは、時間ゼロから分布曲線のピークを中心までに相当する。 t_r はクロマトグラフィーに要する時間のめやすであり、 t_r を大幅に短縮したのが高速液体クロマトグラフィーである。 t_r は (2) 式であらわされる。(2) 式の導入については II 章末に述べる。

$$t_r = \frac{L}{F}(1+D) \quad (2)$$

(2) 式を用いて、高速液体クロマトグラフィーにおいて t_r がいかに短縮されるかその理由を説明しよう。

L はカラムの長さ、 F は溶媒のカラム移動速度(線速度)で単位は cm/min であり、溶媒の流速(単位は ml/min)をカラム断面積で割って求められる。 D は質量分布比で固定相に存在する分子の全量と移動相に存在する分子の全量の比 $D=1-R$ で与えられ、分離の度合に関する因子である。 t_r を小さくするには L, D を小さくし F を大きくすればよいが、 L および D は実際の分離には技術的にある程度の値が必要であるから、高速液体クロマトグラフィーと従来の液体クロマトグラフィーとではさほど変わらない。高速液体クロマトグラフィーにおいて t_r が小さくなる原因はもっぱら F の増大、特にカラム断面積の減少である。たとえばカラム直径が 10 分の 1 のものを使うと移動速度(線速度)は 100 倍となり、 t_r を簡単に時間単位から分単位に縮少できる計算になる。実際高速液体クロマトグラフィーはカラム径を小さくして溶媒の移動速度の上昇を図っているが、カラム径を小さくすると両端の圧力差が大きくなる。そのために加圧ポンプで溶媒に高圧をかけ、高移動速度を確保しているのである。

現在高速液体クロマトグラフィーとよばれているのは、保持時間および移動速度(線速度)がガスクロマトグラフ

ィーのそれとは近い値を示し、かつシステム化された装置をもつものをさしていることが多い。溶媒の流速(流量速度)からいえば、高速と従来との間に厳密な境界がみられるわけではないことは注意しておく必要がある。

さて(2)式は以下のようにして導かれる。固定相に全く相互作用をしない化合物がカラムをすどおりするのに t_0 時間を要したとすると、このときの溶媒の流速が $f(\text{ml/min})$ であれば、このときまでに溶出された溶媒の全容積は $f \times t_0$ で求められる。この容積はカラムの移動相の体積 V_m に等しい。次に A という化合物が溶出されるまでに要した溶媒の容積は保持容積 V_r と称されるが、これは $f \times t_r$ で求められる。 A はすどおり成分に比べて固定相に分布した分だけ溶出に余分の量の溶媒を要するので、 V_r は(3)式であらわすことができる。

$$V_r = V_m + K V_s \quad (3)$$

ここで、 K は A の固定相と移動相における濃度比、 V_s は固定相の体積である。 K のかわりに、実測に便利な全分子の分布量比 D を用いると

$$D = K \frac{V_s}{V_m} \quad (4)$$

であるから、(3)式は

$$V_r = V_m(1 + D) \quad (5)$$

であらわされる。 $V_r = f \times t_r$, $V_m = f \times t_0$ であるから

$$t_r = t_0(1 + D) \quad (6)$$

t_0 はカラムの長さ L 、溶媒の移動速度を F とすると $t_0 = L/F$ であるから(6)式に代入して

$$t_r = \frac{L}{F}(1 + D)$$

このようにして(2)式が導かれる。

III. なぜ分離がよいのか

一般にクロマトグラフィーにおいては、溶媒の移動速度が小さいときはよい分離が期待でき、逆に移動速度を大きくすると分離が悪くなる。ところが高速液体クロマトグラフィーでは移動速度の増大にもかかわらず分離が非常によく、しかもクロマトグラムにはシャープなピークが記録される。その理由を以下にのべる。

まず溶媒の移動速度の上昇に伴って分離の鈍化をもたらす主要原因をあげてみよう。分離の度合は分離度 R_s の概念であらわすことができる。第2図のクロマトグラムに示されるように、保持時間を t_r 、ピークの溶出に要する時間を t_w とすると R_s は

$$R_s = \frac{t_r(B) - t_r(A)}{\frac{t_w(B) + t_w(A)}{2}} \quad (7)$$

で定義される。この式は $R_s > 1$ ならば異種物質は完全に

分離され、 $R_s < 1$ ならば分離が不充分であることをあらわしている。従って分離度 R_s を大きくするためには、(7)式から、カラムを長くするか、ピークの幅を減少するよう工夫すればよいことがわかる。しかしカラムには適度な長さが必要であり、また後に(8)式でのべる理由からもカラムをあまり長くすることは得策ではなく、もっぱら後者が採用される。そこでピークの広がりの原因を探ってみよう。ピークの幅を W とすると、 W は第2図の aa' , bb' に相当する。ところで W はカラムの長さ L の平方根に比例して増大することが知られている。 $W \propto \sqrt{L}$ から比例定数を $\sqrt{h}$ であらわすと

$$W = \sqrt{hL} \quad (8)$$

と書ける。(7)式は L 即ち $t_r(B) - t_r(A)$ の増大によって、(8)式は逆に L の減少によって R_s を小さくできることを示している。従ってカラムを長くして分離度の改善を図る方法は効果が小さい。また(8)式は h の値が小さいとき、ピーク幅 W も小さいことを示しており、 h は分離度に関する重要な因子であることがわかる。事実 h は理論段高さと呼ばれるもので、固定相(充填剤)の分離性能のめやすとなる。この h は(9)式であらわされる。

$$h = 2\lambda d_p + \frac{2\gamma D_M}{F} + \frac{q D d_s^2 F}{(1 + D)^2 D_s} + \frac{\omega d_p^2 F}{D_M} \quad (9)$$

F : 移動相の移動速度(線速度) [cm/min]

D : 質量分布比 [—]

λ : 流路の不規則性をあらわす因子 [—]

γ : 充填剤粒子による拡散阻止係数 [—]

D_M : 試料の移動相における拡散係数

[cm²/min]

D_s : 試料の固定相における拡散係数

[cm²/min]

q : 固定相の形状による因子 [—]

ω : カラムの形状や充填状態による係数

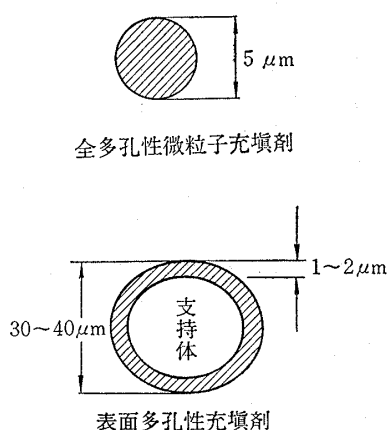
[—]

d_p : 充填剤の粒子径 [cm]

d_s : 固定相の厚さ [cm]

(9)式の第1項は乱流による軸方向拡散の項、第2項は分子拡散による項、第3は固定相中の、第4は移動相中の化合物の移動における分子分布のずれに基く項である。(9)式の第3、第4項は、移動相の速度 F を上げると h が増大することを示している。 D_M は小さく第2項の影響は少ないから溶媒の移動速度の上昇は全体として h の増大に導き、その結果ピーク幅は広がり、必然的に分離度の減少をもたらすことになる。実際液体クロマトグラフィーにおいて溶媒の速度を上げるとピーク幅は広がる。

高速液体クロマトグラフィー (I)

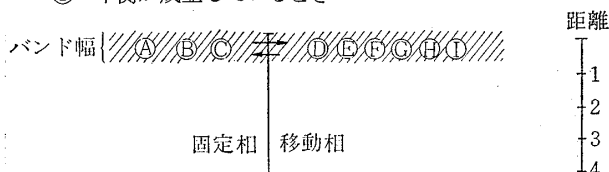


第3図 充填剤の模式図

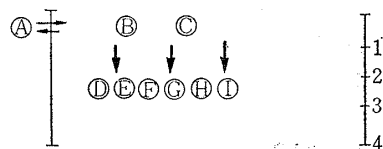
ましてや高速液体クロマトグラフィーの速度では分離はとうてい望めない。そこで F の増大にもかかわらず、 h を小さい値にするためには、粒子径が小さく固定相の層が薄い充填剤が適当であることがわかる。高速液体クロマトグラフィー用充填剤は、この要求を充たしたもので、第3図上は全多孔性微粒子充填剤の模式図であり、これは粒子径を極めて小さくすることによって分離能の改善を計ったものである。第3図下は固定相の層を極力薄くした表面多孔性充填剤である。現在多種市販されている充填剤は、この2型のどちらかに属する。以上の条件に加えて、後述するように球形に近くしかも大きさの揃った充填剤が均一につまっているカラムを用いるとより理想的な分離を行うことができる。このような充填剤の開発により、溶媒の高速化にもかかわらず高度な分離がえられる液体クロマトグラフィーが誕生した。

ところで視点を変えて、I章で述べた平衡の概念と分

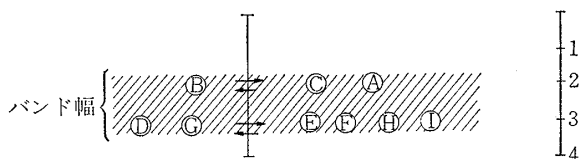
① 平衡が成立しているとき



② 移動相が分子を運ぶ



③ 再び平衡の成立した瞬間



第4図 バンドの広がり方

離との関連について述べてみよう。第4図の①はある化合物の分子が固定相と移動相に一定の割合で分布している平衡の成立した状態を示している。ここで分子が両相に分布するとき、ある速度で両相間を移動しておりかつ平衡に達するために微少ではあるが時間を要することを忘れてはならない。第4図の各分子には便宜上記号をつけた。

①のA~Cのように分子が固定相に分布しているときは、カラムの進行方向から見るとカラム内を進まずに停滞しており、一方移動相に存在する分子は溶媒とともにカラムの先端(図の下方)へ運ばれようとする。一方分子にはつねに、固定相との間に作用が働き平衡を保とうとするから、固定相中の分子は速やかに移動相に移り、先に進んだ移動相中の分子の一部は固定相に移動して、再び平衡に達する。これをくり返して物質はカラムを進んでいく。溶媒の速度が大きくなり、分子の両相間移動速度との差が大きくなると、移動相中の分子①~①はカラムのより先方に運ばれ、A~Cとの間に進行方向における距離の差を生じ、カラムを進むにつれその差は拡大されてバンドは広がり、ピーク幅の広がりとなってあらわれる。化合物の両相間移動速度よりも溶媒の速度の方が大きい場合は、平衡が成立しないうちに分子が運ばれる非平衡移動になるため再現性のあるクロマトグラフィーは望めない。このように溶媒の流速を高速にすると平衡に達しにくくなるので、高速液体クロマトグラフィーにおいては平衡到達時間を短くする工夫がなされる。また高速化によって分子の運搬にむらを生じその結果バンド幅はさらに広がる。

以上のべたバンドの広がり(9)式の第3, 第4項に含まれており、前述のように充填剤を改善することで解消される。

ところで、このようなカラムにおいて溶媒の移動速度(線速度)を上げるには、カラムの入口と出口で大きな圧力差がなければならない。このときの圧力低下 ΔP は(10)式であらわされる。

$$\Delta P = F\eta Lf/K^\circ \quad (10)$$

η : 溶媒の粘度 [g/cm $\cdot$ min]

f : カラムの空隙率 [—]

K° : カラムの透過性 [cm 2]

(10)式を(2)式に代入すると t_r は

$$t_r = \frac{\eta L^2 f (1+D)}{K^\circ \Delta P} \quad (11)$$

と書きあらわすことができる。 K° を大きくするには d_p を大きくすればよいが、同時に f も大きくなるので結局 ΔP を大きくして t_r を小さく保っていることがわかる。

また f は d_p の小さいしかも大きさの揃った充填剤を密につめることで小さくすることができる。さらに充填剤は加圧の影響を受けないものでなければならないことを付記しておく。

最後に、さきに扱った理論段高さ h について説明を加えておく。 h は物質がそのカラムに対してもつ固有の値をとる。物質のカラムにおける移動速度を z とおくと、 $t_r = L/z$, $t_w = W/z$ であるからこれを(8)式に代入して

$$\frac{L}{h} = \left(\frac{t_r}{t_w} \right)^2 \quad (12)$$

を導くことができる。ここで $L/h = n$ とおくと、 h の値が小さいほど分離がよくなるから、 n は逆に値が大きいほど分離がよいことを示す。 h がカラム長さと同じ次元をもち、 n がその逆数であるところから、カラムを多段反応塔の一種にみたてて、 h を理論段高さ、 n を理論段数と称し分離のめやすとする。クロマトグラムのピーク幅 t_w を正確に測定することは不可能であるから、標準偏差 σ を求めて $t_w = 4\sigma$ で近似しこのときの理論段数を N として

$$N = 16 \times \left(\frac{t_r}{t_w} \right)^2 = \left(\frac{t_r}{\sigma} \right)^2 \quad (13)$$

であらわすことも多い。

理論段数 n は、同一カラムでも物質によって異なる値をもつが、第2図におけるピーク幅が同じであるとき A と B の理論段数幾何平均を n' とすると(7)式と(13)式より

$$R_s = \frac{1}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \sqrt{n'} \quad (14)$$

がえられる。但し α は A と B の保持比で、(15)式であらわされる。

$$\alpha = \frac{K_D(B)}{K_D(A)} = \frac{t_r(B) - t_0}{t_r(A) - t_0} \quad (15)$$

α は既知であるから、分離度 R_s の望ましい値に必要な理論段数 n' は計算でえられ、望ましい R_s に必要なカラム長さを推定することができる。

実際の応用については続稿において実例を中心に説明する。

参考図書

1. 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), 東京 (1979)
2. J. N. Done & J. H. Knox; Applications of High-speed Liquid Chromatography. John Wiley Sons. London (1974)

新 刊 紹 介

慶田雅洋・伊藤誉志男・豊田正武共著 「食品中添加物の分析法」

(A5判 298ページ 定価2,800円 光生館)

食品添加物が使用されているかどうか、また許容量以下であるかどうかを知るといことは、食品添加物の安全性を論ずる場合に最も必要なことである。現在このような分析を行う場合、米国のA.O.A.Cの公定法を参考にしたり、日本薬学会協定の衛生試験法、厚生省から発表されている試験法等を参考として最も適していると思われる方法を使いながら行うことが多い。

しかし上記の書籍は、専門のところでは容易に見ることができても、だれもが簡単に見ることはできない。また幾つかの方法がある場合、どの方法が良いかということを判断することは容易ではない。

本書の著者は国立衛生試験所大阪支所食品部の方々で西日本の海空港を通じて輸入される食品の分析に当

っておられる方々で、毎日食品添加物の分析をしておられ、迅速かつ正確に行うにはどのような方法が良いかの研究に当たっており、すでに多くの報告を発表しておられる。それらの成果をふまえて今回本書を出版されたものである。

含まれている添加物は、保存料、殺菌料、酸化防止剤、漂白剤、発色剤、甘味料、着色料、防虫剤、りん酸、その他となっており、不許可の添加物の検出にもふれておられる。

試験法としては系統的分析法に重点がおかれており、ガスクロマトグラムを使用する例が多いことも特長の一つであろう。

(元山)