



目 次

分析機器解説シリーズ(49) 1
リサイクル型ゲル浸透高速液体クロマトグラフィー

お知らせ 10

リサイクル型ゲル浸透高速液体クロマトグラフィー

九州大学機能物質科学研究所 澤田 剛

クロマトグラフィーは、物質の分離・同定・精製に、最も盛んに用いられている方法である。1906年にTsettが植物色素の混合物からクロロフィルの分離に成功したのが、クロマトグラフィー(Chromatographie)の最初といわれている^{1,2)}。ちなみにChromaはギリシャ語の色という言葉である。

クロマトグラフィーは、今日では実験室から工業レベルまで、汎く利用されている。特に、1960年代の後半から高速液体クロマトグラフィーが実用化されて、より短い時間で効率の良い分離が可能となり、化合物の分析や精製に欠かせないものとなっている。しかし、大量に化合物を分取するためには、高価な大型の分取用カラムが必要であり、また大量の溶媒を必要とするという欠点を有している。

1990年に我々の研究室に、リサイクル型ゲル浸透高速液体クロマトグラフィーが導入された。これは、溶媒の消費量も少なく、カラムの分離効率が高く、手軽に扱えるという利点を有しており様々な化合物の分離に有効に活用されている。

そこで今回は、このリサイクル型ゲル浸透クロマトグラフィーについて、その構成と原理から、実際の使用法、注意事項などについて述べる。

1. 構成と仕様

装置の構成を図1に示す。本体には送液ポンプ、インジェクター、紫外検出器、サイフォンユニット、各種切り替えバルブを内蔵しており、溶媒瓶、分取カラム2本、クロマトデータ処理装置、廃溶媒瓶を接続している。

装置の仕様は表1に示したとおりである。溶媒は脱気した液クロ用クロロホルムを用い、分離可能な試料量は、およそ0.5mg - 1gである。

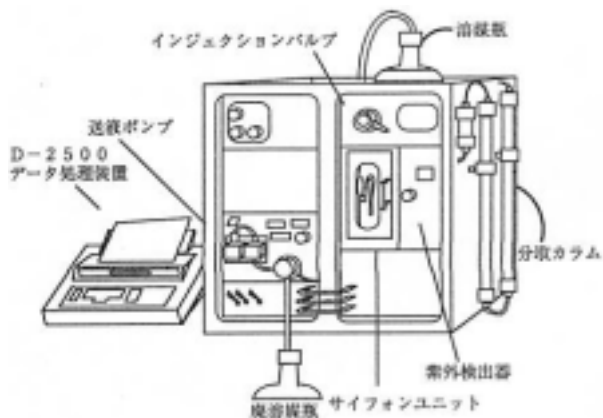


図1 リサイクルゲル浸透クロマトグラフィー装置構成図

表1 リサイクル分取 HPLC LC - 908 型の仕様

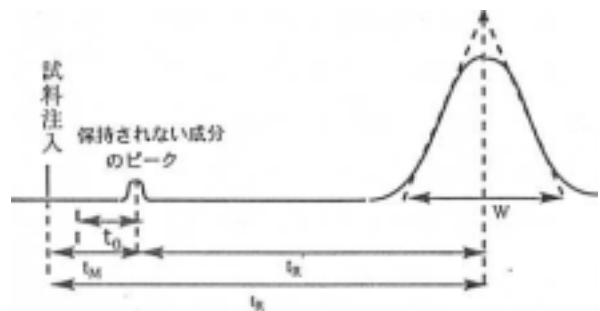
装置名：	日本分析工業 LC - 908				
送液ポンプ：	908 型				
	送液方法 最大吐出圧力 吐出流量範囲 低圧送液	2 連プランジャー往復ピストン方式 400Kg / cm ² 0.001 - 9.99ml / min 20 - 400Kg / cm ² 連続可変			
紫外検出器：	245nm (固定)				
試料導入部：	試料注入バルブ 試料ループ	レオダイン 7、125 型 3ml			
カラム：	種類	排除限界分子量	理論段数	使用流速(ml/min)	
		(ポリスチレン)	(TP / 本)	常用	最大
JAIGEL - 1H	スチレン系ポリマー	1000	> 13,000	3.5	4
JAIGEL - 2H	スチレン系ポリマー	1000	> 13,000	3.5	4
データ処理：	日立製作所 D - 2500				

2. クロマトグラフィーの原理^{3,4)}

まず、一般的なクロマトグラフィーの原理と概念について述べる。

クロマトグラフィーとは、試料中の各成分が固定相と移動相へとそれぞれ相互作用して分配され、その相互作用の差に応じて保持が異なるために成分が分離し、定性、定量的に測定される分析法である。

クロマトグラフィーの模式図を図2に示す。



t₀: 全保持時間, t_R: 非保持時間, t_R: 空保持時間,
t_R': 全保持時間, W: ピーク幅

図2 クロマトグラフィーの模式図

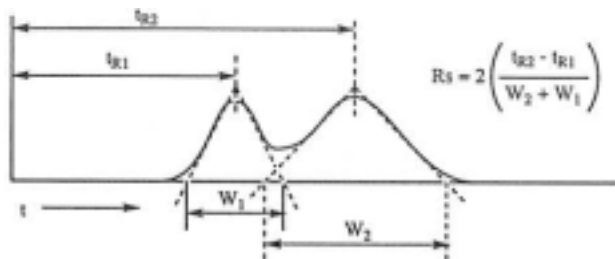


図3 二つのピークの間隔度

試料がカラムに添加されてからでるまでの時間を保持時間といひ、t_Rで表す。しかし、液クロ装置には、検出器や流路などカラム以外の容積も存在しており、また、カラム中で何の相互作用もなく素通りしても、幾分かの時間がかかる。そこでこの

素通りに要する時間を非保持時間 t_m という。また、非保持体積から試料導入部と検出器の容積を引いたものを空保持体積といい、 V_0 で表し、このときにかかる時間を空保持時間もという。

ここで、二つのピークの総体的な分離の程度を表す尺度として分離度 R_s がある (図3)

この値は溶出するピークの幅 (w) とピーク間の距離の組み合わせで表される。分離度 $R_s = 1.5$ であれば分離は十分であり重なりは 1% 以下である。ただし一方の成分がごく微量の場合、 R_s が 1 以上でもふたつのピークの区別は困難になる。

3. リサイクル型ゲル浸透クロマトグラフィーの原理と使用方法

クロマトグラフィーにおける固定相と移動相の相互作用として以下のようなものが挙げられる。

- (1) 吸着作用
- (2) 分配作用
- (3) 疎水性相互作用
- (4) イオン交換作用
- (5) イオン対形成作用
- (6) 浸透・排除作用

リサイクル分取ゲル浸透クロマトグラフィーは、(6)浸透・排除作用によって分子を分離するクロマトグラフィーである。図4にこの概念を示す。

固定相としては多孔性の高分子ゲルを用いる。それぞれの成分は大小に応じて固定相に浸透したり排除されたりする。すなわち、大きい分子は高分子ゲルの細孔に入り込まずに移動相中を早く移動してゆき、小さい分子は細孔の奥まで入り込み、ゆっくりと移動することになる。その結果、浸透あるいは排除される程度の差によって分子はふるい分けられて分離され、嵩が大きい分子から順

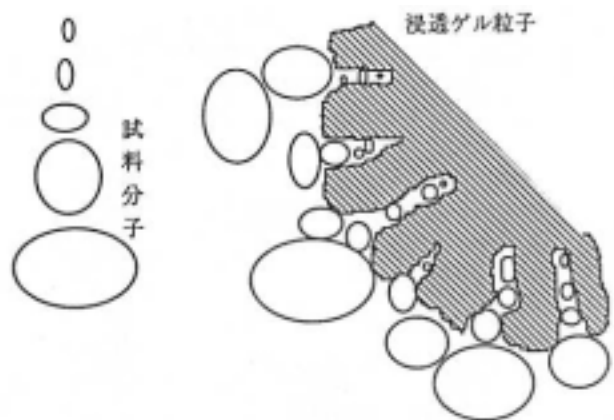


図4 浸透作用

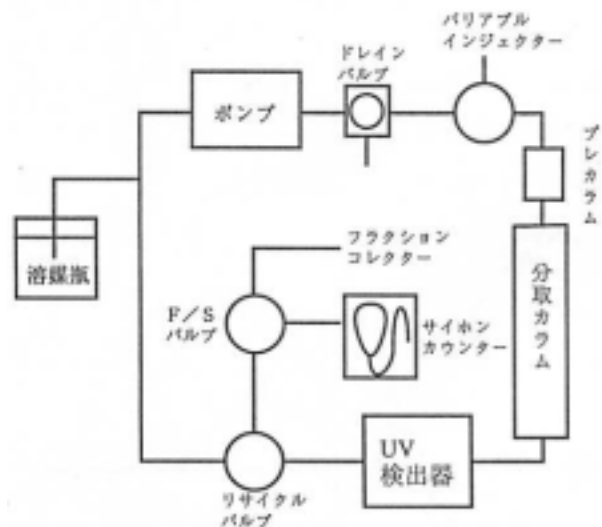


図5 リサイクルゲル浸透クロマトグラフィー LC-908の概要

番に流出することになる。

ゲル浸透クロマトグラフィーでは成分と固定相の間に吸着が起こらないので、固定相の活性化なしに何度も利用することが可能である。このためリサイクル法という発想が生まれた。図5に我々の研究室で使用している装置の概要を示す。

LC - 908 型はリサイクルバルブを備え、分離の困難な成分にも対応できる HPLC 装置である。通常の分取カラムではカラムコスト、カラムサイズ、カラム圧、溶媒消費量の点から無制限にカラムの数を増やすことはできない。しかし LC - 908 型では多少でも分離の傾向が見られるならばその部分をリサイクルにかければ分離できる。

リサイクル法の利点として以下の3点が挙げられる。

- 1) 所有のカラムを数倍にしたのと同じ効果が得られる。
- 2) 長時間のリサイクルの間溶媒を消費しない
- 3) 分離度に応じてリサイクル回数を増減するので、効率よくカラムを利用できる。

ここで典型的なリサイクルの実施例を示す(図6)。

基本的な操作法は、通常の HPLC と同じである。溶媒として HPLC 用のクロロホルムを用い、使用前に脱気する。サンプルはクロロホルムに溶かしメンブランフィルターで濃過する。

リサイクル法の操作は以下の点について留意しておこなう。

- 1) より効果的にリサイクルを進めるためには、一度試料の全体のパターンをとり、リサイクルにかけられる範囲をあらかじめ決めておくこと。
- 2) 分離の悪い範囲にかかったところでリサイクルバルブをリサイクルにする。

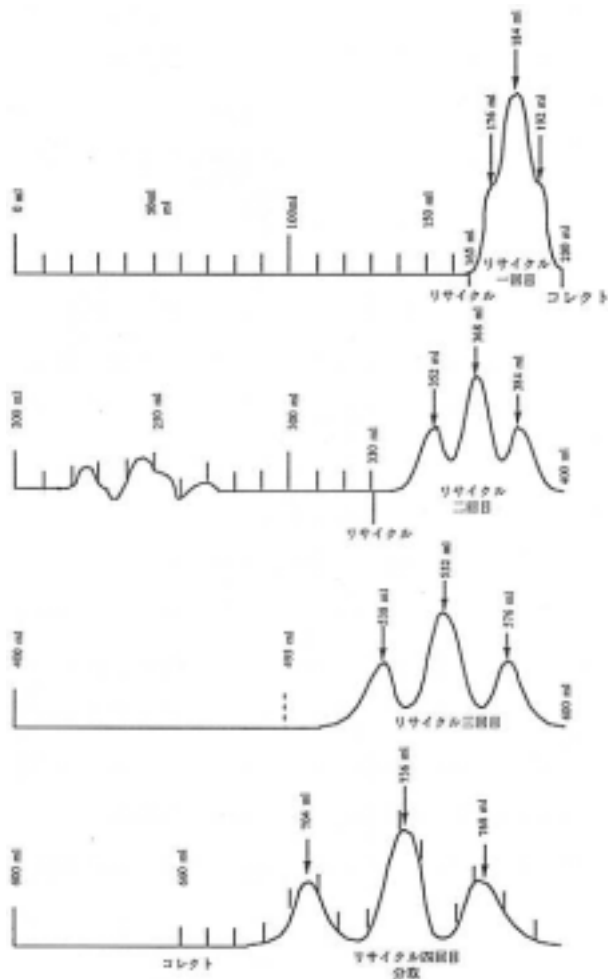


図6 典型的なリサイクルの例

目的範囲が終わったらコレクトに戻す。

3) リサイクルにかけた領域が再度クロマトグラフに出てくる。リサイクルを続行するならば再度リサイクルバルブをリサイクルにする。

4) サンプルループ中に一度清浄な溶媒を流してループ中の気泡を取り除く。

また、二つのピークをリサイクルして分離する場合、保持時間とピークの幅について以下の式が成立する。

$$(n \text{ 回目の } t_{R2} - t_{R1}) = n \times (\text{一回目の } t_{R2} - t_{R1})$$

$$n \text{ 回目のピーク幅 } W = n^{1/2} \times \text{一回目の } W$$

すなわち、二つの成分の保持時間の差はリサイクルの回数 n に比例し、それぞれの成分のピーク幅はリサイクル回数 n の平方根に比例する。この法則と、一般的なクロマトグラフィーの分離度の式とを組み合わせることにより、最も効率の良いリサイクルの回数とそのときの時間、分取する幅を求めることが可能である。

またリサイクル法を用いる際に以下のような失敗をしやすいので注意する。

1) リサイクル範囲を広くとりすぎること。

広すぎる範囲をリサイクルするとピーク群の幅が極めて大きくなり、リサイクルしてきた流速の早い成分が遅い成分に追いついてピークが重なる。

2) 低分子量成分が存在しているのに高分子量成分をリサイクルすること。

低分子量成分の保持時間が、リサイクルした高分子主成分の保持時間の整数倍ならば、リサイクルするとピークが重なり成分の分離ができない。

3) 過剰量の試料を注入すること

検出限界を越えた過剰量の成分はリサイクル法でも分離できない。

ちなみに、この LC - 930 の場合、一回のクロマトグラフィーで単離可能な量は、分子量 1000 以下の低分子量試料で 500mg - 1g、それ以上の高分子量試料で 100 - 200mg である。このために、一回のクロマトグラフィーで核磁気共鳴や各種の測定に必要な試料を単離可能である。

リサイクルゲル浸透クロマトグラフィーは、分子量 100 以下の分子ならば炭素一個分の違いでさえも分離可能であり、また構造異性体の分離にも利用できる。これはごくわずかな浸透力の差であっても、リサイクルを行うことにより大きな保持時間の差となるからである。

4 . おわりに

このようにリサイクルゲル浸透クロマトグラフィーは、様々な有機化合物の分離に有用であり、その取り扱いも容易である。リサイクル技術とゲル浸透クロマトグラフィーと組み合わせることで、吸着タイプの高速液体クロマトグラフィーに匹敵する分離能と、それを上回る高効率を示すようになった。この技術は今後様々な有機化学の分野で用いられることが期待される。

5 . 参考文献

- 1) M.S.Tswett , Jr.V.Obshch , Estestvoispyt, Otd. Biol. , 14 , 20 (1903).
- 2) M.S.Tswett , Ber. Deut. Bot. Ges. , 24 , 316 (1906).
- 3) 波多野博行、花井俊彦、「新版実験クロマトグラフィー」, 東京化学同人、(1988).
- 4) 庄野利之、脇田久伸、「入門機器分析化学」, 三共出版、(1988).

お 知 ら せ

平成7年度の補正予算で表面分析装置が認められました。来年3月末中央分析センター（筑紫地区）に設置予定です。機種構成は次のとおりです。

線光電子分光システム

走査型オージェ電子分光システム（SIMS 含）

試料予備評価装置

・トンネル顕微鏡

・FT - IR（赤外分光）

今回導入予定のシステムは、現有の複合機タイプではありません。 と は別々の装置となっており、孤立に利用出来ます。