

液体クロマトグラフィー (2)

渋川 雅美

前号では、最近の研究によって明らかにされたアルキル結合型シリカ充填剤表面に形成される固定相の構造に基づいて逆相液体クロマトグラフィー (reversed-phase liquid chromatography, RPLC) における分離機構を解説した。本号では、引き続き充填剤表面の修飾基の構造や移動相組成によって RPLC における溶質の保持挙動がどのように変化するかについて述べる。また、ピークの広がりや歪みがどのようにして生じるのかについて議論する。さらに、液体クロマトグラフィーにおいて分離選択性の向上を目的に利用される化学反応 (二次的平衡) の導入についても解説する。

であるが、両者の溶質保持選択性は全く異なる。このため、これら二つの固定相の相対的な大きさによって、分離選択性すなわち化合物の溶出順が異なることになる。

純水を移動相としたときの水/アルキル結合層界面への種々の化合物の分配係数 (D_{IW}) を C_8 シリカと C_{18} シリカについて測定し、両者を比較した結果を図 1 に示す¹⁾。二つの充填剤は同じシリカ基材を用い、同じ方法でエンドキャップされたものである。両者の D_{IW} はほぼ等しいことから、少なくともオクチル基以上の鎖長を持つアルキル基で修飾されたシリカ充填剤では、界面

4・3 化学結合型シリカカラムを用いた RPLC における溶質保持に及ぼす修飾基の構造および移動相組成の効果

4・3・1 表面修飾アルキル基の鎖長

前号で述べたように、アルキル結合型シリカカラムを用いた RPLC において主たる固定相として機能するのは、移動相/アルキル結合層界面とアルキル結合層内部

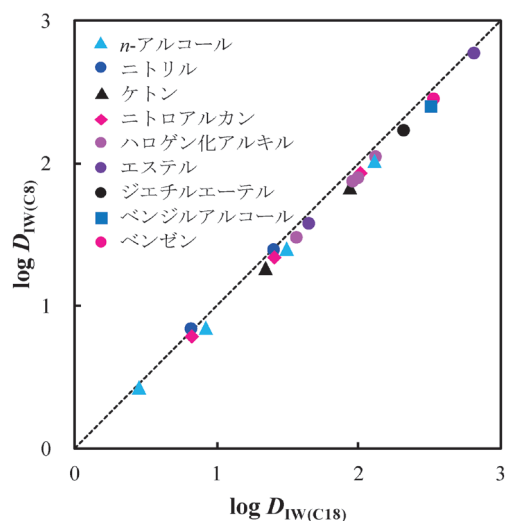


図 1 C_8 シリカカラム (L-column2 C8) および C_{18} シリカカラム (L-column2 ODS) における移動相 (水) から水/アルキル結合層界面への分配係数の比較¹⁾

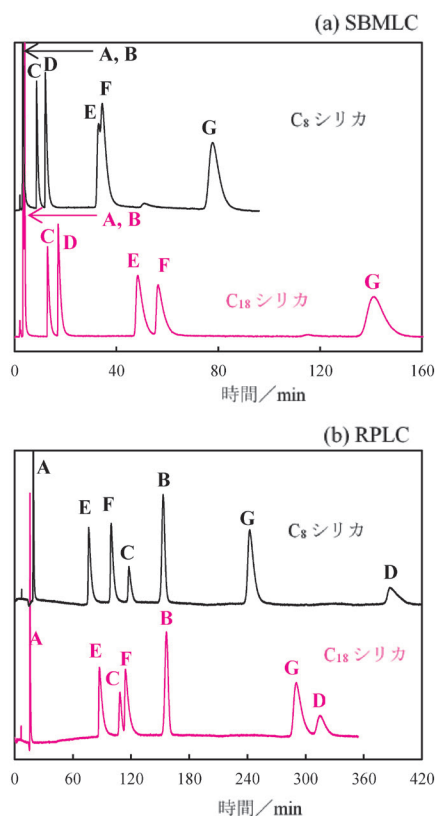


図 2 C_8 (L-column2 C8) および C_{18} シリカカラム (L-column2 ODS) を用いた SBMLC および RPLC における有機化合物のクロマトグラム¹⁾

カラムサイズ: 4.6 mm×150 mm. 移動相: 純水. 温度: 25 °C. 流量: 0.6 mL min⁻¹. 検出器: 示差屈折率検出器. 試料化合物: A, プロピオニトリル; B, ベンジルアルコール; C, ジエチルエーテル; D, 酢酸イソプロピル; E, プロモエタン; F, クロロホルム; G, ベンゼン.

の溶質保持選択性には差がないと言える。

C₈ シリカカラムと C₁₈ シリカカラムを用いた RPLC における有機化合物のクロマトグラムを、表面気泡変調液体クロマトグラフィー (surface-bubble-modulated liquid chromatography, SBMLC) モードにしたときのクロマトグラムと比較して図 2 に示す¹⁾。RPLC では充填剤細孔内が水で満たされているのに対して、SBMLC では充填剤の細孔内部は気体 (水蒸気) が占めているので (前号を参照)¹⁾²⁾、水とアルキル結合層との界面の面積は無視できるほど小さい。したがって、RPLC では移動相/アルキル結合層界面とアルキル結合層内部の両方が固定相として機能するのに対して、SBMLC ではアルキル結合層のみが固定相として働くことになる。ここで用いた有機化合物はいずれも揮発性があるので、気相空間を通して水とアルキル結合層間を移動するが、これらの化合物の気相への分配は非常に小さく、無視できる。図 2 からわかるように、SBMLC では C₈ シリカカラムと C₁₈ シリカカラムとで試料化合物の溶出順に変化がない。これは、どちらも基本的にアルキル結合層内部への分配だけで溶質の保持が決まるためである。保持体積が C₈ シリカカラムよりも C₁₈ シリカカラムのほうが大きいのは、C₁₈ シリカの方がアルキル結合層の体積が大きいことによる。これらの充填剤の炭素含有量 (シリカの単位重量当たりの炭素重量) を比較すると、C₈ シリカが 10 % であるのに対して C₁₈ シリカは 17 % である。

一方、これに対して RPLC では両カラムにおける試料化合物の溶出順が異なっている。ジエチルエーテル、ベンジルアルコール、酢酸イソプロピルなどの保持時間は SBMLC と比べて著しく大きくなっているが、これはこれらの化合物の界面への分配係数 (D_{IW}) が大きいことによる。これら親水基を持つ化合物の中には、C₈ シリカカラムのほうが C₁₈ シリカカラムよりも保持時間が大きくなり、二つのカラムで他の化合物との溶出順が異なるものがある。これは C₈ シリカのほうがアルキル結合層の厚さが小さく、またそのために水と接する表面積 (界面の面積) が大きいことによる。実際に測定されたカラム当たりの表面積は、C₁₈ シリカカラムが 234 m² であるのに対して、C₈ シリカカラムは 292 m² であった¹⁾。以上の結果から、アルキル基の修飾密度に大きな差がなければ、疎水性化合物の保持体積はアルキル鎖長が大きくなるにしたがって大きくなるが、親水基を持つ化合物は逆に小さくなるのがわかる。

4・3・2 表面修飾基の化学構造

RPLC に用いられる化学結合型シリカの疎水性修飾基としては、アルキル基のほかにフェニルアルキル基やフッ化炭素基などがある。修飾基が変わると、結合層自体はもちろん移動相との界面における溶質保持選択性も変化する。フェニルヘキシルシリカカラムを用いた

RPLC では、フェニル基が移動相と接触し、ヘキシル基が結合層内部を占めるので、結合層への溶質の分配係数は C₁₈ シリカカラムと同程度である。これに対して、水/フェニル基界面の界面張力は水/アルキル基界面と比べて小さいため、界面への分配係数は小さくなるという違いが生じる³⁾。

4・3・3 移動相中の有機溶媒濃度

すでに述べたように、RPLC では水とメタノールまたはアセトニトリルなどの極性有機溶媒との混合溶媒を移動相として用いて溶質の保持体積を調節することが多い。一般に有機溶媒濃度が大きいほど溶質の保持体積は小さくなるが、その変化の程度は溶質によって異なり、有機溶媒濃度によって溶出順が変わることもある。これは移動相/アルキル結合層界面とアルキル結合層内部への溶質分子の分配の有機溶媒濃度依存性が異なるためである。

SBMLC および RPLC における有機化合物のクロマトグラムが移動相中のアセトニトリル濃度によってどのように変化するかを図 3 に示す⁴⁾。図 3 (a) からわか

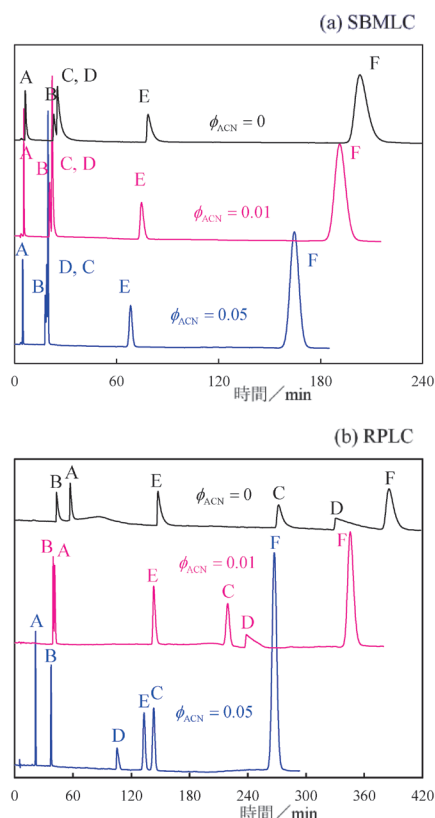


図 3 C₁₈ シリカカラム (Capcell Pak C18 UG120) を用いた SBMLC および RPLC における有機化合物のクロマトグラムのアセトニトリル濃度による変化⁴⁾

カラムサイズ: 4.6 mm×250 mm. 移動相: 0, 1, 5 % (v/v) アセトニトリル/水混合溶媒. 温度: 25 °C. 流量: 0.5 mL min⁻¹. 検出器: 紫外吸光検出器 (190 nm). 試料化合物: A, 2-ブタノン; B, ジクロロメタン; C, 1-ニトロブタン; D, 酢酸イソプロピル; E, クロロホルム; F, ベンゼン.

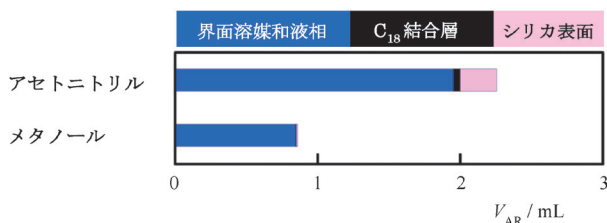


図4 ODS カラム (L-column2 ODS, 4.6 mm×150 mm) におけるアセトニトリルとメタノールの補正保持体積への各固定相 (界面溶媒和液相, C₁₈ 結合層, シリカ基材表面) の寄与¹⁾

移動相: 水, 温度: 25 °C.

るように, 移動相/アルキル結合層界面の寄与が無視でき, アルキル結合層内部への分配だけで溶質の保持が起こる SBMLC では, 低濃度のアセトニトリルの添加による保持時間の変化は小さく, 溶出順もほぼ同じである. これに対して RPLC においては, 2-ブタノン, 1-ニトロブタン, 酢酸イソプロピルなどの親水基を持つ化合物は, 少量のアセトニトリルの添加で保持時間が著しく小さくなり, ジクロロメタンやクロロホルムと溶出順が逆転する (図3 (b)). これは, RPLC では親水基を持つ化合物の保持への移動相/アルキル結合層界面の寄与が大きく (前号図11), かつその分配係数のアセトニトリル濃度依存性が大きいことによる.

RPLC の三つの固定相 (水/アルキル結合層界面 (界面溶媒和液相), アルキル結合層内部, シリカ表面) におけるアセトニトリルの補正保持体積, $V_{AR} (=V_R - V_m)$, をメタノールと比較して図4に示す (V_R と V_m は, それぞれ溶質の保持体積と移動相体積を指す). 前号でも述べたように, アセトニトリルとメタノールはともにアルキル結合層内部へはほとんど分配せず, 主に界面に保持される. したがって, 移動相にこれらの有機溶媒が添加されると, 親水基を持つ化合物は界面への保持の割合が大きいため, 保持体積が減少することになる. 移動相中の有機溶媒濃度が大きくなると, 移動相とアルキル結合層内部との間の分配係数も小さくなるが, その効果は低濃度域では界面への分配係数の減少に比べて小さい. このため, 上述したような溶出順の逆転が起こるのである. 有機溶媒濃度がさらに大きくなると, 界面への保持の割合は次第に小さくなっていき, 移動相とアルキル結合層内部との間の分配の寄与が相対的に大きくなる.

このように, 移動相/アルキル結合層界面とアルキル結合層内部とでは, 移動相からそれぞれの固定相への溶質の分配係数の有機溶媒濃度依存性が異なるので, 全濃度範囲にわたって単純な関係式で表すことは難しいが, 有機溶媒が比較的低濃度である場合については, 保持係数 (k) と有機溶媒濃度の関係が経験的に次式によって表されることが知られている^{5)~7)}.

$$\log k = \log k_w - S\phi_0 \dots \dots \dots (1)$$

ここで, k_w は純水を移動相としたときの溶質の保持係数であり, ϕ_0 は移動相中の有機溶媒の体積分率である. また, S は溶質と有機溶媒の種類で決まる係数で, RPLC における溶媒強度として用いることができる.

5 溶質バンド (ピーク) の広がり形状

5.1 バンドの広がりをもたらす要因

前号で述べたように, クロマトグラフィーにおける分離の効率は, ピーク幅の大きさとピークの中心がどれだけ離れているかによって決まる. ここでは, カラム内でのバンドの広がりを引き起こす三つの主要な要因について述べる. ただし, カラム外すなわち, インジェクターや検出器セル, 配管内部, およびそれらの結合部での溶質バンドの広がりも無視できないことに注意する必要がある.

(1) 通常拡散

カラム内の溶質は, 濃度の高い領域から低い領域へと拡散してゆく. この拡散はカラム内のいずれの方向に向かっても起こるが, 問題となるのは移動相および固定相中でのカラム長さ方向の拡散である. ガスクロマトグラフィーとは異なり, 液体クロマトグラフィーでは移動相での拡散だけではなく, 固定相における通常拡散の寄与も大きい場合がある. 拡散は時間の経過とともに進行するので, この原因によるバンドの広がりは移動相の流量が小さいほど増大する.

(2) 多流路拡散

中空キャピラリーカラムを用いる場合を除いては, 移動相は充填剤粒子の間をぬって流れてゆく. したがって, 大きさや形の異なった粒子が不規則に充填されたカラム内には, それぞれ流速の異なった多くの流路が生じる. 狭く曲がりくねった流路をたどった分子は, 広く流れの速い流路を通った分子よりも遅れてカラム内を移動することになり, その結果, 溶質分子の集合体としてのバンドは広がることになる. このような原因によるバンドの広がりは, 充填剤の形状や粒子径および粒子径分布, さらにカラム充填状態の均一性によって左右される. 真球状で粒子径が小さく, かつ粒子径分布も狭い充填剤ほど, 多流路拡散によるバンドの広がりは抑制され, 高い理論段数が得られる.

(3) 物質移動

移動相と固定相との間を移動する溶質分子の速度は有限であり, 移動相は常に流れ続けているため, 移動相内と固定相内のカラム長さ方向の溶質濃度分布にはずれが生じることになる. すなわち, バンドの先端部では $c_s < K_D c_m$ となるのに対してバンド後部では $c_s > K_D c_m$ となる (ここで c_m と c_s は, それぞれ移動相および固定相中での溶質の濃度, また K_D は分配係数である). その結果,

先端部の移動速度はバンドの平均速度よりも大きく、逆に後部の移動速度はバンドの平均速度よりも小さくなり、そのためバンド全体としては幅が拡大することになる。この原因によるバンドの拡大の程度は、両相間の物質移動速度が小さいほど、また移動相流量が大きいほど増大する。

クロマトグラフィーにおけるバンドの広がりには、上に挙げた三つの要因がそれぞれ独立に作用する結果生じるものとして、理論段高さ（1理論段当たりのカラム長さ、 H ）について次のような理論式が導かれる⁸⁾⁹⁾。

$$H = \frac{L}{N} = 2\lambda d_p + \frac{2\gamma_m D_m}{u} + \frac{2\gamma_s D_s}{u} \left(\frac{1-R}{R} \right) + \frac{qR(1-R)d_s^2}{D_s} u \dots\dots\dots (2)$$

ここで L はカラム長さ、 D_m および D_s はそれぞれ移動相および固定相における溶質の拡散係数、 d_p および d_s は充填剤粒子の直径および固定相の厚さ、 λ 、 γ 、 q はそれぞれカラム充填状態、拡散経路、および固定相構造の不規則性を示す係数、そして u は移動相の線速度 (mm s^{-1}) である。また R は、溶質バンドの線速度 (u_R) と移動相の線速度の比であり、移動率または移動度比と呼ばれるが、式 (3) に示すように、全溶質量に対する移動相に存在する溶質量の比と言い換えることもできる。

$$R = \frac{u_R}{u} = \frac{c_m V_m}{c_m V_m + c_s V_s} \dots\dots\dots (3)$$

ここで、 V_m と V_s はカラム内の移動相体積および固定相体積である。式 (2) の右辺第1項は多流路拡散、第2項と第3項はそれぞれ移動相と固定相における通常拡散、そして第4項は物質移動の理論段高さに対する寄与を示している。特定の溶質、カラムおよび移動相に対しては D_m 、 D_s 、 R 、 d_p 、 d_s 、 λ 、 γ 、 q は定数とみなせるので、式 (2) は次のように簡略化できる。

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu \dots\dots\dots (4)$$

ここで A 、 B 、 C は定数である。

移動相の線速度に対する理論段高さの依存性 (van Deemter プロットと呼ばれる) を図5に示す。流速が小さい場合には通常拡散がバンドの広がりに大きく寄与するが、流速が大きくなると物質移動の影響が大きくなるのがわかる。また、 $u = (B/C)^{1/2}$ のとき理論段高さが最小となり、最も高い分離度を得られることになる。式 (2) および図5からわかるように、粒子径および固定相の厚さが小さいほど高理論段数を得ることができ、流速の増大に伴う理論段高さの増加も小さい。

Knox は、式 (2) および式 (4) の第1項は実際には

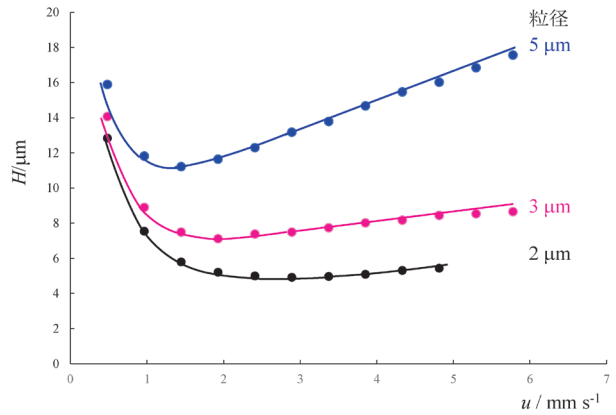


図5 van Deemter プロット

カラム：L-column2 ODS (2.1 mm×50 mm)，移動相：アセトニトリル/水 (50：50)，温度：25 °C，試料注入体積：0.5 mL，試料：ナフタレン。(一般財団法人化学物質評価研究機構提供データ)

u に依存する ($Au^{1/3}$) こと、およびカラム充填が均一でない場合にその効果が大きくなることを示している¹⁰⁾。より均一に充填されたカラムや一般的な構造を持つモノリス型カラムは、カラム効率を高めることにつながると考えられる。

5.2 テーリングとリーディング

クロマトグラム上のピークは幅が広がるだけでなく、対称性が崩れて歪んだ形になることがある。ピークが後方に尾を引く形をテーリング、逆に前方に裾が伸びた形をリーディングまたはフロンティングという。これらの非対称ピークを生じる原因は数多くあり、特定することが難しい場合もあるが、比較的多いのは、カラムに注入される試料量が大きすぎて分配あるいは吸着等温線の直線範囲を逸脱する場合であろう。図6に示したように、等温線が上に凸であるときは試料濃度が大きくなるほど分配係数が小さくなるので、濃度がより高いバンド中心

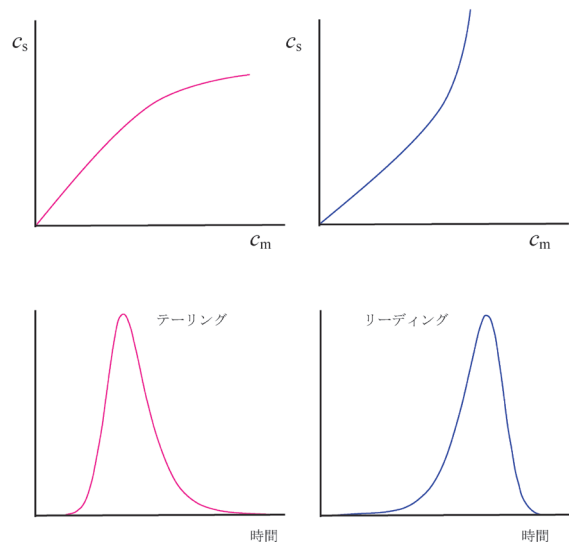


図6 分配等温線 (上図) とピーク形状 (下図)

部がカラム内を速く移動し、ピークはテーリングを示す。逆に等温線が下に凸であるときは、ピークはリーディングを示すことになる。

カラム内に複数の固定相（分配または吸着部位）が存在するとき、その中に溶質保持容量（固定相体積または面積）が小さく、物質移動速度が極端に小さいものがあると、顕著なテーリングを生じることがある。化学結合型シリカカラムを用いた RPLC においてよく見られるピークテーリングは、これによるものと考えられている。例えば、図 2 および図 3 において、ジエチルエーテル、酢酸イソプロピル、クロロホルムなどのピークは、純水を移動相とした系では特に明らかなテーリングを示していることがわかる。蛍光相関分光法を用いた研究などによって、オクタデシル（C₁₈）基を表面化学修飾したシリカ粒子（ODS）表面には溶質分子の脱着速度が非常に小さい部位がわずかではあるが存在することが明らかになっており、これが RPLC におけるテーリングの原因となっていると考えられている^{11)~13)}。また、この部位は残存シラノール基であると一般に推測されている^{11)~13)}。

図 3 (b) は、移動相にアセトニトリルを添加していくと、テーリングが小さくなり、ピークの対称性が良くなることを示している。図 4 からわかるように、アセトニトリルは水/アルキル結合層界面に次いでシリカ表面に多く（長時間）保持される。一方、メタノールのシリカ表面への保持は小さい。メタノールは 5 % 添加しても各化合物のピーク形状にほとんど影響を与えないことから、アセトニトリルがシリカ表面に吸着することによって、テーリングが抑制されたものと推定される⁴⁾。なお、図 3 (b) では、特に純水系で測定した酢酸イソプロピルのピークテーリングが顕著であるが、これはこのときの検出条件では感度が低かったため、試料濃度を高くしたことにより等温線の直線範囲から逸脱したことが主な原因である（図 6）。

5.3 化学反応によるバンド拡大

溶質がカラム内で化学反応を起こして、異なる化学種への可逆的な変換が起こるとき、バンドの広がりが生じることがある⁸⁾¹⁴⁾¹⁵⁾。一例として、ジペプチドの一種である L-アラニル-L-プロリン (Ala-Pro) の RPLC におけるクロマトグラムの温度依存性を図 7 に示す¹⁵⁾。低温では二つのピークが明確に分離しているのに対して、温度が上昇するにしたがってピークが融合し、40 °C 以上では一つのピークしか観測されなくなることがわかる。また、さらに高温にするとピーク幅が小さくなっている。これは、Ala-Pro には *trans* 体と *cis* 体が存在し、溶液中および界面溶媒和液相中で異性化反応を起こしていることによる。低温では異性化反応速度が小さいので、保持時間の小さい *trans* 体と大きい *cis* 体が分離して

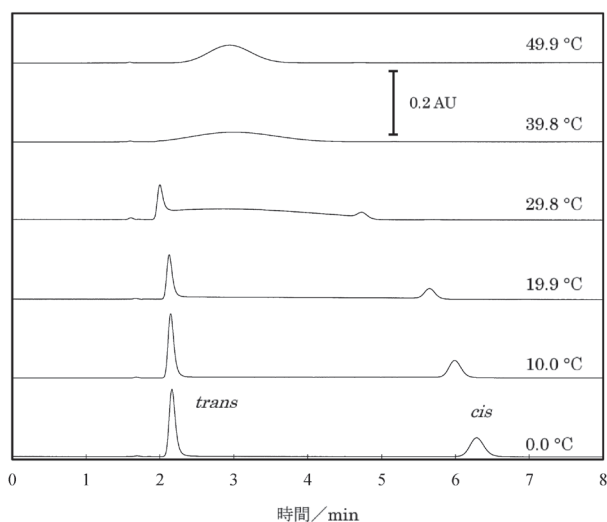


図 7 RPLC における Ala-Pro のクロマトグラムの温度変化¹⁵⁾
カラム：L-column ODS (4.6 mm×100 mm), 移動相：0.10 mol L⁻¹ リン酸緩衝液 (pH 7.0), 流量：0.65 mL min⁻¹, 検出：紫外吸光検出器 (205 nm)。

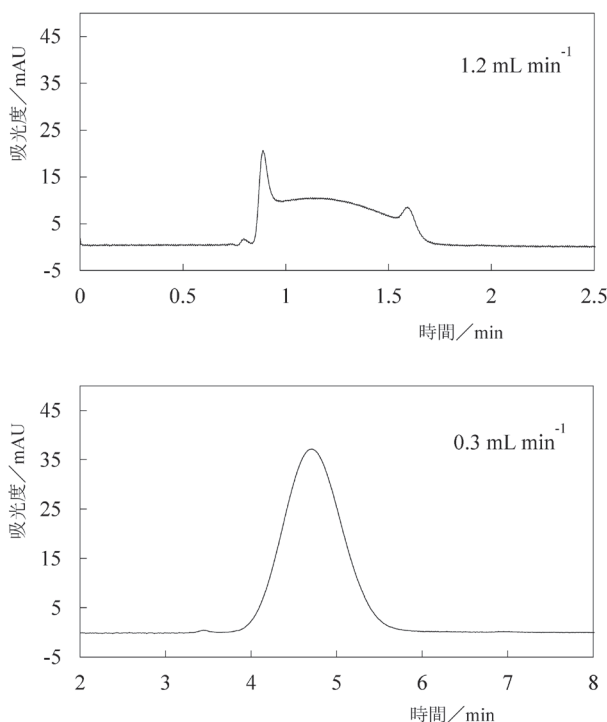


図 8 RPLC における Ala-Pro のピーク形状の流量による変化¹⁵⁾

カラム：PRP-1 (4.1 mm×150 mm), 移動相：0.10 mol L⁻¹ リン酸緩衝液 (pH 7.0), 温度 39.9 °C, 検出：紫外吸光検出器 (205 nm)。

カラムから溶出するが、温度が高くなると反応速度が大きくなり、ついには二つの異性体の平衡混合物が一つのピークとして観測されるようになるのである。このとき、理論段高さは移動相の線速度 u に比例して大きくなる。したがって、その寄与は式 (4) の C 項に含まれることになる^{8)14)~16)}。しかし、移動相の流量が大きくなると、ピークが分裂するようになる（図 8）¹⁵⁾¹⁶⁾。

6 二次的化学平衡による分離選択性の制御

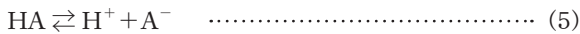
6.1 二次的化学平衡

高速液体クロマトグラフィー (high-performance liquid chromatography, HPLC) により試料成分を分離するには、各成分の分配係数 (保持係数) に十分な差が必要である。理論段数が 10000 のカラムで、分離したい 2 成分の保持係数の平均が 5.0 のとき、分離係数 (α) が 1.1 以上であれば、分離度 (R_s) が 1.8 以上となり、ほぼ完全分離が達成できるようになることが前号の式 (6) よりわかる。これは HPLC が高い分離能を持っていることを示しているが、各種の異性体のように構造が非常に似かよった物質どうしを分離するには十分でないことがある。このようなとき、カラム内の分離場に化学反応を導入して高度な分離を達成することができる。これは HPLC に限られたものではなく、溶媒抽出やイオン交換でも用いられる方法であるが、HPLC においては、移動相と固定相との間の分配 (吸着) 平衡に対比して、導入される化学平衡を二次的平衡と呼ぶことがある¹⁷⁾。

6.2 酸塩基平衡を利用した分離

二次的平衡として、RPLC やイオン交換クロマトグラフィーにおいて最もよく用いられる酸塩基平衡を取り上げて説明する。RPLC においては、移動相に疎水性の大きな対イオンが加えられていないかぎり、電荷を持つ化学種、すなわちイオンは固定相に対する親和性が小さく、中性の化学種よりも保持が圧倒的に小さくなる。したがって、移動相の pH を変えることによって酸性化合物や塩基性化合物の荷電状態を変化させることができれば、たとえ中性の状態や完全にイオン化した状態では相互分離できない場合でも、両者が平衡混合物として存在する pH 領域で容易に分離できるようになる。

一塩基酸, HA, を例にとると、その解離平衡は次のように書くことができる。



ここで、 A^- は酸 HA の共役塩基である。また、酸解離定数は次式で表される。

$$K_a = \frac{[\text{H}^+][\text{A}^-]}{[\text{HA}]} \quad \dots \dots \dots (6)$$

水溶液中での酸塩基反応 (プロトン移動反応) の速度は各化学種の移動相/固定相間の物質移動速度に比べて極めて大きく、酸とその共役塩基とが HPLC カラム内での溶出過程において分離されることはない。すなわち、両者は常に平衡混合物として 1 つのバンドの中に存在しており、酸塩基反応によるピーク幅の拡大などは起こらない。したがって、実際に測定される保持係数, k_A ,

は次のように表される。

$$k_A = \frac{V_s}{V_m} \left(\frac{[\text{HA}]_s + [\text{A}^-]_s}{[\text{HA}]_m + [\text{A}^-]_m} \right) = \frac{k_0[\text{H}^+]_m + k_{-1}K_a}{K_a + [\text{H}^+]_m} \quad \dots (7)$$

ここで、 k_0 と k_{-1} はそれぞれ HA および A^- がそれぞれ単独で存在するときに得られる保持係数であり、下付きの m と s はそれぞれ移動相と固定相の値であることを示す。

図 9 に、酸型と塩基型の保持係数が等しく、 $\text{p}K_a$ だけがわずかに異なる二つの仮想的弱酸の RPLC における保持係数と pH の関係を示す¹⁷⁾。この図からわかるように、分離したい化合物の $\text{p}K_a$ に差があれば、それらの保持係数の pH 依存性を利用して分離を達成することができる。二つの一塩基酸 A と B の k_0 と k_{-1} が互いに等しい場合、分離係数が最大となる pH, pH_{opt} は次式で与えられる¹⁷⁾。

$$\text{pH}_{\text{opt}} = \frac{\text{p}K_{a,A} + \text{p}K_{a,B}}{2} + \frac{1}{2} \log \frac{k_0}{k_{-1}} \quad \dots \dots \dots (8)$$

ここで $\text{p}K_{a,A}$ および $\text{p}K_{a,B}$ はそれぞれの酸の $\text{p}K_a$ である。

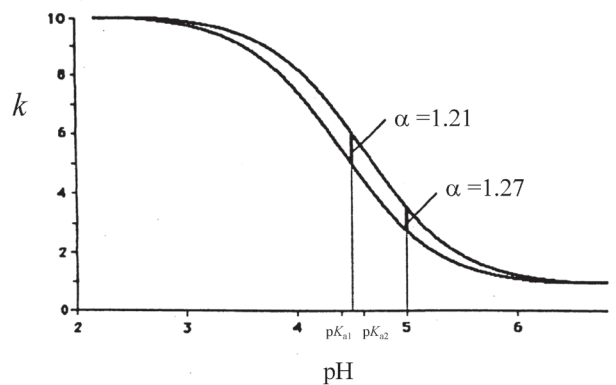


図 9 逆相 HPLC における二つの仮想的弱酸の保持係数の pH 依存性¹⁷⁾
 $\text{p}K_{a1} = 4.4$, $\text{p}K_{a2} = 4.6$

k_{av} 16.1 13.6 7.98 6.25 4.38 3.04

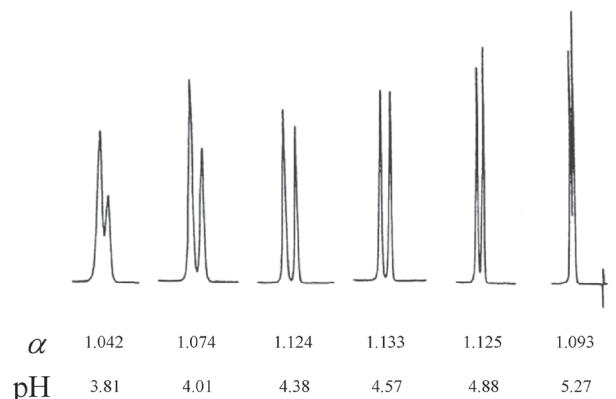


図 10 3-クロロ安息香酸 ($\text{p}K_a = 3.68$) と 4-クロロ安息香酸 ($\text{p}K_a = 3.85$) の分離¹⁷⁾

図 10 に 3-クロロ安息香酸 ($pK_a=3.68$) と 4-クロロ安息香酸 ($pK_a=3.85$) の分離例を示す¹⁷⁾. 式 (8) から予測される pH で最も良い分離が得られていることがわかる. また Tanaka らは, 安息香酸のカルボキシ基の酸解離定数, およびアニリンのアミノ基の塩基解離定数が, それぞれの官能基中の酸素同位体 (^{16}O , ^{17}O , ^{18}O) および窒素同位体 (^{14}N , ^{15}N) によってわずかに異なることを利用して, この方法による各同位体化合物の分離ができることを報告している^{18)~20)}.

酸塩基反応のほかにも, イオン交換クロマトグラフィーによる金属イオンの分離には錯形成反応が用いられるなど, 種々の化学反応が二次的平衡として HPLC 分離に利用されている. しかし溶液内化学反応を二次的平衡として導入する場合には, 5・3 に述べたように, 反応速度が十分に大きくないとピーク幅が大きくなったり, 複数のピークが現れたりすることがあることに留意しなくてはならない.

7 おわりに

RPLC における溶質の分離機構を中心に, 2号にわたって液体クロマトグラフィーの基礎を解説してきた. クロマトグラフィーは, 溶媒抽出やイオン交換, 固相抽出などで一般に用いられるバッチ法と呼ばれる 1 段階分離に対して, 多段階の分離法とみなすことができる. 現在の HPLC では, 150 mm のカラムで 10000 を超える理論段数 (すなわちバッチ法による 10000 回の分離) を得ることは比較的容易であるので, それに相当する回数の分離が, カラムを試料成分が通過する間に行われていることになる. それでも, 目的とする分離を達成するには, 適切なカラムと移動相の選択をはじめ, 多くの条件を最適化しなくてはならない. そのためには, 各種の液体クロマトグラフィーの分離機構を正しく理解することが重要である.

逆相シリカ充填剤を用いた RPLC では, 一般に化学修飾された疎水基が親水性の移動相溶媒とは混和せず, 単独の固定相として機能すると近似でき, 移動相中の成分は疎水基表面に移動相とは異なる界面溶媒和液相を形成して, これも独立の固定相として作用する. 前号の図 7, 8, 10 に示されているように, 溶媒和液相の厚さは, およそ 1~2 nm 程度と非常に小さいが, 界面の面積は大きいので, 溶質分子の保持体積への寄与は非常に大きくなる. これは特に移動相液体と充填剤の極性の差が大きいときの特徴である.

一方, 修飾基や充填剤の基材自体が移動相溶媒と親和性が大きく, 互いに混和 (溶解) する場合は様相が大きく異なる. たとえば, デキストランゲルやポリアクリルアミドゲルを充填剤とし, 水溶液を移動相とするクロマトグラフィーについて考えてみよう. デキストランやポリアクリルアミドは 3 次元架橋されているので水に完

全に溶解はしないものの, 膨潤して高分子水溶液相を形成する. このカラム内に固定された高分子水溶液相は, バルク水溶液とは溶質分子との親和性が異なるので固定相として働き, 移動相水溶液との間に溶質の分配が生じる²¹⁾. 高分子水溶液相中の高分子濃度が大きいほど (一般には架橋度が大きいほど高分子濃度が大きくなる), バルク水溶液相との物性の差が大きくなるので, 二つの溶質の分離係数は大きくなる. 同様のことはポリスチレンゲルや酢酸ビニルゲルを充填剤とし, 有機溶媒を移動相とするクロマトグラフィーにおいても起こる²²⁾²³⁾. これらは, 一般に水溶液系および有機溶媒系サイズ排除クロマトグラフィーとして使用される系であるが, 常に分配の寄与があることを忘れてはならない. このように, 液体クロマトグラフィーにおける分離場は, 充填剤の表面または基材そのものと移動相成分との相互作用に依存して, その構成が多様に変化する. 一般に固定相は複数存在することが多く, また, そこで溶質間の分離を引き起こす作用 (分離機構) も一つだけとは限らない. このため, 目的の分離を達成するためのカラムと移動相の選択は容易でないことが多いが, 逆に困難な分離も可能になることがある. 予想しなかった分離挙動やピーク形状が観測されたときには, ミクロの視点で試料成分分子やイオンが置かれている分離場と, そこで起こっている反応を考えてみるのが重要である.

文 献

- 1) K. Nakamura, S. Saito, M. Shibukawa : *J. Phys. Chem. C*, **122**, 4409 (2018).
- 2) K. Nakamura, H. Nakamura, S. Saito, M. Shibukawa : *Anal. Chem.*, **87**, 1180 (2015).
- 3) K. Nakamura, S. Saito, M. Shibukawa : *J. Chromatogr. A*, **1628**, 461450 (2020).
- 4) K. Nakamura, R. Ubukata, H. Mizuno, S. Saito, M. Shibukawa : *J. Phys. Chem. C*, **122**, 28674 (2018).
- 5) L. R. Snyder, J. W. Dolan, J. R. Gant : *J. Chromatogr.*, **165**, 3 (1979).
- 6) P. J. Schoenmakers, H. A. H. Billiet, L. De Galan : *Chromatographia*, **15**, 205 (1982).
- 7) A. Jouyban, S. Soltani, A. Shayanfar, A. Pappa-Louisi : *J. Chromatogr. A*, **1218**, 6454 (2011).
- 8) J. C. Giddings : "Dynamics of Chromatography, Part 1, Principles and Theory", (1965), (Marcel Dekker, New York).
- 9) 津田孝雄 : "クロマトグラフィー第 2 版一分離のしくみと応用", (1995), (丸善).
- 10) J. H. Knox : *J. Chromatogr. A*, **960**, 7 (2002).
- 11) M. J. Wirth, R. W. P. Fairbank, H. O. Fatunmbi : *Science*, **275**, 44 (1997).
- 12) M. D. Ludes, M. J. Wirth : *Anal. Chem.*, **74**, 386 (2002).
- 13) L. Kisley, C. F. Landes : *Anal. Chem.*, **87**, 83 (2015).
- 14) J. H. Knox, M. Shibukawa : *J. Chromatogr.*, **545**, 123 (1991).
- 15) M. Shibukawa, A. Miyake, S. Eda, S. Saito : *Anal. Chem.*, **87**, 9280 (2015).
- 16) 洪川雅美 : *ぶんせき (Bunseki)*, **2017**, 140.
- 17) J. P. Foley, W. E. May : *Anal. Chem.*, **59**, 102 (1987).
- 18) N. Tanaka, M. Araki : *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 7780 (1985).

- 19) N. Tanaka, A. Yamaguchi, M. Araki : *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 7781 (1985).
 20) N. Tanaka, M. Araki, K. Kimata : *J. Chromatogr.*, **352**, 31 (1986).
 21) 渋川雅美 : 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **55**, 149 (2006).
 22) M. Yamamoto, Y. Yamamoto : *Anal. Chim. Acta*, **87**, 375 (1976).
 23) K. Saitoh, N. Suzuki : *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **51**, 116 (1978).



渋川 雅美 (Masami SHIBUKAWA)
 埼玉大学 (〒338-8570 さいたま市桜区下大久保 255). 東京都立大学大学院理学研究科博士課程化学専攻. 理学博士. 《現在の研究テーマ》SBMLC による気体および VOC の分離, 疎水界面水の構造解析. 《主な著書》“分析化学改訂版”. (裳華房). 《趣味》ジョギング.
 E-mail : sibukawa@mail.saitama-u.ac.jp

日本分析化学会の機関月刊誌『ぶんせき』の再録集 vol. 2 が出版されました！ 初学者必見！ 正しく分析するための 241 ページです。

本書は書籍化の第二弾として、「入門講座」から分析試料の取り扱いや前処理に関する記事、合計 36 本を再録しました。『ぶんせき』では、分析化学の初学者から専門家まで幅広い会員に向けて、多くの有用な情報を提供し続けています。これまで掲載された記事には、分析化学諸分野の入門的な概説や分析操作の基礎といった、いつの時代でも必要となる手ほどきや現役の研究者・技術者の実体験など、分析のノウハウが詰まっています。

本書は下記の二章だてとなっています。

〈1 章 分析における試料前処理の基礎知識〉

- | | |
|----------------------------------|-----------------------------------|
| 1. 土壌中重金属分析のための前処理法 | 11. 大気中揮発性有機化合物分析のための前処理 |
| 2. 岩石試料の分析のための前処理法 | 12. 放射性核種分析のための前処理法 |
| 3. プラスチック試料の分析のための前処理法 | 13. 脂質分析のための前処理法 |
| 4. 金属試料分析のための前処理 | 14. 糖鎖分析のための試料前処理 |
| 5. 分析試料としての水産生物の特徴と取り扱い | 15. イムノアッセイのための前処理法 |
| 6. 食品分析のための前処理法 | 16. 加速器質量分析における超高感度核種分析のための試料前処理法 |
| 7. Dried blood spot 法による血液試料の前処理 | 17. 生元素安定同位体比分析のための試料前処理法 |
| 8. 生体試料のための前処理法 (液-液抽出) | 18. セラミックス試料分析のための前処理法 |
| 9. 生体試料のための前処理法 (固相抽出) | |
| 10. 環境水試料の分析のための前処理法 | |

〈2 章 分析試料の正しい取り扱いかた〉

- | | |
|---------------------------|--------------------|
| 1. 生体 (血液) | 10. 岩石 |
| 2. 生体 (毛髪) | 11. 食品 (農産物の残留農薬) |
| 3. 金属 (非鉄金属) | 12. ガラス |
| 4. 金属 (鉄鋼) | 13. 環境 (陸水) |
| 5. 食品 (酒類) | 14. 温泉付随ガス |
| 6. 医薬品 (原薬・中間体・原料) | 15. 透過電子顕微鏡観察の試料調整 |
| 7. 海水 (微量金属) | 16. 環境 (ダイオキシン類) |
| 8. 考古資料 | 17. 高分子材料 |
| 9. 海底下の試料 (地球深部の堆積物および岩石) | 18. 沈降粒子 |

なお、『ぶんせき』掲載時から数年が経過しているため、記事の中には執筆者の所属も含め、部分的に現在の状況とは異なる内容を含むものがあるかもしれません。本書では、各記事の『ぶんせき』掲載年を明記することで、再録にともなう本文改稿を割愛しました。これらの点については、執筆者および読者の方々にご了承いただきたく、お願い申し上げます。

本シリーズが化学分析の虎の巻として多くの方に活用されることを願ってやみません。