機器分析・分析化学

ゆっくり丁寧・これで納得

クロマトグラフィー

Chromatography

分離分析
必ず深くわかる

分配係数・保持係数
正規分布・分離係数
分離度・シンメトリー係数

No.
11-2

なぜ，定性できるのか？
分離の指標は？

1

本動画でわかること

#11-1 (前回の動画)
そもそも，なぜ分離できるのか？ を明らかにしました。

⬇ 今回の動画(#11-2)では

なぜ，定性分析ができるのか？

どの程度，分離できているのか？

2

目次

なぜ, 定性分析ができるのか？
1. 分配係数 の復習
2. クロマトグラムと 各種名称
3. 保持値(時間と容量と係数)と分配係数の関係

分離の度合いについて
4. 正規分布
5. 分離係数
6. 分離度
7. シンメトリー係数

3

1. 分配係数/ Distribution coefficient

分配係数 K

$$K = \frac{C_S}{C_M} = \frac{\text{固定相中の試料濃度}}{\text{移動相中の試料濃度}}$$

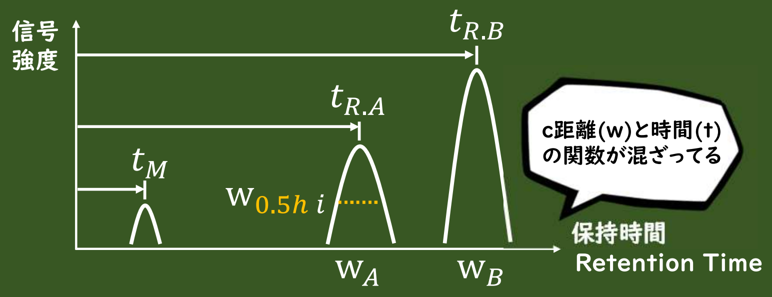
Kが大きい → 分母が小さい → 移動相が低濃度・固定相が高濃度

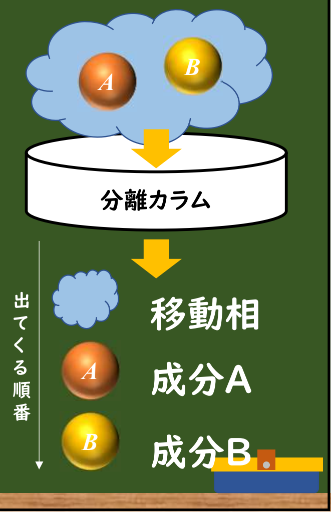
$K_A = 0.5$
$K_B = 1.0$

サンプルBの方が Kが大きい。
Bの方が固定相濃度が高い。
→ Bの方が, 時間をかけて排出される。

4

2. クロマトグラムと語彙/ Chromatogram





t_M　分離成分と一緒に導入された移動相がカラム内の成分(酸素やメタン等)を押し出した結果の生じるピーク(出ないこともある)。>>**移動相の通過時間**も示す

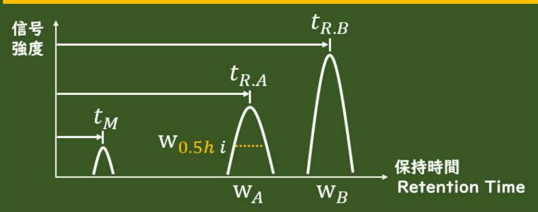
$t_{R.i}$　分離成分がカラムから留出してくる時間 (**保持時間**) ➡ **定性分析**

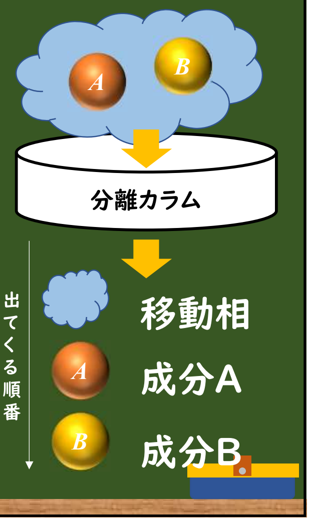
w_i　ピーク幅

$w_{0.5h\ i}$　ピークの半値幅

5

2. クロマトグラムと語彙/ Chromatogram





t_M に移動相の流量F を乗ずることで，移動相が通過できる体積 V_M(**移動相の体積**)がわかる。
Dead volume

$$V_M = F \times t_M$$

$t_{R.i}$ に移動相の流量F を乗ずることで，成分の体積V(**保持容量**)がわかる。
Retention volume

$$V = F \times t_{R.i}$$

$t'_{R.i} = t_{R.i} - t_M$ は，調整**保持時間**(Adjusted retention time)

$V' = V - V_M$ は，調整**保持容量**(Adjusted retention volume)

➡ 成分が固定相と相互作用した真の保持時間と 真の保持容量

6

3-1.保持値(時間と容量と係数)と分配係数の関係

なぜ, 定性分析ができるのか？

成分が平均線速度μでカラム内を移動しているとする。
このμは, 移動相の平均線速度μ_Mと全物質量に対する移動相中の物質量の分率の積に相当するので,

$$\mu = \mu_M \times \frac{\text{移動相中の物質量}}{\text{全物質量}} = \mu_M \times \frac{C_M V_M}{C_M V_M + C_S V_S}$$

V_M:移動相の体積
V_S:固定相の体積

式変形として, $C_M V_M$ で割って, $K = \frac{C_S}{C_M}$ を代入すると

$$\mu = \mu_M \times \frac{1}{1 + \frac{C_S V_S}{C_M V_M}} = \mu_M \times \frac{1}{1 + K\frac{V_S}{V_M}} \quad \cdots 式①$$

7

3-2.保持値(時間と容量と係数)と分配係数の関係

一方, 分配平衡を記述する重要なパラメーターとして
保持係数 k (Retention factor)がある

$$k = \frac{C_S V_S}{C_M V_M} = K\frac{V_S}{V_M} \quad \cdots 式②$$

式②から, 同じ(製品化された)分離カラムを使う場合, 固定相と移動相の体積は変化しない(V_S/V_M= 一定)ので, k は K に比例する。
また, 移動相(V_M)と固定相(V_S)の体積が同じであれば, k は K と 同じ値になる。
式② を 式① に代入すると

$$\mu = \mu_M \times \frac{1}{1 + K\frac{V_S}{V_M}} = \mu_M \times \frac{1}{1 + k}$$

$\cdots$式①

8

3-3.保持値(時間と容量と係数)と分配係数の関係

平均線速度μでカラム長さ L を除し，この成分の保持時間t_Rには

$$t_R = \frac{L}{\mu} = \frac{L}{\mu_M}(1+k) = t_M(1+k) \quad \cdots 式③$$

μ_M：移動相の平均線速度，t_M：移動相を通過する必要な時間

さらに，この保持時間t_Rに移動相の流量Fを乗ずることで

$$V = F \times t_R = F \times t_M(1+k) = V_M(1+k) \quad \cdots 式④$$

式④に式②を代入すると，

$$V = V_M\left(1 + K\frac{V_S}{V_M}\right) = V_M + K\,V_S$$

$$V - V_M = K\,V_S \quad (※調整保持容量\ V' = V - V_M)$$

$$V' = K\,V_S$$

9

3-4.保持値(時間と容量と係数)と分配係数の関係

$$V' = K\,V_S$$

つまり，固定相の体積(V_S)が一定ならば，真の保持値(調整保持容量；V’)が分配係数K に比例する。分配係数K は移動相と固定相の組合せにより決定される。

また，調整保持容量を構成する保持容量は，保持時間と移動相の流量Fに比例する。

つまり，分離装置の条件(移動相の流量F・固定相の体積・移動相と固定相の組合せ)が同じであれば，

成分Aの保持値(時間)は，その成分の固有値(同じ時間)になる。

調整保持容量
$V' = V - V_M$

保持容量と保持時間
$V = F \times t_{R.i}$

➡ **保持時間によって，定性分析が可能**
(使用したカラム(固定相・体積)と移動相の種類・流量の情報が論文では必要)

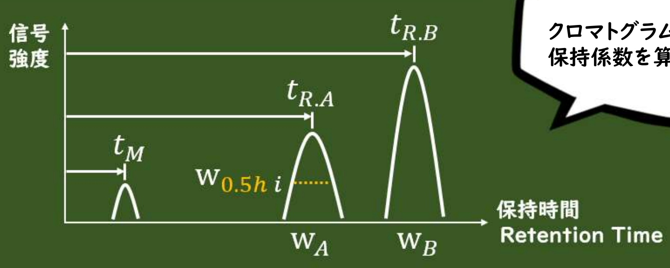
10

3-5.保持値(時間と容量と係数)と分配係数の関係

$$t_R = \frac{L}{\mu} = \frac{L}{\mu_M}(1+k) = t_M(1+k) \quad \cdots 式③$$

また，式③を整理することで，保持係数k と クロマトグラムの関係がわかる

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$ 保持係数 k



クロマトグラムより
保持係数を算出できる

11

目次

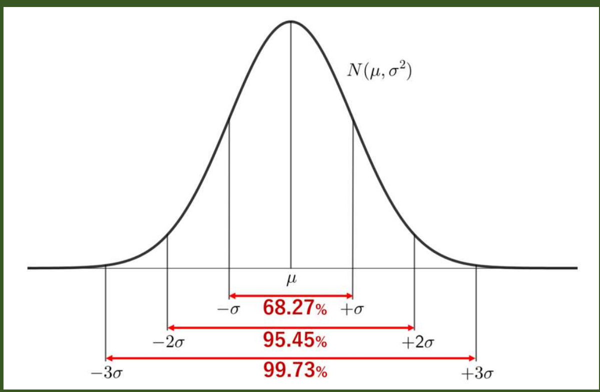
なぜ，**定性分析**ができるのか？
1. 分配係数 の復習
2. クロマトグラムと 各種名称
3. 保持値(時間と容量と係数)と分配係数の関係

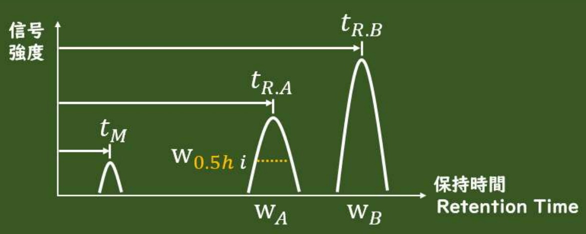
分離の**度合い**について
4. 正規分布
5. 分離係数
6. 分離度
7. シンメトリー係数

12

4. 正規分布 (ガウス関数)

クロマトグラムのピークは，正規分布として例えられます。
下記は，正規分布(確率密度関数)と 分散(σ^2)の関係





ピーク幅 $w = 4\sigma$

ピーク半値幅 $w_{0.5h\,i} = \sqrt{8\ln 2}\,\sigma$

分散(σ^2)： データのバラツキ
標準偏差(σ)：平均値からのズレ

13

5. 分離係数/ Separation factor

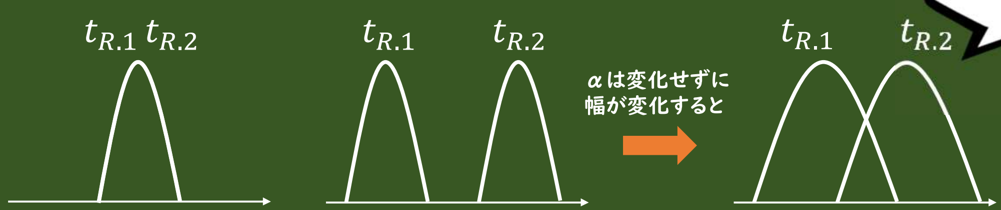
分離係数αとは，簡易的に相互分離されているか？
＞ 隣接するピークの保持係数の比である。

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t_{R.2}-t_M}{t_M} \times \frac{t_M}{t_{R.1}-t_M} = \frac{t_{R.2}-t_M}{t_{R.1}-t_M} = \frac{t_{R.2}}{t_{R.1}}$$

t_M を省略することもある

分離係数α≧1であること

α＝1の場合　　α＞1の場合



ピークが重なる　　ピーク(トップ)が離れる　　ピーク(トップ)が離れる

分離できていない

ピークの幅を考慮する必要がある

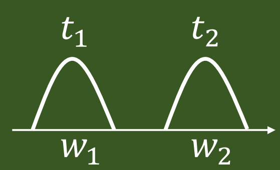
14

6-1. 分離度

分離係数αは，ピークの幅を考慮していない。それぞれのピーク幅を考慮する必要がある。 分離度Rは，

ピークトップの差を，それぞれのピーク幅の平均で割った値

$$R = \frac{t_2 - t_1}{\frac{1}{2}(w_1 + w_2)} = 2 \times \frac{t_2 - t_1}{w_1 + w_2}$$



数学として，R=1.5以上の場合，二つのピークはほぼ相互分離している。

ピーク半値幅 $w_{0.5h\,i} = \sqrt{8 \ln 2}\,\sigma = 2.3546\,\sigma$

$$R = 1.177 \times \frac{t_2 - t_1}{w_{0.5h\,1} + w_{0.5h\,2}}$$

日本薬局および
JIS規格はこちらの式で定義

15

6-2a. 分離度を 具体的な数字で考える

二つのピークの高さ・ピーク幅が同じ正規分布とすると

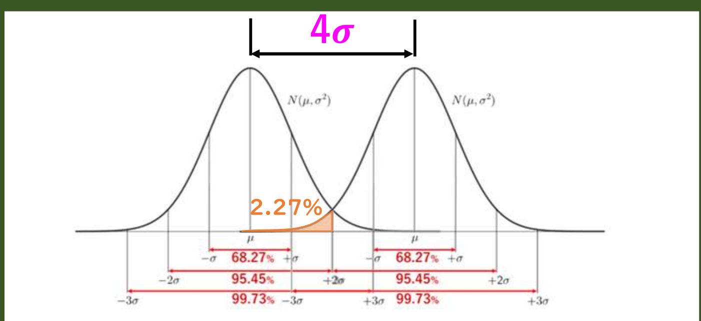
R = 1の場合

$$R = 2 \times \frac{t_2 - t_1}{w_1 + w_2} = 1$$

ピーク幅が同じ
$w_1 = w_2 = \mathrm{w}$

$t_2 - t_1 = 1.0 \times \mathrm{w}$

$w = 4\sigma$ なので， $t_2 - t_1 = 1.0 \times 4\sigma = 4\sigma$



お互いのピークが，2.27%づつ
重なっている状態

16

6-2b. 分離度を 具体的な数字で考える

二つのピークの高さ・ピーク幅が同じ正規分布とすると

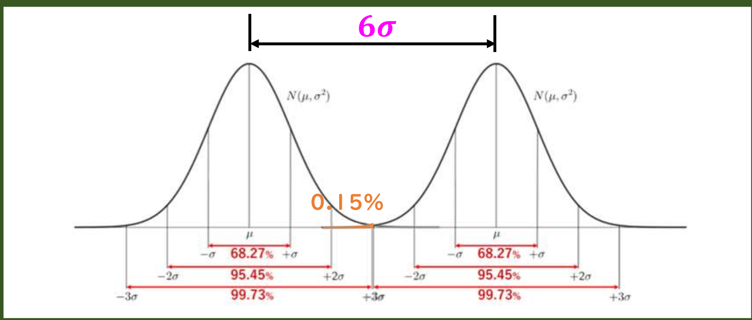
R＝1.5の場合

$$R = 2 \times \frac{t_2 - t_1}{w_1 + w_2} = 1.5$$

ピーク幅が同じ

$w_1 = w_2 = \mathrm{w}$ → $t_2 - t_1 = 1.5 \times \mathrm{w}$

$w = 4\sigma$ なので， $t_2 - t_1 = 1.5 \times 4\sigma = 6\sigma$



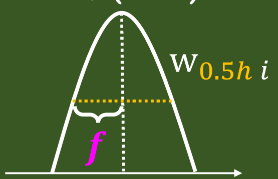
お互いのピークが，0.15%づつ重なっている状態

17

7-1. シンメトリー係数

ピーク異常として，「テーリング」と「リーディング」をご紹介

正常(理想)

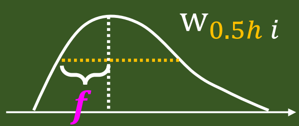


シンメトリー係数S は

$$S = \frac{w_{0.5h}}{2f}$$

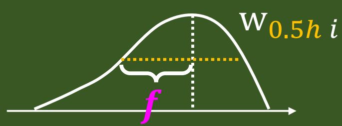
ピーク半値幅$W_{0.5h}$と2fが同じなら正規分布

「テーリング」



S > 1

「リーディング」



S < 1

語呂あわせ
天 ： テーリング
高く： S > 1
陸 ： リーディング
低く： S < 1

18

7-2. シンメトリー係数

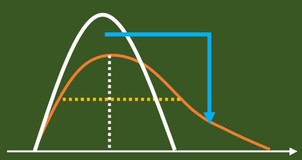
「テーリング」と「リーディング」がなぜ起こるかをざっくり説明

※わかりやすいようにオーバーに書いてます

AはBよりも固定相に吸着しない。
だから, Aの方が先にでてくる。

対策
固定相との相互作用を弱める

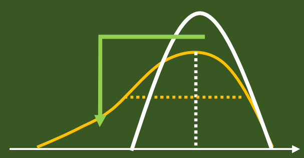
「テーリング」



ピークトップの重心が右にズレる。
→ 右にズレる。 → 通常より「遅く」出てくる。
つまり, 固定相に余計に吸着されてる。 (相互作用している)

「リーディング」

対策
量を減らす



ピークトップの重心が左にズレる。
→ 左にズレる。 → 通常より「早く」出てくる。
固定相に吸着されない。 (過剰に加えて固定相能を超えてる)

ご視聴ありがとうございました。

なぜ, 定性分析ができるのか？
1. 分配係数 の復習
2. クロマトグラムと 各種名称
3. 保持値(時間と容量と係数)と分配係数の関係

分離の度合いについて
4. 正規分布
5. 分離係数
6. 分離度
7. シンメトリー係数

学外へのアウトプットは自己研鑽につながっています。
皆さんと共に様々に学んでいます。