

High Performance Liquid Chromatography

液体クロマトグラフィー

特徴・装置概要の解説

何がわかる？

ガスクロと結構違う
様々な分離選択性を創出可能

分離分析
必ず深くわかる

機器分析・分析化学
ゆつくり丁寧・これで納得
No. 11-6



1

目次

1. クロマトグラフィーの理論：YouTube動画の紹介
2. ガスクロマトグラフィーとの比較
3. 液体クロマトグラフィーの装置概要（試料導入部 & 移動相）
4. 分離部の特徴（ガスクロvs液クロ）
5. 分析時間を短縮する方法は？
6. 分離モード概要
7. グラジエント溶離法の利点（おさらい）
8. 検出部

2

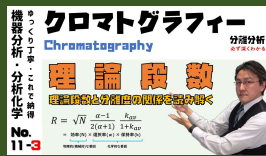
1. クロマトグラフィーの理論：動画の紹介



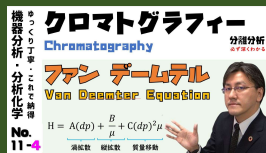
#11-1
なぜ、クロマトグラフィーで分離できるのか？



#11-2
なぜ、定性分析ができるのか？クロマトの頻出用語を紹介
(分配係数・保持係数・分離係数・分離度・シンメトリー係数)



#11-3
理論段数と分離度Rの関係式から、クロマトを使い倒す



#11-4
クロマトの頻出式
ファンデムテル式を読み解く

3

2. 液体クロマトグラフィーの特徴 ①

液体クロマトグラフィー(LC; Liquid Chromatography)

ガスクロ(GC)では測定困難な不揮発性および熱的に不安定な物質の測定に適用できる。溶液にできるすべての試料が分析対象とできる。

液体クロマトグラフィーの分類

カラムクロマトグラフィー
平面クロマトグラフィー
薄層クロマトグラフィー
ペーパークロマトグラフィー



カラム管に固定相を充填

4

2. 液体クロマトグラフィー vs ガスクロマトグラフィーとの比較

ガスクロマトグラフィー

移動相が気体なため、分離対象物は**気体に変化**できる必要がある。



液体クロマトグラフィー（高速液体クロマトグラフィー HPLC）

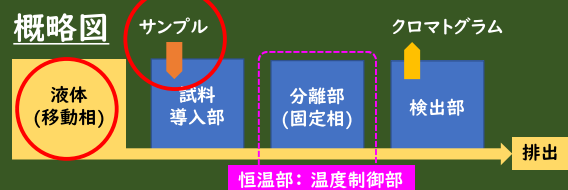
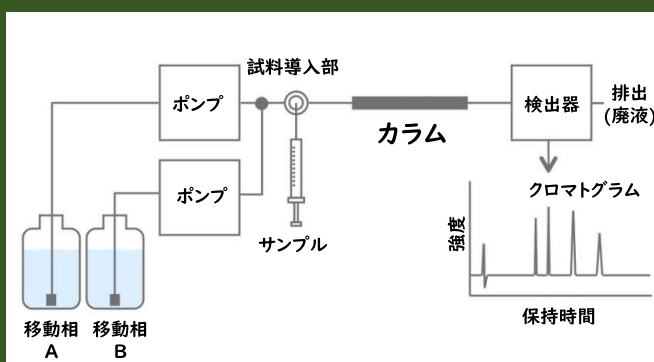
ガスクロでは測定困難な

- 不揮発性の分離対象物（気体にならない）
 - 熱的に不安定な化合物（気体状態で不安定）
- の分離に利用できる。

溶液にできる試料すべてが分析対象になる
無機イオン・有機化合物・高分子・天然物 等々

5

3. 液体クロマトグラフィーの装置構成



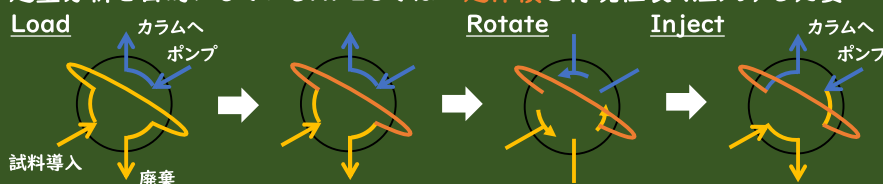
移動相

単一組成（イソクラティック溶離）の移動相で分離が困難な場合、組成を変化させながら分離

グラジエント溶離：直線的に濃度勾配をつける
ステップワイズ溶離：段階的に溶媒を切り替え

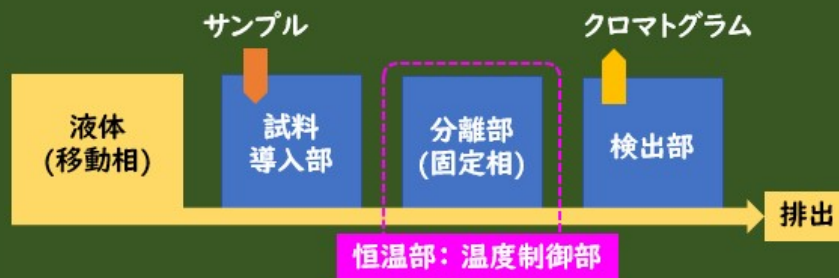
試料導入部(インジェクター)

定量分析を目的にしているHPLCでは**一定体積**を再現性良く注入する必要



6

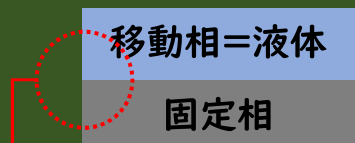
3. 各装置部：液体クロマトグラフィーの装置構成



7

4. 液体クロマトグラフィー vs ガスクロマトグラフィーとの比較

液体クロマトグラフィー



吸着
分配
イオン交換
サイズ排除
上記4つの混合

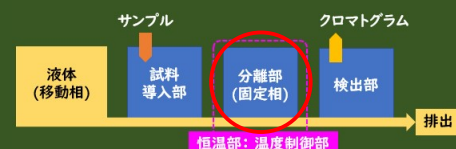
- ・ 親水性相互作用
- ・ イオン排除
- ・ イオン対
- ・ アフィニティー
- ・ キラル分離

ガスクロマトグラフィー



吸着
分配

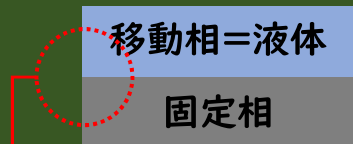
分離部の特徴
移動相と固定相の組合せ
様々な分離選択性を利用



8

4. 液体クロマトグラフィー vs ガスクロマトグラフィーとの比較

液体クロマトグラフィー



吸着
 分配
 イオン交換
 サイズ排除
 上記4つの混合
 ・ 親水性相互作用
 ・ イオン排除
 ・ イオン対
 ・ アフィニティー
 ・ キラル分離

特徴
 移動相と固定相の組合せ
 様々な**分離選択性**を利用

様々な分離モードを利用できるのはメリットである反面、
 分析対象や分析目的に応じて**適切な分離モード**を
選択する必要

9

4. (吸着・分配・親水性相互作用) 順相クロマト と 逆相クロマト

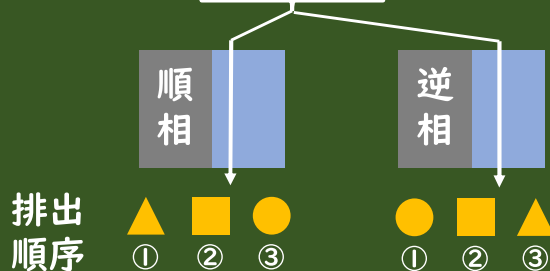
順相クロマト (Normal Phase Liquid Chromatography, NPLC)

固定相が移動相より極性が**高い**。アルミナやシリカゲルなどの**高極性**

逆相クロマト (Reversed Phase Liquid Chromatography, RPLC)

固定相が移動相より極性が**低い**。アルキル基などの**低極性**を利用

極性が**高い** → 極性が**低い**



排出順序が**異なる**

極性の**似た**ものが相性が良い。
 つまり、極性の高い●は
 順相では、固定相に長く存在(吸着)する
 逆相では、移動相に長く存在(吸着)する

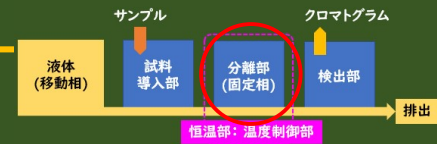
10

4. 分離カラムの分類

クロマトの用途は、分析と分取である。分析に比べて、**分取はカラム内径が大きくなる。**

分析用カラムサイズ；0.075～6.0mm

分取用カラムサイズ；10mm～



カラム管に固定相を充填

分離モード	固定相	移動相	相互作用
順相	シリカゲル	有機溶媒	吸着
逆相	アルキル基	水-有機溶媒	疎水性相互作用
親水性相互作用	極性基	CH ₃ CN-緩衝溶液	親水性相互作用
イオン交換	イオン交換体	電解質水溶液	静電相互作用
イオン排除	イオン交換体	電解質水溶液	静電相互作用
イオン対	アルキル基	対イオンを含む水有機溶媒	静電 疎水性 相
サイズ排除(ゲル浸透)	ポリマー	有機溶媒	ゲル浸透
サイズ排除(ゲルろ過)	親水性ポリ	緩衝溶液	ゲル浸透
アフィニティー	基質や抗原	水溶液	特異的相互作用
キラル分離	キラル化合物	水-有機溶媒	電荷移動・水素結合・配位子交換

11

5. 分析時間を短縮する方法は？

分析時間の短縮のもっとも単純な方法は、

①カラム長さを短く、②流速を上げること。

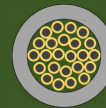
→ これらは、分離能の**低下**を招く!!

③充填剤の粒子径を小さく → 分離能が**向上**

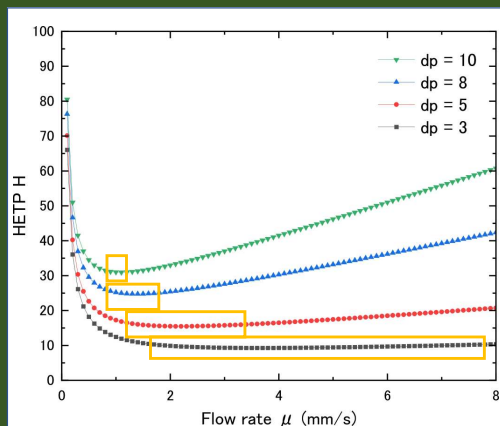
① 長さ

② 流速

カラム管



③ 充填剤の粒子径



充填剤の粒子径を因子にもつ Van Deemter式
横軸が流速 > 大きい方が分析時間が短い
縦軸が理論段数高さ > 小さい方が分離能が高い

粒子径(dp)が小さい方が、流速に対する理論段数高さの変化が**ほとんどない**。

12

6. 分離モードの概要 その1

・吸着 (固定相=極性高め)

充填剤としてシリカゲル($\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$)やアルミナ(Al_2O_3)を用い, 充填剤表面に直接物質が「吸着」することで分離が行われる。

分離成分は, シリカゲル表面のシラノール基(Si-OH)との水素結合などにより保持

異性体の分離などにも利用

吸着しないまま溶出しない成分が多く(吸着サイトを埋める), 吸着サイトが少なくなった結果, 溶出速度が速くなる傾向がある。



13

6. 分離モードの概要 その2

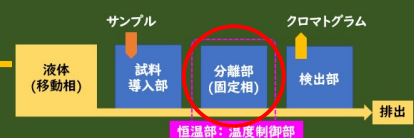
・分配 (固定相=極性低め)

充填剤としてシリカゲル表面に $\text{C}_{18}\text{H}_{37}$ (オクタデシル基)や $\text{C}_{18}\text{H}_{37}\text{O}$ (オクタデシルシラン基)を化学的に修飾した充填剤で分離が行われる。

分離成分は, 溶媒和したアルキル基に疎水性相互作用などにより保持



アルキル基の結合方法や結合量, あるいはアルキル基の炭素数の変化($\text{C}_{30}\text{H}_{62}$)や官能基(フェニル基・シアノ基)の付加により分離特性を変更。



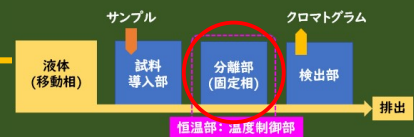
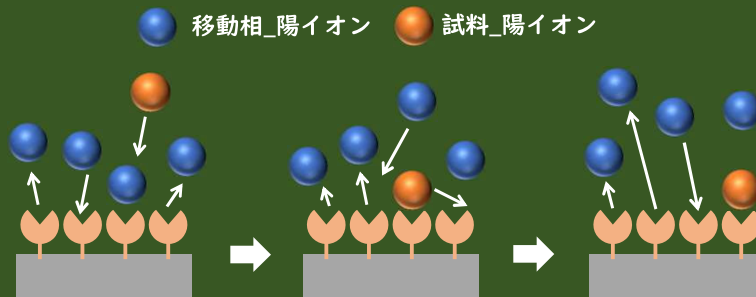
14

6. 分離モードの概要 その3

・イオン交換

ポリスチレン-ジビニルベンゼンなどの有機基材やシリカゲルなどの無機基材に官能基を修飾したイオン交換樹脂を用いる。試料イオンと交換基の静電的引力により保持
スルホン(SO_3H)基やカルボキシル(COOH)基をもつ陽イオン交換樹脂
対アニオン(OH , Cl)をもつ第4級アンモニウム(NR_4)基を修飾した陰イオン交換樹脂

移動相イオンと試料イオンは競争的にイオン交換基に作用



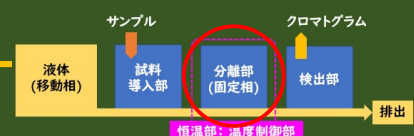
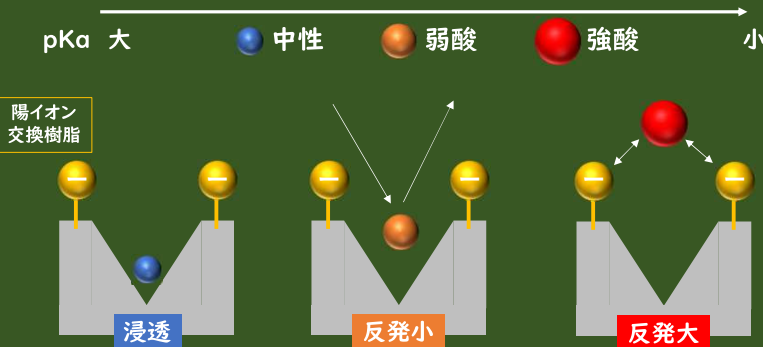
15

6. 分離モードの概要 その4

・イオン排除

有機酸分析で多用され、**H型陽イオン交換樹脂**により保持
ドナン排除(▼への浸透具合)の大小により分離する。

固定相の負電荷により、強酸は大きな静電的排除を受け充填剤のポア内部に浸透できないが、有機酸のような弱酸はその電荷の大きさにより、ポア内部への浸透の具合が決まり、溶出時間の差(分離)が生じる。



早い	クエン酸; pKa 3.13
	乳酸; pKa 3.86
	酢酸; pKa 4.76
	プロピオン酸; pKa 4.87
	酪酸; pKa 4.82
遅い	吉草酸; pKa 4.84

原理的に有機酸はpKaの小さい順に溶出し、中性物質が溶出するまでにはすべてが排出される。Pka; 化学便覧改訂2版

16

6. 分離モードの概要 その5

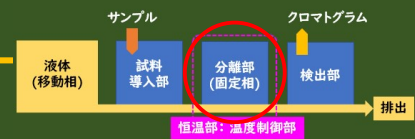
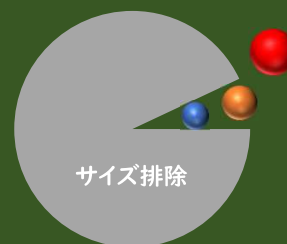
・サイズ排除

3次元の網目構造をもつ充填剤に対して、小さな分子は細孔の奥まで浸透するが、大きな分子は細孔に浸透せずに分離する。(分子ふるい効果)

分子量2000以上のたんぱく質やペプチドなどの生体高分子の分離に利用され、合成高分子の分子量推定にも利用

ゲル浸透クロマトグラフィー
(Gel permeation chromatography: GPC)
有機溶媒系の移動相と疎水性充填剤

ゲルろ過クロマトグラフィー
(Gel filtration chromatography: GFC)
水系の移動相と親水性充填剤



17

6. 分離モードの概要 その6

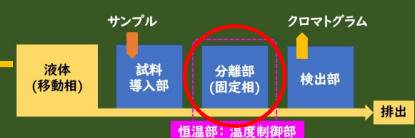
・アフィニティー

酵素や抗原などのたんぱく質は、特定の基質や抗体のみと結合する。このような生体物質の特異的な相互作用を利用して特定のたんぱく質を精製する。

・キラル分離

エナンチオマー(鏡像異性体)の分離を可能にする分離。

- 水素結合・電荷移動型固定相では、ジアステレオマー(鏡像異性体ではない)を生じさせる水素結合や電荷移動による相互作用が不斉識別に寄与。
- 配位子交換型固定相では、キラル配位子とキレート化合物との配位子交換相互作用が寄与。
- シクロデキストリン固定相では、疎水性のキラルなポア内にゲスト分子を取り込み不斉識別を行う。



18

7. グラジエント溶離法の利点

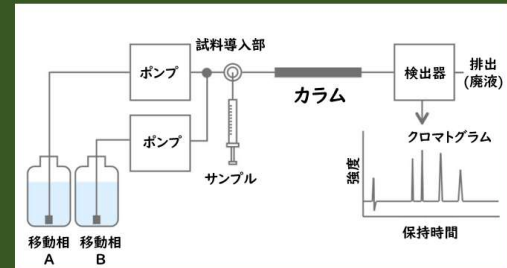
グラジエント溶離法

移動相

単一組成(イソクラティック溶離)の移動相で分離が困難な場合、組成を変化させながら分離

グラジエント溶離:

移動相の組成を直線的に変化させる方法



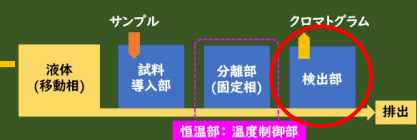
- 物性が広範囲な成分を一斉に溶出可能
- 早く溶出する成分の分離度を改善
- 遅く溶出する成分の溶出時間を短縮
- 検出感度も改善

19

8. 検出部

検出部では、

分析対象物の光学的・電氣的・あるいは化学的な特性を利用して測定される。



代表的な検出器は、紫外可視吸光検出器・蛍光検出器・示差屈折率検出器

多彩な検出器の考案

1. 紫外可視吸光検出器 (Ultra violet visible detector; UV-vis)
2. フォトダイオード検出器 (Photodiode array detector; PDA)
3. 蛍光検出器 (Fluorescence detector; FLD)
4. 示差屈折率検出器 (Refractive Index detector; RID)
5. 電気伝導度検出器 (Conductivity detector; CDD)
6. 電気化学検出器 (Electrochemical detector; ECD)
7. 蒸発光散乱検出器 (Evaporative Light Scattering detector; ELSD)
8. 旋光度検出器 (Optical rotation detector; ORD)
9. 円二色性検出器 (Circular dichroism detector; CDD)
10. 質量分析計 (MS) → 別動画

20

8. 検出部

検出部	グラジエント溶離法	温度の影響	検出感度(g)	原理及び特徴
紫外可視吸光	YES	小さい	$\sim 10^{-9}$	紫外可視に吸収がある成分が測定対象
フォトダイオード	YES	小さい	$\sim 10^{-9}$	紫外可視では受光部が1個しかないが、PDAでは多数のフォトダイオードで多波長同時モニタリングが可能
蛍光	YES	小さい	$\sim 10^{-12}$	励起光を照射したときの蛍光を測定するので選択性が高く、検出感度も高い
示唆屈折率	No	大きい	$\sim 10^{-6}$	試料成分が溶解した移動相の屈折率が変化する現象を利用する検出方法なので、ほとんどの化合物が溶媒に溶けることで屈折率が変化するの、 あらゆる成分が検出可能 。 ただし、屈折率は「温度」や「濃度」によって変化するので、定温・定組成で分析する必要がある。

検出器は、分析対象の濃度レベルや共存成分の影響も考慮して選択する。
目的成分の濃縮や妨害成分の除去が必要となる。

21

ご視聴ありがとうございました。

- ガスクロと双璧をなす液クロは、自由落下であった移動相をポンプで圧力をかけて移動相を流すことで、短時間で高性能な分離を行えるようになった。
- 溶液にできる試料が測定対象物
- 分離部が多種多様
- 検出部も多種多様
- グラジエント溶離法：移動相の組成を変化させて分離を効率よく実施
- ※ 移動相の組成を変化させた際に析出が起きないように気を付けましょう

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

22