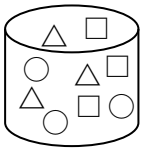
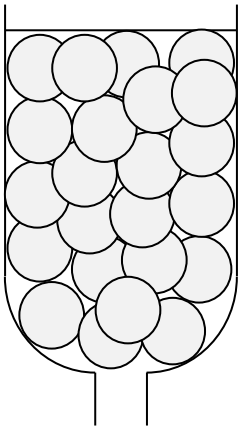
Ⅰ.クロマトグラフィー

1　クロマトグラフィーの原理

クロマトグラフィーは、気体、液体、超臨界流体を移動相とし、カラムと呼ばれる管の中に保持された固定相と物質の相互作用によって混合物を分離、検出する分析法である。



混合物



移動相 ― 液体
　　気体
　　超臨界流体

固定相 ― 固体
　　液体

2　分類

クロマトグラフィーは、**移動相と固定相の違い**や**分離機能**で以下のように分類される。

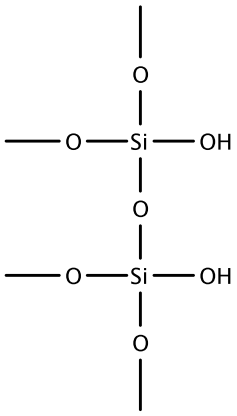
分類基準	名称	
移動相の種類	**液体**クロマトグラフィー（LC）	**液**–固クロマトグラフィー **液**–液クロマトグラフィー
	ガスクロマトグラフィー（GC）	**気**–固クロマトグラフィー **気**–液クロマトグラフィー
固定相の種類（分離機能）	吸着クロマトグラフィー 分配クロマトグラフィー イオン交換クロマトグラフィー サイズ排除クロマトグラフィー アフィニティクロマトグラフィー	
固定相の形式	薄層クロマトグラフィー カラムクロマトグラフィー	

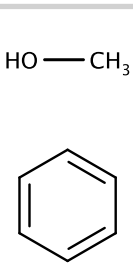
3　クロマトグラフィーの分離機構

1）　吸着クロマトグラフィー

吸着クロマトグラフィーとは、**極性が高く、吸着能をもつ固定相**と、極性の低い溶媒を移動相として用いた分離法である。固定相として用いられる充填剤として、**シリカゲル**、アルミナ、活性炭、合成ゼオライトなどがある。

・シリカゲル固定相の吸着機構

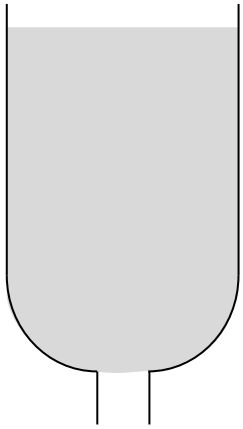


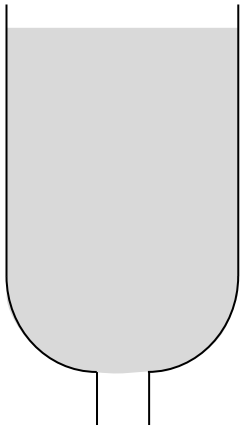


メタノール

ベンゼン

・シリカゲル固定相の分離機構

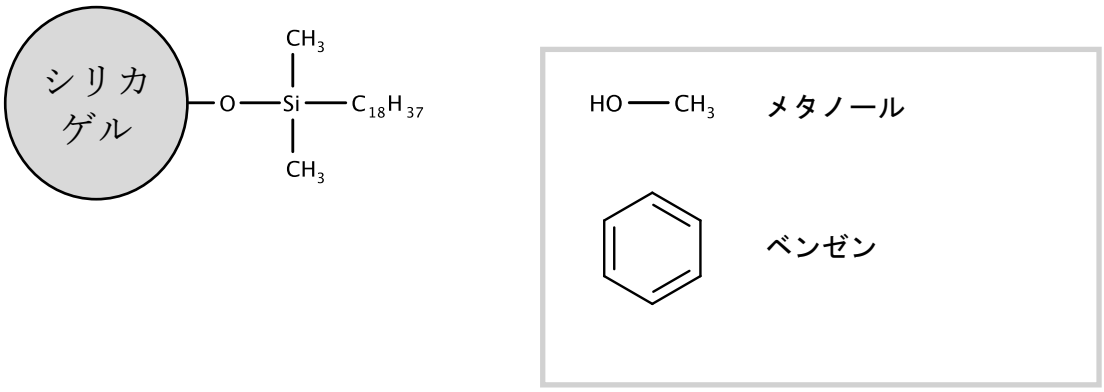




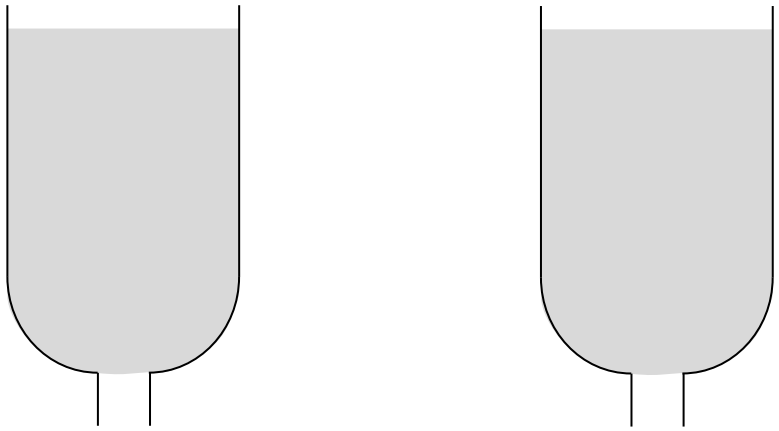
２）　分配クロマトグラフィー

分配クロマトグラフィーには、**極性の高い固定相を用いる順相分配クロマトグラフィー**と、**極性の低い固定相を用いる逆相分配クロマトグラフィー**がある。固定相として用いられる充填剤として、順相分配クロマトグラフィーはシリカゲルに吸着した水、逆相分配クロマトグラフィーではシリカゲルにアルキル基などを化学結合させた**オクタデシルシリル（ＯＤＳ）化シリカゲル**が用いられる。

・ＯＤＳ固定相の吸着機構



・ＯＤＳ固定相の分離機構



３）　イオン交換クロマトグラフィー

イオン交換クロマトグラフィーは、イオン交換樹脂を固定相として用いて、試料中のイオン種成分を分離する方法である。イオン交換樹脂に、**スルホン酸やカルボン酸のような陰イオン性官能基**が導入されているものは、**陽イオン交換樹脂**と呼び、**四級アンモニウムのような陽イオン性官能基**が導入されているものは、**陰イオン交換樹脂**と呼ぶ。

（１）イオン交換樹脂への選択性（吸着性）

① **電荷が大きいイオンほど選択性（吸着性）は大きくなる。**

例：$Na^{+} < Ca^{2+} < Al^{3+}$

② **価数が同じイオンの場合、原子番号が大きいほど選択性（吸着性）は大きくなる。**

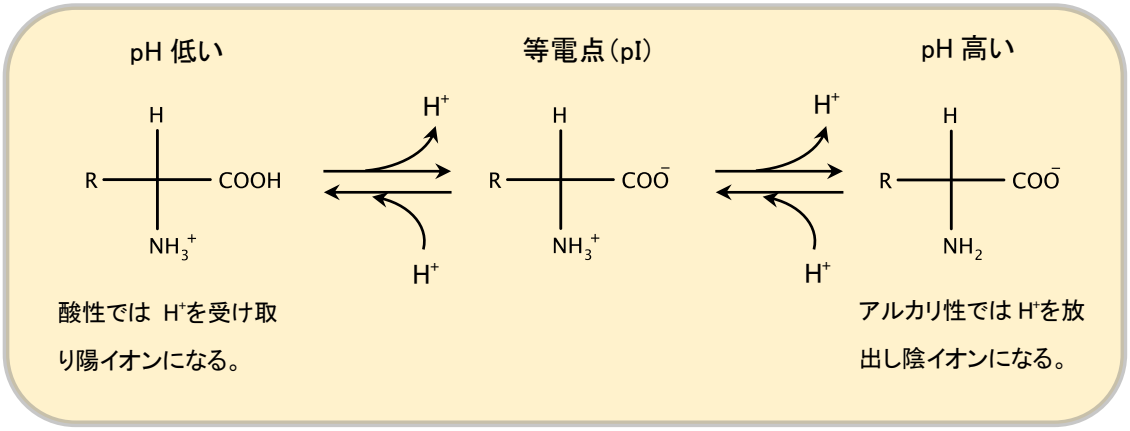
例：$Li^{+} < Na^{+} < K^{+} < Rb^{+}$

$Mg^{2+} < Ca^{2+} < Sr^{2+} < Ba^{2+}$

（２）アミノ酸混合物の分離

① **アミノ酸の性質**

アミノ酸は両性化合物と呼ばれ、pH の変化により、電荷が変化する。**等電点（pI）より酸性側では陽イオン、アルカリ性側では陰イオンとなる。**



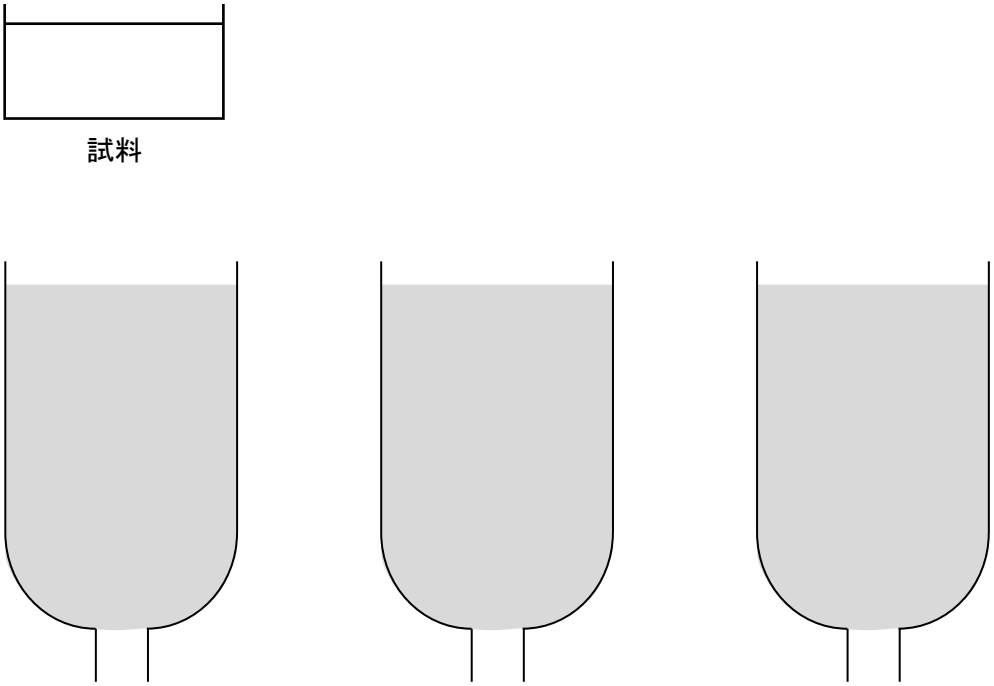
② アミノ酸の等電点と pH 変化による電荷

	2.77～3.22 （約 3.0）		5.07～6.30 （約 6.0）		7.59～10.76 （約 9.0）
酸性アミノ酸	＋	0	−		
中性アミノ酸	＋		0	−	
塩基性アミノ酸	＋			0	−

③ アミノ酸混合物の分離機構

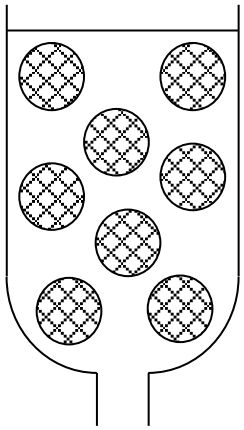
・陽イオン交換体を用いた場合（固定相は⊖）

pH の低い溶液中では、アミノ酸は陽イオンとなるため固定相に結合している。徐々に**移動相の pH を上げていく**と、アミノ酸は等電点と同じ pH で電荷を失い、**等電点の低いアミノ酸から順に溶出する**。



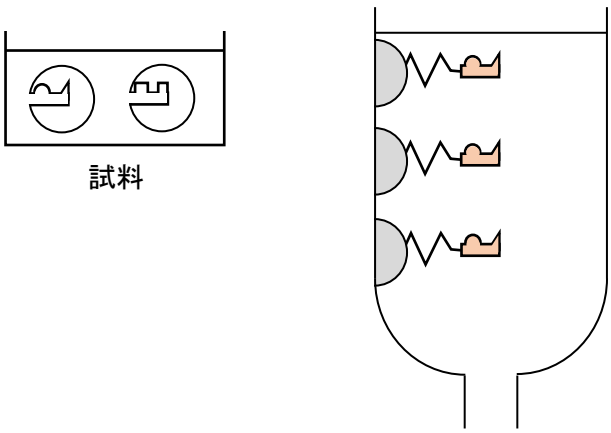
４）　サイズ排除クロマトグラフィー　（ゲルクロマトグラフィー ）

サイズ排除クロマトグラフィーは、網目構造の細孔を有するシリカゲルやポリマーを用い、**分子ふるい効果**を利用してタンパク質や核酸などの生体試料を分子の大きさによって分離する方法である。**分子量の大きい物質ほど**、ゲルの網目に入りにくく**先に溶出する**。一方、**分子量の小さい物質**ほど入りやすく**遅く溶出する**。



５）　アフィティークロマトグラフィー

アフィティークロマトグラフィーは、目的物質と**生物学的親和性（アフィティー）を有する物質（リガンド）**を固定相とし、抗原と抗体、酵素と基質、酵素と阻害剤などの生物学的親和性によって結合する物質間の相互作用を利用した分離法である。

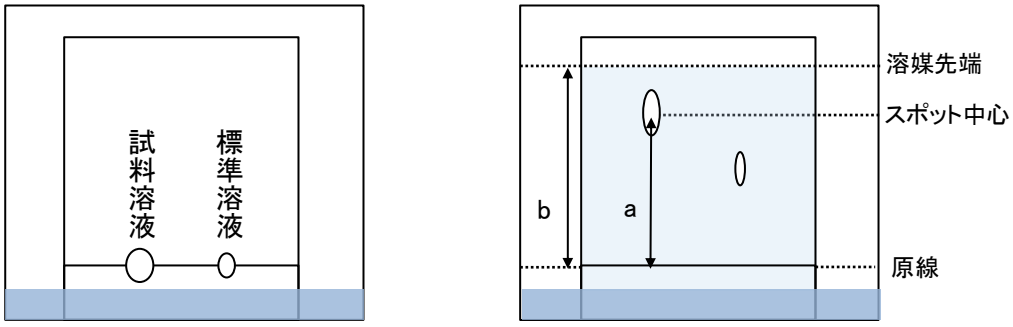


６）　薄層クロマトグラフィー（TLC）

薄層クロマトグラフィーは、ガラス板やアルミニウムの上にシリカゲルなどの担体を薄く貼ったプレート（薄層）を用いて行う分離法である。

	順相型	逆相型
固定相	シリカゲル、アルミナ、セルロースなど	アルキルシリル化されたシリカゲル
移動相	液体	

＜シリカゲルを固定相とする薄層クロマトグラフィー＞



$$R_f\text{値} = \frac{\text{原線からスポットの中心までの距離}}{\text{原線から溶媒先端までの距離}} = \frac{a}{b}$$

※R_f値は、変動しやすいので通常、同じ薄層板上にスポットした標準物質と比較する。

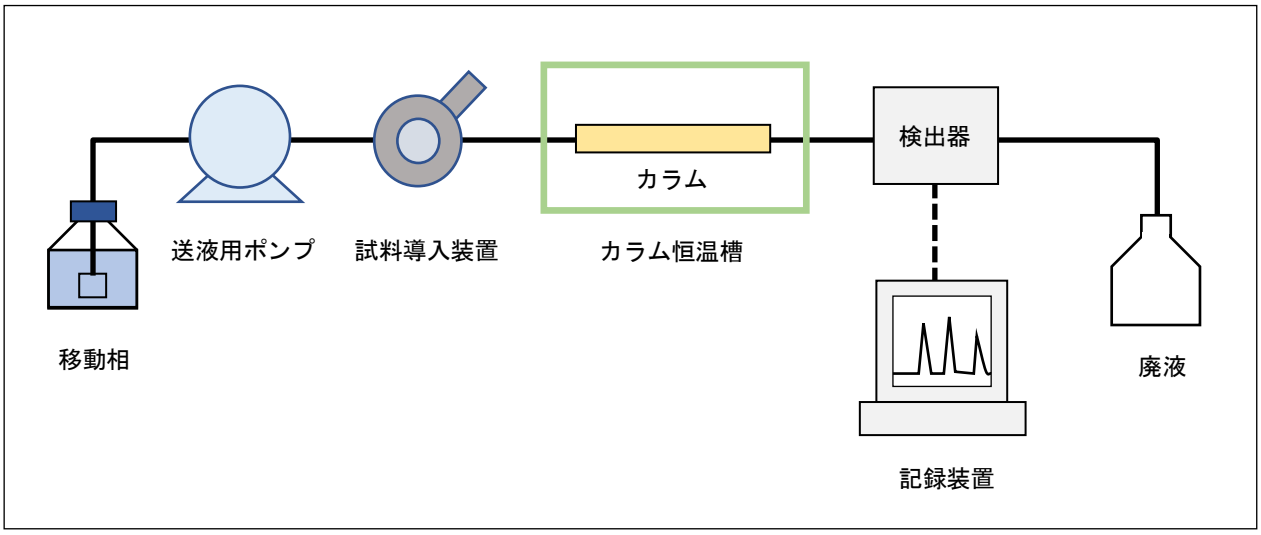
R_f値の最大値は１、最小値は０である。

4　液体クロマトグラフィー（LC）

1）　概要

液体クロマトグラフィーは、適当な固定相を用いて作られたカラムに試料を注入し、**移動相として液体**を用い、固定相と移動相の相互作用（吸着、分配、イオン交換、サイズ排除など）の差を利用してそれぞれの成分に分離し、分析する方法である。液体または溶媒に溶解できる物質なら測定が可能である。

2）　装置



① カラム

固定相の違いにより、**吸着型、分配型、イオン交換型、サイズ排除型、アフィニティー型**のカラムを用いることができる。

② カラム恒温槽

カラム温度は分離、保持時間に影響を与えるため、カラム恒温槽により、**温度を一定に保つ。**

③ 検出器

紫外可視吸光光度計、蛍光光度計、電気化学検出器、質量分析計（LC–MS）など様々な検出器が用いられる。

３）　アミノ酸のラベル化（誘導体化）

一般的にアミノ酸の分析には HPLC（高速液体クロマトグラフィー ）が用いられる。ほとんどのアミノ酸はそのままでは紫外線や可視光線による検出ができないため、ラベル化（誘導体化）を行う必要がある。ラベル化法には、**プレラベル法（プレカラム法）**と**ポストラベル法（ポストカラム法）**があり、以下はそれぞれの誘導体化法の特徴である。

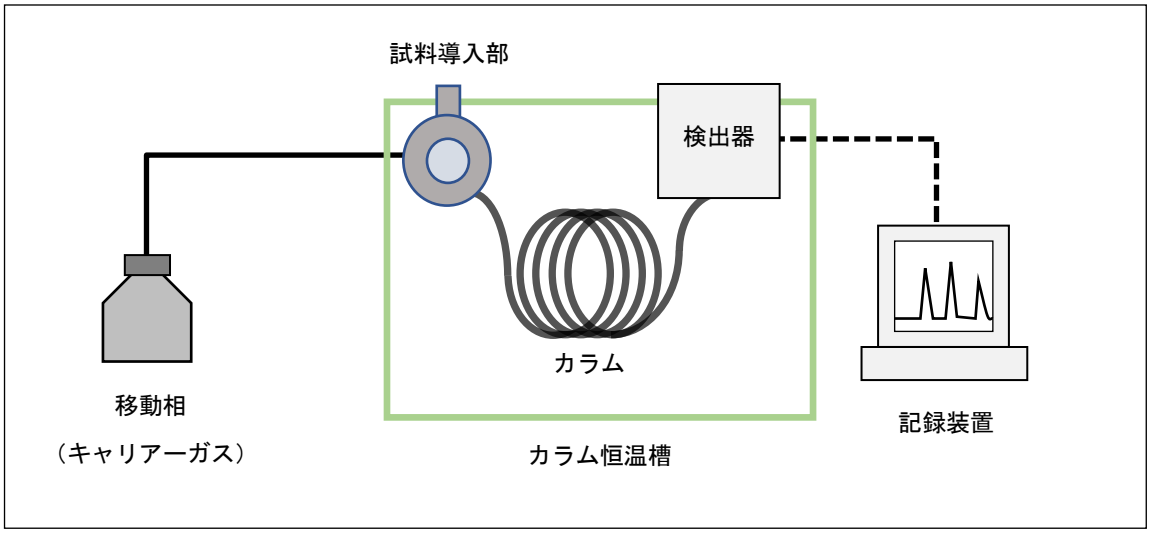
	プレラベル法（プレカラム法）	**ポストラベル法（ポストカラム法）**
方法	**カラムの前に**ラベル化試薬を注入	**カラムの後に**ラベル化試薬を注入
試薬	ダンシルクロリド フェニルチオヒダントイン	**ニンヒドリン（可視部検出）** **オルトフタルアルデヒド（蛍光検出）**
試薬の量	少ない	多い
反応条件	**長時間の誘導体化**でも分析可能	**短時間の誘導体化**のみ
構造	分析対象物質**固有の誘導体化**のみ	１つの分析対象物から**複数の誘導体化**が生成しても分析可能

5　ガスクロマトグラフィー（GC）

1）　概要

ガスクロマトグラフィーは、適当な固定相を用いて作られたカラムに試料を注入し、**移動相として気体**を用い、固定相と移動相の相互作用（吸着、分配）の差を利用してそれぞれの成分に分離し、分析する方法である。気体または気化できる物質なら測定が可能である。

2）　装置



①　移動相（キャリアーガス）

キャリアーガスには、**窒素、水素、アルゴン、ヘリウム**などが用いられる。不活性なガスなため、**移動相の種類によって試料成分の溶出順序が変化することはない。**

また、移動相が気体であるため、**固定相との吸着・分配平衡に達する時間が短く、高い分離能が得られる。**

②　試料導入部

揮発性の低い物質や熱安定性の低い物質は**トリメチルシリル化**などの誘導体化を行い、熱安定性を高めてから試料として導入する。

③　カラム

固定相の違いにより、**吸着型（気–固クロマトグラフィー）、分配型（気–液クロマトグラフィー）**のカラムを用いることができる。また、ガラス製の内径 2～4 mm の管の中に充填剤を詰めた充填カラムと、フューズドシリカ製の内径 1 mm 以下の管の内面に液相や充填剤を保持させた**キャピラリーカラム**がある。

④　カラム恒温槽

分離を効率的に行うためにカラム温度を**一定速度で上昇させる**ことがある。

⑤ 検出器

ガスクロマトグラフィーに利用される検出器は以下の通りである。

検　出　器	特　　徴
熱伝導度検出器（TCD）	水素、ヘリウムのような熱伝導度の大きいキャリアーガスを用いる。**有機物及び無機物**の検出に利用される
水素炎イオン化検出器（FID）	窒素、ヘリウムなどのキャリアーガスを用いる。**C－H 結合を有する有機物**の検出に利用される
電子捕獲検出器（ECD）	窒素、ヘリウムなどのキャリアーガスを用いる。^{3}H（トリチウム）、^{63}Ni から出たβ線を利用してイオン化を行う検出法である。**有機ハロゲン化物**などの検出に利用される。
炎光光度検出器（FPD）	窒素をキャリアーガスとして用いる。**イオウ及びリン化合物**などの検出に利用される。
アルカリ熱イオン化検出器（FTD）	窒素、ヘリウムなどのキャリアーガスを用いる。**含窒素、含リン化合物**などの検出に利用される。
質量分析計（GC–MS）	微量成分の分子量の測定に利用される。

ガスクロ検出器「エンジンストップ電波と水のみあるピクニック」
エン：炎光光度検出器、ス：S、プ：P、電：電子捕獲検出器、波：ハロゲン
水：水素炎イオン化検出器、のみ：有機物のみ
ある：アルカリ熱イオン化検出器、ピクニック：P、N
※熱伝導度検出器は有機物も無機物も OK！！

6　クロマトグラム

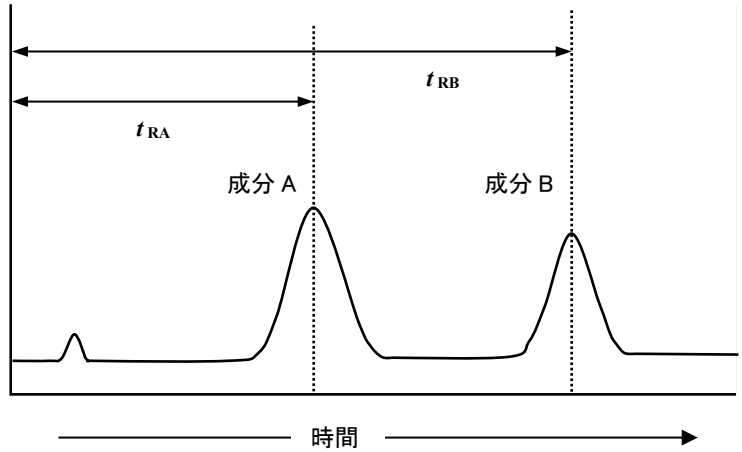
1）　概要

クロマトグラフィーによる分離の結果を図で表したものをクロマトグラムと呼ぶ。クロマトグラムの結果から、定性や定量を行う。

2）　指標

（1）保持時間（t_R）：試料注入時からピーク頂点までの時間

保持時間は、カラム温度、移動相の種類、カラムの長さなどの影響を受け、これらの条件を一定に保つことで**物質に固有の値**となる。よって、保持時間は**物質の確認**に利用される。

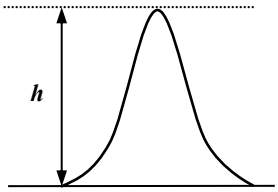


（2）ピーク測定法

ピークの大きさは成分量に比例することを利用して**定量**を行うことができる。ピーク測定法には、**ピーク高さ測定法**と**ピーク面積測定法**がある。

① ピーク高さ測定法

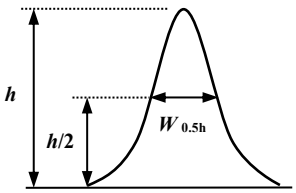
ピーク高さ（h）…ピークの頂点からピークの底辺までの長さ



② ピーク面積測定法

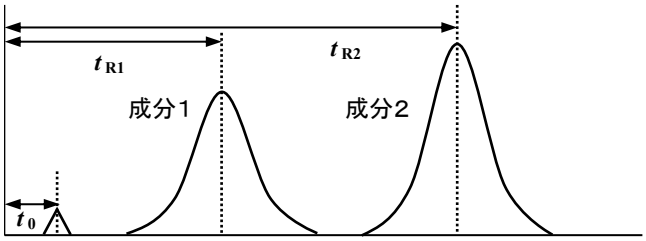
半値幅法…ピーク高さの中点におけるピーク幅にピークの高さを乗じて面積を求める。

ピーク面積＝$h \times W_{0.5h}$



（３）分離係数（α）：ピーク相互の保持時間の関係を表す。

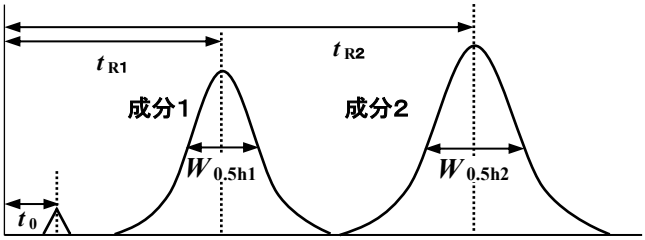
$$\alpha = \frac{t_{R2} - t_0}{t_{R1} - t_0}$$



同一条件において、２つの化合物の保持時間が同じ場合、α＝1 となる。

（４）分離度（R_s）：ピーク相互の保持時間とピーク幅の関係を表す。

$$R_s = 1.18 \times \frac{t_{R2} - t_{R1}}{W_{0.5h1} + W_{0.5h2}}$$

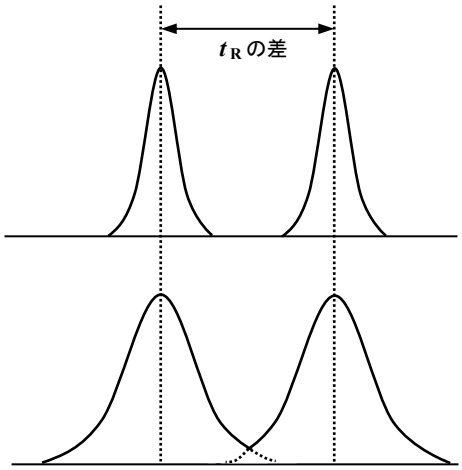


同一条件において、２つの化合物の保持時間が同じ場合、R_s＝0 となる。
また、日本薬局方では、R_s 値が 1.5 以上の場合、２つのピークは**完全に分離している**とみなされる。

保持時間の差が同一の場合の分離について

それぞれの物質の**ピークが鋭いほど分離度は大きくなる。**

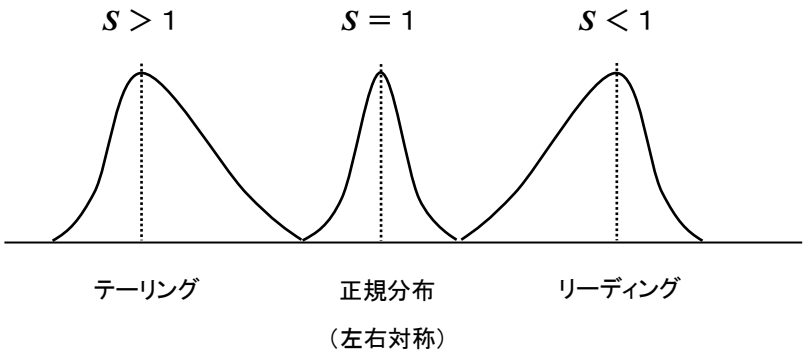
ピークは鋭く完全に分離している



ピークは緩やかで分離していない

（５）シンメトリー係数（S）：ピークの対称性の度合いを表す。

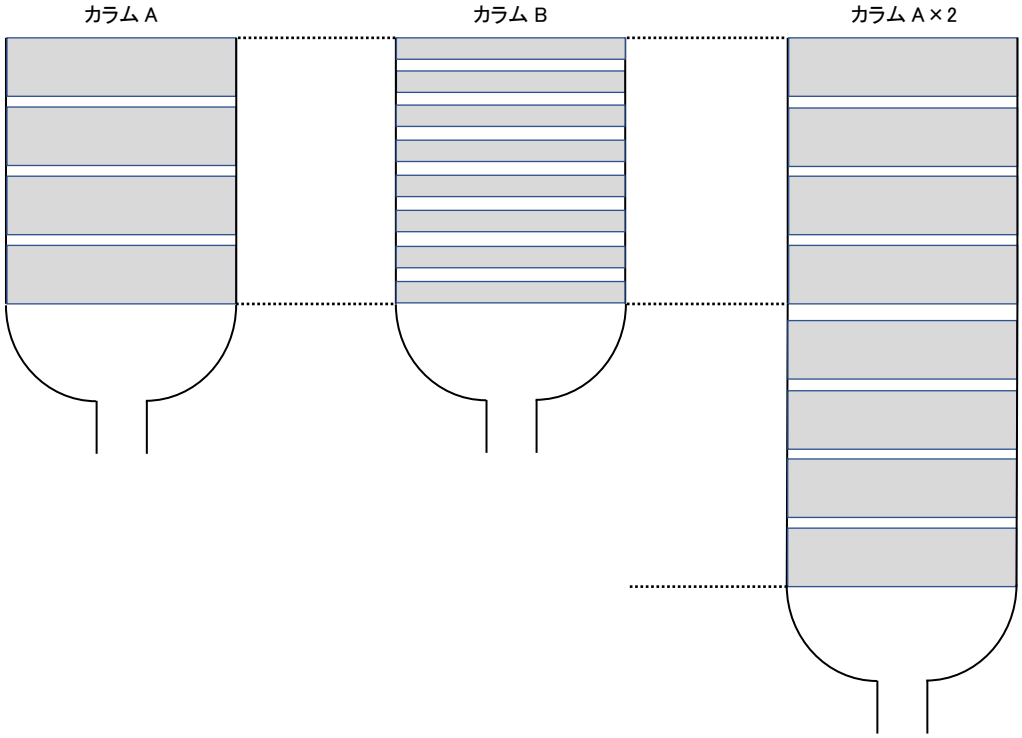
$$S = \frac{W_{0.05h}}{2f}$$



（６）理論段数（N）：カラム中における物質のバンドの広がりの度合い（カラム効率）を表す。

$$N = 5.54 \times \frac{t_R^2}{W_{0.5h}^2}$$

【カラムの模式図】



（７）質量分布比（k）：カラムに注入された成分が移動相と固定相にどれぐらいの割合で分布するのかを表す。

$$k = \frac{\text{固定相に存在する物質の量}}{\text{移動相に存在する物質の量}} = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

k は同一条件下（カラムの充填剤、温度、流速、移動相の種類）において物質に固有の値となる。また、k の値が大きいほど試料の固定相への親和性が高く、移動速度が遅い。k の値が小さいほど、試料の固定相への親和性が低く、移動速度が速い。

7　定量法

1）　概要

試料中の目的物質の量を、濃度既知の標準被検試料を用いて作成した検量線から求める方法。定量法には、**絶対検量線法、内標準法、標準添加法**がある。

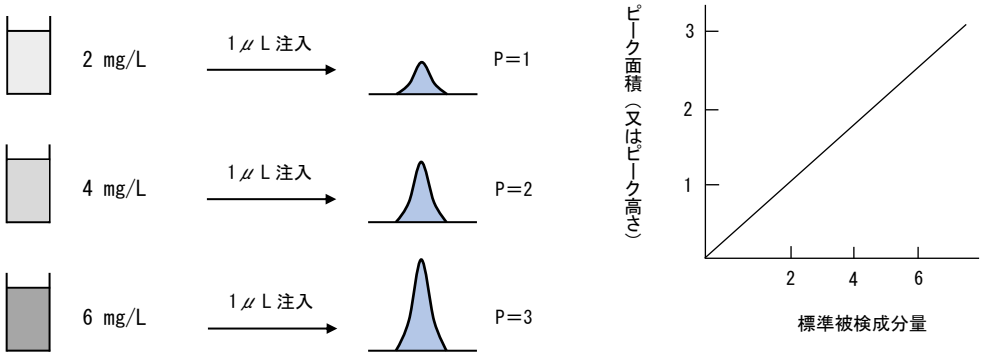
定量は通例、**内標準法**によるが、適当な内標準物質が得られない場合は**絶対検量線法**による。定量結果に対して被検成分以外の成分の影響が無視できない場合は**標準添加法**による。

なお、液体クロマトグラフィーにおいて標準添加法は適用されない。

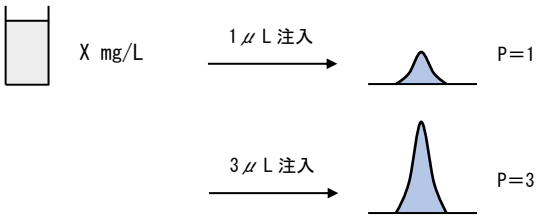
（1）　絶対検量線法

濃度既知の標準被検試料を濃度が段階的になるように調製し、この一定量ずつを正確に再現性良く注入する。得られたクロマトグラムから縦軸に標準被検成分の**ピーク面積又はピーク高さ**、横軸に標準被検成分量をとり、検量線を作成する。この検量線を用いて同一の条件で測定を行い、被検成分量を求める。また、操作条件により、ピーク面積又はピーク高さの値は変化するため、絶対検量線法では**操作条件は厳密に一定になるように行う。**

①　濃度既知の標準被検成分を用いた検量線の作成



②　作成した検量線を用いて被検成分量を求める

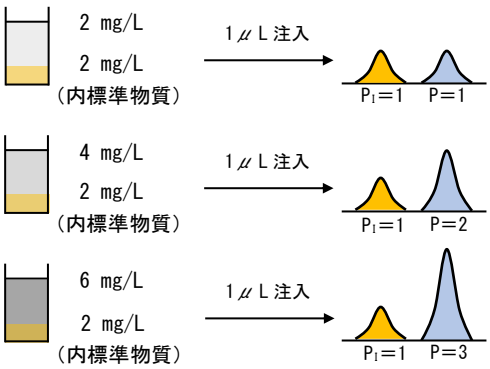


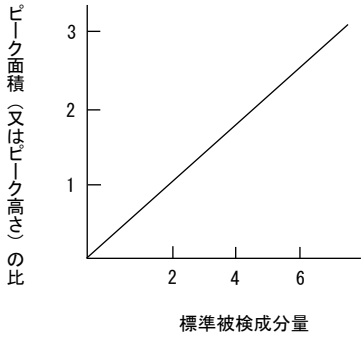
（２） 内標準法

内標準法は、一定量の内標準物質に対して濃度既知の標準被検試料を濃度が段階的になるように調製し、この一定量ずつを正確に再現性良く注入する。得られたクロマトグラムから縦軸に内標準物質と標準被検成分の**ピーク面積の比（又はピーク高さの比）**、横軸に標準被検成分量をとり、検量線を作成する。この検量線を用いて同一の条件で測定を行い、被検成分量を求める。また、ピーク面積又はピーク高さの比を用いて定量を行うため、内標準法では**試料の注入操作は厳密に行う必要はない。**

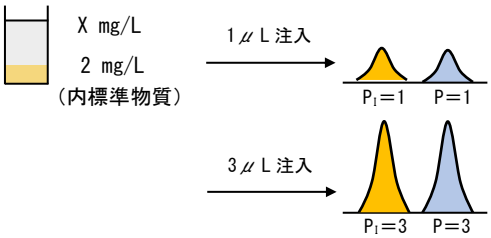
※内標準物質は、**被検成分になるべく近い保持時間を持ち、いずれのピークとも完全に分離する安定な物質**を用いる。

①　濃度既知の標準被検成分と内標準物質を用いた検量線の作成





②　作成した検量線を用いて被検成分量を求める

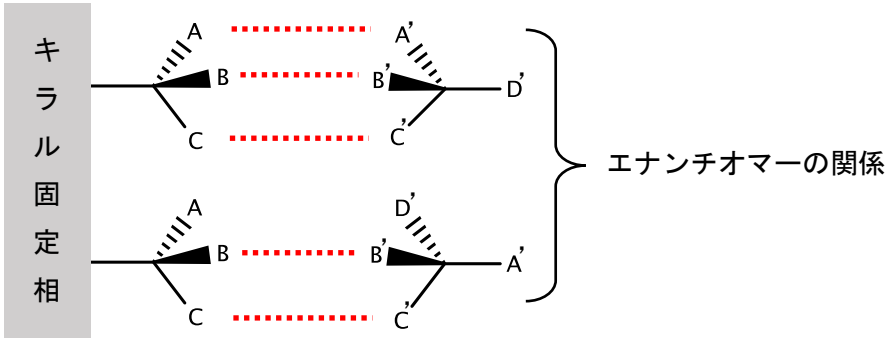


8　光学異性体の分離（光学分離）

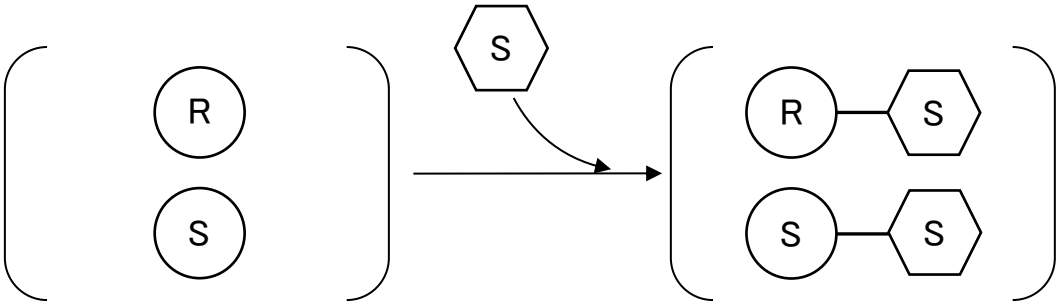
光学活性な生理活性物質や医薬品は、光学異性体間で生理活性や薬効の強さなどが異なるため、光学異性体の分離（光学分離）が必要となる。液体クロマトグラフィーによる光学分離法には**キラル固定相法、キラル移動相法、ジアステレオマー誘導体化法**がある。

光学分離法	方法
キラル固定相法	キラル固定相法は、**キラルセレクター**と呼ばれる光学活性化合物を固定化したキラルカラムを用いて、光学異性体を直接分割する方法である。 キラルセレクターには、**多糖類**や**タンパク質**、**シクロデキストリン**、**キラルクラウンエーテル**などが用いられる。
キラル移動相法	キラル移動相法は、移動相に添加したキラルセレクターと試料の複合体形成能の違いから学異性体を分離する方法である。
ジアステレオマー誘導体化法	ジアステレオマー誘導体化法は、キラル誘導体化試薬とよばれる光学活性物質を試料と反応させることで、試料を**ジアステレオマーに誘導体化**し、エナンチオマーの分離を行う方法である。ジアステレオマー間では物理化学的性質が異なるため、**通常の分配クロマトグラフィーで分離**することができる。

・キラル固定相法の分離の原理



・ジアステレオマー誘導体化法の分離の原理



エナンチオマーの関係（性質が同じ）　　ジアステレオマーの関係（性質が異なる）