

クロマトグラフィーのはなし

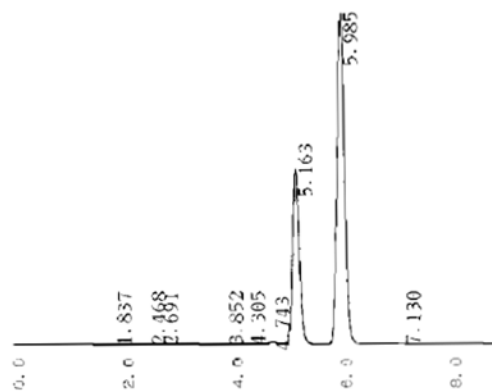
2014.6.5

内容

クロマトグラフィーのはなし.....	1
★クロマトグラフィーというもの.....	1
★多数回の分離操作の組み合わせによる分離.....	1
★クロマトグラフィーにおける分離のモデル.....	3
★保持容量・保持時間と理論段数.....	3
★物質輸送と分離モデルから見えるもの.....	4
問題.....	6

★クロマトグラフィーというもの

移動相（気体や液体）と固定相（液体・固体）の間の分配を利用する分析手法を、クロマトグラフィー chromatography と呼ぶ。移動相中の流れによる物質輸送の間に、固定相との間の分配が生じることで、物質それぞれの個性に応じて輸送速度が低減され、分離が実現される。クロマトグラフィーとよく似た言葉にクロマトグラフ chromatograph、クロマトグラム chromatogram という言葉がある。クロマトグラフはクロマトグラフィーのための装置を指し（「クロマトグラフ装置」といった呼び方がされることもある）、クロマトグラムは、クロマトグラフィーの結果の図あるいは画像のことである。



高速液体クロマトグラム。ナフタレンとビフェニルの分離。（カラムは ODS。溶離液は 90%メタノール。260 nm の光吸収）

専用の機器や器具がなくとも容易に行うことができるペーパークロマトグラフィーを始め、種々のクロマトグラフィーが知られているが、大きく移動相が気体のガスクロマトグラフィー（ガスクロ、GC）と、移動相が液体の液体クロマトグラフィー（液クロ、LC）とに分けることができる。クロマトグラフィーは物質を分取するのにも用いられるが、多量の物質（およそ数 g 以上）を扱うのには不向きで、分析手法として用いられることが多い。液体クロマトグラフィーの中でも、工夫を凝らし分離効率を飛躍的に向上させたものは、高速液体クロマトグラフィー（High Performance Liquid Chromatography HPLC）と呼ばれる。ここでは液体クロマトグラフィー、特に HPLC を中心にその原理的な側面を中心に述べよう。

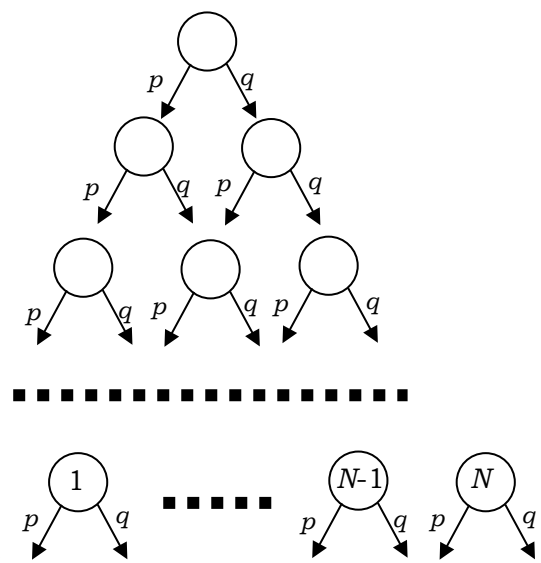
★多数回の分離操作の組み合わせによる分離

1 回ずつの分離度は悪くとも、多数回繰り返すことで高い分離度を実現することができる。

溶媒 S に溶け込んだ微量成分 A と B を結晶化操作で分離することを考えてみよう。最初溶液に A と B が等量 m だけ存在するとし、溶液がちょうど半分固化した時、固相中に A は $p_A m$ 、B は $p_B m$ だけ分配されるものとする ($p_A > p_B$)。この操作で得られた固相を取り出して溶媒 S を同量加え、再び半分固化させると、固相中に A は $p_A^2 m$ 、B は $p_B^2 m$ 分配される。この操作を N 回繰り返せば、固相中の A と B の存在量は $p_A^N m$ 、B は $p_B^N m$ となる。A と B の組成

比は p_A^N/p_B^N で $p_A/p_B = 2$ であれば、この操作を 10 回繰り返すことで B の量は A のほぼ千分の 1 になり A と B の分離はほぼ達成できる。しかしかりに $p_A = 0.8$ であったとすると A の量は最初の量の約 1/10、 $p_A = 0.4$ であったら 1/10000 になってしまう。

この一連の操作では、固化した際に残る溶液を利用しなかったわけだが、溶液も利用することを考えよう。固化した際残った溶液には A が $(1 - p_A)m = q_A m$ 、B が $q_B m$ 存在している ($q = 1 - p$ とする)。ここに同量の溶媒 S を加えて半分固化させれば、できた固相には A が $p_A q_A m$ 、B が $p_B q_B m$ 存在することになる。ところで最初に取り出した固相に同量の溶媒 S を加えて溶解させ半分固化させれば、そこで残った溶液にも同じく A が $p_A q_A m$ 、B が $p_B q_B m$ 存在する。こうして固→液で分離した A と B の組成比は先に液→固で分離した A と B の組成比と同じなので一つにまとめてしまう。するとここまでの操作で、A と B の組成比が p_A^2/p_B^2 、 $p_A q_A/p_B q_B$ 、 q_A^2/q_B^2 の 3 つの分画が 1 : 2 : 1 の量比で得られたことになる。



この一連の操作を右図のように繰り返したとする。この時 N 回目の操作で得た $N+1$ 種の溶液の溶液に順次 0, 1, 2, ..., N と番号を付けると、それぞれに含まれる A の量は二項分布に従い i 番目の溶液には

$${}^N C_i p_A^i q_A^{N-i} m$$

の A が入っていることになる。B についても同様に i 番目の溶液中の A と B の組成比は

$$[q_A^N/q_B^N] [(p_A/q_A)/(p_B/q_B)]^i = [q_A^N/q_B^N] \alpha^i$$

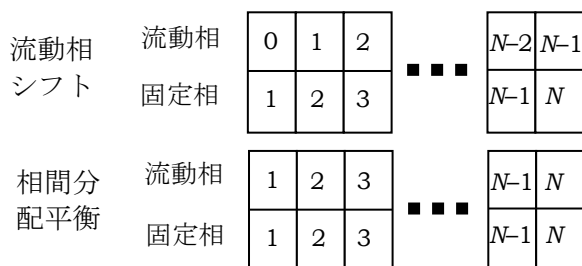
で与えられる。ここで $\alpha = (p_A/q_A)/(p_B/q_B)$ を分離係数と呼び、各分画間の A と B の組成のちがいを表すパラメータである。

十分 N が大きければ分布は平均 Np 、分散 Npq の正規分布と見なせる (中心極限定理)。仮に $p_A = 0.2$ 、 $p_B = 0.3$ であるとし、 $N = 100$ であるなら、 $16 \leq i \leq 24$ をとれば A が、 $26 \leq i \leq 34$ をとれば B がそれぞれ元の量の 7 割程度が入っており、A と B はほぼ分離できたことになっている。こうした手法はほぼそのままの形で (古典的な) 分別結晶法に使用されており、蒸留やクロマトグラフィーにも通じる。

分離操作の回数 N を蒸留塔との類推から段数と呼び、こうした逐次的な分配操作との類推で分離操作をモデル化して語るとき N を理論段数 **theoretical plate** と呼ぶ。分離度として A と B のピークとなる分画番号のちがい $Np_B - Np_A$ を、B の標準偏差 $\sqrt{Np_B q_B}$ (A でも構わない。B あるいは A の含まれる分画範囲の大きさ) で割ったものをとれば、分離度は \sqrt{N} に比例して大きくなる。 N を 100 倍にすると分離度は 10 倍になる。

★クロマトグラフィーにおける分離のモデル

クロマトグラフのカラムの中での物質分離過程を右図のように、 N 個の流動相と固定相を含むセル間の分離ステップでモデル化することを考える。各分離ステップは i 番目のセルから $i+1$ 番目のセルへの流動相のシフト、それに引き続く各セル内での分配平衡の実現からなる。流動相のシフトでは新たな溶媒が左から供給され、 N 番目のセルの流動相が外部に放出される。また平衡化した時、固定相と流動相の間で、注目する物質 X は $p:q$ の比で分配されるものとする ($p+q=1, p \gg q$)。



この分離プロセスで m 回目のステップ後における i 番目のセル中の X の量を $a(i, m)$ とすると次の関係が成立する

$$a(i, m+1) = p a(i, m) + q a(i-1, m)$$

この関係は先の分別結晶で見たのと同じものであり、最初 1 番のセルのみに物質 X が存在していたものとする、 m 回目のステップ後における i 番目のセル中の X の分布は二項分布

$$a(i, m) = {}_m C_i p^{m-i} q^i$$

で与えられる。十分 m, N が大きく $m < N$ であれば、各セルへの物質 X の分布は平均 mq 、分散 $mpq \approx mq$ の正規分布に従うと見なせる。

クロマトグラフィーでは、ペーパークロマトグラフィーや薄層クロマトグラフィーのように、ある時間後（ある一定分離ステップ後）の固定相中の物質分布に注目することもあるが、固定相中のある地点（多くの場合カラムの終端）を通過する物質の量の変化に注目することの方が多。これは上記のモデルで分離ステップの回数 m がセルの数 N より大きく ($m > N$)、 N 番目のセルから m ステップ目に外部に放出される X の物質量 $f(m) = qa(N, m)$ に注目することに相当する。分布 $a(i, m)$ が平均 mq 、分散 mq の正規分布に従うから $f(m)$ は C を定数として

$$f(m) = C \exp\left[-\frac{(N-mq)^2}{2mq}\right]$$

と書ける。さて分離ステップの回数 m による X の流出量の変化に注目すると、 m はもっぱら N/q 近傍の値を取るので上式は次のように書ける：

$$f(m) = C \exp\left[-\frac{(m-N/q)^2}{2m/q}\right] \approx C \exp\left[-\frac{(m-N/q)^2}{2N/q^2}\right]$$

つまり $f(m)$ は平均 N/q 、分散 N/q^2 の正規分布に従うと見なすことができる。

★保持容量・保持時間と理論段数

一般に行われるカラムクロマトグラフィーでは、流体を流している分離カラムに試料を注入してからの経過時間と流出液中の試料濃度を測定する。この経過時間を保持時間 **retention time**、それまでに流れた液体の体積を保持容量 **retention volume** と呼ぶ。先のモデルと対

応付けて考えると、分離操作の1ステップに要する時間は1つのセルを流体が通過する時間 t_c に対応し、保持時間 t_R と流出までの分離ステップの回数 m には

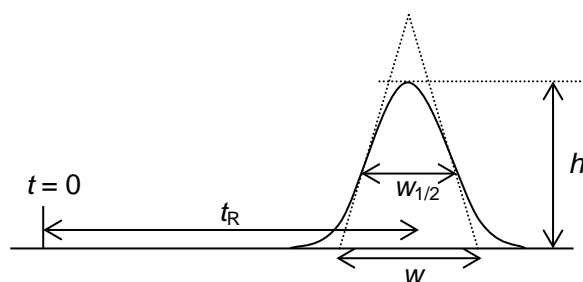
$$t_R = m t_c$$

の関係が成立すると考えてよい (実際の測定値には、カラム以外の配管部分等を通る時間も加味されるがここでは無視する)。したがって先のモデルに基づけば、保持時間と試料濃度の関係は正規分布に従うはずで、ピーク位置と形状から保持時間の平均・分散がわかれば

$$\langle t_R \rangle = \langle m \rangle t_c = (N/q) t_c$$

$$\langle \langle t_R^2 \rangle \rangle = \langle \langle m^2 \rangle \rangle t_c^2 = (N/q^2) t_c^2$$

の関係から、分離カラムを特徴づけるパラメータである理論段数 N を決めることができる。よく使われるのは図に示すピークの半値幅 $w_{1/2}$ を用いる計算法だが、それ以外にもピーク巾 w を使う方法、ピークの高さ h とピーク面積 A を求める手法があり、次のような関係が成立する：



$$N = 5.54 \left(\frac{t_R}{w_{1/2}} \right)^2 = 16 \left(\frac{t_R}{w} \right)^2 = 2\pi \left(\frac{h \times t_R}{A} \right)^2$$

ピークの形状が正規分布に従っておれば、どの計算でも同じ結果になるはずだが、実際のピークの形状は必ずしも正規分布に従わず、必ずしも同じにはならない。そもそもこうした計算は、分離過程のモデル化の妥当性に依存しており、理論段数はその分離カラムの実効的な性能のパラメータと考えた方がよい。理論段数は物質の分取に用いられるようなカラムクロマトグラフィーではおよそ数十～数百程度だが、HPLC は数千～数万とけた違いの性能を示す。

★物質輸送と分離モデルから見えるもの

先の単純な分離モデルに照らして、移動相の流速 u が分離の効率にどのように影響するかを考えてみよう。

理論段1段分を実現するのに必要なカラムの長さ (カラムの全長を理論段数で割ったもの) を理論段相当長さ (Height Equivalent to a Theoretical Plate (HETP)) と呼ぶ (段高 plate height と呼ぶこともある)。高速液体クロマトグラフィーで用いられるカラムでは、たいていの場合およそ粒径 $5 \mu\text{m}$ 程度の粒子が詰め込まれていると考えてよく、HETPはおよそ $10 \mu\text{m}$ 程度と評価できる。

ここで先のモデルが妥当するには、移動相がセルを通過する時間 t_c が、分離しようとする物質 X がセル間を拡散する時間より短い必要がある。 X の拡散係数を D とすると $(\text{HETP})^2/D > t_c = \text{HETP}/u$ より

$$u > D/\text{HETP}$$

ということになる。拡散係数 D はおおむね $10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ 程度なので、HETP が $10 \mu\text{m}$ 程度なら、流速は 10^{-4} m/s 程度以上は必要である。

さてこの条件が十分満たされるものとするれば、以前見た管中の流れの中での Taylor 分散の条件が整うことになる。時間 t_c 後の Taylor 分散にともなう濃度分布の広がりを L とすると、流路の典型的な幅を a として $L^2 \sim t_c (au)^2/D = \text{HETP} \times a^2 u/D$ で評価できる。この L が HETP より小さい必要があるので、

$$u < \text{HETP} \times D/a^2$$

もし a が HETP の 1/10 程度であるなら、流速は 10^{-2} m/s 程度以下である必要がある。

このように期待される性能を出すには、流速は速すぎても遅すぎてもよくない。この事情を表したのがカラムに詰めた粒子の粒径 d と流速 u と HETP の関係を与える次の (簡易化) van Deemter の式と考えてよい*。

$$\text{HETP} = Ad + \frac{B}{u} + C d^2 u$$

ここから粒径の小さい粒子を使えば、HETP は小さくなって同じ長さのカラムなら理論段数がより大きくなって分離性能が上がり、流速を大きくしても HETP への影響が小さいので時間短縮も可能ということになる。実際たとえばカラムクロマトより薄層クロマトの方が、細かい粒径のシリカやアルミナを利用できるので一般に分離はよい。しかし Kozeny-Carman の式から、同じ流速を得るには粒径の 2 乗に逆比例して大きな圧力を必要とすることになる。現在の標準的な HPLC 装置では数十 MPa までの加圧が可能である。それをさらに高くすることは技術的には可能でも、今度はそうした応力がかかったときに、充填粒子が破壊されるという問題が起きてくる。こうした問題と向き合いながらさまざまな努力の末、1980 年代ごろ HPLC 技術が実用化し、今日広く普及している。さらなる高みを目指した探求は今も続いている。

* 元の van Deemter の式には Taylor 分散などより手の込んだ分散機構が組み込まれ、進んだ取り扱いがされているが、ここでは単純化して考える。

問題

実験番号 _____

氏名 _____

☆イオン交換樹脂を 10 cm 詰めたカラムで希土類の陽イオンの分離実験を行ったところ、全量 50 mL の溶離液を流したところで Y イオンが出始め、全量 70 mL 程度流したところでほぼ完全に Y イオンの溶離が完了した。イオン交換樹脂の分量を 2 倍にしてイオン交換樹脂を 20 cm 詰めたカラムで同じ実験を行ったら、Y イオンが出始める容量、溶離が完了する容量はそれぞれ何 mL になると予想されるか。イオン交換樹脂カラムを浸すのに必要な液量(死容積)は無視するものとする。