

クロマトグラフィー充填剤

(1903年～現在)

クロマトグラフィーは、気体や液体の構成成分を分離分析する手法であり、製薬、食品、石油化学、化粧品 などにおける有効成分の研究開発、水や大気における環境汚染物質の分析、作物残留農薬の分析などに広く使われている。

シリカゲル、ケイソウ土などの多孔性無機材料に種々の有機化合物を塗布または化学結合した粒子や天然ゼオライト粒子などのケイ素含有セラミックス材料がクロマトグラフィー充填剤として用いられている。

化学成分種の増大に応じて、それら充填剤は、多種多様な形に変化しながら、時代と共に進歩してきている。

＜クロマトグラフィーとは＞

1903年に、ロシアの植物学者ツヴェット (Mikhail S. Tswett) が、植物色素を分離したことから、¹⁾ギリシャ語の色 (Chroma) と記録 (Graphin) からクロマトグラフィー (Chromatography) と命名された。試料を溶出液 (移動相) によって、充填剤を詰めたカラムに導入し、成分と充填剤との相互作用^{※1)}の強さの差によって、化学成分毎に分離する手法である。

カラムクロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィー、液体クロマトグラフィーなど、分離目的に応じた種々の方法があり、それに対応する様々なクロマトグラフィー充填剤が市販されている。実際の分析には、図1に示すような装置が用いられ、移動相として、気体を用いる場合がガスクロマトグラフ、液体を用いる場合が液体クロマトグラフとなる。

＜カラムクロマトグラフィー＞

筒状のガラスカラムや樹脂製カラムに充填剤を詰め、試料溶液をカラム上部に添加し、自然落下、加圧、吸引などで移動相溶媒を順次流す事により、成分を分離する手法である。特に、ポリプロピレン樹脂製カラムに破碎状シリカゲルなどの充填剤を詰めた固相抽出カラム (図2) は、装置が必要なく吸引やシリンジでの加圧だけでも使用できるので、環境分析、生体中薬物分析や食品分析などにおける前処理^{※2)}として、現在広く使われている。

＜ガスクロマトグラフィー＞

ヘリウムガスや窒素ガスなどを移動相として、試料をカラムに導入し、カラム温度やガス流速を変化させて

分離分析するのが、ガスクロマトグラフィーであり、1950年代から使われ始めた。

ケイソウ土担体にシリコンポリマー、ポリエチレングリコール、ポリエステルなどの高沸点液相を数%～20%程度コーティングした充填剤などがあり、内径2～4mmの長さ30cm～6m程度のガラスカラムやステンレスカラムに充填したパックドカラムが使用される。ケイソウ土担体は、珪藻が化石になることで生じたケイ酸骨格を持つケイソウ土を焼成して粒子状に固めた後、数百μmにふるい分けした粒子で、表面に小孔を持つ多孔質体である。

1979年に熔融石英チューブの内面に液相をコーティングしたキャピラリーカラムが紹介され、現在ではこのカラムが主流となっている。

Key-words：クロマトグラフィー、シリカゲル、シリカモノリス、固相抽出

注1 結合より弱い分子間で影響し合う化学的作用。水素結合力、イオン結合力、双極子力、ファンデルワールス力などによって、分子間で引かれたり、反発したりして影響し合う。

注2 機器に導入する前に種々の処理。試料成分を揮発し易いように、化学処理 (誘導体化) をしたり、目的成分の分析を妨害する複雑な成分 (マトリクス) を除去したりする。

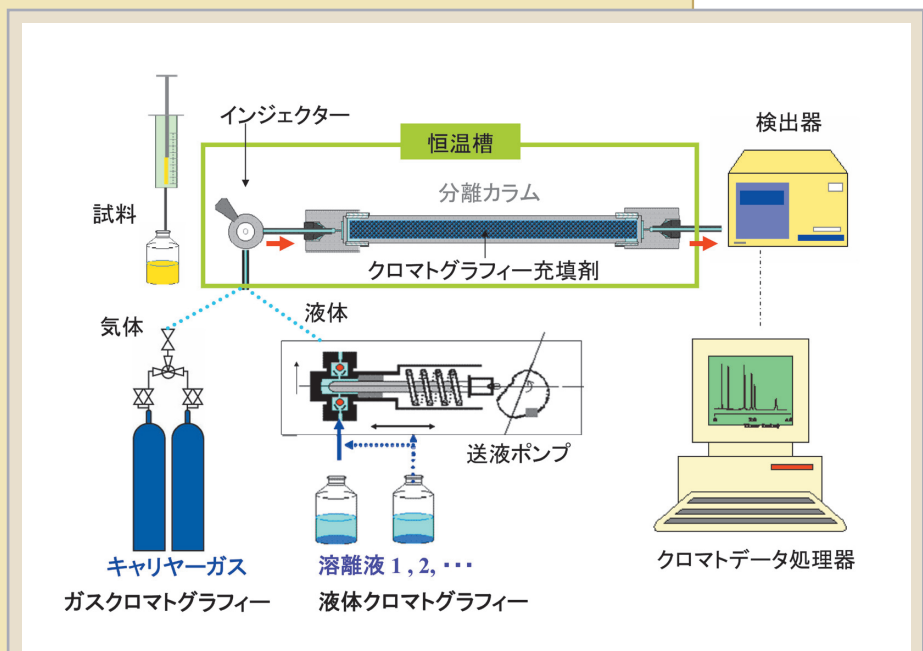


図1 クロマトグラフの構成例

クロマトグラフは、試料を注入するインジェクター、気体または液体を流す送液部、分離カラム、カラム温度を調整する恒温槽、検出器、結果を記録するデータ処理器などから構成されるクロマトグラフィー用装置である。

溶融石英チューブは、石英管を溶融して細く引きながら、周りにポリイミドの保護層をコーティングした内径0.1～0.53mm長さ10～60mの折れ難く使い易いキャピラリーチューブである。

その石英内面に、高沸点液相を数 μm の厚さに均一に化学結合したキャピラリーカラムである。中空であるため、気体抵抗が小さく、数十成分を一度に分離する事ができ、化学原料の組成分析、環境分析、残留農薬分析、臭気分析、ドーピング検査などに広く用いられている。(図3)

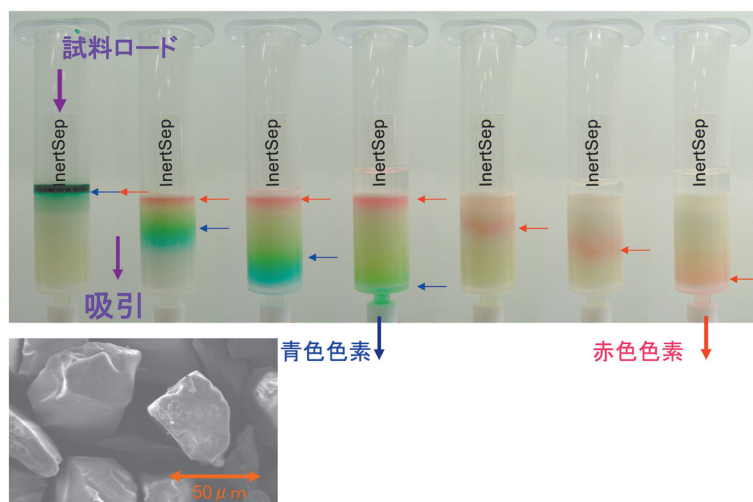


図2 固相抽出における色素の分離例

電子顕微鏡写真のような50 μm の破砕状シリカゲルが詰められた固相抽出カラムに色素を含んだ試料をロードする。溶媒を変化させながら吸引すると、時間と共に溶出してきて、青色と赤色の色素を分離溶出させることができる。

＜液体クロマトグラフィー＞

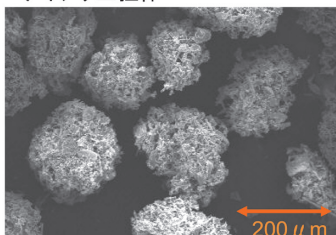
液体を移動相として、ポンプで試料をカラムに導入し、移動相組成を変化させて分離分析するのが、液体クロマトグラフィーであり、1960年代から使われ始めた。

不揮発成分や熱分解成分の分離に用いられ、医薬成分、ビタミン、アミノ酸、食品添加物、色素、界面活性剤、タンパク・ペプチドなど化学物質成分の分離分析に欠かせず、現在では、あらゆる分野に幅広く用いられている。

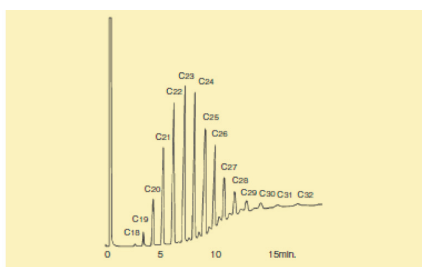
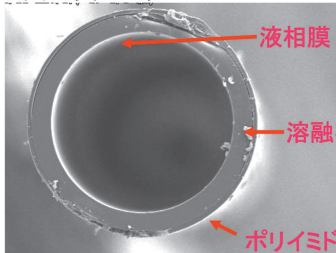
アセトニトリルやメタノールなどの有機溶媒と水との混合液などが移動相として用いられ、混合割合を変化させる事で分離を調節する。数十Mpa以上の高圧に耐え、表面積が200 m^2/g 以上の球状シリカゲルが主に使用される。種々の有機溶媒に対する化学的耐久性も必要で、シリル化反応を利用して、シラノール基にオクタデシル基などの有機化合物を化学結合する。この充填剤を内径1～10mm長さ50～250mmステンレスカラムに50Mpa程度で充填したHPLC(High Performance Liquid Chromatography; 高速液体クロマトグラフィー)カラムが主に用いられている。

粒子径は、時代と共に小さくなり、現在では5 μm が主流となっている。近年では、ポンプ性能も上がり35Mpa以上でも送液できるようになり、より粒子径の小さい充填剤が使われ始めている。(図4)粒子径を小さくするほど、ピークはシャープになり高速化ができるので、これから増えていくと考えられる。

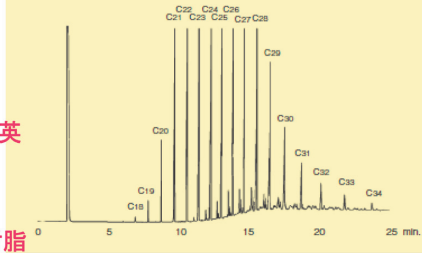
ケイソウ土担体



キャピラリーカラム



Column: Unisole 10T 5% Uniport HP 80 / 100 Glass 2m x 3mm I.D. Col.Temp.: 160~260°C (10°C/min) Carrier Gas: N₂ 80mL/min. Detector: FID 10 \times 8 Sample Size: 1.0 μL



Column: TC-1 30m x 0.25mm I.D. df=0.25 μm Col.Temp.: 160~300°C (10°C/min) Carrier Gas: He 1mL/min. Detector: FID 10 \times 2 Sample Size: 1 μL Injector: split 1/100

図3 ガスクロマトグラフィーによるパラフィン (mp50～52 $^{\circ}\text{C}$) の分析例

ケイソウ土担体に液相をコーティングした充填カラムに比べて、ポリイミドで被覆された溶融石英チューブ内面に液相をコーティングしたキャピラリーカラムの方が、各成分の分離が良くなり、多成分分析に適している。

<これからの展開>

ケイ酸エチルのゾルゲル方法から作成したシリカモノリス多孔質体は、大きな表面積を持ち、物理的、化学的にも安定であり、新しいクロマトグラフィー用充填剤として注目を浴びている。多孔性のケイ酸骨格と移動相が流れる空間の比率を調整することで、従来の粒子タイプより通液抵抗が小さくできるので、液体クロマトグラフィーにおける高速分析に期待されている。²⁾さらに、新しい試みとして、このモノリス体では、自由な形で作成できるので、直接カラムに固定する事ができ、DNAなどの生体試料の前処理用クロマトグラフィー充填剤としても応用されている。(図5)

クロマトグラフィー用充填剤は、装置の発展や対象試料成分の変化や使用法の変化に応じて、形や性能を変えながら益々幅広く使われていくと考えられる。

文献

- 1) 松下至, ぶんせき, 11, 682-683 (2003).
- 2) N. Tanaka, H. Kobayashi, K. Nakanishi, H. Minakuchi, N. Ishizuka, Anal. Chem. 73, 420A-429A (2001).

[連絡先] 大平 真義
 ジーエルサイエンス(株)
 技術開発部
 〒358-0032
 入間市狭山ヶ原 237-2

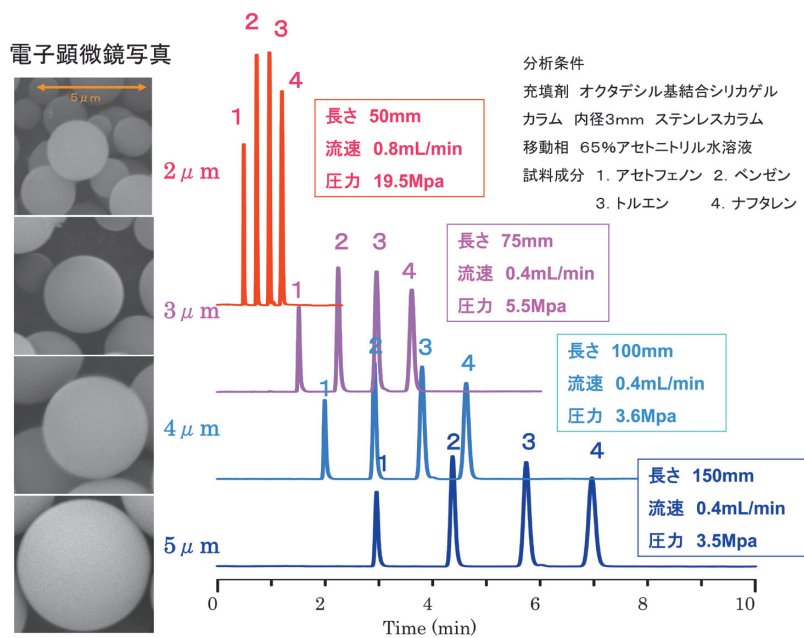


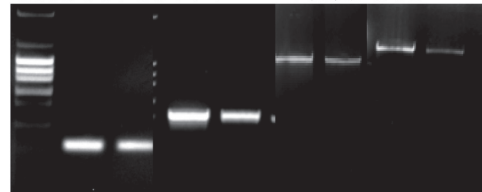
図4 液体クロマトグラフィーにおける粒子径の違い

オクタデシル基を結合した球状のシリカゲルなどが用いられ、粒子径が小さくなると、ピークがシャープになり、分析時間を早くすることができる。ポンプ耐圧性能が上がり、2 μm粒子が高速分析に適用され始めている。

樹脂製カートリッジに
 シリカモノリスを融着



広範囲のフラグメントDNAの精製に適応



pHY
 マーカー 35bp 500bp 10Kbp 35Kbp

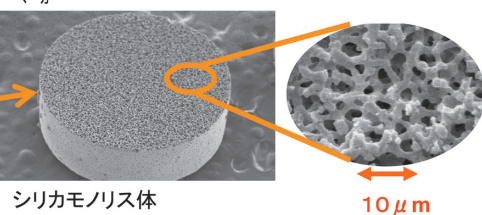


図5 シリカモノリスを用いた DNA 精製例

京都大学 曾我・中西先生らによって、発明された三次元網目構造を持つシリカモノリスは、粒子タイプと異なりフィルターが必要なく、樹脂製カラムに融着で固定できるので、DNAなどの精製にも使用されている。