

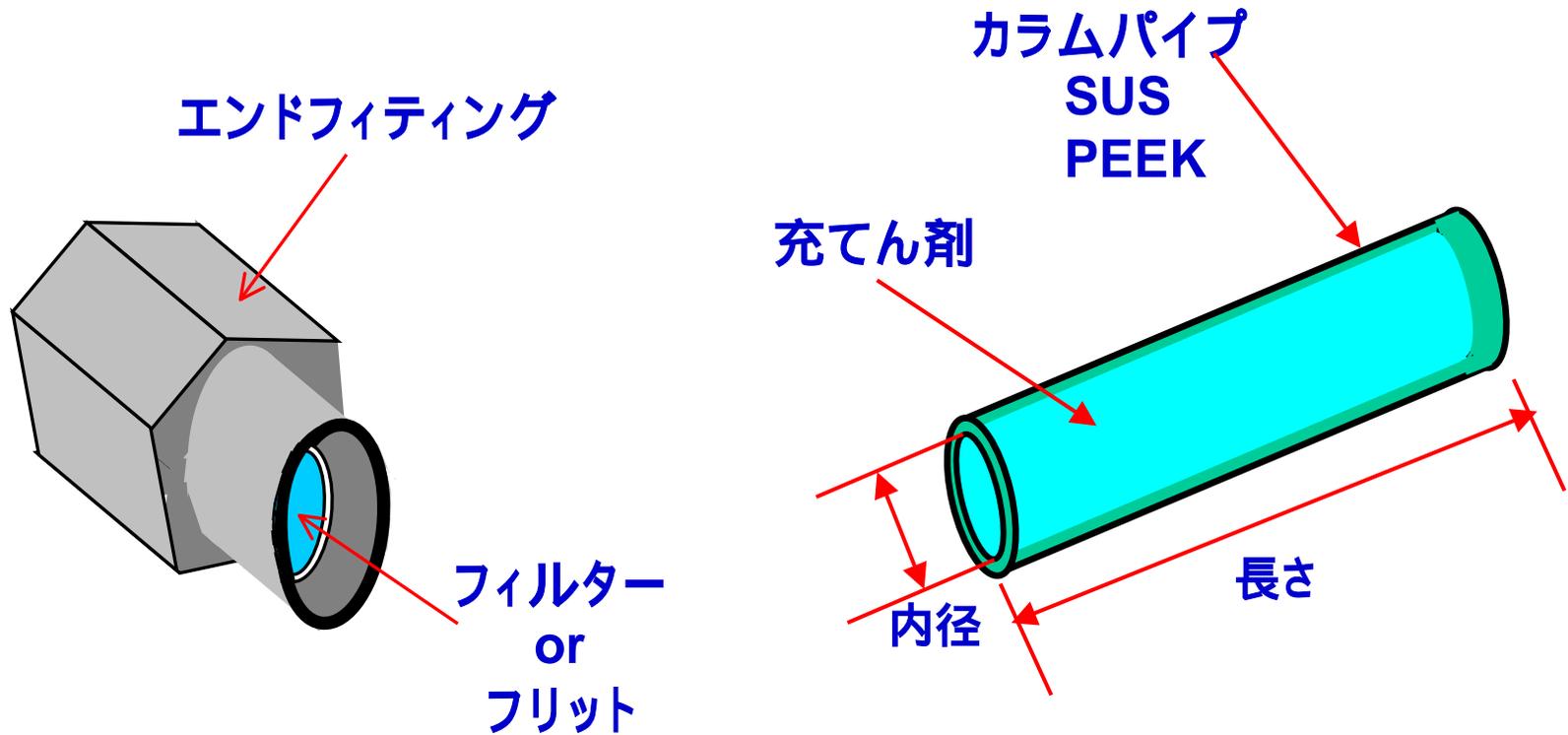
分離

❖ HPLCの分離モードとメカニズム

- 逆相分配
- 順相分配
- イオン交換
- サイズ排除



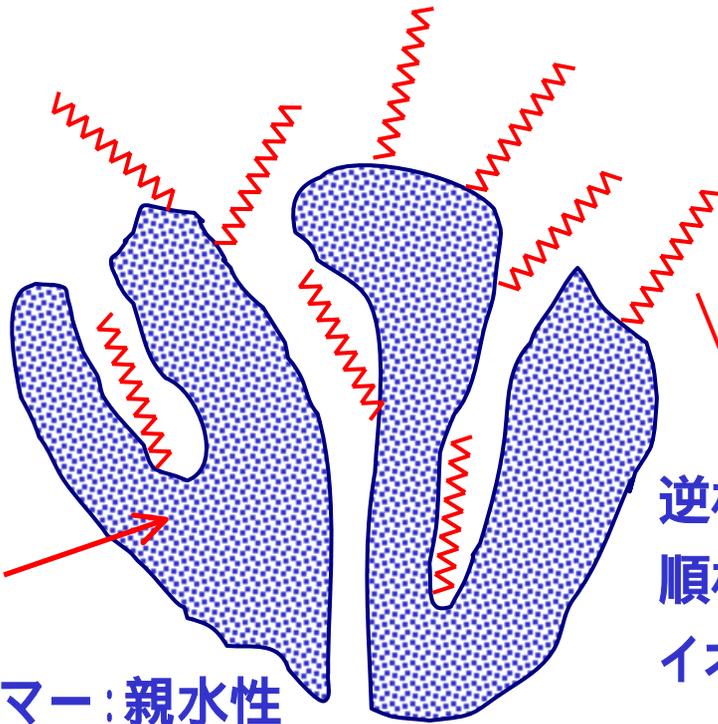
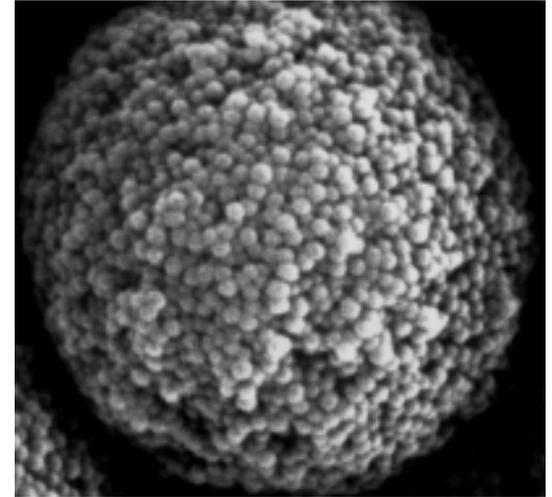
HPLC用カラムの部品



固定相 (充填剤)

化合物の性質 (特性) の違いを認識する場

||
分離の中枢部



担体 (基材)
シリカ

合成ポリマー: 親水性
疎水性

||
化学結合相

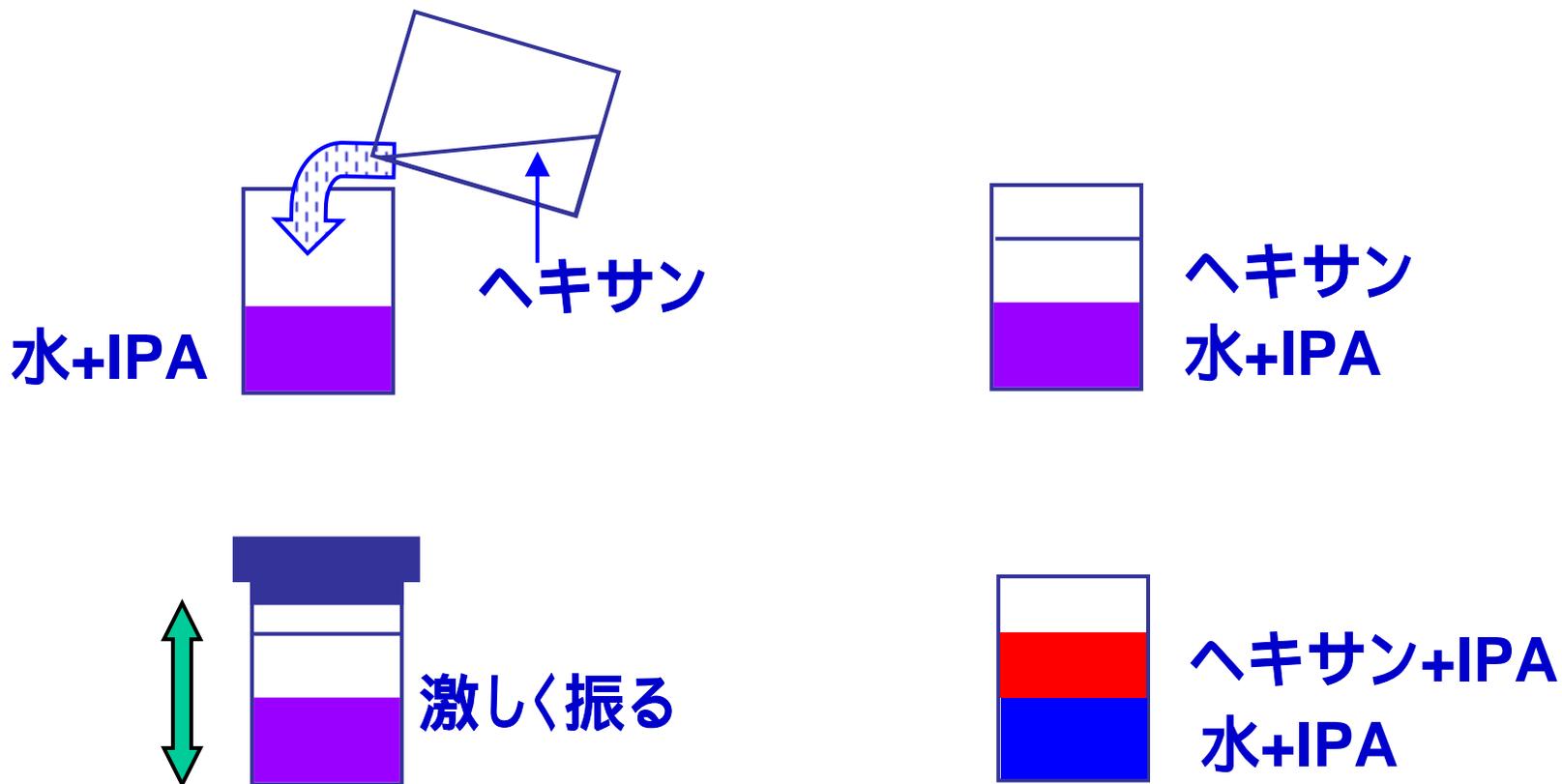
||
逆相分配: $C_{18}H_{37}$, C_8H_{17} , etc.

順相分配: CN , NH_2 ,

イオン交換: $COOH$, NR_4^+ , SO_3^-

分離モード: 分配クロマトグラフィー

分配: 溶質が共存する2相にそれぞれ存在している状態



IPA: イソプロピルアルコール

逆相分配クロマトグラフィー1

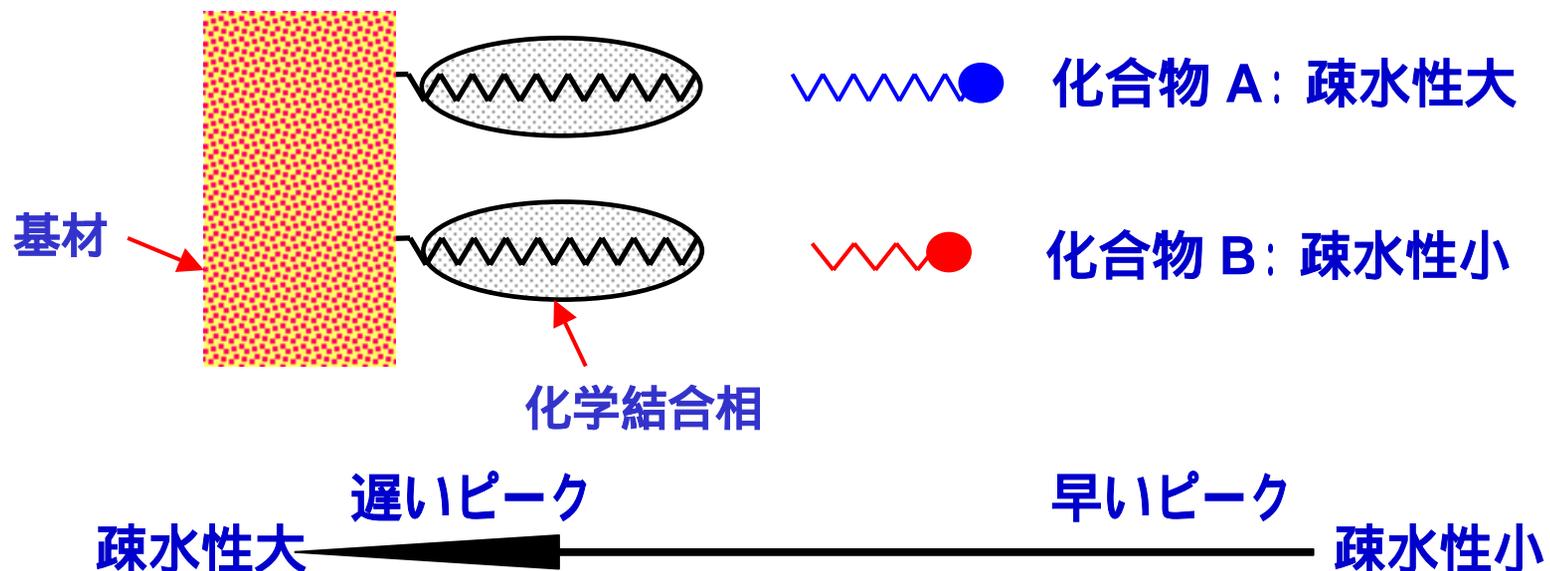
Reversed Phase Partition Chromatography

HPLCでもっとも広く利用されている分離モード

(原理) 固定相、移動相と試料との間の疎水性相互作用で分離する。

極性: 固定相 < 移動相

化学結合相 (C₁₈, C₈など) 疎水性



逆相分配クロマトグラフィー2

Reversed Phase Partition Chromatography

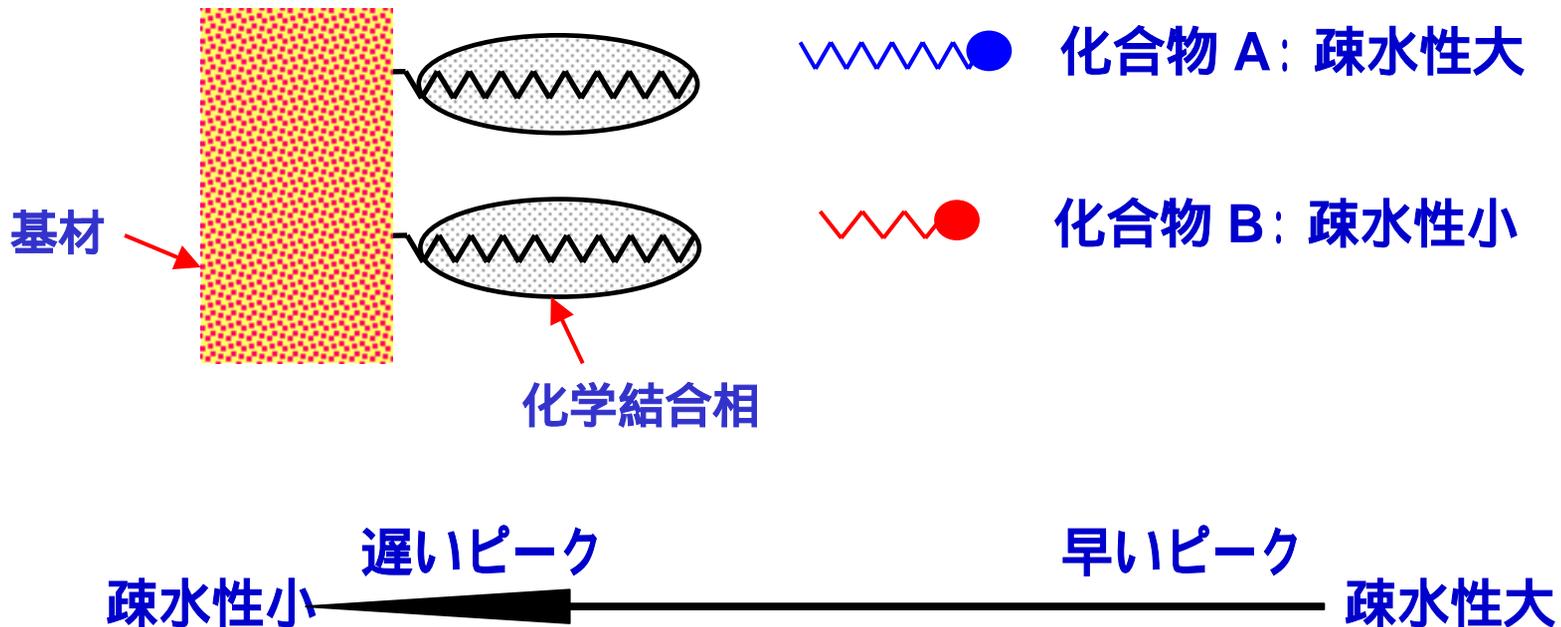
- * 代表的な充てん剤 : ODS, MOS (シリカゲル系)、
ポリマー系逆相充てん剤など
- * 適用できる試料 : 低極性から中極性の比較的分子量の小さい化合物
- * 移動相 : 水、および緩衝液と水溶性有機溶媒 (CH_3OH 、 CH_3CN など) の混合溶液

順相分配クロマトグラフィー1

Ordinary Phase Partition Chromatography

(原理) 固定相、移動相と試料との間の疎水性相互作用で分離する。
極性: 固定相 > 移動相

化学結合相(NH₂, CNなど) 親水性



順相分配クロマトグラフィー2

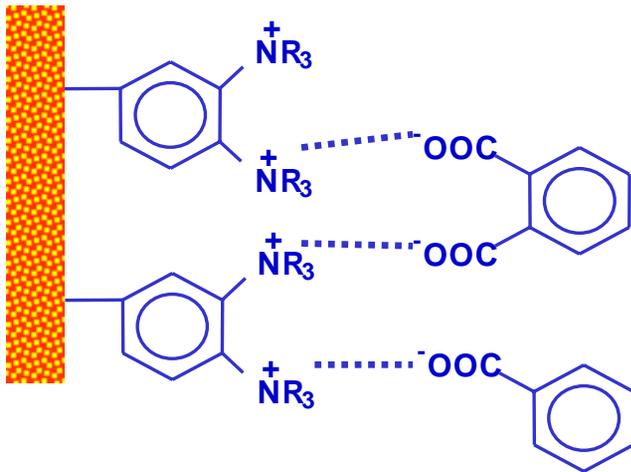
Ordinary Phase Partition Chromatography

- * 代表的な充てん剤 : NH_2 、 CN (シリカゲル系、ポリマー系)
- * 適用できる試料 : 低極性(親水性が高い)化合物。
- * 移動相 : 水、および緩衝液と水溶性有機溶媒 (CH_3OH 、 CH_3CN など)の混合溶液

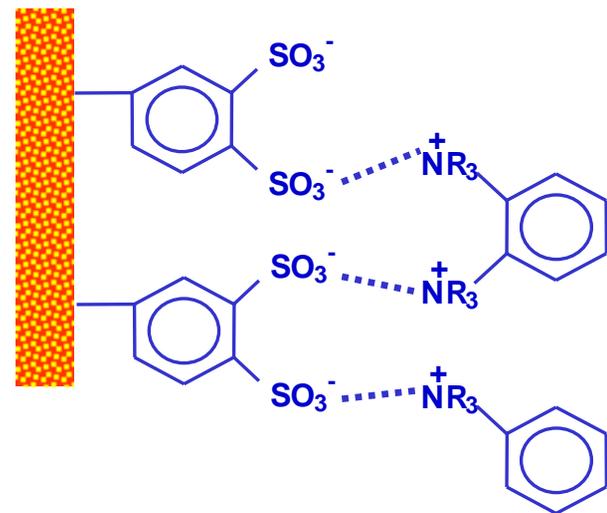
イオン交換クロマトグラフィー1

Ion Exchange Chromatography

(原理) 固定相のイオン交換基と試料、移動相間とのイオン交換作用で分離する。



陰イオン交換樹脂



陽イオン交換樹脂

イオン交換クロマトグラフィー2

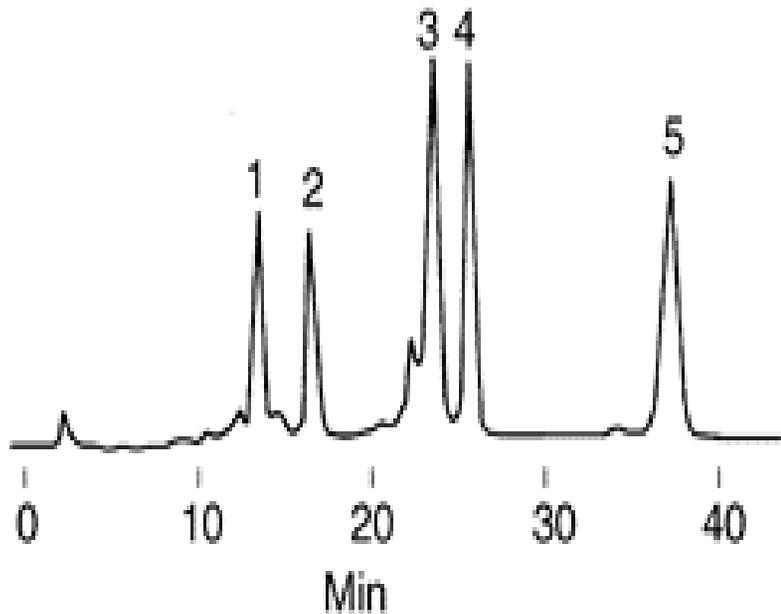
Ion Exchange Chromatography

- * 代表的な充てん剤 : 4級アンモニウム型陰イオン交換樹脂(強塩基)
3級アミン型陰イオン交換樹脂(弱塩基)
スルホン酸型陽イオン交換樹脂(強酸)
カルボキシル型陽イオン交換樹脂(弱酸)
基材としては、親水性ポリマー、疎水性ポリマー、シリカゲル
- * 適用できる試料 : イオン性化合物(解離しやすいもの)
無機イオン、アミン、有機酸、タンパク質、アミノ酸
- * 移動相 : 緩衝液

イオン交換クロマトグラフィー3

Ion Exchange Chromatography

タンパク質の分離例



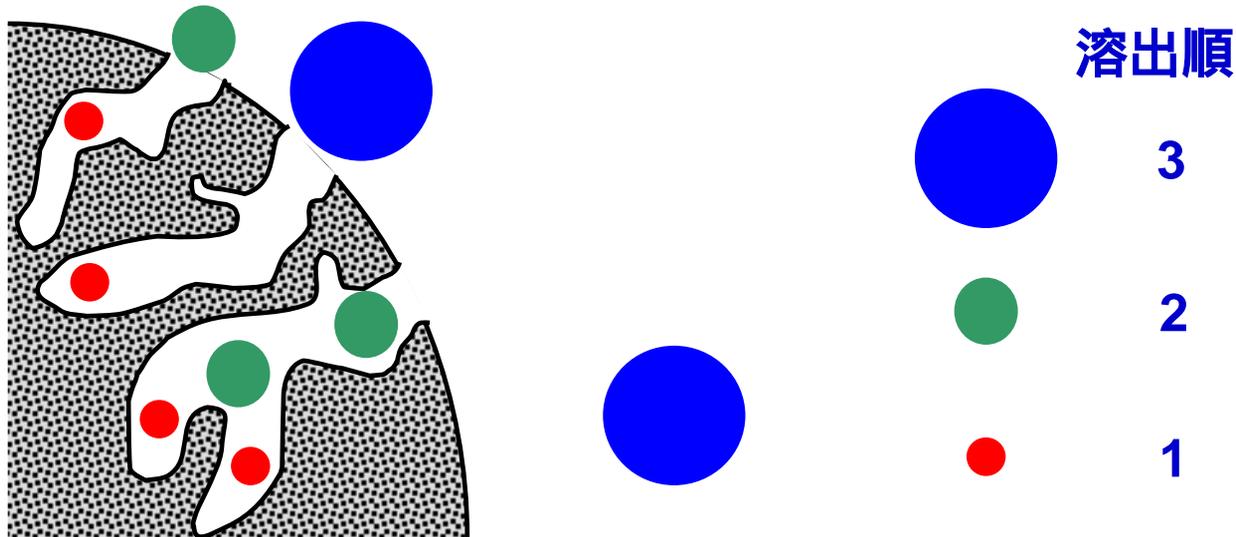
Column: TSKgel CM-5PW,
Mobile Phase: A = 0.1M NaH₂PO₄ buffer, pH 7.0
B = 0.5M NaCl
0% B to 100% B in 60 min
Flow Rate: 1.0mL/min
Det.: UV, 280nm

1. Trypsinogen
2. Ribonuclease A
3. α-Chymotrypsinogen
4. Cytochrome c
5. Lysozyme

サイズ排除クロマトグラフィー1

Size Exclusion Chromatography

(原理) 分子の立体的な大きさの差を利用して分離する。



充てん剤のポア(穴)より小さい分子はポア内部にまで入れるが、ポアより大きい分子は入れない。その結果、大きい分子は小さい分子より早くカラムから溶出する。

サイズ排除クロマトグラフィー2

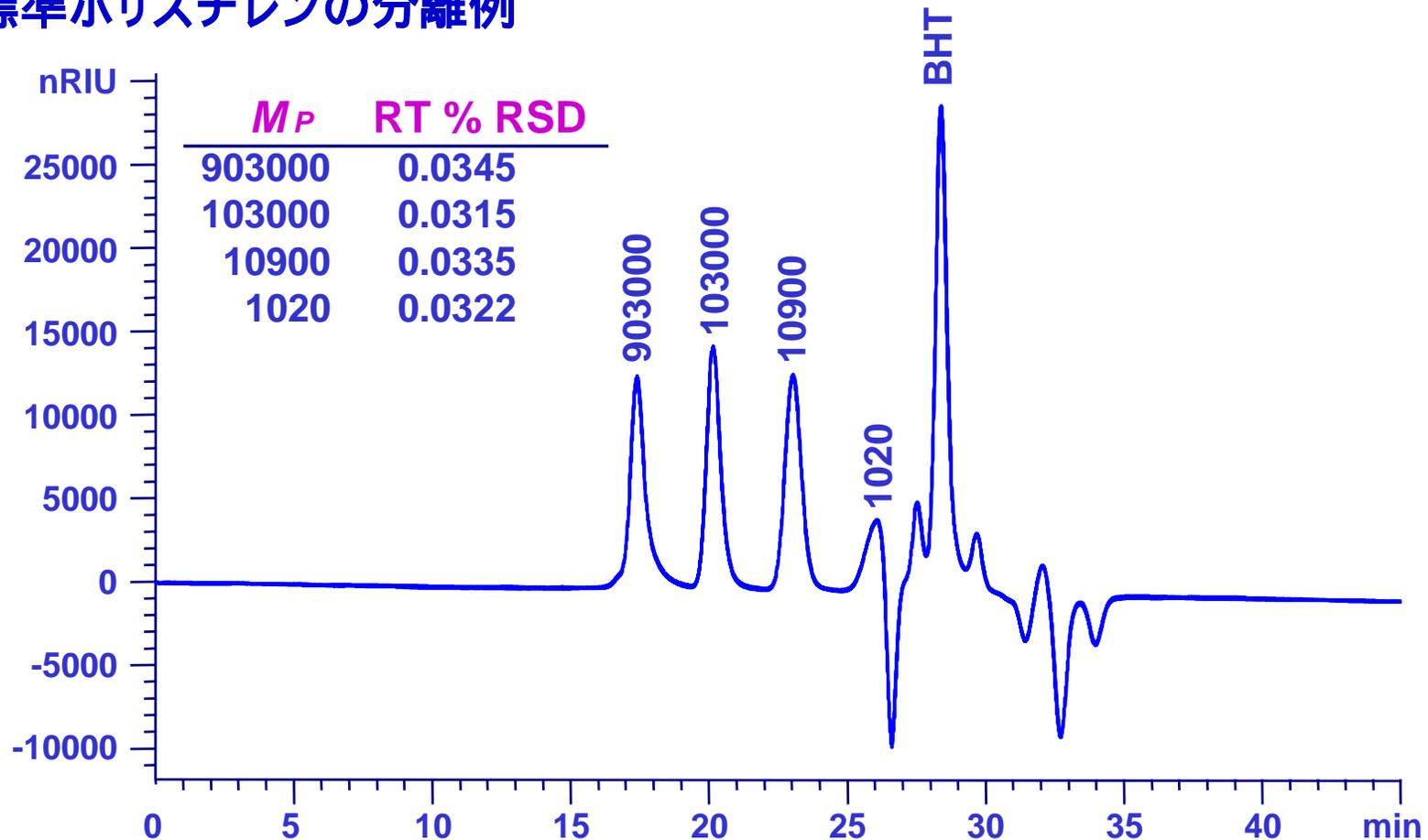
Size Exclusion Chromatography

- *水系SEC: 水(緩衝液)に可溶性高分子が対象 - タンパク質、水溶性合成高分子
タンパク質の水系SECはGFC(Gel Filtration Chromatography)と呼ばれることがある。
充てん剤; 親水性ポリマーあるいは表面処理したシリカゲルが基材
移動相; 水、緩衝液
- *有機溶媒系SEC: 水の溶解しない高分子が対象 - ポリスチレン、PET など
GPC (Gel Permeation Chromatography)とも呼ばれる。
充てん剤; ポリスチレンが基材
移動相; 分析するポリマーが溶解する有機溶媒 - THF, トルエンなど

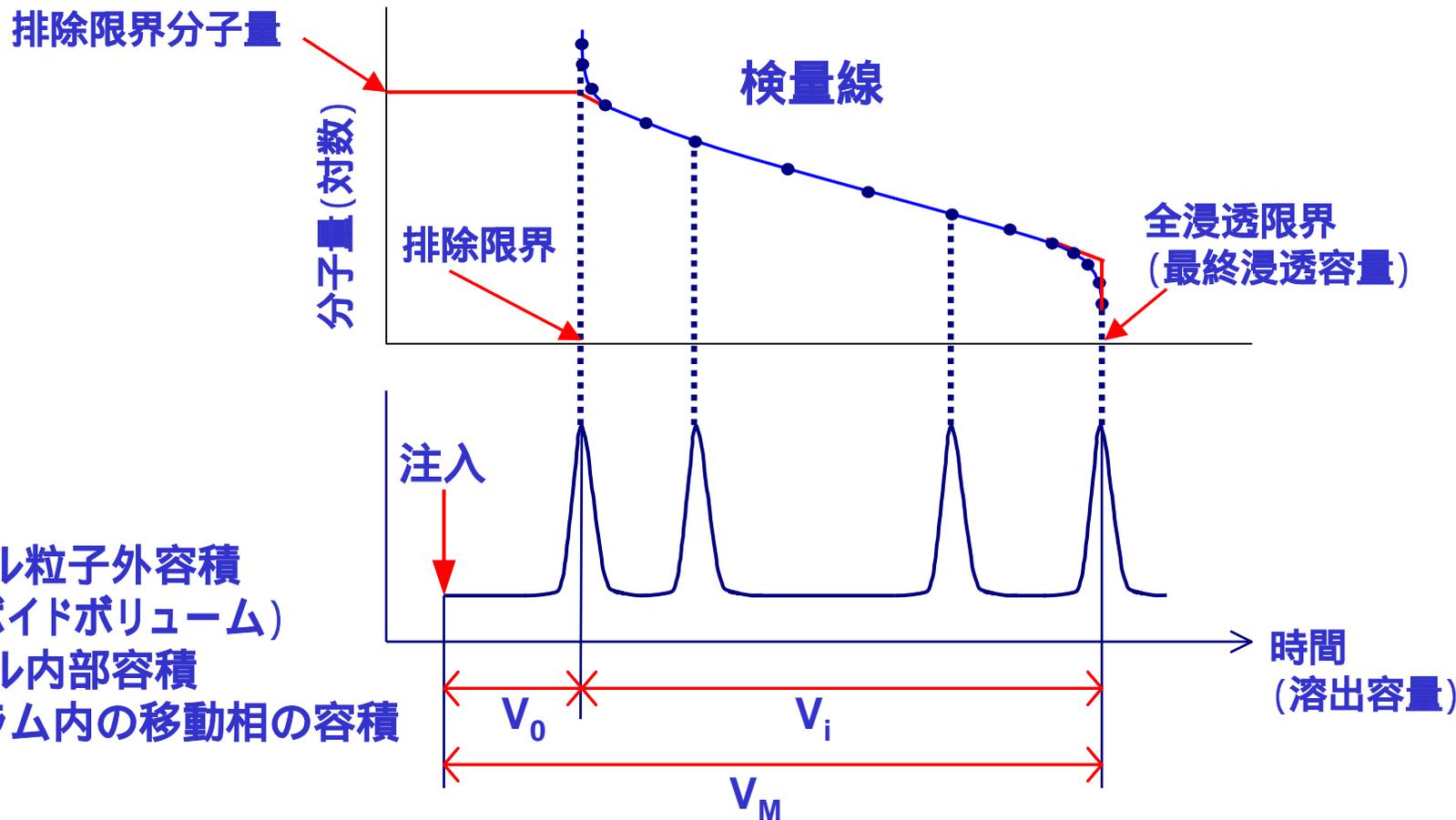
サイズ排除クロマトグラフィー3

Size Exclusion Chromatography

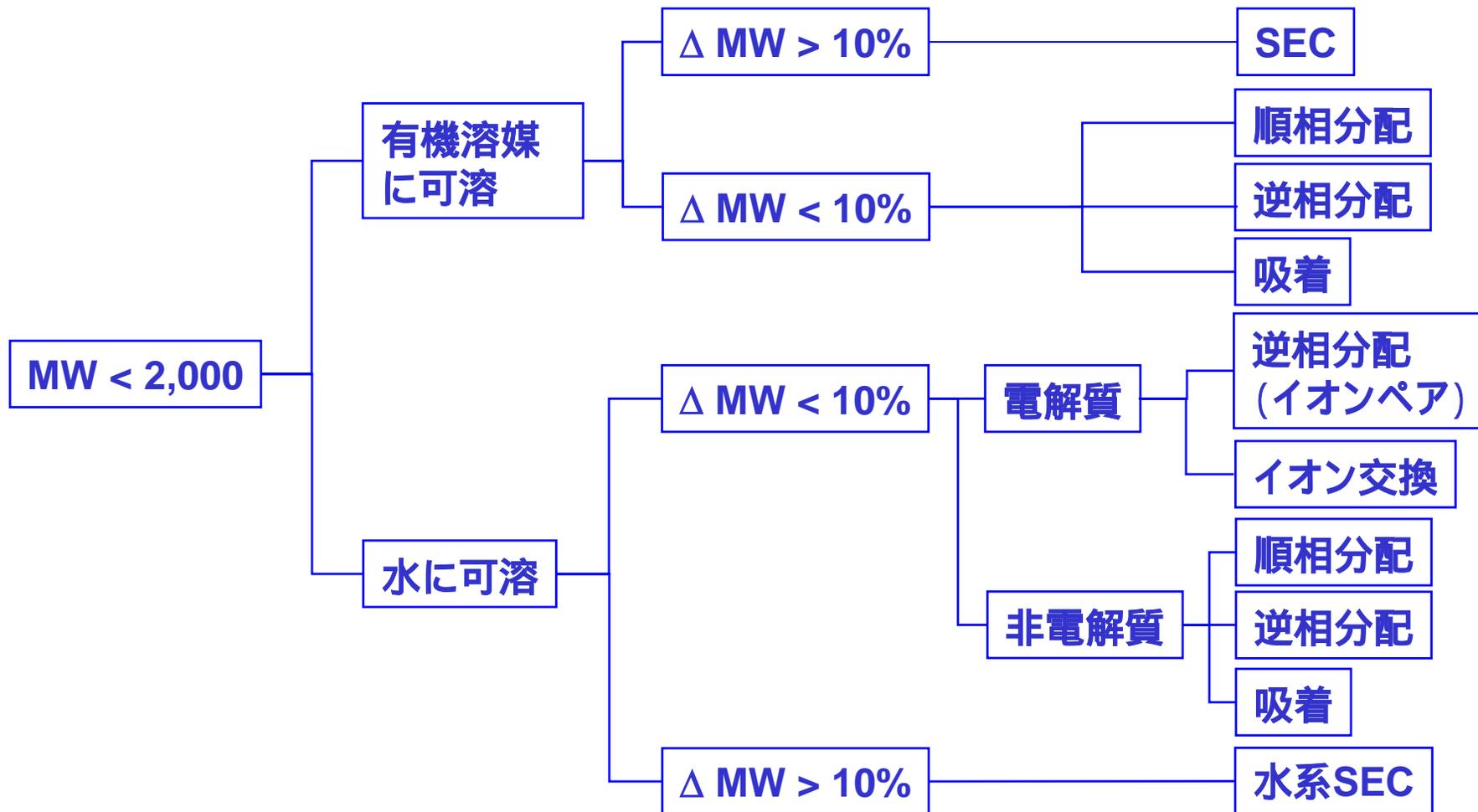
標準ポリスチレンの分離例



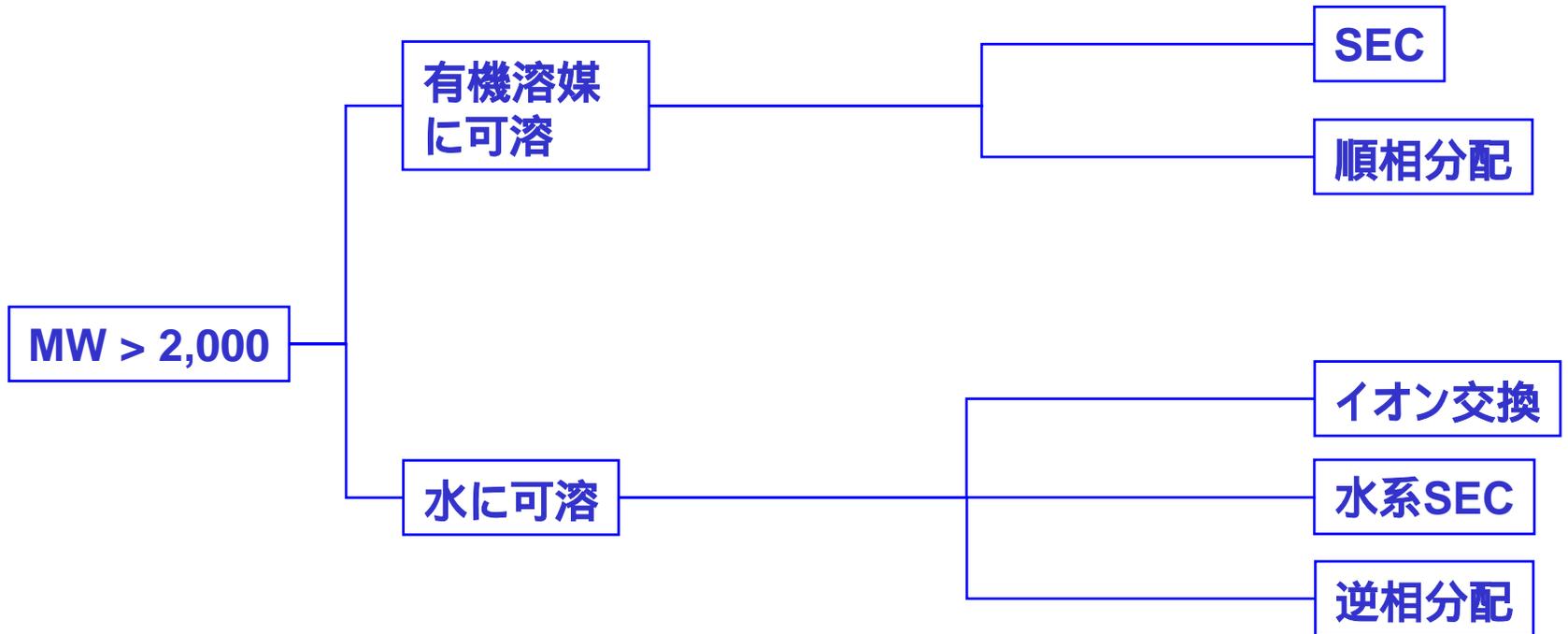
排除限界と最終浸透容積 - 検量線



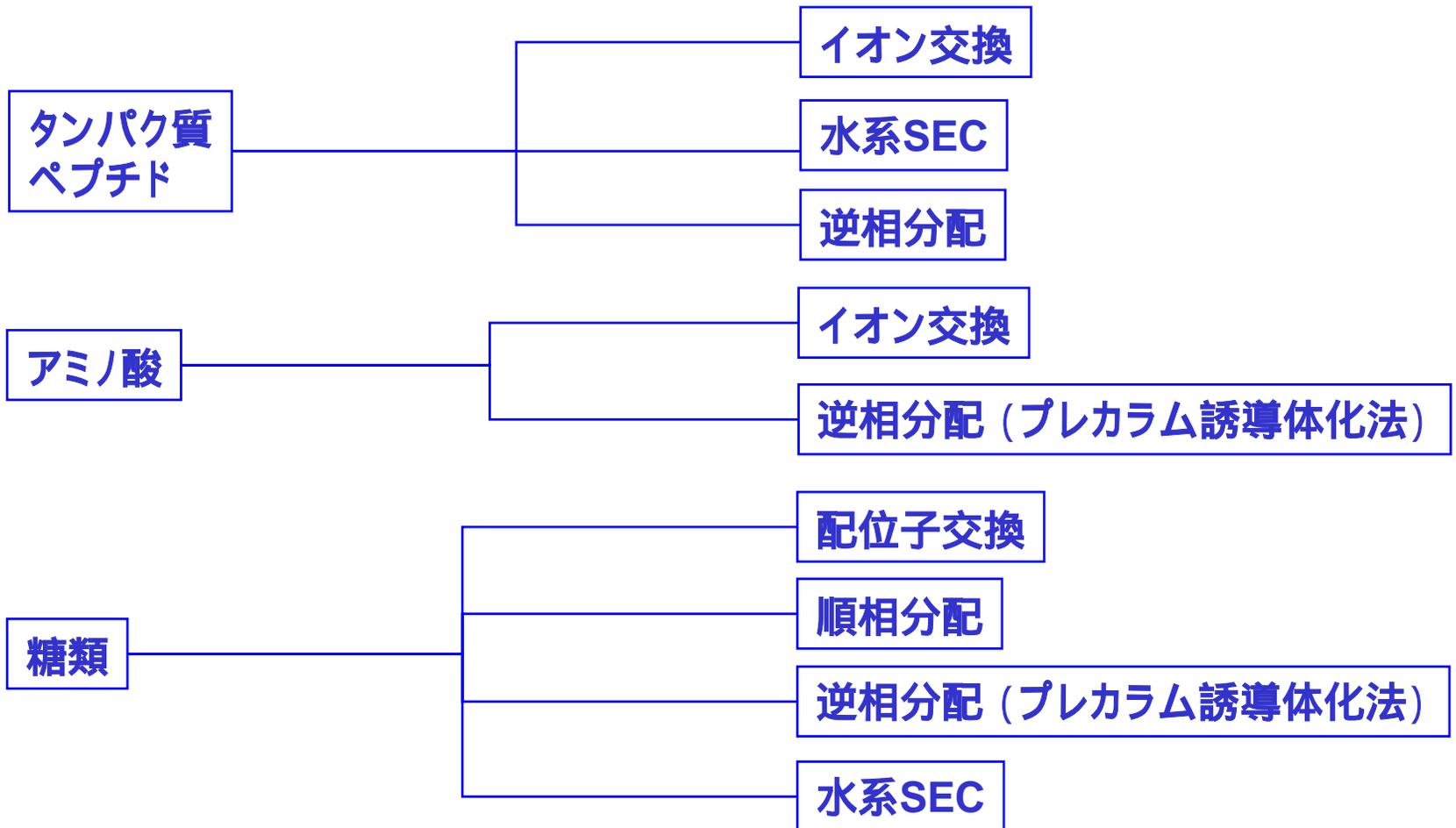
HPLCカラムの選択A (1)



HPLCカラムの選択A (2)



HPLCカラムの選択B (1)



HPLCカラムの選択B (2)

