

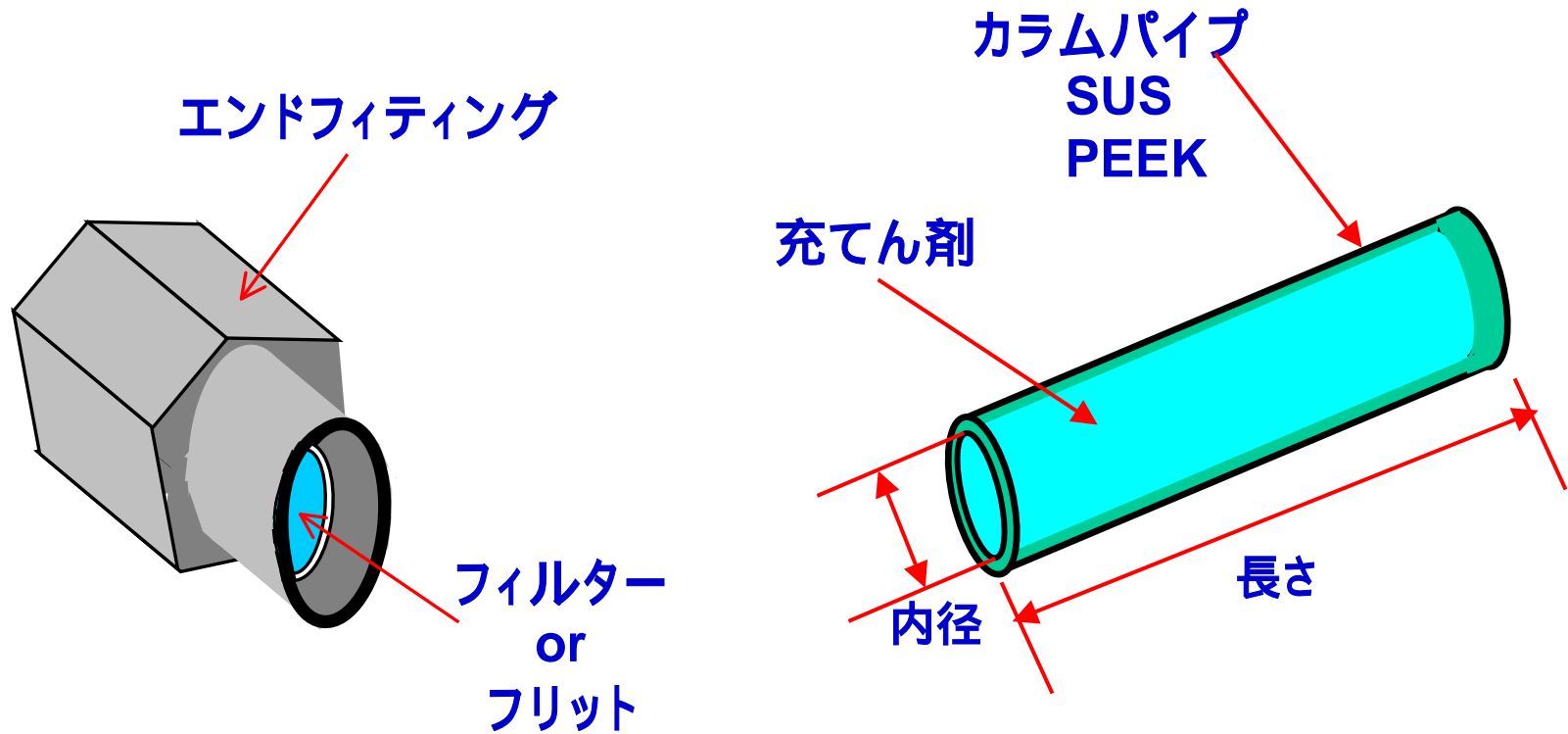
# 分離

## ❖ 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



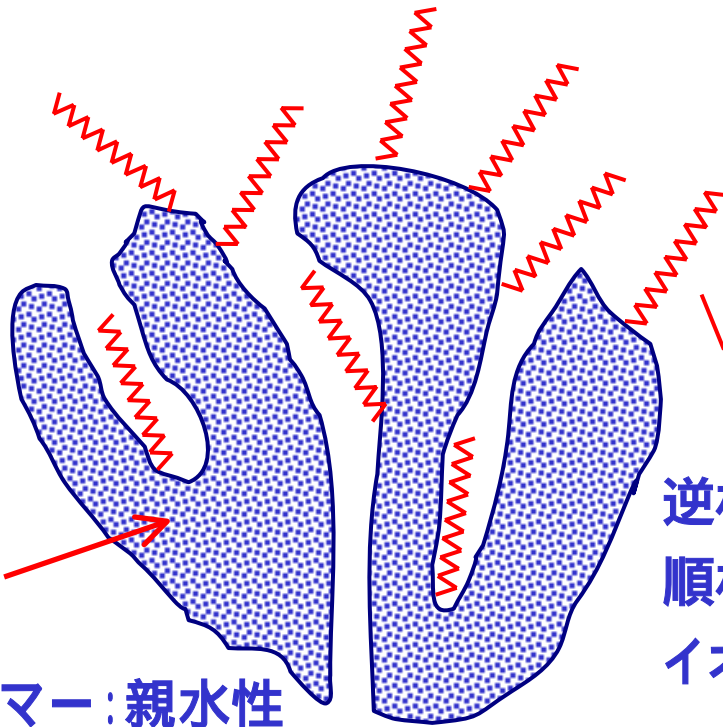
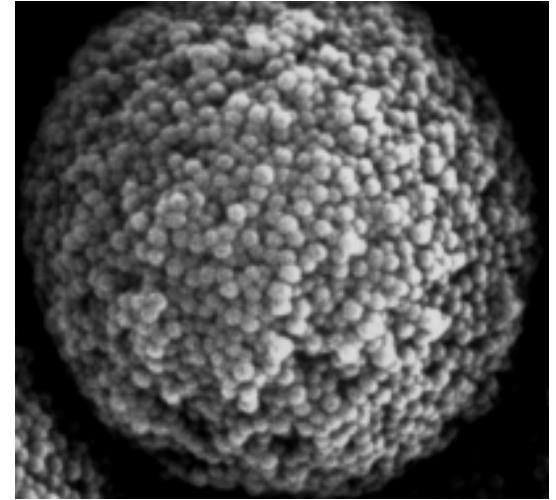
# HPLC用カラムの部品



# 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

||

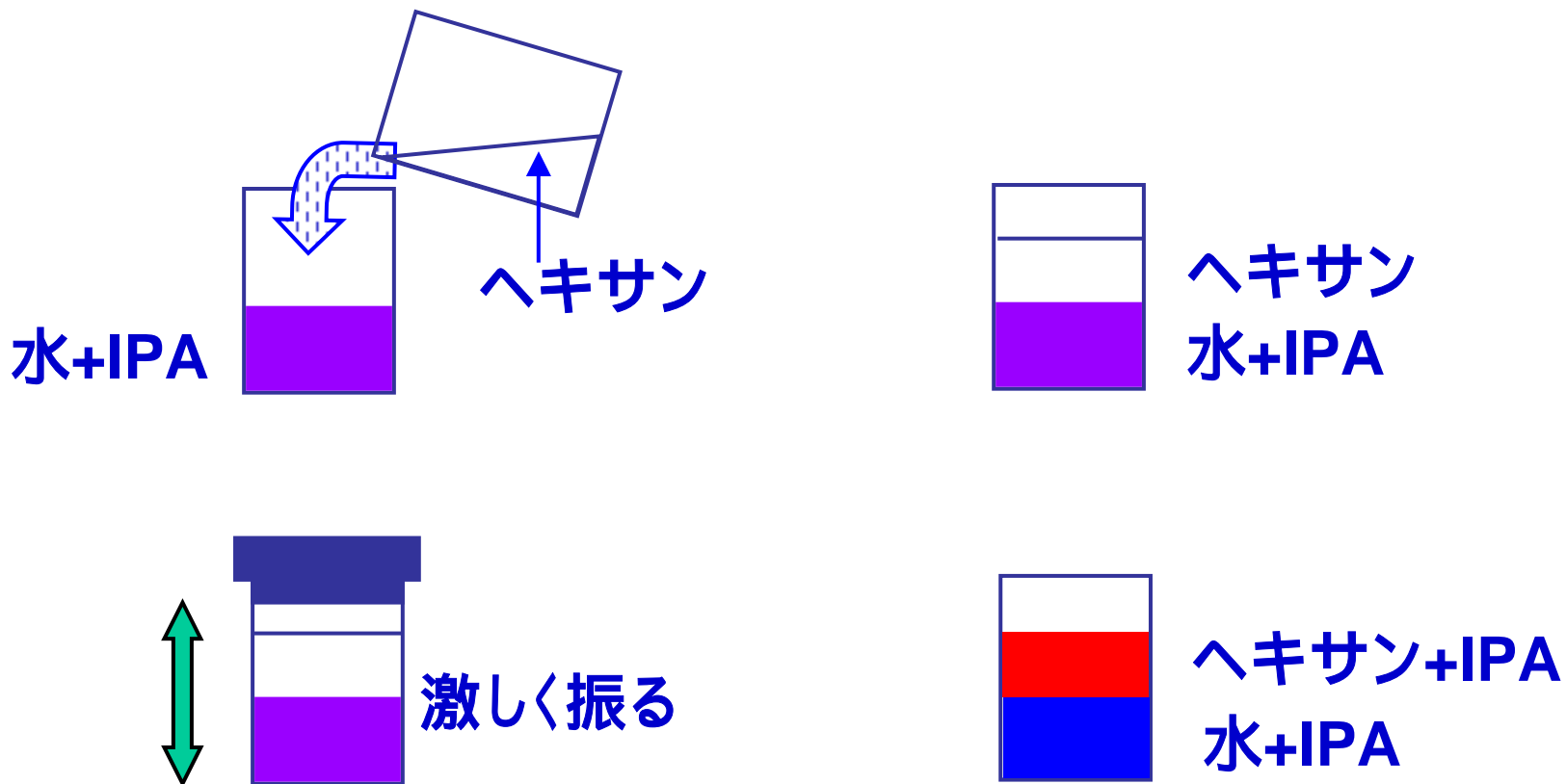
逆相分配:  $C_{18}H_{37}$ ,  $C_8H_{17}$ , etc.

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

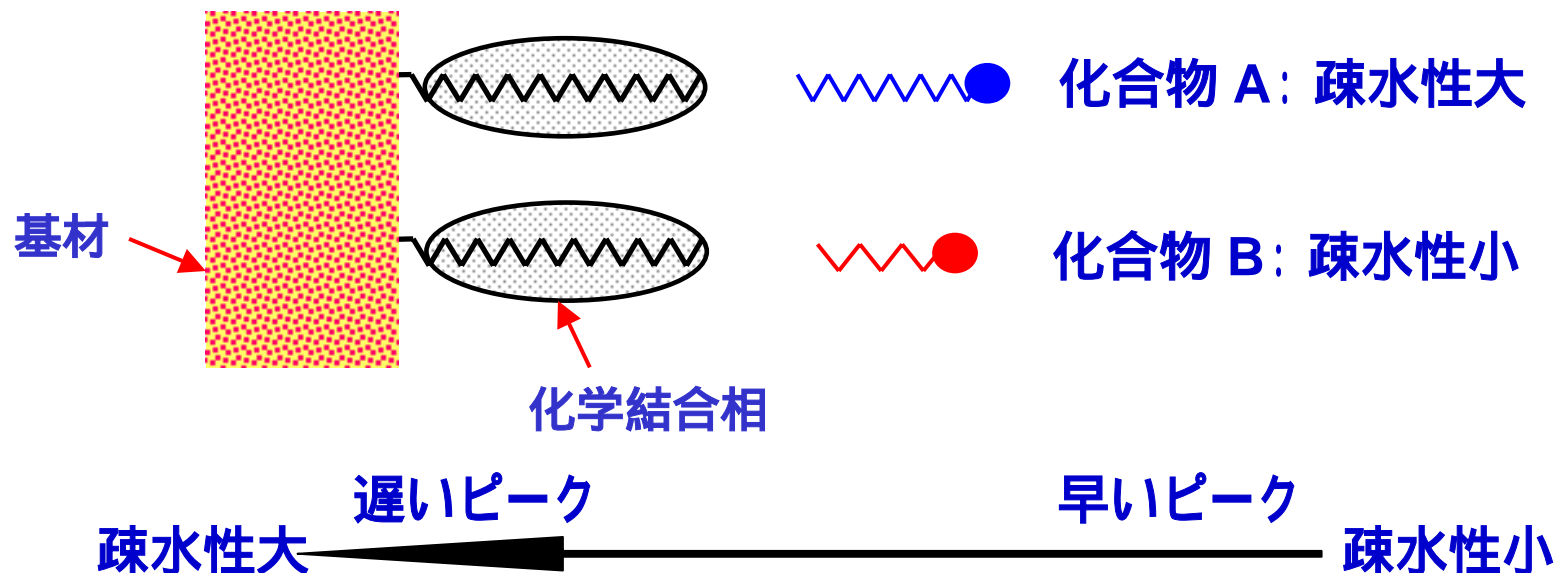
## Reversed Phase Partition Chromatography

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 (C<sub>18</sub>, C<sub>8</sub>など) 疎水性



# 逆相分配クロマトグラフィー2

## Reversed Phase Partition Chromatography

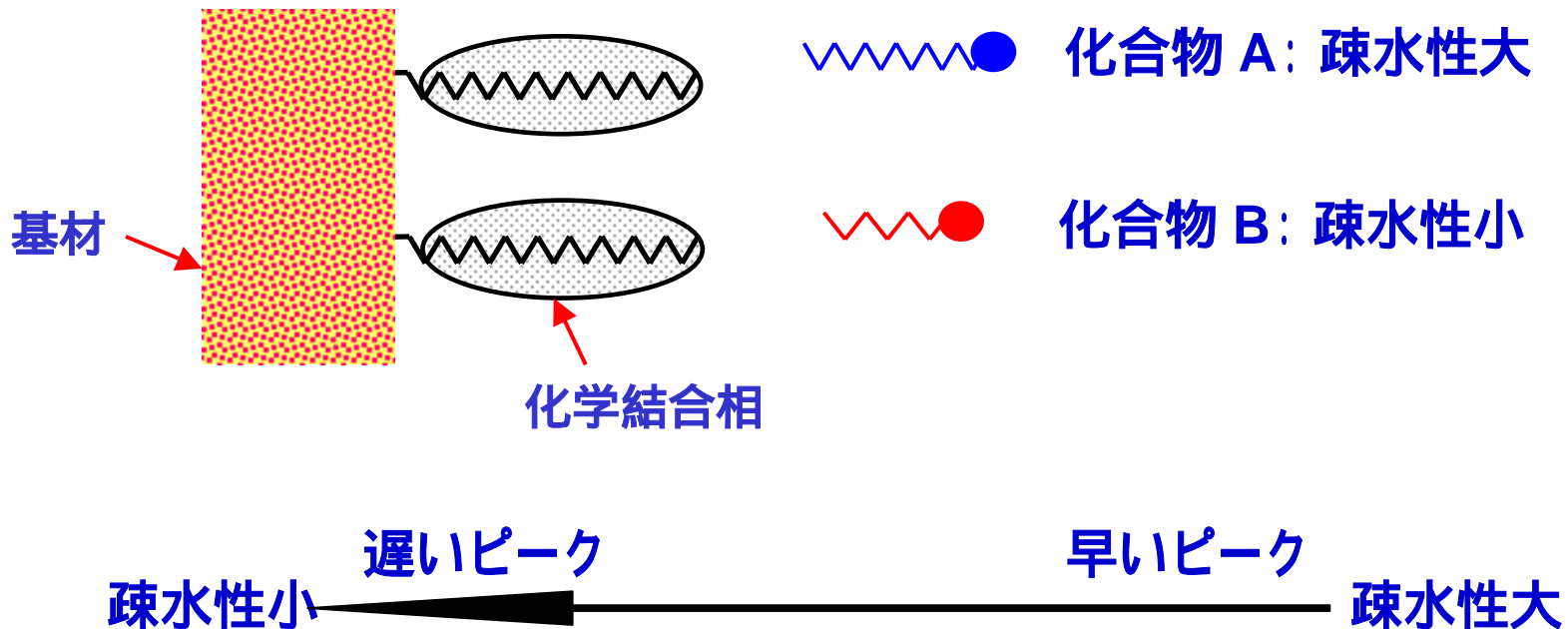
- \* 代表的な充てん剤 : ODS, MOS (シリカゲル系)、  
ポリマー系逆相充てん剤など
- \* 適用できる試料 : 低極性から中極性の比較的分子量の小さい化合物
- \* 移動相 : 水、および緩衝液と水溶性有機溶媒 ( $\text{CH}_3\text{OH}$ 、 $\text{CH}_3\text{CN}$ など) の混合溶液

# 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(NH<sub>2</sub>、CNなど) 親水性



# 順相分配クロマトグラフィー2

## Ordinary Phase Partition Chromatography

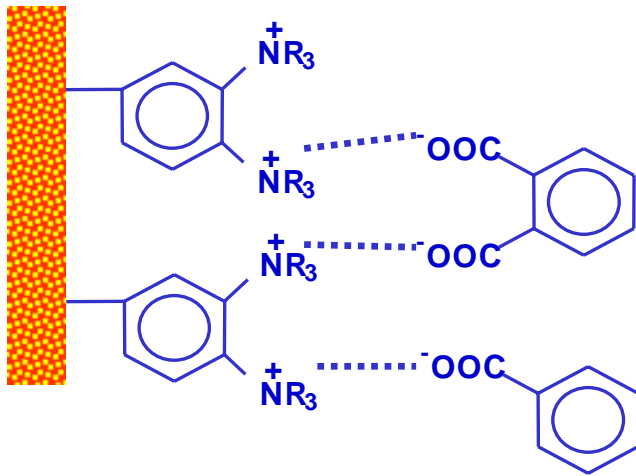
- \* 代表的な充てん剤 :  $\text{NH}_2$ 、 $\text{CN}$ (シリカゲル系、ポリマー系)
- \* 適用できる試料 : 低極性(親水性が高い)化合物。
- \* 移動相 : 水、および緩衝液と水溶性有機溶媒 ( $\text{CH}_3\text{OH}$ 、 $\text{CH}_3\text{CN}$ など)の混合溶液



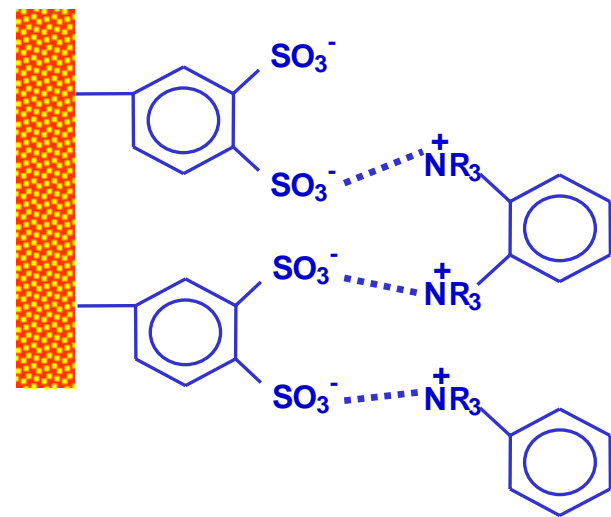
# イオン交換クロマトグラフィー1

## 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

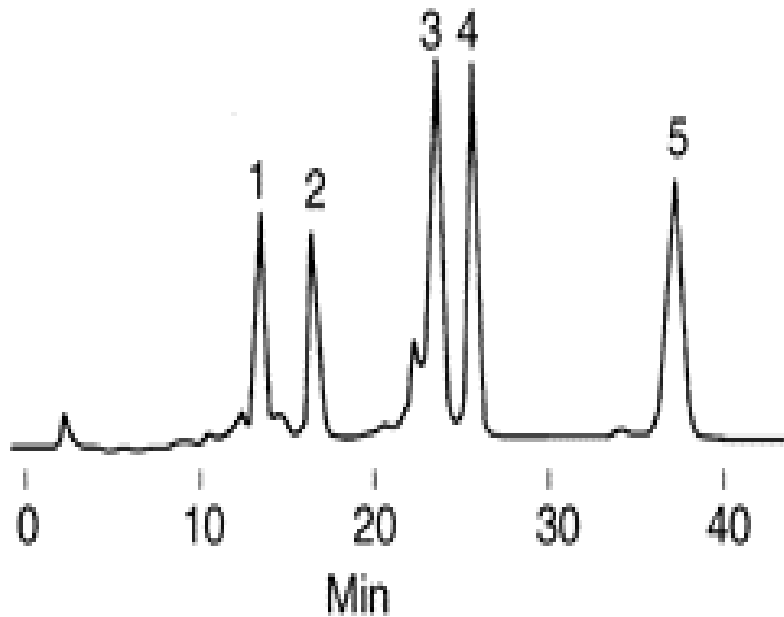
## Ion Exchange Chromatography

- \* 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 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> buffer, pH 7.0  
B = 0.5M NaCl

0% B to 100% B in 60 min

Flow Rate: 1.0mL/min

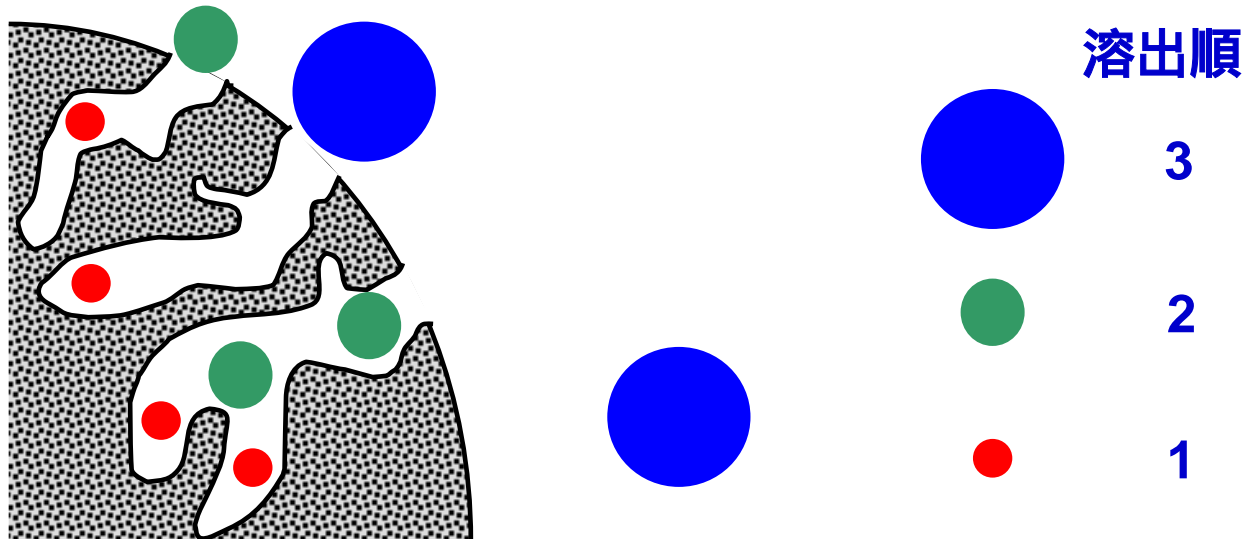
Det.: UV, 280nm

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

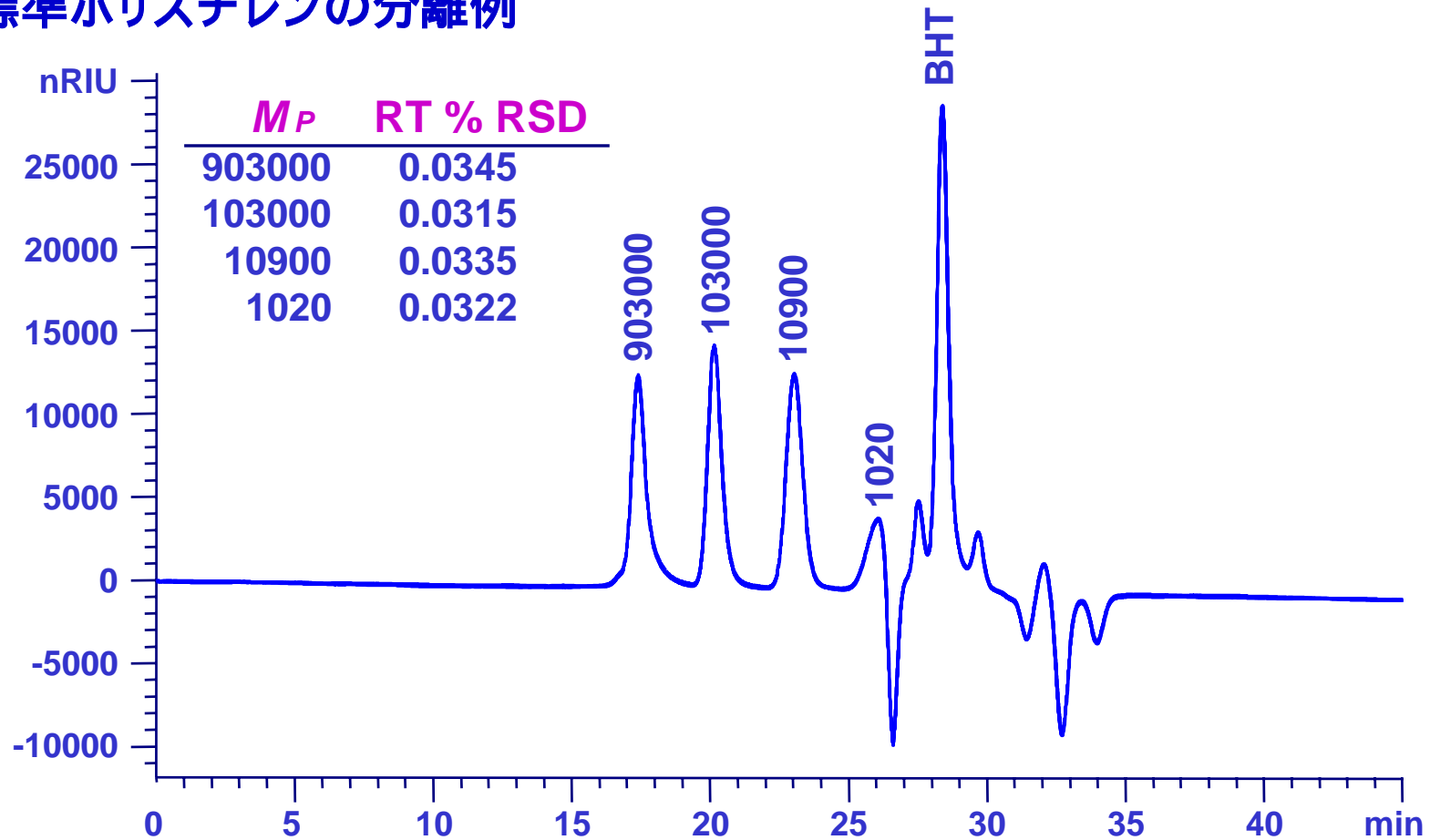
## Size Exclusion Chromatography

- \*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

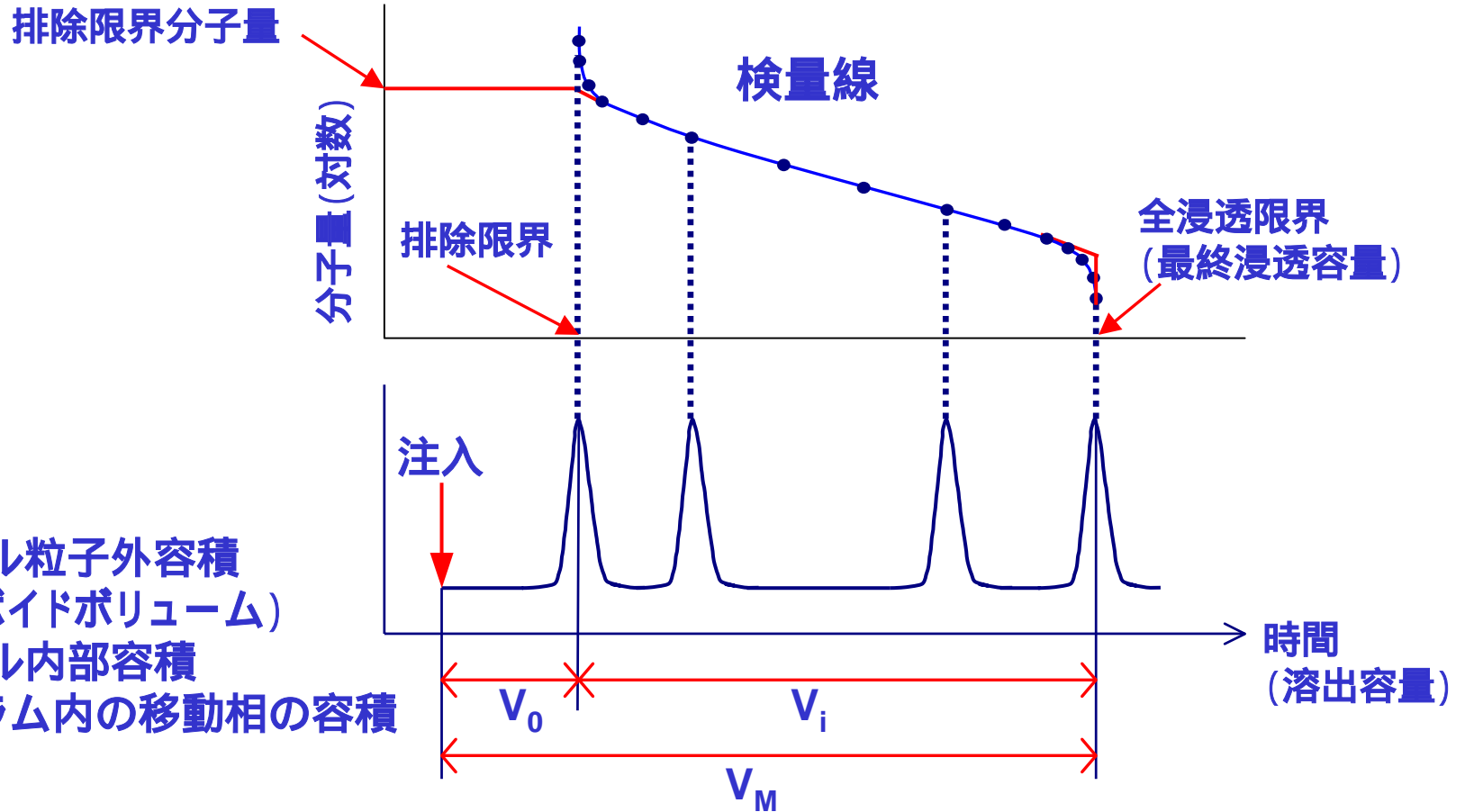
# サイズ排除クロマトグラフィー3

## Size Exclusion Chromatography

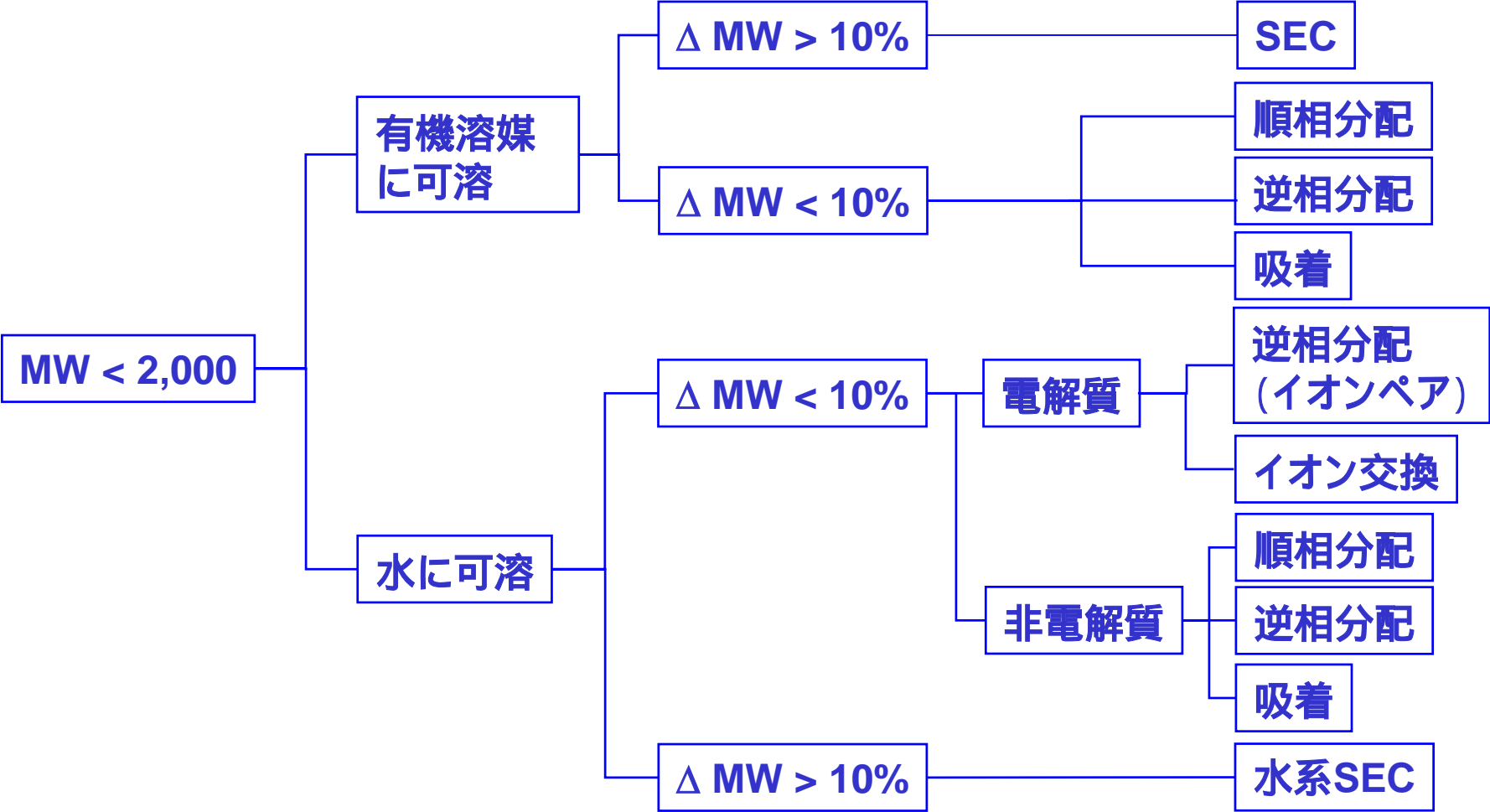
### 標準ポリスチレンの分離例



# 排除限界と最終浸透容積 - 検量線

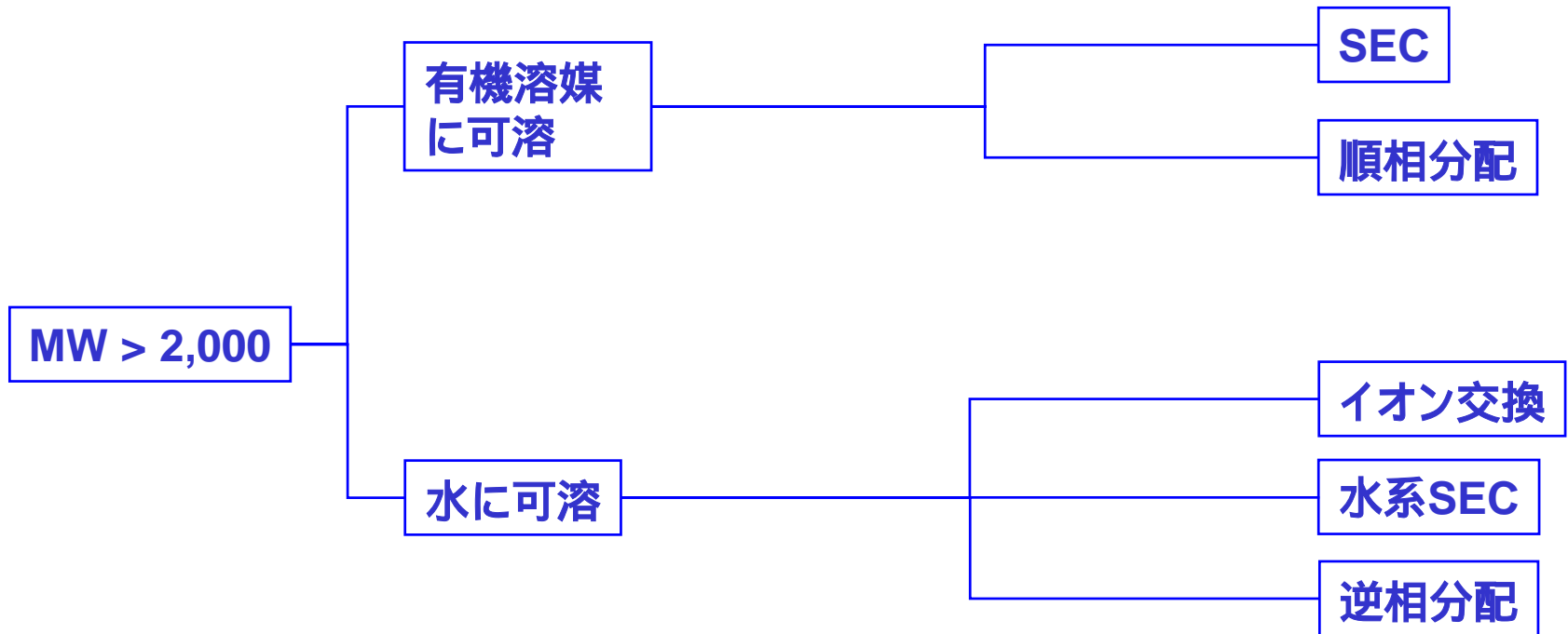


# HPLCカラムの選択A (1)

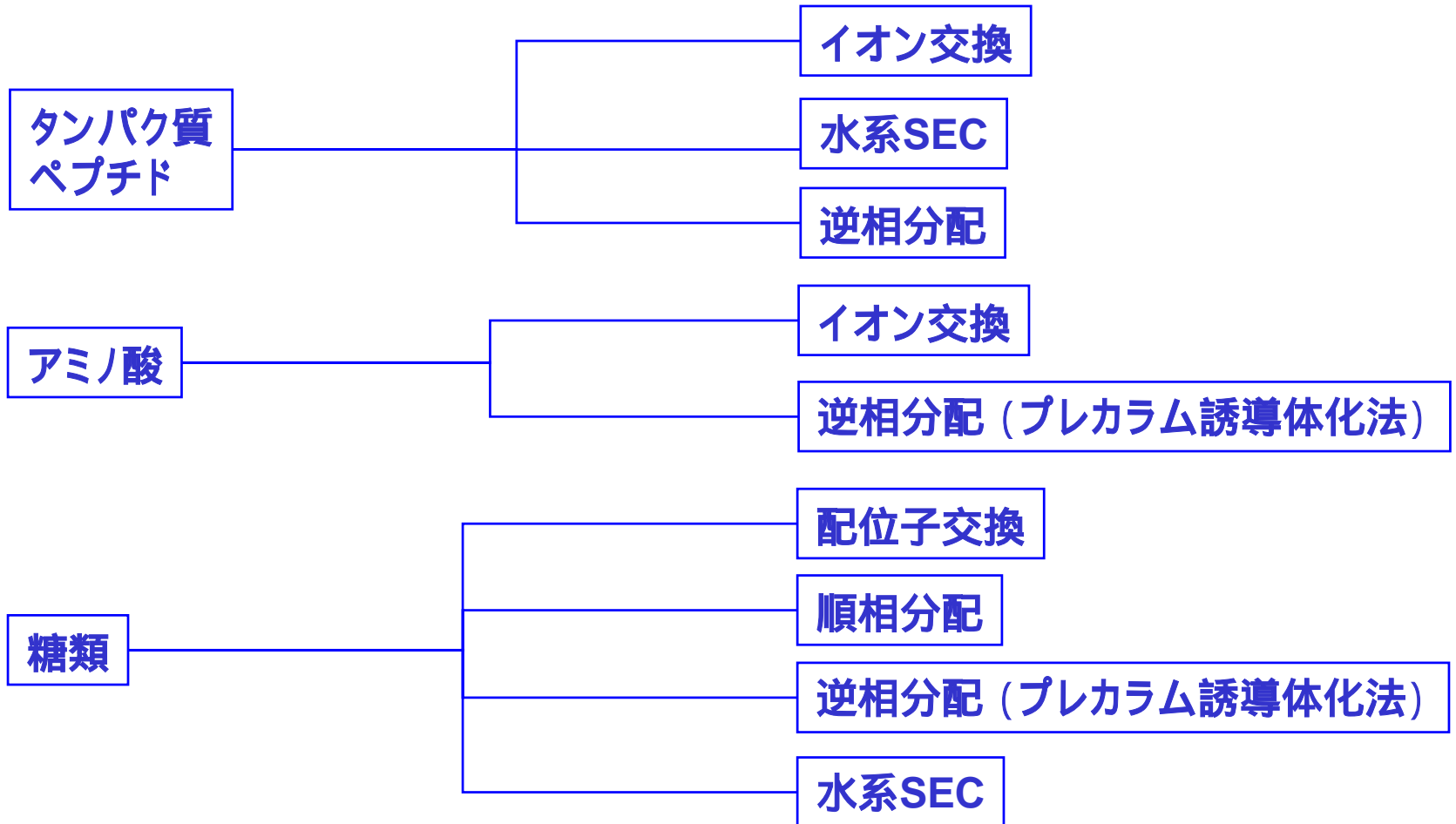




# HPLCカラムの選択A (2)



# HPLCカラムの選択B (1)



# HPLCカラムの選択B (2)

