

失敗しない液クロ分析

—試料前処理と溶離液作成のコツ—

演習の解答

◆第1章◆

1 タンパク質は多数のアミノ酸が結合してできている分子であり、分子量は約 5000 から数十万にのぼる。タンパクを酵素で切断するとペプチドになり、分子量が小さくなる（分子量約 2000～5000）。ペプチドには機能をもつものも多い。アミノ酸はより分子量が小さく 90～150 前後である。

2 限外ろ過膜には多くの種類があるので、その中から選択する必要がある。たとえば、まずは分子量 2000 以下が通過する膜で脱塩する。ペプチド類は残り液（チューブの中）に含まれる。処理は簡単であるが、装置は比較的高い（20～30 万円）。

現在は塩分計の精度が上がり、汎用されている。電気伝導度を利用するもので、溶液中の電気伝導度から食塩量を求めるものである。硝酸銀活用の塩化物イオンの滴定分析法は、煩雑であるが丁寧に行えば正確な定量値を得られる。その他には屈折率を利用したボーマ比重計を用いると、おおまかではあるが容易に測定できる。

3 油分抽出法では、分液ロートを使用して何回も抽出を繰り返して分取する。温度を上げないで分離するので、成分の酸化は比較的生じにくい。溶液間の成分抽出に有効である。

ソックスレー抽出器は主に固体試料を専用容器に詰め込み、溶剤を循環させて抽出する。抽出液は何回も循環するので抽出効率は高い。溶媒に応じて温度を調整するが、低目がコツである。一度セットしておけば連続で抽出できるので手間がかからない。

4 α -アミラーゼによって、デンプンをブドウ糖へランダムに分解する。プロテアーゼによって、タンパク質のペプチド結合を切断する。アミログルコシダーゼによって、熱安定 α -アミラーゼによって分解された糖鎖をブドウ糖分子にまで分解する。

別途、タンパク質と灰分を定量して乾燥重量から差し引くことで、食物繊維量が算出される。

5 溶液量が 200 mL 以上あるので、市販のミニディスペンサーやミニカラムでは処理できない。よって、逆浸透膜セルで 500 mL 処理可能な装置で行う。分子の小さいものを除外できる。ゲルろ過クロマトグラフィーは低分子分画用のゲルを選択する（たとえば分子量 1500 以下など）。順次分画してくるので、適度に分取できる。

6 試料の塩分濃度を 1/10 にする簡単な方法として、膜による脱塩処理があげられる。イオン性膜を利用して分画すればよい。多くのイオン交換膜が市販されているので、そこから選択して使用する。

より正確に分離するにはゲルろ過クロマトグラフィー（本書 5 ページ参照）がある。分子量分画なので、分子量の差の大きい成分が多く含まれている試料には適している。

7 磨りガラスの品質が上がり、シリコンオイルなどを塗ることは減ったが、長期間の使用で密封性が弱くなったような場合はシリコンオイル等を薄く塗るのは効果的である。

冷却水の温度が低いと効率よく濃縮できるので、できれば低温水循環装置を備えつけるのがよい。冬場は水道水でも可能。

吸引ポンプは種々販売されているが、汎用されているのが水流ポンプである。溶剤などが微量入ってもポンプの故障は起きにくい。

減圧度合を大きくすると効率よく濃縮できるので、オイル式ポンプが適している場合もある。この際は酸、有機溶媒などがオイルに混入すると性能が劣化するので、オイル交換が必要である。

回転フラスコには試料は半分程度とすること。多くすると噴き出す可能性がある。温度を低くして、成分の劣化を防ぎながらの濃縮なので、温度調整が十分効くウォーターバスを使用する。

低温処理がエバポレーターの特徴なので、温水浴の温度制御は正確なほうがよい。ほとんどの製品に、設定温度になれば自動でオン・オフされる機能があるので光熱費の節減になる。200 mL~2 L 程度のフラスコが設置できるものにする。

8 分子量の大きい順にオリゴペプチド、タンパク質、ウイルスになるので、まずは精密ろ過膜でウイルスを分取する。次にタンパク質を分子サイズの限外ろ過膜を使用してタンパク質を分取する。

たとえば、分子量 500 前後の限外ろ過膜を通せば、通過液にオリゴペプチド、残液にタンパク質類が含まれる。

◆第2章◆

1 ペプチドの分子量を求める問題なので、ペプチドよりも分子量の小さなアミノ酸と食塩を除く前処理が必要となる。一般的には次の二つが考えられる。

①1000 MW 以下が通過する中空糸膜を用いた限外ろ過。

②500～3500 MW を分画できるゲルを用い、ゲルろ過クロマトグラフィーで溶出分離する。

2 油分をよく抽出する有機溶剤を選ぶこと。具体的にはクロロホルム、塩化メチレン、ヘキサンなどである。後に成分の含有量を計算することを前提に、同量の 100 mL を追加して行う。

注意事項としては、20 mL 入のだから分液ロートの寸法は 300～500 mL にすること。よく混合するように上下に振る。上部の空気溝を開け、圧抜きをする。この工程を 3 回ほど行う（3 回合計で 100 回ほど振る）。

3 薄層クロマトグラフィーでは、ガラスのプレートにシリカゲル（順相）、アルミナ、化学修飾型シリカゲルなどの吸着剤を一定の厚さに展着させて薄層板に試料を塗布し、溶媒を展開させ、 R_f 値を求め、定性定量を行う。

（1）化学修飾型クロマトグラフィーの種類

タイプ	略名	官能基 (R)	特徴
逆相タイプ	RP-2	ジメチルシリル	脂質、多環芳香族などの無極性、または低極性物質の分解、イオンペア法を用いた塩基性または酸性物質の分解に適する。
	RP-8	<i>n</i> -オクチルジメチルシリル	
	RP-18	<i>n</i> -オクタデシルジメチルシリル	
NH ₂ タイプ	NH ₂	プロピルアミノ	カルボン酸、スルホン酸、リン酸、ヌクレオチド、ヌクレオシド、核酸塩基、フェノールなどの分解に適する。
CN タイプ	CN	γ -シアノプロピル	順相、逆相いずれかの分離モードにも対応。ステロイド、フェノール、アルカロイドなどの分離に適する。

【操 作】

- ・TLC の溶媒系（溶離液）を選択する。
- ・TLC プレートに試料をスポットする。
- ・さまざまな溶媒系で展開し、一番下のスポットが $R_f \geq 0.35$ となるような溶媒系を検討す

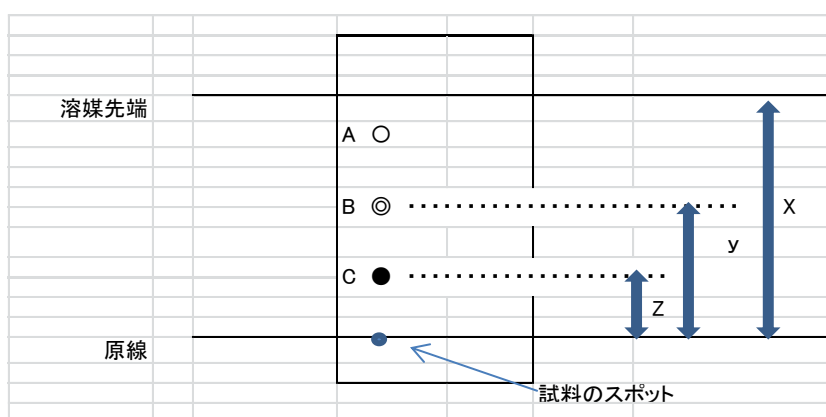
る．順相系で最もよい溶媒組成はヘキサン－酢酸エチル系である．

※ $Rf \geq 0.35$ の物質はすべて分離してくる． $Rf < 0.35$ ではその物質は分離してこない（カラムから出てこない）．

※ $\Delta Rf \geq 0.2$ が望ましい分離が得られる条件である．

【 Rf 値について】

TLC では Rf 値で物質を同定する． Rf 値は，その物質が TLC 上で溶媒を展開したとき，どのくらい移動したかを現すものです．この値が大きいほど移動速度が速く，TLC の上のほうにその物質のスポットが見える．これをカラムに置き換えると，カラム内の移動が速い＝早く溶出されることになる．



Rf 値が大きい＝速く溶出する

4 近年，有機化学の分野において，分離や精製はますます重要になってきている．有機系研究室では，従来は TLC（薄層クロマトグラフィー）で目的とする物質を検索し，その物質を単離したいときは，通常はカラムクロマトグラフィーを行っていた．しかし，カラムクロマトグラフィーは分離時間が非常に長く，天然物や反応成分の単離実験などにおいては，しばしば拡散による回収率の低下や目的物質の変性がネックになることがあった．

そこで，分離能の向上と迅速性，さらに安易に行える粗精製（汚染物質，夾雑物質などの除去）を目的としてフラッシュクロマトグラフィーが開発され，現在では多くの研究室で分離，精製の手段として広く使われている．通常は 15 時間ほどかかり，特に多成分系の分離には数日を要する場合もある．流出液の分取にはフラクションコネクターを用いる夜間運転を行い，途中で実験を中断しないようにする．

フラッシュクロマトグラフィーは，アメリカの研究者 W. Still らによって発表された方法で，比較的粒子径の細かい（20～60 μm 程度）シリカゲルなどの充填剤を詰めたカラムを用い，圧縮空気などの加圧下に溶媒を展開させ，分離を行う．分離能はオープンカラムによる方法と高速液体クロマトグラフィーとの中間に位置し，プレパックカラム（ローバー）

を用いる中圧液体クロマトグラフィーに匹敵する。数 mg から 20 g 程度の試料を良好な分離能で分離でき、しかも要する時間も短く特別な機器（送液ポンプ、試料注入装置など）も必要としない点で経済的である。

カラムの寸法、充填剤の量、流量、試料との関係などがわかれば、フラッシュクロマトグラフの設定に大いに役立つ。これをある程度理解して実験しないと、無駄な充填剤、溶液を使ってしまう。

5 常圧蒸留は 1 atm (760 mmHg) の压力下で蒸留する基本的な蒸留法。 P_A (成分 A の蒸気圧) + P_B (成分 B の蒸気圧) = 760mmHg で沸騰が始まる。

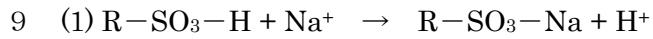
減圧蒸留は、常圧では高い沸点をもつ物質を、減圧により沸点を下げて蒸留する操作である。たとえば富士山では、平野より気圧が低いので水が 90° C 前後で沸騰する。この沸点の低下を、有機化合物の分離など利用する。蒸留装置の内部を減圧にし、系の内部の圧を下げることにより、低い温度で蒸留できる。 P_A (成分 A の蒸気圧) + P_B (成分 B の蒸気圧) = P (系の圧力) で沸騰が始まる。

水蒸気蒸留は水に溶けない物質に水を加えたり水蒸気を吹きこんだりして、水蒸気とともに物質中の揮発成分を蒸留する方法である。それぞれの物質の沸点よりも低い温度で蒸留できる。すなわち、高沸点成分も比較的低温で蒸留できる。植物の精油などの分離・精製に用いる。このとき、蒸気圧はモル分率に依存せず、純粋な蒸気圧 P と見ることができ。 $P_A < P$ (系の圧力) では沸騰しないが、 $P_A + P_W < P$ (系の圧力) とすることで沸騰する。

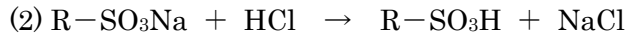
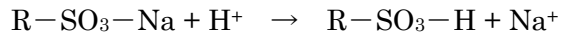
6 アセトン → クロロホルム → メタノール → ○ヘキサン → ○エタノール → アセトニトリル → プロパノール

7 試料溶液中に 25%アセトニトリルが入っていると、真空ポンプ中のオイルに混入し、オイルの粘度を下げ、真空度到達時間および真空度性の性能が落ちる。そのため、試料中のアセトニトリルをエバポレーターで 0.5%以下にする（その判定はミニ HPLC か TLC で行う）。かつオイル中に徐々に有機溶媒が混入してくるので、ときどき交換する必要がある。オイルの劣化度をチェックする方法を身につけておくとよい。

8 最近は両性イオン交換樹脂が多く開発され、塩類の吸着比率が高いものが手に入るようになった。自分で詰めてもいいが、ポリカラムやカートリッジになっているものも多い。逆相系樹脂も利用されるようになった。ペプチド、タンパク質の分離には、アフィニティ樹脂、イオン交換 (IEX)、およびサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) などの手法がある。量的に多く処理する際は透析法が簡単で迅速である（本書 3 ページ参照）。



再生する反応は次の通り.



10 陽イオン交換樹脂は純水を製造した後に塩酸水で再生し，陰イオン交換樹脂は純水を製造した後にアルカリ水で再生する．元の状態にして何度も純水に置き換えることができる．

11 ODS は疎水性基の作用の大きなゲルなので，それと逆のものを選ぶ．たとえば分子量分画ゲル，イオン交換のような異種の分離メカニズムのもの，ODS と真逆の化学修飾型ゲル（たとえば ARG 基をもつゲル）などを試してみる．

◆第3章◆

1 カフェインの溶解度は水に比べてはるかに高いものを選ぶ。クロロホルム、ヘキサンなどが考えられるが、より分配比率の高いクロロホルムが使われる。

市販のコーヒー飲料を 5 mL 取り、分液ロートに入れ、同量のクロロホルムを上部から注ぎ、本文中のように 3 回クロロホルムを入れ換え、全量を合わせてロータリーエバポレーターで濃縮後、HPLC 溶離液にて混合し、メンブレンフィルターでろ過する。操作中の残存カフェイン量をチェックするには TLC が簡便でよい。何検体も同時に見られるので、比較もしやすい。

2 カフェイン (100 mg) はクロロホルムに 8, 水に 2 分配されるので、1 回目でクロロホルム中に 80 mg 抽出される。2 回目ではその 80% が抽出できるので 64 mg になり、3 回だと 51.2 mg となる。分配クロマトグラフィーはこの溶解性を利用したクロマトグラフィーである。

3 遠心分離処理 ⇒ 微細金網処理 ⇒ No.2 ろ紙 ⇒ No.6 ろ紙 ⇒ メンブレンフィルター 0.45 μm

粗い分離から徐々に微細にしていくこと。この操作は前処理には欠かせない。

4 ODS は疎水性基の作用の大きなゲルなので、それと逆のものを選ぶ。分子量分画ゲルを試す、イオン交換のような異種の分離メカニズムを用いる、ODS と真逆の化学修飾型ゲル (たとえば ARG 基をもつゲル) を試すなど。

5 通常、塩酸、ギ酸、酢酸、リン酸は研究用に使用される抽出剤であり、酢酸 (CH_3COOH , 分子量 60) は食品工業でも使用される。非常によく使われるのは酢酸である。微抗菌作用もあり、価格も安い。ただ臭いが残りやすい。クエン酸、リン酸は酸がきつくなく、健康にもよいが結晶として残る

6 アントシアニン-3-グルコシド 0.2% は 1 L 中に 2 g である。アントシアニン-3-グルコシド 1 モルは 450 g だから

$$2 \div 450 = 0.0044 \rightarrow 4.4 \text{ mmol}$$

7 (1) 葉酸の HPLC 測定限界が 0.01 mmol とすると、通常は 0.02~0.10 程度にクロマトグラムの感度を合わせる。ここでは 0.1 mmol に合わせて計算する。

(2) ブロッコリー 2 L 抽出溶液中に 0.5 mg になるから、それを 100 mL に濃縮すると 0.5 mg になる。葉酸 0.10 mmol は 4.41 mg なので、測定可能にするには、さらに 8~10 倍濃縮する必要がある。

8 圧力は、表面積に反比例するので、最初のカラムの表面積は $2 \times 2 \times 3.14$
置き換えるカラムの表面積は $5 \times 5 \times 3.14$
表面積比は $25 : 4 = 6.25 : 1$
圧力 P は 6.25 倍下がり $10 \div 6.25 = 1.6 \text{ kg/cm}^2$

9 1 mol は 420 g であるから、0.2 mmol は 0.084 g である。よって
 $0.084 : 32 = X : 40 \quad \therefore X = 0.105$
答えは 0.105 g となる。

10 850 mL 中に KH_2PO_4 (リン酸水素カリウム) が何 mg 必要かと、420 mL 中に KH_2PO_4 が何 mg 必要かを計算する。多いほうから少ないほうを引いたら、答えが出る。
850 mL 中には 0.0215 g 必要である。
420 mL 中には 0.0105 g ある。
よって $0.0215 - 0.0105 = 0.011 \text{ g}$
420 g の溶液に 0.011 g を加えて、850 mL にメスアップする。

11 ・波長を変える→×

波長を変化させるのは検出器の感度を上げる方法で、分離度 (R_s) とは関係ない。

・メタノールをアセトニトリルに変える→○

ODS の場合は充填剤の表面の親水性・疎水性の度合いで分離度を変化できるので、正解である。

・溶離液の pH を変える→○

pH の変化も親水性・疎水性に影響を及ぼし、分離度を上げるので正解である。

・流速を上げる→×

流速を上げてピークのリテンションタイムが速くなるだけで、分離度は上がらない。

・カラム温度を変化させる→×

ほんの多少は分離度に影響することもあるが、ほとんど効果はない。

12 成分 20 mg を全部注入し、分取すると、 $20 \text{ mg} \times 0.95 = 19 \text{ mg}$ になるが、ピークの重なりが 25% であったので、 $19 \text{ mg} \times 0.75 = 14.25 \text{ mg}$ となる。

◆第4章◆

$$1 \quad (1) \text{質量パーセント濃度}(\%) = \frac{110(g)}{110 + 100(g)} \times 100 = 52.38\ldots(\%)$$

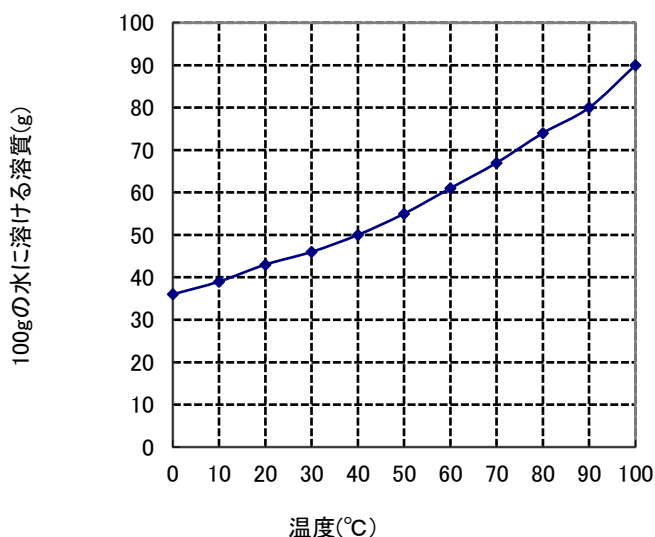
(2) 60 °Cにおける飽和溶液は 122 g であるから，全体量は 220 g になる．よって 50 g 中には
 は $122 \times 50 \div 220 = 27.7 \text{ g}$

$$2 \quad 20 \text{ °Cで } 85 \text{ g 溶けるから，} 185 \text{ mL 中に } 85 \text{ g 溶けている．} 1 \text{ L 中には}$$

$$85 \times (1000/185) = 459.4 \text{ g} = 5.40 \text{ mol}$$

3

物質Aの溶解度曲線



4

1000	×	1.85	×	$\frac{98}{100}$	×	$\frac{1}{98}$	=	18.5	[mol/L]
------	---	------	---	------------------	---	----------------	---	------	---------

5 アンモニアの分子量は 17.0 だから，1L 中には $x = 17 \times 8.5 = 144.5 \text{ g}$ 溶けている．これを 10 分の 1 にすると 14.45 になる．

100 g 中に 14.45 g で密度が 0.95 g/cm^3 だから $14.45 \times 1 \div 0.95 = 15.2\%$

6 緩衝液を用いる系では有機溶媒類をほとんど使用せず，水溶液中心で緩衝試薬も少量なので，微生物が生育しやすい環境にある．

7 炭酸水素ナトリウム (NaH_2CO_3) の分子量が 84 なので，1000 mL 中に 84 g 入っていれば 1 mol/L である．よって 1000 mL なら

$$0.5 \times (1 / 1000) \times 84 = 0.042 \text{ g}$$

必要である．いまは，500 mL の調整なので，0.021 g となる．

◆第5章◆

1 アセトニトリルは低波長まで吸光度はないので高感度測定に有利である。メタノール、エタノールの順に吸光度が高くなる。

また、アセトニトリルはカラムに対する負荷圧が低いので低圧での分析に有利である。カラム圧力が高すぎると、HPLC では測定に良い影響を与えない。

補足：欠点としては、アセトニトリルは人体に悪影響がある。逆に悪影響が低いのはエタノールである。ゆえに廃棄も慎重に管理する必要がある。また価格も高い。

2 溶媒グラディエントは、溶媒の混合する混合器の位置（送液ポンプの入口側か出口側か）により低圧グラディエントと高圧グラディエントの 2 種類に分けられる。低圧グラディエントは、送液ポンプの吸引側、つまり圧力が加わっていない箇所です溶媒を混合し、逆に高圧グラディエントは送液ポンプの吐出側、つまり圧力が加わった箇所です溶媒を混合するため、このように呼ばれている。図 8.5 を参照。

高圧グラディエントの利点は、高圧下で混合されるため、混合により気泡が発生しやすい組合せでも気泡が発生しにくいこと、分析カラムに近い位置で混合されるため、カラム内の溶離液組成の変化に対する時間の遅れが少なくてすむことがある。欠点として、混合する溶媒の数だけ送液ポンプが必要になることがあり、装置のコストが高くなる。

一方、低圧グラディエントの利点は、1 台の送液ポンプと電磁弁で構成されるため、シンプルなシステムが構成できることである。欠点は、大気圧下で混合されるため、気泡が発生しやすいことである。この現象は、混合により熱（混合熱）が発生する溶媒の組み合わせではさらに顕著になる。

3 紫外検出器：試料溶液の吸光度を測定する装置で、一般的な検出器、現在は高感度三次元検出器が汎用されている。

蛍光検出器：測定試料に励起波長を当て、その励起された吸光度を測定する、紫外検出器の 1000 倍程度の感度をもつ。

屈折率検出器：測定試料の屈折率の差を測定する装置。感度は低い、ほとんどの成分の測定に使えるという特徴がある。

4 A ピークを $R_t1.0$ とすると効率よくクロマトグラムを得ることができる。

分離度 R_s

$$R_s = 1.2$$

$$1.2 = 11.2 - 10.0 / 1$$

$R_t 1.2$ と 10.0 のピークを得る。理論段数を N とすると

$$N = 5.54 \times (11.2 \div 0.25)^2 = 11119$$

この値をグラフ用紙に描けばよい。ピークの高さは自由に描いてよい。

5 光が一つの媒質から外の媒質に入るとき，その境界面で進行方向が変る現象を光の屈折という．入射角 i の正弦と屈折角 γ の正弦の比は，入射角と無関係に一定の値をとり，これを媒質Ⅱの媒質Ⅰに対する屈折率または相対屈折率 n という．

$$n = \sin i / \sin \gamma$$

よって問題のガラスの屈折率は

$$n = \sin 60^\circ / \sin 30^\circ = \sqrt{3} = 1.73$$

6 屈折率検出器 (RI) は溶離液と成分液の屈折率の差を検出し定量するものであるが，グラディエント溶離液は，分離度を上げるために濃度を変化させて溶出させるので逐次屈折率の差が生じるためである (コンピュータなどの波形処理がより進めば定量計算も可能になる)．

7 半径 2.1 mm なので

$$0.21 \times 0.21 \times 3.14 = 0.138 \text{ mm}^2$$

$$100 \div 27.5 = 34.4 \text{ } \mu\text{L}$$

$$0.034 \div 0.138 = 0.25 \text{ cm}$$

カラム半径が倍になるので

$$4.4 \div 17.64 = 0.25$$

ゆえに $0.25 \times 0.25 = 0.063 \text{ cm}$

8 (1) C_{18} (オクタデシル基)， C_8 (オクチル基) は疎水性相互作用， NH_2 基は塩基性の陰イオン性相互作用．

C_{18} ， C_8 は有機溶媒系． NH_2 基は陰イオン性相互作用のアミノ基は緩衝液使用

(2) シリカゲル SiO_2 に C_{18} ，シリカゲル SiO_2 に C_8 ， NH_2 基はシリカゲルあるいは合成樹脂にアミノ基．

◆第6章◆

$$1 \quad 2 \times 2 \times 3.14 \times H \times 0.15 = 20 \times 1 / 1000$$

$$\therefore H = 0.0106 \text{ cm}$$

- 2 (1) イオンペアを試料どうしで結合し，ODS 表面との保持力が変化するため。
(2) イオンペア試薬の試薬により差があるが，濃度は 2～10 ppm，温度は 20～30℃。
(3) 本文を参照。

3 HPLC 装置の流路全体にアセトニトリル，メタノールなどの有機溶媒が満たされている。まず純水とよく混合する溶剤，たとえば 20%メタノール水を約 200 mL 作る。そして，吸引フィルター（サクションフィルター）をそのままメタノール水ボトルに入れる。次に使用していたカラムを外し，カラム栓で止めておく。出口にミニビーカーを備える（処理に時間がかかるようであれば，検出器の入り口をシリンジなどで液注状態で保管）。次にポンプより溶液を流す。1 分間 1 mL で通常約 15～25 分。緩衝液は有機溶剤には溶けないので，次には純水で同様に流路洗浄し，検出器，フラクションコネクターにも流しておく。

4 HPLC 装置の流路全体がアセトニトリル 75%で満たされていると考え，アセトニトリルの濃度を徐々に下げていく。アセトニトリルとよく混合するエタノール 20%水溶液を各 50 mL 作成する。次にカラムを外し，密封し，配管には受け皿を準備し，エタノール 20%水溶液を流す。通常は 1.2 mL /分で送液する。次に純水で同様の操作をする。その後，新規のカラムを装着する。

5 本文を参照。

6 イオンペアクロマトグラフィーは，移動相中にイオンペア試薬を混ぜて行う逆相クロマトグラフィーである。イオンペア試薬が解離しているイオン性化合物と一緒にになり，解離が打ち消され，逆相充填剤に保持される。イオンペア試薬の種類と濃度はもちろん，温度も保持に大きく影響する。したがって，カラム温度を一定に保つことが重要である。一般に温度を上げると保持力は小さくなる。一般にイオンペア試薬のアルキル鎖が長くなるほど試料の保持力は大きくなる。また，イオンペア試料の濃度がある一定濃度まで高くなるほど試料の保持力は大きくなる。

$$7 (1) [H^+] = 0.01 \times 1 = 10^{-2} \times 1 \text{ mol / L} \quad \text{pH}=2$$

$$(2) [H^+] = 0.1 \times 1 = 10^{-1} \times 10^{-2} = 10^{-3} \times 1 \text{ mol / L} \quad \text{pH}=3$$

$$(3) [OH^-] = 0.01 \times 1 = 10^{-2} \times 1 \text{ mol / L} \quad \text{pH} = 14 - 2 = 12$$

$$(4) [OH^-] = 0.01 \times 0.1 = 10^{-3} \text{ mol / L} \quad \text{pH} = 14 - 3 = 11$$

$$8 \quad 0.02 \times (2.0 \times 10^5) / (1.0 \times 10^5) \times (2/1) = 0.08 \text{ L} = 80 \text{ mL}$$

◆第7章◆

1 アセトニトリル 0.782 81.7 °C

メタノール 0.791 64.5 °C

エタノール 0.785 78 °C

プロパノール 0.804 97 °C

アセトン 0.790 56 °C

2 (1) 溶離液で希釈 (2) イオン交換モードカラム

(3) 溶離液はリン酸緩衝液

◆第8章◆

1 (1) RPC：水系と有機溶媒グラディエント GPC：有機溶媒中心（表 8.2 参照）

SEC：有機溶媒中心（表 8.3 参照）

(2) RPC：疎水性分離 GPC：タンパク質等生体成分の分子量サイズ分離

SEC：ポリマー，重合度等の分子量サイズ分離

2 (1) 水溶系の緩衝液

(2) ゲルとのマトリックスメカニズム

3 HPLC 装置の流路全体にアセトニトリル，メタノールなどの有機溶媒が満たされているとして，緩衝溶液にする方法を例に述べる．まず純水とよく混合する溶剤，たとえば 20% メタノール水溶液を約 200 mL 作る．そして，吸引フィルター（サクションフィルター）をそのままメタノール水ボトルに入れる．次に現在使用のカラムを外し，カラム栓で止めておく．出口にミニビーカーを備える．次に緩衝液は有機溶剤には溶けないので，ポンプより温水純水を流す．1 分間 1 mL で通常約 15～25 分，次には使用溶離液で同様に流路洗浄し，検出器，フラクションコネクターにも流して準備しておく．

4 (1) イオンペアクロマトグラフィーは，移動相中にイオンペア試薬を混ぜて行う逆相クロマトグラフィーである．イオンペア試薬が解離しているイオン性化合物と一緒にになり，解離が打ち消され，逆相充填剤に保持される

(2) イオンペア試薬の種類と濃度はもちろん，温度も保持に大きく影響する．したがって，カラム温度を一定に保つことが重要である．一般に温度を上げると，保持は小さくなる．一般にイオンペア試薬のアルキル鎖が長くなるほど試料の保持は大きくなる．また，イオンペア試料の濃度がある一定濃度まで高くなるほど試料の保持は大きくなる．

(3) イオンペア試薬は現在，東京化成工業を中心に数 10 種類以上市販されている．それぞれの分離メカニズムはホームページなどで説明されている．

5 HPLC 装置の流路全体にアセトニトリル，メタノールなどの有機溶媒が満たされているので，まず純水とよく混合する溶剤，たとえば 20% メタノール水溶液を約 200 mL 作る．そして，吸引フィルター（サクションフィルター）をそのままメタノール水ボトルに入れる．次に現在使用のカラムを外し，カラム栓で止めておく．出口にミニビーカーを備える（長時間処理に時間がかかるようであれば，検出器の入り口をシリンジなどで液注状態で保管）．次にポンプより溶液を流す．1 分間 1 mL で通常約 15～25 分，緩衝液は有機溶剤には溶けないので，次には純水で同様に流路洗浄し，検出器，フラクションコネクターにも流しておく．