

# 逆相液体クロマト分離の最適条件探索に関する研究の現状と課題

The Current Status and Related Issues of Studies on Optimization Strategies of Separation Conditions of Reversed-Phase Liquid Chromatography

宮部 寛志\*・鈴木 基之\*\*

Kanji MIYABE and Motoyuki SUZUKI

逆相液体クロマトグラフィーは現在、混合試料の分離分析だけでなく、目的物質の分離精製法としても適用されており、クロマト分離の目的や条件が異なる条件下において幅広く利用されている。また均一溶離法だけでなく、グラジエント分離法も適用される。本報では、目的や方法論の異なるこれらの各種逆相液体クロマト分離の最適条件探索法について既往の研究を整理し、今後の研究課題について考察する。

## 1. 緒 言

クロマト分離の目的が混合試料の分離分析、あるいは目的物質の分離精製のいずれの場合も、クロマト分離を実用化する上で最も重要な課題は、最適なクロマト分離条件の探索、設定である。

最適なクロマト分離システムでは、試料中の各成分が完全に、迅速に分離、検出される。さらに分取クロマト分離では、高い試料負荷量と回収率が要求される。これらすべての要件を満足するような最適クロマト分離条件を設定することは難しく、“最適”の定義は、クロマト分離の目的に応じて異なる。ルーチン分析に高速液体クロマトグラフィーを使用する場合には、試料組成が既知であるため、目的の分離が得られる範囲での高速で正確なクロマト分離が要求される。一方、未知試料を分析する場合には、分析時間の短縮よりも混合物中の各成分の完全分離が第一に要求される。分取クロマト分離では、試料組成や各ピークの溶出順序や形状などのクロマト分離傾向は、予備検討の結果から既知であることが多い。クロマト分離性能については、カラム部分での分離だけでなく分離システム全体としての分離効率が議論される。目的ピークの分離度ではなく、試料負荷量、回収率やクロマト分離時間などから計算される生産速度を指標としてクロマト分離条件の最適化が検討される。

逆相液体クロマト分離に対する固定相のアルキル鎖長や移動相中の有機溶媒組成の影響に関する基礎的研究結果より、クロマト分離の分離度と、試料負荷量の向上や分離の高速化とは、互いに相反する要件であることがわかる。つまりクロマト分離条件の最適化とは、クロマト

分離の目的に応じてこれらの適当な妥協点を見つける操作といえる。液体クロマト分離の分離特性は移動相条件の検討により簡便かつ効果的に調節することができるため、液体クロマトグラフィーの最適分離条件の設定は多くの場合、移動相条件の最適化によって行われる。実際には、クロマト分離の理論的解析と実験データの測定を組み合わせる場合が多い。

逆相液体クロマトグラフィーは従来からの分離分析だけではなく、目的物質の分離精製法としても利用されつつある<sup>2), 3), 7), 8), 24), 29), 33), 34), 37)~40), 44), 55), 56)</sup>。また均一溶離法の他、グラジエント法も利用されている<sup>27), 28)</sup>。本報では、これら目的や方法論の異なる条件下での逆相液体クロマト分離の最適条件探索法について既往の研究を整理し、今後の研究課題について考察する。

## 2. 分析クロマト分離

### 2.1 最適クロマト分離条件の実験的探索法

クロマト分離の実測データを解析する実験的な最適なクロマト分離条件探索法として、格子状探索法、系統的探索法、反復法やウインドウ・ダイアグラム法などが提案されている<sup>5), 6), 12), 13), 35), 36), 43), 51)</sup>。これらの特徴を表1に示す。これらの方法では、クロマト分離条件を変化させてそれに対するクロマト分離挙動の変化を実測し、その結果から最適なクロマト分離条件を推定する。クロマト分離を評価する指標としてはさまざまな関数や、分離係数が利用される<sup>43)</sup>。

分析クロマト分離の最適条件探索法としては、これらの他にもさまざまな方法が提案されている。これらの方法は実際的ではあるが、ピーク形状や分離度によってはクロマト分離を正確に評価できない場合もある。またいずれの場合も、初期条件の設定や指標関数として利用す

\*栗田工業(株) 総合研究所

\*\*東京大学生産技術研究所 第4部

表1 分析クロマト分離の最適条件探索法の比較

条件探索法	長 所	短 所	備 考
格子状探索法	<ul style="list-style-type: none"> <li>・操作が単純</li> <li>・クロマト分離条件検討の自動化が容易</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・必要なデータ数が多い</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・移動相条件をできるだけ細かく変化させる</li> <li>・最適条件探索の効率化は考慮しない</li> </ul>
系統的探索法	<ul style="list-style-type: none"> <li>・効率良く系統的に最適化する</li> <li>・必要なデータ数は少ない</li> <li>・相互に関連のある複数のパラメータを同時に検討できる</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・最終的な結果が初期条件の設定により異なる場合がある</li> <li>・局所的な最適条件設定の段階で検討が終了する場合がある</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・初期条件の設定を的確に行う必要がある</li> </ul>
反復法	<ul style="list-style-type: none"> <li>・必要なデータ数は少ない</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>・探索範囲を次第に絞る</li> </ul>
ウインドウ・ダイアグラム法	<ul style="list-style-type: none"> <li>・簡便</li> <li>・必要なデータ数はそれほど多くない</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・分離係数だけが指標、ピーク幅は考慮しない</li> </ul>	

る関数の種類によって、最終的に得られる最適条件の内容が異なる場合がある。

## 2.2 分析クロマト分離の最適条件探索に関する研究のまとめと課題

カラムに微量の試料を注入する分析クロマトグラフでは、分離対象物質の濃度が低く、吸着等温線の直線領域においてクロマト分離が行われるため、ピーク形状はガウス分布に近い形となる。試料間の相互作用やクロマト分離に対する吸着質濃度の影響は無視される。その分離挙動の解析には従来のクロマト分離理論の適用が可能であり、クロマト分離の保持挙動とピークの拡がりが主に議論される。

- ①逆相液体クロマト分離の保持挙動の解析：移動相組成、固定相のアルキル鎖長や吸着質の構造の影響については多くの研究が行われ、さまざまな相関関係が報告されている。
- ②ピーク幅の拡がりの解析：移動相流速、固定相の粒子径やカラム長さなどの影響については、段理論や速度論的解析法を利用してその概略がほぼ類推できる。

このためクロマト分離性能を理論段数や分離度などの指標を用いて総括的に評価し、適当なクロマト分離条件を探索することは、従来のクロマト分離理論を利用しても行うことができる。しかし、カラム内や固定相粒子内の物質移動に対するアルキル鎖長や移動相組成などの影響を解明し、その知見に基づいてより厳密なクロマト分離条件の最適化を行う場合には、さらにクロマト分離機構に関する基礎的な研究が必要である。

グラジエント分離データから、均一溶出分離の最適条件を探索する方法も提案されている<sup>27), 28), 50)</sup>。しかし、段理論をグラジエント分離に近似的に適用している点や、データ処理の際に用いる見かけ上のキャパシティーファクターの値の理論的根拠が明確ではないことから、この方法によって設定されるクロマト分離条件は厳密に最適化されたものではない。移動相条件が逐次変化するグラジエント分離の理論的解析は均一溶出法の場合より難しいが、グラジエント分離データを正確に解析できる理論やモデルを開発することが、グラジエント溶出法利用による均一溶出分離条件の最適化を可能にする。そのためには、液相吸着特性に対する移動相溶媒の影響を明らかにすることが必要である。

## 3. 分取クロマト分離

物質の分離精製を目的とする分取クロマト分離では、目標の純度で、いかに高収率、迅速に目的物質を分離精製するかという点が重要であり、生産速度をできるだけ高めることが必要である。さらに、工業的規模での生産を目的とする分離精製の場合には、目的物質の精製に要するコストの低減が最も重要な課題である。このため、最適なクロマト分離条件の探索が分析クロマト分離の場合よりもさらに強く要求される。分取クロマト分離の分離条件最適化についても、理論的、解析的方法や実験的方法が検討されている。実際には、計算によって推定した結果を実験的に確認し、その実測データを解析してさらにクロマト分離の予測を行うといった方法で、最適なクロマト分離条件が探索される場合が多い。

目的物質の生産速度を向上させるため、分取クロマト分離では一般的に、過負荷条件下においてクロマト分離が行われる。多量の試料の注入は、試料溶液の容量を増

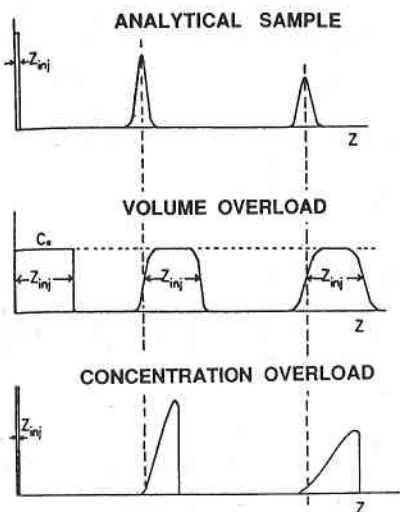


図1 分析および分取クロマト分離におけるピーク形状の模式図<sup>2)</sup>

加させる容量過負荷 (Volume Overload) と、濃度を高める濃度過負荷 (Concentration Overload) の2通りの方法によって行われる。過負荷条件下におけるクロマト分離挙動は、分析クロマト分離の場合とは大きく異なる。図1にそのようすを模式的に示す。すなわち、分析クロマト分離ではカラムに注入される試料の絶対量が少ないため、クロマト分離は吸着等温線の直線領域において行われ、ガウス分布曲線に近い対称性の良いクロマト分離ピークが得られる。これに対して容量過負荷条件では、試料濃度が吸着等温線の直線領域にある場合にはクロマト分離ピークは対称ではあるものの、ピークに平らな部分が現われ、ピーク形状は台形に近くなる。一方、濃度過負荷条件では、カラムに高濃度の試料が注入されるため、クロマト分離過程の大部分または一部が吸着等温線の非直線領域において行われるようになる。その結果、クロマト分離ピークの形状もガウス分布曲線とは大きく異なり、対称性の低い三角形に近い形になる<sup>11)</sup>。

### 3.1 分取クロマト分離のモデル化と理論的解析

過負荷条件下では、吸着等温線の曲線性、各成分間の相互作用や物質移動速度係数の吸着量依存性などがクロマト分離に影響を及ぼすため、クロマト分離過程のモデル化や解析的な取り扱いが難しく、先に示したような分析クロマト分離の理論や最適条件探索法をそのまま適用することはできない。しかし適当な近似を仮定してモデル化し、段理論に基づいて分取クロマト分離過程を解析しようとする検討が行われている。分取クロマト分離性能 (目的物質の純度、回収率や生産速度など) を推算する計算式が提案され、クロマト分離性能に対するクロマ

ト分離条件 (カラム効率、試料の負荷量や組成など) の影響が考察されている<sup>14), 17)–19), 32), 41), 45), 48)</sup>。

吸着等温線の非直線領域における多成分系のクロマト分離過程を厳密に解析できる一般的なモデルはなく、過負荷条件下におけるクロマト分離挙動を正確に解析できるのは、吸着等温線が直線である場合などに限られる。このため、次に示すような数値解析によるクロマト分離のシミュレーションを利用する方法が研究されている。

### 3.2 クロマト分離の数値解析

カラム内における各成分のクロマト分離挙動は、物質収支式、吸着等温線と吸着速度式を連立させ、数値解析することによって予測できる。最近では、分取クロマト分離の解析、装置のスケールアップや最適分離条件の設計に関する研究の多くが、数値計算によるクロマト分離のシミュレーション法を利用して行われている。クロマト分離のシミュレーション計算法としては、Semi-ideal モデル法と Craig モデル法がすでに提案されている。これらの計算法と Stop-go 法の特徴を表2に示す。

①Semi-ideal モデル: Semi-ideal モデル<sup>20)</sup>では、物質収支式を数値解析する際に固定相-移動相間の吸着平衡を仮定し、ピークの拡がりは軸方向混合拡散と物質移動抵抗の寄与を組み合わせた見かけの軸方向混合拡散係数を使って表現する。この見かけの軸方向混合拡散係数はカラム理論段数から求め、その濃度依存性は無視する。数値計算上の時間とカラム長さの刻み幅も理論段数から設定する。

過負荷条件下における単成分系<sup>15), 16)</sup>および二成分系<sup>25), 30), 31)</sup>のクロマト分離が数値解析され、実測値との比較が行われている。またクロマトグラムの形状に対する吸着等温線の特徴の影響が検討され<sup>21)</sup>、シミュレーションにおける吸着等温式の選択についての考察が行われている<sup>25), 26)</sup>。

Semi-ideal モデルでは吸着速度式が省略されるため、吸着速度に対する吸着量や移動相組成の変化の影響をモデルに組み込むことができない。したがって、グラジエント分離、高負荷条件下におけるクロマト分離や置換クロマト分離に Semi-ideal モデルを適用することはできない。

②Craig モデル: Craig モデル<sup>4), 9), 10), 49)</sup>では、カラムを槽列と見なし、その槽数はカラム理論段数から設定する。Craig モデルではピーク幅の拡がりに対する吸着質の物質移動速度や軸方向混合拡散の影響を表わす速度式を使用せず、その影響は槽数によって表わす。各槽の中には一定量の固定相と移動相が存在し、クロマト分離過程では両相間における吸着平衡関係が各槽において成立

表2 クロマト分離における各種シミュレーション計算法の比較

	Semi-ideal モデル	Craig モデル	Stop-Go 法
基礎式	吸着等温線 物質収支式	吸着等温線 物質収支式	吸着等温線 物質収支式
計算 安定性	—	—	安定
正確さ	—	不正確	—
時間	5分/5,000段 (VAX 8650)	16時間/2,000段 (IBM-AT)	—
$\Delta x$	$\Delta x = H$	$\Delta x \leftarrow Nc (=N_0k_0 / (1+k_0))$ $N_0$ : 無限希釈条件での理論段数	$\Delta x$ と $\Delta t$ は関連がある
$\Delta t$	$\Delta t = 2H/u$	$\Delta t \leftarrow \Delta x$	
仮定	吸着速度の影響は見かけの軸方向混合拡散係数で表現する ( $Da=Hu/2$ )		吸着速度の影響は計算段数の設定により表現する
制限・限界	分子拡散係数一定と仮定できる条件でのみ適用可能 (濃度 5% 以下位)	低濃度領域でのみ適用可能 (濃度 0.6% 以下位)	
アルゴリズム	Godunov 法 (有限差分法)	Craig モデル (Stop-Go 法と類似)	移動相の移動 (Go) と物質移動課程 (Stop) の繰り返し
溶出クロマト法以外への適用	・グラジエント法への適用例はない ・置換法へは適用できない	・グラジエント法への適用例は報告されている	・クロマト分離への適用は報告されていない
備考	・偏微分方程式は 2 階微分方程式 ・高濃度領域では適用不可 ・二成分系では、両成分の $Da$ を同一と仮定する	・計算結果を実測値と一致させるため、補正係数 (1.5~2位) を利用する——例、1% 負荷条件でのクロマト分離を予測する場合には、1.8% 負荷条件での計算を行う ・Guiochon らは、実用的ではないと評価している	・吸着平衡や吸着速度を表現する関数は任意 ・計算課程が明確 ・特性曲線法の簡易法で、方程式の数が $1/2$ に減少 ・PSA のシミュレーションなどに利用されている ・クロマト分離への適用も可能

すると仮定する。数値計算を行う際には、固定相に対して移動相だけを移動させる。分離対象試料は移動相と共にカラムに導入され、吸着等温線に従い固定相-移動相間で吸着される。その後移動相だけが移動し、次の槽において再び吸着質が吸着される。このような移動相の移動と、固定相-移動相間における吸着質の吸着とが繰り返されると仮定する。

Craig モデルの最大の問題点は、計算結果を実測値と合わせるために経験的な補正係数を使用する点にある。例えば、1% (w-試料/w-吸着剤) 負荷条件におけるクロマト分離を予測する場合には、1.5~2% (w/w) 負荷におけるシミュレーションを行い、1% (w/w) 負荷における実測データと比較する。Craig モデルのグラジエント分離への応用も報告されているが、先の Semi-ideal モデルと同様に吸着速度式を利用しないため、吸

着速度に対する吸着量や移動相組成の変化の影響をモデルに組み込むことができない。したがって、グラジエント分離をシミュレーションする場合には、さらに多くの経験的補正係数の使用が必要になる。このような課題を有するため、Craig モデルは高負荷条件におけるクロマト分離や置換クロマト分離への適用も不可能である。

③stop-go 法: Stop-go 法<sup>53), 54)</sup>ではカラム内での吸着や物質移動現象を2つの過程 (Go と Stop) の繰り返しであると仮定して解析を行う。そのモデルは、先の Craig モデルと類似している。Go ステップでは移動相の移動だけを考え、固定相-移動相間における物質移動を考慮しない。一方 Stop ステップでは、微小時間  $dt$  だけ各槽において回分吸着を行わせる。各槽内での吸着操作はおのこの独立で、物質収支を表わす簡単な代数式に

よって固定相-移動相間における物質移動を計算できる。

Stop-go 法では、吸着等温線や吸着速度式にどんな複雑な関数でも利用することができるため、先の Semi-ideal モデルや Craig モデルとは異なり、吸着特性に対する吸着量や移動相組成の変化の影響を正確に記述することができる。また物質収支だけではなく、熱収支なども同時に解析できるため、Stop-go 法は非等温 PSA のシミュレーションなどにも適用されている<sup>52)</sup>。Stop-go 法は、さまざまな条件下におけるカラム内での物質移動現象を先に示した Semi-ideal モデルや Craig モデルよりも正確に記述できる計算法であるが、クロマト分離に対する Stop-go 法の適用例はこれまでに報告されていない。

### 3.3 分取クロマト分離の最適条件探索に関する研究のまとめと課題

工業的分離精製では、目的物質の精製に要するコストの低減が最も重要な課題である。クロマト分離条件最適化の影響は装置のランニングコストに直接反映するため、クロマト分離条件の最適化が、分析クロマト分離の場合よりもさらに強く要求される。

液体クロマト分離ではその分離特性に影響を及ぼすパラメータが多いため、液体クロマト分離条件選択の幅は広い。しかし分析クロマト分離の場合とは異なり、分取クロマト分離では条件設定に際に考慮しなければならない要件や制限がある。その例を以下に示し、それに対する研究課題を記述する。

①移動相：分取クロマト分離では溶媒使用量が多く、溶媒コストが分離精製費用に大きく影響するため、使用溶媒の回収が要求される。このため混合溶媒は多くても二成分程度、また塩類や緩衝剤の使用も必要最小限に制限される。クロマト分離の最適条件探索は多くの場合移動相条件の最適化によって行われるが、分取クロマト分離では限られた範囲内でその検討を行わなければならない。このため、最適クロマト分離条件をより効率的で正確に探索できる方法の開発が要求される。

②固定相：液体クロマト分離を実用化するには、固定相の耐久性が分離精製コストに大きく影響するため、固定相の耐久性向上も重要な問題の一つである。耐久性に優れた固定相の開発や、クロマト分離装置運転中の固定相状態の確認に関連して、固定相の表面状態を分析、評価する方法が必要である。

③クロマト分離装置のスケールアップ：分取クロマト分離では多くの場合、試料処理量を増加させるため分析クロマト分離よりも大規模なクロマト分離装置を使用する。カラムサイズも大きく、差圧の問題から粒子径の大きな固定相粒子が一般的に用いられる。カラム内における移動相の流れ方や吸着質の物質移動など、ピーク幅の拡がりの傾向が分析クロマト分離の場合とは大きく異なる。このため分取クロマト分離では、カラムの分離性能を理論段数のような総括的な指標で評価するのではなく、ピーク幅に影響を及ぼすカラム内や固定相粒子内の各速度過程の寄与を分離し、クロマト分離性能を解析する必要がある。

表3 分取クロマト分離における各種分離法の比較

方式	長所	短所	適用可能分野・実施例
擬似移動層方式	<ul style="list-style-type: none"> <li>・カラム使用効率高い</li> <li>・連続分離可能</li> <li>・試料希釈されない(濃縮されない)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・二成分系にのみ適用可能(多成分系ではカスケード)</li> <li>・装置構造が複雑</li> <li>・制御が複雑、困難</li> <li>・試料溶媒と分離溶媒が同一 →グラジエント分離不可</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・炭化水素異性体や糖分離など、二成分のバルク分離に適する(Molex, Parex, Olex, Sarex)</li> </ul>
連続クロマト分離法(回転式)	<ul style="list-style-type: none"> <li>・多成分系に適用可能</li> <li>・連続分離</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・カラム使用効率低い</li> <li>・試料希釈</li> <li>・基本的に均一溶出法 →グラジエント法困難</li> <li>・機械的制御とクロマト分離制御のバランス</li> <li>・均一充填層形成困難 →チャンネルング、耐久性低い</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・パルス法(回分式)と擬似移動層方式との中間的位置づけ</li> </ul>
パルス方式	<ul style="list-style-type: none"> <li>・グラジエント分離可能</li> <li>・多成分系に適用可能</li> <li>・最も基本的</li> <li>・試料希釈</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・カラム効率低い(繰り返しパルス注入で対応)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・大量のバルク分離よりも多成分系の精密分離に適する</li> </ul>

④クロマト分離装置の効率化：分取クロマト分離では、装置全体としてのクロマト分離効率の向上が重要な課題であり、各種の分離法が利用されている。ハード的には、擬似移動層方式<sup>22)</sup>や円筒、円盤式の連続クロマト分離法<sup>23)</sup>が提案されている。これらの方法の特徴を表3に示す。一方ソフト的には、グラジエント分離法<sup>27), 28)</sup>や置換クロマト分離法<sup>43)</sup>などが利用できる。

これらの分離過程は均一溶出法による分析クロマト分離の場合とは大きく異なり、クロマト分離に対して吸着質濃度（吸着量）が影響する他、分離システムも複雑である。従来のクロマト分離理論を利用してこれらの分離過程を正確に解析することは困難である。これらのクロマト分離挙動を解析し、最適な分離条件を設定する場合には、数値解析によるクロマト分離のシミュレーション法の利用が必要不可欠である。

以上示したように、分離精製を目的とするクロマト分離では、過負荷条件下においてクロマト分離を行う場合が多い。そのモデル化や理論的取り扱いを行う場合には、分析クロマト分離の場合とは異なり、吸着平衡の非直線性や吸着速度に対する濃度（吸着量）の影響を考慮しなければならない。分取クロマト分離のモデル化や数値解析法の利用により、分取クロマト分離の分離性能や生産速度を推定する相関式がこれまでにいくつか報告されている。そして、これらの相関式を利用する最適クロマト分離条件探索の理論や方法が提案されているが、実際には基礎的実験データの測定とその理論的解析だけから最適条件を厳密に設定することは難しく、分取クロマト分離データの測定を行いながら最適化の検討を行う場合が多い。しかし、分取クロマト分離条件の実験的な最適化法には、作業量、時間やコストの点で限界がある。作業の効率化やより厳密な条件設定のためにも、クロマト分離挙動を予測できるシミュレーション法の利用が必要である。

数値解析によるシミュレーション法を分取クロマト分離条件の最適化に活用するためには、移動相条件や試料負荷量などのクロマト分離に対する各パラメータの影響を基礎的に組み込むことができ、クロマト分離挙動を正確に予測できるシミュレーションモデルの構築が必要である。そのためには、吸着剤表面での吸着現象やカラム内での物質移動に関する基礎的研究が必要であり、多成分系の吸着平衡、吸着速度や熱力学的パラメータの吸着量依存性や、各吸着特性に対する吸着剤や溶媒条件などの影響を解明することが重要な課題である。また、実用化のためには、数値計算に必要なパラメータ測定、推算の簡易化も要求される。

## 4. グラジエント溶出法

移動相の溶媒組成を逐次変化させるグラジエント溶出法では、保持挙動が大幅に異なる複数のピークを一度のクロマト分離で同時に分離できる。さらに、ピーク形状、分離度や検出感度が均一溶出法よりも改善される場合がある<sup>27), 28)</sup>。しかし移動相条件の最適化は均一溶出法の場合より複雑であり、グラジエントの初濃度、傾きや形状などいくつかの相互に関連性のある分離条件を最適化する必要がある。

### 4.1 グラジエント溶出法のモデル化

LSS (Linear Solvent Strength) 理論はグラジエント分離の簡便な解析法であり、グラジエント分離条件の最適化に利用されている<sup>50)</sup>。理想的な LSS 条件でのグラジエント分離では、各成分の有効平均キャパシティーファクターやピーク幅はほぼ同一になる。LSS グラジエント溶出法における各成分のクロマト分離挙動は、それに相当する溶媒強度の移動相を用いる均一溶出法の結果と対応する。このため、グラジエント分離データを LSS 理論により解析し、均一溶出分離の最適条件を探索する方法も提案されている。

分析を目的とするグラジエント分離の保持時間（容量）は、移動相組成の変化に伴うキャパシティーファクターの変化を表わす関数と、溶媒組成の時間変化を表わす関数を組み合わせ、これを積分して計算される。これまでに、数多くの関数が提案されている<sup>27), 28), 47)</sup>。保持に対するグラジエント分離条件の影響が定量的に解析できるため、分離係数の最適化はこれらの関数を利用して行われる<sup>28)</sup>。グラジエントの初濃度、傾きや形状をどのような順序で最適化するかについても、まず最初にグラジエントの形状、次に傾き、その後初濃度を最適化するという順序が提案されている<sup>28)</sup>。

一方、ピーク幅の定量的解析は現在のところ、保持時間（容量）の推定に比べて誤差が大きい。一般的には、均一溶出法の場合と同様の計算式を用いて推算することが多い。その場合にはキャパシティーファクターの値として、ピークトップがカラムから溶離する時の値、あるいはピークトップがカラムの中間の位置を通過する際の値が用いられる。また、一次モーメントが既知の条件下における二次モーメントの推算式も提案されている<sup>46)</sup>。

移動相条件が逐次変化する場合のクロマト分離ピークの解析は均一溶出法の場合以上に難しく、これらのモデル解析ではグラジエント分離の概略が予測できるだけである。このため、グラジエント溶出法のクロマト分離挙動を正確に取り扱う場合にも、数値解析法が有効な手段である。

## 4.2 グラジエント溶出法の数値解析

先に示した Craig モデルや Semi-ideal モデルは数値解析の基礎式が簡略化されており、クロマト分離に対する移動相条件の変化の影響をモデルに組み込むことができない。Craig モデルのグラジエント分離への応用例は報告されているが、これらの方法ではグラジエント分離を厳密に解析することはできないと推定される。吸着平衡や吸着速度に対する移動相条件の影響を正確に表現できる基礎式を立て、それを厳密に数値解析するシミュレーション計算法の利用が必要である<sup>1), 42)</sup>。

逆相系ではないが、イオン交換モードでの分析を目的としたグラジエントクロマト分離についての数値解析法が検討されている<sup>42)</sup>。またグラジエント分離に対する試料の過負荷条件の影響について、数値解析法による検討結果が報告されている<sup>1)</sup>。目的物質の生産速度、回収率や濃縮率の点から均一溶出法とグラジエント法を比較している。

## 4.3 グラジエント分離の最適条件探索に関する研究のまとめと課題

移動相条件を逐次変化させてクロマト分離を行うグラジエント溶出法の理論的解析は、均一溶出法の場合より難しい。このため、グラジエント分離条件の最適化を行う場合には、数値解析によるクロマト分離のシミュレーション法の利用が有効である。しかし、分取クロマト分離をグラジエント法で行う場合には、吸着平衡や吸着速度に対する吸着量と移動相組成の両方の影響を考慮する必要がある。固定相表面での吸着現象に対する吸着量や移動相条件の影響を解明し、それらの情報を組み込んだ数値計算モデルの開発が必要である。

## 5. 結 言

本報では、分析および分取クロマト分離の最適条件探索法に関する既往の研究結果をまとめ、今後の研究課題について考察した。

逆相液体クロマト分離の基礎的研究結果に基づく理論的な取り扱いや数値解析法の利用により、分取クロマト分離の分離性能や生産速度に対するクロマト分離パラメータの影響や分析クロマト分離の分離特性との相関関係についての数多くの研究が行われている。そして、これらの結果に基づくクロマト分離条件の理論的な最適化法が提案されている。しかし現在実用的には、これらの理論的な方法だけで最適条件を探索することは難しく、実験データの測定と組み合わせる最適化の検討を行う場合が多い。クロマト分離条件の実験的な最適設定法には、作業量、時間やコストの点で限界がある。特に分取クロマト分離では、作業の効率化やより厳密な条件設定のためにも、クロマト分離挙動を予測できるシミュレーショ

ン法の利用が必要である。

逆相液体クロマト分離の分離機構に関する従来の研究が保持挙動だけに注目して行われてきたため、カラム内や固定相粒子内での物質移動がほとんど解明されていない。このため従来提案されているシミュレーションモデルには、ピーク幅の拡がりやそれに対するクロマト分離パラメータの影響が正確に記述されていない。

数値解析によるシミュレーション法を分析、分取クロマト分離条件の最適設定に活用するためには、移動相条件や試料負荷量などのクロマト分離に対する各パラメータの影響を記述でき、クロマト分離挙動を正確に予測できるシミュレーションモデルの構築が必要である。そのためには、吸着剤表面での吸着現象やカラム内での物質移動に関する基礎的研究が必要であり、多成分系の吸着平衡、吸着速度や熱力学的パラメータの吸着量依存性や、各吸着特性に対する吸着剤や溶媒条件などの影響の解明が重要な課題である。また、数値計算に必要なパラメータの測定や推算法の簡易化も要求される。

(1993年2月8日受理)

## 参 考 文 献

- 1) Antia, F.D., and C. Horvath, *J. Chromatogr.*, 484, 1 (1989)
- 2) Bidlingmeyer, B.A., "Preparative Liquid Chromatography, Elsevier, Amsterdam (1987)
- 3) Cantwell, A.M., R. Calderone, and M. Sienko, *J. Chromatogr.*, 316, 133 (1984)
- 4) Cretier, G., and J.L. Rocca, *Sep. Sci. Technol.*, 22, 1881 (1987)
- 5) D'Agostino, L. Castagnetta, F. Mitchell, and M.J. O'Hare, *J. Chromatogr.*, 338, 1 (1985)
- 6) Deming, S.N., and S.L. Morgan, *Anal. Chem.*, 45, 278A (1973)
- 7) DeStefano, J.J., and J.J. Kirkland, *Anal. Chem.*, 47, 1103A (1975)
- 8) DeStefano, J.J., and J.J. Kirkland, *Anal. Chem.*, 47, 1193A (1975)
- 9) Eble, J.E., R.L. Grob, P.E. Antle, and L.R. Snyder, *J. Chromatogr.*, 384, 25 (1987)
- 10) Eble, J.E., R.L. Grob, P.E. Antle, and L.R. Snyder, *J. Chromatogr.*, 405, 51 (1987)
- 11) Foley, J.P., and J.G. Dorsey, *Anal. Chem.*, 55, 730 (1983)
- 12) Glajch, J.L., and J.J. Kirkland, *Anal. Chem.*, 55, 319A (1983)
- 13) Goewie, C.E., *J. Liq. Chromatogr.*, 9, 1431 (1986)
- 14) Golshan-Shirazi, S., and G. Guiochon, *Anal. Chem.*, 60, 2364 (1988)
- 15) Golshan-Shirazi, S., and G. Guiochon, *Anal. Chem.*, 60, 2630 (1988)
- 16) Golshan-Shirazi, S., and G. Guiochon, *Anal. Chem.*, 60, 2634 (1988)
- 17) Golshan-Shirazi, S., and G. Guiochon, *Anal. Chem.*, 61, 462 (1989)

- 18) Golshan-Shirazi, S., and G. Guiochon, *Anal. Chem.*, 61, 1276 (1989)
- 19) Golshan-Shirazi, S., and G. Guiochon, *J. Chromatogr.*, 517, 229 (1990)
- 20) Guiochon, G., S. Ghodbane, S. Golshan-Shirazi, J.X. Huang, A. Katti, B.C. Lin, and Z. Ma, *Talanta*, 36, 19 (1989)
- 21) Guiochon, G., S. Golshan-Shirazi, and A. Jaulmes, *Anal. Chem.*, 60, 1856 (1988)
- 22) Hashimoto, K., S. Adachi, H. Noujima, and H. Maruyama, *J. Chem. Eng. Japan*, 16, 400 (1983)
- 23) Howard, A.J., G. Carta, and C.H. Byers, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 27, 1873 (1988)
- 24) Huang, J.X., and G. Guiochon, *J. Chromatogr.*, 492, 431 (1989)
- 25) Jacobson, S., S. Golshan-Shirazi, and G. Guiochon, *J. Am. Chem. Soc.*, 112, 6492 (1990)
- 26) Jacobson, S., S. Golshan-Shirazi, and G. Guiochon, *AIChE J.*, 37, 836 (1991)
- 27) Jandera, P., *J. Chromatogr.*, 485, 113 (1989)
- 28) Jandera, P., and J. Churacek, "Gradient Elution in Column Liquid Chromatography, Theory and Practice", Elsevier, Amsterdam (1985)
- 29) Karger, B.L., and R.W. Giese, *Anal. Chem.*, 50, 1048A (1978)
- 30) Katti, A., and G. Guiochon, *Anal. Chem.*, 61, 982 (1989)
- 31) Katti, A., and G. Guiochon, *J. Chromatogr.*, 499, 21 (1990)
- 32) Knox, J.H., and H.M. Pyper, *J. Chromatogr.*, 363, 1 (1986)
- 33) Kroeff, E.P., R.A. Owens, E.L. Campbell, R.D. Johnson, and H.I. Marks, *J. Chromatogr.*, 461, 45 (1989)
- 34) Krstulovic, A.M., and P.R. Brown, "Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography, John Wiley and Sons, New York (1982)
- 35) Laub, R.J., and J.H. Purnell, *J. Chromatogr.*, 112, 71 (1975)
- 36) Laub, R.J., and J.H. Purnell, *Anal. Chem.*, 48, 799 (1976)
- 37) Nambara, T., and N. Ikekawa, "Modern High-Performance Liquid Chromatography", Hirokawa Publishing Company, Tokyo (1983)
- 38) 日本分析化学会関東支部 編, 「高速液体クロマトグラフィードハンドブック」, 丸善 (1985)
- 39) 日本化学会編, 「化学総説, クロマトグラフィーの新展開」, 学会出版センター (1990)
- 40) Ohtsu, Y., O. Shirota, T. Ogawa, I. Tanaka, T. Ohta, O. Nakata, and Y. Fujuyama, *Chromatographia*, 24, 351 (1987)
- 41) Personnaz, L., and P. Gareil, *Sep. Sci. Technol.*, 16, 135 (1981)
- 42) Pitt, Jr., W.W., *J. Chromatogr. Sci.*, 14, 396 (1976)
- 43) Poole, C.F. and S.K. Poole, "Chromatography Today", Elsevier, Amsterdam (1991)
- 44) Poole, C.F. and S.A. Schuette, "Contemporary Practice of Chromatography", Elsevier, Amsterdam (1984)
- 45) Poppe, H., and J.C. Kraak, *J. Chromatogr.*, 255, 395 (1983)
- 46) Poppe, H., J. Paanakker, and M. Bronckhorst, *J. Chromatogr.*, 204, 77 (1981)
- 47) Schoenmakers, P.J., H.A.H. Billiet, R. Tijssen, and L. de Galan, *J. Chromatogr.*, 149, 519 (1978)
- 48) Snyder, L.R., and G.B. Cox, *J. Chromatogr.*, 483, 85 (1989)
- 49) Snyder, L.R., J.W. Dolan, and G.B. Cox, *J. Chromatogr.*, 483, 63 (1989)
- 50) Snyder, L.R., J.W. Dolan, and J.R. Gant, *J. Chromatogr.*, 165, 3 (1979)
- 51) Snyder, L.R., J.L. Glajch, and J.J. Kirkland, "Practical HPLC Method Development", John Wiley and Sons, New York (1988)
- 52) Suzuki, M., "Adsorption Engineering", Elsevier/Kodansha, Tokyo (1990)
- 53) Sweed, N.H., and R.H. Wilhelm, *Ind. Eng. Chem. Fundamentals*, 8, 221 (1969)
- 54) Takeuchi, K., H. Komiyama, and M. Suzuki, *Tappi*, 62 (NO.10), 111 (1979)
- 55) Verzele, M., *Anal. Chem.*, 62, 265A (1990)
- 56) Verzele, M., and E. Geereart, *J. Chromatogr. Sci.*, 18, 559 (1980)