

シリカ系逆相固定相の本当の姿・状態・相互作用 今までと違う？

株式会社クロマニクテクノロジーズ 長江徳和

1. はじめに

1969年にカーランドにより発表された HPLC (High Pressure Liquid Chromatography)¹⁾は半世紀以上の歳月が経過し、様々な改良がなされ高性能化が進み、医学・薬学、食品、環境、工業製品など多くの分野での分離分析の手法として欠かすことのできないものとなっている。HPLC の分離モードは順相クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィーなどがあり、用途によって使い分けられている。これらの分離モードのなかでも逆相クロマトグラフィーは様々な分野で最も多用されており、シリカ系逆相固定相も日々開発・改良され続けている。シリカ充填剤表面に逆相の代表的な固定相である C18 を結合した後でもシリカ表面には 2/3 程度のシラノール基が残っている。この残存シラノール基の影響による塩基性化合物のテーリングなどが問題視されてきた。1970年代は移動相にトリエチルアミンを添加することにより残存シラノール基の影響を防ぐことが主流であったが、1980年代に入ると、残存シラノール基にトリメチルシラン(TMS)を結合させ、残存シラノール基の影響を少なくする(エンドキャッピングと言われる)ことが多くのカラムメーカーで行われるようになった。しかしこのようにエンドキャッピングを施したとしてもシリカ表面のシラノール基はまだ半分程度残っている²⁾と言われていた。1990年代以降エンドキャッピング技術は進化を遂げ、エンドキャッピングによるシリカ表面の疎水化により、pH10程度のアルカリ性移動相条件でも、シリカ系逆相カラムは使用できるようになった³⁾。また C18 固定相(カラム)は水の割合が高い水系移動相条件では、保持時間が安定せず、時間の経過とともに C18 アルキル基がシリカ表面に倒れこみ、保持時間が減少することが 1980 年に報告⁴⁾された。その後 2000 年までの 20 年間に多くの研究者がアルキル基が立ち上がって、移動相に濡れている状態から、アルキル基が倒れこみ、移動相に濡れなくなることによる保持時間の減少を報告した。この現象を Dewetting という言葉を用いて説明する論文も出てきた。筆者は 2000 年に水系移動相条件における保持時間の減少について、アルキル基の倒れこみは関係なく、充填剤細孔内からの移動相の抜け出しが原因であることを発表した⁵⁾。その後アルキル基が倒れこむことにより固定相表面と移動相が濡れなくなり、その結果充填剤細孔内から移動相が抜け出すとする論文⁶⁾も出てきた。2000 年以前はアルキル基の倒れこみ論が盛んに議論されていたが、2005 年以降はコンピューターシミュレーションによるアルキル基の存在状態が考察され⁷⁾、アルキル基は立ち上がっていることはなく固まった状態であることが示された。2000 年以前は、多くのクロマトグラファーはアルキル基が立ち上がって移動相に濡れた状態でないと、相互作用が起こらず、分離できないと考えていた。しかし分液ロートを用いてヘキサンと水との間で溶質を分配する場合には、ヘキサンと水は混ざり合うことなく、それぞれの界面が 0.2 から 0.3 nm 離れて接しているだけであるが、溶質は両溶媒に分配することを考慮すれば、逆相クロマトグラフィーにおいても同様に固定相と移動相がある隙間を維持した界面で接していれば分配は問題なく起こることになる。つまり、固定相と移動相は濡れる必要はなく、ヘキサンと水のように界面で接触していれば溶質は分配し、分離が達成されることになる。このように二十数年前に常識的に語られていた事柄が、実はそうではないことは、科学の進歩に伴い多々出現すると考えられる。逆相クロマトグラフィーにおける固定相または移動相の状態や溶質との相互作用など、従来とは異なった観点からみ

れば、新しい発見、考え方や見え方ができる可能性がある。本報告ではシリカ系逆相充填剤・逆相カラムに関わる事項として、「アルキル基の長さの分離への影響」、「水系移動相使用時の保持の変化」、「メタノール/水移動相の C18 固定相への濡れ性」、「アルキル基の有機溶媒和と分離特性」を考察する。

2. アルキル基の長さの分離への影響

2.1 アルキル基固定相の保持力

逆相クロマトグラフィーアルキル基固定相は C30, C18, C8, C1 (TMS, トリメチルシリル化) などがあり、それぞれのアルキル基の疎水性により保持力が決まると多くのクロマトグラファーが考えている。「C18 固定相は C8 固定相より疎水性が高いので、C18 カラムの方が C8 カラムより保持が大きい。」としばしば言われている。実際に同じ平均細孔径 12 nm, 比表面積 340 m²/g のシリカ基材から製造されエンドキャッピングを施した C18 カラムと C8 カラムを比較すると、ほぼ C18 カラムの方が C8 カラムよりも保持が大きくなる。しかし同様に C30 カラムと C18 カラムを比較すると、C30 トリアコンチル基は嵩高く、結合密度が上がらず、結果として C30 充填剤は C18 充填剤とほぼ同じ炭素含有量となり、C30 カラムと C18 カラムの保持はほぼ同じであった。それぞれの充填剤の炭素含有量を比較すると、C30 充填剤は 18%, C18 充填剤も 18%, C8 充填剤は 11% であった。また、C18 オクタデシル基の結合密度をあえて低くし、炭素含有量を 11% とした C18 充填カラムは炭素含有量 11% の C8 カラムとほぼ同じ保持であった。以上のことから保持力はアルキル鎖長ではなく充填剤の炭素含有量でほぼ決まることが分かる。

表 1 にメタン、オクタン、オクタデカンおよびトリアコンタンの疎水性 (Log *P*) と水への溶解度を示す。Log *P* は *n*-オクタノールと水への分配濃度比の対数である。オクタンとオクタデカンの Log *P* の差は 4, オクタデカンとトリアコンタンの Log *P* の差は 4.91 である。これは *n*-オクタノールと水への分配濃度比が 10,000 倍以上異なることを示しており、非常に大きな疎水性の差になる。しかし水への溶解度がオクタデカンおよびトリアコンタンは極端に低いことから、この水への溶解度の低さが疎水性に大きく反映していると考えられる。実際の逆相クロマトグラフィーの保持はブチルベンゼンのような溶質の移動相と固定相への分配量比により決まるのであって、オクタデシル基固定相自体の水への分配や溶解度は溶質の保持には無関係である。

表 1 メタン、オクタン、オクタデカン、トリアコンタンの疎水性と水への溶解度

	Methane (C1)	Octane (C8)	Octadecane (C18)	Triacontane (C30)
疎水性(Log <i>P</i>)	1.09	5.18	9.18	14.09
水への溶解度 (mg/L)	22.6	0.66	0.006	8.84×10 ⁻¹⁰

固定相と移動相への溶質の分配が分離機構の主なものとされる逆相クロマトグラフィーにおける保持係数 *k* と溶質の固定相と移動相への分配比 *K_D* は以下の式で示される。

$$k = \frac{S}{M} = \frac{S_D \times V_S}{M_D \times V_M}$$

$$K_D = \frac{S_D}{M_D}$$

$$k = K_D \times \frac{V_S}{V_M}$$

S は固定相中の溶質の存在量, *M* は移動相中の溶質の存在量, *S_D* は固定相中の溶質の分配濃度, *M_D* は 移動相中の溶質の分配濃度, *V_S* は固定相の体積 (容積), *V_M* は移動相の容積である。保持係数 *k* は分配比 *K_D* とは異なり、保持係数は固定相と移動相への溶質の分配量の比であるのに対し、分配比は固定相と移動相への溶質の分配濃度比で

表2 C18 カラムと C8 カラムの物性値

固定相	炭素含有量	結合密度	固定相体積	移動相体積
C18 (A)	18%	2.3 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$	0.4 mL	1.6 mL
C18 (B)	11%	1.2 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$	0.23 mL	1.77 mL
C8	11%	2.4 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$	0.23 mL	1.77 mL

★固定相：シリカ基材の細孔径，12nm，一官能性試薬＋エンドキャッピング，
移動相：メタノール/水=70/30，温度：30℃

積）が 1/2 になると保持係数も 1/2 になる．表 2 に炭素含有量 18% と 11% の C18 充填剤と 11% の C8 充填剤の結合密度，固定相体積および移動相体積を示す．これらの値から表 2 の 3 種の充填剤の保持係数と分配比の関係を以下に示す．

$$\text{C18とC8固定相分配比}(K_D)\text{は}K_{D_{C18}}, K_{D_{C8}} \quad K_D = \frac{S_D}{M_D}$$

$$\text{C18 (A)の場合} \quad k_{C18} = \frac{S}{M} = \frac{S_D \times V_s}{M_D \times V_M} = \frac{S_D \times 0.4}{M_D \times 1.6} = \frac{S_D}{M_D} \times 0.25 = 0.25 K_{D_{C18}}$$

$$\text{C18 (B)の場合} \quad k_{C18} = \frac{S}{M} = \frac{S_D \times V_s}{M_D \times V_M} = \frac{S_D \times 0.23}{M_D \times 1.77} = \frac{S_D}{M_D} \times 0.13 = 0.13 K_{D_{C18}}$$

$$\text{C8の場合} \quad k_{C8} = \frac{S}{M} = \frac{S_D \times V_s}{M_D \times V_M} = \frac{S_D \times 0.23}{M_D \times 1.77} = \frac{S_D}{M_D} \times 0.13 = 0.13 K_{D_{C8}}$$

炭素含有量 18% と 11% の C18(A) と C18(B) の保持係数 k はそれぞれ $0.25K_D$ と $0.13K_D$ となり，同じ C18 固定相の炭素含有量が異なっても K_D 値は同じであるとすれば，保持係数については，C18(A) は C18(B) のほぼ 2 倍になる．

これは実験結果と一致する．また，同じ炭素含有量 11% の C18(B) と C8 を比較すると，保持係数はそれぞれ $0.13K_{D_{C18}}$ と $0.13K_{D_{C8}}$ となる．実験結果は両カラムはほぼ同じ保持係数を示したことから，C18 と C8 の分配比 $K_{D_{C18}}$ と $K_{D_{C8}}$ はほぼ同じ値となる．これは例えば溶質としてのベンゼンにペンチル基が結合したアミルベンゼンからみれば，メタノール/水移動相と C18 固定相への分配比率は，メタノール/水移動相と C8 固定相への分配比率と同じであり，オクタデカンとオクタンの疎水性を比較すれば，当然ながらオクタデカンの方が高いが，アミルベンゼンの分配比率から比較した場合には，C18 固定相と C8 固定相には大きな差がないことになる．同じ炭素含有量 18% の C30 充填剤と C18 充填剤も保持がほぼ同じことから，同様に C30 固定相と C18 固定相もアミルベンゼンの分配比率から比較した場合には，大きな差がないことになる．極端な例として，同じシリカ基材を用い炭素含有量が 11% になるように結合量を調節した C30 カラム，C18 カラム，C8 カラムは，すべてのカラムでアミルベンゼンはほぼ同じ保持を示すことになる．アルキル鎖長の異なる固定相は，炭素含有量が同じであれば，アミルベンゼンのような溶質の保持はほぼ等しいが，当然のことながら分離における選択性は異なる．図 1 には炭素含有量 18% の C30 カラムと C18 カラムを用いたビタミン K1 の分離を示す．ビタミン K1 は trans 体と cis 体の異性体成分

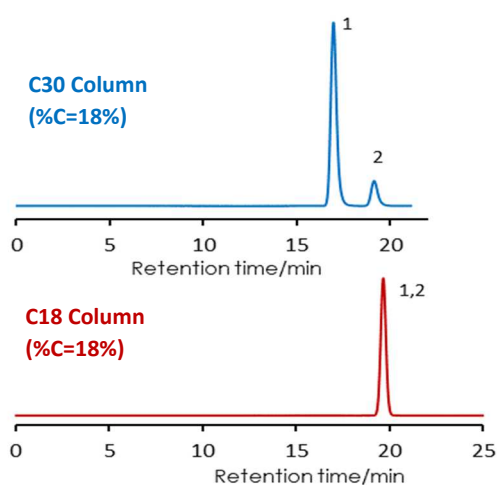
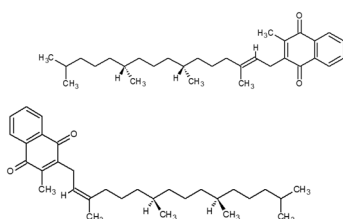


図1 異性体（ビタミン K1）の分離
Column, Sunrise C30 3 μm , 150 x 4.6 mm, company A C18 3 μm , 150 x 4.6mm; mobile phase, methanol/water=99/1; flow rate, 1.0 mL/min; temperature, 15℃; detection, UV at 250 nm; peaks, vitamin K1 isomers (trans and cis)

1 = trans

2 = cis



が混ざっており、C18 カラムでは分離できないが、C30 カラムでは分離している。これは C30 固定相と C18 固定相の選択性が大きく異なる一例である。ここで留意すべき点として、後の項目で詳しく述べるが、メタノール/水移動相の場合、アルキル基固定相は倒れ込みほぼ固まった状態であり、移動相中のメタノールの一部は固定相に溶媒和していると考えられ、さらにこの溶媒和したメタノールも固定相の一部と考えられるが、この溶媒和したメタノールは保持にはほとんど影響していないものとして考察した。

2.2 アルキル基固定相の炭素一個分の差の認識力

逆相固定相(カラム)の疎水性を比較するパラメーターとして、アミルベンゼンの保持係数(保持時間)や炭素一個分の差のあるアミルベンゼンとブチルベンゼンの分離係数を用いて分離特性などの議論がされている。表 3 には同じ

表 3 C30, C18, C8, C1 固定相の炭素含有量と疎水性

固定相	炭素含有量	疎水性	疎水性
		α (アミルベンゼン/ブチルベンゼン)	アミルベンゼンの保持係数
C30	18%	1.72	18.9
C18	18%	1.68	19.7
C8	11%	1.55	9.4
C1	4.5%	1.43	2.3

★固定相：シリカ基材の細孔径、12nm、一官能性試薬+エンドキャッピング、移動相：メタノール/水=70/30、温度：30℃

シリカ基材に一官能性シリル化試薬を結合後、同じエンドキャッピングを施した C30, C18, C8 および C1 固定相の炭素含有量、疎水性としてアミルベンゼンとブチルベンゼンの分離係数さらにアミルベンゼンの保持係数を示す。前項で記述しているように C30 固定相と C18 固定相は炭素含有量が同じ 18%であり、アミルベンゼンの保持係数もほぼ同じであった。C8 固定相は炭素含有量が 11%で保持係数は C18 固定相に比べ約半分であった。疎水性としての

$$Rs = \frac{1}{4} \sqrt{N} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k}{k + 1} \right)$$

N は理論段数、 α は分離係数である。この式は保持係数 k の値により分離度が変わることを示している。そこで同じ移動相条件ではそれぞれの固定相で保持時間が大きく異なるので、移動相の有機溶媒濃度を変え、同じ保持時間で比較を行った。C30, C18, C8 および C1 カラムを用いエチルベンゼンの保持時間が約 8.2 分になるように移動相中のメタノール濃度を調整した時の標準試料のクロマトグラムを図 2 に示す。炭素一個分の差であるエチルベンゼンとトルエンのピークを比較すると、全てのカラムでほぼ同じ溶出時間であった。このことは同じ保持時間になるように調整した条件下では、どの固定相でも炭素一個分の差を持つ化合物の分離係数は同じになり、炭素一個分の差を認識する能力は同じであることを意味している。炭素一個分の差を持つ化合物の分離係数を疎水性のパラメーターとした場合、同じ移動相条件では炭素含有量が高く保持時間が長くなるほど疎水性が高い傾向があるが、保持時間が一定になるように移動相条件を調節すると、炭素含有量やアルキル鎖長に関係なく、疎水性は全ての固定相で同じであった。前項でも述べたが、それぞれ

シリカ基材に一官能性シリル化試薬を結合後、同じエンドキャッピングを施した C30, C18, C8 および C1 固定相の炭素含有量、疎水性としてアミルベンゼンとブチルベンゼンの分離係数さらにアミルベンゼンの保持係数を示す。前項で記述しているように C30 固定相と C18 固定相は炭素含有量が同じ 18%であり、アミルベンゼンの保持係数もほぼ同じであった。C8 固定相は炭素含有量が 11%で保持係数は C18 固定相に比べ約半分であった。疎水性としての

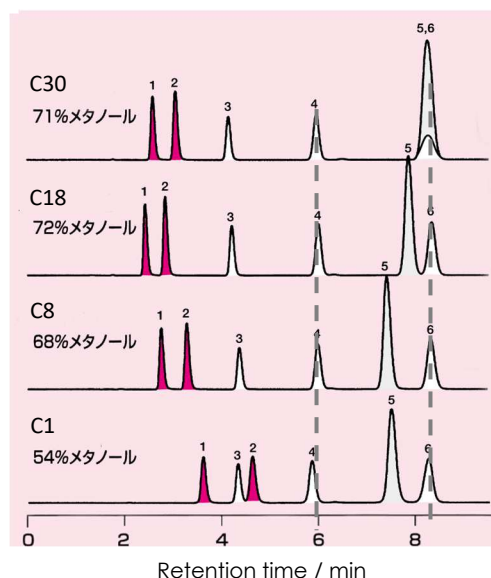


図 2 エチルベンゼンの保持時間を合わせた場合の標準試料の分離

Column dimension, 150 x 4.6 mm;

Mobile phase, methanol/water, 有機溶媒濃度は図中に表示; flow rate, 1.0 mL/min;

temperature, 30 °C; peaks,

1 = methylparaben, 2 = ethylparaben,

3 = benzene, 4 = toluene,

5 = naphthalene, 6 = ethylbenzene.

の固定相で分離選択性は異なるため、図 2 に示されている極性の高いメチルパラベンやエチルパラベンおよび二重結合の多いナフタレンの保持時間や溶出パターンは固定相間で異なっている。特に C1 固定相ではエチルパラベンはベンゼンより長い保持時間であり、溶出順序が逆転した。

これまで述べてきたように、固定相の疎水性について、*n*-オクタノールと水にオクタデカンやオクタンが分配する場合（疎水性のパラメータ $\text{Log } P$ ）とアミルベンゼンのような溶質がメタノール/水移動相とオクタデカンやオクタンに分配する場合(保持係数)、つまりオクタデカンやオクタンが分配する場合と、分配される場合では全く異なる結果となった。従来とは異なる視点で逆相固定相を眺めた時には、「C18 固定相は C8 固定相より疎水性が高いので、C18 カラムの方が C8 カラムより保持が大きい。」は間違っていることになる。今までの議論はメタノール/水移動相を用いており、固定相と移動相との相溶性が高くない場合であったが、後の項目で述べるように、オクタデカンを溶かしてしまうような有機溶媒を用いた有機溶媒/水移動相を用いると、アルキル鎖長に関係した保持挙動を示すようになる。

3. 水および緩衝液を移動相として用いた場合の逆相固定相

3.1 水を移動相として用いた場合の C18 カラムの保持挙動

C18 固定相を代表とする逆相固定相において、100%水系の移動相を用いた場合、保持が減少することはよく知られている。従来 90%以上の、特に 95%以上の水を含む移動相は保持の再現性が低くなるため、これらの移動相は逆相固定相では避けるべき移動相として扱われてきた。図 3 には細孔径 10 nm の C18 固定相と水移動相を用いた場合の亜硝酸ナトリウムと 2-プロパノールの 40℃での保持の変化を示す。ホールドアップタイム(t_0)を測定する成分として亜硝酸ナトリウムを用いた。C18 カラム内を水移動相に置換し、さらに保持を測定する間、カラム出口と検出器の間(以後カラム出口以降と称す)に背圧をかけた。1 時間以上送液しカラムが安定した後、試料を注入して得られたクロマトグラムを上段の A に示す。また、その後 1 時間送液ポンプを停止し、その後再度送液開始し得られたクロマトグラムを下段の B に示す。1 時間の送液停止後の亜硝酸ナトリウムの溶出時間(t_0)と 2-プロパノールの保持時間が両方とも減少した。1 時間の送液停止前のクロマトグラム A ではホールドアップタイムから 2-プロパノールが溶出するまで 5.40 分かかったが、1 時間の送液停止後のクロマトグラム B では 0.41 分であった。一般にはホールドアップタイムの減少は考えられないがホールドアップタイムの減少が起こった。

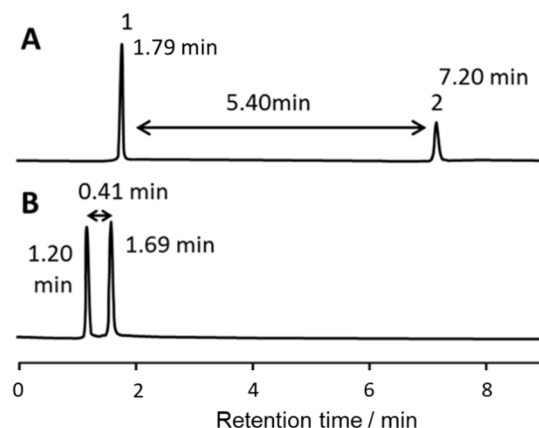


図 3 水移動相条件下の C18 カラムの保持挙動 (A)は初期状態、(B)は 1 時間送液停止後再度測定; Column, 150 mm x 4.6 mm, 5 μm dp C18, 10-nm pore size; mobile phase, water; flow rate, 1.0 mL/min; column temperature, 40 $^{\circ}\text{C}$; detection, refractive index; peaks, 1 = sodium nitrite (t_0), 2 = 2-propanol.カラムの出口と検出器の間に 1.7 MPa の背圧をかける。

3.2 アルキル鎖長および充填剤細孔径の影響

細孔径の異なる 5 μm のシリカゲルにアルキル鎖長の異なる, C30, C18, C8 及び C1 (TMS, トリメチルシラン)の一官能性シリル化試薬を過剰量で反応させ、さらに TMS でエンドキャッピングを施した各充填剤について、1 時間の送液停止前後の保持時間の減少を 10 mM リン酸緩衝液移動相で測定^{5,8,9)}した。その結果を図 4 に示す。横軸

の細孔径はシリカ基材ではなく、それぞれの固定相（アルキル基）が結合した後の窒素ガス吸着法により測定した充填剤の細孔径である。アルキル鎖長が異なっている、細孔径が大きいほどポンプ停止後の相対保持時間は100%に近くなり、細孔径が小さいほど相対保持時間は減少した。細孔径15 nmの比較ではC18よりC8の方が保持時間の減少率は大きく、またC18が80%の保持時間減少を示す細孔径10 nmでもC30は数%のみの保持時間の減少であり、C8からアルキル鎖長が長くなるほど、保持時間の減少し始める細孔径が小さくなった。アルキル鎖長の最も短いC1は8 nm以下の細孔径で急激に保持時間は減少した。相対保持時間が90%以上になるそれぞれの固定相の細孔径は、C8が22 nm以上、C18は20 nm以上、C30とC1は8.5 nm以上であった。

3.3 保持時間が減少する原因

アルキル基の寝込みにより保持時間が減少するのであれば、細孔径が22 nm以上のC8やC18固定相の保持時間の減少度が少ないことは、アルキル基が寝込んでいないことになる

のか。また、C1は物理的にアルキル基の寝込みは起こりえないが、8 nm以下の細孔径では保持時間は減少した。これらの結果によりアルキル基の寝込みでは保持の減少を説明できないことが確認された。図3での実験において、ポンプ停止後ポンプ出口での圧力表示が0 MPaになった後、すぐにカラムin側のカラムエンドに密栓をし、カラム出口を観察すると移動相の溶出が認められた。その移動相の溶出量を測定すると、初めの1分間で0.3 mL、その後の9分間で0.29 mLの移動相がカラムからの溶出することが確認された。溶出量は合計で0.59 mLであり、図3の1時間ポンプ停止後に短くなった亜硝酸ナトリウムの溶出時間(ホールドアップタイム)に一致した。つまり、ポンプを停止し放置している間にカラム内から移動相が抜け出ている。カラム内部の粒子間隙または充填剤細孔内部のどちらか、または両方から移動相が抜け出ていることになるが、次項以降に述べられているように、毛管作用により充填剤細孔内部の移動相が抜け出たと結論¹⁰⁾付けられた。図5にポンプ停止後の充填剤細孔内からの水（移動相）の抜け出す状態の概略図を示す。充填剤の周りに圧力がかかっている場合には水は充填剤細孔内に浸透している

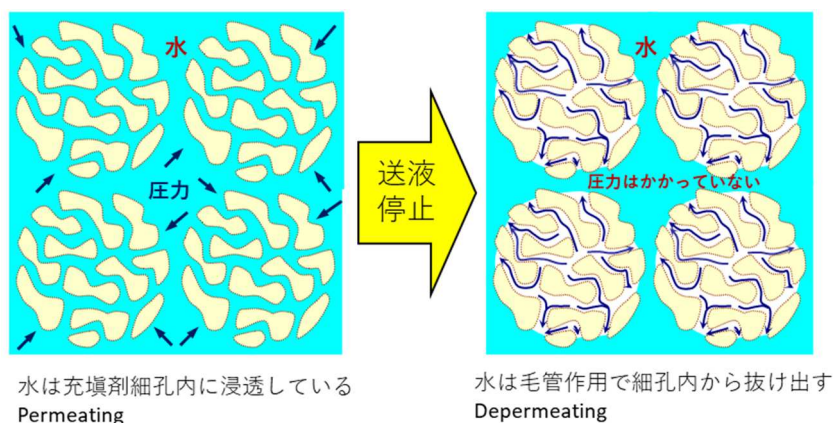


図5 C18充填剤の細孔内の水の存在状態の概略図

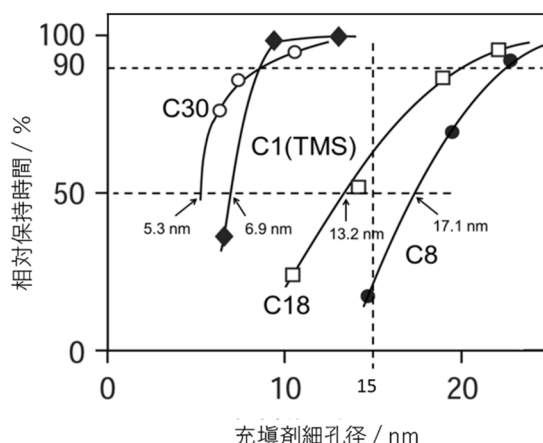


図4 充填剤細孔径と水移動相条件下の相対保持時間との関係

Column, C30 (○), C18 (□), C8 (●), and TMS (Tri-methylsilyl silica) (◆); column dimensions, 150 mm x 4.6 mm; mobile phase, 10 mM phosphate buffer (pH7.0); flow rate, 1.0 mL/min; column pressure, 6.0 MPa; temperature, 40 °C; detection, UV at 250 nm; sample, thymine. 相対保持時間は初期に対する1時間送液停止後の相対値とする。

るが、送液ポンプを停止し、充填剤の周りに圧力がかかっていると水は充填剤細孔内に浸透しているが、送液ポンプを停止し、充填剤の周りに圧力がかかっていると水は抜け出てしまう。溶質は固定相と移動相とに分配して保持されるが、充填剤細孔内に移動相が存在しておらず、固定相の大部分は充填剤細孔内にあり、移動相が抜け出した細孔内では固定相と移動相との相互作用が起こらないため、保持時間が減少したと考えられる。

3.4 毛管現象

毛管作用は次式で表される。

$$h=2\gamma\cos\theta/r\rho g$$

ここで h は毛管の内外の液面の高さ、 r は管の半径、 ρ は液体の密度、 γ は液体の表面張力、 θ は接触角、 g は重力加速度である。ガラス製の細管は水に濡れるすなわち接触角が 90° 以下であるため、水にガラス細管を接触させると重力に反して細管内を水面は上昇する。また、ポリテトラフルオロエチレン(PTFE)細管は水に濡れない、すなわち接触角が 90° 以上であるため PTFE 細管を水に接触させるとガラス細管とは逆に水面は下がるようになる。逆相充填剤の細孔内部は C18 などのアルキル基が結合しており、PTFE 細管と同様に水に濡れないために、毛管現象により、細孔から水を抜け出させる力が働く。図 4 に示されているように、充填剤細孔径が小さくなるほど保持が減少しているのは毛管現象によるもので、毛管作用の式が表している液面の高さと管の半径は反比例関係であり、充填剤細孔径が小さいほど、毛管作用により発生する細孔内から移動相を抜け出させる力が大きくなることを示している。また、毛管作用の式の他のパラメーターとして、液体の密度 ρ と液体の表面張力 γ が作用しているが、移動相の塩の種類・濃度やカラム温度を変えることにより、これらのパラメーター値は変化する。例えば水のみ、10 mM 酢酸アンモニウムおよび 100 mM 酢酸アンモニウム移動相を用いて、 40°C でポンプ停止 1 時間後の保持時間の減少率を比較すると、塩濃度が高いほど保持時間の減少率は低く、水のみでの移動相では 90% 以上であるが、100 mM 酢酸アンモニウム移動相は 70% であった。さらに 1-オクタンスルホン酸ナトリウム などのイオンペアー試薬を 10 mM のリン酸緩衝液と共に移動相として用いると、1 mM の 1-オクタンスルホン酸ナトリウムの場合には保持時間は 50% 減少するが、10 mM の 1-オクタンスルホン酸ナトリウムでは保持時間の減少率は 0% で、保持時間の変化は認められなかった。塩やイオンペアー試薬の添加は移動相の表面張力を下げるために、毛管作用が減少したと考えられる。またイオンペアー試薬の場合にはこのイオンペアー試薬の極性部が表面に出るような状態で固定相に吸着するため、イオンペアー試薬を吸着した固定相は水との接触角が 90° に近づき毛管作用が減少したとも考えられる。図 3 で示したクロマトグラムは 40°C のカラム温度での保持時間の減少を表しているが、カラム温度を下げることでよりこの減少率は下がる。 30°C では 50% の、 10°C では 10% の保持時間の減少になり、 5°C では保持時間の減少率は 10% 以下となり、ほぼ問題なく使用できるようになる。温度を下げると移動相の表面張力は上がるので、毛管作用は増大し、充填剤細孔内から移動相は抜け出しやすくなり、保持時間の減少は大きくなるはずであるが、実際にはその逆であった。これは温度が下がることによる固定相と移動相との接触角の減少の方が毛管作用に、より大きく寄与するためだと推察される。

3.5 毛管現象のヒステリシス

自然界ではヒステリシスが起ることがよく知られている。例えば外部磁場（横軸）と磁化（縦軸）の関係を示したグラフはヒステリシス曲線と言われている。また、物質の融点測定においても、温度を融点以下から上げて測定した値と、融点以上から下げて測定した値は異なることもヒステリシスとして知られている。図 6 には毛管作用による充填剤細孔内からの移動相の抜け出し（相対保持時間の減少）とカラム出口以降の背圧との関係、およびカラム内の充填剤細孔内の移動相の存在状態を示す。クロマトグラフィーの条件は図 3 と同じである。ポンプを 1 時間停止した後、相対保持時間は 8% まで下がっている。この状態からカラム出口以降に内径 0.1 mm の配管を接続し、カラム出口以降に背圧をかけた。2.5 MPa の背圧時が①で 11 MPa、15 MPa および 30 MPa は②、③および④である。30 MPa の背圧をかけ、相対保持時間が 100% になった状態から送液を止めずにカラム出口以降の背圧を 5 MPa まで下げた状態が⑤である。②のカラム出口以降の背圧が 11 MPa の場合はカラム自身に 6 MPa の圧力がかかるた

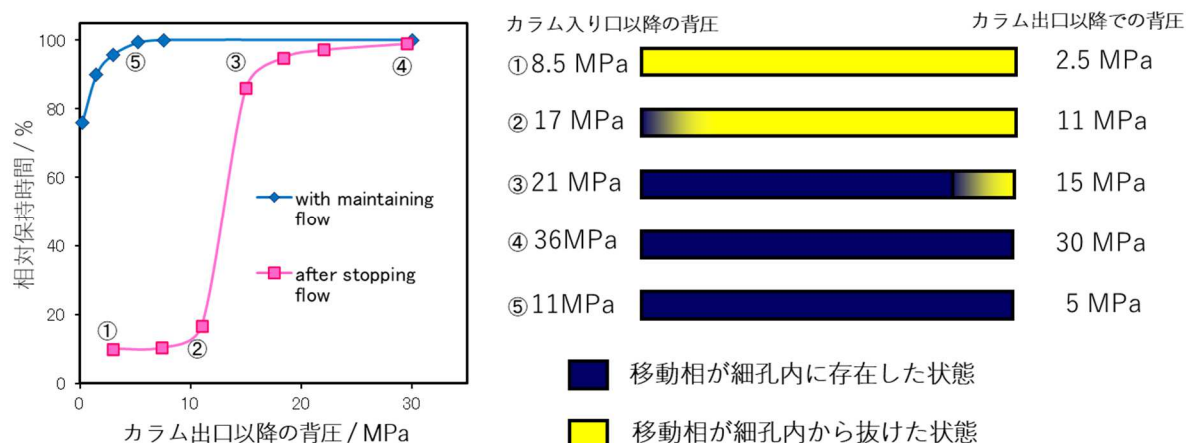


図6 カラム出口以降の背圧と相対保持時間の関係とカラム内の充填剤細孔内の水の存在状態
Column, 150 mm x 4.6 mm, 5 μ m dp C18, 10-nm pore size. 他の条件は図3と同じ。

め、カラム入口の圧力は 17 MPa となる。カラム出口以降の背圧を上げている曲線から、一度充填剤細孔内から移動相が抜け出した後は 16 MPa の圧力がかった状態で初めて充填剤細孔内に水移動相が入り込んでいる。②の状態はカラム入口から数パーセントの充填剤細孔内に移動相が入り込み、その分相対保持時間が上昇した。③の状態ではカラム内の 90% 近くの充填剤細孔内に移動相が入り込み、相対保持時間は約 90% まで回復した。④のように 30 MPa 以上の圧力がかった状態では全ての充填剤細孔内に移動相は入り込んでいる。⑤の状態は④と同じで充填剤細孔内には移動相は抜けることなく全て入り込んでいる。つまり、いったん充填剤細孔内から移動相が抜けた状態では細孔内に移動相が入り込むためには 16 MPa の圧力が必要となるが、細孔内に移動相が入り込んでいる状態では 5 MPa の圧力が加わっていれば細孔内から移動相は抜け出すことはない。これが充填剤細孔内部で起こっている毛管作用のヒステリシスである。充填剤細孔内に移動相が入り込んでいる状態で、カラム出口以降の背圧を 0 MPa にしてもすぐには細孔内から移動相は抜け出さず、数時間かけてカラム出口付近の低い圧力しかかかっていない充填剤細孔内から移動相が抜け出す。その結果相対保持時間は 77% になった。

C18 固定相でもカラム出口以降に背圧を加えることにより水移動相でも十分な分離が達成される。これらの固定相と移動相は濡れることはなく、0.2 nm から 0.3 nm の隙間が空いた状態の界面で接していると考えられる。お互いが混ざり合わないヘキサンと水を用いて溶質を液液分配させることと同様に、C18 固定相と水移動相はある界面で接していれば溶質はそれぞれの相に分配することができる。固定相に溶質が分配できれば保持でき、分離することができる。従来言われてきた「固定相は移動相に濡れないと分離できない」は実は「固定相が移動相で濡れていても、濡れていなくとも分離には関係なく、充填剤細孔内に移動相が存在していないと分離できない」と表現すべきであると考えられる。

3.6 各固定相と水との接触角

図6の結果からここで用いた C18 充填剤の細孔内に水移動相が入り込む圧力を 16 MPa とした場合、実測の平均細孔半径 5.2 nm と 40°C の水の表面張力 69.6 dyne cm⁻¹ を用いて、毛管作用の式からこの C18 固定相と水との接触角を計算すると、126°の値が導き出された。また、図4の相対保持時間が 50% の時のそれぞれの固定相の平均細孔径を求めると、C30 は 5.3 nm, C1(TMS) は 6.9 nm, C18 は 13.2 nm および C8 は 17.1 nm となる。図4の相対保持時間が 50% になったときのそれぞれの平均細孔径と接触角の余弦関数値(cos θ)が比例すると仮定すると、毛管作

表 4 トリフルオロメタン, メタン, オクタン, オクタデカンおよびトリアコンタンの物性

	Trifluoromethane	Methane	Octane	Octadecane	Triacontane
水の接触角(θ)	120°	108°	140°	126°	104°
分配係数(Log P)	0.64	1.09	5.18	9.18	14.09
水への溶解度 (mg/L)	4090	22.6	0.66	0.006	8.84×10^{-10}

用の式を用いて C18 固定相と水との接触角 126°から, 他の固定相の接触角を逆算することができる. その結果は C8 固定相は 140°, C1(TMS)固定相は 108°, C30 固定相は 104°となった. またこの接触角はあくまでもシリカ表面にそれぞれのアルキル基を結合させ, TMS エンドキャッピングを施した状態の固定相表面と水の接触角であり, シリカ表面の影響を全く受けていないとは言いきれず, オクタデカンやオクタンそのものと水との接触角とは多少は異なる可能性はある. この接触角については C8 固定相が最も大きく, C8 よりもアルキル鎖長が長くなると小さくなり, 水に濡れやすくなることが示された. 疎水性はアルキル鎖長が長くなるほど大きくなるため, 撥水性(水との濡れにくさ)も同様に大きくなると考えがちであるが, 実際にはその逆であった. 疎水性は水との混ざりにくさであり, n -オクタノールと水との分配比の対数 (Log P) で定義されるが, 撥水性は水との接触角で定義される. 定義自体が異なる両パラメーターに対して相関性がないことは決して不自然ではない. 表 4 にトリフルオロメタン (CHF₃), メタン (CH₄), オクタン (C₈H₁₈), オクタデカン (C₁₈H₃₈)およびトリアコンタン (C₃₀H₆₂) の水の接触角, 疎水性および水への溶解度を示す. トリフルオロメタンは疎水性が低いにも関わらず, 水との接触角は大きく, オクタデカンと同程度の撥水性を示している. 海外では “Dewetting” という言葉で保持時間の減少を説明することが多く, 水・緩衝液移動相を用いると, 固定相のアルキル基が立ち上がっている状態 (Wetting) から寝込んでしまい, 固定相が移動相と濡れない状態 (Non-wetting) に変化し, 保持時間は減少する. そして同時に細孔内からも移動相が抜け出すと主張するクロマトグラファーがほとんどである. 固定相は移動相と濡れていれば固定相と移動相への溶質の分配が起り, その結果溶質は保持されるが, アルキル基が寝込み濡れなくなると固定相と移動相への溶質の分配が起らず, 溶質は保持されなくなると解釈されている. この解釈に則ると, 図 3 の A のクロマトグラムは 2-ブロパノールを保持しているので, 安定化のための 1 時間以上の送液時には C18 アルキル基は立ち上がって移動相に Wetting している状態であり, 送液ポンプを停止すると C18 アルキル基は寝込みだし Non-wetting の状態に変化することになる. 図 5 に示されているように, 水移動相は固定相に濡れていないが, 毛管作用で働く圧力以上の圧力が充填剤周りにかかっているため, 充填剤細孔内に留まっており, 送液を停止し, 充填剤周りの圧力が毛管作用で働く圧力以下の大気圧まで下がると, 移動相は充填剤細孔内から抜け出す. つまり固定相は最初から水移動相に濡れておらず, 濡れていないからこそ送液停止すると移動相が充填剤細孔内から抜け出す. 後の項目で詳細に述べるが, 充填剤細孔内から移動相が抜けた後, メタノール/水=30/70 または 50/50 の移動相を通液しても, 充填剤細孔内にこの移動相は入り込まなく, 保持は回復しない. メタノール/水=30/70 または 50/50 移動相が C18 固定相に濡れるのであれば, 毛管作用により充填剤細孔内へ移動相を入り込ませる力が働くが, 実はメタノール/水=30/70 または 50/50 移動相も C18 固定相には濡れない. メタノール濃度を 70%まで上げたメタノール/水=70/30 移動相は C18 固定相を濡らすため, この移動相は充填剤細孔内に入り込み, 保持は回復する. このことから水移動相は最初から C18 固定相に濡れておらず, wetting 状態にはなっていない. したがって Dewetting は Wetting 状態から Non-wetting 状態に変化することであるならば, 水移動相を C18 カラムに通液した場合の保持時間の減少に対して Dewetting と表現することは適切ではないと考えられる. 図 5 に表されているように, 水移動相は C18 固定相に濡れていないが細孔内に存在している. これは浸透している (Permeating) と言うべきであり, さらに充填剤細孔内から抜け出す事は Depermeating と言う表現がこの事象をよりの確に表していると考えられる. また, 細孔内に水移動相が存在し

ていることを **Wetting** と称し、さらに細孔内から水移動相が抜け出した状態を **Non-wetting** と称し、水移動相が細孔から抜け出すことを **Dewetting** と言い表すこともあるが、この現象はまさに毛管現象であり、**Capillarity** または **Capillary phenomenon** と称すべきである。細孔内に水移動相が存在していても、固定相と水移動相が濡れた状態で存在しているのではなく、濡れていないが、毛管作用で働く圧力以上の圧が充填剤周りにかかっていることで、細孔内に水移動相が留まっているのであるため、これを **Wetting** と称することはできないと考えられる。

3.7 水および緩衝液を移動相として用いた逆相分離の再現性

今までに述べてきたように、水・緩衝液移動相を用いた場合の保持時間の減少は充填剤細孔内からの移動相の抜け出しが原因であった。この移動相の抜け出しを抑えるためには固定相への水の接触角を小さくすればよく、**C1 (TMS)** や、**C30** などのアルキル鎖長の長い固定相を用いることである。また細孔径の大きな充填剤を用いても保持の再現性は高くなるが、細孔径が大きくなるほど充填剤の比表面積は小さくなり、保持が小さくなるので、保持時間を長くするために移動相の有機溶媒比率をゼロ近くに下げている場合には、細孔径が大きく保持の小さい充填剤は適さない。通常の **C18** 固定相でも充填剤細孔内から水移動相を抜け出さないように条件設定できれば保持時間の再現性を上げることができる。一例として内径 **4.6 mm** の **C18** カラムを **40℃** で水移動相を用い、流速 **1 mL/min** で送液した場合、カラム出口以降に **5 MPa** 背圧がかかるように内径 **0.1 mm**、長さ **500 mm** の配管を接続し、測定開始前にはカラム内に有機溶媒濃度が **70%** 以上のメタノール/水またはアセトニトリル/水移動相が入った状態にして、その後水移動相を通液開始し、送液を止めることなく、カラム圧を維持し続けられれば再現性のある分離が可能となる。これはカラム内が水移動相に切り替わり始める時点から **5 MPa** 以上の圧力がかかり続けることにより、毛管作用による充填剤細孔内からの移動相の抜け出しを抑えるためである。また測定後に有機溶媒濃度の高い移動相でカラム洗浄を毎回行えば、水移動相でも連続して送液している限り、保持の再現性の高い分離ができる。

近年は **C18** 固定相でも水移動相を用いても保持時間の再現性が高い **AQ** タイプが入手できるが、この **AQ** タイプの **C18** 固定相は **C18** アルキル基（ステアシル基）の結合密度を下げ、エンドキャッピングである **TMS** の結合密度を上げ、固定相の性質を **TMS** に近づけたり、極性の高い試薬を用いてエンドキャッピング処理をしたり、極性基埋め込み型のアルキル基を結合したりし、水との接触角を小さくしている。これらの処理を施した **C18** 固定相は通常の **C18** 固定相より固定相自身の疎水性が下がることから、移動相中の水がシリカ表面に接触しやすくなり、酸によるアルキル基の加水分解やアルカリによるシリカ自身への加水分解が起こりやすく、カラム寿命が短くなる欠点がある。その点 **C30** のような長鎖アルキル基固定相は極性を上げるような処理を施していないため、水移動相条件下の保持時間の再現性を維持しつつ、かつ高い耐久性を示す。

4. メタノール/水移動相の **C18** 固定相への濡れ性

メタノール/水移動相の目盛なオール濃度 / % 相を用いると保持時間が減少することから確認できたが、メタノール/水=**70/30**、**50/50** 及び **30/70** の移動相は **C18** 固定相に濡れるのか濡れないのか。これらの移動相を用いて保持時間が変化することはないため、また従来は濡れていないと固定相と移動相に溶質は分配できないと考えられていたため、当然 **C18** 固定相にこれらの移動相は濡れると考えられていた。図 7 にはメタノール/水の混合溶液を用いた時の **C18** 充填剤の分散状態を示す。A はメタノール/水=**70/30**、B はメタノール/水=**50/50**、C はメタノール/水=**30/70** 溶液を用いた。図 3 で用いた **C18** カラムに用いられた充填剤と同じ **C18** 充填剤を十分乾燥してそれぞれの溶液に投入し、超音波振動を加えながらかき混ぜた。A は充填剤が溶液に分散し沈降し始めていた、B は一部の充填剤が分散したが、多くの充填剤は液面上に浮いていた。C では全く分散せず、すべての充填剤が液面上に浮いていた。

つまり A のメタノール/水=70/30 溶液は C18 固定相に濡れることを示しており、毛管作用により充填剤細孔内へ溶液が簡単に入り込み溶液中に分散した。C のメタノール/水=30/70 溶液は C18 固定相には濡れず、液面上に浮いており、B のメタノール/水=50/50 溶液は超音波振動のエネルギーで一部の C18 充填剤は分散したが、ほとんどの C18 充填剤が液面上に浮いていることは C18 固定相はこの溶液にも濡れないことを示している。図 3 に示されているように送液停止すると充填剤細孔内から移動相が抜け出し保持時間が減少するが、その後メタノール/水=50/50 移動相を流しても保持時間は回復しない。これはメタノール/水=50/50 溶液は C18 固定相に濡れず充填剤細孔内に入り込まないためであり、逆にメタノール/水=70/30 移動相を流せば保持時間が回復するのは、メタノール/水=70/30 溶液は C18 固定相を濡らすため、充填剤細孔内に入り込むためである。メタノール/水=50/50 溶液は C18 固定相に濡れないのであれば、この溶液を移動相として用いると毛管作用により充填剤細孔内から移動相を抜け出させる力が働くはずであるが、実際には充填剤細孔内から移動相は抜け出さず、保持時間の減少は起こらない。これは図 6 で示されているように細孔内へ浸透させる力と細孔内から排除させる力が大きく異なっているためで、メタノール/水=50/50 溶液を C18 充填剤細孔内へ浸透させるには大気圧では不十分で、メタノール/水=50/50 溶液が C18 充填剤細孔内にあらかじめ入っている場合に細孔内から抜け出させる圧力（力）は大気圧より低いためである。充填剤周りの圧力を真空乾燥器内で 0.01 MPa（約 0.1 気圧）にしてカラムから抜け出した移動相の重量をカラムの重量減として測定した結果を図 8 に示す。メタノール/水=10/90, 30/70, 50/50, 70/30 及び 80/20 の溶液を封入したカラムを温度 40℃に設定した真空乾燥器に入れ 0.01MPa の圧力下に 20 分間静置し、カラムの重量減を測定した。メタノール/水=70/30 及び 80/20 溶液は C18 固定相に濡れるため、カラムの重量減はほとんどなかった。しかし他の溶液はカラム重量が下がっており、C18 充填剤細孔内から溶液が抜け出していることを示している。

つまりこれらの溶液は C18 固定相に濡れず、毛管作用により働く細孔内から溶液を抜け出させる圧力（力）は大気圧より低く、0.01 MPa より高いことを示している。もし 0.01 MPa の気圧の環境（高地）で HPLC を操作し、C18 カラムとメタノール/水=30/70 移動相を用いた場合、送液を停止すると、その後は保持時間が減少してしまう。

細孔径 10 nm の C30 充填剤は水との接触角が 104°で 90°より大きく、水には濡れないが、水移動相を用いても



図 7 メタノール/水の混合溶液中で超音波振動を加えた状態で攪拌した C18 充填剤の分散状態
Packing material, 5 μ m dp C18, 10-nm pore size;
solution, A = methanol/water = 70/30,
B = methanol/water=50/50,
C = methanol/water=30/70.

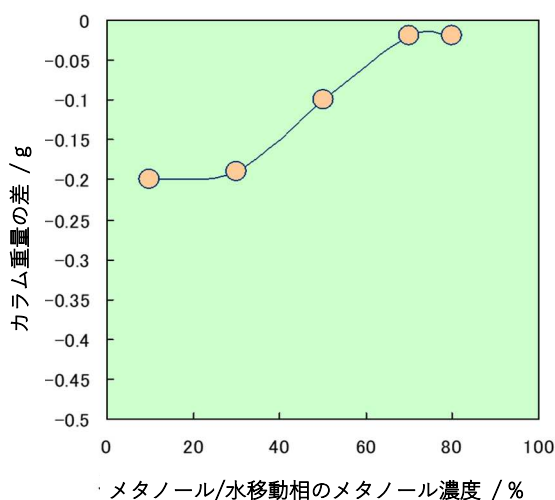


図 8 移動相中のメタノール濃度とカラム重量の関係
Column, 250 mm x 4.6 mm, 5 μ m dp C18, 10-nm; pore size; enclosed solution, methanol/water = 10/90, 30/70, 50/50, 70/30, 80/20; temperature, 40 °C.カラム重量の差として、初期と 20 分間 0.01 MPa の圧力に維持した後の重量差を測定した。

保持時間が減少しないのは、C18 カラムのメタノール/水=30/70 移動相使用時と同じで、毛管作用により働く C30 充填剤細孔径内から水移動相を抜け出させる圧力が大気圧より低いため、大気圧によって水移動相は C30 充填剤細孔内に押し込まれているためである。

5. アルキル基の有機溶媒和と分離特性

5.1 アルキル基の状態についての推測

これまでは水移動相を用いた場合の逆相カラムの保持時間減少の原因や、固定相および充填剤細孔内の移動相の存在について述べてきたが、固定相のアルキル基の状態については言及してこなかった。2000 年以前の保持時間の減少についての説明では、アルキル基が立ち上がって移動相と濡れている場合は保持があり、寝込むことにより保持はなくなるとされていた。また最近の特に欧米のクロマトグラファーの間では、充填剤細孔内から移動相が抜け出ることを肯定しているが、アルキル基が寝込むことにより移動相は固定相に濡れなくなり、保持しなくなるが、それと同時に充填剤細孔内から移動相が抜け出すと解釈されていることが多い。ではアルキル基の状態はどうのようになっているのであろうか。水移動相で C18 固定相のステアシル基は立ち上がっていることはあるのか。炭素数 6 のヘキサン(C_6H_{14})ですら、メタノールとは混ざらない。オクタデカン ($C_{18}H_{38}$) はロウソクのロウのような状態であり、オクタデカンはヘキサン以上にメタノールとは混ざらない。C18 カラムにメタノールを移動相として通液した場合に C18 固定相は隣接するステアシル基の間にメタノールが入り込んでステアシル基自身が立ち上がるのか。実際にはそうではなく、ステアシル基はメタノールとの接触面積が最低になるようなコンフォメーションをとり、シリカ表面でステアシル基は折れ曲がった状態で固まっていると推測される。またテトラヒドロフラン (THF) と水との混合溶液を移動相として用いた場合には、THF はオクタデカンを溶かすため、ステアシル基の塊の中に入り込み、C18 固定相は THF で膨潤し、THF がある濃度以上になると、隣接するステアシル基間に THF は十分入り込み、ステアシル基は立ち上がるようになると推測される。

5.2 逆相固定相への有機溶媒和

図 9 に示されているように C18 カラムに水移動相を用いるとメタノール、エタノール、アセトニトリル、プロパノールは保持し分離される。アセトニトリル/水=1/99 移動相を用いた場合にもアセトニトリルは保持し、保持係数(k)は 0.62 となる。同様にアセトニトリル/水=10/90 および 20/80 移動相でもアセトニトリルの保持係数(k)はそれぞれ 0.36 と 0.32 となる。保持係数 (k) は固定相中の溶質成分の存在量 (S) と移動相中の存在量 (M) の比として表される。

$$k=S/M$$

(S : 固定相中の溶質の存在量, M : 移動相中の存在量)

移動相には決まった濃度のアセトニトリルが常時含まれているため、アセトニトリル/水=1/99 移動相での保持係数 0.62 は移動相中の 1%のアセトニトリル量の 0.62 倍の量のアセトニトリルが固定相中に分配されていることになる。内径 4.6 mm、長さ 150 mm カラムで計算すると、C18 固定相へは 0.011 mL のアセトニトリルが分配されている。同様にアセトニトリル/水=10/90 および 20/80 移動

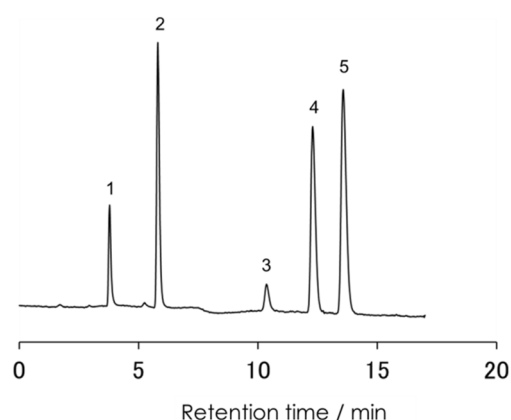


図 9 C18 カラムを用いたアルコールとアセトニトリルの分離

Column, 250 mm x 4.6 mm, 5 μ m dp C18, 10-nm pore size; peaks, 1 = methanol, 2 = ethanol, 3 = acetonitrile, 4 = 1-propanol, 5 = 2-propanol. 他の条件は図 3 と同じ。

相では 0.059 mL と 0.101 mL のアセトニトリルが分配されている。この分配量は固定相への溶媒和量と同一であると考えられる。メタノール、エタノールおよびテトラヒドロフラン(THF)について同様に溶媒和を求めた。溶媒和した有機溶媒は固定相として働くため、溶媒和量の増加量分がカラム内の移動相量(ホールドアップボリューム)の減少分と一致した。有機溶媒量の多い移動相では保持係数の測定誤差が大きくなるため、ホールドアップボリュームの減少分を溶媒和量の増加分として総溶媒和量を求めた。移動相中の有機溶媒濃度と固定相への溶媒和量の関係を図 10 に示す。この図のメタノール/水=82/18 の溶媒和量を 0.06 mL と仮定し、他の有機溶媒の溶媒和量を決定した。内径 4.6 mm, 長さ 150 mm カラム内には C18 および C30 充填剤は約 1.5 g 充填されており、炭素含有量 16% の C18 と炭素含有量 16% の C30 の固定相の容積は両方とも約 0.35 mL と計算される。各有機溶媒の固定相への溶媒和は移動相中の有機溶媒のある濃度で飽和している。また、THF の溶媒和量については、C18 固定相では固定相の容積とほぼ同じ量の有機溶媒が溶媒和しており、C30 固定相では固定相容積の 1.5 倍の有機溶媒が溶媒和している。これらの結果と前項の推測からアルキル基の状態は図 11 に示されているように、メタノールは固まった固定相上に溶媒和しているが、THF はアルキル基の間に入り込みアルキル基は立ち上がった状態になっていると考えられる。同じ炭素含有量の C30 と C18 固定相でもアルキル鎖長の違いにより THF の溶媒和量は異なり、アルキル基の長い C30 固定相の方が溶媒和量は多くなる。Schure ら¹¹⁾ はコンピューターシミュレーションの手法を用いメタノール/水およびアセトニトリル/水移動相中での C18 固定相のアルキル基の存在状態を考察している。温度 50℃ の条件で、有機溶媒 0% のの水のみの移動相ではほとんどアルキル基は固まっており、メタノール/水=82/18 移動相中でも 70% 以上アルキル基は固まっていると結論付けており、本稿の溶媒和量からのアルキル基の状態の推論を肯定する内容となっている。

図 12 にはメタノール/水=75/25 移動相とテトラヒドロフラン/水=50/50 移動相を用いた標準試料の分離を示す。6 番のアミルベンゼンの保持時間を比較すると、メタノール/水=75/25 移動相では炭素含有量が同じ C30 と C18 はほぼ同じ保持時間となり、炭素含有量の低い C8 は C18 の 1/2 以下の保持時間であったのに対し、テトラヒドロフラン/水=50/50 移動相ではアルキル鎖長の最も長い C30 が最も長い保持時間を示し、アルキル鎖長が短くなるほど保持時間は短くなった。メタノールとテトラヒドロフランではアミルベンゼンの各固定相の相対的な保持時間は大きく異なった。メタノール/水=75/25 移動相では図 11 に示されているように炭素含有量が同じ C30 と C18 は固まった状態で表面に少量のメタノールが溶媒和しており、溶媒和している有機溶媒を含めた固定相の体積は C30 と C18 はほぼ同じであるため、同じ保持時間になったと考えられる。一方テトラヒドロフラン/水=50/50 移動相ではテトラヒドロフランの溶媒和量は非常に多く、図 11 に示されてようにアルキル鎖長の長い固定相ほど多く溶媒和してお

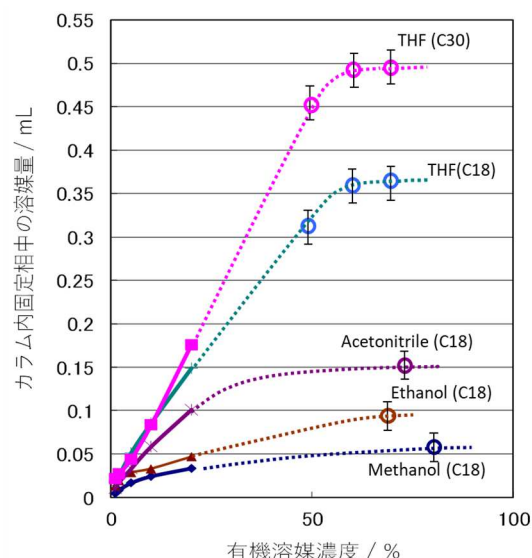


図 10 移動相中の有機溶媒濃度と固定相への有機溶媒の溶媒和の関係

Column, 150 mm x 4.6 mm, 5 μ m dp C18 and C30, 10-nm pore size; temperature: 40 $^{\circ}$ C.

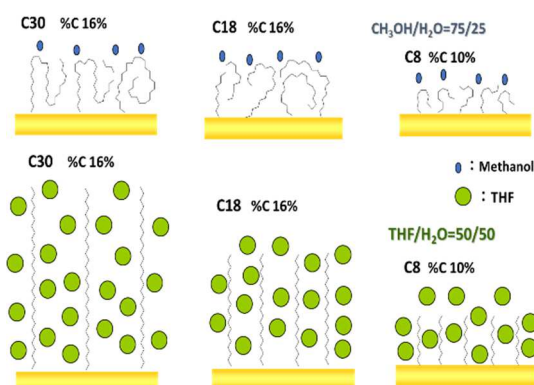


図 11 メタノールとテトラヒドロフラン(THF)の固定相への溶媒和

り、溶媒和している有機溶媒を含めた固定相全体では C30 が最も大きな体積になる。固定相体積が大きいほどアミルベンゼンの保持時間は長くなったと考えられる。メタノールとテトラヒドロフランによる保持時間の差は溶媒和量が異なり、固定相の体積が大きく変化することに起因していると推察される。しかしながらアミルベンゼンより極性が高い 3 番ピークのフェノールの保持時間を比較すると、両移動相において固定相に関係なく保持時間はほぼ同じであった。メタノール/水=75/25 移動相ではフェノールの保持時間が短く比較しづらいが、メタノール/水=30/70 移動相を用いるとフェノールの保持係数は約 3 になり、十分保持するようになる。この条件での比較でも、C30、C18 および C8 の保持時間はほぼ同じであった。このようにアミルベンゼンとフェノールは大きく異なる保持挙動を示した。この現象はフェノールに限ったことではなく、極性が高い他の化合物でも同様であった。フェノールはアミルベンゼンよりも極性が高いため、アミルベンゼンはオクタンやオクタデカンに溶解、固定相全体と相互作用するのにに対し、フェノールはオクタンなどに難溶で固定相内部に入り込むことがなく、固定相の表面付近でのみで相互作用していると推測される。固定相の表面は炭素含有量の大小に関係なく、シリカ基材が同じであれば、ほぼ同じ表面積であるため、保持時間はどの固定相でも同じになったと考えられる。

6. 高極性化合物と脂溶性化合物の分離

核酸と有機酸の分離を図 13 と図 14 に示す。いずれも C30 固定相カラムと有機溶媒を含まない緩衝液移動相を用いた。前述し

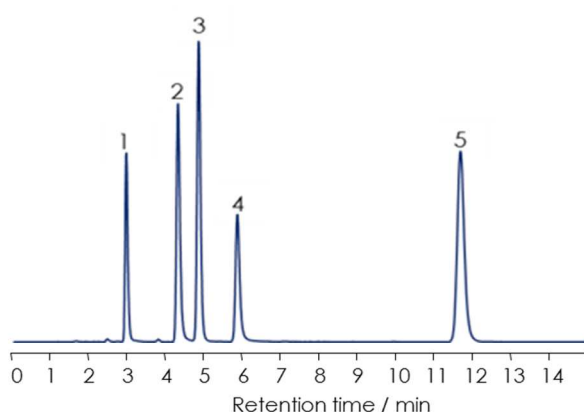
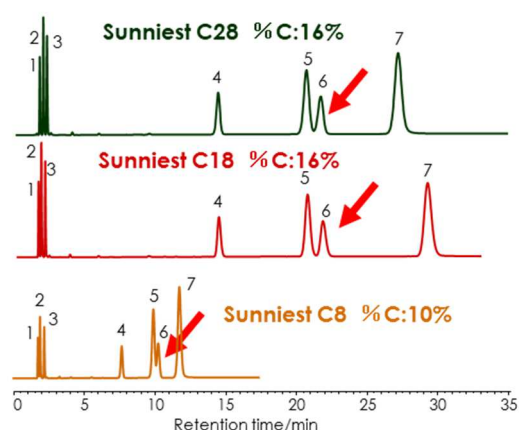


図 13 核酸の分離

Column, Sunniest RP-AQUA (C30) 3 μ m, 4.6 x 150 mm; mobile phase, 20 mM phosphate buffer pH6.0; flow rate, 1.0 mL/min; temperature, 40 $^{\circ}$ C; detection, UV at 250 nm; peaks, 1 = 5'-GDP, 2 = 5'-GMP, 3 = 5'-ATP, 4 = 5'-ADP, 5 = 5'-AMP.

メタノール/水=75/25



THF/水=50/50

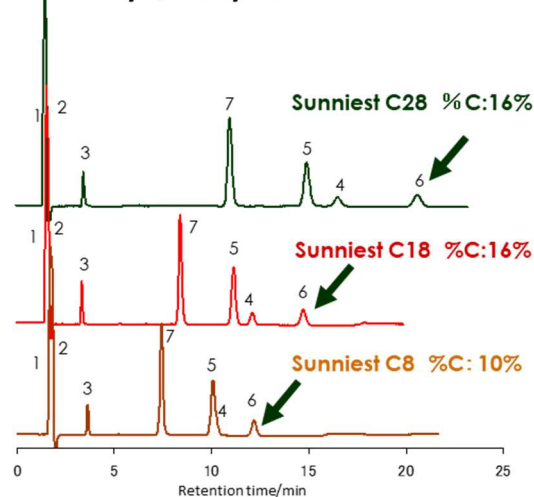


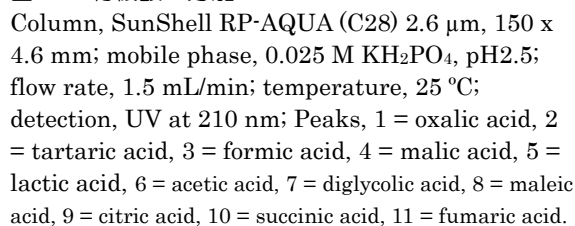
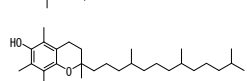
図 12 標準試料の分離

Column, 150 mm x 4.6 mm, 5 μ m dp, Sunniest C30, C18 and C8; mobile phase, methanol/water = 75/25 and tetrahydrofuran/water = 50/50; flow rate, 1.0 mL/min; temperature, 40 $^{\circ}$ C; detection, UV at 250 nm; peaks, 1 = uracil, 2 = caffeine, 3 = phenol, 4 = butylbenzene, 5 = o-terphenyl, 6 = amylbenzene, 7 = triphenylene.

たよう
に長鎖
アルキ
ル基は
緩衝液

のみの移動相でも安定した保持時間を示し、なおかつ高い耐久性を示すため、高極性化合物の分離には適している。核酸分析においては、ピークテーリングを抑えるために高濃度のリン酸緩衝液を用いることが多く、一般的に 100 mM リン酸緩衝液が移動相として用いられるが、図 13 の分離例では、エンドキャッピングが十分施され、残存シラノール基の影響がほとんどないカラムを用いているため、20 mM 濃度のリン酸緩衝液を用いてもテーリングしていない。有機酸の分離

いたが、C30 カラムを用いれば逆相モードでも分離可能である。アルキル長鎖の長い C30 固定相は C18 固定相に



The figure displays two chromatograms side-by-side. The left chromatogram is for the Conventional C18 column, showing two closely spaced peaks labeled 1 and 2. The right chromatogram is for the Sunrise C30 column, showing two well-resolved peaks labeled 1 and 2. The x-axis represents Retention time / min, ranging from 0 to 35. The y-axis represents detector response.

Conventional C18
%C:18%

Sunrise C30 %C:18%

Retention time / min

-15-

固定相でも C30 固定相でも分離できるが、同じ炭素含有量の固定相であるにも関わらず、C30 固定相は C18 固定相の 2 倍の保持を示し、アルファーとベータカロテンの分離度(R_s)は大きく改善され、C18 固定相は 1.15 であるのに対し C30 固定相では 5.50 であった。天然物の分離ではアルファーとベータカロテンの間に溶出する成分の存在が知られており、C30 固定相ではこれらの成分が分離可能となる。トコフェロールとカロテンの分離では同じカラムを用いているが、メタノール/水移動相を用いたトコフェロールの分離では C18 カラムと C30 カラムで保持時間の差はほとんどないが、アセトニトリル/クロロホルム移動相を用いたカロテンの分離では両カラムで 2 倍の保持時間の差が生じた。これは今まで述べてきたように疎水性の高いクロロホルムの溶媒和量は非常に多く、それぞれの固定相はクロロホルムにより膨潤し、アルキル基が立ち上がった状態になり、溶媒和した有機溶媒を含めた C18 固定相と C30 固定相の体積が大きく異なるためであると考えられる。

7. まとめ

アルキル基固定相の保持力や炭素 1 個の差の分離について考察した。また高極性化合物を保持させるために、移動相中の有機溶媒比率を下げ、最終的に有機溶媒を含まない移動相を用いることになった場合に起こる現象について述べてきた。さらに移動相中の有機溶媒の溶媒和について考察し、この溶媒和が分離に与える影響についても述べてきた。クロマトグラフィーは結果としての分離に重きが向けられがちであるが、本稿では二十数年前には常識的に言われていた事柄について懐疑的にみることにより、違った見方や考え方があることを示した。従来とは異なった視点から分離について考えるきっかけになれば幸いである。逆相クロマトグラフィーでは C18 固定相が主流であるが、C30 固定相は高極性化合物分離のための水・緩衝液のみの移動相使用時でも保持時間の再現性が高く、なおかつ耐久性も優れており、有機溶媒のみの移動相で脂溶性化合物分離する場合にも、C18 固定相より優れている。今後、長鎖アルキル基の C30 カラムは C18 カラムと同様に逆相分離には欠かせないものになると思われる。

文献

- 1) J.J. Kirkland, *J Chromatogr. Sci.*, **7**, 13-16 (1969).
- 2) G. E. Berendsen, L. Galan, *J. Chromatogr. A*, **196**, 21-37 (1980).
- 3) N. Nagae and D. Ishii, *American Laboratory*, **27**, 20 (1995).
- 4) R. P. W. Scott, C. F. Simpson, *J. Chromatogr.* **197**, 11-20 (1980)
- 5) N. Nagae, T. Enami, *Bunseki Kagaku*, **49**, 887-893 (2000).
- 6) M. Przybyciel, R. E. Majors, *LCGC North America*, **20** Number 6 (2002).
- 7) K. A. Lipka, L. C. Sander, and R. D. Mountain, *Anal. Chem.*, **77**, 7852-7861 (2005).
- 8) T. Enami, N. Nagae, *Chromatography*, **22**, 33-39 (2001).
- 9) N. Nagae, T. Emani, S. Doshi, *LCGC North America* **20**, 964-972 (2002).
- 10) T. Enami, N. Nagae, *Bunseki Kagaku*, **53**, 1309-1313 (2004).
- 11) M. R. Schure, J. L. Rafferty, L. Zhang, J. I. Siepmann, *LCGC North America*, **31**, 630-637 (2013).

株式会社 クロマニク テクノロジーズ
552-0001 大阪府大阪市港区波除 6-3-1
TEL: 06-6581-0885 FAX: 06-6581-0890
E-mail: info@chromanik.co.jp
Website: <http://chromanik.co.jp>

202009