

逆相カラム Biphenyl, PFP および PFP&C18 の分離特性

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

逆相クロマトグラフィーでは、C18 (ODS) カラムは保持時間が長く、耐久性が高く、さらに多くの応用例が発表されている事などから、多くのクロマトグラファーが使用しており、汎用性の高いカラムである。しかし試料によっては、C18 カラムでは分離が難しく、他の固定相のカラムを用いると簡単に分離できる場合もある。C18 固定相と分離選択性が異なる固定相として、C30 固定相、Phenyl 固定相、Biphenyl 固定相、Pentafluorophenyl (PFP) 固定相、Cyano 固定相などが知られている。C30 固定相は 100%水系移動相条件でも保持時間の再現性が高い、ビタミン E の異性体の分離が可能、脂溶性の高いカロテンやトリグリセリドの異性体の分離が良いなどの特徴がある。Phenyl 固定相や Biphenyl 固定相はアルキル基型固定相にはない π 電子を有している事が特徴で、 π - π 相互作用や CH/ π 相互作用が働く。PFP 固定相はフェニル基に五つのフッ素原子が結合しており、 π - π 相互作用のみならず、水素結合性、双極子相互作用、静電的相互作用が働くと言われている。Cyano 固定相は疎水性が低く、三重結合を有しているので、逆相固定相としては特異的な存在である。本稿では Biphenyl 固定相と PFP 固定相および PFP と C18 を併せ持つ PFP&C18 固定相について C18 固定相とは異なる分離特性を解説する。

2 標準試料による逆相固定相の比較

図 1 に逆相固定相の模式図を示す。フェニル基系固定相はケイ素原子とフェニル基の間にスペーサーとしてアルキル基を入れる事が多いが、Biphenyl 固定相はケイ素原子に直にビフェニル基が結合している。図 2 に同一の比表面積 340m²/g の全多孔性シリカに三官能性シリル化試薬を結合後、エンドキャッピング処理を行った C30 固定相、C18 固定相、C8 固定相、Phenyl 固定相、Biphenyl 固定相、PFP 固定相および PFP&C18 固定相による標準試料の分離と、それぞれの充填剤の炭素含有量、カフェインとフェノールの分離係数としての水素結合性、アミルベンゼンとブチルベンゼンの分離係数としての疎水性およびトリフェニレンと σ -ターフェニルの分離係数としての立体選択性を示す。ウラシルの溶出時間をホールドアップタイムとして計算した。C30、C18 および C8 のアルキル基固定相は炭素含有量の多い順番で保持が大きく、フェニル基、ペンタフルオロフェニル基固定相では炭素含有量の保持への効果がアルキル基固定相より低い。C8 固定相と Biphenyl 固定相との比較では、C8 固定相の方が、炭素含有量は低いがあミルベンゼンの保持は大きい。水素結合性はフェノールを基準としたカフェインの保持割合であり、水素結合性が大きいと極性の高い（水素結合性が強い）化合物の保持が大きくなる。これは、エン

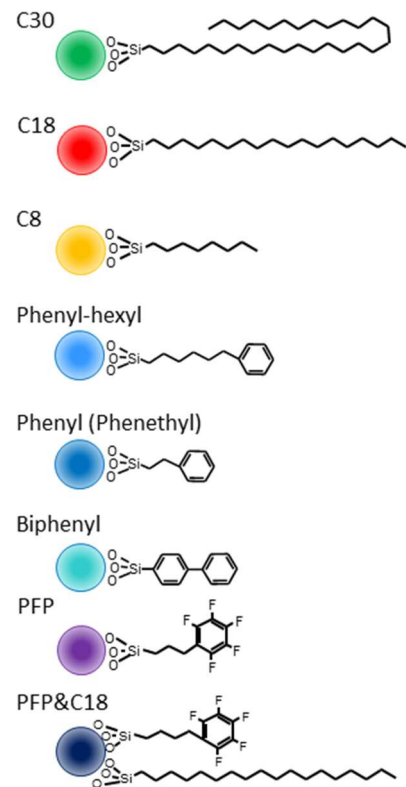
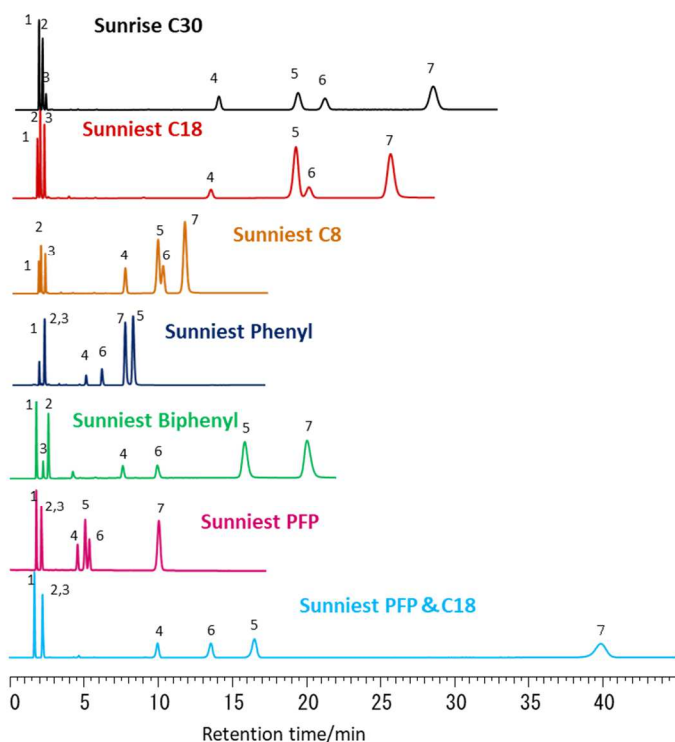


図 1 逆相固定相の模式図



Column: SunriseC30,
 Sunniest C18, RP-AQUA, 5C8, PhE, PFP, PFP&C18
 5 μ m 4.6x150 mm
 Mobile phase: CH₃OH/H₂O=75/25
 Flow rate: 1.0 mL/min
 Temperature: 40 °C
 Pressure: 5.4 MPa
 Sample: 1 = Uracil,
 2 = Caffeine,
 3 = Phenol,
 4 = Butylbenzene,
 5 = o-Terphenyl,
 6 = Amylbenzene,
 7 = Triphenylene.

固定相	炭素含有量	水素結合性 (Caffeine/ Phenol)	疎水性 (Amylbenzene/ Butylbenzene)	立体選択性 (Triphenylene/ o-Terphenyl)
C30	18%	0.51	1.59	1.52
C18	16%	0.43	1.56	1.37
C8	10%	0.33	1.43	1.23
Phenyl	10%	1.00	1.34	0.92
Biphenyl	11%	1.77	1.41	1.30
PFP	10%	1.00	1.29	2.51
PFP&C18	14%	1.00	1.43	2.66

図2 標準試料の分離と水素結合性・疎水性・立体選択性

ドキャッピングを施していない C18 充填剤では残存シラノール基とカフェインの水素結合性による二次的相互作用が強く働く為、カフェインの保持は大きくなるが、フェノールは残存シラノール基による二次的相互作用を受け難く、大きな保持の変化がない特性を利用したものである。PFP 固定相、PFP&C18 固定相、Phenyl 固定相および Biphenyl 固定相は、アルキル基固定相よりも水素結合性が高い値となった²⁾。特に Biphenyl 固定相は C18 固定相と同じエンドキャッピングを施しており、残存シラノール基の影響は少ない筈であるが、エンドキャッピングを施していない C18 固定相と同等か、それ以上の高い水素結合性を示した。フェノール基やビフェニル基の特性として、ベンゼン環に由来する π 電子の存在により環の中心部が最もマイナスに偏っていると考えられ、この電子の偏りが水素結合性 (CH/ π 相互作用) を大きくしており、カフェインのような極性化合物をより強く保持するようになると推察される。Biphenyl 固定相はベンゼン環が 2 つ結合しており、固定相としては結晶状態になっておらず、液体に近い状態であると考えられ、二つのベンゼン環は約 45 度傾いて結合している。この隣接した 2 つのベンゼン環の相乗効果により水素結合性がより強くなっていると思われる。立体選択性の評価に用いられたトリフェニレンと σ ターフェニルは 3 つのベンゼン環が結合しており、トリフェニレンは 3 つのベンゼン環が平面的に配置しているのに対し、 σ ターフェニルはそれぞれのベンゼン環は振じれた状態になっている。この立体的な差の認識 (分離) 度合いを立体選択性としている。アルキル基固定相ではアルキル鎖長の長い固定相程、立体選択性は高くなり、メチル基の位置異性体である β -トコフェロールと γ -トコフェロールは立体選択性の高い C30 固定相の方が C18 固定相より良い分離を示す³⁾。Biphenyl 固定相および Phenyl 固定相については立体的な差の認識よりも、 π - π 相互作用が強く発揮されてトリフェニレンと σ ターフェニルが保持されていると考えられる。アルキル基固定相では σ ターフェニルの溶出後にアミルベンゼンが溶出するが、フェニル基固定相では π - π 相互作用により σ ターフェニルの保持が大きくなり、アミルベンゼンとの溶出順序が逆転した。トリフェニレンの保持について、Phenyl 固定相では σ ターフェニルとトリフェニレンは同じ時間に溶出したが、Biphenyl 固定相はアルキル基固定相と同様にトリフェニレンの保持が大きくなった。Phenyl 固定相と Biphenyl 固定相は、共にフェニル基型の固定相として分類されるが、水

素結合性と立体選択性の値が大きく異なった。PFP 固定相はフェニル基に 5 つのフッ素原子が結合し、疎水性相互作用、水素結合性、双極子相互作用、 π - π 相互作用および静電的相互作用が働くと考えられており、他の固定相と大きく異なる。PFP 固定相と PFP&C18 固定相については、ここで用いた立

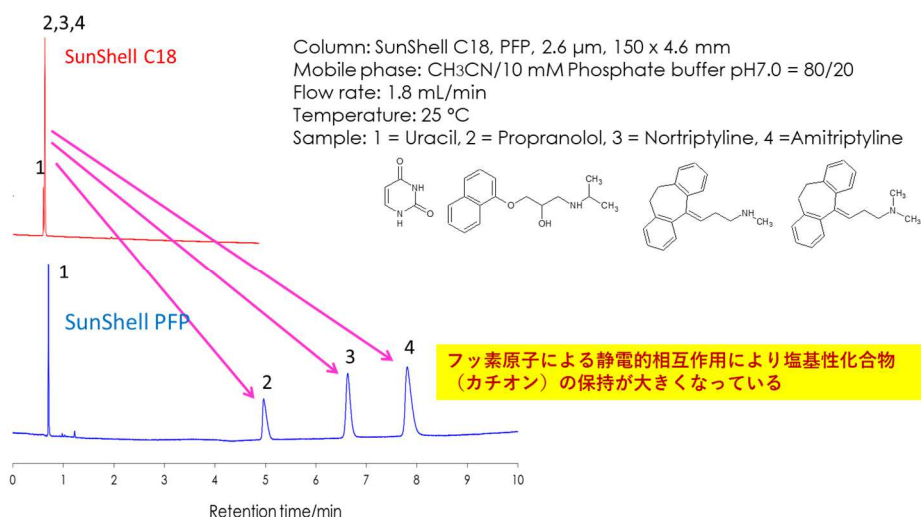


図3 C18とPFP固定相による塩基性化合物の分離

体選択性の値は 2 以上になった。これは他の固定相に比べ非常に大きな値であり、 σ -ターフェニルとトリフェニレンの保持についてはフェニル基型固定相と同様にアルキル基固定相とは異なる相互作用が働いていると推察される。また、PFP&C18 固定相は PFP 固定相に C18 固定相を加えたもので、疎水性の値は C18 固定相が加わった事で増加し、保持は大きくなったが、水素結合性や立体選択性の値は PFP 固定相とほぼ同じであり、PFP&C18 固定相も PFP 固定相と同様な分離特性を有していた。PFP 固定相は PFP 独自の分離挙動を示し、特にフッ素原子の電子吸引性により、構造中の電子の偏りが生じる為、カチオンの保持が大きくなる。図 3 にコアシェルシリカに表面処理を施した C18 固定相と PFP 固定相の塩基性化合物の分離を示す。移動相 pH は 7 であり、これらの塩基性化合物はプロトン化したカチオンとして存在する。移動相中のアセトニトリル濃度は 80% であり、C18 固定相では塩基性化合物をほとんど保持していないのに対し、PFP 固定相は 5 分から 8 分に溶出し、大きな保持を示した。これは静電的相互作用による保持の増大であると考えられる。このカチオンの保持を大きくしている相互作用を陽イオン交換相互作用であるとする報告⁴⁾もあるが、PFP 固定相のフッ素原子はイオン化しておらず、イオン交換は起こり得ない。また、この静電的相互作用は移動相中有機溶媒濃度が高くなる程、大きく作用し、塩基性化合物の保持時間が長くなる。この現象を HILIC モードの分離挙動であると説明される事⁵⁾もある。HILIC モードは順相モードの一部であり、移動相に有機溶媒と水溶液の混合溶媒を用いた場合を特に HILIC モードと表現している。順相モードでは移動相よりも固定相の方の極性が高く、極性の高い溶質程、保持が大きくなり、逆相とは反対になる。しかし、PFP 固定相は有機溶媒と緩衝液の混合溶媒の移動相より疎水性が高く、さらに、塩基性化合物の保持は疎水性の高いもの程、保持時間が長くなっており、逆相の分離挙動を示している(図 3)。移動相中の有機溶媒濃度の増加と共にカチオンの保持が大きくなるのは、静電的相互作用が移動相中の有機溶媒濃度が高い程、相対的に強くなる事が理由である推察され、逆相分配相互作用に二次的に静電的相互作用が加味されているものと考えられる。

HPLC 用のシリカゲル充填剤はシリカ表面に何も修飾しないシリカゲルそのものを吸着クロマトグラフィーとして、また水やアルコールなどの極性溶媒をシリカ表面に保持させ、順相分配による分離を行う順相クロマトグラフィーとして使用される場合と、シリカ表面にシラノール基を介して極性の高いアミノプロピルシリル基などを結合し順相クロマトグラフィーとして、またオクタデシルシリル基やフェニルシリル基などを結合し逆相クロマトグラフィーとして使用される場合がある。それぞれの分離モードによりシラノール基の役割は変わるが、吸着クロマトグラフィーでは文字通り吸着点として働き、逆相モードやヒリックモードの様に移動相に水が含まれる分離モード

では、カチオンに対してイオン交換、アニオンに対してイオン排除、極性化合物に対して水素結合が働く。シリカ表面に存在するシラノール基の pKa は 2.6 前後であると言われており、シラノール基が解離し、SiO⁻の状態になる pH 3 以上の移動相条件において、イオン交換やイオン排除が起こる。

3 Biphenyl カラムの分離例

図 4 に種々の固定相と移動相を用いて得られたメチル馬尿酸異性体の分離を示す。固定相として C18、C30、Phenyl および Biphenyl を用い、移動相中の有機溶媒としてメタノールおよびアセトニトリルを用いて、それぞれの固定相の分離を比較した。メチル馬尿酸はメタ体とパラ体の異性体の分離が難しく、近接して溶出される。それぞれのクロマトグラム上にメタ体とパラ体の異性体の分離係数 α を示した。移動相中の有機溶媒が 25 %メタノールと 13.5 %アセトニトリルを比較すると、25 %メタノールは固定相により保持時間が大きく異なり、Phenyl 固定相は C18 固定相より保持時間は長くなり、Biphenyl 固定相はさらに保持時間が長く、C18 固定相と比較し約 2 倍の保持時間となった。しかし、13.5 %アセトニトリルでは全ての固定相でほぼ同じ保持時間となった。さらに、Biphenyl 固定相におけるパラ-メチル馬尿酸とメタ-メチル馬尿酸の溶

出順序に関しては、25 %メタノールでは他の固定相とは溶出順序が逆転したが、13.5 %アセトニトリルでは他の固定相と同じ溶出順序であった。25 %メタノールで Phenyl 固定相や Biphenyl 固定相においてメチル馬尿酸の保持が大きくなったのは、 π - π 相互作用によるものと考えられる。アセトニトリルの CN の三重結合が固定相と溶

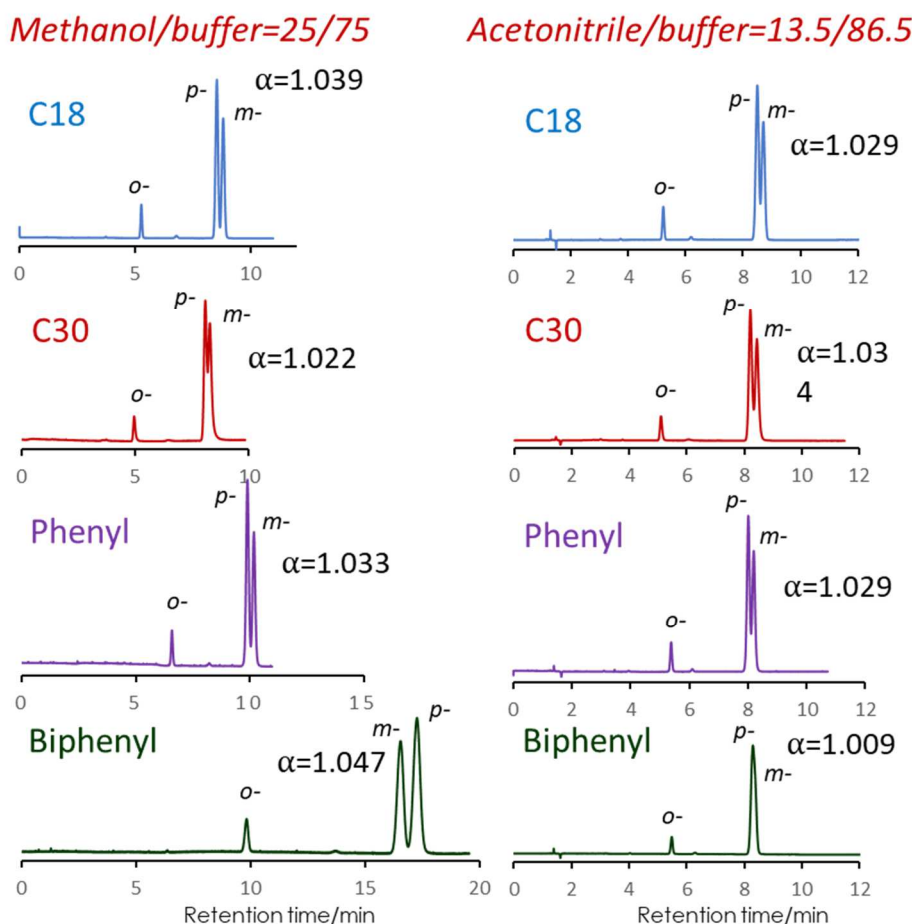


図 4 メチル馬尿酸異性体の分離

Column: SunShell C18 2.6 μ m 150 x 4.6 mm

SunShell C30 2.6 μ m 150 x 4.6 mm

SunShell Phenyl 2.6 μ m 150 x 4.6 mm

SunShell Biphenyl 2.6 μ m 150 x 4.6 mm

Mobile phase: Organic solvent/25 mM phosphate buffer pH3.0

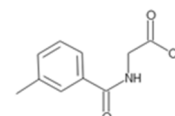
Flow rate: 1.0 mL/min

Temperature: 40 $^{\circ}$ C

Detection: UV@230 nm

Peaks: o-, m-, p-methylhippuric acid

m-methylhippuric acid



質の間の π - π 相互作用を弱める為、13.5 %アセトニトリルではフェニル基の特徴が発揮されず、保持時間はそれぞれの固定相で大差なく、Biphenyl 固定相でのパラ・メタ-メチル馬尿酸の溶出順序は逆転しなかったと推察される。

図 5 に C18、C30 および Biphenyl 固定相による核酸塩基類の分離を示す。核酸塩基は極性が高い為、メタノールを 20 %程度含む移動相では保持係数が 1 以下になる。有機溶媒を含まない緩衝液の移動相では、例えばチミンの保持係数は 3~5 程度に増大する。逆相カラムは有機溶媒濃度が 5 %を下回るような移動相では保持時間の再現性が低くなる事が知られており、これ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により起こるものと報告されている⁶⁾。図 5 の C18 カラムの有機溶媒を含まない 10 mmol/L の酢酸アンモニウム水溶液を移動相とした分離は、カラム出口以降に 5 MPa の背圧を掛け、充填剤細孔内からの移動相が抜け出ない様にしている。3 種類の

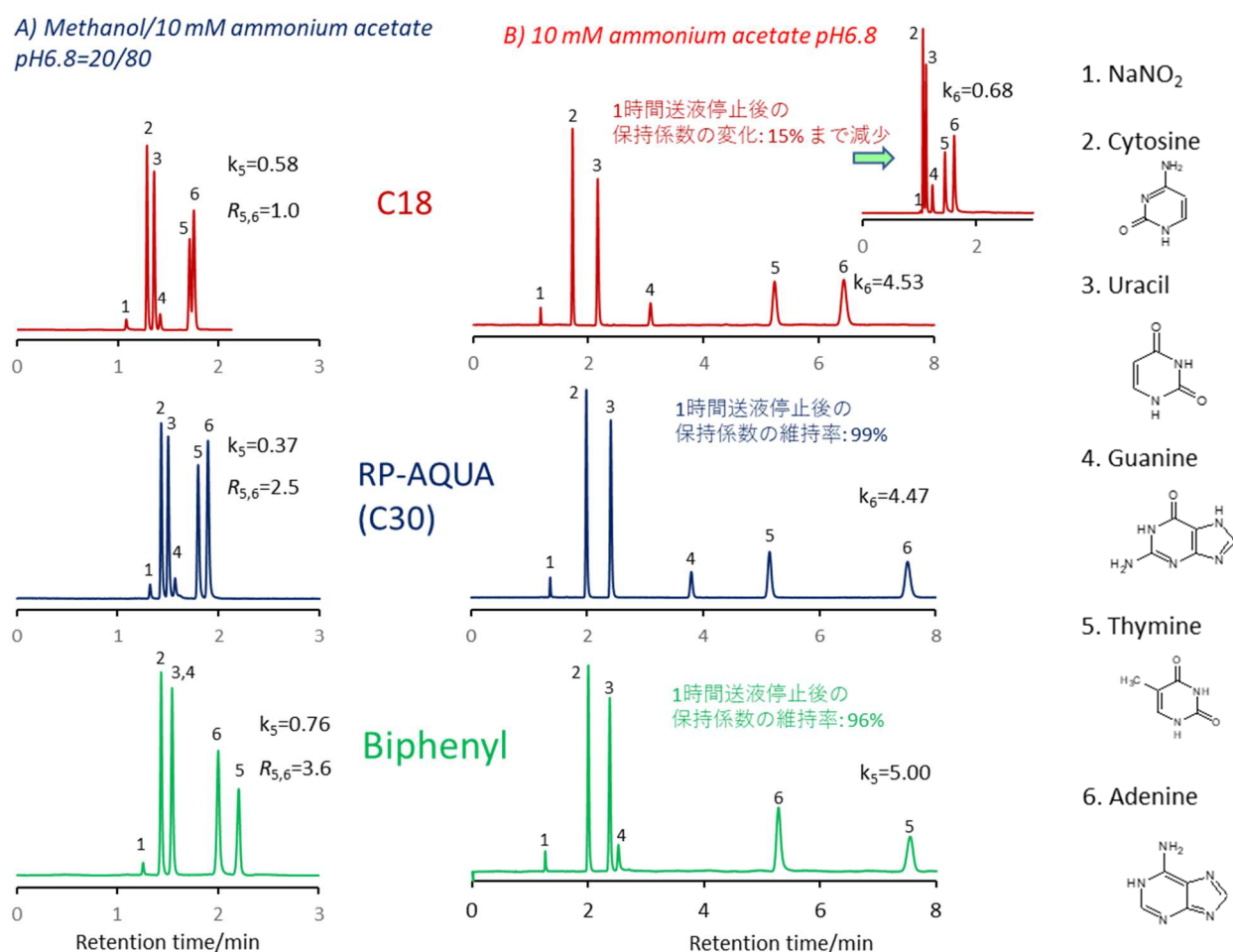


図 5 核酸塩基の分離

Column: SunShell C18 2.6 μ m, 150 x 4.6 mm (pore size: 9 nm)

SunShell RP-AQUA 2.6 μ m, 150 x 4.6 mm (pore size: 16 nm)

SunShell Biphenyl 2.6 μ m, 150 x 4.6 mm (pore size: 9 nm)

Mobile phase: A) Methanol/10 mM ammonium acetate pH 6.8=20/80

B) 10 mM ammonium acetate pH 6.8

Flow rate: 1.0 mL/min

Temperature: 40 °C

Detection: UV@250 nm

Sample: 1 = Sodium nitrite, 2 = Cytosine, 3 = Uracil, 4 = Guanine, 5 = Thymine, 6 = Adenine

固定相を比較すると、最後に溶出する成分は Biphenyl 固定相が最も大きな保持を示した。また、チミン（ピーク 5）とアデニン（ピーク 6）は Biphenyl 固定相のみ溶出順序が逆転した。さらにグアニンの相対的な保持は Biphenyl 固定相が特に小さく、ウラシルと近い保持時間となった。これらの現象は 20 % のメタノールを移動相に加えた時も、100 %水系移動相と同様であった。図 2 で示されている水素結合性が最も高い Biphenyl 固定相は、核酸塩基の保持や、溶出順序に水素結合性が大きく寄与していると考えられる。Biphenyl 固定相は π - π 相互作用や CH/ π 相互作用¹⁾が働くと言われていたが、これらの相互作用も加味され、カフェインの保持を大きくする水素結合性が増大したと考えられる。100 %水系移動相を用いた場合のポンプ停止前後の保持時間の安定性は、C30 と Biphenyl 両固定相とも高く、ポンプ停止後再度通液して得られた保持時間はポンプ停止前の 96 %以上であった。しかし、C18 固定相ではポンプ停止後は 15 %まで保持間は減少した。

図 6 には酒石酸、グリコール酸、ギ酸及び乳酸の分離を示す。RP-AQUA(C30) 固定相と Biphenyl 固定相の比較を行った。アルキル鎖系(C18-AQ 等)のカラムでは酒石酸とギ酸のピークが接近しており、グリコール酸はほとんどの場合酒石酸と重なる。RP-AQUA(C30)カラムも同様に酒石酸とグリコール酸は重なり、1本のピークとなった。しかし Biphenyl カラムは図 6 及び図 9 に示されている様に、酒石酸ピークとギ酸ピークは離れており、この間にグリコール酸は溶出した。Biphenyl カラムは酒石酸、グリコール酸及びギ酸の 3 成分の分離が可能であった。

4 PFP および PFP&C18 カラムの分離例

図 7 には PFP 固定相、PFP&C18 固定相および C18 固定相を用いたフルオロベンゼン類の分離を示す。フルオロベンゼンとベンゼンは C18 固定相では分離不可能であるが、PFP 固定相および PFP&C18 固定相では保持時間は異なるものの十分な分離が達成された。PFP はハロゲンを含む化合物の選択性が向上した。図 8 にはカテコールアミン類の分離を示す。エピネフリンとレボドーパの溶出順序は PFP&C18 固定相と PFP 固定相では逆になった。PFP&C18 固定相は C18 固定相で分離を行った場合の溶出順序と同じであり、疎水性相互作用が保持に大きく寄与していると推察されるのに対し、PFP 固定相は水素結合性、双極子相互作用が保持に大きく寄与し、極性のより高いエピネフリンの保持が増大したと考えられる。図 9 には 9 種の有機酸の分離を示す。RP-AQUA(C30) 固定相、Biphenyl 固定相、PFP 固定相および PFP&C18 固定相を比較しているが、それぞれの固定相で溶出順序は異なり、それぞれの固定相が有する特異な相互作用が発揮されていると推察される。PFP 固定相と PFP&C18 固定相の比較において、保持時間は PFP&C18 固定相の方が大きくなった。これは pH3 のとの間で働く疎水性相互作用が他の相互作用よりも保持に大きく寄与したためであると考えられる。図 7 と 8 での両分離は 100%水系移動相であり、極性

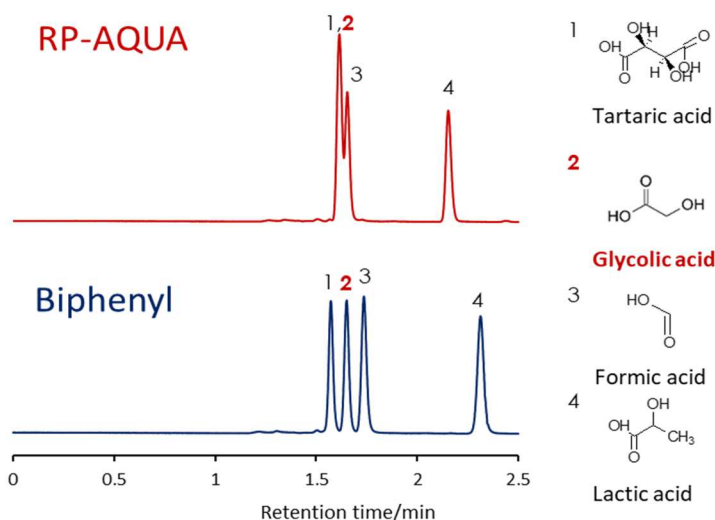


図 6 グリコール酸の分離

Column: SunShell RP-AQUA, 2.6 μ m 150 x 4.6 mm

SunShell Biphenyl, 2.6 μ m 150 x 4.6 mm

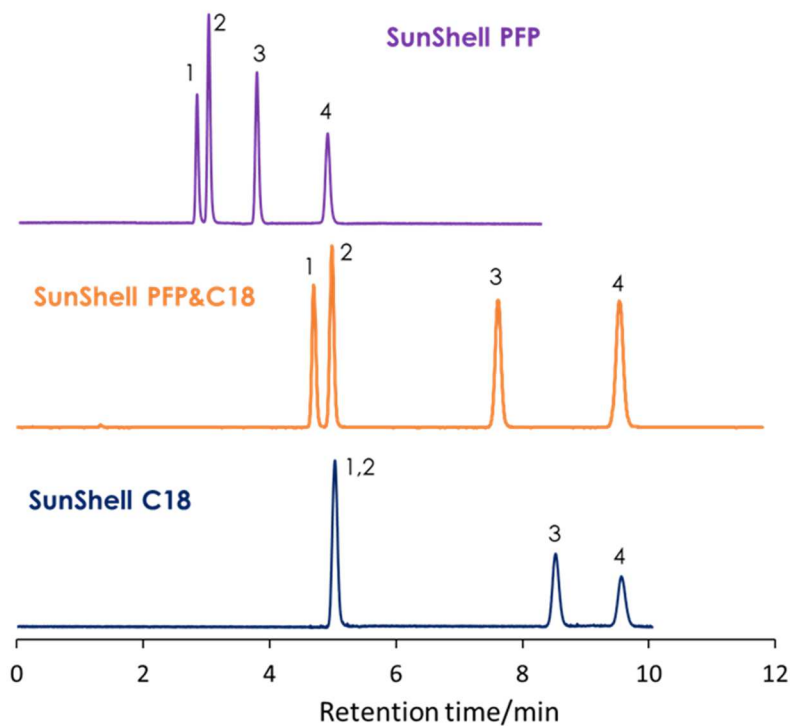
Mobile phase: 0.1% H₃PO₄

Flow rate: 1.0 mL/min

Temperature, 40 °C

Detection: UV210 nm

Peaks, 1=tartaric acid, 2=glycolic acid, 3= formic acid, 4=lactic acid.



の高い化合物の分離であるが、固定相との相互作用の関わり方は化合物の性質により異なる事が示された。

図7 フルオロベンゼン類の分離

Column: SunShell PFP 2.6 μ m, 150x 4.6 mm

SunShell PFP&C18 2.6 μ m, 150x 4.6 mm

SunShell C18 2.6 μ m, 150x 4.6 mm

Mobile phase: Methanol/water=60/40

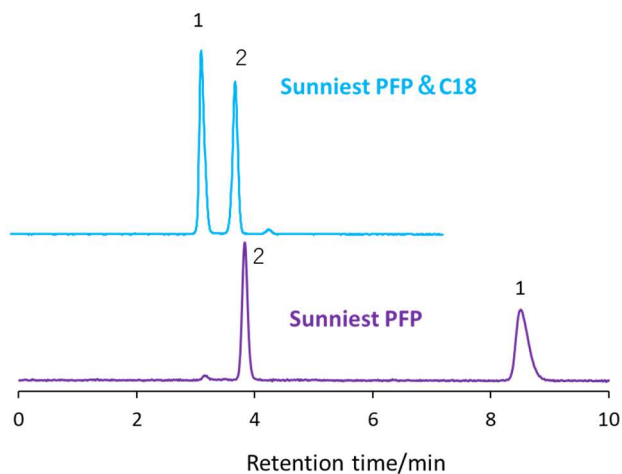
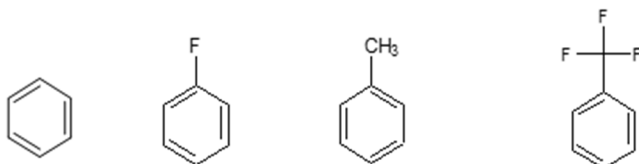
Flow rate: 1.0 mL / min

Temperature: 40 °C

Detection: UV@250 nm

Sample:

1 = Benzene, 2 = Fluorobenzene, 3 = Toluene, 4 = α,α,α -Trifluorotoluene



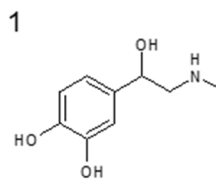
Column: Sunniest PFP&C18, PFP 5 μ m, 150 x 4.6 mm

Mobile phase: 12.5 mM Ammonium Formate(pH3)

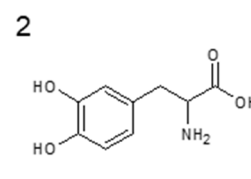
Flow rate: 1.0 mL/min

Temperature: 25 °C

Detection: UV@260nm



Epinephrine



Levodopa

図8 カテコールアミン類の分離

Biphenyl 固定相, PFP 固定相および PFP&C18 固定相を比較しているが, それぞれの固定相で溶出順序は異なり, それぞれの固定相が有する特異な相互作用が発揮されていると推察される。PFP 固定相と PFP&C18 固定相の比較において, 保持時間は PFP&C18 固定相の方が大きくなった。これは pH3 のとの間で働く疎水性相互作用が他の相互作用よりも保持に大きく寄与したためであると考えられる。図 8 と 9 での両分離は 100%水系移動相であり, 極性の高い化合物の分離であるが, 固定相との相互作用の関わり方は化合物の性質により異なる事が示された。

5 まとめ

本稿で紹介した Biphenyl カラム, PFP カラムと PFP&C18 カラムはそれぞれ C18 カラムにはない特徴を有しており, Biphenyl は π - π 相互作用や大きな水素結合性により, PFP や PFP&C18 は π - π 相互作用, 水素結合性, 双極子相互作用および静電的相互作用により, C18 とは大きく異なる分離が可能である。これらのカラムは, C18 カラムを補完するカラムとして, 注目されており, 今後の応用例が期待される。

文献

- 1) A. Fujii, H. Hayashi, J. W. Park, T. Kazama, N. Mikami, S. Tsuzuki; *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **13**, 14131-14141 (2011)
- 2) H. Cramer, D. S. Bell, D. Shollenberger; *LCGC Europe*, **30**, 6, 314-320 (2017).
- 3) 長江徳和, LC と LC/MS の知恵, 第 1 号, 8-27 (2020).
- 4) J. Nichthäuser, P. Stepnowski; *J. Chromatogr. Sci.*, **47**, 247-253 (2009).
- 5) D. S. Bell, A. D. Jones, *J. Chromatogr. A*, **1073**, 99-109 (2005).
- 6) 榎並敏行, 長江徳和, 分析化学, **53**, 1309-1313 (2004).

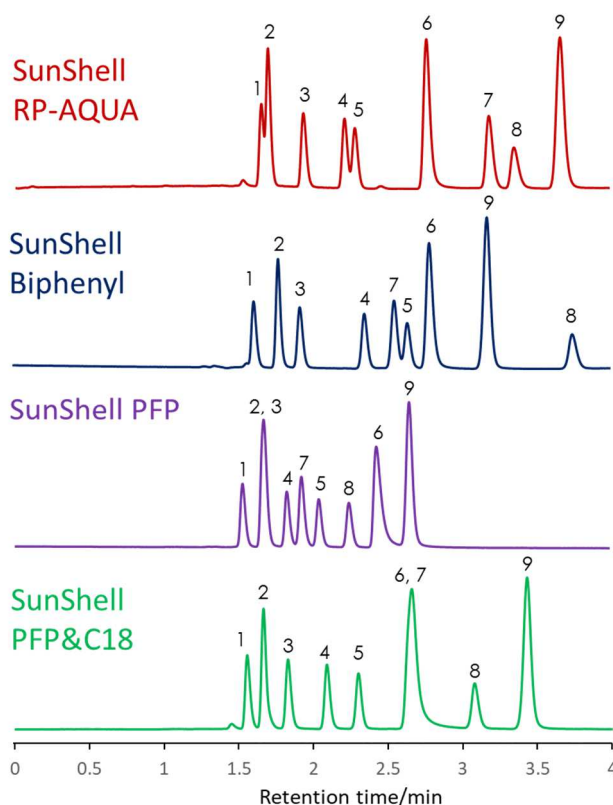
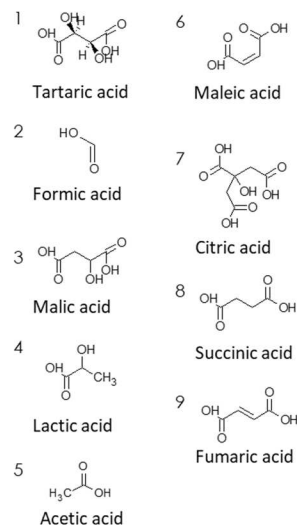


図 9 有機酸の分離

Column: SunShell RP-AQUA,
Biphenyl, PFP, PFP&C18
2.6 μ m, 150 x 4.6 mm
Mobile phase: 0.1% H₃PO₄,
Flow rate: 1.0 mL/min
Temperature: 40 °C
Detection: UV@210 nm



株式会社 クロマニック 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