

逆相クロマトグラフィー用 C30 固定相の分離特性

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 HPLC において、長さの異なるアルキル基や、 π - π 相互作用が働くフェニル基を結合したものなど多種多様な固定相が使用されている。数ある固定相の内、最も多用されているものはオクタデシル基を結合した C18 (ODS) 固定相であり、逆相 HPLC 固定相の主流となっている。一方、C18 よりも長鎖のアルキル基を結合した固定相についても種々研究が行われ、トリアコンチル基を結合した C30 固定相については、1987 年に牧野ら¹⁾によりオリゴヌクレオチドの分離の優位性や、同じく 1987 年に Sander ら²⁾によるモノメリックとポリメリック結合の差の評価などが発表されている。C30 固定相カラムの最初の製造販売は、1994 年に発表された Sander ら³⁾の論文が基になったと思われる、この論文ではカロテノイド類の異性体の分離は結合密度を高くしたポリメリック結合で、エンドキャッピングを行わず、シラノール基を残した固定相が最適であると結論付けられた。この C30 カラムは炭素数 30 のトリアコンチル基の結合密度の高いポリメリック結合であり、シリカ表面の固定相としての厚みが C18 固定相に比べ、1.6 倍程度厚くなっていることが原因であると思われるカラム効率（理論段数）の低さが指摘されていたが、脂溶性化合物の異性体の分離の優位性の方がカラム効率に勝るとカタログなどには記載されていた。その後各社から C30 カラムが上市され、モノメリック結合でエンドキャッピングを施した C30 カラムは C18 とほぼ同じカラム効率が得られ、脂溶性化合物に限らず、極性化合物でも C18 カラムと異なる選択性を示した。このモノメリック C30 カラムの出現で、C30 カラムの評価も上がり、C18 カラムと同様に C30 カラムは汎用性があり有用性の高いカラムであると認められるようになった。この様にポリメリックタイプだけでなくモノメリックタイプの C30 カラムも使用頻度が高くなった。現在は全多孔性 C30 カラムは 8 ブランド以上、コアシェル型 C30 カラムも 3 ブランド以上のカラムが利用可能となっている。

本稿では C18 カラムとは大きく異なる分離選択性を有する C30 カラムの分離特性について紹介する。

2 C30 カラム

各社の C30 カラムについて、カタログなどで公表されている物性値を表 1 に示す。結合密度は炭素含有量と比表面積から、エンドキャッピングの有無を考慮して計算した値を示した。炭素含有量やエンドキャッピングの有無等が公表されていないカラムもあり、公表されていないものは破線で示した。それぞれのカラムはほぼ発売時期順に上から並べており、Prontosil C30 と YMC Carotenoid カラムは 1995 年にはすでに販売されており、Develosil C30 や Wakopak Navi C30 は 1998 年に販売開始されている。アルキル鎖長の長い C30 固定相の場合、結合密度の値が $3 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ 以上がポリメリック結合で、 $2 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ 以下がモノメリック結合と言

表1 C30 カラムの物性値

カラム名	結合相	シリカの種類	粒子径 (μm)	細孔径 (nm)	比表面積 (m ² /g)	炭素含有量 (%)	結合密度 (μmol/m ²)	エンドキャッピング
Prontosil 120-C30	C30	FPP	3	12	300	25	3.4	No
Prontosil 200-C30	C30	FPP	3,5	20	200	20	3.7	No
Prontosil 300-C30	C30	FPP	3,5	30	100	13	4.3	No
YMC Carotenoid	C30	FPP	3,5	12	---	---	---	---
Develosil C30	C30	FPP	3,5	14	300	18	1.8	Yes
Wakopak Navi C30	C30	FPP	5	---	---	---	---	---
Sunrise C30	C30	FPP	3,5	12	340	18	1.8	Yes
Sunniest RP-AQUA	C30	FPP	3,5	12	340	16	1.4	Yes
Acclaim C30	C30	FPP	3,5	20	200	---	---	---
SunArmor RP-AQUA	C30	FPP	3,5	12	340	18	1.7	Yes
Accucore C30	C30	SPP	2.6	15	90	---	---	---
SunShell C30	C30	SPP	2.6	12	95	6.5	1.8	Yes
SunShell RP-AQUA	C30	SPP	2.6	16	90	4	1.3	Yes
Halo C30	C30	SPP	2.7	16	90	4.5	1.5	Yes

※FPP: 全多孔性シリカ, SPP: 表面多孔性シリカ (コアシェルシリカ)

われている。初期に発売された C30 カラムは C30 の結合密度からポリメリック C30 であり、それ以降の C30 カラムについては、結合密度が計算されたものはモノメリック C30 であった。2020 年に US Pharmacopeia (米国薬局方) に LC カラムの固定相として C18 (L1) を登録しているメーカー数は 78 社であるが、表 1 に記載された C30 カラムは 7 社から販売されており、C18 カラムと比べると約 1/10 の HPLC カラムメーカーのみが C30 カラムを供給している事になる。

3 ポリメリック C30 とモノメリック C30 の差

図 1 にはポリメリック C30 カラム, モノメリック C30 および一般的な C18 カラムを用いたビタミン E の分離を示す。ビタミン E (トコフェロール) はメチル基の数と結合位置の差により 4 種類の α, β, γ, δ-トコフェロールが存在する。その構造式は図 1 の中に示されている。C18 カラムは二つのメチル基が結合した位置異性体である β-トコフェロールと

γ-トコフェロールが分離出来ないが, C30 カラムは分離出来る。ポリメリック C30 とモノメリック C30 カラムの β と γ-トコフェロールの分離係数 (α) と分離度 (R) を比較すると, 分離係数は結合密度の高いポリメリック C30 の方が大きな値となったが, 分離度は逆にモノメリック C30 の方が大きくなった。通常は分離係数が高いほど分離度も大きくなる傾向があるが, ポリメリック C30 カラムはカラム効率が低く, 理論段数がモノメリック C30 の約半分で, しかもテーリングが大きいため, 分

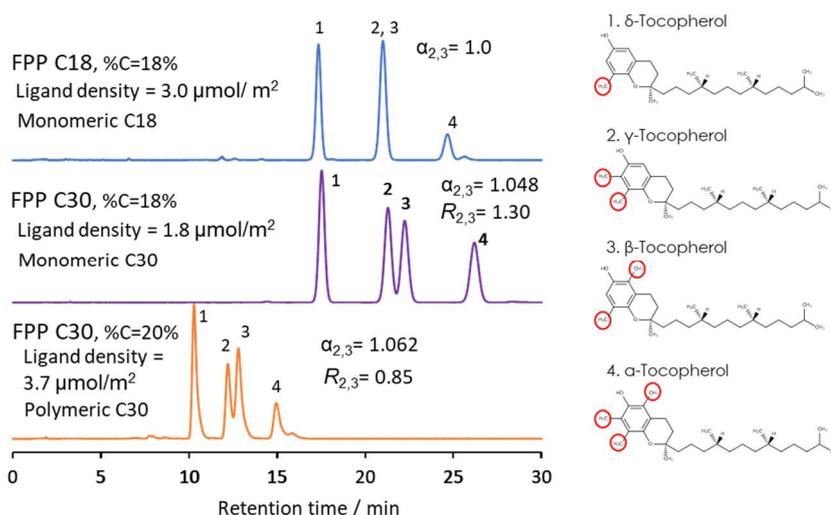


図1 C18 と C30 カラムによるビタミン E の分離
Column, 固定相は図中に表示, 250 mm x 4.6 mm, 5 μm; mobile phase, methanol/water=97/3; flow rate, 1.0 mL/min; column temperature, 30 °C; detection, UV at 295 nm; peaks, 図中に表示。

離度が低くなった。図 2 には核酸塩基の分離をポリメリック C30 とモノメリック C30 カラムで行った。C30 カラムは 100%水系移動相条件でも保持の再現性の高い分離が可能であり^{4,6)}、両 C30 カラムとも図 2 の条件では送液停止前後でもほぼ保持時間の変化はなかった。モノメリック C30 カラムはシャープなピーク形状でウリジンピークは 19,000 段の理論段数を示したが、ポリメリック C30 カラムは全てのピークが幅広くなっており、チミンのピークは 3,800 段であった。又ポリメリック C30 とモノメリック C30 カラムでは、ウリジンとチミンの溶出順序が逆転した。ポリメリック C30 はエンドキャッピングが施されておらず、残存シラノール基が多く、水素結合性が高くなるため、チミンの保持が大きくなったと考えられる。これは水素結合性の高い Biphenyl 固定相でもチミンの保持が相対的に大きくなる事と同じであると考えられる。

脂溶性化合物から高極性化合物まで、溶質の極性（疎水性）に関わらず、ポリメリック C30 カラムはモノメリック C30 カラムに比べ、1/2 以下の理論段数であった。ポリメリック C18 カラムでも有機溶媒/水移動相の有機溶媒濃度比率が 50%以下になると、ピークがブロードになる事と同様に、ポリメリック C30 カラムは有機溶媒濃度 100%からピークがブロードになる。これは高密度に C30 が結合された固定相の特徴であると推察される。異性体の分離係数は結合密度が高い程大きくなる傾向があるが、ピークの理論段数を考慮すると、最終的に分離度を上げるためには C30 の結合密度が 1.8 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ 前後のモノメリック C30 カラムが異性体を含めた多くの化合物の分離に適していると言える。

4 C18 カラムと C30 カラムの比較

4-1 脂溶性化合物や疎水性化合物の分離

図 3 にはビタミン K1 の *trans* 体と *cis* 体の分離を示す。カラムはコアシェル C30 としてクロマニックテクノロジーの SunShell C30 と A 社 C30 を用いた。又、C18 カラムとして SunShell C18 を用いた。ビタミン K1 の *trans-cis* 体は C30 カラムでは分離出来たが、C18 カラムでは分離出来なかった。又カラム温度は低いほど *trans-cis* 体の分離係数は大きくなった。これは図 1 のビタミン E の β -トコフェロールと γ -トコフェロールの分離も同様であり、カラム温度の低下に伴い分離係数は大きくなる。C30 カラムの比較として、SunShell C30 と A 社 C30 のビタミン K1 の保持時間と、*trans-cis* 体の分離を比べると、SunShell C30 の方が、保持時間は長く分離係数は大きくなった。A 社 C30 は細孔径が 15 nm であることは開示されていたが、炭素含有量については開示されていない。細孔径の小さい SunShell C30 の方が比表面積が大きく保持時間は長くなると考えられるが、分離係数の差は C30 の結合密度が大きな要因であると考えられる。長江ら⁷⁾は細孔径の異なるコアシェルシリカを用い、更にトリアコンチル基 (C30) の結合密度を変えた C30 充填剤を調整し、 β -トコフェロールと γ -トコフェロールの分離係数とビタミン K1 の *trans-cis* 体の分離係数を求め、細孔径と

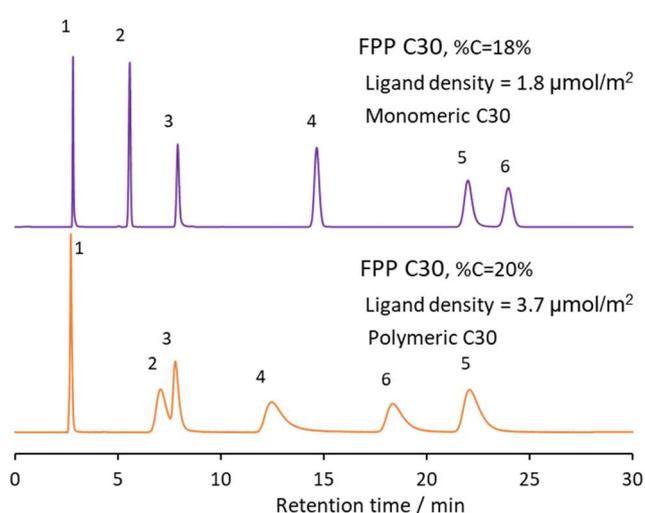


図 2 ポリメリック及びモノメリック C30 カラムによる核酸塩基の分離
Column, 固定相は図中に表示, 250 mm x 4.6 mm, 5 μm ; mobile phase, 10 mmol/L phosphate buffer (pH7.0); flow rate, 1.0 mL/min; column temperature, 30 $^{\circ}\text{C}$; detection, UV at 250 nm; peaks, 1= sodium Nitrite (t_0), 2 = cytosine, 3 = uracil, 4 = cytidine, 5 = thymine, 6 = uridine.

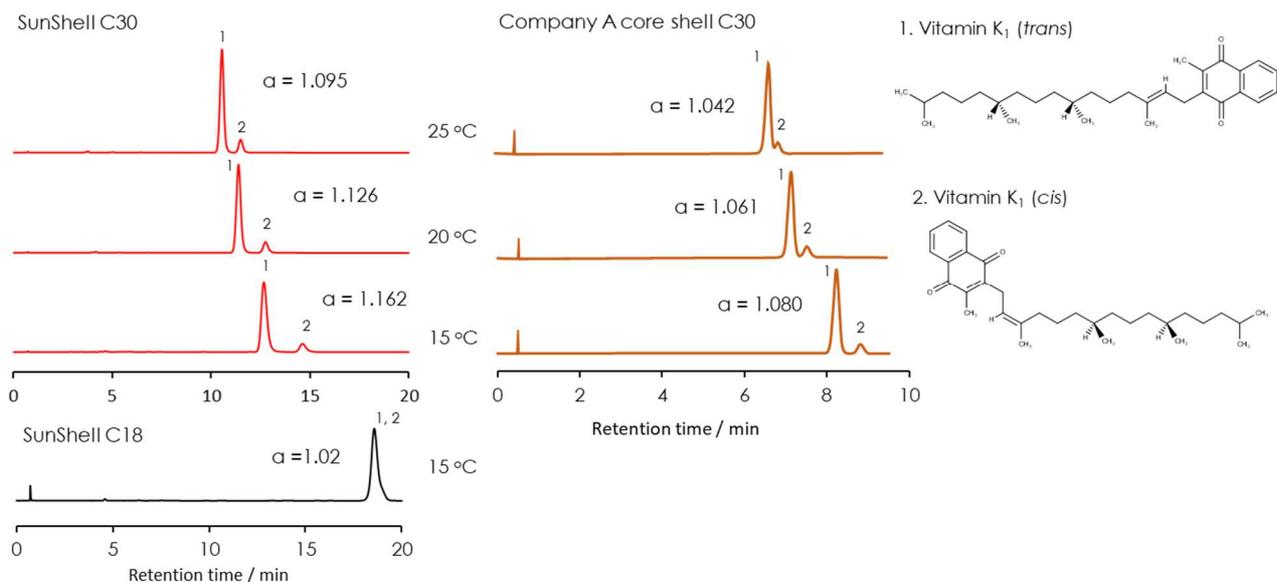


図3 ビタミン K1 の異性体の分離

Column, 固定相は図中に表示, 100 mm x 2.1 mm, 2.6 μm; mobile phase, methanol/water=96/4; flow rate, 0.35 mL/min; column temperature, 図中に表示; detection, UV at 250 nm; peaks, 図中に表示。

結合密度の最適値を求めた。その結果は、結合密度が高いほど分離係数は高くなったが、結合密度が 2 μmol/m² 以上になると、理論段数が下がり、ピークテーリングが出るようになった。細孔径 12 nm と 16 nm の比較において、メタノール/水系移動相使用時にはトリアコンチル基は倒れ込み固まった状態になっていると考えられ、細孔径が小さいほど、細孔内部で倒れ込んだトリアコンチル基の密度が上がると推察される。計算上同じ結合密度でも、細孔径の小さい充填剤の方が、細孔内部では密度が高くなり、細孔径 12 nm の方が細孔径 16 nm より異性体である β-トコフェロールと γ-トコフェロール分離には有利であった。カラムの理論段数と異性体の分離係数の両方を考慮すると、結合密度を 1.8~1.9 μmol/m² に調整した細孔径 12 nm の充填剤が最終的に異性体の分離度が

高くなることが結論付けられた。A 社 C30 のトリアコンチル基の炭素含有量は公表されておらず、炭素含有量と比表面積から計算される結合密度は分からないが、図 3 に示されているビタミン K1 の *trans-cis* 体の保持時間と分離係数から推察すると、A 社 C30 のトリアコンチル基の結合密度は 1.5 μmol/m² 程度である。

図 4 には α, β-カロテンの分離を示す。図 1 の C18 とモノメリック C30 カラムと

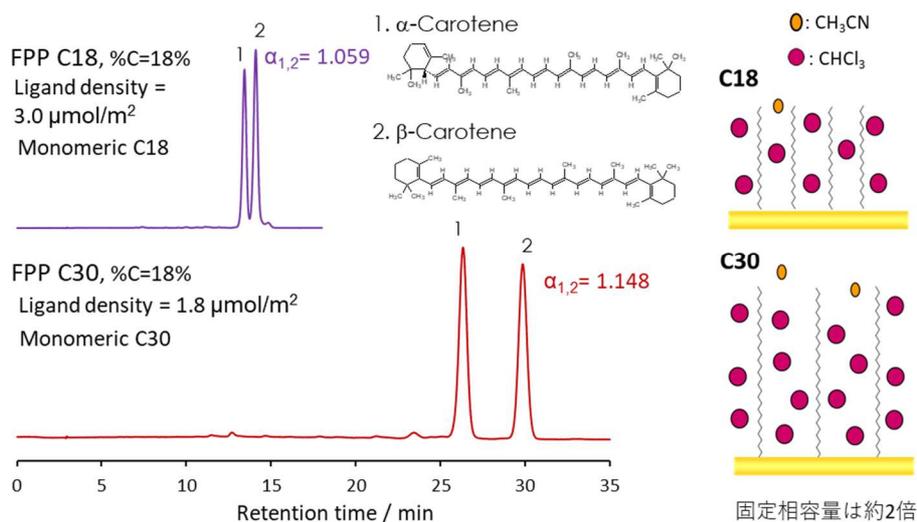


図4 α, β-カロテンの分離

Column, 固定相は図中に表示, 250 mm x 4.6 mm, 5 μm; mobile phase, acetonitrile/chloroform=80/20; flow rate, 1.0 mL/min; column temperature, 30 °C; detection, UV at 450 nm; peaks, 図中に表示。

同じカラムをカロテンの分離にも用いた。C30 カラムは C18 カラムに比べ、約 2 倍の保持時間を示した。又 α 、 β -カロテンの分離係数は C18 が 1.059 であるのに対し C30 は 1.148 となり、C30 は十分な分離が得られた。天然物のカロテンの測定では α -カロテンピークと β -カロテンピークのために 3 本程度の不純物ピークが存在する事が知られてるが、C18 カラムではこの不純物成分は全く分離出来ない。図 1 のビタミン E の分離では炭素含有量が同じ 18%である C18

と C30 カラムはほぼ同じ保持時間であった。 α 、 β -カロテンの分離では、両カラムともビタミン E を分離した時と同じカラムであるにもかかわらず、

C30 カラムは C18 カラムの約 2 倍の保持時間を示した。ビタミン E の分離とビタミン K1 の分離では大きく異なった保持挙動となった。この保持挙動は長江ら^{8,9)}の論文で示されている様に、溶媒和により固定相の容積が変化することに起因している。メタノールはオクタデカン(C₁₈H₃₈)やトリアコンタン(C₃₀H₆₂)を溶かすことが出来ない

ので、メタノール/水系移動相では C18 固定相や C30 固定相のアルキル基は固まった状態であり、メタノールは固まったアルキル基固定相の上部に少量溶媒和している。一方クロロホルムはオクタデカンやトリアコンタンを溶かすことが出来るため、固まったアルキル基内にクロロホルムは入り込み、図 4 に示されている様に固定相はアルキル基が立ち上がった状態になっていると考えられる。又溶媒和した溶媒は固定相として働くため、C18 固定相と C30 固定相では固定相容量が大きく異なっている。炭素含有量が同じ 18%である C18 固定相と C30 固定相は、メタノール/水系移動相では固まっており、固定相容量がほぼ同じであるため、ビタミン E の保持時間は C18 カラムと C30 カラムでは大きな差はなく、 α 、 β -カロテンの分離には移

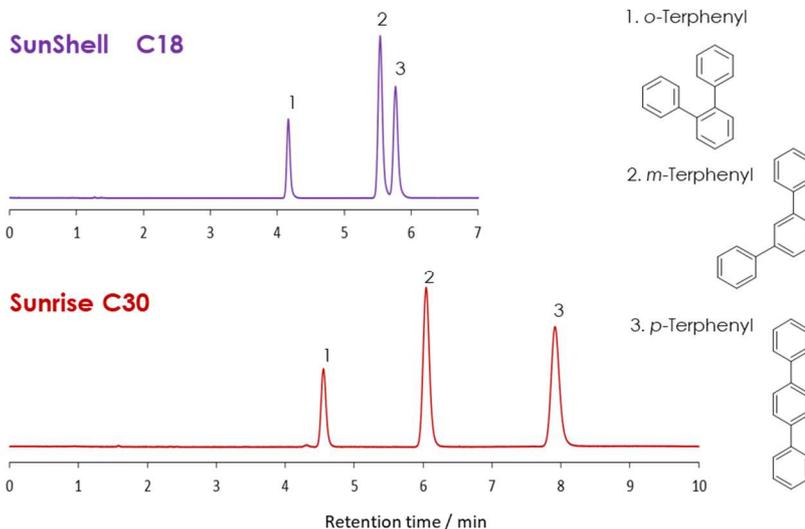


図 5 o, m, p-ターフェニルの分離

Column, SunShell C18, 2.6 μ m 150 mm x 4.6 mm, Sunrise C30, 3 μ m, 150 mm x 4.6 mm; mobile phase, methanol/water=90/10; flow rate, 1.0 mL/min; column temperature, 25 $^{\circ}$ C; detection, UV at 250 nm; peaks, 図中に表示。

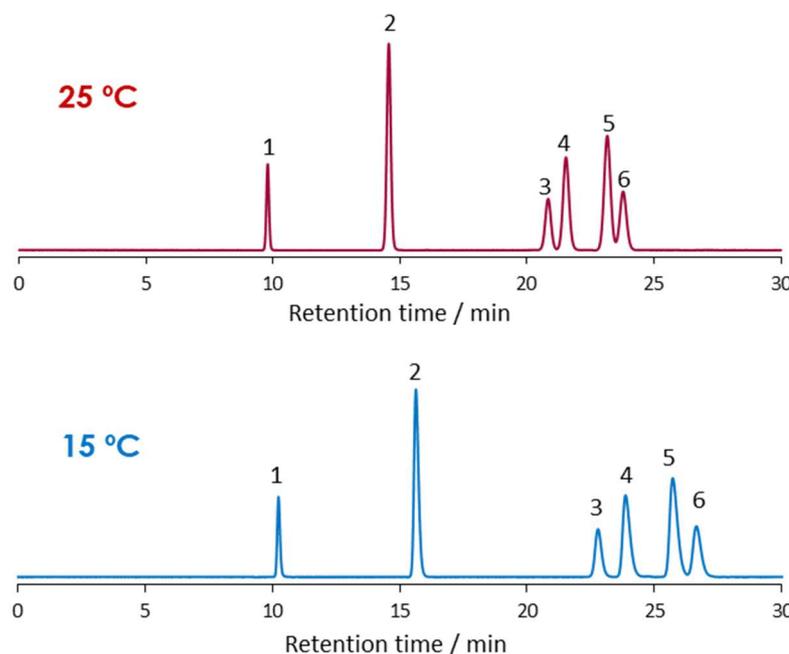


図 6 BETX の分離

Column, Sunrise C30, 3 μ m 250 mm x 4.6 mm; mobile phase, methanol/water=70/30; flow rate, 0.7 mL/min; column temperature, 図中に表示; detection, UV at 250 nm; peaks, 1=benzene, 2=toluene, 3=ethylbenzene, 4=o-xylene, 5=m-xylene, 6=p-xylene.

動相にクロロホルムが 20%加えられているため、クロロホルムの溶媒和により固定相容積が C30 固定相では C18 固定相の約 2 倍になって、保持時間が約 2 倍になったと考えられる。ここで留意すべき点としては、メタノール/水系移動相では炭素含有量が同じ場合にはアルキル鎖長に関係なく保持はほぼ等しくなる事⁹⁾である。

図 5 には *o*, *m*, *p*-ターフェニルの分離を示す。C18 カラムでは *m*-ターフェニルと *p*-ターフェニルは近接しているが分離は達成されている。しかし C30 カラムでは *o*, *m*, *p*-ターフェニルは全て十分な分離が達成されている。様々な化合物のメタ体・パラ体の分離は難しいことが多いが、C30 カラムは C18 カラムに比べメタ体・パラ体の分離が優れていることが多い。図 6 には石油業界で話題となる BTEX の分離を示す。ベンゼン、トルエン、エチルベンゼン及び *o*, *m*, *p*-キシレンの分離は C30 カラムを用いることで全て成分が分離出来るが、一般的な C18 カラムでは *m*-キシレンと *p*-キシレンが重なり、分離出来ない。カラム温度は 25°C よりも 15°C の方が分離が向上した。

4-2 高極性化合物の分離

図 7 と図 8 にはヌクレオチドと水溶性ビタミンの分離を示す。両試料とも高極性化合物であり、移動相には有機溶媒を含まない緩衝液のみを用いた。3 種の C18 カラムと C30 (Sunniest RP-AQUA)カラムを用いた。3 種の C18 カラムは極性基埋め込み型の C18 固定相であり、全て 100%水系移動相使用時でも保持の再現性がある C18-AQ タイプであると公表されている。ヌクレオチドの分離では C18 カラムは一部のピークで分離不十分であったが、C30 カラムは全てのピークが完全分離した。保持時間

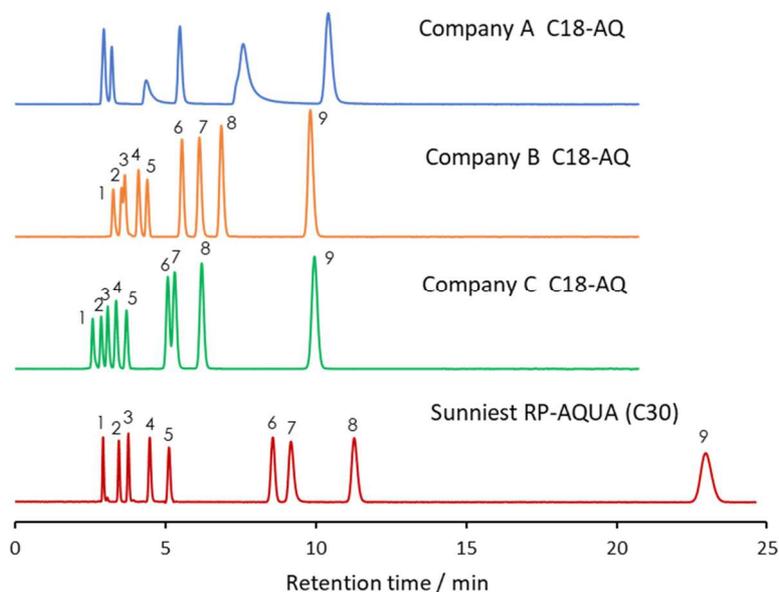


図 7 ヌクレオチドの分離
Column, 固定相は図中に表示, 250 mm x 4.6 mm, 5 μ m; mobile phase, 50 mmol/L phosphate buffer (pH6.0); flow rate, 1.0 mL/min; column temperature, 30 $^{\circ}$ C; detection, UV at 260 nm; sample, nucleotides; peaks, 1=5'-CTP, 2=5'-CDP, 3=5'-CMP, 4=5'-GTP, 5=5'-GDP, 6=5'-GMP, 7=5'-ATP, 8=5'-ADP, 9=5'-AMP.

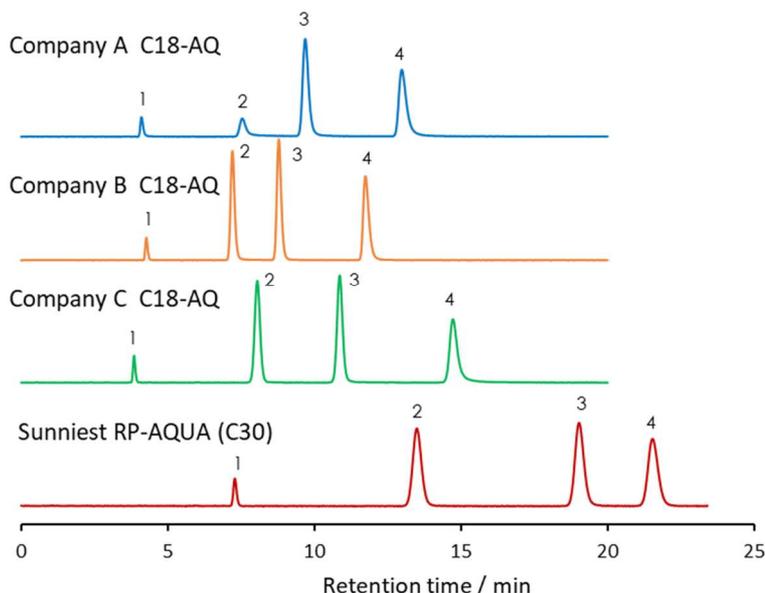


図 8 水溶性ビタミンの分離
Column, 固定相は図中に表示, 250 mm x 4.6 mm, 5 μ m; mobile phase, 50 mmol/L phosphate buffer (pH6.9); flow rate, 1.0 mL/min; column temperature, 30 $^{\circ}$ C; detection, UV at 250 nm; peaks, 1= orotic acid, 2=pyridoxal HCl, 3=pyridoxine HCl, 4=nicotinamide.

の比較においては3種のC18カラムはほぼ同じであり、最後に溶出する5'-AMPは10分前後であった。しかしC30カラムでは最後のピークの5'-AMPは23分に溶出した。C30カラムはC18カラムに比べ保持時間が2倍以上になり、分離が改善された。逆相クロマトグラフィーでは移動相中の有機溶媒濃度を下げる事により保持時間を長くすることが出来るが、有機溶媒を含まない移動相を用いた場合には有機溶媒濃度をこれ以上上げることは出来ないため、保持時間が長いことは高極性化合物の分離には有利である。図8の水溶性ビタミンの分離についてもC30カラムは保持時間が長く、C18カラムの1.5倍以上の保持時間を示した。図7と図8で使用したC30カラムはSunniest RP-AQUAであり、塩基性化合物のテーリングをより減らすために、高温でのエンドキャッピングが施されている。このエンドキャッピングの反応条件下ではC30の結合密度を高く留まらせる事が出来ず、表1に示されている様に結合密度は1.4 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ になってしまう。結合密度1.8 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ のC30 (Sunrise C30 など) を用いれば、ヌクレオチドや水溶性ビタミンの保持時間が更に長くなる事が確認されている。

図9には酸性条件(pH 2.3)と弱アルカリ性(pH 8.0)の耐久性試験を示す。酸性条件では酸による加水分解でアルキル基がシリカ表面から脱離¹⁰⁾するので、縦軸は初期の保持時間を100%とする相対保持時間とした。又アルカリ性条件ではアルカリによる加水分解でアルキル基も少しは切れるが、主には基剤のシリカが溶け出し¹⁰⁾、充填剤量が減る。その結果カラムIN側に隙間が発生し、理論段数が減少する。従ってアルカリ性条件では縦軸を相対理論段数とした。アルカリ性条件でのシリカ基剤からシリカの溶け出す濃度は時間の経過と共に指数関数的に増大する¹¹⁾ため、理論段数はある時間経過後急激に下がる。酸性条件と弱アルカリ性条件の両条件で、C30カラムが最も高い耐久性を示した。特に弱アルカリ性条件ではC30と他のC18カラムの耐久性の差が大きくなった。100%水系移動相で保持時間の再現性を高くしたC18固定相は、この試験で用いた極性基埋め込み型のC18であったり、極性の高いシリル化試薬でエンドキャッピングを行ったり、オクタデシル基の結合密度を半分程度に下げたりしている。これらのC18-AQタイプの固定相は、通常のC18固定相に比べ、疎水性が下がっている事からシリカ表面近くに移動相の水が接触し易く、加水分解が起こり易くなり、耐久性が低くなる。一方C30固定相はC18-AQタイプの固定相とは異なり、疎水性を

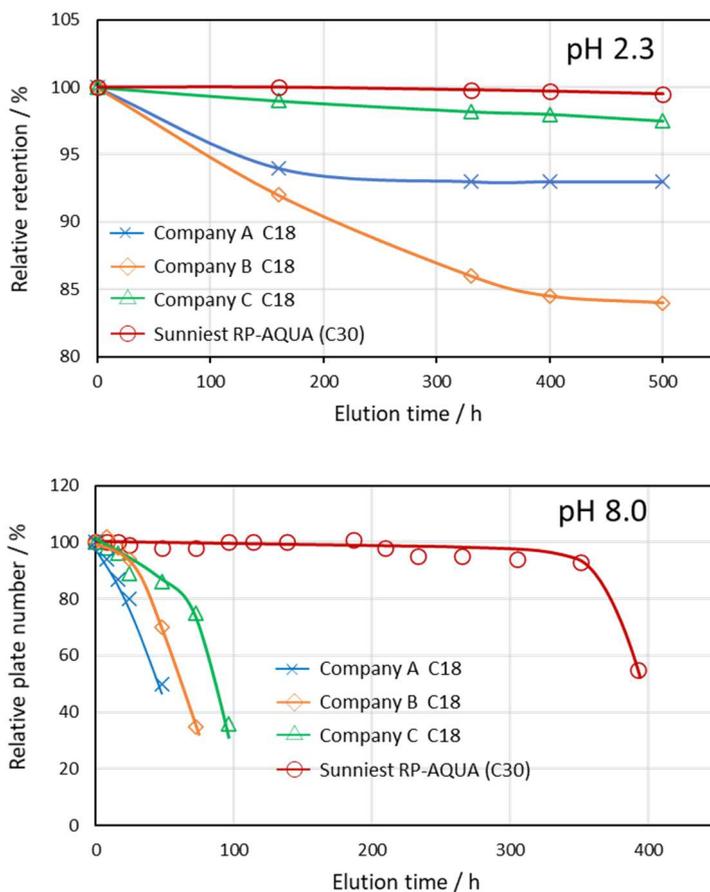


図9 酸性条件(pH 2.3)と弱アルカリ性(pH 8.0)の耐久性
Durability test condition, mobile phase, acetonitrile/0.1% phosphoric acid (pH 2.3)=2/98, 20 mmol/L phosphate buffer (pH 8.0); flow rate, 1.0 mL/min; column temperature, 40 °C.
Measurement condition, mobile phase, acetonitrile/water=70:30; flow rate, 1.0 mL/min; column temperature, 40 °C; sample, butylbenzene.

下げるような操作を行っていないので、耐久性が高いと考えられる。細孔径 12 nm で比表面積 340 m²/g のシリカ基剤にトリアコンチルシリル化試薬を無水条件で反応させ、疎水性のトリメチルシリル(TMS)化試薬でエンドキャッピングを施した C30 充填剤は炭素含有量が約 18%となる。一方同じシリカ基剤に C18 を結合しエンドキャッピングを施した一般的な C18 充填剤の炭素含有量もほぼ同じ 18%になる。C30 はアルキル鎖長が長いので、細孔径 12 nm のシリカ基剤では、立体障害により結合密度が C18 に比べ低くなり、結果的に C18 とほぼ同じ炭素含有量になる。つまり、C30 固定相と一般的な C18 固定相は炭素含有量が同じであるため、疎水性も同程度になり、耐久性も大きく変わらない。

5 まとめ

ポリメリック C30 カラムとモノメリック C30 カラムは同じ C30 カラムであるが、全く別物と考えた方がよいと思われるほどピーク形状やカラム効率が異なる。ポリメリック C30 カラムは開発目的であったカロテノイド類の分離に特化したカラムであると言える。本稿では紹介していないが、モノメリック C30 (Sunrise C30 や Sunniest RP-AQUA) カラムは逆相モードで分析されている試料の 50%以上が C18 カラムとほぼ同じ分離となる。さらに C18 カラムに勝る分離がモノメリック C30 カラムでは可能であり、高極性化合物や脂溶性化合物で C18 カラムを凌駕している。C30 カラムは少数のカラムメーカーのみが製造販売しているが、これはアルキル鎖の長いトリアコンチルシリル化試薬の取り扱いが難しいことに起因していると思われる。試薬の融点、沸点、溶媒への溶解力などを考慮することがトリアコンチルシリル化試薬には重要である。今後多くのカラムメーカーから C30 カラムが開発・製造され、C30 カラム同士で切磋琢磨する事により、更なる高性能 C30 カラムの出現が期待される。

文 献

- 1) K. Makino, H. Ozaki, H. Imaishi, T. Takeuchi, T. Fukui: *CHEMISTRY LETTERS*, **16**, 1251 (1987).
- 2) L. C. Sander and S. A. Wise: *Anal. Chem.* **59**, 2309 (1987).
- 3) L. C. Sander, K. E. Sharpless, N. E. Craft, and S. A. Wise: *Anal. Chem.* **66**, 1667 (1994)..
- 4) 長江徳和, 榎並敏行: *分析化学*, **49**, 887 (2000).
- 5) 榎並敏行, 長江徳和: *Chromatography*, **22**, 33 (2001).
- 6) N. Nagae, T. Enami and S. Doshi: *LGC North America*, **20**, 964 (2002).
- 7) N. Nagae, T. Tsukamoto, S. Kojima: "HPLC2016", P-T-0225, (2016).
(http://chromanik.co.jp/technical/pdf/HPLC2016_poster.pdf) (2021年7月21日, 最終確認)
- 8) 長江徳和, *食品衛生学雑誌*, **57**, J-109 (2016).
- 9) 長江徳和, *LC と LC/MS の知恵*, **第 1 号**, 8 (2020).
- 10) 長江徳和, *LC と LC/MS の知恵*, **第 2 号**, 6 (2021).
- 11) N. Nagae and D. Ishii, *American Laboratory*, **27**, 20 (1995).

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>