

# 水移動相で C18 カラムは使えるの？ アルキル基は立ってるの？寝込んでいるの？

《水・緩衝液を用いた逆相カラムの保持挙動および固定相としてのアルキル基の存在状態について》

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)<sup>1)</sup>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。最初の HPLC 用充填剤は直径 30  $\mu\text{m}$  のガラスビーズに 0.5 $\mu\text{m}$  の多孔質層を表面に形成させた表面多孔性充填剤<sup>2)</sup>であった。これは現在の Superficially porous particle (silica)、通称コアシェルの元祖である。その後 1972 年以降は全多孔性シリカが HPLC 充填剤の主流になり、粒子形状も破砕形から球形に、粒子径も 10  $\mu\text{m}$  から 5  $\mu\text{m}$ 、3  $\mu\text{m}$  と小さくなり 2,000 から 3,000 段の理論段数から 20,000 段以上の理論段数が得られるようになった。現在では粒子径が sub 2  $\mu\text{m}$  (1.8  $\mu\text{m}$  など)まで小さくなり、UHPLC (Ultra High Performance Liquid Chromatography) 装置を用い高速・高理論段数の分離が達成されるようになった。最も多用される逆相モードの固定相・充填剤も改善が進んでおり、特にシリカ系逆相充填剤の性能を左右する残存シラノール基の処理（エンドキャッピング）技術も大きく進化した。35 年前はトリエチルアミンを移動相に添加し、残存シラノール基に吸着させることによりシラノール基の影響を封鎖していたが、現在では高度なエンドキャッピング処理により、移動相に何も添加しなくても塩基性化合物がテーリングすることのない充填剤（充填カラム）が利用できるようになった。さらに革新的な基材として、前述した Superficially porous particle の粒子径を 2.7  $\mu\text{m}$  まで小さくし全多孔性シリカ基材に比べ 1.5 倍の理論段数が得られようになった充填剤<sup>3)</sup>

が 2007 年に開発された。全多孔性充填剤で 1.5 倍の理論段数を得るためには粒子径を 2/3 にする必要があり、カラム背圧が 2 倍以上になってしまう。粒子径の微小化によるカラム背圧の上昇を伴うことなく理論段数の向上可能な Superficially porous particle 技術は将来の方向性を大きく変えることになると思われる。

HPLC を用いた分離分析には様々な試料が試みられており、アミノ酸や糖のような高極性化合物から、トリグリセリドやカロチノイドなどの脂溶性化合物など、極性（疎水性）の大きく異なる試料が分離分析されている。これらの試料の逆相 HPLC 分離には、ほとんど緩衝液のみの移動相を用いたり、逆に水を含まない有機溶媒のみ、さらにクロロホルムなどの疎水性溶媒を移動相として用いられることがある。逆相分離では C18 (ODS) が最も多く使用されているが、有機溶媒濃度が 5%以下の移動相条件では保持時間の再現性が低くなることから、この移動相条件では C18 の使用を避けるべきだと言われてきた。実際通常の C18 は緩衝液のみの移動相を用いた場合、保持時間が徐々に減少する。本稿では水・緩衝液のみの移動相を用いた場合の逆相充填剤の状態を考察し、保持時間の減少の原因やその解決策を提示する。また、2000 年以前は水移動相条件下では C18 固定相のアルキル基は立ち上がっている状態から寝込むことにより保持が減少すると解釈<sup>4)</sup>することが常識であったが、実際には C18 固定相のアルキル基はどのような状態であるのか、メタノール・水、アセトニトリル・水、テトラヒドロフラン・水系の移動相だけでなく、クロロホルムなどの有機溶媒も含めた場合の考察を行った。

## 2. 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

### 2.1 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 1 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°Cでの保持の変化を示す。全く保持せず溶出する時間( $t_0$ )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、カラム出口以降に背圧をかけた。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、再度送液開始した後に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。一般には  $t_0$  の減少は考えられないが  $t_0$  の減少が起こった。

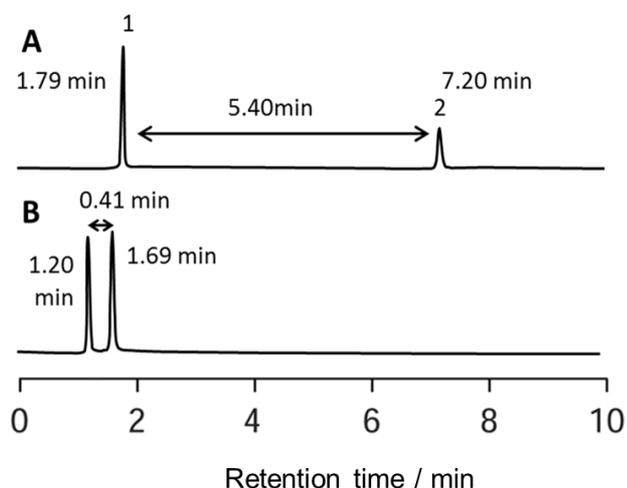


図 1 水移動相条件下の C18 カラムの保持挙動 (A)は初期状態、(B)は 1 時間送液停止後再度測定; Column, 150 mm x 4.6 mm, 5  $\mu$ m dp C18, 10-nm pore size; mobile phase, water; flow rate, 1.0 mL/min; column temperature, 40  $^{\circ}$ C; detection, refractive index; peaks, 1 = sodium nitrite ( $t_0$ ), 2 = 2-propanol. カラムの出口以降に 1.7MPa の背圧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

### 2.2 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  $\mu$ m 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<sup>5-7)</sup>した。その結果を図 2 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も、細孔径が大きいほどポンプ停止後の相対保持時間は 100%に近くになり、細孔径が小さいほど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高く、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。

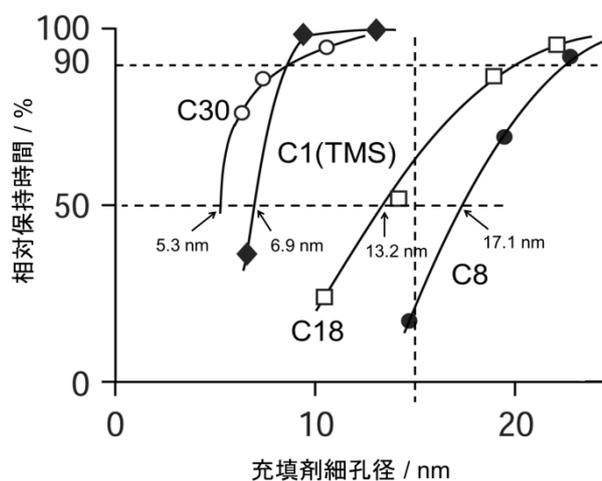


図 2 充填剤細孔径と水移動相条件下の相対保持時間との関係

Column, C30 (O), 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  $^{\circ}$ C; detection, UV at 254 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。

### 2.3 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合いが少ないことは、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のできないことが確認された。図 1 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、カラム出口から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<sup>9)</sup>された。溶出量は合計で 0.59 mL であり、図 1 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( $t_0$ )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、または両方の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<sup>9)</sup>付けられた。図 3 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。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、移動相が抜け出た細孔内では固定相と移動相との相

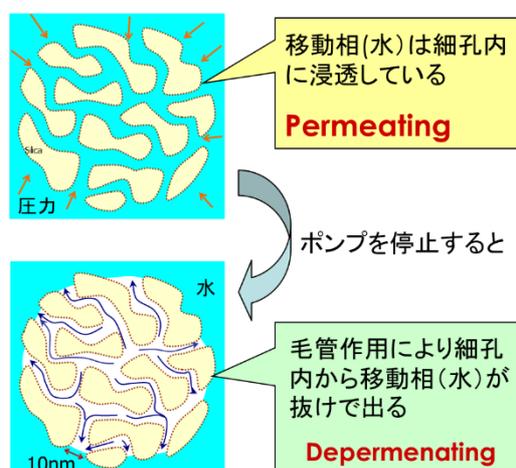


図 3 C18 充填剤の細孔内の水の存在状態の概略図

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。

### 2.4 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、 $\rho$  は液体の密度、 $\gamma$  は液体の表面張力、 $\theta$  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  $90^\circ$  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  $90^\circ$  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作用する。図 2 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  $\rho$  と液体の表面張力  $\gamma$  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、 $40^\circ\text{C}$  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 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  $90^\circ$  に近づき毛管作用が減少したとも考えられる。図 1 で示した図は  $40^\circ\text{C}$  のカラム温度での保持時間の減少率であったが、カラム温度を下げることによりこの減少率は下がる。 $30^\circ\text{C}$  では 50% の、 $10^\circ\text{C}$  では 10% の保持時間の減少になり、 $5^\circ\text{C}$  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。

## 2.5 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 4 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 1 と同じである。ポンプを 1 時間停止後相対保持時間は 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。 $2.5\text{ MPa}$  の背圧時が①で  $11\text{ MPa}$ 、 $16\text{ MPa}$  および  $30\text{ MPa}$  は②、③および④である。 $30\text{ MPa}$  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  $5\text{ MPa}$  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  $11\text{ MPa}$  の場合はカラム自身に  $6\text{ MPa}$  の圧力がかかるため、カラム入口の圧力は  $17\text{ MPa}$  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  $16\text{ MPa}$  の圧力がか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  $30\text{ MPa}$  以上の圧力がか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  $16\text{ MPa}$  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  $5\text{ MPa}$  の圧力がかか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  $0\text{ MPa}$  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

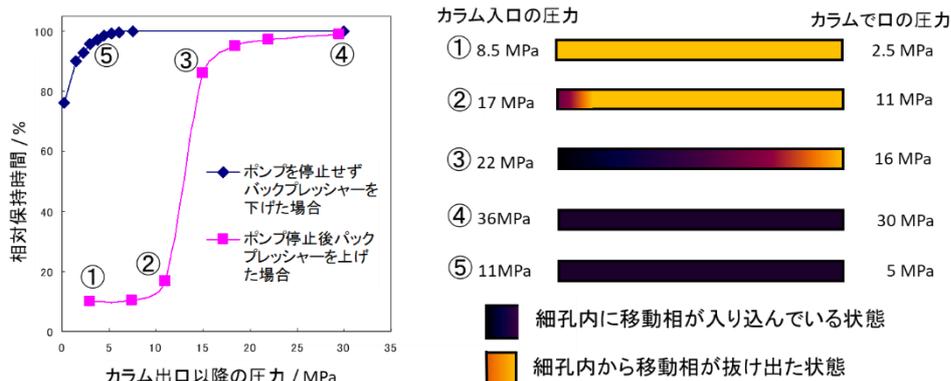


図 4 カラム出口以降の背圧と相対保持時間の関係とカラム内の充填剤細孔内の水の存在状態  
 Column, 150 mm x 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$  dp C18, 10-nm pore size. 他の条件は図 1 と同じ。

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「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。

## 2.6 各固定相と水との接触角

図 4 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、実測の細孔半径 5.2 nm と 40°C の水の表面張力 69.6 dyne cm<sup>-1</sup> 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 2 の相対保持時間が 50% の時のそれぞれの固定相の細孔径を求めると、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 2 の相対保持時間が 50% になったときのそれぞれの細孔径と接触角の余弦関数値 (cosθ) が比例すると仮定すると、毛管作用の式を用いて 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。C8 固定相が最も接触角が大きく、C8 よりもアルキル鎖長が長くなると接触角は小さくなり、水に濡れやすくなった。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 (LogP) 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 1 にトリフルオロメタン (CHF<sub>3</sub>)、オクタン (C<sub>8</sub>H<sub>18</sub>)、オクタデカン (C<sub>18</sub>H<sub>38</sub>) およびトリアコンタン (C<sub>30</sub>H<sub>62</sub>) 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 1 の A のクロマトグラムは 2-プロパノールを保持しているの、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 2 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

表 1 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

	Trifluoromethan	Methane (C1)	Octane (C8)	Octadecane (C18)	Triacontane (C30)
水の接触角(θ)	120°	108°	140°	126°	104°
分配係数(LogP)	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 <sup>-10</sup>

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 2 にあるように、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。

## 2.7 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°C 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メタノールまたはアセトニトリル濃度が 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。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（ステアリル基）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。C30 や C28 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、水移動相条件で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。

## 3. メタノール/水移動相の C18 固定相への濡れ性

水が C18 固定相に濡れないことは、水移動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=30/70、50/50 及び 70/30 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 5 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=30/70, B はメタノール/水=50/50, C はメタノール/水=70/30 溶液を用いた。図 1 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 は全く分散せず、すべての充填剤が液面上に浮いていた。B は一部の充填剤が分散したが、多くの充填剤は A と同様に液面上に浮いていた。C では充填剤は溶液に分散し沈降し始めていた。つまり C 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



図 5 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  $\mu$ m dp C18, 10-nm pore size;  
solution, A = methanol/water=30/70, B = methanol/water=50/50, C = methanol/water=70/30.

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。A 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 1 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かずであるが、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 4 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 6 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

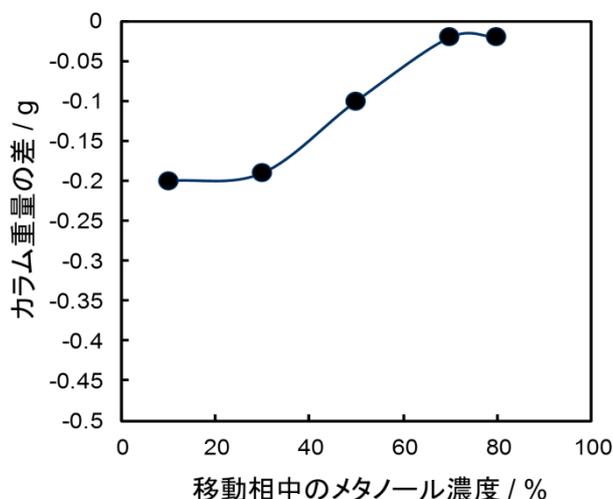


図 6 移動相中のメタノール濃度とカラム重量の関係

Column, 250 mm x 4.6 mm, 5  $\mu$ m dp C18, 10-nm pore size; enclosed solution, methanol/water = 10/90, 30/70, 50/50, 70/30, 80/20; temperature, 40  $^{\circ}$ C. カラム重量の差は初期と 20 分間 0.01 MPa の圧力に維持した後の重量差を測定した。

40°C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 よりは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、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。

## 4. 充填剤の状態

### 4.1 アルキル基の状態についての推測

今まで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 固定相のステアリ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<sub>6</sub>H<sub>14</sub>)です

ら、メタノールとは混ざらない。オクタデカン(C<sub>18</sub>H<sub>38</sub>)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リル基間にメタノールが入り込んでステアリル基自身が立ち上がるのか。実際にはそうではなく、ステアリ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リ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、ステアリ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、隣接するステアリル基間に THF は十分入り込み、ステアリル基は立ち上がるようになると推測される。

### 4.2 逆相固定相への有機溶媒和

図 7 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

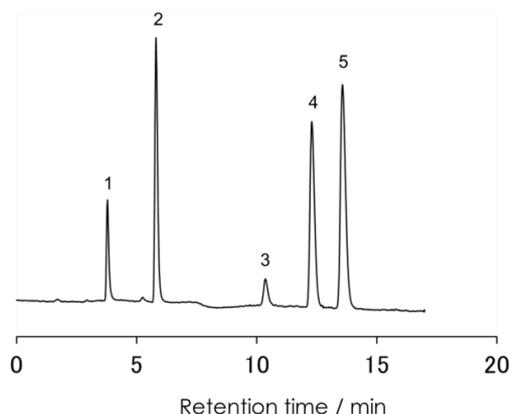


図 7 アルコールとアセトニトリルの C18 カラムを用いた分離

Column, 250 mm x 4.6 mm, 5 μm 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 1 と同じ。

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移動相量 ( $t_0$  の値)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、 $t_0$  の値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 8 に示す。内径 4.6 mm, 長さ 150

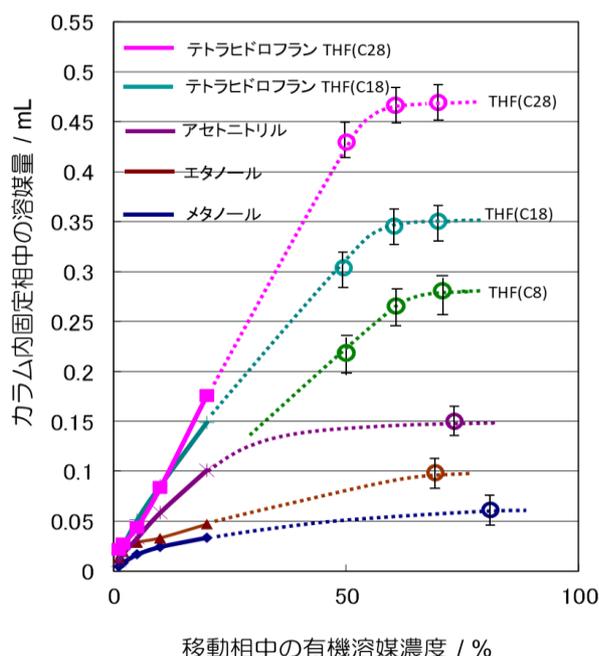


図 8 移動相中の有機溶媒濃度と固定相への有機溶媒の溶媒和の関係

Column, 150 mm x 4.6 mm, 5  $\mu$ m dp C18, C8 and C30, 10-nm pore size; temperature: 40  $^{\circ}$ C.

mm カラム内には C18 および C28 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 C28 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, C28 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 9 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 C28 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 C28 固定相の方が溶媒和量は多くなる。Schure ら<sup>9)</sup>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 $^{\circ}$ C の条件で, 有機溶媒 0%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。

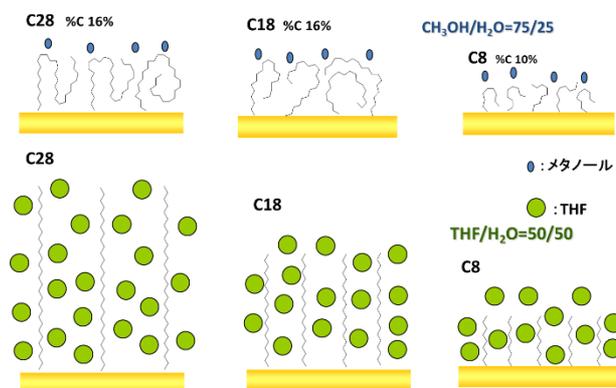


図 9 メタノールとテトラヒドロフラン(THF)の固定相への溶媒和

#### 4.3 溶媒和した固定相による分離比較

図 10 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

### メタノール/水=75/25

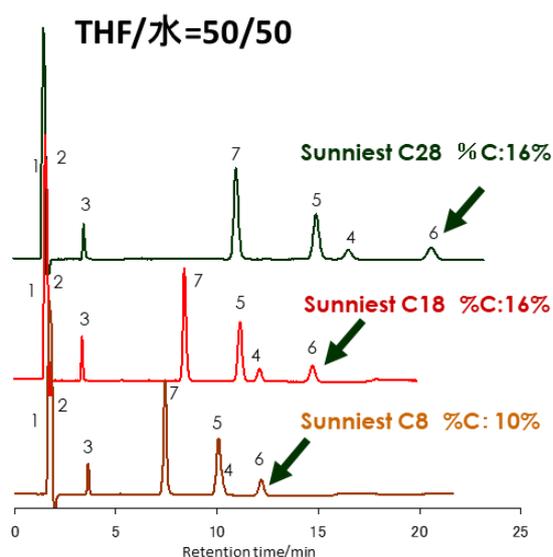
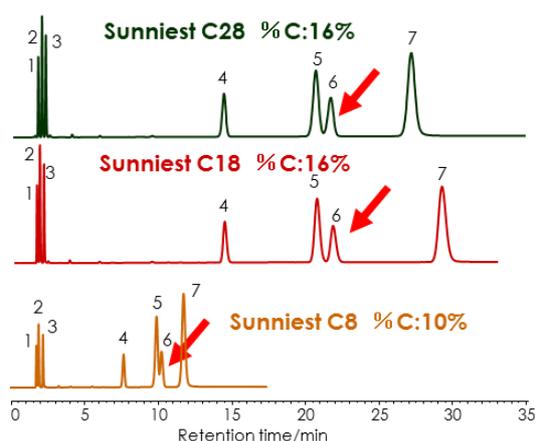


図 10 標準試料の分離

Column, 150 mm x 4.6 mm, 5  $\mu$ m dp, Sunniest C28, 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.

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 C28 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 C28 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 移動相移動相では図 9 に示されているよう

に炭素含有量が同じ C28 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 C28 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 9 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り、溶媒和している有機溶媒を含めた固定相全体では C28 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、C28, 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け、固定相全体と相互作用するのに対し、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。

### 5. 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 11 と図 12 に示す。いずれも C28 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

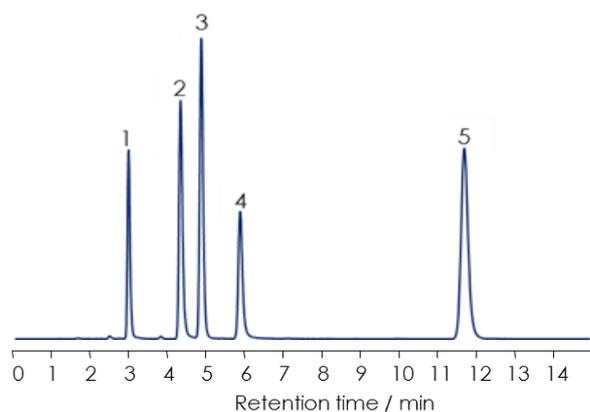


図 11 核酸の分離

Column, Sunniest RP-AQUA (C28) 3  $\mu$ m, 4.6 x 150 mm; mobile phase, 20mM phosphate buffer pH6.0; flow rate, 1.0 mL/min; temperature, 40  $^{\circ}$ C; detection, UV at 250nm; peaks, 1 = 5'-GDP, 2 = 5'-GMP, 3 = 5'-ATP, 4 = 5'-ADP, 5 = 5'-AMP.

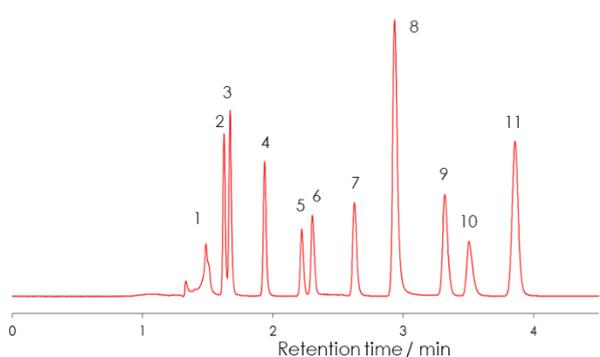


図 12 有機酸の分離

Column, SunShell RP-AQUA (C28) 2.6  $\mu$ m, 150 x 4.6 mm; mobile phase, 0.025 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH2.5; flow rate, 1.5 mL/min; temperature, 25  $^{\circ}$ C; detection, UV at 210nm; Peaks, 1 = oxalic acid, 2 = tartaric acid, 3 = formic acid, 4 = malic acid, 5 = lactic acid, 6 = acetic acid, 7 = diglycolic acid, 8 = maleic acid, 9 = citric acid, 10 = succinic acid, 11 = fumaric acid.

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 11 の分離例では、エンドキャッピングが十分施され、残存シリ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。有機酸の分離には粒子径 2.6  $\mu$ m の表面多孔質充填剤 (Superficially porous particle, Core shell particle, コアシェル型充填剤) カラムを用いており、高理論段数で高速分離を達成している。コアシェル型充填剤は従来の全多孔性充填剤と比較し、1.5 倍の理論段数を発揮する。

コアシェル型充填剤の特徴は、充填剤粒子の内部に無孔性の核を有することと粒度分布が狭く粒子径が揃っていることにより、試料成分の拡散が抑えられることであり、この試料成分の拡散抑制が高理論段数を導き出す。

図 13 と図 14 にはトコフェロールとカロテンの分離を示す。通常の C18 カラムと C28 カラムの分離比較も同時に行った。トコフェロールの分離は逆相 C18 カラムではベータトコフェロールとガンマトコフェロールの分離ができないため、従来はシリカカラムを用い順相モードで行われていたが、C28 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 C28 固定相は C18 固定相に比べ立体選択性が高く、異性体の分離に優れているため、ベータとガンマトコフェロールが分離できた。またこれ以外に C28 固定相が C18 固定相より優れる点として、C18 のステアリル基よりも大きな分子サイズの成分が C28 固定相で分離が良くなる傾向が強い。例えば糖が 2~3 個結合した配糖体などは C28 固定相を用いると大きく分離改善される。アルファとベータカロテンは C18 固定相でも C28 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、C28 固定相は C18 固定相の 2 倍の保持を示し、アルファ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 C28 固定相では 5.50 であった。天然物の分離ではアルファ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、C28 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 C28 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 C28 固定相の体積が大きく異なるためであると考えられる。

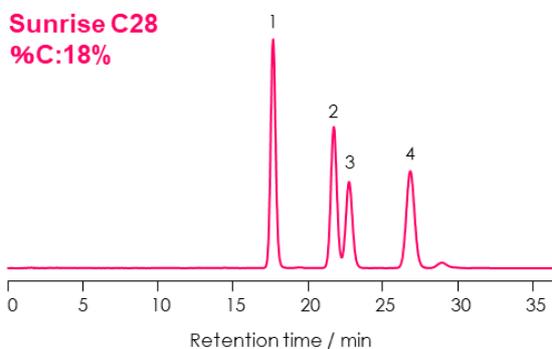
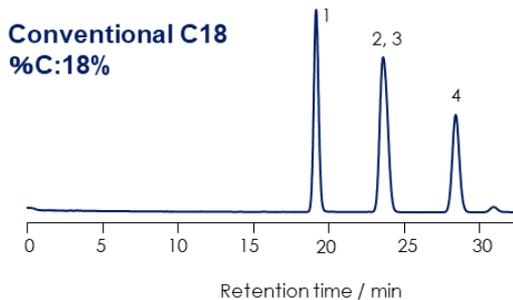
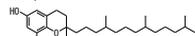


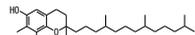
図 13 トコフェロールの分離

Column, Conventional C18, Sunrise C28, C%, 18%;  
column size, 250 x 4.6 mm; mobile phase, methanol/  
water=97/3; flow rate, 1.0 mL/min; temperature:  
25 °C; detection, UV at 295nm;

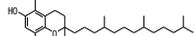
peaks, 1 =  $\delta$ -tocopherol,



2 =  $\gamma$ -tocopherol,



3 =  $\beta$ -tocopherol,



4 =  $\alpha$ -tocopherol.

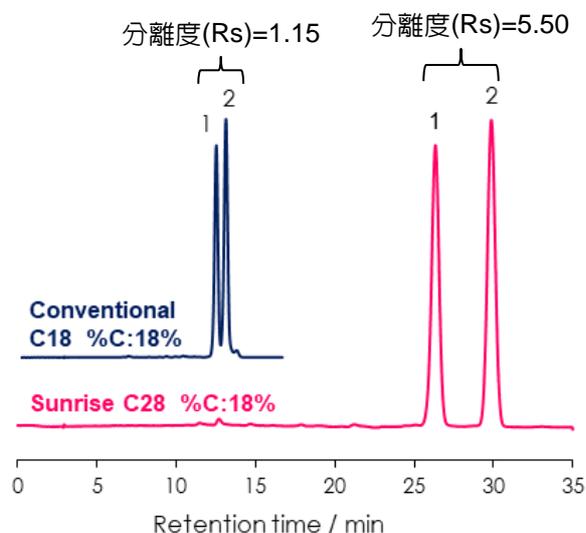
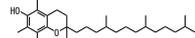
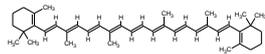


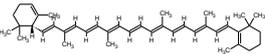
図 14 カロテンの分離

Mobile phase, acetonitrile/chloroform=80/20;  
temperature, 30 °C; detection, UV at 450nm, 他の条件は図 13 と同じ.

peaks, 1 =  $\alpha$ -carotene,



2 =  $\beta$ -carotene.



## 6. まとめ

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。C28 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 C28 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となると思われる。

## 文献

- 1) J.J Kirkland, J Chromatogr. Sci., 7 (1), 13-16 (1969).
- 2) J.J Kirkland, J Chromatogr. Sci., 7 (1), 7-12 (1969).
- 3) J.J. Kirkland, T.J. Langlois, and J.J. DeStefano, Am. Lab., 39, 18-21 (2007).
- 4) Wolcott, G.R., Dolan, W. J. LC/GC, 17, 316-321 (1999).
- 5) N. Nagae, T. Enami, Bunseki Kagaku, 49, 887-893 (2000).
- 6) T. Enami, N. Nagae, Chromatography, 22, 33-39 (2001).
- 7) N. Nagae, T. Emani, S. Doshi, LC/GC, 20, 964-972 (2002).
- 8) T. Enami, N. Nagae, Bunseki Kagaku, 53, 1309-1313 (2004).
- 9) Mark R. Schure, J. L. Rafferty, L. Zhang, J. I. Siepmannet, LCGC North America, 31, 630-637 (2013).

1908

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