

液体クロマトグラフィーの基礎技術(1)

Fundamental Techniques of Liquid Chromatography

—逆相クロマトグラフィーとカラムの選び方 その1—

— How to select the appropriate column for your reversed phase chromatography (I) —

関東化学株式会社 草加工場 生産技術部 酒井 芳博

YOSHIHIRO SAKAI

Production Technique Dept, Soka Factory, Kanto Chemical Co., Inc.

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は、現在ではなくてはならない重要な分析方法の一つであるが、その実施にあたっては、一般的に「固定相 (カラム) の選択」、「移動相の選択」、「検出方法の決定」が三要素として重要視されている。

今回は、その中から「固定相 (逆相及び順相) の選択」及び「移動相の選択」の二つの要素についてそれぞれポイントとなるいくつかの基礎技術をとらえてやさしく解説する。

1. 液体クロマトグラフィーとその特徴

本論に入る前に、液体クロマトグラフィーの概要を説明する。

液体クロマトグラフィーには、いろいろな分類方法があるが、一般的には、固定相と移動相の関係から逆相クロマトグラフィー (Reversed Phase Chromatography) と順相クロマトグラフィー (Normal Phase Chromatography) に大別される。「逆相クロマトグラフィーとは、非極性の固定相に極性の移動相を使用して行うクロマトグラフィー」のことであり、「順相クロマトグラフィーとは、極性の固定相に非極性の移動相を使用して行うクロマトグラフィー」のことである。

最近では、この逆相、順相クロマトグラフィーという二つの分類だけでなく、分離機構を基にした分類も一般的であり、その代表的なものとして、

- a) 分配クロマトグラフィー
(Partition Chromatography)
- b) 吸着クロマトグラフィー
(Adsorption Chromatography)

- c) 親水性相互作用クロマトグラフィー
(Hydrophilic Interaction Chromatography)
- d) サイズ排除クロマトグラフィー
(Size Exclusion Chromatography)
- e) イオン交換クロマトグラフィー
(Ion Exchange Chromatography)
- f) アフィニティークロマトグラフィー
(Affinity Chromatography)

などがある。したがって、これら分類の手法を踏まえて分析しようとする試料の物性と分離機構を考慮することで、変化に富んだ分離・分析が可能となる。

2. カラムと充填剤について

現在HPLC用カラムは、内径0.3mmほどのキャピラリータイプのカラムから内径1mm程度の大口径を有する分取用のカラムまで種々のサイズのカラムが使用されている。

普通、これらカラムは、その内径により50mm以上のカラムを大量分取用、10~50mmをセミ分取用カラム、2~4.6mmのカラムを汎用カラム、1~2mmのカラムをセミマイクロカラムそして1mm以下のカラムをマイクロカラムと分類されている。

その中でも分析用として主に使用される代表的なカラムサイズは、内径が4.6mm、カラム長が150mmと250mmであり、充填剤の粒子径は5 μ mが中心となっている。

しかしながら、近年検出器に質量分析計 (MS) を使用したLC/MSが普及してきたこともあり、内径2mmのカラムの需要増加と共に、充填剤の粒子径も3 μ mと小さくなっている。

充填剤は、球状シリカゲルを基本材料とした化学結合型充填剤が多く使用されているが、最近、シリカゲル骨格にメチル基を組み込んだハイブリッドシリカゲルも開発され、シリカゲルとポリマーの長所を生かした耐薬品性に優れた充填剤として期待されている。

この他、シリカゲル以外の素材も多く使用されているが、その代表的なものが、ポーラスポリマーと総称されている樹脂を加工した充填剤である。

また、アルミナ、ガラス、チタニア、カーボン等様々な素材がHPLC用の充填剤として使用され、それぞれ特徴のある効果を出している。

3. 検出方法について

HPLCの検出方法では、現在吸光光度法(UV/VIS)が最も多く使用されているが、近年では検出感度や選択性が優れている質量分析計(MS)も検出器として急速に普及している。

この他、示差屈折率(RI)検出、蛍光(FL)検出、電気化学検出(ECD)、電導度検出(CD)、光散乱検出(ELS)、NMR検出等、目的に応じさまざまな検出手法が採用されている。

これら検出器の使用方法を含めた詳細については成書^{1), 2)}を参照願いたい。

4. 固定相について

液体クロマトグラフィーの原点は、1906年、Twettが炭酸カルシュウム(チョークの粉)の固定相に葉緑素のエーテル溶液を流し、クロロフィルを分離したことが始まりといわれている。

しかしながら、近代的なHPLCは、1969年にJ.J.Kirklandらが開発した球状シリカゲルの出現を契機に始まりを見るが、さらにシリカゲルにシラン化合物を化学結合させたパーマネントフェーズ充填剤が登場して以降、現在ではシリカゲルにアルキルシランを化学結合させた逆相充填剤、特にオクタデシルシリルシリカゲル、通称ODSシリカゲル充填剤がHPLCを広く普及させることになった。

HPLC用カラムには、現在オクタデシルシリル(ODS)シリカゲル充填剤(C18)を中心とした逆相分配、いわゆる逆

相(Reversed Phase)クロマトグラフィー用充填剤が多用されていることは周知の事実であるが、このほかにもオクチルシランを化学結合させたC8充填剤をはじめC22充填剤、C30充填剤等、逆相充填剤も種類が豊富になっている。

現在ODSシリカゲル充填剤が多用されている理由として、ODSシリカゲル充填剤が物理的、化学的に安定であること、また有機溶媒と水の混合液を溶離液に使用することができる等、使いやすさを第一にあげることができる。また、最近では、水系100%の溶離液を使用しても、溶出時間が変化しない再現性に優れた親水性ODSシリカゲル充填剤も一般的となってきた。

順相クロマトグラフィー用充填剤では、シリカゲルが代表的な充填剤であるが、アミノプロピルシリカゲル、シアノプロピルシリカゲルなども順相クロマトグラフィー用充填剤として使用されている。

現在、これら順相系充填剤は、親水性相互作用クロマトグラフィー(HILIC)³⁾にも使用できることが解り再び注目されている。

5. 逆相系カラムの選択に関して

ODSシリカゲル充填剤は、前述のように、大変使いやすい充填剤ではあるが、一方で、残存シラノールが原因となる不可逆的な二次相互作用にも悩まされてきたという歴史がある。

しかしながら、1980年代後半、高純度シリカゲルを基材としたHPLC用逆相充填剤が市場に登場し、かつエンドキャッピング技術が進歩したこと及び充填剤の評価方法の進歩もあり、それまで分析者を悩ませていた不可逆的な二次相互作用に起因する充填剤の品質の課題が劇的に改善されている。⁴⁾

例えば、塩基性化合物や配位性化合物など、ODSシリカゲル充填剤を使用する逆相クロマトグラフィーでは溶出が困難であった化合物も容易に分析できるようになり、益々その有用性は増しているといえよう。

弊社では、高純度シリカゲルを採用したODSシリカゲル充填剤Mightysil RP-18⁵⁾を1995年に発売したが、これを改良したMightysil RP-18GP⁶⁾を1997年に上市し現在に至っている。また2000年には、水系100%の溶離液でもHPLCを可能とする、親水性ODSシリカゲル充填剤⁷⁾を使用したMightysil RP-18GP Aquaのシリーズを上市し、

ODSシリカゲルの利用範囲の拡大を図ってきた。

ODSシリカゲルカラムは、従来ベンゼン、ナフタレン、アントラセン等、固定相と二次相互作用しない化合物を使用して理論段数を中心としたカラムの性能試験データを添付して販売されていたが、Mightysil RP-18GPシリーズの充填カラムでは、これ等芳香族炭化水素に加え、塩基性化合物、配位性化合物等の6種類の溶離試験を行い、全ての項目に適合していることが保証されている。

逆相系カラムの選択に関しては、ODSシリカゲル充填剤の物性が極めて重要なポイントとなるので、ここではMightysil RP-18 GPシリーズ製品の溶離試験の特徴を中心に説明を進めることとした。

5-1 Mightysil RP-18 GP 充填剤の物理特性

Mightysil RP-18 GP充填剤の基本物性を表-1に示した。Mightysil RP-18 GPシリーズは、平均細孔径12nmの真球状シリカゲルを使用し、一反応性(モノファンクショナル) ODSを化学結合した炭化水素量20%の充填剤を中心に15%、25%の充填剤が用意されている。粒子径は5 μm と3 μm の2種類だが、高精度に分級され粒度分布の幅が極めて狭く圧力損失が小さいことが特徴である。

表1 主なMightysil RP-18GPの基本物性

粒子径(μm)	比表面積(m^2/g)	平均細孔径(nm)	炭化水素量(%)	結合官能基
5	340	12	20	一反応性
5	270	13	15	一反応性
3	350	12	20	一反応性

Mightysil RP-18GPシリーズは、平均細孔径12nmのシリカゲルに一反応性ODSを化学結合した充填剤であるが、メーカーによっては平均細孔径が8nm、10nmのシリカゲルを採用している場合もある。

またODS基も二反応性、三反応性のODSを結合したポリファンクショナルODSシリカゲル充填剤も供給されているが、これら充填剤はそれぞれ特徴のある溶離特性を示すことも知られている。

したがって、ODSシリカゲル充填剤のこれら基本的な物性を知ることは、カラムの選定にあたり大変重要となるので、これらODSシリカゲル充填剤の基本物性に基づく溶離特性の違いは、5-3項で詳しく述べる。

5-2 ODSシリカゲル充填剤のエンドキャッピング(TMS化)

ODSシリカゲル充填剤は、シリカゲル及び反応試薬であるアルキルシリル化剤由来の残存シラノールの影響によ

り、塩基性化合物との不可逆的な二次相互作用を生じることがよく知られている。この不可逆的な二次相互作用の影響を除くためにエンドキャッピングと呼ばれるトリメチルシリル化(TMS化)が行われているのである。

ODSシリカゲル充填剤にTMS化の処理が必要な理由であるが、シリカゲルの表面の構造的な特徴を理解すると大変分り易い。

シリカゲルの表面は、図1に示すように三種類のシラノールが存在しているといわれており、この状態は、図2の ^{29}Si CP/MAS NMRスペクトルにより具体的に証明されている。

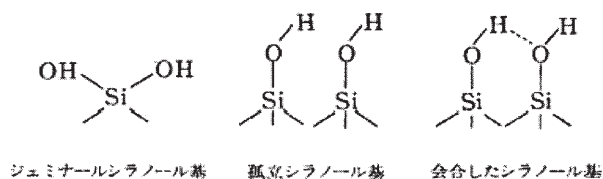


図1 シリカゲル表面に存在するシラノール²⁾

図2中のaで示されるピークは、ジェミナール型シラノールであるが、bで示されるピークはシングルシラノールに属している孤立シラノールと会合型シラノールを示している。cで示されるピークは、シロキサン($-\text{Si}-\text{O}-\text{Si}-$)結合に相当している。

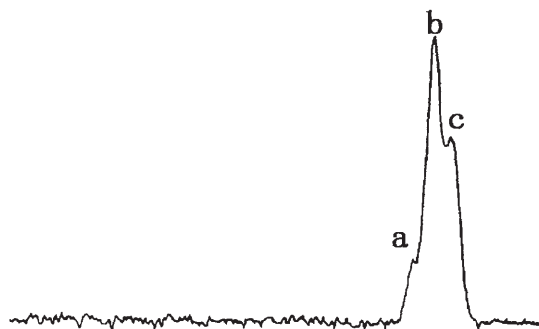


図2 シリカゲル表面の ^{29}Si CP/MAS NMRスペクトル

シリカゲルのODS化では、シリカゲルの表面に存在しているこれらシラノールにODS基を化学結合させるのであるが、ODS基の立体障害のため、未反応のシラノールが残存し易くなるのである。この残存シラノールが塩基性化合物や配位性化合物と不可逆的な二次相互作用を引き起こすため溶出が乱れて検出されるピークがテーリングし、また極端な場合では、溶出しなくなることがある。

図3は、モノファンクショナルODSシリカゲルのエンドキャッピングの進行の様子を ^{29}Si CP/MAS NMRスペクトル

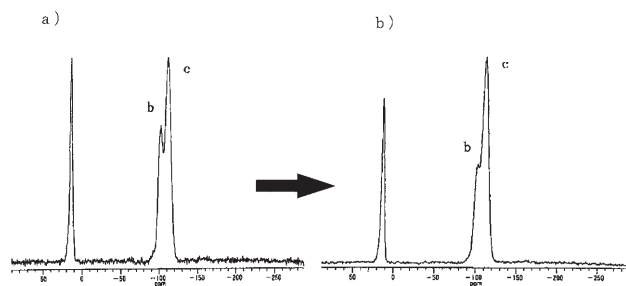


図3 一反応性ODSシリカゲル充填剤の²⁹Si CP/MAS NMR スペクトル
a) エンドキャッピングが不十分なODSシリカゲル充填剤。
b) a)をさらにエンドキャッピングした充填剤(Mightysil RP-18GP(5μm))

の変化をとらえて示したものである。

図3 a) は反応途中のエンドキャッピングが不十分な状態のODSシリカゲルであるが、反応の進行と共に図3 b)のごとくジェミナール型シラノールの消滅と、シングルシラノールが減少している様子がよく分る。

エンドキャッピングは、トルエン還流温度でTMS化反応を行う方法^{8), 9), 10)}が一般的であるが、この方法では完全なTMS化が困難であるとの観点から、より完全なエンドキャッピングを目指した気相法¹¹⁾、高温高压法⁵⁾、高温常圧法¹²⁾、超臨界法¹³⁾など、改良されたエンドキャッピングの方法が報告されている。

Mightysil RP-18 GP (5 μm)

Certificate of Analysis

Batch No. 05M1202

Analytical Results for Bulk Material

Physical Inspection	Spec.	Result
Mean Particle Size [μm]	4.3~4.7	4.4
Surface Area [m ² /g]	325~380	353
Mean Pore Diameter [nm]	11.0~14.0	11.8
Pore Volume [ml/g]	1.0~1.2	1.04
Carbon Content [%]	19.5~21.5	20.5

Chromatographic Results and Conditions

- Column: Mightysil RP-18 GP 150-4.6 (5 μm) -

Selectivity test	Spec.	Result
Test I		
K ⁺ Anilamine	> 5.5	6.07
K ⁺ Aniline / K ⁺ Benzene	1.4~1.5	1.48
K ⁺ Triphenyl / K ⁺ o-Toluidine	1.4~1.5	1.45

Test II		
K ⁺ Acetylacetone / K ⁺ Protonamide	1.9~2.2	2.18

Test III		
K ⁺ Sorbic acid / K ⁺ Benzoic acid	2.0~2.5	2.13
K ⁺ Dehydroacetic acid / K ⁺ Benzoic acid	5.0~6.0	5.03

Test IV		
K ⁺ Oxine-copper / K ⁺ Caffeine	0.10~0.15	0.12

Test V		
K ⁺ Pyridine / K ⁺ Caffeine	2.3~2.6	2.43
K ⁺ Aniline / K ⁺ Pyridine	2.6~2.9	2.90
K ⁺ o-Toluidine / K ⁺ Aniline	1.8~2.0	1.87
K ⁺ N-Methylaniline / K ⁺ o-Toluidine	1.6~1.8	1.74
K ⁺ o-Ethylaniline / K ⁺ N-Methylaniline	1.1~1.3	1.16
K ⁺ p-Nitroaniline / K ⁺ o-Ethylaniline	1.3~1.5	1.48
K ⁺ N,N-Dimethylaniline / K ⁺ p-Nitroaniline	1.7~1.9	1.70

Test VI		
K ⁺ Ethanol	3.0~3.5	3.05

Atomic Emission	Spec.	Result
Na [ppm]	≤ 20	0.1
Al [ppm]	≤ 5	0.4
Fe [ppm]	≤ 10	1.5
Ti [ppm]	≤ 1	0.1

Analytical Conditions	
Eluent:	Methanol / Water = 80 / 20
Flow rate:	1.0 ml / min
Temp.:	40 °C
Detection:	UV 254 nm
Inj. Vol.:	5 μl

Eluent:	Methanol / 20mM buffer(pH7.6)* = 40 / 60
Flow rate:	0.5 ml / min
Temp.:	40 °C
Detection:	UV 254 nm
Inj. Vol.:	5 μl

*pH adjust: add 20mM K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O to 20mM KH ₂ PO ₄	
Eluent:	Acetonitrile / 20mM buffer(pH4.6)* = 1 / 2
Flow rate:	0.5 ml / min
Temp.:	40 °C
Detection:	UV 225 nm
Inj. Vol.:	5 μl

*pH adjust: add conc. CH ₃ COOH to 20mM CH ₃ COONa	
Eluent:	Acetonitrile / 20mM H ₃ PO ₄ = 5 / 95
Flow rate:	1.0 ml / min
Temp.:	40 °C
Detection:	UV 250 nm
Inj. Vol.:	5 μl

Eluent:	Acetonitrile / Water = 30 / 70
Flow rate:	1.0 ml / min
Temp.:	40 °C
Detection:	UV 254 nm
Inj. Vol.:	10 μl

Eluent:	Acetonitrile / 20mM KH ₂ PO ₄ = 40 / 60
Flow rate:	1.0 ml / min
Temp.:	40 °C
Detection:	UV 220 nm
Inj. Vol.:	3 μl

図4 Mightysil RP-18GP(5μm)の充填剤バッチ試験の分析表

5-3 Mightysil RP-18 GPの溶離特性について

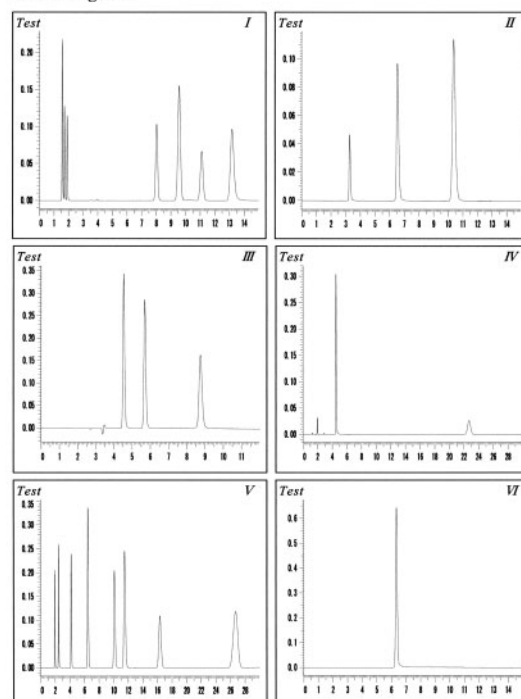
Mightysil RP-18 GPシリーズは、充填剤の製造バッチ毎の品質を一定に保つことを目的に6種類の溶離特性試験を行いバッチ間の再現性を確認し、優れた再現性を保証することを最大の特徴としている。製品に添付されている試験成績表を図4に示す。

図4は、母体シリカゲルの物理特性と代表的な金属不純物および6種類の溶離特性試験の実測値及び規格値を示した一覧表と、6種類の溶離特性試験のクロマトグラムを示したものである。

最近のHPLC用充填カラムでは、このような充填剤の基本性能と溶離試験データが添付されていることが多く、使用者はこれらのデータ(バッチデータ)が試験方法の妥当性の管理にも利用できるようになっているのでGLP (Good Laboratory Practice) 活動の一助となれば幸いである。

Mightysil RP-18GPシリーズで実施しているこれら6種類の溶離特性試験は、試験—I 疎水性、立体選択性試験、試験—II エンドキャッピング試験、試験—III 酸性化合物試験、試験—IV 配位性化合物試験(その1)、試験—V 塩基性化合物試験、試験—VI 配位性化合物試験(その2)により構成されているが、このうち特徴

Chromatograms



Approved by Y.SAWADA
Date 2005.12.02

関東化学株式会社
試験事業本部

〒100-0023 東京都中央区日本橋8丁目11番1号 03-5653-7031
〒100-0004 東京都中央区東区2丁目1番1号 03-5222-2796
〒102-0077 東京都千代田区東区3丁目22番3号 03-5241-9081
関東化学インターネットホームページ <http://www.kanto.co.jp>

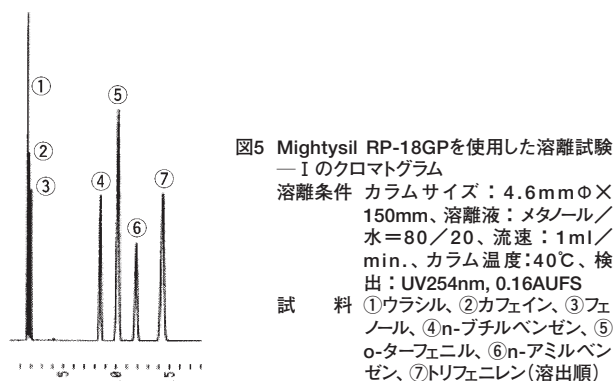
的な試験である、試験—I、試験—II、試験—IVについて以下に述べる。

5-3-1 試験—I 疎水性及び立体選択性試験

1) ODSシリカゲル充填剤の結合官能基数の違い(ファンクショナリティー)による溶離特性

ODSシリカゲル充填剤の溶離特性は、化学結合されたODS基の結合官能基数(ファンクショナリティー)により異なることから、田中試験¹⁴⁾で知られている評価方法を試験—Iとして採用することで充填剤の疎水性と立体選択性を評価し、ODSシリカゲル固定相が均質であることを確認している。

一反応性ODSシリカゲル充填剤が充填されているMightysil RP-18GP (5 μ m) (4.6mm Φ ×150mm) のクロマトグラムを図5に示す。



これに対して、ポリファンクショナルODSシリカゲル充填剤を使用した場合の溶離挙動を図6a) (二反応性ODS)、図6b) (三反応性ODS)に示す。一反応性ODSシリカゲルに比べ、溶出時間も長く特徴のある溶離挙動を示している。

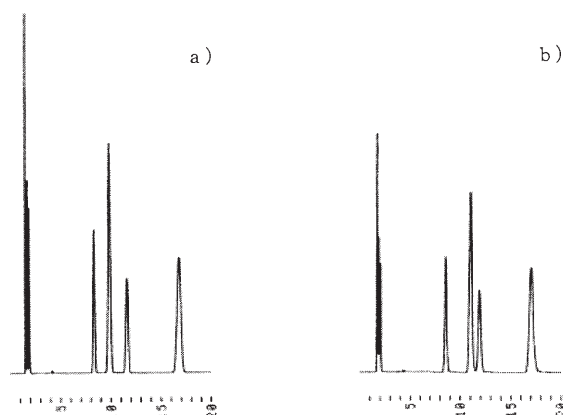


図6 ポリファンクショナルODSシリカゲル充填剤の溶離試験—Iのクロマトグラム
a) 二反応性ODSシリカゲル、b) 三反応性ODSシリカゲル
溶離条件及び試料は図—5と同じ

一般的に、ポリファンクショナルODSシリカゲル充填剤のうち、三反応性ODS充填剤は、ポリメリックな表面構

造になりやすく、多環芳香族炭化水素の立体選択性に優れているといわれている。

この状況を一反応性充填剤のクロマトグラムと比較すると、図6 b)に示される三反応性ODSシリカゲル充填剤の場合、o-ターフェニルとn-アミルベンゼンが接近し分離が悪いように思われるが、これはo-ターフェニルの溶出時間が遅れ、n-アミルベンゼンの溶出時間がほとんど変わらないことから生じた現象である。前述したように多環芳香族化合物に対して特異な働きを示していることがわかる。

これに対し、図6 a)に示す二反応性ODSシリカゲル充填剤は、一反応性充填剤と三反応性充填剤の中間の性質を有しているといわれているが、実際は使用されている例が少ないこともありこれといった特徴が見出されていないのが実情である。

表2 ODSシリカゲル充填剤の分離係数の比較

	k' _{AM} /k' _{BU}	k' _{TR} /k' _{TE}
一反応性 ODS	1.49	1.44
二反応性 ODS	1.48	1.62
三反応性 ODS	1.49	1.64

*) AM: Amylbenzen、BU: Butylbenzene、TR: Triphenylene、TE: o-Terphenyl

表2は図5の溶離条件で測定した際のアルキルベンゼンと多環芳香族炭化水素の分離係数(α)を示したものである。アルキルベンゼンの分離係数は各充填剤共、ほとんど差は見られないが、多環芳香族炭化水素の分離係数は、それぞれ特徴的な結果を示している。

このように、ODS基のファンクショナリティーが異なると溶離特性も違ってくことから、分析しようとする試料の性質もあわせ、充填剤を選定することが重要となる。

(次号に続く)

参考文献

- 1) Lloyd R. Snyder, Joseph J. Kirkland, Joseph L. Glajch, "PRACTICAL HPLC METHOD DEVELOPMENT" 2nd EDITION, JOHN WILEY & SONS INC
- 2) 日本分析化学会関東支部編, "改訂2版 高速液体クロマトグラフィーハンドブック", 丸善 (2000)
- 3) 中村洋監修 "液クロ虎の巻", p54, 筑波出版会 (2003)
- 4) Y. Ohtsu, Y. Shiojima, Y. Okuyama, J. Koyama, K. Nakamura, K. Kimata, N. Tanaka, *J. Chromatogr.*, **481**, 147 (1989)
- 5) 細田誠、酒井芳博 *Chromatography*, **17**, 39 (1996)
- 6) 酒井芳博 *THE CHEMICAL TIMES* **171**, 17 (1999)
- 7) US Patent No. US6713033 B2
- 8) C.H. Lochmueller, D.B. Marshall, *Analitica Chimica Acta*, **142**, 63 (1982)
- 9) K. Jinno, S. Shimura, N. Tanaka, J.C. Fetze, R. Biggs, *Chromatographia*, **27**, 285 (1989)
- 10) N. Nagae, Y. Hatano, D. Ishii, *Chromatography*, **14**, 45R (1993)
- 11) 特許第2611545号
- 12) 酒井芳博、浜川大爾、太田鈴枝 第2回LCテクノプラザ講演要旨集, BP2 51 (1997)
- 13) 檜田孝、井原俊英、堀本能之、野村明 第4回LCテクノプラザ講演要旨集, BP2 36 (1999)
- 14) K. Kimata, K. Iwaguchi, S. Onishi, K. Jinno, R. Eksteen, K. Hosoya, M. Arai, N. Tanaka, *J. Chromatogr. Sci.*, **721**, 27 (1989)