

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2—

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

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.

5. 逆相系カラムの選択に関して

5-3-1 試験—I 疎水性及び立体選択性試験

2) 平均細孔径の違いによる溶離挙動の違い

充填剤において平均細孔径は、試料の溶出時間を左右する重要な因子である。

Mightysil RP-18GPシリーズの充填剤は、平均細孔径12nmのシリカゲルを採用していることは前稿(205号)に述

べたが、平均細孔径10nmのシリカゲルから合成された炭化水素含有量20%の一反応性ODSシリカゲルの溶出挙動との比較を図7に示した。

同じ溶離条件を用いた場合、平均細孔径が12nmの充填剤(図7a)では、最後に溶出するトリフェニレンは14分強だが、平均細孔径10nmのODSシリカゲル充填剤(図7b)では17分強と3分ほど保持時間が長く、全ての試料に対して保持力が強く現れるのである。

3-1) 炭化水素量の違いによる溶離挙動の変化

ODSシリカゲル充填剤の溶離、特に溶出時間に関係するファクターとして、炭化水素量があげられる。

これまで、溶出時間に影響を与える因子としてODS基のファンクションリティー、原料シリカゲルの細孔径について述べてきたが、炭化水素量も逆相クロマトグラフィーでは重要な因子の一つである。

炭化水素量は、ODS化する際に使用するシリカゲルの比表面積に依存することから、同じ比表面積のシリカゲルを使用する限り大きな変化は望めない。したがって、炭化水素量を制御するにはシリカゲルの比表面積を変えることが一般的である。一方、C18(ODS基)を中心にして、アルキル鎖の長さの異なるアルキルシリル化剤を用いて炭化水素量を調整することも行なわれている。

炭化水素量の異なる充填剤Mightysil RP-18GP(L)(炭化水素量15%)、(M)(炭化水素量20%)、及び(H)(炭化水素量23%)のクロマトグラムを図8に示した。当然ながら、炭化水素含有量の高い(H)タイプの充填剤の溶出時間が最も長くなっている。特に炭化水素量15%と炭化水素量23%の結果を比較した場合、明らかに溶出時間に差が認められる。

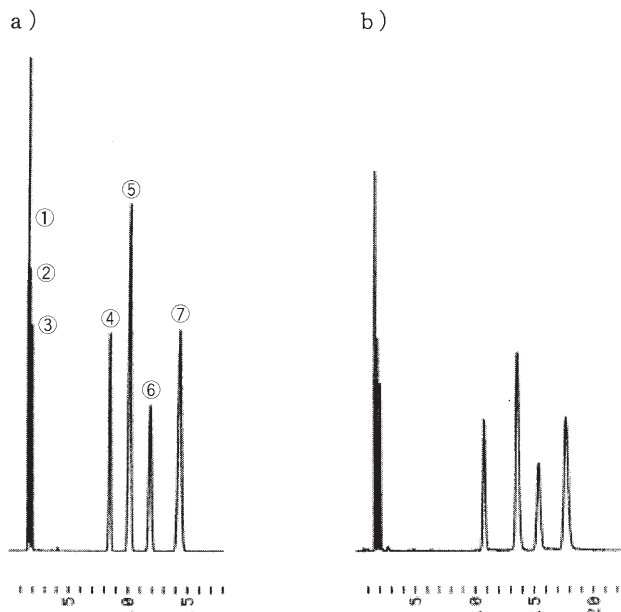


図7 平均細孔径の異なるODSシリカゲルを使用した試験—Iのクロマトグラム

a) 平均細孔径 12nm 炭化水素量20%のODSシリカゲル充填剤

b) 平均細孔径 10nm 炭化水素量20%のODSシリカゲル充填剤

溶離条件

カラム: 4.6mmφ×150mm

溶離液: メタノール/水=80/20

流速: 1ml/min.

カラム温度: 40℃

検出: UV254nm, 0.16AUFs

試料: ①ウラシル、②カフェイン、③フェノール、④n-ブチルベンゼン、⑤o-ターフェニル、⑥n-アミルベンゼン、⑦トリフェニレン(溶出順)

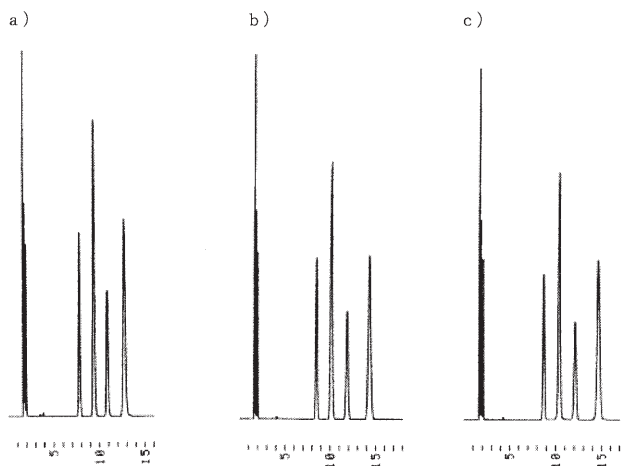


図8 炭化水素量の違いによる溶出時間の違い(試験—I)
カラム：4.6mmΦ×150mm
a) Mightysil RP-18GP (L) (5μm) (炭化水素量:15%)
b) Mightysil RP-18GP (M) (5μm) (炭化水素量:20%)
c) Mightysil RP-18GP (N) (5μm) (炭化水素量:23%)
溶離条件及び試料は図7と同じ

3-2) アルキル鎖のちがいによる溶出挙動

ベンゼン、ナフタレン、アントラセンの三種類の試料を用いたクロマトグラムを比較して図9に示した。Mightysil RP-8GP (5μm) (炭化水素量:13%)は、Mightysil RP-18GP (5μm) (炭化水素量:20%)と比較すると、三番目に溶出するアントラセンの溶出時間がRP-8では4分半程度となっており、かなり保持時間が短くなることが分かる。

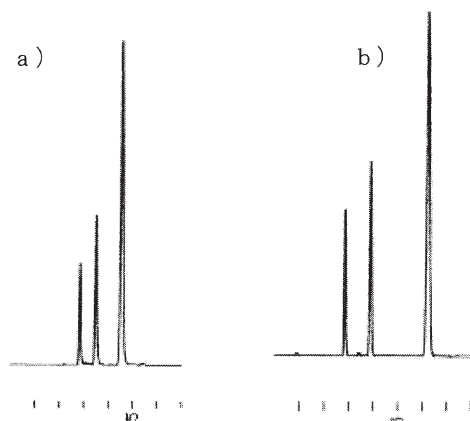


図9 C18とC8の溶出時間の比較
a) Mightysil RP-8GP (5μm)、b) Mightysil RP-18GP (5μm)
溶離条件
カラム：4.6mmΦ×150mm
溶離液：アセトニトリル/水=75/25
流速：1ml/min.
カラム温度：40℃
検出：UV254nm, 0.16AUFSS
試料：ベンゼン、ナフタレン、アントラセン(溶出順)

一方、Mightysil RP-8GP (5μm) (炭化水素量:13%)は、Mightysil RP-18GP (5μm) (L) (炭化水素量 15%)に比べ極端に炭化水素量が少ないわけではないにもかかわらず、溶離条件によっては、図10に示すように、炭化

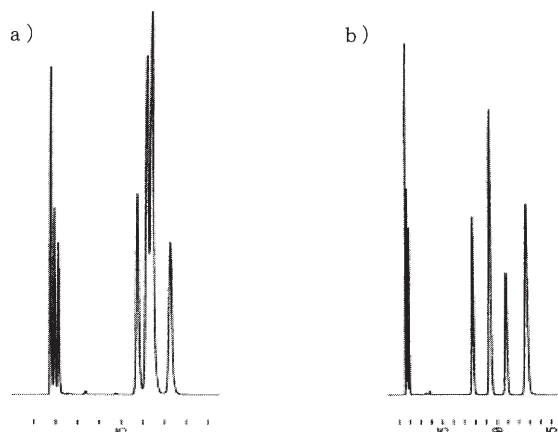


図10 Mightysil RP-8GP (5μm)とMightysil RP-18GP (L) (5μm)の比較(試験—I)
カラム：a) Mightysil RP-8GP (5μm) 4.6mmΦ×150
b) Mightysil RP-18GP (L) (5μm) 4.6mmΦ×150
溶離条件及び試料は図7と同じ

水素量の違い以上に溶離特性が大きく異なることがある。

このように、炭素鎖の違いは溶出挙動を大きく変化させることがあるので、単に溶出時間の調節のためだけにC8カラムを選択するには充分注意を払う必要がある。

5-3-2 試験—I エンドキャッピング試験

溶離試験—Iは、中性溶離液におけるプロカインアミド、アセチルプロカインアミドの溶離挙動からエンドキャッピングの達成度を確認するものである。同じくピリジン/フェノール試験も良く知られている試験方法であるので後述する。

最近では、より塩基度の強い化合物を試料として使用し、さらにpHの高い(中性から弱塩基性)溶離液を用いる試験方法がよく採用されている。その理由として、残存シラノールは、pHが高くなるにつれ解離が進み、塩基性化合物との不可逆的な二次相互作用が強く現れるためである。したがってpHの高い溶離液においても塩基性化合物がシャープなピーク形状を示す充填剤は、良好にエンドキャッピングされていることになる。

このような特性をふまえ、Mightysil RP-18GPではエンドキャッピングの評価用の試料としてプロカインアミドを採用している。そのクロマトグラムを図11a)に示す。

二番目に溶出するピークが、プロカインアミドである。対象性の良いクロマトグラムが得られており、塩基性化合物と不可逆的な二次相互作用がない充填剤であることがわかる。

一方、エンドキャッピングが不十分であると、図11b)に示すようにテーリングしたクロマトグラムになることが特徴である。ここで使用したODSシリカゲル充填剤は、Mightysil RP-18GPを合成する途中の中間体であり、エ

エンドキャッピングが不十分な充填剤を用いた。二番目に溶出しているプロカインアミドのピークはテーリングが大きく、不可逆的な二次相互作用が強いことを示している。

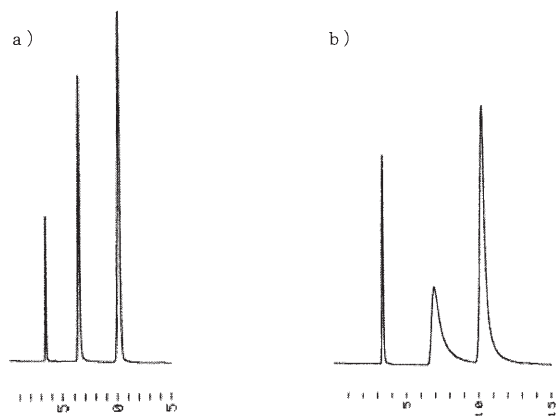


図11 エンドキャッピングの評価(試験Ⅱ)

溶離条件

カラム：4.6mmφ×150mm、

a) Mightysil RP-18GP (5 μm)

b) エンドキャッピング不良充填剤

溶離液：メタノール／pH7.6 20mMリン酸緩衝液＝40／60

流速：0.5ml/min.

カラム温度：40℃

検出：UV254nm, 0.16AUFS.

試料：ウラシル、プロカインアミド、アセチルプロカインアミド(溶出順)

プロカインアミドを使用した塩基性化合物の試験は、pH7.6の緩衝液とアセトニトリルの混合液を溶離液に使用する試験であるが、簡易的にはアセトニトリルと水の混合液を溶離液に、ピリジンとフェノールを試料にしたピリジン/フェノール試験と呼ばれている方法もよく利用されている。

この試験で得られたクロマトグラムを図12に示す。図12 a)は、Mightysil RP-18GP (5 μm)の結果で、同b)は、エンドキャッピング不良の充填剤(図11b)と同じカラムによる結果である。

前者では、ピリジン(最初に溶出しているピーク)はピークテーリングも小さくシャープなピークを示し、これに対して、後者のピリジンのクロマトグラムでは、テーリングが大きく、ピーク幅も広がっている。

また、エンドキャッピングが悪い場合、二次相互作用が強くなるため、塩基性化合物の溶出時間が遅れることも一般的に生じる現象である。

この様に、シリカゲルを基材とした逆相充填剤は、残存シラノールの影響が強く現れることから、エンドキャッピングは絶対的に必要なプロセスとなっている。

高純度シリカゲルを原料とするODSシリカゲル充填剤では、ほとんど、塩基性化合物の溶出に関して問題なく使

用できるようになってきたが、反面旧タイプの充填剤を使用した充填カラムも依然流通しているので、カラムの選択には注意が必要である。

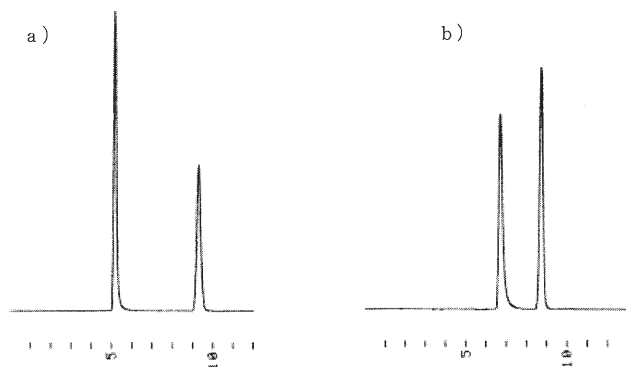


図12 エンドキャッピングの評価(ピリジン/フェノール試験)

溶離条件

カラム：a) Mightysil RP-18GP (5 μm) 4.6mmφ×150mm

b) エンドキャッピング不良充填剤 (5 μm) 4.6mmφ×150mm

溶離液：アセトニトリル／水＝30／70

流速：0.5ml/min.

カラム温度：40℃

検出：UV254nm, 0.16AUFS

試料：ピリジン、フェノール(溶出順)

5-3-3 試験Ⅳ 配位化合物試験

配位化合物との不可逆的な二次相互作用の評価は、オキシシン銅を使用するMightysil RP-18GPシリーズは、高純度シリカゲル(純度99.99%以上)を原料に使用していることに加え、エンドキャッピングも完全に行われているため配位化合物の溶出は良好である。

図13a)にMightysil RP-18GP (5 μm)を使用した配位化合物試験Ⅳのクロマトグラムを示す。

オキシシン銅は、配位化合物の代表として充填剤の性能評価物質として使用されるが、測定に際しては、オキシシン(8-ヒドロキシキノリン)として測定されるので、その配位性のみならず、塩基性であることも考慮する必要がある。

現在、配位化合物の溶出挙動の改善の為には高純度シリカゲルを充填剤の原料に使用することが最善の策と考えられているが、たとえ高純度シリカゲルを原料としてもエンドキャッピングが不十分であれば、同時に溶出不良を引き起こすため、この二つの因子を適切に制御することが不可欠となる。この様子を図13b)に示す。

興味深いオキシシン銅の測定例を次に示すので参考にされたい。オキシシン銅は、ゴルフ場農薬として公共水域等で監視されている有害物質の一つである。

その代表例が、環境省法¹⁵⁾及び上水試験法¹⁶⁾である。

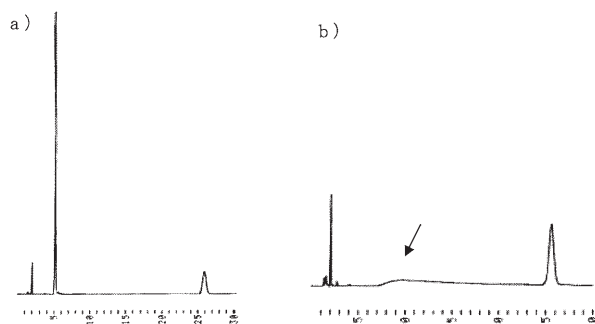


図13 配位化合物のクロマトグラム(試験—Ⅳ)

溶離条件

カラム: a) Mightysil RP-18GP(5 μ m) 4.6mm ϕ ×150mm
b) エンドキャッピング不良充填剤 4.6mm ϕ ×150mm
溶離液: アセトニトリル/20mM リン酸=5/95
流速: 1.0ml/min.
カラム温度: 40℃
検出: UV250nm, a) 0.16AUFS, b) 0.08AUFS
試料: ウランシ、オキシ銅、カフェイン(溶出順)

これらの試験方法では、オキシ銅を測定する溶離液のpHは、環境省法がpH3.3、上水試験法がpH3.5と規定されている他、その定量下限も5ngとなっている。

この条件下でオキシ銅を測定すると一般的なODSシリカゲル充填剤では、図14に示す様に、ピークを確認(3.3分付近)することはできるが、定量性のないクロマトグラムを得ることになる。

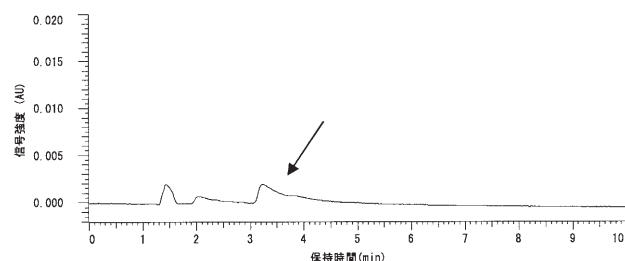


図14 上水試験法の溶離液(pH3.5)を使用した場合のオキシ銅(20ng)の溶離挙動

溶離条件

カラム: 市販ODSシリカゲルカラム(5 μ m) 4.6mm ϕ ×150mm
溶離液: 50mmol/l リン酸緩衝液(pH3.5)/AcCN=60/40
流速: 1ml/min.
カラム温度: 40℃
検出: UV230nm、
試料: オキシ銅 1ppm溶液、20 μ l

このクロマトグラムでは、オキシ銅を20ng注入したが、この状態では、定量下限である5ngの注入量ではピークを確認することは困難である。

これに対し、十分なエンドキャッピングを施した充填剤を使用すると、注入量が定量下限の5ngであってもシャープなピークを示し、上水試験法に対応が可能となる(図15)。

この様に、オキシ銅の微量分析では、高純度シリカゲルベースの充填剤を使用するのみならず、さらにエンド

キャッピングが充分行なわれていることも重要となり、Mightysil RP-18PAのように、溶出が保証されているカラムも選択肢の一つとなろう。¹⁷⁾

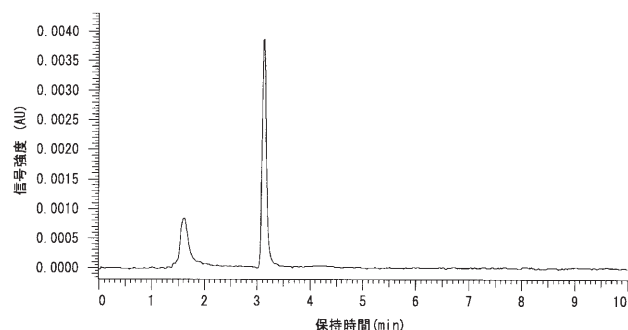


図15 Mightysil RP-18PAによるオキシ銅の溶離挙動

溶離条件

カラム: Mightysil RP-18PA(5 μ m) 4.6mm ϕ ×150mm
溶離液: 50mmol/l リン酸緩衝液(pH3.5)/AcCN=60/40
流速: 1ml/min.
カラム温度: 40℃
検出: UV230nm
試料: オキシ銅 1ppm溶液、注入量: 5 μ l

6. 親水性ODSシリカゲル充填剤

ODSシリカゲル充填剤は、水100%の溶離液を使用する場合、時間の経過と共に試料の保持が弱くなることが良く知られている。この現象は、「撥水現象」と呼ばれ充填剤表面のODS基がワックス化することで生じる現象であると考えられていた。最近、これは充填剤表面の細孔から水が抜けることにより生じる現象¹⁸⁾であると報告あり議論的となっている。

いずれにしても、試料の保持が弱くなることはHPLC分析上好ましいことではない。このため誕生したのが水100%溶離液を使用しても保持が変化しない親水性ODSシリカゲル充填剤Mightysil RP-18GP Aquaである。Mightysil RP-18GP Aquaの特徴を説明する前に、一般のODSシリカゲル充填剤カラムが引き起こす保持の低下について述べる。

ODSシリカゲル充填剤は、一般に有機溶媒と水、もしくは緩衝液の混合液を溶離液として使用される。しかし極性物質である核酸やアミノ酸等を分析する際は、有機溶媒の割合が増えるとその保持が弱くなることから、水リッチな系の溶離液で分析される。しかしながら、水分比率が高い溶離液では、図16に示すように短時間(連続送液15時間後)のうちに保持時間が低下し、再現性を失ってしまう。

これに対して、Mightysil RP-18GP Aquaは、図17に示すように、保持はほとんど変わらず良好な再現性を与えている。このように、Mightysil RP-18GP Aquaは、核酸等の極性化合物も誘導体化やイオンペアを考える必要もなく、直接分析することが可能であると共に、ODSシリカゲル充填剤としての一般的な特性も他のMightysil RP-18GPシリーズと同じであることから、より広範囲に応用が可能なカラムといえよう。

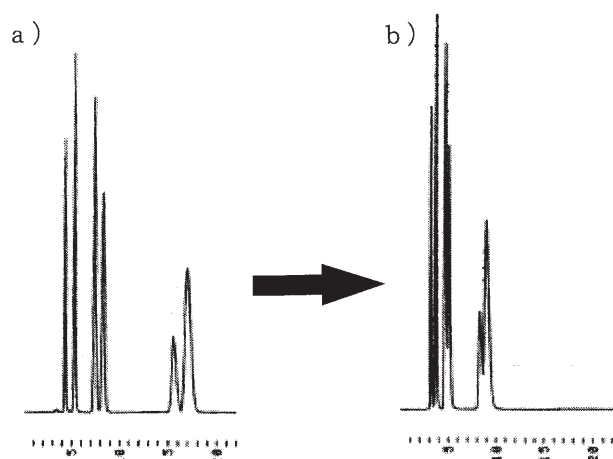


図16 水リッチな溶離液使用開始直後と15時間後のクロマトグラムの比較
溶離条件
カラム：Mightysil RP-18GP (4.6mmΦ×150mm)
a) 使用開始直後、b) a)を測定した15時間後のクロマトグラム
溶離液：5mM KH_2PO_4
流速：0.5 ml/min.
カラム温度：40℃
検出：UV254nm、
試料：CMP、UMP、GMP、IMP、AMP (溶出順)

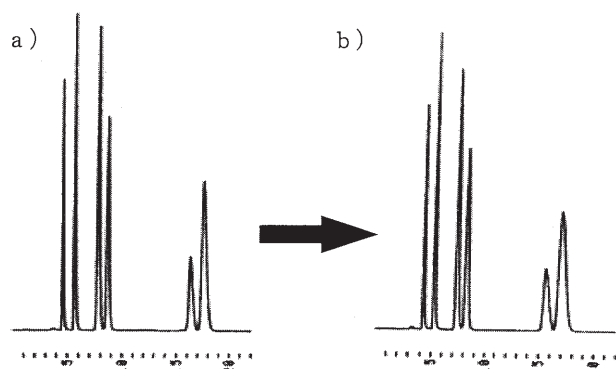


図17 水リッチな溶離液使用開始直後と15時間後のクロマトグラムの比較
溶離条件
カラム：Mightysil RP-18GP Aqua (5μm) (4.6mmΦ×150mm) a) 使用開始直後、b) a)を測定した15時間後のクロマトグラム
溶離液：5mM KH_2PO_4
流速：0.5 ml/min.
カラム温度：40℃
検出：UV254nm
試料：CMP、UMP、GMP、IMP、AMP (溶出順)

7. 最後に

以上、逆相充填剤であるODSシリカゲル充填剤の基本的な特徴を説明してきたが、逆相カラムの選択にあたり、この解説がお役に立てば幸いである。

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)
- 15) 上水試験方法 (2001年版) 日本水道協会
- 16) 環境省環境管理局水環境部土壌環境課「ゴルフ場で使用される農薬による水質汚濁の防止に関わる暫定指導指針」(2001)
- 17) 竹田津研、深井伸彦、澤田豊、酒井芳博, 第8回LCテクノプラザ講演要旨集, GO1 (2003)
- 18) 長江徳和、榎並敏行, *分析化学*, **49**, 887 (2000)