

液体クロマトグラフィーの基礎技術(2)

Fundamental Techniques of Liquid Chromatography

— 順相(吸着)クロマトグラフィーについて —

— *About the Normal Phase (Adsorption) Chromatography* —

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.

1. はじめに

これまで逆相クロマトグラフィー (Reversed Phase Chromatography:RPC) の基礎技術について説明してきたが、今回は順相クロマトグラフィー (Normal Phase Chromatography:NPC) の基礎技術について解説する。

1906年にM.S.Tswettが発表したクロマトグラフィーは、炭酸カルシウムを固定相に、ジエチルエーテルを移動相に使用して葉緑素を分離した実験であったが、これが液体クロマトグラフィーの始まりであり、NPCそのものである。

以来、約100年を経過し、液体クロマトグラフィーはHPLCとして目覚ましい発展を遂げているが、この発展を続けているHPLCの技術の中で、最初に登場したNPCは、現在RPCにその主役の座を奪われている。

吸着クロマトグラフィーとも呼ばれているNPCは、「シリカゲルやアルミナ等の極性の高い固定相を使用し、ヘキサン等の極性の低い移動相を使用する」最も古典的な液体クロマトグラフィーの手法である。

これを試料の溶出の面から見ると、「疎水性の高い試料の溶出は早く、親水性の化合物の溶出は遅れる」ことになり、RPCとは、全く逆の溶出挙動を示すこともよく知られている。

このような特徴を有しているNPCを使用することで良い結果が得られる場合を次に示す。

- 1) 試料の親水性が高くRPCでは保持されない場合。
- 2) 試料の疎水性が高くRPCでは保持が強すぎる場合。
- 3) RPCにおいて十分な分離が得られない場合。
- 4) 試料に位置異性体、立体異性体、ジアステレオマーが含まれている場合。

5) 試料が非極性溶媒に溶ける(極性溶媒に溶けない)場合。

また、最近水系溶離液を使用するNPCが、親水性相互作用クロマトグラフィー (Hydrophilic Interaction Chromatography:HILIC)^{1,2)}として注目を浴びているように、NPCの新たな展開が期待されている。その理由として、以下のことが言われている。

- 1) 逆相系充填剤ODSの限界が見えてきたこと。
- 2) 高純度シリカゲルが登場したこと。
- 3) LC/MSに最適な系であること。

NPCはクロマトグラフィーの原点でもあり、この技術を見直すことで、液体クロマトグラフィーをより深く理解できるものと考えている。

本稿では、NPCの中で最も多く使用されている固定相(または充填剤)であるシリカゲルを中心に話しを進めるが、使用する溶離液により、結果が大きく変わることがあるため、溶離液についても併せて説明する。

2. 順相クロマトグラフィー用充填剤の種類と特徴

NPCに使用される固定相として、シリカゲルが最も多く使用されているが、古来、NPCの固定相には、炭酸カルシウム、アルミナ、活性炭等が使用されていたことはよく知られている。

最近では化学修飾タイプのアミノプロピルシリカゲル充填剤(通称NH₂シリカゲル)、シアノプロピルシリカゲル充填剤(通称CNシリカゲル)、1,2-ジヒドロキシ-3-プロポキシプロピルシリカゲル(通称ジオールシリカゲル)等の充填剤も使用されている。

それぞれの充填剤の特徴は以下に示すとおりである。

- 1) NH₂シリカゲル充填剤は、吸着・分配モードで使用されることが多く、順相固定相として糖の分離に、弱イオン交換体としてヌクレオチドの分離に使用されている。
- 2) CNシリカゲル充填剤は、使用する溶離液により順相吸着と逆相分配のモードが使い分けできる。主にステロイド等の分離に使用されているが、アルキル鎖の異なる第四級アンモニウム塩の分離にも威力を発揮している。
- 3) ジオールシリカゲル充填剤もCNシリカゲル充填剤と同様、使用する溶離液により順相吸着と逆相分配のモードが使い分けできる。また、サイズ排除クロマトグラフィー用の固定相としても使用できることが特徴である。主に、ステロイド、ペプチドの分離に適している。

一方、シリカゲルを原料としたHPLC用充填剤は、高純度シリカゲル(純度99.99%以上)が使用されるようになったが、この高純度シリカゲルをNPCに使用すると、良好な結果を得ることがある。その一例を図1に示す。

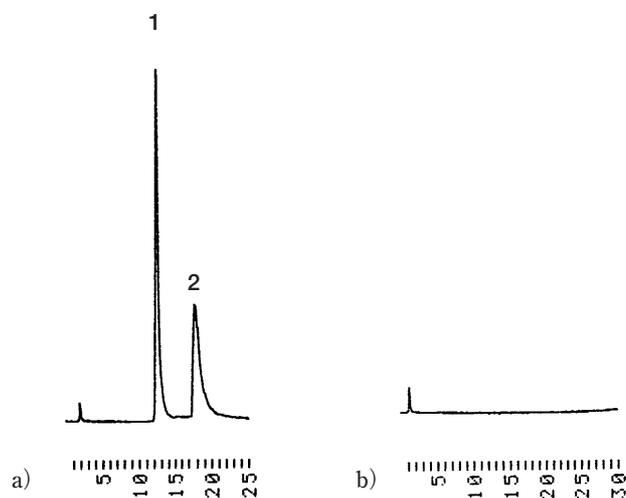


図1 高純度シリカゲル充填剤と旧来のシリカゲル充填剤の溶離特性の比較
溶離条件

カラム：a) Mightysil Si-60 (5 μ m) 4.6mm ϕ ×150mm
b) 旧タイプ Si-60(5 μ m) 4mm ϕ -125mm
溶離液：n-ヘキサン/酢酸エチル=37/63
流速：1mL/min.
カラム温度：40℃
検出：UV280nm, 0.04AUFS
試料：1:カテキン(1 μ g)、2:エピガロカテキン(4 μ g)

図1は、カテキン類(カテキン、エピガロカテキン)溶出のクロマトグラムを示したものであり、高純度シリカゲルを使用しているMightysil Si-60(5 μ m)では、良好なピーク形状で

溶出しているが、旧タイプのシリカゲル(金属不純物の含有量が多く酸性を示すシリカゲル)では、全く溶出しないことが示されている。この結果から、シリカゲルを高純度化すると、配位性が強いといわれている化合物であるカテキン類の溶出が改善されることが判明した。

この様に、高純度シリカゲル充填剤の用途が大きく広がる可能性が出てきた。

3. 順相クロマトグラフィーの長所と短所

NPCの長所と短所を表1に示したが、この表の例は、ごく一般的な特徴を記したものである。

表1 順相クロマトグラフィーの長所と短所

長 所	短 所
①非極性有機溶媒を使用すると、カラムの寿命が長い。	①イオン性化合物は、逆相クロマトグラフィーより分離にくい。
②大量分取用として使用できる。 ・充填剤が比較的安価。 ・多くの化合物が溶離液の有機溶媒に溶ける。	②溶離液の水分量等により溶出が変化しやすい(コントロールが難しい)。 ③グラジエントが困難。
③カラム圧力が低い。 ・粘性の低い溶媒が多く使用される。 ・水溶液で分解する試料には有用。	④順相のカラムの理論段数は、逆相カラムに比べ低い。

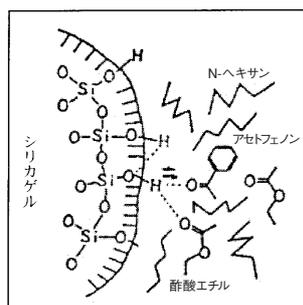
また、NPCは極性の高い固定相と極性の低い有機溶媒を移動相に使用することは既に説明したが、その溶離における特徴として、

- ① 溶出時間はシリカゲルの比表面積に依存する。
- ② 官能基(極性基)の数が分離に反映しやすい。
- ③ 分子構造の違いが分離に反映しやすい。

等があげられるが、これらの具体的な例は、第5項で説明する。

4. 順相(吸着)クロマトグラフィーの分離機構

NPCは、古典的な呼び方では、液-固(Liquid-Solid)クロマトグラフィーである。NPCの分離機構の例として、シリカゲルを固定相にし、アセトフェンを溶質とした場合の分離モデルを図2に示す。クロマトグラフィーの分離は、移動相中の溶質分子と固定相表面(比表面積、細孔径)との相互作用によるものであるが、このモデルの場合、溶質であるアセトフェンは移動相の酢酸エチルとシリカゲル表面への吸着を競合することで分離が展開される。



例 溶質：アセトフェノン
移動相溶媒：n-ヘキサン/
酢酸エチル
アセトフェノンと酢酸エチルが吸着を競合する。

図2 シリカゲル表面における分離モデル

5. 順相クロマトグラフィーの溶出挙動の特徴

5.1 溶出時間はシリカゲルの比表面積に依存する

シリカゲルを固定相に使用したNPCにおける試料の溶出時間は、シリカゲルの比表面積、言い換えるとシラノール基の数に依存する。

シリカゲル表面のシラノール基の構造については、本誌の液体クロマトグラフィーの基礎技術(1)³⁾で説明したように、普通3種類のシラノール基が存在している。

シリカゲルの比表面積は、シラノール基の数により決定されるが、比表面積が大きい場合は、シラノール基が多く存在することになり、試料の保持も強くなる。また、シリカゲルの比表面積は、シリカゲルの平均細孔径の大きさにも依存し、平均細孔径が小さくなると比表面積は大きくなる。

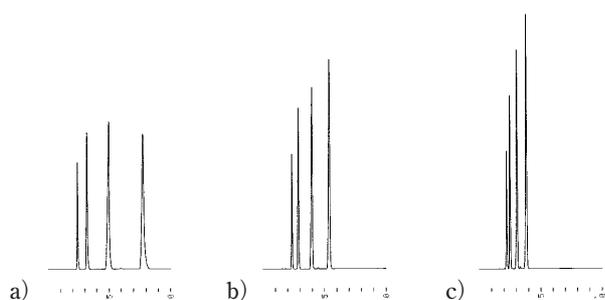


図3 シリカゲルの比表面積の違いによるフタル酸エステル類の溶出時間の変化

分離条件

カラム：4.6mmφ×150mm
充填剤：a) Si-60 (5μm)、b) Si-120 (5μm)、c) Si-200 (5μm)
溶離液：n-ヘプタン/イソプロピルアルコール=99/1
流速：1mL/min.
カラム温度：40℃
検出：UV254nm、0.64AUFS
試料：フタル酸ジ-2-エチルヘキシル、フタル酸ジ-n-ブチル、フタル酸ジエチル、フタル酸ジメチル (溶出順)

図3に比表面積の異なる3種類のシリカゲル (Si-60:平均細孔径6nm、比表面積:530m²/g、Si-120:平均細孔径12nm、比表面積:360m²/g、Si-200:平均細孔径20nm、比表面積:200m²/g) を充填したカラムを使用し、フタル酸

エステル類のクロマトグラムを測定した結果を示した。

この結果をみると、比表面積が小さくなるにしたがって、フタル酸エステル類の溶出が早くなっていることが示されている。すなわち、比表面積が大きいほどシリカゲル表面と試料の相互作用が強く、保持時間が長くなり、比表面積が小さくなるとシリカゲル表面と試料の相互作用が弱くなり、保持時間が短くなることが示されている。この様に、シリカゲルカラムを使用するNPCの保持時間は、シリカゲルの比表面積に大きく依存していることがわかる。

5.2 官能基数の分離への影響

官能基の数が分離に反映する例として、ステロイドホルモン (プロゲステロン、テストステロン、ヒドロコルチゾン) のクロマトグラムを図4a)に示すが、NPCの場合は、極性基が最も少ないプロゲステロンから溶出し、極性の高い (極性官能基の数が多い) ヒドロコルチゾンはシラノールと相互作用が強く最も遅れて溶出する。

NPCのもう一つの特徴として、既に説明したRPCと比較すると、溶出順序が逆になるが、その実例を図4b)に示す。RPCでは、極性の高いヒドロコルチゾンが最初に溶出し、テストステロン、プロゲステロンの順に溶出する。

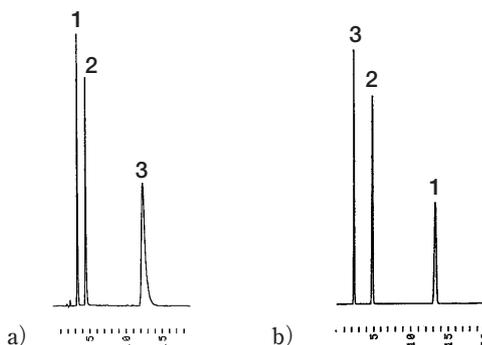
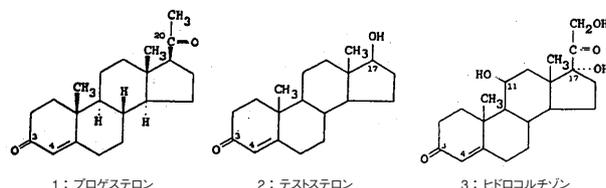


図4 ステロイドホルモンのNPCとRPC

分離条件

カラム：a) Mightysil Si-60 (5μm) 4.6mmφ×150mm
b) Mightysil RP-18GP (5μm) 4.6mmφ×150mm
溶離液：a) n-ヘキサン/ジエチルエーテル/2-プロパノール=5/4/1
b) アセトニトリル/水=50/50
流速：1mL/min.
カラム温度：40℃
検出：UV240nm、0.16AUFS
試料：1:プロゲステロン、2:テストステロン、3:ヒドロコルチゾン

5.3 分子構造の分離への影響

分子構造の違いが分離に影響する例として、シリカゲルカラムによるスチレンのポリマー(ダイマー、トリマー)のクロマトグラムを、ODSによるクロマトグラフとともに図5に示す。NPCの場合、図5a)のクロマトグラムに示されるように、1. モノマー、2. ダイマー、3. 環状トリマー、4. 鎖状トリマーの順に溶出されており、分子構造の違いが分離にはっきり現れている。

これに対して、RPCの場合には、図5b)のクロマトグラムに示されるように、1. モノマー、2. ダイマー、そして3. トリマー(環状と鎖状の混合ピーク)の順に溶出している。トリマーは環状と鎖状が接近して溶出しており、構造の違いによる分離はされていない。

この結果を比較すると、分析を考慮した場合は、逆相クロマトグラフィーのほうが分離の状況は良好であるが、分取を考慮した場合は、環状及び鎖状トリマーがはっきり分離されることから、NPCのほうが都合の良い分離を示していることになる。

この様に、クロマトグラフィーを行なう目的にもよるが、シリカゲルカラムを使用したNPCは、興味ある溶出特性を示すことを考慮すると応用範囲が広がるものと考えられる。

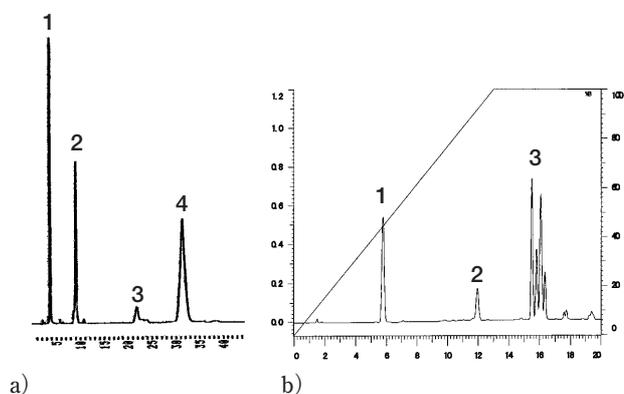


図5 吸着と逆相クロマトグラフィーによるスチレンポリマーの溶出状況の比較

a)	b)
溶離条件	溶離条件
カラム: Mightysil Si-60 (5 μ m)	カラム: Mightysil RP-18GP (5 μ m)
4.6mm ϕ -150mm	4.6mm ϕ -150mm
溶離液: n-ヘキサン	溶離液: A アセトニトリル/水=60/40
流速: 1mL/min.	B アセトニトリル=100
温度: 40 $^{\circ}$ C	グラジエント:
検出: 254nm	0 min. A 100% \rightarrow 13min. B100%
試料: スチレンペレット抽出液	温度: 40 $^{\circ}$ C
20倍濃縮品	流速: 1mL/min
1:モノマー	検出: 254nm
2:ダイマー	試料: スチレンペレット抽出液20倍濃縮品
3:トリマー(環状)	1:モノマー
4:トリマー(鎖状)	2:ダイマー
注入量: 20 μ L	3:トリマー(環状)、(鎖状)
	注入量: 20 μ L

6. 順相クロマトグラフィーにおける注意点

6.1 溶媒の選択

NPCの溶離液には、非極性溶媒が多用されていることは既に説明したが、特にこれら非極性溶媒を溶離液として使用して炭化水素類を分離する場合、クロロホルムを添加し溶出時間を調整することが良く行われる。この場合、使用するクロロホルムの純度(安定剤の種類)を考慮する必要がある。その理由は、クロロホルムには安定剤として、エタノールを添加した試薬(主に試薬特級グレード)及び不飽和炭化水素を添加した試薬(HPLCグレード)が存在しており、その影響が無視できないからである。

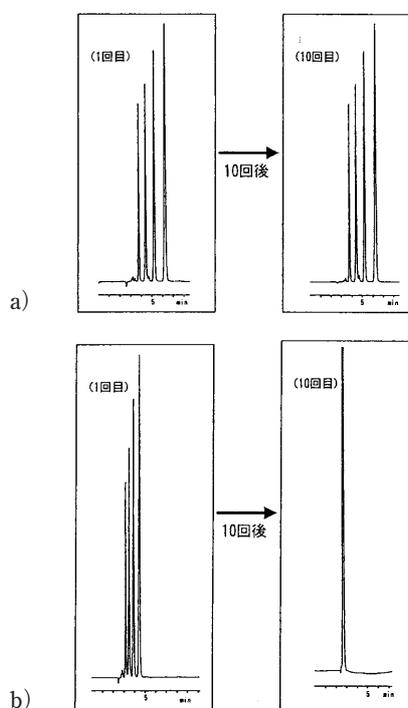


図6 溶媒中の安定剤の違いが順相クロマトグラフィーに与える影響⁴⁾

a)
溶離条件
カラム: LiChroCART 250 \times ϕ 4mm
LiChrospher Si60 (5 μ m)
溶離液: n-ヘプタン/HLC-SOL クロロホルム=4/1
流速: 1.0mL/min
圧力: 60kg/cm ²
温度: 室温
検出: UV254nm
試料: ビフェニル、テニフェル、クアテルフェニル、キンクエフェニル
b)
溶離条件
カラム: LiChroCART 250 \times ϕ 4mm
LiChrospher Si60 (5 μ m)
溶離液: n-ヘプタン/特級 クロロホルム=4/1
流速: 1.0mL/min
圧力: 60kg/cm ²
温度: 室温
検出: UV254nm
試料: ビフェニル、テニフェル、クアテルフェニル、キンクエフェニル

図6は、シリカゲルカラム (Si-60) で芳香族炭化水素類を分離する際、HPLCグレードのクロロホルムと特級グレードのクロロホルムを溶離液に使用した場合の影響を示したものである。図6a)は、HPLCグレードのクロロホルムを使用した例であるが、繰り返し分析を行っても、芳香族炭化水素類の溶出時間にほとんど変化は見られず、良好な分離を維持している。これに対して、特級グレードのクロロホルムを使用した場合、図6b)に示すように芳香族炭化水素類の溶出時間は、回を重ねるごとに速くなり、分析を10回繰り返すと、分離が不能となった。

これは、特級グレードのクロロホルムにエタノールが安定剤として使用されていることが原因である。この溶離液のクロロホルムの割合は20% (v/v) であり、かつ安定剤として添加されているエタノールの量は約0.5%であるが、NPCに極性溶媒が添加されると、この様な溶出異常が発生することがあるため、使用する溶媒の安定剤及び添加する極性溶媒には十分注意する必要がある。

6.2 逆相モードから順相モードへの切替

NPCは、非極性溶媒を使用することが多いが、通常の分析では、逆相モードで極性溶媒を使用していることが多いと考えられる。このように逆相モードで使用したHPLC装置をNPCモードに切替える場合、シリカゲルカラムを接続する前にポンプ、配管、インジェクター内を逆相モードで使用した極性溶媒と順相モードで使用する非極性溶媒ともに混和する溶媒 (2-プロパノール、クロロホルム、テトラヒドロフラン等) で十分洗浄した後、溶離液で同じ洗浄を行い、その後カラムを接続することが必要である。この操作を怠ると、6-1項で説明した事態を招くことになる。

6.3 シリカゲルカラムの再生

シリカゲルカラムは、長時間の使用や長期間のカラムの保存中に溶媒中の水分を吸着し、活性が弱くなり、保持時間が安定しなくなることがある。

水を吸着して性能が低下したシリカゲルカラムを再生するには、単に溶離液を流してカラムの回復を待つという方法もあるが、この方法は時間がかかり確実といえない。R.A. Bredewegらは、化学反応を利用しカラムに吸着された水を有効に取り除く方法⁵⁾を報告しているが、その方法は、2,2-ジメトキシプロパンをカラムに流し、吸着した水分を除去するものである。この方法では、理論段数が1,200段/カラム (初期理論段数:5,500/カラム) に低下したカラム

が初期理論段数5,500/カラムに再生すると共に、試料の保持時間も初期値に復活したことが報告されている。

7. 親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC)

親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC) の概念は、1990年にJ.Alpert¹⁾が提唱したが、極性の高い固定相に極性の高い溶媒を移動相に使用するNPCの一種である。しかしながら、このHILICモードによるクロマトグラフィーは、既に1990年以前から使用されていた方法であり、代表的なものとして、アミノプロピルシリカゲル (NH₂シリカゲル) カラムを使用した糖の分離が、水/アセトニトリルの溶離液で行なわれるのはよく知られた方法である。

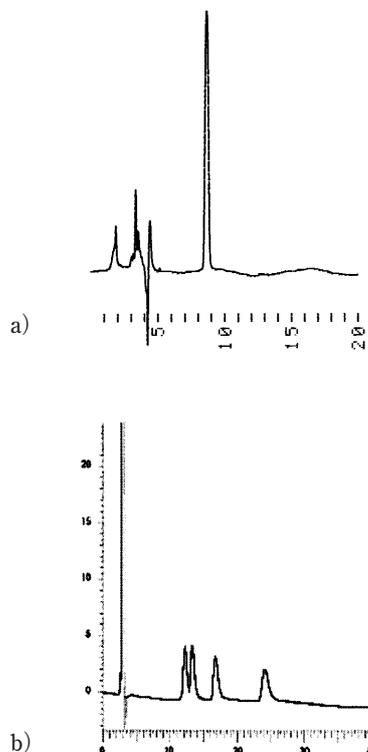


図7 Mightysil Si-60を使用したアミノ酸の分離

溶離条件:

a) カラム Mightysil Si-60 (5 μ m) 4.6mm ϕ ×150mm
 溶離液: アセトニトリル/水=75/25
 流速: 0.5mL/min.
 カラム温度: 40°C
 検出: UV 205nm, 0.02AUFS
 試料: タウリン

b) カラム Mightysil Si-60 (5 μ m) 2mm ϕ ×150mm
 溶離液: アセトニトリル/水=85/15
 流速: 0.2mL/min.
 温度: 室温 (26°C)
 検出: RI
 試料: ロイシン、イソロイシン、バリン、アラニン (溶出順)

図7にシリカゲルカラムSi-60を使用し、水／アセトニトリル溶離液でアミノ酸を分離した例を示す。図7a)は、タウリンをUV検出器で測定した例であるが、タウリンはUV域でのモル吸光係数が小さいため、試料量が少ない場合測定を低波長の205nmとし、検出感度を上げる必要があり、微量分析が困難である。その解決策として検出器の変更が考えられる。

図7b)は、ロイシン等をRI-検出器で測定した例であるが、これらの化合物はODSへの保持が弱いいため、逆相カラムでは溶離液を再現性の悪い水100%にしなければならないが、シリカゲルカラムを使用することで、アセトニトリル／水系の溶離液を使用することが可能になる。シリカゲルカラムに水を含む溶離液を流すことは、カラムの寿命を短くすることが知られているが、同じシリカゲルを充填したプレカラムを接続し、溶離液にシリカゲルを飽和させることでカラムの寿命を伸ばすことは可能になると考える。

8. 最後に

以上、シリカゲルカラムを使用したNPCについて説明をしてきたが、現在はシリカゲル自身の純度が向上してきたことから、従来困難であった化合物の溶出が可能となり、新たな展開が期待できる。また、最近、NPCにも水系の溶離液を使用し、この溶離液システムをLC/MSに展開する応用が盛んにおこなわれており、今後もその傾向には拍車が掛かるものと考えている。

参考文献

- 1) A.J.Alpert J. Chromatogr., **499**, 177 (1990)
- 2) 中村洋監修 “液クロの巻” p54、筑波出版会 (2003)
- 3) 酒井芳博 THE CHEMICAL TIMES, **205**, 13 (2007)
- 4) 細田誠、酒井芳博 Chromatography, **16**, 45 (1995)
- 5) R.A.Bredewe, L.D.Rothman, C.D.Pfeiffer Anal. Chem., **51**, 2061 (1979)

