Original

水100%移動相を用いたHPLC逆相固定相の保持挙動(2)

榎並敏行、長江徳和

Retention Behavior of Reversed-Phase for HPLC Using 100% Aqueous Mobile Phase(2)

Toshiyuki Enami and Norikazu Nagae

Nomura Chemical Co., Ltd., 851 Anada-cho, Seto, Aichi 489-0003, Japan Received for review August 30, 2000. Accepted October 20, 2000.

Abstract

The retention behavior of the reversed-phase was evaluated under 100% aqueous conditions. It is commonly said that reversed-phases, such as ODS (C18) and C8, show a decrease in the retention time under 100% aqueous conditions. It was found that 100% aqueous mobile phase was pulled out of the pore of the packing materials, so that the stationary phase in contact with the mobile phase decreased and the retention time decreased. Some parameters, such as the pore size, length of the alkyl group of the stationary phase, the amount of residual silanol groups of the stationary phase and back pressure of the column, were shown to influence of the decrease in retention.

Keywords: HPLC, reversed-phase, 100% aqueous mobile phase, retention behavior

1 緒言

現在HPLCにおいて化学結合型逆相クロマトグラフィー充 填剤としては炭素数1から18程度のアルキル基結合型が広く 用いられ、その中でも炭素数18であるODS充填剤が広範囲の 化合物に適応でき、また他のアルキル基結合型より耐久性に 優れている等の理由から最も一般的に使用されている。しか しながらODS充填剤は親水性化合物の分析を対象とした際、 水100%移動相、塩・酸などを含む緩衝液移動相(以下水 100%移動相の表現には緩衝液も含む)もしくはこれら100% 水系溶媒に有機溶媒を数パーセント混合した移動相を使用し た場合、試料の保持時間が一定せず、時間の経過とともに保 持が減少し、実質的には使用不可能であると考えられている。 これらの現象はステアリル基(C18)の寝込み現象により引き 起こされ、この寝込みにより固定相の選択性までも変化する と報告[1]されている。この問題点を解決するために、極 性の高いアミド基[2]~[6]やカルバメート基[7]を含 むアルキル基をシリカ担体に結合した固定相や、ステアリル

〒489-0003 愛知県瀬戸市穴田町851 野村化学株式会社 *Corresponding author: Tel, +81-561-48-1853, fax, +81-56-48-1434; - 33 -

基結合後シリカ担体に残る残存シラノール基を減少させるた めに行うエンドキャッピング処理に極性基を結合した固定相 など固定相内に極性基を含んだもの、もしくはアルキル基の 結合密度を下げることにより固定相の疎水性を低くしたもの [8]が充填剤として用いられている。しかしながら、極性 基を含む固定相はこれら極性基の影響により分離に対する選 択性が変化したり、固定相の疎水性がこれらの極性基により 減少するため、保持が減少したり、耐久性が低下するなど、 今までの逆相固定相とは異なる分離性能を示す。従って、分 離が改善される場合もあるが、逆に保持が小さくなることな どにより、分離できなくなる等の問題点も有している。また 別の解決方法として、従来用いられていた炭素数1から22ま でのアルキル基以外の長鎖アルキル基[9]~[11]を用いる ことにより、水100%移動相を使用可能にするこれまでとは 異なるアプローチから開発された固定相も提唱されている。

本研究[12]では立体的に寝込みが生じるとは考えられな い炭素数1のTMS充填剤についても条件次第では同様な保

持の減少が生じることを確認し、このことから水100%移動 相を用いた場合、現在まで考えられてきたアルキル基の寝込 みだけでは説明することができない通常のアルキル基結合型 逆相固定相に起こる保持の減少について、その過程を明らか にし、水100%移動相が使用不可能であると考えられていた 逆相固定相でも、ある一定の条件を満たした固定相を用いる または使用条件を変更することにより、水100%移動相を用 いても十分な保持の再現性が得られることを見い出したので 報告する。

2 実験

2・1 装置

HPLCシステムは日本分光製PU-980送液ポンプ、UV-970検 出器及び830-RI検出器、レオダイン製7125インジェクター、 システムインスツルメンツ製480データ処理装置を用いた。 カラム恒温槽にはウォーターバスを用い、ヒーターによりオ ムロン製E5C3温度コントローラーで温度制御した。物性値 については比表面積、細孔容積、平均細孔径はベックマンコ ールター製SA3100を、また炭素含有率はヤナコ製CNコーダ ーを用いて測定した。

2・2 試薬

水は水道水を2回蒸留し、ODSカラムに一度通液したもの を用いた。リン酸ナトリウム、チミン、亜硝酸ナトリウム、 n-プロパノールは和光純薬製を用いた。充填剤は担体として 野村化学製Develosil 250-5、220-5、170-5、140-5、100-5、 80-5、60-5、30-5の粒子径 5 µmのシリカゲルを用い、アルキ ル基の結合は常法により12時間トルエン還流にて合成を行っ た。試薬はトリアコンチルジメチルクロロシラン(C30)、オ クタデシルジメチルクロロシラン(ODS)、オクチルジメチ ルクロロシラン(C8)およびトリメチルクロロシラン(TMS) を用いた。それぞれの試薬は実際に結合する量に比べ大過剰 量を加え反応させているため、モノメリック状態では最大に 近い結合密度となっている。さらに、全ての充填剤について 常法によりトリメチルシリル化によるエンドキャプ処理を行 った。各充填剤の物性値をTable 1に示す。以下充填剤の表 示はTable 1の固定相名で示す。また、市販のカラムとして 野村化学製Develosil ODS-HG-5, ODS-T-5, ODS-A-5を水素 結合性の評価に用い、Develosil ODS-UG-15/30を使用し、カ ラム圧の保持時間への影響を調べた。

3 結果と考察

3・1 水100%移動相を用いた場合の保持の減少

Fig. 1には平均細孔径10.4 nmのODS(10)固定相の40 でのチミンと亜硝酸ナトリウムの保持の変化を示す。70時間連続通液の場合1時間後から19時間後までにチミンの保持時間

は約16%減少している。また72時間以降の通液停止後は更に 58%もチミンの保持時間は減少した。一方カラムを素通りし 固定相に全く保持していないと考えられる亜硝酸ナトリウム についても同様に溶出時間の変化を示した。固定相に保持し ない試料は充填剤粒子間の間隙および充填剤内の細孔容積の 和に相当する溶出時間を示す。数十パーセントの有機溶媒を 含む移動相ではウラシルが、また水90%以上の移動相では亜 硝酸ナトリウムが固定相と全く相互作用しない保持値0の試 料として用いられることが多い。Fig. 1の亜硝酸ナトリウム の初期の溶出時間は1.61分であり、ポンプ停止後は溶出時間 が1.10分まで減少している。また、アセトニトリル/水 (70:30)移動相でODS(10)カラムを平衡にした後、Fig.1と 同じ条件で1時間通液後、送液ポンプを停止し、圧力表示が0 MPaになると同時にカラムを外し密栓をし、カラム重量を測 定した。カラムを外し密栓をするまでには約7秒の時間がか かった。重量を測定したカラムから密栓を外し大気圧にて開 放した。カラムの乾燥による重量の減少を防ぐため、カラム の両端には移動相を満たしたステンレスチューブを接続し、 40 の恒温槽内にて10時間放置した後、再度カラムの重量を 測定した。カラム重量はそれぞれ62.3gと61.8gとなり0.5g の重量差であり、この重量差は再現性のあるものであった。 この時、カラム両端のステンレスチューブから溶媒約0.5 ml の溶出が確認された。つまり、1.61分から1.10分までの亜硝 酸ナトリウムの溶出時間の減少分は、カラム内の移動相が抜 け出たため生じたと推測され、またチミンの溶出時間の減少 はカラム内の移動相の減少に伴う分離場の喪失であると考え られる。

移動相と試料をそれぞれ水とn-プロパノールを用いた単純 な系においても、10 mMリン酸緩衝液およびチミンを用い たFigure 1の実験と同様な結果が得られた。チミンはイオン 性試料ではあるが、シリカ系逆相充填剤の残存シラノール基 の影響や移動相中の10 mM程度の塩濃度に対してのピーク 形状への影響がほとんどない事を確認している。また、移動 相の塩濃度の影響については前報[13]で報告しているよう に、保持の変化に対し大きく影響をしており、水のみを移動 相として用いる場合よりも、10 mMリン酸緩衝液を移動相 として用いた場合の方が、送液開始直後の保持の安定性が高 いため、本研究では移動相に10 mMリン酸緩衝液および試 料にチミンを用いて実験を行った。

3・2 細孔径の影響

3 · 2 · 1 ODSとTMS固定相について

Figure 2とFigure 3には細孔径の異なるODSとTMSの保持 の変化を比較した。実験条件は、アセトニトリル(70:30) 移動相でカラムを平衡化した後、Figure 1と同じ条件で移動 相の送液を行った。送液時間と送液停止時間はそれぞれのグ

Stationary	Specific	Pore volume	Pore diameter	Carbon content	Ligand density
phase name	surface area	(mL/g)	(nm)	(%)	$(\mu \text{ molm}^{-2})$
	(m²/g)				
TMS (13)	223	0.93	12.9	4.7	4.8
TMS (9)	302	0.91	9.3	5.0	4.3
TMS (6)	331	0.65	6.5	6.3	4.1
TMS (3)	367	0.31	3.5	8.8	4.1
C8 (22)	128	0.90	22.4	5.6	3.1
C8(18)	142	0.88	19.0	7.2	3.3
C8(15)	169	0.84	15.1	8.4	3.1
C8(11)	199	0.74	11.3	10.6	3.3
ODS (22)	113	0.80	21.9	11.4	3.4
ODS (18)	123	0.73	17.9	12.8	3.2
ODS (14)	139	0.65	13.9	13.9	3.0
ODS (10)	163	0.58	10.4	18.4	3.2
C30(10)	176	0.60	10.4	18.0	1.8
C30(7)	219	0.53	7.2	19.7	1.2
C30(6)	210	0.43	6.2	21.2	1.0

Table 1. Properties of stationary phases

Packing materials bonded with alkyl groups were measured.



Figure 1. Retention behavior of ODS (10) under 100% aqueous conditions

Conditions: stationary phase, ODS (10); column size, 150 x 4.6 mm i.d.; mobile phase, 10 mM sodium phoshate (pH 7.0); flow rate, 1.0ml/min; column temperature, 40°C; wave length of UV detection, 254nm; sample, thymine () and sodium nitrite ()

ラフに示すとおりである。Figure 2より10.4 nmの細孔径の ODS(10)は保持時間が減少しているが、21.9 nmの細孔径の ODS(22)は一定の保持時間を示した。ODS(10)では大きく 保持時間が減少している通液停止後もODS(22)はほとんど 保持時間は変化していない。この時、ポンプ停止直後とポン プ停止放置後のカラムの重量もほとんど変化していない事を 確認した。水100%移動相を用いた場合は、このODS(22)は 細孔径が大きいことにより移動相が時間の経過とともにカラ ムから抜け出ることがなく、亜硝酸ナトリウムもチミンも溶 出時間および保持時間が一定であると考えられる。Figure 3 はTMSの比較例であり、連続通液停止後の保持時間の変化 をプロットしている。各点は、1時間通液後15分間通液停止 し、その後再度通液開始し30分通液後の保持時間を測定した。 次に1.75時間通液停止し合計2時間通液停止後の保持時間を 同様に測定し、最後に合計20時間後を測定した。TMS(13) は保持時間が一定であるが、TMS(6)は大きく減少してい る。またTMS(3)については、チミンの保持時間が水100% 移動相に切り換え直後から、1.25分であり、Figure 3には示 していないが亜硝酸ナトリウムの溶出時間が初期から1.20分 であることを考慮すると、3nmの小さな細孔径では水100% 移動相切り換え直後から、試料と固定相の相互作用は十分に 起こっていないと結論づけられる。この3nmの細孔径の TMS(3)でもアセトニトリル/水(70:30)のような十分に



Figure 2. Retention behavior of ODS (10) and ODS (22) under 100% aqueous conditions

Conditions: stationary phase, ODS (10) and ODS (22); other conditions as in Fig. 1. : ODS (10) and thymine; :ODS (10) and sodium; : ODS (22) and thymine; : ODS (22) and sodium nitrite

有機溶媒濃度の高い移動相では、TMS(6)よりも高い保持 を示した。

これらの結果から、水100%移動相を用いた場合の保持時 間の再現性は、細孔径により大きな差が生じており、固定相 が異なっていても、細孔径が大きい場合には保持が減少しな い事が明らかになった。ODS(10)とODS(22)およびTMS (13)とTMS(6)は粒子径は同じであり、細孔径が異なるの みである。細孔径のより大きなODS(22)やTMS(13)では保 持の変化がなく、移動相がカラム外へ抜け出さないのに対し、 細孔径の小さいODS(10)やTMS(6)では、移動相のカラム 外への抜け出しによる保持の減少が起こる。このことから、 移動相は充填剤細孔径の50倍以上大きな充填剤粒子間隙から 抜け出ているのではなく、充填剤細孔内から抜け出している と考えられる。つまり、細孔内の移動相が抜け出してしまう ことで分離場が減少してしまい、亜硝酸ナトリウムの溶出時 間の減少とチミンの保持の減少が生じると考えられる。これ らのことから、細孔径の大きな充填剤を用いれば、水100% 移動相でも保持時間が一定の分析が可能となることが明らか となった。また、細孔径のさほど大きくないTMS(13)で も水100%移動相で保持の変化がなく高い再現性が得られて いることから、固定相の種類、例えばアルキル鎖長により、 水100%移動相が抜け出る細孔径の大きさは異なることが示 された。

3・2・2 アルキル鎖長と細孔径の影響



Figure 3. Retention behavior of TMS (13), TMS (6) and TMS (3) under 100% aqueous conditions

Conditions: stationary phase, TMS (13), TMS (6) and TMS (3); sample, thymine; other conditions as in Figure 1. :TMS (13); :TMS (6); :TMS (3)

アルキル鎖長と細孔径が及ぼす水100%移動相を用いた際 の保持の減少への影響は、異なる細孔径を有する基材に異な る鎖長のアルキル基を結合した充填剤を用いて実験を行っ た。それぞれの充填剤はTable 1に示しており、カラムサイ ズ4.6×150 mmに充填し使用した。Figure 4には細孔径と保 持時間が変化する前後の相対保持時間との関係を示す。アセ トニトリル/水(70:30)移動相にてカラムを平衡にした後 Figure1に示す移動相を40 にて1時間通液した後試料とし てチミンを用いて得た保持時間を基準の保持時間とし、その 後ポンプを停止し、10時間放置した後再度測定したチミンの 保持時間から相対保持時間を求めた。またFigure 5には90% 以上の相対保持時間を有する充填剤の細孔径を示す。アルキ ル鎖長により違いはあるが、どの充填剤についてもある細孔 径以上であれば90%以上の相対保持時間を維持している。 90%以上の相対保持時間を示す細孔径は、炭素数8のアルキ ル基が極大値を示し、炭素数8から18および30に増加するに 従い小さくなった。細孔径15 nm程度のC8とODSを比較する と保持の減少度合いは大きく異なりC8が80%に対しODSは 40%に留まり、大きな差が存在する。C30はC8からODSへの 変化の延長線上にあり、より小さな細孔径で90%以上の相対 保持時間を示しており、C30だけが特異的ではなく炭素数8 以上のアルキル鎖長と90%以上の相対保持時間を示す細孔径 には相関関係が存在すると考えられる。TMSは8 nm以上の 細孔径で90%以上の相対保持時間を示し、C30と同様な結果 が得られた。TMSは炭素数1でシリカ表面上のシロキサン



Figure 4. Effect of the pore diameter of packing materials on the relative retention time

Conditions: stationary phase, (A) C30, (B) ODS, (C) C8 and (D) TMS; sample, thymine; other conditions as in Figure 1.

結合等の相互作用がより強く発現するため、より小さい細孔 径でも高い相対保持時間を示したと推測される。

ODSの結合密度の低い固定相は結合密度の高い固定相に比 べ、水100%移動相条件で保持の減少が少なく、保持の再現 性が高くなることが報告[8]されているが、これはODSの 結合密度を下げた分エンドキャッピングとしてのTMSの結 合密度が上がっており、ODSの結合密度の低い固定相は、 Figure 4のODSとTMSの曲線の間に位置すると考えられる。 つまり、ODSの結合密度を下げTMSの結合密度が上がるほ ど相対保持時間と細孔径の関係は、Figure 4のODSから TMSの曲線に移動すると考えられる。

3・3 残存シラノール基の影響

固定相表面の極性基の影響として残存シラノール基量が異 なる市販カラム3種類について水100%移動相を使用した際 の保持の変化を比較した。一般に水素結合性の値は残存シラ ノール基の量を反映していると考えられている。Table 2に それぞれの充填剤に対する水素結合性と水100%移動相を用 いた保持時間の減少後の相対保持時間を示す。水素結合性は メタノール/水(75:25)移動相を用い、40 のカラム温度 でのフェノールに対するカフェインの分離係数を用いた。相 対保持時間はFigure 4中の値と同じ方法で求めた。水素結合 性の値よりDevelosil ODS-HG-5が最も残存シラノール基が少 なく、Develosil ODS-A-5は残存シラノール基が多く残っ ている。水素結合性が高く、残存シラノール基が多く残っ ているDevelosil ODS-A-5は高い相対保持時間を示した。逆 に水素結合性の最も低いDevelosil ODS-HG-5は低い相対保持 時間を示した。これらの結果より、水100%移動相が細孔内



Figure 5. Area with high reproducibility for the retention Conditions are the same in Figure 4. The value by each plot was the relative retention time.



Figure 6. Effect of back pressure of the column on the retention time conditions are the same as in Figure 1.

より抜け出る現象は固定相表面の極性すなわち残存シラノー ル基の影響も強く受けており、残存シラノール基が少ないほ ど細孔内より水100%移動相が抜け出しやすいといえる。つ まり、水100%移動相を使用する際には、残存シラノール基 の多い充填剤を選択すれば、保持時間の変化の少ない分析が 可能である。しかし、残存シラノール量が多い充填剤は中性 からアルカリ性における耐久性が著しく低くなる欠点を有し ている。緒言で述べたようにアルキルアミド基のように、固 定相内に極性基を含む場合も水100%移動相で高い再現性が 得られるが、シリカ表面のシラノール基による極性部によっ ても同様に高い再現性が得られることが示された。

3・4 カラム圧の影響

今まで実験に用いたカラムは粒子径5μmの充填剤を4.6× 150 mmカラムに充填したものを用いており、40 で1 ml/minの流速で通液した場合6 MPa前後の圧力を示してい る。Figure 1に示されているように通液停止後に大きな保持 の減少が観察されており、充填剤にかかる圧力により、細孔

Stationary phase	Hydrogen bonding capacity	Relative retention time			
ODS-HG-5	0.38	39.9%			
ODS-T-5	0.53	58.2%			
ODS-A-5	1.42	97.5%			

Table 2. Effect of the amount of residual silanol groups

内から抜け出る移動相量が異なると考えられる。Figure 6に はバックプレッシャーと保持時間の関係を示す。今回は粒子 径20µmのDevelosil ODS-UG-15/30を4.6 x 150 mmカラムに 充填して用いた。条件はFigure 1と同じであり、通液開始1 時間後のチミンの保持時間を測定した。このカラムは粒子径 が大きいため、1 ml/minで通液してもカラム圧は0.4 MPaで あった。バックプレッシャーはカラムのOUT側に内径0.13 mmのチューブを接続し、チューブの長さを26 cmから5 cm 程度まで変えることにより調圧した。Figure 6に示されてい るようにバックプレッシャー0 MPaの時は4分の保持しか示 さないが、3.6 MPaのバックプレッシャーを加えた時には7.8 分の保持時間を示した。また、0.7MPa前後で保持時間の増 加傾向が大きく変化した。これらの結果から、3.6 MPaのバ ックプレッシャーを加えている場合は、カラムIN側に4.0 MPa、カラムOUT側に3.6 MPaの圧力がかかっている状態で あり、このように圧力の存在している状態では細孔内から移 動相は抜け出ていないと考えられ、長い保持時間を示すが、 バックプレッシャーを加えていない場合はカラムIN側の圧力 が0.4 MPaであり、カラム全体では0.4 MPa以下の圧力しかっ かっておらず、このように低い圧力においては、水100%移 動相に切り換え直後から細孔内から移動相が抜け出ているこ とになる。0.7 MPa前後に保持の減少度合が変化することか ら、0.7 MPaの圧力以下で細孔より水100%移動相が抜け出し やすくなっていると推測される。また、Figure 4の細孔径に より保持の減少度合が異なることを考慮すると、小さい細孔 ほど細孔内に水100%移動相を留めておくために高い圧力が 必要であると推察される。この実験において、亜硝酸ナトリ ウムの溶出時間もチミンの保持時間と相関していた。また、 送液停止し、大気圧に1時間以上放置した後更に保持時間は 減少した。

バックプレッシャーを加えない粒子径5 μmの充填剤を用 いた場合にも、カラム全体として6 MPaの圧力がかかってい るが、カラムのOUT側から長さ10%の位置では0.6 MPa以下 の圧力しかかかっておらず、細孔内から移動相が抜け出し始 めていると推察される。

3・5 逆相固定相の水100%移動相使用に関する検討

逆相固定相はメチル基からオクチル基、オクタデシル基と

疎水性の高い結合相を有していることを特徴としている。こ れら固定相の疎水性表面上には、水のような極性の高い溶媒 は表面張力などの物性が関与し、反発しあい接触面積が小さ くなるように作用する。したがって、固定相内に極性基を含 み固定相そのものの疎水性が低くなったもの、またはアルキ ル基の結合密度を下げ固定相の疎水性を下げたものはこの反 発作用が低下し、水になじみやすくなったと考えられる。ま た、充填剤の細孔径も逆相固定相表面上と水とのなじみやす さ、または逆の反発作用に関与し、細孔径が大きいほど水と のなじみやすさが増大する。さらに固定相の種類により水と のなじみやすさは変化し、10nm前後の細孔径の場合、C8が 最も水となじみにくく、ODS、C30とアルキル鎖長が長くな るほど水となじみやすくなる。また、TMSは炭素数1のメチ ル基で鎖長が短くシリカ表面の影響が強くなるため水となじ みやすくなると考えられる。

従来水100%移動相では再現性の問題から使用できないと 考えられていたC8、ODS固定相でも細孔径の大きな充填剤 を用いれば再現性の高い分離が可能である。しかしこの場合 比表面積も下がるため、大きな保持は期待できない。しかし ながら、C30固定相を用いれば、C8、ODS固定相に比べより 小さな細孔径すなわち大きな比表面積にて水100%移動相が 使用可能なため十分な保持が期待される。また、細孔径以外 のパラメーターとしては残存シラノール基とカラムへのバッ クプレッシャーが水100%移動相の細孔内からの抜け出しに 影響していることが明らかとなり、これらのパラメーターを 考慮すれば水100%移動相を使用した分析の再現性が向上で きると考えられる。

4. 文献

- [1] Wolcott, G. R.; Dolan, W. J. LC•GC, 1999, 17, 316-321.
- [2] Buszewski, B.; Schmid, J.; Albert, K.; Bayer, E. J. Chromatogr. 1991, 552, 451-427.
- [3] Kasturi, P.; Buszewski, B.; Jaroniec, M.; Gilpin, K. R. J. Chromatogr. 1994, A659, 261-265.
- [4] Czajkowaka, T.; Hrabovsky, I.; Buszewski, B.; Gilpin, K. R.; Jaronieic, M. J. Chromatogr. 1995, A691, 217-224.
- [5] Ascah, L. T.; Kallury, R. M.; Szafranski, A. C.; Corman, D.; Liu, F. J. Liq. Chrom. & Rel. Technol. 1996, 19 (17&18),

3049-3073.

- [6] Czajkowaka, T.; Jaronieic, *M. J. Chromatogr*.**1997**, *A762*, 147-158.
- [7] O'Gara, E. J.; Alden, A. B.; Walter, H. T.; Petersen, S. J.; Niederlander, L. C.; Neue, D. U. Anal. Chem. 1995, 67, 3809-3813.
- [8] Enami, T.; Nagae, N. Chromatography. 1998, 19, 380-381.
- [9] Nagae, N.; Takeuchi, T.; Ishii, D. Chromatography. 1993, 14, 19R-24R.
- [10] 野村化学: 日本公開特許公報、特開2000-193648号
- [11] Moriwaki, H. Anal. Sci. 2000, 16, 105-106.
- [12] 野村化学: 日本特許出願中、特願2000-193336号
- [13] Nagae, N.; Enami, T. Bunseki Kagaku. in press.