# Focusing Review

# 逆相液体クロマトグラフィーにおける溶質保持に及ぼす 移動相溶媒による疎水性充填剤の溶媒和の効果

# 渋川雅美\*

# Effect of solvation of hydrophobic packing materials by mobile phase solvents on solute retention in reversed–phase liquid chromatography

Masami Shibukawa\*

Graduate School of Science and Engineering, Saitama University, 255 Shimo–Okubo, Sakura–ku, Saitama 338–8570, Japan Received for review November 5, 2008. Accepted December 10, 2008.

#### Abstract

Many studies have been conducted that examine retention mechanism in reversed-phase liquid chromatography (RPLC), and two main models, solvophobic adsorption on the surface of alkyl bonded phase and partition into the bonded alkyl chains, have evolved so far. On the other hand, two other models that involve analyte distribution between the mobile phase and the eluent solvent layer formed by solvation of the alkyl bonded phase have recently been proposed. One of them postulates the exclusive adsorption of organic modifiers on the hydrophobic surface, while the other claims that water is also a component of the solvent layer. This report provides a brief review of the strategies of these approaches for elucidating the physicochemical structure of the liquid layer formed by solvation of RPLC packing materials and the effect of the liquid layer on solute retention in RPLC.

Keywords: retention mechanism; reversed-phase liquid chromatography; solvated liquid layer

### 1. はじめに

水溶液試料中の化学物質の分離や濃縮の多くは、いわゆる 逆相系を用いて行われることが多い。液体クロマトグラ フィーは言うに及ばず、試料の前処理に多用される固相抽出 においても、その多くが疎水性カラム充填剤あるいは固相抽 出剤を用いて行われている。このうち最も多用されるのはア ルキル基をシリカゲル粒子表面に化学修飾したもので、これ をカラム充填剤とした逆相液体クロマトグラフィー

埼玉大学大学院理工学研究科物質科学部門 分析化学研究室 〒338-8570 埼玉県さいたま市桜区下大久保255 電話:048-858-3520 FAX:048-858-3520 (RPLC)における保持機構はこれまで多くの研究者の興味 を惹いてきた。その初期においては、非極性の化合物あるい は化合物中の非極性官能基が水やメタノールなどの高極性で 高い構造性を有する溶媒から逃れて、アルキル基が集積する 充填剤表面に吸着すると考える、いわゆる疎溶媒和相互作用 (solvophobic interaction)に基づく保持機構が Horvath らに よって提案された[1,2]。疎溶媒和相互作用はアルキル鎖お よび溶質の非極性基と極性溶媒との間の斥力に起因し、極性 溶媒がその溶媒と接する溶質の非極性部分との表面積をでき るだけ小さくしようとすることにより生じるとされる。この 理論によれば,移動相中での溶質分子サイズの空孔形成とこ の空孔への溶質分子の移動における自由エネルギー変化が溶 質保持の駆動力になる[1]。疎溶媒和理論に基づいて,例え ば類縁化合物については,保持係数の対数 ln k と分子内の 非極性部分の表面積との間に直線関係が成り立ち,その傾き は移動相溶媒の表面張力に比例することなどが説明されてい る[1]。

疎溶媒和理論に基づく RPLC の保持機構は、アルキル結合 層表面への溶質の吸着であるのに対して、アルキル結合層内 部への溶質分子の分配を考えるモデルが提起されている[3-10]。分配モデルの中には正則溶液論に基づいて保持機構を 論じるものもあり[8-10],溶質の保持係数と移動相溶媒組成 の関係をうまく説明できることなどが示されているが、アル キル結合層をバルクの溶媒とみなすことは難しいことが明ら かになっている。したがって当然のことながら、アルキル結 合層への溶質分子の取り込みを仮定する分配モデルではアル キル結合層の構造が溶質保持に与える影響を明らかにするこ とが重要になる。Mirtire と Boehm の論文はこの点に着目し た最初の報告であり、移動相溶媒組成に依存してアルキル鎖 の配列が変化することを示した[11]。アルキル結合層の構造 が移動相溶媒の種類や組成によってどのように変化するかは 多くの研究者の興味を惹いており、最近でも NMR [12]、ラ マン分光法[13],赤外分光法[14],分子動力学計算[15,16]な どによって研究が進められている。

分配理論は、1980年代後半以降 Dill や Dorsey らによって 展開され、RPLC における溶質保持に関するいくつかの現象 がこれによって説明された。たとえば60/40 (v/v) アセトニ トリル/水を移動相とした系で、ベンゼンの保持係数の温度 依存性を以下に示す van't Hoff プロットで表すと、結合層の 密度が2.84  $\mu$ mol m<sup>-2</sup>以下の C<sub>18</sub>シリカ充填剤ではよい直線関 係が得られるが、3.06  $\mu$ mol m<sup>-2</sup>以上の充填剤では20℃付近 に明確な屈曲が観測された[6]。

$$\ln k = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} + \ln \Phi \tag{1}$$

ここで, ΔH と ΔS はそれぞれ移動相から固定相への溶質の 移行エンタルピーと移行エントロピー, R, T, Φ はそれぞ れ気体定数,絶対温度,相比である。このプロットが屈曲を 示す温度は示差走査熱量測定によって得られた C<sub>18</sub>シリカ充 填剤表面のアルキル結合層の相転移(ガラス転移)温度にほ ほ対応することから,アルキル結合層の構造変化が溶質保持 を変化させたことを示していると考えられ,分配モデルの妥 当性を実証する実験的証拠として挙げられている。また,ポ リメリック C<sub>18</sub>結合層が多環芳香族炭化水素などの平面構造 を認識する分離選択性を示すことなどは,分配モデルを支持 する実験結果としてよく知られている[3, 17]。

このように、疎溶媒和理論に基づくアルキル結合層表面へ

の吸着と,結合層内部への分配が RPLC の異なる保持モデル として主張されてきたが,両者は必ずしも対立するものとは 考えられていない。むしろ,両者とも溶質保持に寄与してお り,用いる移動相溶媒によって,どちらが主になるかが決ま ると考えている研究者が多い。すなわち,メタノール/水混 合溶媒や水を高濃度で含む溶液を移動相として用いる系,す なわち極性の高い移動相を用いる場合では疎溶媒和吸着が, またアセトニトリルやテトラヒドロフランを高濃度で含む系 では結合層内部への分配が支配的になるとされている。前者 においてはアルキル結合層表面が,また後者においては結合 層それ自身が固定相として機能することになる。

これに対して、アルキル結合層表面には移動相中の有機溶 媒成分が溶媒和し, それがもう一つの固定相として機能する と考える分配モデルが, Kazakevich や Guiochon らによって 近年提唱されている[18,19]。メタノール/水やアセトニト リル/水を RPLC の移動相として用いた場合、メタノールや アセトニトリルが RPLC 充填剤表面に選択的に(もしくは優 先的に)溶媒和することは古くから明らかにされているが, その溶媒和層の厚さあるいは量を求めるとともに、この溶媒 和層がアルキル結合層とは独立の固定相として溶質保持に寄 与するとするモデルはこれまでにないものである。一方筆者 らは、独自に創案した移動相体積測定法を用いて、RPLC に おいて固定相として機能する液相の体積を測定することによ り、その液相組成を求める方法を提案した[20]。その結果、 移動相中の有機溶媒成分のみならず、水も固定相として機能 しうることが明らかになった。本稿では、アルキル結合層表 面の移動相溶媒による溶媒和と,その溶質保持に及ぼす効果 を溶媒和相への溶質分子の分配に基づいて考察した最近の研 究を紹介する。

# 2. 吸着等温線の測定による RPLC 充填剤の溶媒和層構造 の推定

メタノール/水やアセトニトリル/水混合溶媒を移動相と した系での RPLC 充填剤表面におけるこれら有機溶媒の溶媒 和あるいは吸着の挙動は、すでに多くの研究者によって研究 されている。最近では分子動力学計算 [15, 21, 22]やラマン分 光法[23]などによって、アルキル結合層の構造がこれらの溶 媒中で有機溶媒成分との相互作用によりどのように変化する かも明らかにされつつある。しかし、アルキル結合層の溶媒 和を実験に基づいて定量的に論じた研究としては、吸着等温 線の測定によるものがほとんどであるといってよい [18, 19, 24-28]。吸着等温線は、いわゆる minor disturbance method と 呼ばれる方法によって測定されている。この方法は、移動相 が2成分からなる系において、移動相の組成とわずかに異な る組成の溶液をLCに注入したときに生じる minor disturbance peak (システムピークとも呼ばれる) の保持体積を, 全組成範囲において測定することによって、過剰吸着量を求 めるものである。溶液成分の部分モル体積が溶液相と吸着相

とで等しいと仮定できるとき,目的成分の表面過剰量 *Γ*(*C*) は以下の式で定義される。

$$\Gamma(C) = \frac{(C_0 - C_e)V}{A} \tag{2}$$

ここで $C_0$ と $C_e$ はそれぞれ溶液中の目的成分の初期濃度と平衡濃度であり、VとAは溶液の体積と吸着剤の表面積である。有機溶媒濃度がC mol/L の有機溶媒/水混合溶媒を移動相としたときに観測される minor disturbance peak の保持体積 $V_{\rm R}(C)$ は次式で与えられる。

$$V_{\rm R}(C) = V_0 + A \left[ \frac{d\Gamma}{dC} \right] c \tag{3}$$

ここで V<sub>0</sub>はカラム内の全液相体積,すなわち移動相溶媒成 分が占める空間の体積である。この式を積分することによっ て,下式のように有機溶媒成分の表面過剰量を求めることが できる。

$$\Gamma(C) = \frac{1}{A} \int_{0}^{c} (V_{R}(C) - V_{0}) dC$$
(4)

したがって、単位表面積あたりの選択的吸着量 nads は以下のようになる。

$$n_{\rm ads} = C\tau + \Gamma(C) \tag{5}$$

ここで C はバルク溶液相すなわち移動相中の有機溶媒成分 濃度,  $\tau$  は吸着層の厚さである。

このようにして得られたメタノール,アセトニトリル,テ トラヒドロフランの各水溶液から C<sub>18</sub>シリカ充填剤への有機 溶媒成分の過剰吸着等温線の例を Figure 1 に示す[18]。それ ぞれの等温線から, Γ(C)は 20–40%(v/v)で最大値をとり,そ れより高濃度側では有機溶媒成分の体積分率にほぼ比例して 減少していることがわかる。このことは,この濃度領域では 吸着が飽和に達しており,有機溶媒の吸着量が一定になって いることを示している。したがって,仮に有機溶媒のみが吸



Figure 1. Excess adsorption isotherms of acetonitrile (■), methanol (◆), and tetrahydrofuran (▲) from water on C1 modified silica (a) and on C<sub>18</sub> modified silica [Reproduced with permission from ref. 18].



**Figure 2.** Volume of adsorbed organic layer of acetonitrile, methanol, and tetrahydrofuran on adsorbents with different bonded chains, and "free" volume between bonded chains (in all-*trans* conformation) [Reproduced with permission from ref. 18].



Figure 3. Schematic illustration of a possible structure of solvent layer formed on the surface of an alkyl bonded packing material.

着層を形成しているとすれば、(5)式から過剰吸着等温線の 直線部を C = 0 に外挿することによって単位表面積あたりの 飽和吸着量 nmax を求めることができる。さらに nmax と充填剤 の比表面積から吸着層の厚さを見積もることが可能になる。 Kazakevich らは,吸着層の厚さがメタノールについては2.5 Å,またアセトニトリルとテトラヒドロフランについては14 Åと報告した。Guiochon らも、同じ方法で異なる C<sub>18</sub>シリカ 充填剤についての値を算出し、これとほぼ等しい値を得てい る[19]。また Kazakevich らはフェニル基を修飾した充填剤で も同様の結果を報告している[28]。これらの値は、メタノー ルは単分子層を、またアセトニトリルとテトラヒドロフラン は多分子層(4-5分子層)を形成していることを意味して いる。

さらに Kazakevich らは吸着した有機溶媒成分の体積 Vs が シリカ表面に結合したアルキル鎖の長さによってどのように 変化するかを調べた[18]。その結果, Figure 2 に示したよう に C1から C1s結合層まで,いずれの有機溶媒についても nmax の値はアルキル鎖長に依存せずほとんど一定であることが明 らかになった。この結果は、メタノールのみならず、アセト ニトリルやテトラヒドロフランの分子もアルキル結合層内に 浸透していないことを示唆している。すなわち、これらの有 機溶媒の溶媒和層あるいは吸着層はアルキル結合層の表面に 形成され、アルキル基と混和した相にはなっていないことに なる。この実験結果に基づいて、Kazakevich ら[18]、および その後 Guiochon ら[19]は吸着した有機溶媒和層とアルキル 結合層が独立の固定相として機能するとする分配一吸着モデ ルを提唱した。Figure 3 にその模式図を示す。

Kazakevich らのモデルでは、溶質の保持は移動相から有機 溶媒和層への分配と、さらに有機溶媒和層からそれと接する アルキル結合層表面への吸着によって起こることになり、溶 質の保持体積 V<sub>R</sub> は次式で与えられる。

$$V_{\rm R} = V_0 - V_{\rm s} + K_{\rm p} (C) [V_{\rm s} + AK_{\rm H}]$$
(6)

ここで  $V_{\mu}$  は有機溶媒和層の体積,  $K_{\mu}(C)$ は移動相と有機溶 媒和層間の溶質の分配係数,  $K_{\mu}$  は有機溶媒和層とアルキル 結合層表面間の吸着定数である。 $K_{\mu}(C)$ と $K_{\mu}$  はそれぞれ以 下のように表される。

$$K_{p}(C) = c_{s} / c_{m}$$

$$K_{u} = \Gamma(c_{v}) / c_{s}$$
(8)

$$\mathbf{\Lambda}_{\mathrm{H}} \equiv \mathbf{I} \ (\mathcal{C}_{\mathrm{s}}) / \mathcal{C}_{\mathrm{s}} \tag{O}$$

ここで, *c*<sub>m</sub> と *c*<sub>s</sub> はそれぞれ移動相および有機溶媒和層にお ける溶質濃度を示す。

このうち  $K_{P}(C)$ は移動相組成に依存するが、 $K_{H}$ は有機溶 媒によって決まる定数で100%有機溶媒を移動相としたとき の保持体積  $V_{R}$ (100)から次式によって求められる。

$$K_{\rm H} = \frac{V_{\rm R} \,(100) - V_0}{A} \tag{9}$$

また, K<sub>P</sub>(C)は各組成の有機溶媒水溶液と気相との間の溶質

の分配係数を測定することによって見積もることができる。 Kazakevich らはヘッドスペースガスクロマトグラフィーを用 いて,各濃度のアセトニトリル/水混合溶媒と気相との分配 係数を 1–ブタノンと数種のアルキルベンゼンについて測定 し, $K_p$ (C)を算出した。ついで得られた $K_p$ (C)と $K_H$ 値を(6) 式に代入して得られた保持体積と実測値とを比較して,両者 はよく一致することを示している[18]。

## 3. 移動相体積の測定による RPLC 充填剤の溶媒和層構造 の推定

Kazakevich や Guiochon らの提唱するモデルは、2成分か らなる移動相を用いたときにアルキル結合層表面に形成され る有機溶媒の選択的溶媒和層が、アルキル結合層あるいはそ の表面とは別の異なる固定相として機能することを仮定する ものである。したがって、従来のアルキル結合層表面への直 接の疎水性吸着やアルキル結合層内への分配、あるいは両者 の組み合わせによって保持機構を考えるものとは一線を画し ている。しかし、表面過剰量を測定して溶媒和層を計測して いるのであるから、当然のことながら2成分系(あるいは多 成分系)を対象とした議論となり、しかも一方の成分、すな わち水は疎水表面では溶媒和層を形成しないという暗黙の仮 定の上にこのモデルは成り立っている(Figure 1 において有 機溶媒成分が 80–90%(v/v)以上の領域で負吸着を示すのは、 残存シラノール基への水の吸着によるものとして説明されて いる[18, 19, 26])。

水が固定相として機能する溶媒和層の成分となっているの か否かを明らかにするには、全く別のアプローチが必要であ る。筆者らは、カラム内で固定相として機能している領域と 移動相として機能している領域とを区別するには、溶質分子 をプローブとする方法を用いるほかないと考えている。固定 相と移動相とを区別するということは、言いかえればカラム 内移動相体積を測定するということである。すなわち移動相 以外の部分は固定相として機能しているか、あるいは溶質分 子が入り込めない空間ということになるからである。しか し, RPLC における移動相体積は,これまで多くの方法が提 案されているにもかかわらず、いまだにその測定法が確立さ れていない[29]。ウラシルやチオ尿素などサイズが小さく親 水性の大きな化合物の保持体積を測定して移動相体積とする 方法が一般的に用いられているが、水を多量に含む移動相を 用いた系では明らかに移動相体積としては大きすぎる値を示 す[20]。また, n-アルコールやアルキルベンゼンなどアルキ ル鎖長の異なる一連の同族体の保持体積を測定し、直線的自 由エネルギー関係, すなわち ln k と同族体の炭素数との間 の直線関係を仮定して移動相体積を求める方法も提案されて いるが,用いる同族体化合物の種類や,同じ同族体でも炭素 数によって得られる値が変化することがすでに明らかになっ ている[20,30]。

これに対して筆者らは、イオンの保持に及ぼす移動相中の

電解質(溶離電解質)の効果を利用する移動相体積測定法を 提案した[31]。この方法は、イオンの活量係数が、移動相お よび固定相において共存する電解質の種類に依存せず一定で ある系においては2つの同じ電荷を持つイオンの保持係数の 比が電解質の種類によらず一定になるという理論的帰結に基 づいており[32, 33]、移動相体積 V<sub>m</sub> は次式で与えられる。

$$V_{\rm m} = \frac{V_{\rm A}^{\rm YX} V_{\rm B}^{\rm WZ} - V_{\rm A}^{\rm WZ} V_{\rm B}^{\rm YX}}{V_{\rm A}^{\rm YX} + V_{\rm B}^{\rm WZ} - V_{\rm A}^{\rm WZ} - V_{\rm B}^{\rm YX}}$$
(10)

ここで, V<sup>xx</sup> は溶離電解質として YX を用いた系における イオンAの保持体積を示す。この方法は,イオンをプロー ブとして移動相と固定相とを識別する方法であるということ ができる。これまで主に純水を移動相とし,親水性高分子ゲ ルをカラム充填剤として用いた系についてこの方法を適用 し,移動相として機能する水と固定相として機能する水の量 を正確に測定できることを明らかにしてきた[34–37]。この ようなゲルにおいては,固定相は高分子マトリクスと水との 混合相あるいは複合体とみなすことができ,固定相における 高分子濃度が高いほど溶質間の分配係数の差,すなわち分離 選択性が大きい。

一方,最近 C<sub>1</sub>, C<sub>8</sub>, C<sub>18</sub>結合シリカカラムについて,この 方法を用いて移動相体積 V<sub>m</sub>の計測を試みた。IO<sub>5</sub><sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>, NO<sub>5</sub><sup>-</sup>, I<sup>-</sup>, SCN<sup>-</sup>をプローブイオンとし,溶離電解質として NaCl および NaClO<sub>4</sub>を用いて 0–40%(w/v)アセトニトリル/水 を移動相とした系について V<sub>m</sub> 値を測定したところ,いずれ のプローブイオンの組み合わせについてもよく一致した値が 得られた。一例として Inertsil ODS–3V カラム (150×4.6 mm, ジーエルサイエンス製)について得られた結果を Table 1 に示す。この結果は,これら無機イオンがカラム内の同じ 領域を移動相として認識していることを示している[20]。

さらに、以下の Knox と Kaliszan の式[38]に基づいてカラ

**Table 1.**  $V_m$  values (mL) calculated from eq. 11 for an Inertsil ODS-3V column

probe ion	concentration of acetonitrile (% w/v)						
	0	2	5	10	15	20	40
IO <sub>3</sub> <sup>-/</sup> Br <sup>-</sup>	1.62	1.62	1.60	1.58	1.54	1.49	1.49
$IO_{3}^{-}/NO_{3}^{-}$	1.63	1.61	1.60	1.58	1.54	1.49	1.50
IO <sub>3</sub> <sup>-/</sup> I <sup>-</sup>	1.65	1.60	1.59	1.57	1.53	1.48	1.50
$IO_3^-/SCN^-$	1.64	1.60	1.58	1.57	1.53	1.48	1.50
Br <sup>-</sup> / NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	1.65	1.59	1.60	1.58	1.49	1.52	1.45
Br <sup>-</sup> / I <sup>-</sup>	1.67	1.57	1.57	1.57	1.51	1.47	1.47
Br-/ SCN-	1.64	1.58	1.57	1.56	1.51	1.46	1.47
NO <sub>3</sub> <sup>-/</sup> I <sup>-</sup>	1.69	1.56	1.55	1.57	1.52	1.43	1.49
NO <sub>3</sub> <sup>-/</sup> SCN <sup>-</sup>	1.64	1.58	1.56	1.55	1.51	1.44	1.49
I <sup>-/</sup> SCN <sup>-</sup>	1.59	1.59	1.57	1.54	1.49	1.44	1.43
Average	1.64	1.59	1.58	1.57	1.52	1.47	1.48
(S.D.)	(±0.03)	(±0.02)	(±0.02)	(±0.01)	(±0.02)	(±0.03)	(±0.02)

ム内全液相体積 V<sub>0</sub>を測定した。

$$V_0 = \sum \phi_i^{\rm m} V_{\rm R,i} \tag{11}$$

ここで、 $\phi_i^{m}$ は移動相中の成分 *i* の体積分率であり、また  $V_{R,i}$ は同位体で標識した化合物 *i* の保持体積である。この式 は、移動相成分の部分モル体積がバルク液相においても、ま た充填剤表面に吸着した場合でも等しいと仮定して導かれ る。得られた  $V_0$ と  $V_m$ を比較したところ、いずれの系でも  $V_0$ >  $V_m$  となり、固定相として機能する液相が存在することが わかった。そこで  $V_0$ と  $V_m$ の差から固定相として機能する液 相、すなわち溶媒和層の体積  $V_L$ を求めるとともに、 $D_2$ O と CD<sub>3</sub>CN の保持体積から溶媒和層におけるアセトニトリルの 体積分率  $\phi_{LDCN}^i$ を以下の(13)式によって求めた。

$$V_{\rm L} = V_0 - V_{\rm m} \tag{12}$$

$$\phi_{\rm CD,CN}^{\rm L} = \phi_{\rm CD,CN}^{\rm m} \frac{(V_{\rm R,i} - V_{\rm m})}{V_{\rm L}}$$
(13)

20%(w/v)アセトニトリル/水系において, C<sub>1</sub>, C<sub>8</sub>, C<sub>18</sub>結合シ リカカラムについて得られたこれらの値を Table 2 に示す。 仮にアルキル鎖とアセトニトリルおよび水の3成分が混和し て均一な固定相を形成すると仮定したときの固定相中でのア セトニトリルの体積分率 🖉 を計算した結果も併せて示し た。興味深いことに VL 値がそれぞれのカラムによって異な に C<sub>1</sub>, C<sub>8</sub>シリカカラムについても, その値は C<sub>18</sub>カラムに比 べて若干小さいものの、大きな差がないことがわかる。これ に対して  $\phi^{\mu}_{CD,CN}$  はカラムごとに、しかも同じ C<sub>18</sub>結合シリカカ ラムでも大きく異なる値を示した。この結果は、アルキル鎖 とアセトニトリルおよび水は混和して均一な固定相を構成し ているのではなく、分離して単独の分離媒体として機能して いること、および溶媒和液相の組成は充填剤表面の化学的構 造によって決まることを示している。前者の結論は Kazakevich や Guiochon らのモデルと一致するが、溶媒和液相には

**Table 2.**  $V_{\rm m}$ ,  $V_{\rm L}$ ,  $V_0$ ,  $\phi_{\rm CD,CN}^{\rm L}$  and  $\phi_{\rm CD,CN}^{\rm H}$  values determined for C<sub>1</sub>, C<sub>8</sub>, and C<sub>18</sub> silica columns equilibrated with 20 %(w/v) aceto-nitrile/water

	$V_{\rm m}({\rm mL})$	$V_{L}(mL)$	$V_0$ (mL)	$\phi^{\rm L}_{\rm CD_3CN}$	$\phi^{\rm H}_{\rm CD_3CN}$
C <sub>1</sub> silica					
1:Capcell Pak C1 UG120	1.72	0.39	2.11	0.41	0.30
C <sub>8</sub> silica					
2:Capcell Pak C8 UG120	1.71	0.35	2.06	0.42	0.27
C <sub>18</sub> silica					
3: Inertsil ODS-3V	1.47	0.44	1.91	0.46	0.26
4:L-column ODS	1.66	0.33	1.99	0.45	0.21
5:Capcell Pak C18 UG80	1.46	0.29	1.75	0.46	0.18
6:Capcell Pak C18 UG120	1.61	0.30	1.91	0.43	0.20
7:Capcell Pak C18 UG300	2.01	0.19	2.20	0.46	0.24



**Figure 4.** Plots of  $V_L$  /A against  $d_{pore}$  for the Capcell Pak columns. The numbers denote the columns shown in Table 2.

水も構成成分として含まれるという大きな相違がある。

V<sub>L</sub> 値が得られれば、上述した Kazakevich らの方法と同様 に、カラム内の充填剤の表面積Aから固定相として機能す る溶媒和層の厚さを V<sub>L</sub>/A として求めることができる。アル キル基を導入する前のシリカゲルの表面積を用いて算出した 溶媒和層の厚さを、異なる細孔径の充填剤について比較した ところ、細孔径の大きな充填剤ほど溶媒和層の厚さが大きい ことがわかった[20]。20%(w/v)アセトニトリル/水系におい て、一連の Capcell Pak UG シリーズ(資生堂製) について得 られた充填剤細孔径 drove と VL /A の関係を Figure 4 に示す。 この結果は、細孔体積が小さいと溶媒和層が完全に拡張でき ない状態にとどまること, また空間による制限がなければ約 16Åの厚さを持つことを示している。ただし、この値はアル キル基を修飾した後でも表面積は変わらないと仮定して算出 したものである。アルキル基の導入により表面積は2分の1 ないし3分の1に小さくなるという報告[39]があることを考 慮すると、溶媒和液層の厚さは数 nm に及ぶ可能性もある。 アセトニトリルのみが溶媒和液層を構成するとするモデルで は、この移動相組成で溶媒和液層の厚さが約9Åと見積もら れることと比較すると[18,19], 当然のことながらかなり大 きな値である。

この移動相体積測定法により得られた結果が示唆するさら に重要な点は、純水を移動相とした系でも VL 値が0にはな らないことである(Table 3)。これは、疎水性細孔内に取り 込まれた水の一部が無機イオンに対して固定相として機能す

**Table 3.**  $V_0$ ,  $V_L$ ,  $\phi_{CD,CN}^m$  and  $\phi_{CD,CN}^L$  values determined for an Inertsil ODS-3V column

	concentration of acetonitrile (% w/v)						
	0	10	15	20	100		
$V_0$ (mL)	1.96	1.97	1.96	1.91	2.01		
$V_{\rm L}$ (mL)	0.32	0.40	0.44	0.44			
$\phi^{\rm m}_{{\rm CD}_3{\rm CN}}$		0.13	0.19	0.26			
$\phi^{\rm L}_{\rm CD_3CN}$		0.30	0.40	0.46			

ることを意味する。筆者らが、同じ疎水性カラム充填剤であ るポリスチレン - ジビニルベンゼン (PS-DVB) 共重合体ゲ ル TSKgel Styrene-60 と Styrene-120 (東ソー製) を充填した カラムを用いて行った実験では、純水を移動相溶媒として用 いた場合にはいずれも $V_0 = V_m$ となり、固定相として機能す る水相を検出することができなかった[40]。特に TSKgel Styrene-60では、デキストランの保持体積から求めたゲル粒子 外部の液相体積 Vint も Voおよび Vin と等しいという結果が得 られ、ゲルが収縮して細孔が完全につぶれてしまっているこ とが推定された。Styrene-60よりは細孔径の大きな Styrene-120 では、 $V_0 = V_m > V_{int}$ となり、細孔の存在は確認されたが、 おそらく径の小さい細孔は、充填剤をカラムに充填する際に 溶媒をメタノールから純水に置換する過程で収縮し、水を内 部に含まない状態になっていたものと考えられる。このため 表面積が著しく小さくなり,固定相として機能する水を検出 できなかったものと推測される。これに対してシリカゲルを 基材としたアルキル結合型充填剤は、溶媒を水に置換しても 収縮を起こさないため,固定相として機能する水の量を測定 できたと考えられる。

Davankovらは最近,平均細孔径が4nmのPS-DVB樹脂 を合成し,これをカラム充填剤として,移動相として水のみ を用いた系が無機イオンの分離と濃縮に有効であることを示 した。彼らはこの現象を水和イオン半径の差によるサイズ排 除効果に基づくものとして説明している[41,42]。しかし筆 者らによる研究結果は,この現象がサイズ排除によるもので はなく,疎水性細孔水が溶質に対してバルク水とは異なる親 和性を示すことが原因であることを示唆している。親水性高 分子を基材とする充填剤を用いた系で固定相として機能する 水は,高分子マトリクスとの複合体あるいは均一な混合相を 形成して分離機能を示すが,疎水性表面を持つ充填剤では表 面近傍の水がそれ自身で固定相として機能していることにな る。この推論に関しては,無機イオン以外の溶質をプローブ として用いて検証する必要がある。

#### 4. おわりに

疎水性表面あるいは疎水性微小空間における水の構造や物 性, さらにはその分離機能は, 疎水性相互作用の本質にかか わるものとして注目され,多くの研究の対象となっている。 これらの研究においてこれまでに用いられてきた手法の多く は分子動力学計算や分光学的方法を用いるものである。これ らの方法は,水の構造や水分子の運動を推定することを可能 にするという点で優れているが,疎水性細孔水の分離機能と の関係,さらには細孔に取り込まれた水のうちどの部分が分 離に寄与しているかという定量的な情報を与えてはくれな い。これを明らかにするためには,溶質分子をプローブとし て用い,疎水性細孔水との分子間相互作用に関する情報を獲 得する研究手法が必要である。クロマトグラフィーは多段分 離を通して分子間相互作用を増幅し,検出する分析法として 利用することができるので,溶質分子をプローブとしてその 保持挙動を解析することにより,カラム内で働いている分子 間相互作用を知ることが可能である。疎水性粒子表面の溶媒 和層構造とその分離選択性の解明の一翼を,液体クロマトグ ラフィーが担うことができるのではないかと期待している。

#### 記号

- A 吸着剤の表面積
- C 移動相中の有機溶媒成分濃度
- C。 溶液中の目的成分の平衡濃度
- C<sub>0</sub> 溶液中の目的成分の初期濃度
- cm 移動相における溶質濃度
- c。 有機溶媒和層における溶質濃度
- dpore 充填剤細孔径
- k 保持係数
- K<sub>H</sub> 有機溶媒和層とアルキル結合層表面間の吸着定数
- *K*<sub>p</sub>(*C*) 移動相と有機溶媒和層間の溶質の分配係数
- nads 単位表面積あたりの選択的吸着量
- nmax 単位表面積あたりの飽和吸着量
- R 気体定数
- T 絶対温度
- V 溶液の体積
- V<sup>YX</sup>
   溶離電解質として YX を用いたときのイオン A の保持 体積
- Vint ゲル粒子外部の液相体積
- VL 溶媒和液層の体積
- V<sub>m</sub> カラム内移動相体積
- V<sub>0</sub> カラム内全液相体積
- V<sub>R</sub> 保持体積
- $V_{\mathbb{R}}(C)$  minor disturbance peak の保持体積
- VR,i 同位体で標識した化合物 i の保持体積
- V<sub>R</sub>(100) 100%有機溶媒を移動相としたときの保持体積
- V。 吸着した有機溶媒成分の体積
- ΔH 移動相から固定相への溶質の移行エンタルピー
- ΔS 移動相から固定相への溶質の移行エントロピー
- Φ 相比
- φ<sup>m</sup> 移動相中の成分 i の体積分率
- φ<sup>H</sup><sub>CD-CN</sub> 固定相中でのアセトニトリルの体積分率
- *φ*<sup>t</sup><sub>max</sub> 溶媒和層におけるアセトニトリルの体積分率
- **Γ**(C) 目的成分の表面過剰量
- τ 有機溶媒吸着層の厚さ

### 参照文献

- Horvath, C.; Melander, W.; Molnar, I. J. Chromatogr. 1976, 125, 129–156.
- [2] Melander, W.; Stoveken, J.; Horvath, C. J. Chromatogr. 1980, 199, 35–56.
- [3] Tanaka, N.; Sakagami, K.; Araki, M. J. Chromatogr. 1980,

199, 327-337.

- [4] Dill, K. A. J. Phys. Chem. **1987**, 91, 1980–1988.
- [5] Dorsey, J. G.; Dill, K. A. Chem. Rev. 1989, 89, 331–346.
- [6] Cole, L. A.; Dorsey, J. G. Anal. Chem. 1992, 64, 1317– 1323.
- [7] Cole, L. A.; Dorsey, J. G.; Dill. K. A. Anal. Chem. 1992, 64, 1324–1327.
- [8] Schoenmakers, P. J.; Billiet, H. A. H.; de Galan L. Chromatographia 1982, 15, 205–214.
- [9] Hafkenscheid, T. L.; Tomlinson, E. J. Chromatogr. 1983, 264, 47–62.
- [10] Szanto, J. I.; Veress, T. Chromatographia 1985, 20, 596– 600.
- [11] Martire, D. E.; Boehm, R. E. J. Phys. Chem. 1983, 87, 1045 -1062.
- [12] Pursch, M.; Sander, L. C.; Albert, K. Anal. Chem. 1996, 68, 4107–4113.
- [13] Doyle, C. A.; Vickers, T. J.; Mann, C. K.; Dorsey, J. G. J. Chromatogr. A 2000, 877, 41–59.
- [14] Singh, S.; Wegmann, J.; Albert, K.; Muller, K. J. Phys. Chem. 2002, 106, 878–888.
- [15] Ban, K.; Saito, Y.; Jinno, K. Anal. Sci. 2004, 20, 1403– 1408.
- [16] Zhang, L.; Sun, L.; Siepmass, J. I.; Schure, M. R. J. Chromatogr. A 2005, 1079, 127–135.
- [17] Sander, L. C.; Wise, S. A. J. Chromatogr. A 1993, 656, 335 -351.
- [18] Kazakevich, Y. V.; LoBrutto, R.; Chan, F.; Patel, T. J. Chromatogr. A 2001, 913, 75–87.
- [19] Gritti, F.; Guiochon, G. Anal, Chem. 2005, 77, 4257–4272.
- [20] Shibukawa, M.; Takazawa, Y.; Saitoh, K. Anal. Chem. 2007, 79, 6279–6286.
- [21] Rafferty, J. L.; Zhang L.; Siepmann, J. I.; Schure, M. R. Anal, Chem. 2007, 79, 6551–6558.
- [22] Zhang L.; Sun, L.; Siepmann, J. I.; Schure, M. J. Chromatogr. A 2005, 1079, 127–135.
- [23] Liao, Z.; Pemberton, J. E. Anal, Chem. 2008, 80, 2911– 2920.
- [24] Riedo, F.; sz. Kovats, E. J. Chromatogr. 1982, 239, 1-28.
- [25] Ha, N. L.; Ungvaral, J.; sz. Kovats, E. Anal, Chem. 1982, 54, 2410–2421.
- [26] Zhu, P. L. Chromatographia 1985, 20, 425-433.
- [27] Alvarez-Zepeda, A.; Martire, D. E. J. Chromatogr. 1991, 550, 285–300.
- [28] Chan, F.; Yeung, L. S.; LoBrutto, R.; Kazakevich, Y. V. J. Chromatogr. A 2005, 1082, 158–165.
- [29] Rimmer, C. A.; Simmons, C. R.; Dorsey, F. G. J. Chromatogr., A 2002, 965, 219–232.

- [30] Krstulovic, A. M.; Colin, H.; Guiochon, G. Anal, Chem. 1982, 54, 2438–2443.
- [31] Shibukawa, M.; Ohta, N. Chromatographia 1988, 25, 288– 294.
- [32] Shibukawa, M.; Ohta, N. Chromatographia 1986, 22, 261– 267.
- [33] Shibukawa, M.; Ohta, N.; Kuroda, R. Anal. Chem. 1981, 53, 1620–1627.
- [34] Shibukawa, M.; Ohta, N.; Onda, N. Bull. Chem. Soc. Jpn. 1990, 63, 3490–3494.
- [35] Shibukawa, M.; Aoyagi, K.; Sakamoto, R.; Oguma, K. J. Chromatogr. A 1999, 832, 17–27.
- [36] Baba, T.; Sakamoto, R.; Shibukawa, M.; Oguma, K. J.

Chromatogr. A, 2004, 1040, 45-51.

- [37] Shibukawa, M. Bunseki Kagaku 2006, 55, 149–162.
- [38] Knox, J. H.; Kaliszan, R. J. Chromatogr., 1985, 349, 211– 234.
- [39] Walter, T. H.; Iraneta, P.; Capparella, M. J. Chromatogr. A, 2005, 1075, 177–183.
- [40] Baba, T.; Shibukawa, M.; Heya, T.; Abe, S.; Oguma, K. J. Chromatogr. A, 2003, 1010, 177–184.
- [41] Davankov, V.; Tsyurupa, M. J. Chromatogr. A, 2003, 1087, 23–12.
- [42] Laatikainen, M.; Sainio, T.; Davankov, V.; Tsyurupa, M.;
  Blinnikova, Z.; Paatero, E. J. Chromatogr. A, 2007, 1149, 245–253.