

逆相クロマトグラフィーにおける 100 % 水系移動相の使用時の問題点について

長江 徳和, 塚本 友康, 小山 隆次

1 はじめに

逆相クロマトグラフィーでは、C18 (ODS) カラムは保持時間が長く、耐久性が高く、さらに多くの応用例が発表されていることなどから、多くのクロマトグラファーが使用しており、汎用性の高いカラムである。HPLC が開発された 1969 年から 11 年後の 1980 年には有機溶媒を含まない 100 % 水系移動相では C8 カラムや C18 カラムは保持の再現性が低く、時間の経過とともに保持が減少することが発表され、有機溶媒濃度が 10 % 以下の移動相は使用できないとの認識が広まった。1990 年以降高極性化合物の分離分析の必要性が高まり、100 % 水系移動相でも保持の再現性が高い逆相カラムの開発が始まり、C18-AQ などの呼び名のカラムが利用可能になった。本稿では 100 % 水系移動相での保持の低下の原因や対処方法について紹介する。

2 100 % 水系条件下の保持の再現性低下の議論

100 % 水系移動相を用いた場合に保持時間が短くなることを議論した最初の論文¹⁾が 1980 年に発表された。この論文の一部を以下に示す。“It follows that the stationary phase could agglomerate and, therefore, could have a greatly reduced effective chromatographic surface area. It is possible that it will adopt a spatial arrangement where the chain are lying almost flat upon the surface.” これはアルキル鎖がシリカ表面に倒れ込むことによりクロマトグラフィーとしての分離場が少なくなる可能性を指摘している。その後、類似の論文は数多く発表され、アルキル基の倒れ込みは Ligand collapse, Phase collapse や Mat down と表現された。1990 年代になると C18 や C8 などのアルキル鎖が溶媒和により立ち上がった状態では移動相に濡れた状態であり、移動相中の有機溶媒濃度が 10 % 以下になるとアルキル鎖は寝込んだり、倒れ込んだりし、移動相とは濡れていない状態になり、保持が小さくなるとする主張が主流になった。1999 年の LC / GC North America に LCトラブルシューティングとして掲載された移動相として水のみを

使用したカラム洗浄についての記事²⁾は、同様な事象が述べられ、アルキル基の寝込み・倒れ込みによる保持の減少は、誰も疑うことのない事象として取り扱われこれていた。筆者は 1998 年に長鎖アルキル基の C30 カラムを製造し、移動相中有機溶媒濃度と保持の減少率について調べたところ、有機溶媒が 0 % でも有意な保持の減少は認められなかった。アルキル鎖の長い C30 は当然 C18 よりアルキル鎖が倒れ込み易いと考えられ、保持の減少度合いが大きくなるはずであるが、実験結果はそうならなかった。つまり、保持の減少はアルキル鎖の倒れ込みとは異なる機構で起こっていることになる。LC の学会でこの事実を発表した時には、「アルキル鎖の寝込み・倒れ込みにより保持が減少することは常識であり、大学院の授業でもそう教えている」と筆者の実験結果が間違っているとのコメントがあった。筆者は 2000 年に 100 % 水系移動相での C18 カラムの保持の減少は充填剤細孔内から移動相が抜け出すことにより起こるとする論文³⁾を発表した。この論文は充填剤細孔内から移動相が抜け出すことを述べた最初の論文である。移動相が充填剤細孔から抜け出すことが一般に受けられるのには時間がかかった。初期には移動相が細孔から抜け出した後、細孔内はどうなっているかの疑問に、真空状態になるが、細孔入り口では水と接しているのだから、水蒸気圧になっていると回答したが、真空状態にさせるどんな力が作用しているのか、そんな力は働かざるを得ないとの意見も多数あった。筆者の続報^{4~8)}で C18 充填剤の表面は水に濡れず、接触角が 126° 程度で、毛管作用により、細孔から水を抜け出させる力が働くことを示した。毛管現象は広く認知された事象であり、内径 0.5 mm のガラス管を赤インクに着けると液面が約 6 cm 上がることは誰もが肯定する。ガラス管の内径を 1/500 の 1 μm にすると、液面は 500 倍の 30 m 上がることになる。水が重力に逆らって 30 m 上がることは圧力に換算すると、3 気圧に相当する。逆相クロマトグラフィーの C18 カラムの充填剤細孔径は約 10 nm であり、1 μm の 1/100 である。このことから C18 充填剤細孔内で毛管作用で生じる圧力 (力) が 100 気圧程度になることは容易に想像できる。実際の実験結果から 160 気圧の圧が毛管

作用により働き、C18 充填剤細孔内から水が抜け出した後では、充填剤周りに 160 気圧以上の圧をかかれば水は細孔内に再び入り込み保持は回復することが分かっている。毛管作用で 160 気圧の力が働くことを考慮すれば、大気圧に逆らって C18 充填剤細孔内の水を抜け出させる力がかかり、細孔内が真空状態に近づくことは十分推察される。

1990 年代の論文では、アルキル鎖が溶媒和により立ち上がっている場合は移動相と濡れている状態で wetting と表現し、移動相中の有機溶媒濃度が 10 % 以下になり、アルキル鎖が寝込んだり、倒れたりした場合は移動相と濡れていない状態 non-wetting と表現し、立ち上がっているアルキル鎖が寝込み、倒れ込むことを wetting から non-wetting に変化する意味の Dewetting と称することが多かった。またアルキル鎖の寝込み・倒れ込みにより固定相が変化することで、移動相が固定相と濡れなくなり、その結果保持が減少することは Dewetting 現象によって起こると主張された。しかし、充填剤細孔内の移動相 (100 % 水系移動相) が抜け出ることにより保持が減少することが 2000 年に発表され、それ以降、特に西欧の研究者はアルキル基の寝込み・倒れ込みが起こることにより固定相は移動相に濡れなくなり、その結果充填剤細孔内から移動相が抜け出し、保持が減少すると報告⁹⁾¹⁰⁾するようになった。さらに C18 充填剤細孔表面に移動相が濡れているかいないかは関係なく、充填剤細孔内に移動相が存在していることを wetting と称し、充填剤細孔内から移動相が抜ける事象を Dewetting と称するようになった。2000 年前後で Wetting と Dewetting の用語の意味や使い方が変化している。まず wetting (濡れ) の科学的な意味は、ある物質上に液体が存在した時の液体の接触角が 90° より小さい場合のことである。その逆の non-wetting (濡れていない) は接触角が 90° より大きい場合である。例えば撥水性の高いポリテトラフルオロエチレン (PTFE) 樹脂板の上に水滴を乗せた場合、その水滴は球形に近い形になる。PTFE 樹脂板上の水の接触角は 90° 以上であり、PTFE 樹脂板上の水は存在しているが、PTFE 樹脂板は水に濡れていない状態である。つまり水の存在自身を wetting と定義しているのではなく、あくまでも接触角が 90° より小さいことが科学的な wetting の定義である。C18 充填剤細孔表面は水に濡れないことから、科学的な用語の使い方としては C18 充填剤細孔内に水が存在していても、non-wetting 状態であり、決して wetting 状態ではない。つまり、C18 充填剤細孔内に水が存在している状態から水が抜け出すことは non-wetting 状態そのままである。言い換えれば C18 充填剤細孔表面は水に濡れておらず、濡れていないからこそ毛管作用で水が細孔内から抜け出す。西欧のほとんどのクロマトグラファーは 100 % 水系移動相が充填剤細孔内

から抜け出すことを Dewetting 現象として認識しているが、実態を正確に示す科学的な表現は Capillary (毛管) 現象であると考えられる。

3 100 % 水系移動相を用いた場合の逆相カラムの保持の変化

図 1 には細孔径 10 nm の C18 固定相と水移動相を用いた場合の亜硝酸ナトリウムと 2-プロパノールの 40 °C での保持の変化を示す。C18 カラム内を水移動相に置換し、さらに保持を測定する間、カラム出口と検出器の間 (以後カラム出口以降と称す) に背圧をかけた。1 時間以上送液しカラムが安定した後、試料を注入して得られたクロマトグラムを上段の A に示す。また、その後 1 時間送液ポンプを停止し、その後再度送液開始し得られたクロマトグラムを下段の B に示す。1 時間の送液停止後の亜硝酸ナトリウムの溶出時間 (t_0) と 2-プロパノールの保持時間が両方とも減少した。つまり充填剤周りに圧力がかかっているときは充填剤細孔内から水は抜け出すことはなく、ポンプを停止し、充填剤周りの圧が大気圧になると充填剤細孔内から水は抜け出ている。抜け出た後は充填剤周りに 6~8 MPa の圧がかかっても水が再び充填剤細孔内に入ることはなく、保持は減少したままである。

細孔径の異なる 5 μm のシリカゲルにアルキル鎖長の異なる、C30, C18, C8 および C1 (TMS, トリメチルシラン) の一官能性シリル化試薬を過剰量で反応させ、さらに TMS でエンドキャッピングを施した各充填剤について、1 時間の送液停止前後での保持時間の減少を 10 mmol L⁻¹ リン酸緩衝液移動相で測定^{3)~5)}した。その

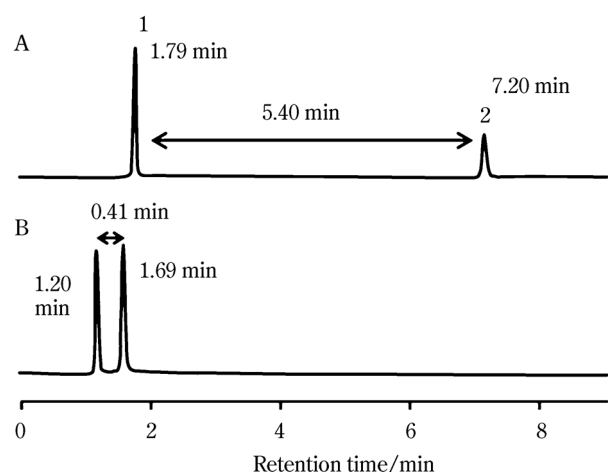


図 1 水移動相条件下の C18 カラムの保持挙動 (A) は初期状態、(B) は 1 時間送液停止後再度測定; Column, 150 mm×4.6 mm, 5 μm C18, 10 nm pore size; mobile phase, water; flow rate, 1.0 mL min⁻¹; column temperature, 40 °C; detection, refractive index; peaks, 1 =sodium nitrite (t_0), 2=2-propanol. カラムの出口と検出器の間に 1.7 MPa の背圧をかける。

結果を図2に示す。横軸の細孔径はシリカ基材ではなく、それぞれの固定相（アルキル基）が結合した後の窒素ガス吸着法により測定した充填剤の細孔径である。アルキル鎖長が異なっても、細孔径が大きいほどポンプ停止後の相対保持時間は100%に近くになり、細孔径が小さいほど相対保持時間は減少した。細孔径15nmの比較ではC18よりC8の方が保持時間の減少率は大きく、またC18が80%の保持時間減少を示す細孔径10nmでもC30は数%のみの保持時間の減少であり、C8からアルキル鎖長が長くなるほど、保持時間の減少し始める細孔径が小さくなった。アルキル鎖長の最も短いC1は8nm以下の細孔径で急激に保持時間は減少した。相対保持時間が90%以上になるそれぞれの固定相の細孔径は、C8が22nm以上、C18は20nm以上、

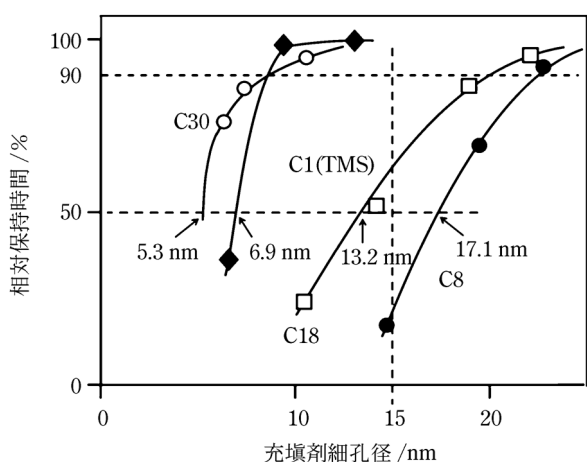


図2 充填剤細孔径と水移動相条件下の相対保持時間との関係
Column, C30 (○), C18 (□), C8 (●), and TMS (Tri-methylsilyl silica) (◆); column dimensions, 150 mm × 4.6 mm; mobile phase, 10 mmol L⁻¹ phosphate buffer (pH 7.0); flow rate, 1.0 mL min⁻¹; column pressure, 6.0 MPa; temperature, 40 °C; detection, UV at 250 nm; sample, thymine. 相対保持時間は初期に対する1時間送液停止後の相対値とする。

C30とC1は8.5nm以上であった。試験した充填剤では、すべて保持時間が減少しており、水との接触角はすべて90°より大きいことが示された。また毛管作用により水は充填剤細孔内から抜け出すため、細孔径が大きくなると水の抜け出しは少なくなった。TMSはメチル基の固定相であり、物理的にアルキル基は寝込むことができないことや、細孔径の大小によりアルキル鎖の寝込みが制御されることは考えにくいことから、充填剤表面の濡れ性はアルキル鎖の寝込みとは無関係であると考えられる。

図3には毛管作用による充填剤細孔内からの移動相の抜け出し（相対保持時間の減少）とカラム出口以降の背圧との関係、およびカラム内の充填剤細孔内の移動相の存在状態を示す。クロマトグラフィーの条件は図1と同じである。ポンプを1時間停止した後、相対保持時間は8%まで下がった。この状態からカラム出口以降に内径0.1mmの配管を接続し、カラム出口以降に背圧をかけた。2.5MPaの背圧時が①で11MPa、15MPaおよび30MPaは②、③および④である。30MPaの背圧をかけ、相対保持時間が100%になった状態から送液を止めずにカラム出口以降の背圧を5MPaまで下げた状態が⑤である。②のカラム出口以降の背圧が11MPaの場合はカラム自身に6MPaの圧力がかかるため、カラム入口の圧力は17MPaとなる。カラム出口以降の背圧を上げている曲線から、一度充填剤細孔内から移動相が抜け出した後は16MPaの圧力がかかった状態で初めて充填剤細孔内に水移動相が入り込んでいる。②の状態はカラム入口から数パーセントの充填剤細孔内に移動相が入り込み、その分相対保持時間が上昇した。③の状態ではカラム内の90%近くの充填剤細孔内に移動相が入り込み、相対保持時間は約90%まで回復した。④のように30MPa以上の圧力がかかった状態ではすべての充填剤細孔内に移動相は入り込んでいる。⑤の状態は④と同じで充填剤細孔内には移動相は

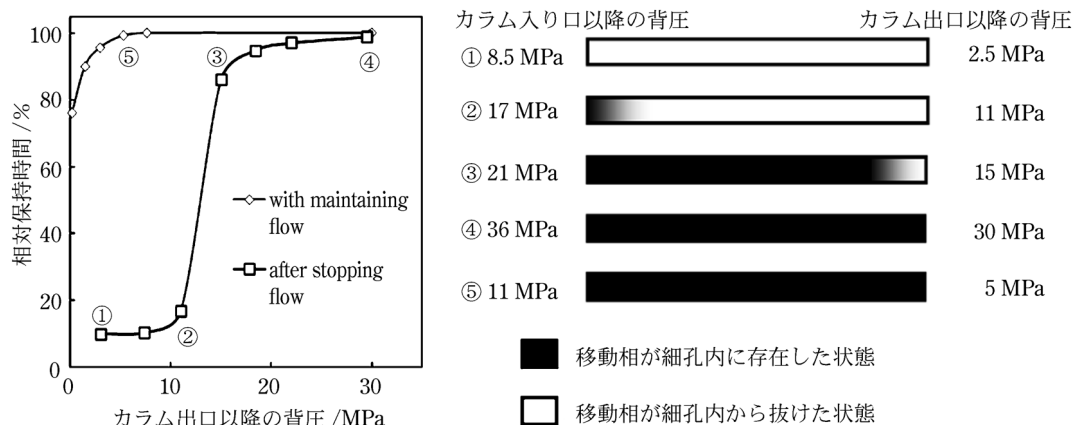


図3 カラム出口以降の背圧と相対保持時間の関係とカラム内の充填剤細孔内の水の存在状態
Column, 150 mm × 4.6 mm, 5 μm dp C18, 10-nm pore size. 他の条件は図1と同じ。

抜けることなくすべて入り込んでいる。つまり、いったん充填剤細孔内から移動相が抜けた状態では細孔内に移動相が入り込むためには 16 MPa の圧力が必要となるが、細孔内に移動相が入り込んでいる状態では 5 MPa の圧力がかかっていれば細孔内から移動相は抜け出すことはない。これが充填剤細孔内部で起こっている毛管作用のヒステリシスである。充填剤細孔内に移動相が入り込んでいる状態で、カラム出口以降の背圧を 0 MPa にしてもすぐには細孔内から移動相は抜け出さず、数時間かけてカラム出口付近の低い圧力しかかかっていない充填剤細孔内から移動相が抜け出す。その結果相対保持時間は 77 % になった。C18 固定相でもカラム出口以降に背圧を加えることにより水移動相でも十分な分離が達成される。これらの固定相と移動相は濡れることはなく、0.2 nm から 0.3 nm の隙間が空いた状態の界面で接していると考えられる。お互いが混ざり合わないヘキサンと水を用いて溶質を液液分配させることと同様に、C18 固定相と水移動相はある界面で接していれば溶質はそれぞれの相に分配することができる。固定相に溶質が分配できれば保持でき、分離することができる。従来言われてきた「固定相は移動相に濡れないと分離できない」は実は「固定相が移動相で濡れていても、濡れていなくとも分離には関係なく、充填剤細孔内に移動相が存在していないと分離できない」と表現すべきであると考えられる。

図 3 の結果からここで用いた C18 充填剤の細孔内に水移動相が入り込む圧力を 16 MPa とした場合、実測の平均細孔半径 5.2 nm と 40 °C の水の表面張力 69.6 dyne cm^{-1} を用いて、毛管作用の式からこの C18 固定相と水との接触角を計算すると、126° の値が導き出された。また、図 2 の相対保持時間が 50 % の時のそれぞれの固定相の平均細孔径を求めると、C30 は 5.3 nm, C1 (TMS) は 6.9 nm, C18 は 13.2 nm および C8 は 17.1 nm となる。図 2 の相対保持時間が 50 % になったときのそれぞれの平均細孔径と接触角の余弦関数値 ($\cos \theta$) が比例すると仮定すると、毛管作用の式を用いて C18 固定相と水との接触角 126° から、他の固定相の接触角を逆算することができる。その結果は C8 固定相は 140°, C1 (TMS) 固定相は 108°, C30 固定相は 104° となった。またこの接触角はあくまでもシリカ表面にそれぞれのアルキル基を結合させ、TMS エンドキャッピングを施した状態の固定相表面と水の接触角であり、シリカ表面の影響を全く受けていないとは言い切れず、オクタデカンやオクタンそのものと水との接触角とは多少は異なる可能性はある。この接触角については C8 固定相が最も大きく、C8 よりもアルキル鎖長が長くなると小さくなり、水に濡れやすくなることが示された。疎水性はアルキル鎖長が長くなるほど大きくなるため、撥水性（水との濡れにくさ）も同様に大きくなると考えがち

であるが、実際にはその逆であった。疎水性は水との混ざりにくさであり、*n*-オクタノールと水との分配比の対数 (Log P) で定義されるが、撥水性は水との接触角で定義される。定義自体が異なる両パラメーターに対して相関性がないことは決して不自然ではない。

4 100 % 水系移動相でも保持の再現性の高い逆相カラム

充填剤細孔径が 10 nm 程度の逆相カラムを用いて 100 % 水系移動相でも保持の高い再現性を得るためには、水との接触角が 108° 以下になるような C30 や TMS カラムを用いることである。C18 固定相でも 100 % 水系移動相を使用しても保持の再現性が高いカラムとして多く HPLC カラムメーカーから C18-AQ などと称されるカラムが販売されている。これらの C18-AQ カラムは固定相と水との接触角が 108° 以下になる様に、高極性のエンドキャッピングを施したり、極性基をアルキル基内に埋め込んだり、C18 アルキル基の結合密度を下げたりしている。結果的に固定相の疎水性は下がり、シリカ基剤表面に水分子が近づきやすくなることにより、加水分解によるカラム劣化が促進されるので、カラムの耐久性は下がる。C30 カラムは通常の C18 カラムとほぼ同じ炭素含有量で、疎水性は低くなっていないため、C18-AQ カラムのように耐久性が下がることはない。また通常の C18 カラムを用いても図 3 に示されている様にカラム出口以降に 5 MPa の背圧がかかるような配管を接続することにより、充填剤細孔内に移動相が入っている状態であれば、ポンプを停止しない限り、100 % 水系移動相でも保持の高い再現性を得ることができる。分析終了直後から充填剤細孔内から移動相が抜け始めるが、C18 固定相を濡らすことのできる 70 % 以上の濃度の有機溶媒の入った溶液を移動相として（カラム洗浄を兼ねて）通液することで、毛管作用により充填剤細孔内にはこの移動相が入り込む。再度分析を開始する場合、カラム出口以降に 5 MPa の背圧がかかる状態で、100 % 水系移動相を通液すると、充填剤細孔内では移動相が抜けることなく置換される。このように分析終了後 70 % 以上の濃度の有機溶媒を含む溶媒を通液することにより、通常の C18 カラムでも、100 % 水系移動相を用いた再現性の高い分析が可能となる。

5 おわりに

本稿で紹介した逆相クロマトグラフィーにおける 100 % 水系移動相の使用時の問題点は 40 年以上前から議論されている。充填剤細孔内からの移動相の抜け出しなどかなりの部分が明らかになっているが、用語などの使い方は議論する余地が残されていると思われる。本稿ではアルキル鎖の立ち上がりや寝込み・倒れ込みは実際に起こっているかどうかの考察は行っていない。しかし、

オクタデカンはメタノールに溶けないが、テトラヒドロフラン (THF) には溶けることから、メタノール/水系移動相では C18 アルキル鎖は寝込んでいるが、THF/水系移動相では立ち上がると推察される¹¹⁾。

文 献

- 1) R. P. W. Scott, C. F. Simpson : *J. Chromatogr.*, **197**, 11 (1980).
- 2) R. G. Wolcott, J. W. Dolan : *LCGC North America*, **17** 316 (1999).
- 3) 長江徳和, 榎並敏行 : 分析化学, **49**, 887 (2000).
- 4) 榎並敏行, 長江徳和 : *Chromatography*, **22**, 33 (2001).
- 5) N. Nagae, T. Enami, S. Doshi : *LCGC North America*, **20**, (2002).
- 6) T. Enami, N. Nagae : *American Laboratory*, **36**, 10 (2004).
- 7) 榎並敏行, 長江徳和 : 分析化学, **53**, 1309 (2004).
- 8) 長江徳和 : 分析化学, **59**, 193 (2010).
- 9) M. Przybyciel, R. E. Majors : *LCGC North America*, **20**, 516 (2002).
- 10) R. E. Majors : *LCGC North America*, **31**, 522 (2013).
- 11) 長江徳和 : LC と LC/MS の知恵, **1**, 8 (2020).



長江徳和 (Norikazu NAGAE)

株式会社クロマニクテクノロジーズ (〒552-0001 大阪府大阪市港区波除 6-3-1)。名古屋大学工学部応用化学卒。工学博士。《主な著書》“LC/MS, LC/MS/MS のメンテナンスとトラブル解決” (分担執筆) (オーム社)。

E-mail : nagae@chromanik.co.jp



塚本友康 (Tomoyasu TSUKAMOTO)

株式会社クロマニクテクノロジーズ (〒552-0001 大阪府大阪市港区波除 6-3-1)。中部大学応用生物学研究科応用生物学専攻博士課程修了。応用生物学博士。《現在の研究テーマ》液体クロマトグラフィー用充填剤の開発。

E-mail : tsukamoto@chromanik.co.jp



小山隆次 (Ryuji KOYAMA)

株式会社クロマニクテクノロジーズ (〒552-0001 大阪府大阪市港区波除 6-3-1)。立命館大学理工学部生物工学科卒。《趣味》クロマトグラフィー。

E-mail : koyama@chromanik.co.jp

会社のホームページURL :

<http://chromanik.co.jp/>

関連製品ページURL :

http://chromanik.co.jp/pdf/Sunniest_catalog.pdf

<http://chromanik.co.jp/product/SunShell.html>

http://chromanik.co.jp/pdf/SunArmor_catalog.pdf

http://chromanik.co.jp/info/wp-content/uploads/2020/08/technical_note_S1009.pdf