

## 逆相カラム Biphenyl, PFP および PFP&amp;C18 の分離特性

長江 徳和, 塚本 友康, 小山 隆次

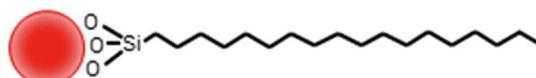
## 1 はじめに

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。しかし試料によっては、C18 カラムでは分離が難しく、他の固定相のカラムを用いると簡単に分離できる場合もある。C18 固定相と分離選択性が異なる固定相として、C30 固定相, Phenyl 固定相, Biphenyl 固定相, Pentafluorophenyl (PFP) 固定相, Cyano 固定相などが知られている。C30 固定相は 100 % 水系移動相条件でも保持時間の再現性が高い、ビタミン E の異性体の分離が可能、脂溶性の高いカロテンやトリグリセリドの異性体の分離が良いなどの特徴がある。Phenyl 固定相や Biphenyl 固定相はアルキル基型固定相にはない  $\pi$  電子を有する事が特徴で、 $\pi$ - $\pi$  相互作用や CH/ $\pi$  相互作用が働く。PFP 固定相はフェニル基に五つのフッ素原子が結合しており、 $\pi$ - $\pi$  相互作用のみならず、水素結合性、双極子相互作用、静電的相互作用が働くと言われている。Cyano 固定相は疎水性が低く、三重結合を有しているため、逆相固定相としては特異的な存在である。本稿では Biphenyl 固定相と PFP 固定相および PFP と C18 を併せ持つ PFP&C18 固定相について C18 固定相とは異なる分離特性を解説する。

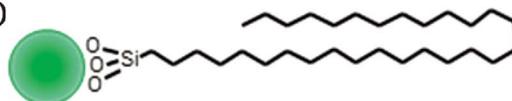
## 2 標準試料による逆相固定相の比較

図 1 に逆相固定相の模式図を示す。フェニル基系固定相はケイ素原子とフェニル基の間にスペーサーとしてアルキル基を入れる事が多いが、Biphenyl 固定相はケイ素原子に直にビフェニル基が結合している。図 2 に同一の比表面積  $340 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$  の全多孔性シリカに三官能性シリル化試薬を結合後、エンドキャッピング処理を行った C30 固定相, C18 固定相, C8 固定相, Phenyl 固定相, Biphenyl 固定相, PFP 固定相および PFP&C18 固定相による標準試料の分離と、それぞれの充填剤の炭素含有量、カフェインとフェノールの分離係数としての水素結合性、アミルベンゼンとブチルベンゼ

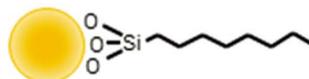
C18



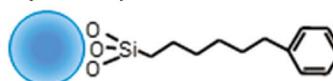
C30



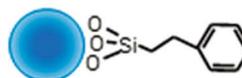
C8



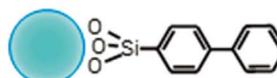
Phenyl-hexyl



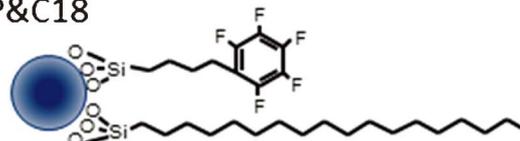
Phenethyl



Biphenyl



PFP&amp;C18



PFP

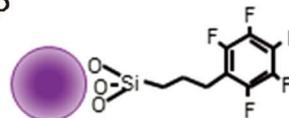
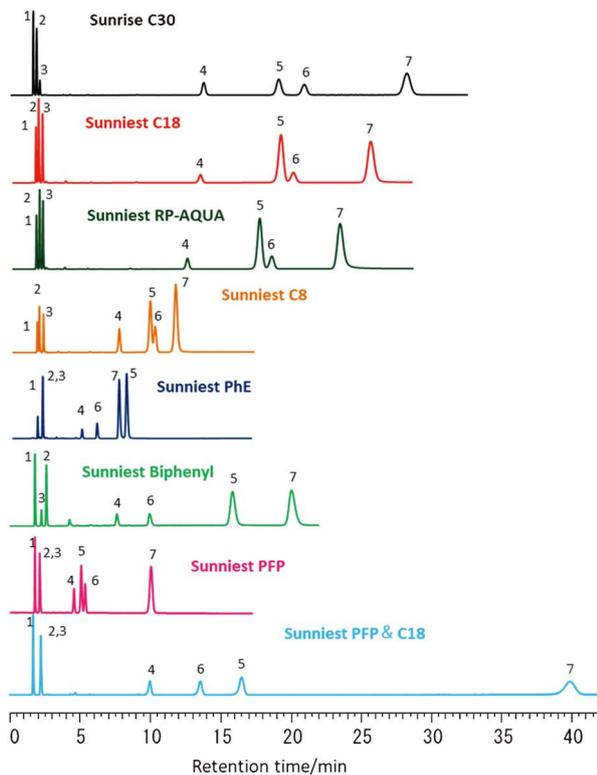


図 1 逆相固定相の模式図

ンの分離係数としての疎水性およびトリフェニレンとオターフェニルの分離係数としての立体選択性を示す。ウラシルの溶出時間をホールドアップタイムとして計算した。C30, C18 および C8 のアルキル基固定相は炭素含



固定相	炭素含有量	水素結合性 (Caffeine/ Phenol)	疎水性 (Amlybenzene/ Butybenzene)	立体選択性 (Triphenylene/ o-Terphenyl)
C30	18%	0.51	1.59	1.52
C18	16%	0.43	1.56	1.37
C8	10%	0.33	1.43	1.23
Phenyl	10%	1.00	1.34	0.92
Biphenyl	11%	1.77	1.41	1.30
PFP	10%	1.00	1.29	2.51
PFP&C18	14%	1.00	1.43	2.66

図2 標準試料の分離と水素結合性・疎水性・立体選択性  
カラム, Sunrise C30, Sunniest C18, Sunniest C8, Sunniest Phenyl, Sunniest Biphenyl, Sunniest PFP, Sunniest PFP&C18, Sunniest PFP, Sunniest PFP&C18, 150 mm × 4.6 mm i.d., 5 μm; 移動相; メタノール/水=75/25; 流速, 1.0 mL/min; カラム温度, 40 °C; 検出, UV250 nm; ピーク; 1=ウラシル, 2=カフェイン, 3=フェノール 4=p-トルベンゼン, 5=o-ターフェニル, 6=アミルベンゼン, 7=トリフェニレン。

有量の多い順番で保持が大きくなり、フェニル基、ペンタフルオロフェニル基固定相では炭素含有量の保持への効果がアルキル基固定相より低い。C8固定相とBiphenyl固定相との比較では、C8固定相の方が、炭素含有量は低いですがアミルベンゼンの保持は大きい。水素結合性はフェノールを基準としたカフェインの保持割合であり、水素結合性が大きいと極性の高い（水素結合性が強い）化合物の保持が大きくなる。これは、エンドキャッピングを施していないC18充填剤では残存シラノール基とカフェインの水素結合性による二次的相互作用が強く働くため、カフェインの保持は大きくなるが、フェノールは残存シラノール基による二次的相互作用を受け難く、大き

な保持の変化がない特性を利用したものである。PFP固定相、PFP&C18固定相、Phenyl固定相およびBiphenyl固定相は、アルキル基固定相よりも水素結合性が高い値となった<sup>2)</sup>。特にBiphenyl固定相はC18固定相と同じエンドキャッピングを施しており、残存シラノール基の影響は少ないはずであるが、エンドキャッピングを施していないC18固定相と同等か、それ以上の高い水素結合性を示した。フェノール基やビフェニル基の特性として、ベンゼン環に由来するπ電子の存在により環の中心部が最もマイナスに偏っていると考えられ、この電子の偏りが水素結合性（CH/π相互作用）を大きくしており、カフェインのような極性化合物をより強く保持するようになることが推察される。Biphenyl固定相はベンゼン環が二つ結合しており、固定相としては結晶状態になっておらず、液体に近い状態であると考えられ、二つのベンゼン環は約45度傾いて結合している。この隣接した二つのベンゼン環の相乗効果により水素結合性がより強くなっていると思われる。立体選択性の評価に用いられたトリフェニレンとo-ターフェニルは三つのベンゼン環が結合しており、トリフェニレンは三つのベンゼン環が平面的に配置しているのに対し、o-ターフェニルはそれぞれのベンゼン環はねじれた状態になっている。この立体的な差の認識（分離）度合いを立体選択性としている。アルキル基固定相ではアルキル鎖長の長い固定相程、立体選択性は高くなり、メチル基の位置異性体であるβ-トコフェロールとγ-トコフェロールは立体選択性の高いC30固定相の方がC18固定相より良い分離を示す<sup>3)</sup>。Biphenyl固定相およびPhenyl固定相については立体的な差の認識よりも、π-π相互作用が強く発揮されてトリフェニレンとo-ターフェニルが保持されていると考えられる。アルキル基固定相ではo-ターフェニルの溶出後にアミルベンゼンが溶出するが、フェニル基固定相ではπ-π相互作用によりo-ターフェニルの保持が大きくなり、アミルベンゼンとの溶出順序が逆転した。トリフェニレンの保持について、Phenyl固定相ではo-ターフェニルとトリフェニレンは同じ時間に溶出したが、Biphenyl固定相はアルキル基固定相と同様にトリフェニレンの保持が大きくなった。Phenyl固定相とBiphenyl固定相は、共にフェニル基型の固定相として分類されるが、水素結合性と立体選択性の値が大きく異なった。PFP固定相はフェニル基に五つのフッ素原子が結合し、疎水性相互作用、水素結合性、双極子相互作用、π-π相互作用および静電的相互作用が働くと考えられており、他の固定相と大きく異なる。PFP固定相とPFP&C18固定相については、ここで用いた立体選択性の値は2以上になった。これは他の固定相に比べ非常に大きな値であり、o-ターフェニルとトリフェニレンの保持についてはフェニル基型固定相と同様にアルキル基固定相とは異なる相互作用が働

いていると推察される。また、PFP&C18 固定相は PFP 固定相に C18 固定相を加えたもので、疎水性の値は C18 固定相が加わったことで増加し、保持は大きくなったが、水素結合性や立体選択性の値は PFP 固定相とほぼ同じであり、PFP&C18 固定相も PFP 固定相と同様な分離特性を有していた。PFP 固定相は PFP 独自の分離挙動を示し、特にフッ素原子の電子吸引性により、構造中の電子の偏りが生じるため、カチオンの保持が大きくなる。図3にコアシェルシリカに表面処理を施した C18 固定相と PFP 固定相の塩基性化合物の分離を示す。移動相 pH は7であり、これらの塩基性化合物はプロトン化したカチオンとして存在する。移動相中のアセトニトリル濃度は80%であり、C18 固定相では塩基性化合物をほとんど保持していないのに対し、PFP 固定相は5分から8分に溶出し、大きな保持を示した。これは静電的相互作用による保持の増大であると考えられる。このカチオンの保持を大きくしている相互作用を陽イオン交換相互作用であるとする報告<sup>4)</sup>もあるが、PFP 固定相のフッ素原子はイオン化しておらず、イオン交換は起こり得ない。また、この静電的相互作用は移動相中有機溶媒濃度が高くなる程、大きく作用し、塩基性化合物の保持時間が長くなる。この現象を HILIC モードの分離挙動であると説明されること<sup>5)</sup>もある。HILIC モードは順相モードの一部であり、移動相に有機溶媒と水溶液の混合溶媒を用いた場合を特に HILIC モードと表現している。順相モードでは移動相よりも固定相の方の極性が高く、極性の高い溶質程、保持が大きくなり、逆相とは反対になる。しかし、PFP 固定相は

有機溶媒と緩衝液の混合溶媒の移動相より疎水性が高く、さらに、塩基性化合物の保持は疎水性の高いもの程、保持時間が長くなっており、逆相の分離挙動を示している(図3)。移動相中の有機溶媒濃度の増加と共にカチオンの保持が大きくなるのは、静電的相互作用が移

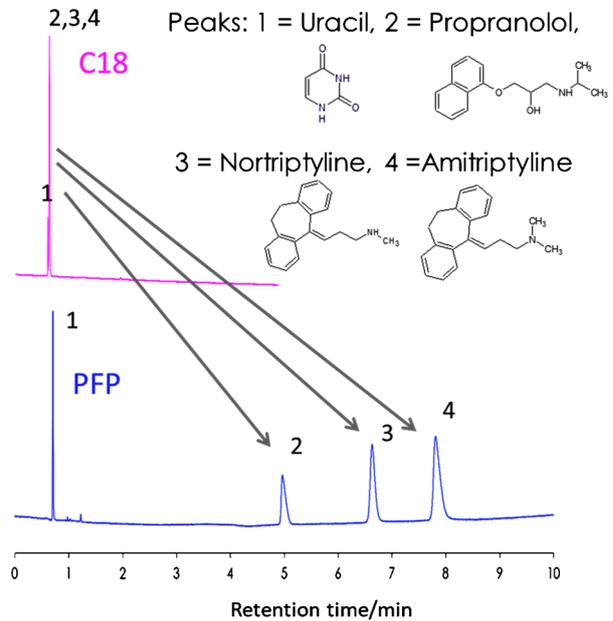
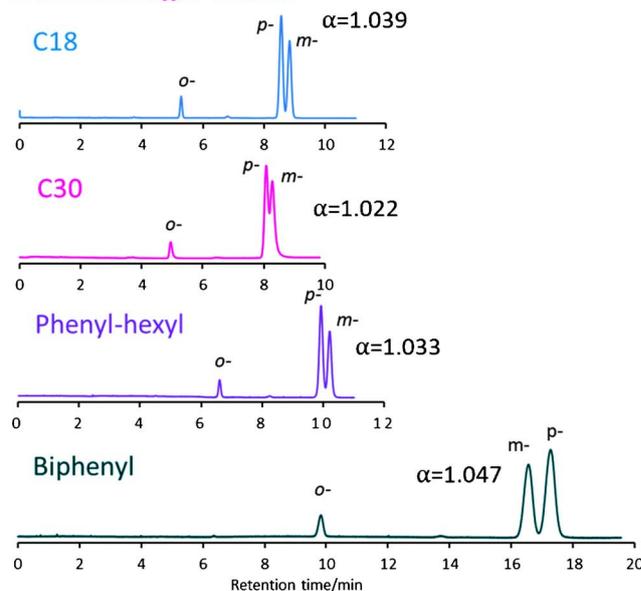


図3 C18とPFP固定相による塩基性化合物の分離  
カラム, SunShell C18, PFP, 150 mm×4.6 mm i.d., 2.6 μm; 移動相, アセトニトリル/10 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 7.0)=80/20; 流速, 1.8 mL/min; カラム温度, 25 °C; ピーク, 1=ウラシル, 2=プロプラノロール, 3=ノルトチプチリン, 4=アミトリプチリン。

Methanol/buffer=25/75



Acetonitrile/buffer=13.5/86.5

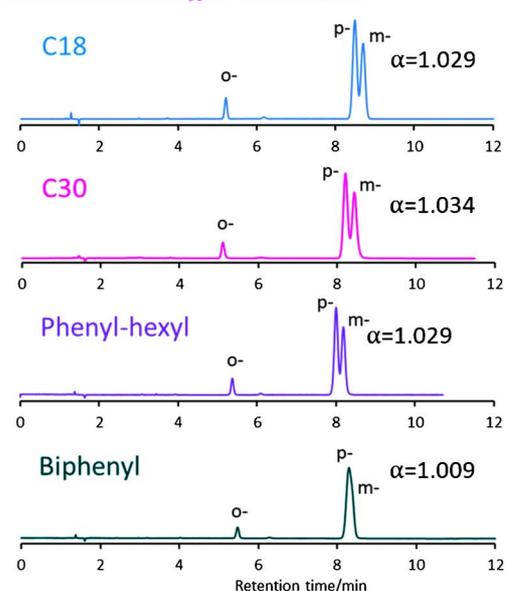


図4 メチル馬尿酸異性体の分離

カラム, SunShell C18, SunShell C30, SunShell Phenyl, SunShell Biphenyl, 150 mm×4.6 mm i.d., 2.6 μm; 移動相, 有機溶媒/25 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 3.0) 有機溶媒は図中に記載, 流速, 1.0 mL/min; カラム温度, 40 °C; 検出, UV230 nm; ピーク, o-, m-, p-メチル馬尿酸。

動相中の有機溶媒濃度が高い程、相対的に強くなる事が理由である推察され、逆相分配相互作用に二次的に静電的相互作用が加味されているものと考えられる。

### 3 Biphenyl カラムの分離例

図4に種々の固定相と移動相を用いて得られたメチル馬尿酸異性体の分離を示す。固定相としてC18, C30, Phenyl および Biphenyl を用い、移動相中の有機溶媒としてメタノールおよびアセトニトリルを用いて、それぞれの固定相の分離を比較した。メチル馬尿酸はメタ体とパラ体の異性体の分離が難しく、近接して溶出される。それぞれのクロマトグラム上にメタ体とパラ体の異性体の分離係数  $\alpha$  を示した。移動相中の有機溶媒が25%メタノールと13.5%アセトニトリルを比較すると、25%メタノールは固定相により保持時間が大きく異なり、Phenyl 固定相はC18 固定相より保持時間は長くなり、Biphenyl 固定相はさらに保持時間が長く、C18 固定相と比較し約2倍の保持時間となった。しかし、13.5%アセトニトリルではすべての固定相でほぼ同じ保持時間となった。さらに、Biphenyl 固定相におけるパラメチル馬尿酸とメタメチル馬尿酸の溶出順序に関しては、25%メタノールでは他の固定相とは溶出順序が逆転したが、13.5%アセトニトリルでは他の固定相と同じ溶出順序であった。25%メタノールでPhenyl 固定相やBiphenyl 固定相においてメチル馬尿酸の保持が大きくなったのは、 $\pi$ - $\pi$  相互作用によるものであると考えられる。アセトニトリルのCNの三重結合が固定相と溶質の間の $\pi$ - $\pi$  相互作用を弱めるため、13.5%アセトニトリルではフェニル基の特徴が発揮されず、保持時間はそれぞれの固定相で大差なく、Biphenyl 固定相でのパラ・メタメチル馬尿酸の溶出順序は逆転しなかったと推察される。

図5にC18, C30 および Biphenyl 固定相による核酸塩基類の分離を示す。核酸塩基は極性が高い為、メタノールを20%程度含む移動相では保持係数が1以下になる。有機溶媒を含まない緩衝液の移動相では、例えばチミンの保持係数は3~5程度に増大する。逆相カラムは有機溶媒濃度が5%を下回るような移動相では保持時間の再現性が低くなることが知られており、これ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により起こるものと報告されている<sup>6)</sup>。図5のC18カラムの有機溶媒を含まない10 mmol L<sup>-1</sup>の酢酸アンモニウム水溶液を移動相とした分離は、カラム出口以降に5 MPaの背圧を掛け、充填剤細孔内からの移動相が抜け出ない様になっている。3種類の固定相を比較すると、最後に溶出する成分はBiphenyl 固定相が最も大きな保持を示した。また、チミン(ピーク5)とアデニン(ピーク6)はBiphenyl 固定相のみ溶出順序が逆転した。さらにグアニンの相対的な保持はBiphenyl 固定相が特に

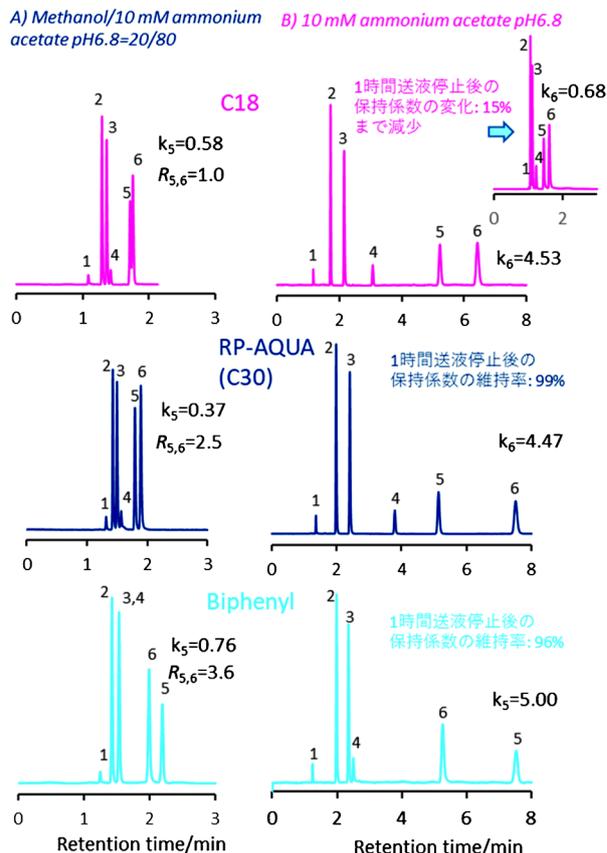


図5 核酸塩基の分離

カラム, SunShell C18 (pore size, 9 nm), SunShell RP-AQUA (C30, pore size, 16 nm), SunShell Biphenyl (pore size, 9 nm), 150 mm×4.6 mm i.d., 2.6 μm; 移動相, A) メタノール/10 mmol/L 酢酸アンモニウム (pH 6.8) = 20/80, B) 10 mmol/L 酢酸アンモニウム (pH 6.8); 流速, 1.0 mL/min; カラム温度, 40°C; 検出, UV250 nm; ピーク, 1=亜硝酸ナトリウム, 2=シトシン, 3=ウラシル, 4=グアニン, 5=チミン, 6=アデニン。

小さく、ウラシルに近い保持時間となった。これらの現象は20%のメタノールを移動相に加えた時も、100%水系移動相と同様であった。図2で示されている水素結合性が最も高いBiphenyl 固定相は、核酸塩基の保持や、溶出順序に水素結合性が大きく寄与していると考えられる。Biphenyl 固定相は $\pi$ - $\pi$  相互作用やCH/ $\pi$  相互作用<sup>7)</sup>が働くと言われているが、これらの相互作用も加味され、カフェインの保持を大きくする水素結合性が増大したと考えられる。100%水系移動相を用いた場合のポンプ停止前後の保持時間の安定性は、C30とBiphenyl 両固定相とも高く、ポンプ停止後再度通液して得られた保持時間はポンプ停止前の96%以上であった。しかし、C18 固定相ではポンプ停止後は15%まで保持時間は減少した。

図6には酒石酸、グリコール酸、ギ酸及び乳酸の分離を示す。RP-AQUA (C30) 固定相とBiphenyl 固定相の比較を行った。アルキル鎖系 (C18-AQ等) のカ

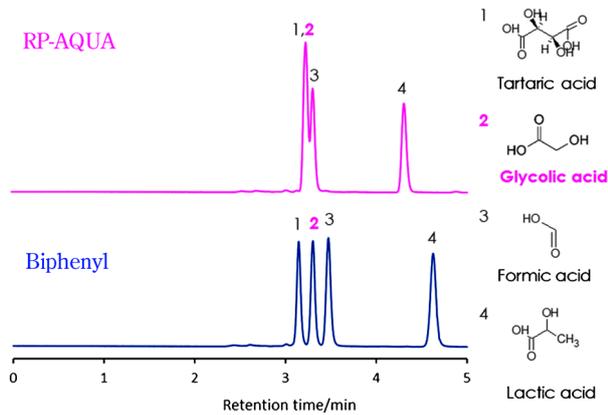


図6 グリコール酸の分離  
 カラム, SunShell RP-AQUA, SunShell Biphenyl, 150 mm×4.6 mm i.d., 2.6 μm; 移動相, 0.1 % リン酸; 流速, 1.0 mL/min; カラム温度, 40 °C; 検出, UV210 nm; ピーク, 1=酒石酸, 2=グリコール酸, 3=ギ酸, 4=乳酸。

ラムでは酒石酸とギ酸のピークが接近しており、グリコール酸はほとんどの場合酒石酸と重なる。RP-AQUA (C30) カラムも同様に酒石酸とグリコール酸は重なり、1本のピークとなった。しかし Biphenyl カラムは図6及び図9に示されている様に、酒石酸ピークとギ酸ピークは離れており、この間にグリコール酸は溶出した。Biphenyl カラムは酒石酸、グリコール酸及びギ酸の3成分の分離が可能であった。

#### 4 PFP および PFP&C18 カラムの分離例

図7には PFP 固定相、PFP&C18 固定相および C18 固定相を用いたフルオロベンゼン類の分離を示す。フルオロベンゼンとベンゼンは C18 固定相では分離不可能であるが、PFP 固定相および PFP&C18 固定相では保持時間は異なるものの十分な分離が達成された。PFP はハロゲンを含む化合物の選択性が向上した。図8にはカテコールアミン類の分離を示す。エピネフリンとレボドーパの溶出順序は PFP&C18 固定相と PFP 固定相では逆になった。PFP&C18 固定相は C18 固定相で分離を行った場合の溶出順序と同じであり、疎水性相互作用が保持に大きく寄与していると推察されるのに対し、PFP 固定相は水素結合性、双極子相互作用が保持に大きく寄与し、極性のより高いエピネフリンの保持が増大したと考えられる。図9には9種の有機酸の分離を示す。RP-AQUA (C30) 固定相、Biphenyl 固定相、PFP 固定相および PFP&C18 固定相を比較しているが、それぞれの固定相で溶出順序は異なり、それぞれの固定相が有する特異な相互作用が発揮されていると推察される。PFP 固定相と PFP&C18 固定相の比較において、保持時間は PFP&C18 固定相の方が大きくなった。これは pH3 の条件での有機酸と固定相との間で働

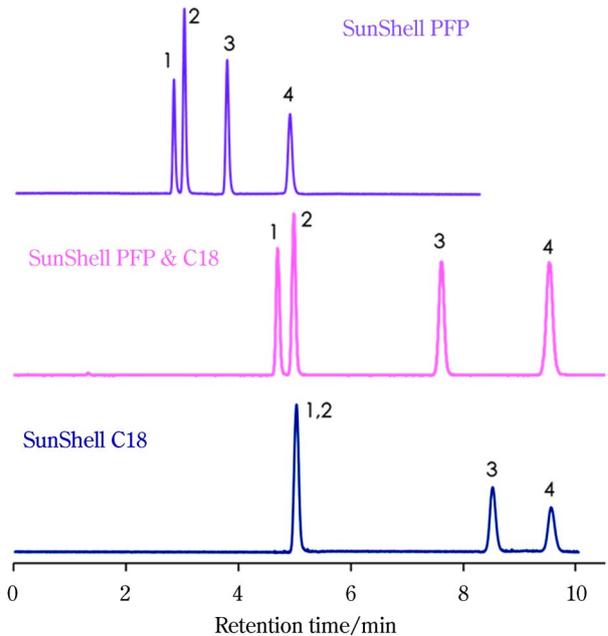


図7 フルオロベンゼン類の分離  
 カラム, SunShell PFP, SunShell PFP&C18, SunShell C18, 150 mm×4.6 mm i.d., 2.6 μm; 移動相, メタノール/水=60/40; 流速, 1.0 mL/min; カラム温度, 40 °C; 検出, UV250 nm; ピーク, 1=ベンゼン, 2=フルオロベンゼン, 3=トルエン, 4=α,α,α-トリフルオロトルエン。

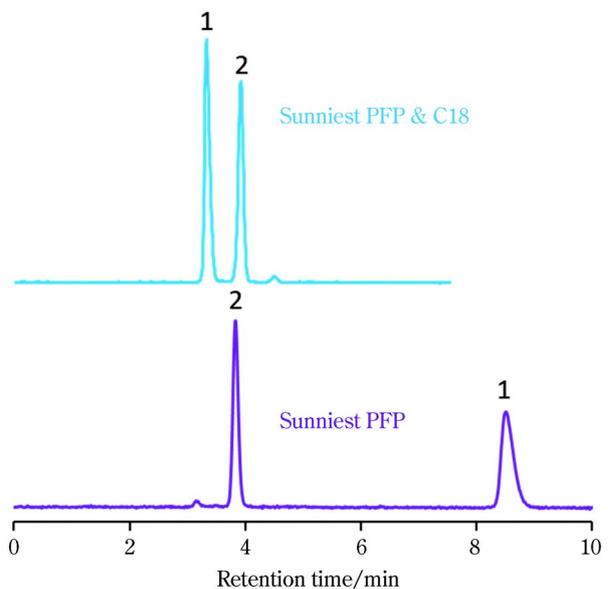


図8 カテコールアミン類の分離  
 カラム, Sunniest PFP&C18, Sunniest PFP, 150 mm×4.6 mm i.d., 5 μm; 移動相, 12.5 mmol/L ギ酸アンモニウム (pH 3); 流速, 1.0 mL/min; カラム温度, 25 °C; 検出, UV260 nm; ピーク, 1=エピネフリン, 2=レボドーパ。

く疎水性相互作用が他の相互作用よりも保持に大きく寄与したためであると考えられる。図8と9での両分離は100%水系移動相であり、極性の高い化合物の分離であるが、固定相との相互作用のかかわり方は化合物の

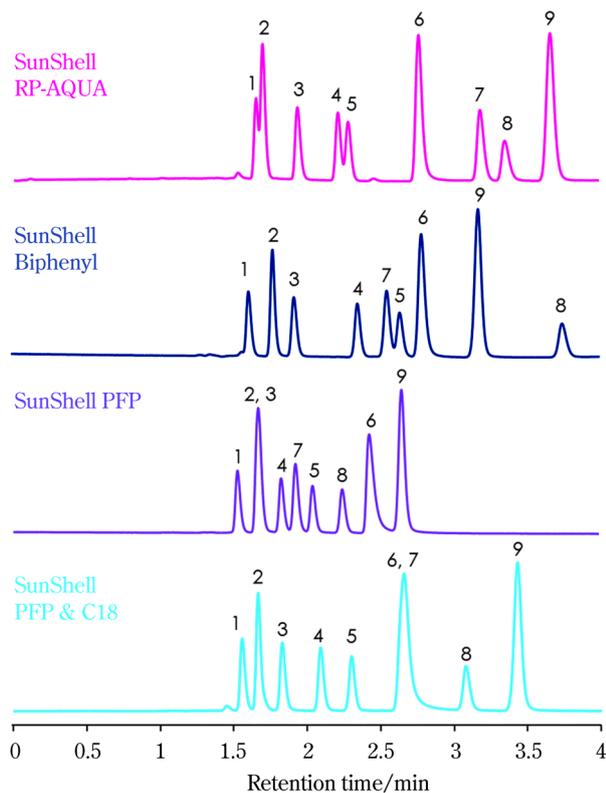


図9 有機酸の分離

4カラム, SunShell RP-AQUA, SunShell Biphenyl, SunShell PFP, SunShell PFP&C18, 150 mm×4.6 mm i.d., 2.6 μm; 移動相, 0.1% リン酸; 流速, 1.0 mL/min; カラム温度, 40 °C; 検出, UV210 nm; ピーク, 1=酒石酸, 2=ギ酸, 3=リンゴ酸, 4=乳酸, 5=酢酸, 6=マレイン酸, 7=クエン酸, 8=琥珀酸, 9=フマル酸。

性質により異なることが示された。

## 5 まとめ

本稿で紹介した Biphenyl カラム, PFP カラムと PFP&C18 カラムはそれぞれ C18 カラムにはない特徴を有しており, Biphenyl は  $\pi$ - $\pi$  相互作用や大きな水素結合性により, PFP や PFP&C18 は  $\pi$ - $\pi$  相互作用, 水

素結合性, 双極子相互作用および静電的相互作用により, C18 とは大きく異なる分離が可能である。これらのカラムは, C18 カラムを補完するカラムとして, 注目されており, 今後の応用例が期待される。

## 文献

- 1) A. Fujii, H. Hayashi, J. W. Park, T. Kazama, N. Mikami, S. Tsuzuki : *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **13**, 14131 (2011).
- 2) H. Cramer, D. S. Bell, D. Shollenberger : *LCGC Europe*, **30**, 6, 314 (2017).
- 3) 長江徳和, LC と LC/MS の知恵, **1**, 8-27 (2020).
- 4) J. Nichthauser, P. Stepnowski : *J. Chromatogr. Sci.*, **47**, 247 (2009).
- 5) D. S. Bell, A. D. Jones : *J. Chromatogr. A*, **1073**, 99 (2005).
- 6) 榎並敏行, 長江徳和 : 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **53**, 1309 (2004).



長江徳和 (Norikazu NAGAE)

株式会社クロマニックテクノロジーズ (〒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。博士(工学)。《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)

株式会社クロマニックテクノロジーズ (〒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。博士(応用生物学)。《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)

株式会社クロマニックテクノロジーズ (〒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/biphenyl\\_catalog\\_40.pdf](http://chromanik.co.jp/pdf/biphenyl_catalog_40.pdf)

[http://chromanik.co.jp/pdf/Sunniest\\_catalog.pdf](http://chromanik.co.jp/pdf/Sunniest_catalog.pdf)

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