技術紹介

株式会社クロマニックテクノロジーズ

アルキル基型逆相固定相の保持のメカニズムについて

長江　徳和，塚本　友康，小山　隆次

1　はじめに

現在は，クロマトグラフィーを最初に提唱したロシア人植物科学者 Tswett の 1903 年の論文発表から 100 年以上経過し，また 1969 年の Kirkland らによる HPLC（High Pressure Liquid Chromatography）の発表から 50 年以上経過しており，分離分析の手法としてクロマトグラフィーは欠かすことのできないものとなった。クロマトグラフィーの分離モードの中でも逆相クロマトグラフィーは使用頻度が高く汎用性の高い分離分析技術である。1970 年代から 1980 年代は基礎的な固定相の保持機構など様々な角度からの研究が行われたが，その後は新規固定相や応用例など実用的な研究が盛んになった。逆相クロマトグラフィーにおいて現在は「固定相とはどのようなものでどのように作用するものなのか。」などの基礎的な事柄は等閑になり，装置の操作方法や分離分析の応用などの実務的な事柄が重要視され，一つの基礎的な事柄として，「C18 固定相（カラム）は C8 固定相（カラム）に比べ固定相の疎水性が高いので保持が大きい。」と多くのクロマトグラファーは認識している。しかしこれは真実を正しく表現しておらず，「メタノール/水系移動相を用いた場合 C18 カラムは C8 カラムに比べ充填剤の炭素含有量が高いので保持が大きい。」，さらに「テトラヒドロフラン（THF）/水系移動相を用いた場合 C18 カラムは C8 カラムに比べアルキル鎖が長いので保持が大きい。」がより正確な表現である。

本稿では逆相カラムの保持について従来とは異なる視点から述べる。逆相クロマトグラフィーにおける保持は疎水性相互作用以外に残存シラノール基の影響やフェニル基などの固定相の π-π 相互作用などの 2 次的相互作用が働くが，疎水性相互作用のみについての議論をするために，固定相はアルキル基型とし，残存シラノール基の影響を受けない中性化合物の保持について記述する。

2　アルキル基固定相の状態

オクタデカン（$C_{18}H_{38}$）やオクタン（C_8H_{18}）のようなアルカンはメタノールに混ざり合わないことから，メタノール/水系移動相を通液した場合，固定相のアルキル基はこの移動相との接触面積が最小になる様なコンフォメーションを取ると考えられる。またこれらのアルカンは THF とは混ざり合えるため，THF/水系移動相を通液すると塊状態になっているアルキル基の内部に THF は浸透し，THF 濃度が高くなれば，アルキル基とアルキル基の間に THF が十分浸透し，アルキル基はほぼ立ち上がった状態になると考えられる。図 1 には移動相中の有機溶媒濃度と固定相（C18，C30）への有機溶媒の溶媒和量の関係[1)]を示す。また図 2 にはメタノールと THF の固定相への溶媒和状態[1)]を示す。カラムサイス 150 mm×4.6 mm ID のカラム管には，炭素含有量が 16 % の C30 充填剤および C18 充填剤は約 1.5 g 充填されており，カラム内の固定相容量は C30 と C18 両充填剤とも約 0.35 mL と計算される。図 1 の C18 充填剤への溶媒和量はメタノールが約 0.06 mL に対し THF は 6 倍の約 0.36 mL であり，C18 固定相の容量とほぼ

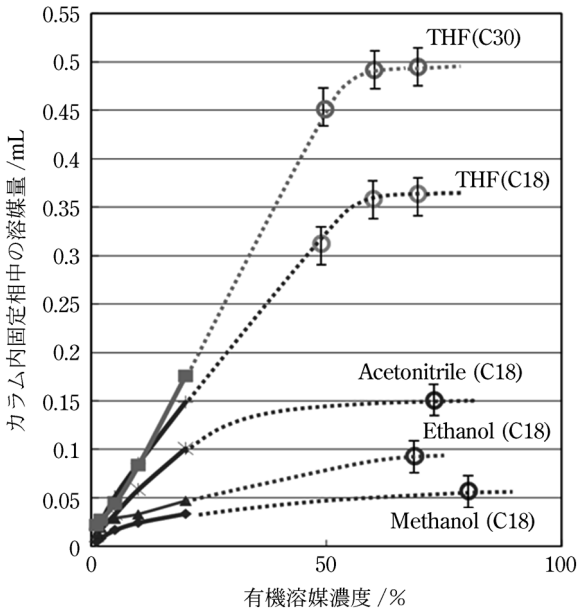

図 1　移動相中の有機溶媒濃度と固定相への有機溶媒の溶媒和量の関係
カラム，150 mm×4.6 mm i.d.，5 µm，C18（% C＝16 %），C30（% C＝16 %），10-nm 細孔径；移動相，有機溶媒/水，有機溶媒濃度は図の横軸に表示；カラム温度，40 ℃。

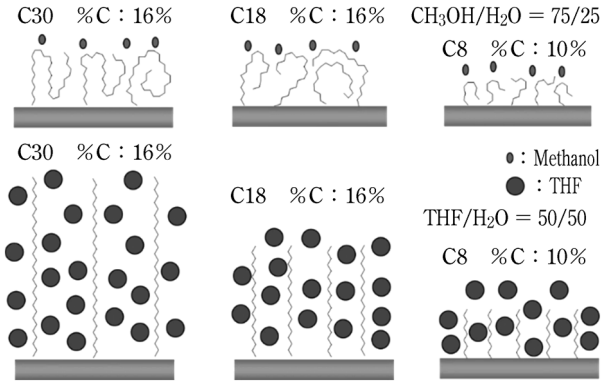

図 2　メタノールとテトラヒドロフラン（THF）の固定相への溶媒和状態

同じ量の THF が溶媒和していることになる。また C30 充填剤への THF の溶媒和量は 0.49 mL と C18 充填剤の約 1.4 倍となり，アルキル鎖長の長い分溶媒和量も増えたことになる。このような事から，図 2 に示されたような固定相の状態が推察される。

3　メタノール/水系移動相を用いた時のアルキル基固定相の保持力

3･1　疎水性の比較的高い化合物の保持

逆相クロマトグラフィーで使用されるアルキル基固定相は C30，C18，C8，C1（TMS，トリメチルシリル化）等があり，それぞれのアルキル基の疎水性により保持力が決まると多くのクロマトグラファーが考えている。「C18 固定相は C8 固定相より疎水性が高いので，C18 カラムの方が C8 カラムより保持が大きい。」ともしばしば言われている。実際に同じ平均細孔径 12 nm，比表面積 340 m^2/g のシリカ基材から製造されエンドキャッピングを施した C18 カラムと C8 カラムをメタノール/水移動相を用いて比較すると，C18 カラムの方が C8 カラムよりも保持が大きくなる。しかし同様に C30 カラムと C18 カラムを比較すると，C30 トリアコンチル基は嵩（かさ）高く，結合密度が上がらず，結果として C30 充填剤は C18 充填剤とほぼ同じ炭素含有量となり，C30 カラムと C18 カラムの保持はほぼ同じであった。それぞれの充填剤の炭素含有量を比較すると，C30 充填剤は 18 %，C18 充填剤も 18 %，C8 充填剤は 11 % であった。また，C18 オクタデシル基の結合密度を敢えて低くし，炭素含有量を 11 % とした C18 充填カラムは，炭素含有量 11 % の C8 カラムとほぼ同じ保持であった。以上のことから保持力はアルキル鎖長ではなく充填剤の炭素含有量でほぼ決まることが分かる。

表 1 にメタン，オクタン，オクタデカンおよびトリアコンタンの疎水性（LogP）と水への溶解度を示す。LogP は n−オクタノールと水への分配濃度比の対数である。オクタンとオクタデカンの LogP の差は 4，オクタデカンとトリアコンタンの LogP の差は 4.91 である。これは n−オクタノールと水への分配濃度比が 10,000 倍以上異なることを示しており，非常に大きな疎水性の差になる。しかし水への溶解度がオクタデカンおよびトリアコンタンは極端に低いことから，この水への溶解度の低さが疎水性に大きく反映していると考えられる。実際の逆相クロマトグラフィーの保持はブチルベンゼンの様な溶質の移動相と固定相への分配量比により決まるのであって，オクタデシル基固定相自体の水への分配や溶解度は溶質の保持には無関係である。

表 1　メタン，オクタン，オクタデカン，トリアコンタンの疎水性と水への溶解度

	Methane (C1)	Octane (C8)	Octadecane (C18)	Triacontane (C30)
疎水性（Log P）	1.09	5.18	9.18	14.09
水への溶解度 (mg/L)	22.6	0.66	0.006	8.84×10^{-10}

固定相と移動相への溶質の分配が主な分離機構とされる逆相クロマトグラフィーにおける保持係数 k と溶質の固定相と移動相への分配比 K_D は以下の式で示される。

$$k=\frac{S}{M}=\frac{S_D\times V_S}{M_D\times V_M}$$

$$K_D=\frac{S_D}{M_D}$$

$$K=K_D\times\frac{V_S}{V_M}$$

S は固定相中の溶質の存在量，M は移動相中の溶質の存在量，S_D は固定相中の溶質の分配濃度，M_D は移動相中の溶質の分配濃度，V_S は固定相の体積（容積），V_M は移動相の容積である。保持係数 k は分配比 K_D とは異なり，保持係数は固定相と移動相への溶質の分配量の比であるのに対し，分配比は固定相と移動相への溶質の分配濃度比である。したがって，上記の保持係数の式にある様に保持係数は分配比に固定相の体積（容積）を乗じ，移動相の容積を除したものである。異なる炭素含有量の C18 充填剤を製造した場合，同じ C18 固定相であるので，分配比は同じであると仮定すると，固定相と移動相の体積（容積）比が保持係数にかかわってくる。つまり固定相と移動相の体積比（固定相体積/移動相体積）が 1/2 になると保持係数も 1/2 になる。表 2 に炭素含有量 18 % と 11 % の C18 充填剤と 11 % の C8 充填剤の結合密度，固定相体積および移動相体積を示す。これらの値から表 2 の 3 種の充填剤の保持係数と分配比の関係を以下に示す。

C18 と C8 固定相分配比（K_D）は

$$K_{D_{C18}},\ K_{D_{C8}},\ K_D=\frac{S_D}{M_D}$$

表 2　C18 カラムと C8 カラム物性値

固定相	炭素含有量	結合密度	固定相体積	移動相体積
C18(A)	18 %	2.3 μmol/m²	0.4 mL	1.6 mL
C18(B)	11 %	1.2 μmol/m²	0.23 mL	1.77 mL
C8	11 %	2.4 μmol/m²	0.23 mL	1.77 mL

C18(A)の場合

$$K_{\mathrm{C18}} = \frac{S}{M} = \frac{S_{\mathrm{D}} \times V_{\mathrm{S}}}{M_{\mathrm{D}} \times V_{\mathrm{M}}} = \frac{S_{\mathrm{D}} \times 0.4}{M_{\mathrm{D}} \times 1.6}$$

$$= \frac{S_{\mathrm{D}}}{M_{\mathrm{D}}} \times 0.25 = 0.25\, K_{\mathrm{D_{C18}}}$$

C18(B)の場合

$$K_{\mathrm{C18}} = \frac{S}{M} = \frac{S_{\mathrm{D}} \times V_{\mathrm{S}}}{M_{\mathrm{D}} \times V_{\mathrm{M}}} = \frac{S_{\mathrm{D}} \times 0.23}{M_{\mathrm{D}} \times 1.77}$$

$$= \frac{S_{\mathrm{D}}}{M_{\mathrm{D}}} \times 0.13 = 0.13\, K_{\mathrm{D_{C18}}}$$

C8 の場合

$$K_{\mathrm{C8}} = \frac{S}{M} = \frac{S_{\mathrm{D}} \times V_{\mathrm{S}}}{M_{\mathrm{D}} \times V_{\mathrm{M}}} = \frac{S_{\mathrm{D}} \times 0.23}{M_{\mathrm{D}} \times 1.77} = \frac{S_{\mathrm{D}}}{M_{\mathrm{D}}} \times 0.13$$

$$= 0.13\, K_{\mathrm{D_{C18}}}$$

炭素含有量 18 % と 11 % の C18(A) と C18(B) の保持係数 k はそれぞれ $0.25K_{\mathrm{DC18}}$ と $0.13K_{\mathrm{DC18}}$ となり，同じ C18 固定相であれば炭素含有量が異なっても K_{DC18} 値は同じであるとすると，保持係数については，C18(A) は C18(B) のほぼ 2 倍になり，これは実験結果と一致する。また，同じ炭素含有量 11 % の C18(B) と C8 を比較すると，保持係数はそれぞれ $0.13K_{\mathrm{DC18}}$ と $0.13K_{\mathrm{DC8}}$ となる。実験結果は両カラムでほぼ同じ保持係数を示したことから，C18 と C8 の分配比 K_{DC18} と K_{DC8} はほぼ同じ値となる。これは例えば溶質としてのベンゼンにペンチル基が結合したアミルベンゼンから見れば，メタノール/水移動相と C18 固定相への分配比率は，メタノール/水移動相と C8 固定相への分配比率と同じであり，オクタデカンとオクタンの疎水性を比較すれば，当然ながらオクタデカンの方が高いが，アミルベンゼンの分配比率から比較した場合には，C18 固定相と C8 固定相には大きな差がないことになる。同じ炭素含有量 18 % の C30 充填剤と C18 充填剤も保持がほぼ同じことから，同様に，C30 固定相と C18 固定相もアミルベンゼンの分配比率から比較した場合には，大きな差がないことになる。極端な例として，同じシリカ基材を用い炭素含有量が 11 % になる様に結合量を調整した C30 カラム，C18 カラム，C8 カラムは，すべてのカラムでアミルベンゼンはほぼ同じ保持を示すことになる。アルキル鎖長の異なる固定相は，炭素含有量が同じであれば，アミルベンゼンの様な溶質の保持はほぼ等しくなる。しかし選択性は固定相により当然異なり，ある固定相が分離できる成分が他の固定相では分離できない場合や，溶出順序が逆になる場合もある。

表 3　C30, C18, C8, C1 固定相の炭素含有量と疎水性

固定相	炭素含有量	分離係数 α(アミルベンゼン/ブチルベンゼン)	保持係数 アミルベンゼンの保持係数
C30	18 %	1.72	18.9
C18	18 %	1.68	19.7
C8	11 %	1.55	9.4
C1	4.5 %	1.43	2.3

固定相：シリカ基材の細孔径，12 nm，一官能性試薬＋エンドキャッピング，移動相：メタノール/水＝70/30，温度：30 ℃

3･2　アルキル基固定相の炭素一個分の差の認識力

逆相固定相(カラム)の疎水性を比較するパラメーターとして，アミルベンゼンの保持係数（保持時間）や炭素一個分の差の有るアミルベンゼンとブチルベンゼンの分離係数を用いて分離特性等の議論がされている。表 3 には同じシリカ基材に一官能性シリル化試薬を結合後，同じエンドキャッピングを施した C30，C18，C8 および C1 固定相の炭素含有量，疎水性としてアミルベンゼンとブチルベンゼンの分離係数，更にアミルベンゼンの保持係数を示す。前項で記述している様に C30 固定相と C18 固定相は炭素含有量が同じ 18 % であり，アミルベンゼンの保持係数もほぼ同じであった。C8 固定相は炭素含有量が 11 % でアミルベンゼンの保持係数は C18 固定相に比べ約半分であった。疎水性のもう一方の指標であるアミルベンゼンとブチルベンゼンの分離係数は，アルキル鎖長が短い程小さくなった。これはアルキル鎖長が長い程疎水性が高いことを示している様に見える。これはアミルベンゼンの保持係数が固定相ごとに異なっており，保持時間が大きく異なる条件でのアミルベンゼンとブチルベンゼンの分離係数を比較している。保持係数（k）と分離度（R）の関係を以下に示す。

$$R_{\mathrm{S}} = \frac{1}{4}\sqrt{N}\left(\frac{\alpha - 1}{\alpha}\right)\left(\frac{k}{k+1}\right)$$

N は理論段数，α は分離係数である。この式は保持係数 k の値により分離度が変わることを示している。そこで同じ移動相条件ではそれぞれの固定相で保持時間が大きく異なるので，移動相の有機溶媒濃度を変え，同じ保持時間で比較を行った。C30，C18，C8 および C1 カラムを用いエチルベンゼンの保持時間が約 8.2 分になる様に移動相中のメタノール濃度を調整した時の標準試料のクロマトグラムを図 3 に示す。炭素一個分の差であるエチルベンゼン（ピーク 6）とトルエン（ピーク 4）のピー

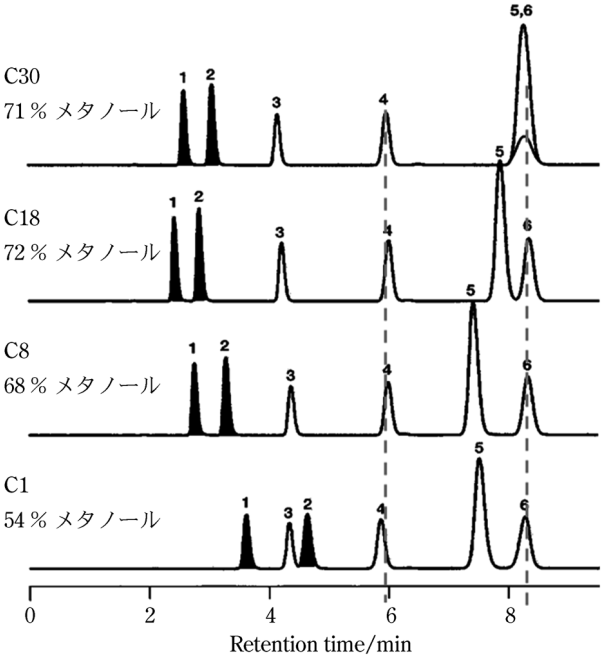

図 3　エチルベンゼンの保持時間を合わせた場合の標準試料の分離
カラム，固定相は図中に表示，150×4.6 mm i.d.；移動相，メタノール/水，有機溶媒濃度は図中に表示；流速，1.0 mL/min；カラム温度，30 ℃；ピーク，1＝メチルパラベン，2＝エチルパラベン，3＝ベンゼン，4＝トルエン，5＝ナフタレン，6＝エチルベンゼン。

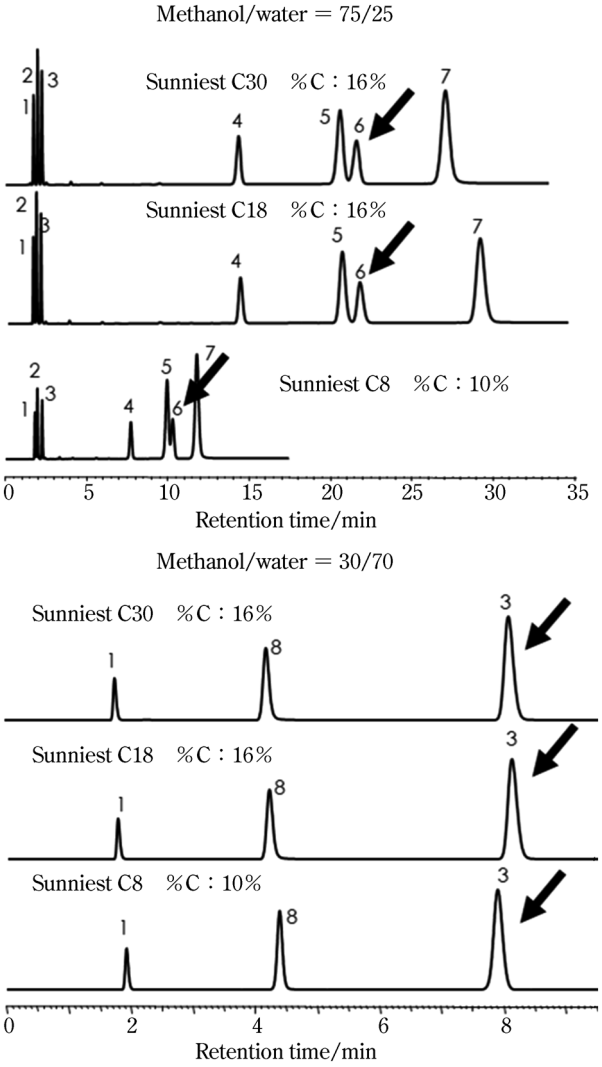

図 4　アミルベンゼンとフェノールの保持の比較
カラム，カラム名は図中に表示，150×4.6 mm i.d.；移動相，メタノール/水，有機溶媒濃度は図中に表示；流速，1.0 mL/min；カラム温度，40 ℃；ピーク，1＝ウラシル，2＝カフェイン，3＝フェノール，4＝ブチルベンゼン，5＝*o*-ターフェニル，6＝アミルベンゼン，7＝トリフェニレン，8＝ピリジン。

クを比較すると，すべてのカラムでほぼ同じ溶出時間であった。このことは同じ保持時間になる様に調整した条件下では，どの固定相でも炭素一個分の差をもつ化合物の分離係数は同じになり，炭素一個分の差を認識する能力は同じであることを意味している。炭素一個分の差をもつ化合物の分離係数を疎水性のパラメーターとした場合，同じ移動相条件では炭素含有量が高く保持時間が長くなる程，疎水性が高い傾向があるが，保持時間が一定になる様に移動相条件を調節すると，炭素含有量やアルキル鎖長に関係なく，疎水性はすべての固定相で同じであった。前項でも述べたが，それぞれの固定相で分離選択性は異なるため，図 3 に示されている極性の高いメチルパラベンやエチルパラベンおよび二重結合の多いナフタレンの保持時間や溶出パターンは固定相間で異なっている。特に C1 固定相ではエチルパラベンはベンゼンより長い保持時間であり，溶出順序が逆転した。

3･3　極性の比較的高い化合物の保持

図 4 には標準試料の分離をメタノール濃度の異なる移動相を用いて比較した。前項で述べたように炭素含有量が同じ C30 カラムと C18 カラムのアミルベンゼンの保持時間はほぼ同じであり，炭素含有量の低い C8 カラムのアミルベンゼンの保持時間はほぼ半分であった。3 番のフェノールに着目すると，メタノール/水＝75/25 移動相では保持時間が 2 分台で保持自体は非常に小さいが，3 種のカラムともほぼ同じ保持の様に見える。メタノール/水＝30/70 移動相を用いて，フェノールの保持時間を長くして比較すると，アミルベンゼンとは異なり，C30，C18 および C8 カラムでほぼ同じ 8 分前後の保持時間を示した。このことはアミルベンゼンとフェノールでは固定相との相互作用が異なることを意味している。図 5 には溶質が相互作用する固定相の部位の模式図を示す。アミルベンゼンはオクタデカンやオクタンに可溶で，固まった固定相内部に入り込むことができるが，極性が高くなったフェノールの場合は，オクタデカンやオクタンに難溶になるため，溶媒和している固定相の表面が主な相互作用場となる。したがって同じシリカ基剤を用いた C18 カラムと C8 カラムでは，炭素含有量

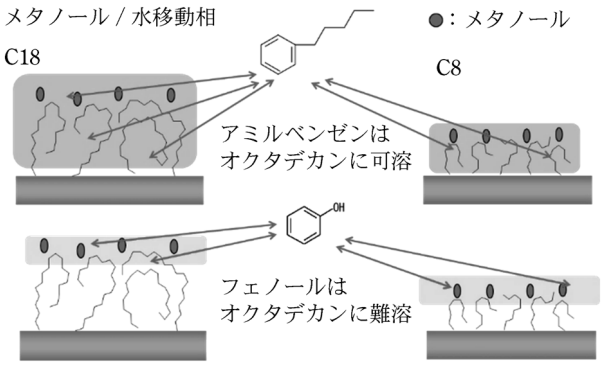

図 5　溶質が相互作用する固定相の部位

が異なり，固定相全体で相互作用するアミルベンゼンの保持時間は異なるが，固定相表面の面積は大差ないため，フェノールの保持時間はほぼ同じであったと推察される。巨大分子のタンパク質は固定相の表面と相互作用すると考えられ，高極性化合物の分離挙動がタンパク質と同様になった実験結果[2)]からもフェノールのような極性化合物は固定相表面が主な相互作用場であることが肯定された。

4　THF/水系移動相を用いた時のアルキル基固定相の保持力

図 6 にはメタノール/水系および THF/水系移動相を用いた場合の分離を示す。炭素含有量が同じ C30 カラムと C18 カラムのアミルベンゼンの保持の比較において，メタノール/水系移動相では今まで述べてきた様に保持の差はほとんどないが，THF/水系移動相では C30 カラムは C18 カラムより大きな保持を示し，C8 カラムは最も小さな保持であった。これは図 2 に示されている様に THF は固定相内部に浸透し，THF 濃度が 50 % になるとほぼアルキル基が立ち上がった状態になる。また保持しない溶質の溶出時間（ホールドアップタイム）が THF の溶媒和量の増加量に伴い減少することから，溶媒和した THF は移動相としてではなく，固定相として働いている事が示されている。溶媒和した溶媒とアルキル基全体が固定相として働くため，アルキル鎖長の最も長い C30 固定相が最も固定相容量が大きくなり，固定相への溶質の分配量も多くなることから，保持がもっとも大きくなったと考えられる。また THF/水系移動相はメタノール/水系移動相に比べ，溶出順序が大きく異なり，選択性の変化が大きいが，これは移動相が変わっただけでなく，THF の溶媒和量がメタノールに比べ多いことと，固定内部に浸透していることから，固定相自体が変化したと考えられ，その結果分離選択性が大きく変化したと推察される。

5　ま　と　め

アルキル基型逆相カラムは固定相の種類ではなく，固定相の容量で保持がほぼ決まることを明らかにした。メタノール/水系移動相では充填剤の炭素含有量が，THF/水系移動相ではアルキル鎖長が保持の増減に大きくかかわる事も明らかにした。炭素一個の差を認識する能力は保持を同じにすればアルキル鎖長に関係なくどの固定相も同じことや，溶質の極性の度合いにより相互作用が働く固定相の部位が異なることを認識する事が，今後の逆相モードの分離分析方法開発へのヒントにつながれば幸いである。

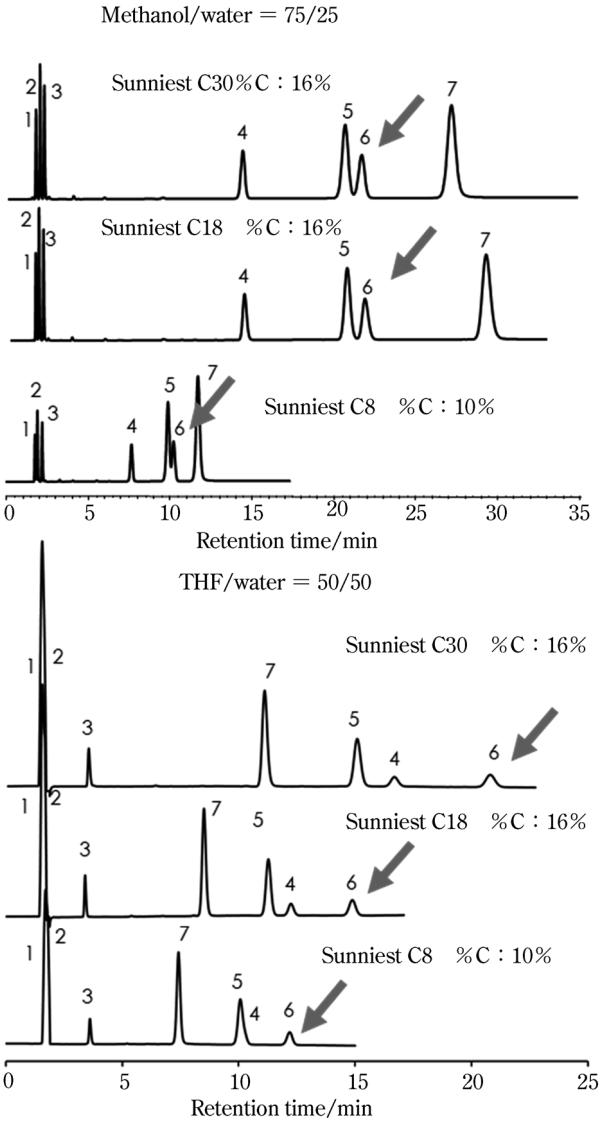

図 6　メノール/水系および THF/水系移動相を用いた分離
移動相は図中に表示，他の条件は図 4 と同じ。

文　献

1）長江徳和：LC と LC/MS の知恵，**1**, 8（2020）.
2）長江徳和：JASIS2020，クロマニックテクノロジーズ新技術説明会.
(http://chromanik.co.jp/info/wp-content/uploads/2020/12/jasis2020s_c.pdf)（2021 年 6 月 15 日，最終確認）.

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/Sunniest_catalog.pdf
http://chromanik.co.jp/product/SunShell.html

原　稿　募　集

「技術紹介」の原稿を募集しています

対象：以下のような分析機器，分析手法に関する紹介・解説記事
1）分析機器の特徴や性能および機器開発に関わる技術，2）分析手法の特徴および手法開発に関わる技術，3）分析機器および分析手法の応用例，4）分析に必要となる試薬や水および雰囲気などに関する情報・解説，5）前処理や試料の取扱い等に関する情報・解説・注意事項，6）その他，分析機器の性能を十分に引き出すために有用な情報など

新規性：本記事の内容に関しては，新規性は一切問いません。新規の装置や技術である必要はなく，既存の装置や技術に関わるもので構いません。また，社会的要求が高いテーマや関連技術については，データや知見の追加などにより繰り返し紹介していただいても構いません。

お問い合わせ先：
日本分析化学会『ぶんせき』編集委員会
〔E−mail : bunseki@jsac.or.jp〕