

液体クロマトグラフィー (1)

渋川 雅美

1 はじめに

クロマトグラフィーは二相間における物質の分配、あるいは一つの相から界面への吸着の大きさの差を利用し、一方の相を他方に対して相対的に移動させることにより、混合物をその成分物質に分離する方法である。二つの混じり合わない液相を互いに反対方向に移動させて分離を行う向流クロマトグラフィーを除いては、一般に一方の相（または界面）を固定することが多いので、これを固定相と呼び、移動する相を移動相という。液体クロマトグラフィーは移動相が液体であるクロマトグラフィーであり、生化学物質やイオン性の化学種も含めてほぼすべての物質の分離を行うことができる。また、高感度検出器と高い流量精度で移動相の送液を可能にするポンプを利用する高速液体クロマトグラフィー (high-performance liquid chromatography, HPLC) は、高精度かつ高感度な定性分析・定量分析を可能にする。このため、液体クロマトグラフィーは幅広い領域で利用される現代社会に不可欠な分析法となっている。

液体クロマトグラフィーは、分離機構に基づいて分配クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィーの四つに大別されることが多い。このうち、固定相に比べて高極性の移動相を用いる分配クロマトグラフィーである逆相液体クロマトグラフィー (reversed-phase liquid chromatography, RPLC) は、あらゆる液体クロマトグラフィー分析の90%以上を占めているとされる¹⁾。本稿では、最初にHPLC装置の概略とクロマトグラフィー分離を表現するパラメータについて述べた後、RPLCを中心にして、液体クロマトグラフィーにおける分離機構をどのように考えるべきか、ピークの広がりや歪みはなぜ生じるのか、そして化学反応を用いてどのようにして分離を向上させることができるのかなどについて、最近の研究結果も含めて2号にわたって解説する。

2 HPLC 装置

2.1 基本的構成

HPLCでは、固定相あるいは固定相を担持した固体粒子をステンレス製などのクロマト管に充填したカラムに移動相溶液を送液して分離が行われる。HPLCに用いられる装置(クロマトグラフ)の基本的構成を図1に示す。移動相溶液(溶離液)は送液ポンプによってカラムに送り込まれるが、カラム入口直前で試料溶液が移動相の流れに導入される。試料溶液中の各成分は、固定相に対する親和性が大きいほどカラム内での移動速度が遅くなるので、各成分の移動速度に差があれば、カラム出口で分離されて出てくることになる。

カラムからの流出液を検出器で連続的にモニタリングして得られる測定データ、すなわちクロマトグラムを図2

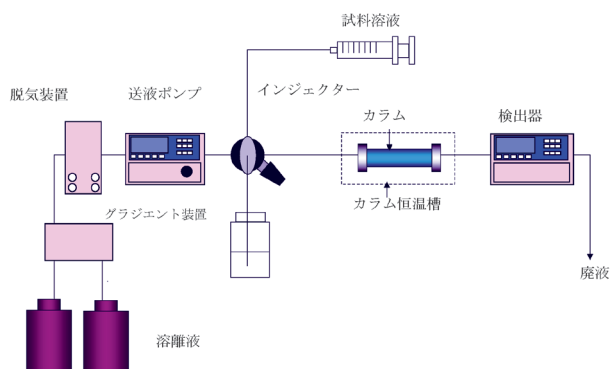


図1 HPLCの基本的構成

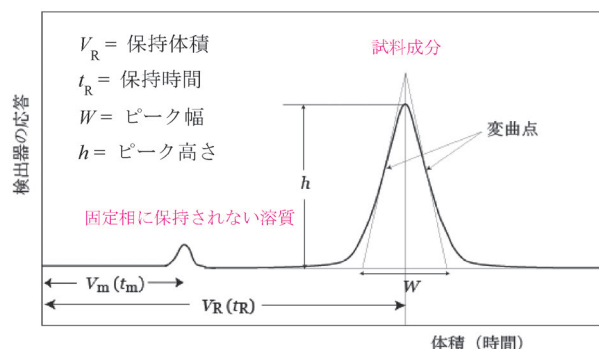


図2 クロマトグラム

に示す。カラムに注入した試料溶液中の溶質がカラムから溶離するのに要する時間を保持時間 (t_R) と呼び、またその時間に流れた移動相の体積を保持体積 (V_R) という。

2.2 送液ポンプ

HPLC による定性分析は保持時間によって、また定量分析は図 2 の各成分の溶出ピークの面積、すなわち検出器の応答（一般に出力電圧×時間 ($\mu\text{V s}$) で表される）によって行われるので、真度および精度ともに高い分析を行うために、ポンプには高い流量精度が求められる。ポンプには一つの大きなシリンジに溶離液を入れ、それをプランジャーの押し出しによって送液するシリンジ型あるいはワンストローク型と呼ばれるものと、小型プランジャーの往復運動によって吸引と吐出を繰り返すプランジャー型または往復動型と呼ばれる構造のものがあるが、通常の数 mm 以上の内径を持つカラムを使用する HPLC では、送液量に制限のない後者のポンプが使用される²⁾³⁾。

往復動型ポンプの場合、ポンプ吸引から吐出、および吐出から吸引への切り替わりの際に移動相流量の変動（脈流）を生むことになる。しかし、現在では複数のプランジャーを駆動させたり、圧力変動を抑制するダンパーを使用したりすることによって、脈流を最小限に抑制することが可能になっており、高い吐出圧力（100 MPa 以上）で、流量の変動係数も 0.1 % 以下の往復動型ポンプが市販されている。一方、内径が 100 μm 以下のキャピラリーカラムを用いるナノ液体クロマトグラフィーでは、送液量が小さいので、一般にシリンジ型ポンプが使用される。

2.3 試料注入装置

HPLC の定量分析の精確さを左右するもう一つのパーツは、試料注入装置（インジェクター）である。手動で試料溶液を移動相の流路に注入するマニュアルインジェクターと多数の試料溶液を自動で注入するオートサンプラーがあるが、いずれも試料溶液を再現性よく常に一定の体積で注入することが要求される。現在 HPLC で一般的に使用されているバルブ切替方式のマニュアルインジェクターの構造と動作の模式図を図 3 に示す²⁾⁴⁾。移

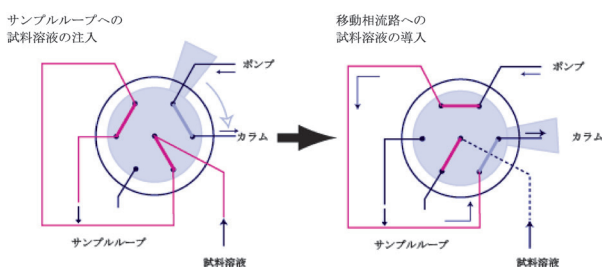


図 3 マニュアルインジェクター

動相の流路からサンプルループが切り離された状態で試料溶液をループ内に満たし（図 3 左）、次いでバルブを切り替えて、流路内にサンプルループを接続することによって（図 3 右）試料溶液をカラムへと導く。この方法は、試料注入量の再現性が高く（変動係数が 0.1 % 以下）、耐圧性に優れているため、オートサンプラーも基本的にこの原理および構造を利用しているものが多い。ただし、導入するバルブ内部の接液部は試料成分の吸着などが生じない材質で構成される必要があるほか、試料溶液が残存することなく、全量が速やかにカラム入口に移動する構造が求められる。

2.4 検出器

HPLC 用の検出器は、カラムから溶出した試料成分を検出してデータ処理装置へ信号を出力し、クロマトグラムを得るという役割を担う。したがって、高感度であること、試料分量または濃度と信号強度との間の直線関係が広い濃度範囲で成立すること、検出セルやそれに接続する流路内での溶質バンドの広がりが小さい構造を持つこと、検出応答が速いことなどが基本的条件として要求される²⁾⁵⁾。最も汎用される紫外可視吸光検出器のほか、示差屈折率検出器、蛍光検出器、電気化学検出器など、分析対象成分の種類や目的によって、種々の検出器が利用される。試料成分の光吸収を利用する検出器は、通常カラムからの溶出液が図 4 に示したようなフローセルを試料成分が通過するときの吸光度を測定する。一般的な HPLC 用としては、光路長 5~10 mm、容量が 3~20 μL 程度のもが多く採用されているが、ナノ液体クロマトグラフィー用には 1 μL 以下の小容量のものも用意されている。

また、分析成分の定性的な情報を得ることを可能にする検出器も使用することができる。たとえば、紫外可視吸収スペクトルを得るフォトダイオードアレイ検出器や質量スペクトルを得る質量分析計などが、その例である。

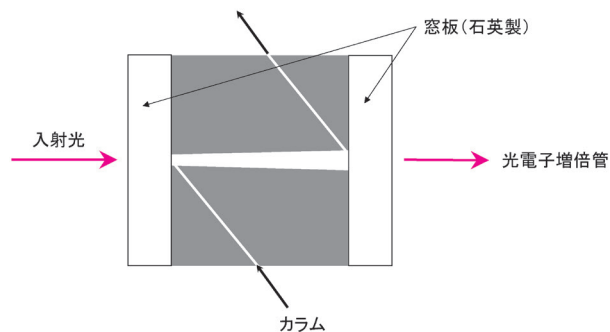


図 4 紫外可視吸光検出器の Z 型フローセル

3 液体クロマトグラフィー分離の基礎

3.1 分配係数と保持係数

移動相の流れの中に注入された溶質が固定相に分配も吸着もしないならば、その溶質は移動相と同じ速さでカラム内を移動し、その保持体積はカラム内の移動相体積 (V_m) と等しくなる (図 2)。ただし、インジェクターから検出部までの移動相体積を測定しているときには、カラム外の配管内部の体積もこれに含まれる。

溶質は保持時間の一部を移動相内で費やし、残りを固定相内で費やすので、その保持体積は分配係数 (K_D) によって決まり、以下のように表される。

$$V_R = V_m + K_D V_s \dots\dots\dots (1)$$

ここで、 V_s は固定相の体積である。 K_D は固定相における溶質濃度 (c_s) と移動相における溶質濃度 (c_m) の比として定義される (式 (2))。

$$K_D = \frac{c_s}{c_m} \dots\dots\dots (2)$$

移動相の流量 (体積/時間、たとえば mL min^{-1} など) を F とすると、溶質の保持時間は式 (3) で表される。

$$t_R = \frac{V_R}{F} \dots\dots\dots (3)$$

したがって異なる溶質は、それぞれの分配係数に依存して異なる保持体積および保持時間でカラムから溶離してくることになる。分配係数は、ある系における移動相と固定相との間での溶質の分布を示しており、カラムの大きさに依存しないので分離機構を議論するときの基本となる保持パラメータである。しかし、固定相の構造が明らかでないときや、特定のカラムの保持特性を示すことが目的であるときは、次式で定義される保持係数 k を用いるのが便利である。

$$k = \frac{n_s}{n_m} = K_D \frac{V_s}{V_m} = \frac{V_R - V_m}{V_m} \dots\dots\dots (4)$$

ここで n_s および n_m は、それぞれ固定相および移動相に存在する溶質の全量 (物質質量 (mol)) を示す。液体クロマトグラフィーによって分配係数を測定するには移動相と固定相の体積の両方のカラムパラメータを知る必要があるが (式 (1) 参照)、保持係数は移動相体積が得られていれば溶質の保持体積から計算できることがわかる。しかし、固定相体積はもとより、移動相体積も正しく測定することは一般に困難である。このため、固定相に保持されない ($K_D = 0$) と仮定される分子やイオンをマーカーとして移動相体積を測定することが多い。保持係数を決定するときは、どのような方法で移動相体積を求めたのかを必ず示しておかなくてはならない⁶⁾⁷⁾。

3.2 分離度と理論段数

クロマトグラフィーにおける 2 成分の分離の程度は、一般に次式で定義される分離度 R_s によって表される。

$$R_s = 2 \left(\frac{t_{R_2} - t_{R_1}}{W_1 + W_2} \right) = 2 \left(\frac{V_{R_2} - V_{R_1}}{W_{V1} + W_{V2}} \right) \dots\dots\dots (5)$$

ここで W と W_V は、それぞれ時間および体積の単位で表した各成分のピーク幅を示す (図 2 参照)。すなわち、保持時間または保持体積の差が大きいほど、そしてピーク幅が小さいほど分離度は大きい。

分離度は保持係数および理論段数 N と次の関係にある。

$$R_s = \frac{1}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \sqrt{N} \left(\frac{k_{av}}{1 + k_{av}} \right) \dots\dots\dots (6)$$

ここで α は 2 成分の保持係数、 k_1 と k_2 、または分配係数 K_{D1} と K_{D2} の比で定義される分離係数であり ($\alpha \geq 1$)、 k_{av} は k_1 と k_2 の平均値である。

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{K_{D2}}{K_{D1}} \dots\dots\dots (7)$$

$$k_{av} = \frac{k_1 + k_2}{2} \dots\dots\dots (8)$$

理論段数は、カラムを同じ高さを持つ不連続な段が多数連なったものと仮定し、それぞれの段において移動相と固定相との間で溶質が分配平衡に達しながら、分離が行われると考える段理論に基づいて導かれるカラムパラメータで、カラムを構成する仮想的な理論段の数をいう。同じ長さのカラムであれば、理論段数の大きなカラムほどピーク幅が狭く、カラム効率が良いことになるので、これを用いてカラムの性能を表すのが習慣になっている。段理論で仮定されるカラムは、その構造と次号で述べる溶質バンド拡大の機構という点で実際のカラムとはまったく異なっているが、この理論から得られる溶質ピークの形状は実際に得られるものとよく一致するため、実際に得られるピークについて次式により求めた理論段数がカラム効率を表す指標としてよく用いられる。

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2 = 16 \left(\frac{V_R}{W_V} \right)^2 \dots\dots\dots (9)$$

式 (5) および (9) から、高い分離度を得るには、分離したい溶質成分の保持時間 (保持体積) の差を大きくする (α を大きくする) とともに、溶質バンドの広がりを小さく抑える (N を大きくする) が必要になるが、保持体積とバンドの広がりの制御はほぼ独立に扱うことができる。前者は平衡論的 (熱力学的) 考察に、また後者は速度論的考察に基づいて行われることになる。

3・3 移動相と固定相

移動相と固定相は、最初に述べたようにカラム内に固定されているか、それとも移動しているかで一般に定義される。しかしこの定義で移動相と固定相を明確に区別することはできない。たとえば、多孔質充填剤の細孔内に入りこんだ移動相液体を考えてみよう。この液体はカラムの長さ方向には流れていないにもかかわらず、溶媒組成や溶質分子との分子間相互作用に変化がなければやはり移動相である。すなわち、移動相はカラム内のどの位置でも同じ速さで移動しているわけではなく、 F は移動相の平均流量である。

一方、溶質分子に対して移動相液体と異なる親和性を示す相や界面は、カラム内に完全に固定されていなくとも、カラム長さ方向の速度成分を持たなければ（厳密には F より小さい流量であれば）、固定相として働くことになる⁷⁾⁸⁾。例えば、ある溶媒組成を持つ移動相が充填剤表面と接したとき、移動相の各溶媒成分の充填剤表面との分子間相互作用の違いによって、表面近傍では濃度（組成）が変化することがある。多孔質粒子表面の大部分は粒子内部に存在する上、粒子表面直近に形成される溶媒和液相はカラム長さ方向の速度成分を実質的に持たない。したがって、充填剤表面の溶媒和液相は固定相として機能することになる。

ちなみに、すべての相が同じ速さでカラム内を移動すると、各相の間で溶質分子の分布に偏りが生じたとしても、どの溶質分子も検出部に到達する時間に差を生じないので、当然ではあるがクロマトグラフィー分離は全く起こらない。

4 逆相液体クロマトグラフィー

4・1 化学結合型逆相系シリカ充填剤

古典的な分配クロマトグラフィーは、固定相となる液体を多孔性固体粒子に物理的に浸透被覆させて固定化し、これとは混じり合わない液体を移動相として流すことによって行われた。このような方法では、移動相への溶解による固定相液体の流出を防ぐために移動相溶媒は固定相液体で飽和させておかなければならない。しかしカラム温度や移動相溶媒組成が変化すると相互溶解度が変わり、固定相が溶けだすことがある。この問題を克服するため、現在では固定相を化学的に固体担体に結合させた化学結合型の充填剤が使用されている。

現在 RPLC 用として市販されているカラムは 600 種以上存在すると言われている¹⁾。その多くはシリカゲルを担体とし、表面のシラノール基 ($-\text{SiOH}$) にシリル化などにより固定相物質を結合させたものであり、特にアルキル基を結合した逆相系の化学結合型充填剤は現在最も広く用いられている。その表面化学構造の例を図 5 に示す²⁾。この充填剤は機械的強度に優れている上、高純度で粒径のそろったシリカゲルが供給されるようにな

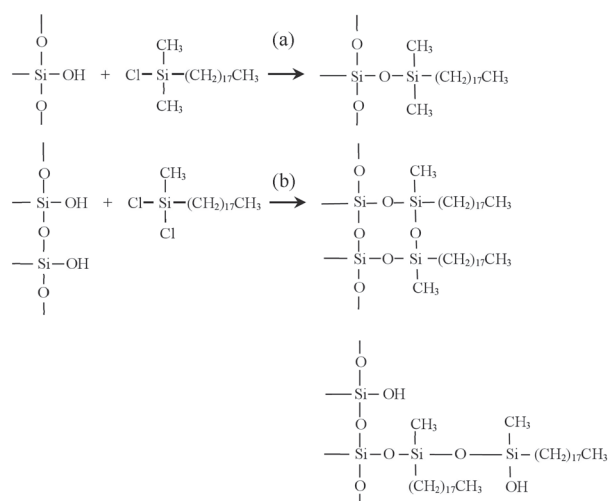


図 5 一官能性 (a) および二官能性 (b) シラン処理によるシリカ表面へのオクタデシル基の導入

り、さらには未反応の残存シラノール基を封鎖（エンドキャップ）する技術が向上して、高いカラム効率を持つカラムが国内外の各社から市販されている。基材として用いられるシリカゲル粒子は、平均細孔径が 10 nm 程度、比表面積が約 $400 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ 、粒子径が $2 \sim 5 \mu\text{m}$ のものが一般的であるが、多様な充填剤が市販されており、対象となる試料化合物などによって最適なものを選ぶことができる。

シリカ基材には高いカラム効率（理論段数）で分離できるという特長があるが、修飾基の脱離を引き起こす塩基性水溶液は原則として使用することができないなどの欠点があり、化学的安定性に関してはポリスチレン樹脂を基材とする充填剤や多孔質グラファイト充填剤のほうが優れている。一方、シリカよりも化学的な耐久性が高いジルコニアやチタニアを基材とする RPLC 用充填剤も市販されているほか、表面化学修飾の工夫によって、より化学的耐久性を高めたアルキル結合型シリカも入手できるようになっている。

粒子充填型のカラムが多数を占めるが、三次元ネットワーク状の骨格と移動相の流路となる空隙（マクロポア）が一体となった棒状の形をもつモノリスシリカカラムも市販されている。マクロポアの孔径は $0.5 \sim 10 \mu\text{m}$ 、シリカ骨格に存在するメソポアは $10 \sim 30 \text{ nm}$ 程度の範囲の大きさを持ち、粒子充填型カラムと比較して大きな流路（粒子充填型カラムでは粒子外部の空間に相当する）をもつため、低圧での送液が可能で高速分離ができるなどの特長を持っている⁹⁾。

4・2 分離機構

4・2・1 アルキル結合型シリカ表面に形成される固定相の構造

液体クロマトグラフィーの固定相は、用いられる多孔質シリカ粒子の比表面積が大きいことからわかるよう

に、移動相と充填剤との界面が分離場として大きな役割を果たすことが多い。これは一般的なスケールの溶媒抽出では、分配係数への液液界面の寄与が通常無視できることと大きく異なる点であり、RPLCにおいては特に顕著である。現在最も多用されているRPLC用充填剤は、オクタデシル(C₁₈)基を表面化学修飾したシリカ粒子(ODS)である。またRPLCの移動相としては、アセトニトリルまたはメタノールと水の混合溶媒が汎用される。そこで、ODSカラムにアセトニトリルと水の混合溶媒を移動相として通液する典型的なRPLCを例にとって、その分離場となる固定相の構造を考えてみよう。

図5に示したように、C₁₈基はシリカ表面に固定されているが、可動性があることが¹³C NMR¹⁰⁾や分子動力学(MD)シミュレーション¹¹⁾を用いた研究によって明らかになっている。またそれは、温度や移動相溶媒の種類に依存して変化し、温度が高いほど、そして疎水性のより大きな溶媒に接したとき増大する。したがって、C₁₈基は水と接した状態では互いに凝集した状態をとるが、アセトニトリル濃度が高くなるにしたがって可動性が大きくなり、より伸長した状態をとるようになる。

水はもとより、メタノールやアセトニトリルのn-アルカンへの溶解度は非常に小さいので、C₁₈基とこれらの親水性有機溶媒が任意の割合で混和して均一相をつくることはない。しかし、水よりもC₁₈基への親和性が大きいので、ODS表面近傍ではメタノールやアセトニトリルの濃度が大きくなる。このため、ODS表面には移動相とは溶媒組成の異なる界面溶媒和液相が形成される。初期の過剰吸着等温線の測定に基づく研究では、メタノールは単分子層、アセトニトリルは多分子層の溶媒

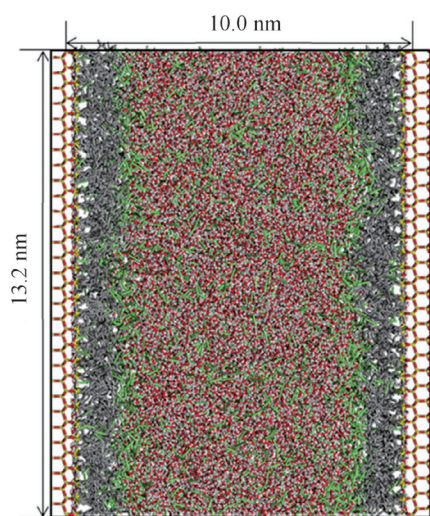


図6 MDシミュレーションによって得られた30%(v/v)アセトニトリル水溶液と平衡化したODS細孔のスナップショット¹²⁾

原子の色: Si=黄, O(シリカおよび水分子)=赤, H(シラノール基および水分子)=白, アセトニトリル分子=緑, C(C₁₈基およびエンドキャップ基)=灰色。

和液相を形成すると思われたが、現在ではメタノールやアセトニトリルのみが選択的にODS表面に吸着するのではなく、水も溶媒和液相の成分であり、有機溶媒が移動相より高濃度の界面液相を形成すると思えるのが妥当であることが明らかになっている。

二つの平面状ODSに挟まれた空間にアセトニトリルと水の混合溶媒を配置したとき、溶媒分子がどのように分布するかがMDシミュレーションによって解析されている。最近のMDシミュレーション研究によって得られたスナップショットを図6に、またシリカ表面からの距離(z/nm)の関数として表したC₁₈基、アセトニトリルおよび水分子の濃度(ρ/atoms nm⁻³)の分布を図7に示す¹²⁾。図6および図7は、RPLCに用いられるODSのモデルとして、4.5 nm⁻²(7.5 μmol nm⁻²)の表面シラノール密度を持つβ-クリストバライト(シリカの結晶多型の一つ)の表面を、ジメチルオクタデシルシランにより表面密度1.87 nm⁻²(3.11 μmol nm⁻²)

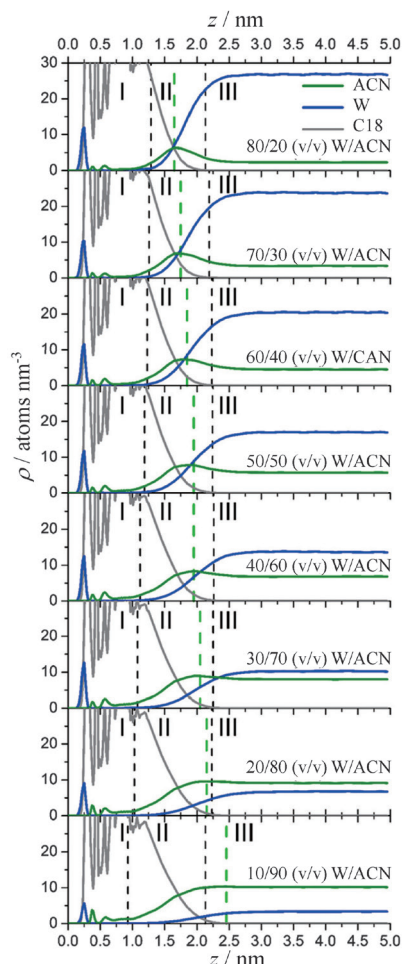


図7 20~90%(v/v)アセトニトリル水溶液と平衡化したODS表面におけるC₁₈基(灰色)、水(W、青)、アセトニトリル(ACN、緑)の濃度分布¹²⁾

領域IとIIおよびIIとIIIの境界(黒の破線)は、それぞれ移動相溶媒の濃度がバルク移動相の10%および90%となる位置を示す。また緑色の破線はアセトニトリル濃度が極大となる位置を示す。

で修飾し、ついでトリメチルシリル基によるエンドキャップを 0.56 nm^{-2} ($0.93 \text{ } \mu\text{mol nm}^{-2}$) の密度で行ったものについて、シミュレーションした結果を示したものである。シラノール基が 2.06 nm^{-2} ($3.42 \text{ } \mu\text{mol nm}^{-2}$) 残っており、これは最近の一般的な RPLC カラムに比べてエンドキャップ率が小さいが、 C_{18} 基の修飾密度は標準的なものである。図 6 および図 7 は、水とアセトニトリルはその一部が残存シラノール基に吸着するが、 C_{18} 基層内部にはほとんど存在せず、その表面（外側）に移動相（バルク液相）よりもアセトニトリル濃度の大きい溶媒和液相を形成することを示している。すなわち、水とアセトニトリルは C_{18} 基とは混和せず、その表面に移動相よりもアセトニトリル濃度の大きい溶媒和液相を形成していることになる。

一方、液体クロマトグラフィーを用いた実験的方法によって ODS 表面の溶媒和液相の厚さと溶媒組成が最近明らかにされた⁷⁾⁸⁾。アセトニトリル/水混合溶媒が形成する溶媒和液相の厚さと溶媒組成が移動相中のアセトニトリル濃度によってどのように変化するかを図 8 に示す⁷⁾。この研究では移動相と溶媒和液相間での無機イオンの分配を計測して移動相体積（バルク液相体積）と溶

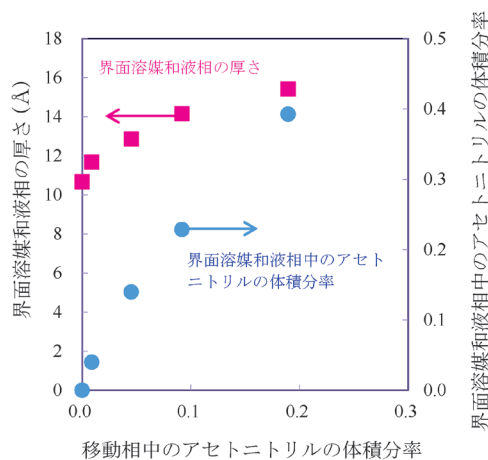


図 8 アセトニトリル水溶液を移動相としたときの ODS 表面における溶媒和液相の厚さと溶媒組成⁷⁾

媒和液相体積を求めているが^{7)8)13)~15)}、得られた結果は MD シミュレーションの結果（図 7 など）とよく一致する⁷⁾⁸⁾。ここで注意しなくてはならないのは、純水を移動相とした場合でも固定相として作用する界面液相（約 1 nm の厚さ）が存在することである⁷⁾¹⁴⁾。このときの界面水は C_{18} 基と接することによって、バルク水とは異なる構造を持ち、溶質分子との相互作用もバルク水中の水分子とは異なることを意味する。疎水性物質表面に形成される界面水に関する研究は、近年各種の界面選択的分光法や MD シミュレーションなどによって急速に進められており、その描像が明らかになりつつある^{14)~19)}。

以上の結果から、ODS カラムを用いた RPLC の固定相は、移動相溶媒によって形成される界面溶媒和液相と C_{18} 結合層によって構成され、さらにこれらに加えてシリカ基材表面（シラノール基やシロキサン結合部位）が溶質の保持に寄与すると結論づけられる。RPLC における ODS 細孔内の模式図を図 9（左）に示す。

4・2・2 溶質保持に及ぼすアルキル結合相、界面溶媒和液相、およびシリカ表面の寄与

RPLC における分離機構として最初に提案されたのは、疎溶媒和理論と名づけられたアルキル結合相表面への溶質分子の吸着に基づくものであった²⁰⁾。その後アルキル結合相への溶質分子の分配を考えないと説明できない現象が発見され²¹⁾、吸着と分配の両方が分離機構として作用していることがわかってきた。これらは、それぞれ界面溶媒和液相とアルキル結合層への分配と言い換えることができる。さらにエンドキャップは通常完全ではないことが多いので、未修飾のシリカ表面も溶質の保持を引き起こす固定相の一部となる。これらの各固定相部位の溶質保持への寄与を個別に定量的にとらえることは困難であったが、MD シミュレーション¹¹⁾¹²⁾²²⁾²³⁾ および ODS の細孔内に気体を固定化した HPLC である表面気泡変調液体クロマトグラフィー（surface-bubble-modulated liquid chromatography, SBMLC）^{24)~27)} を用いた

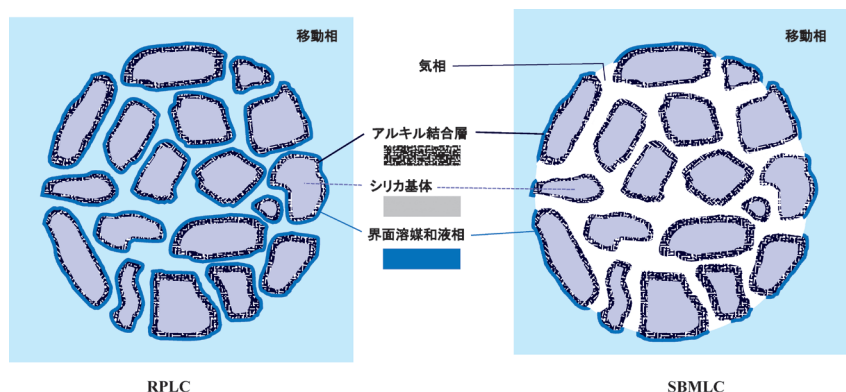


図 9 RPLC および SBMLC における ODS 粒子の細孔内の構造

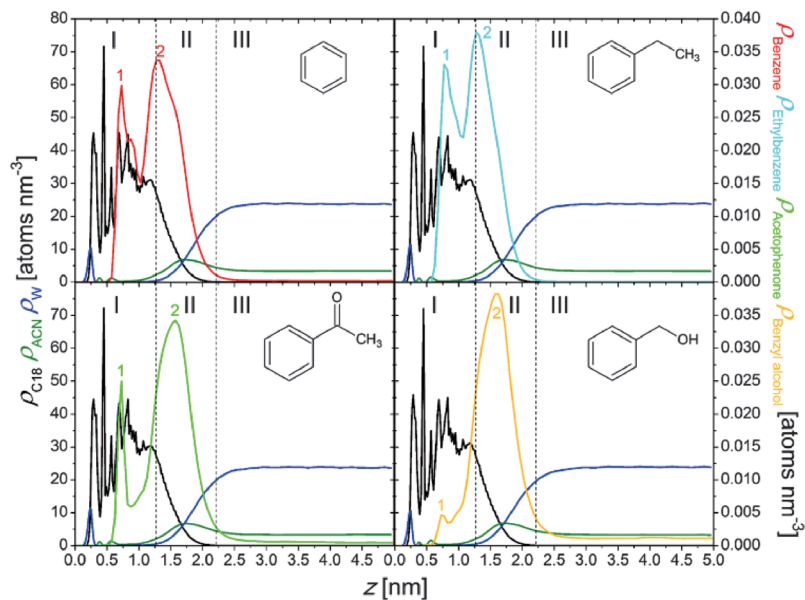


図 10 MD シミュレーションにより得られた ODS 表面近傍における C₁₈ 基, 水, アセトニトリル, 及び溶質分子の濃度分布²²⁾

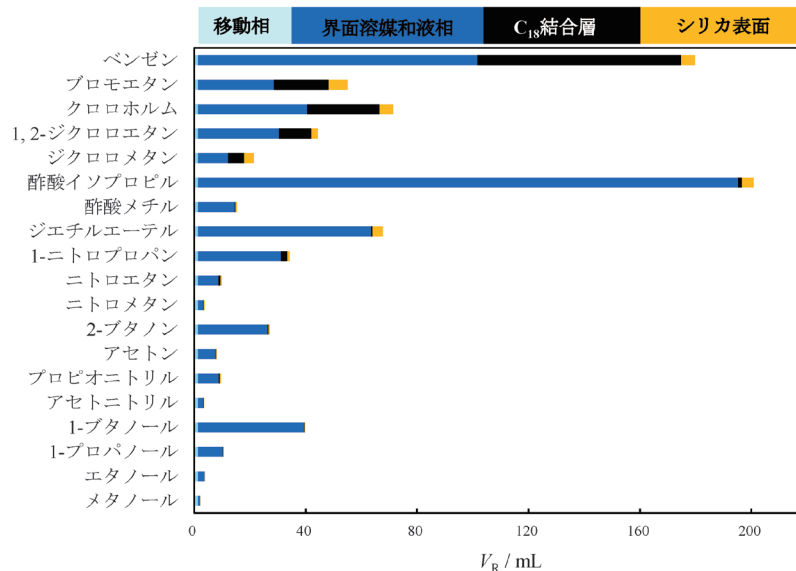


図 11 ODS カラム (L-column2 ODS, 150×4.6 mm) における溶質の保持体積への移動相および各固定相 (界面溶媒和液相, C₁₈ 結合層, シリカ基材表面) の寄与²⁵⁾
移動相: 水, 温度: 25 °C.

研究によって近年解明が進んでいる。SBMLC における ODS 細孔内の構造を RPLC における構造と比較して図 9 (右) に示す。

図 10 は, 4 種の溶質分子をそれぞれ含む 30 (v/v) アセトニトリル水溶液が ODS に接したときの各溶質分子の濃度 (ρ) 分布を, 水 (W), アセトニトリル (ACN), そして C₁₈ 鎖の濃度とともに, シリカ表面からの距離 (z) の関数として示した MD シミュレーションの結果である²²⁾。この計算結果は, ベンジルアルコールは界面溶媒和液相 (C₁₈ 基表面) に特異的に保持されるのに対して, ベンゼン, エチルベンゼン, アセトフェンは C₁₈ 結合相内部と界面溶媒和液相の両方に濃縮されるこ

とを示している。また, 図 7 にも示されているが, アセトニトリルはベンジルアルコールと同様, C₁₈ 結合層表面に濃縮され, 溶媒和液相内で濃度が極大となる。

溶質分子が移動相溶液と ODS との間の界面近傍空間のどの位置に分布しているのかを実験的に明らかにすることは, HPLC はもとより, 各種の分光法を用いても難しいとされていたが²⁸⁾, SBMLC を用いることによって, この問題の実験的解明が可能になった^{8)24)~27)}。純水を移動相としたときの ODS カラムにおける種々の化合物の保持体積への各固定相の寄与を図 11 に示す。この図は, ベンゼンを例にとると, カラム内を移動するのに要する時間のうち, 56 % を界面溶媒和液相中で,

40% を C₁₈ 結合層内で、3% をシリカ表面上で、そして1% を移動相中で費やしていることを示している。この図から、*n*-アルコール、ケトン、エーテル、エステル、ニトリルなどは、水/C₁₈ 結合層界面に選択的に保持されているのに対して、C₁₈ 結合層内部にはほとんど分配していないこと、一方、ベンゼン、プロモエタン、クロロホルムなどは界面と結合層内部の両方に分配していることがわかる。この結果は、図 10 に示した MD シミュレーションによる計算結果と非常によく一致している。

以上の結果から、ヒドロキシ基などの親水基を持つ化合物はアルキル結合層と移動相の界面に保持されるが、親水基を持たない疎水性分子は界面とアルキル結合層内部の両方に保持されることがわかる。イオン性の官能基をもつ化合物もまた、前者と同様に界面にのみ選択的に保持される。さらに、化合物によってはシリカ基材表面の寄与も無視できないことが図 11 より理解される。純水を移動相としたときの C₁₈ 結合層への化合物の分配係数は、*n*-ヘキサデカン/水間の分配係数とほぼ等しいことが明らかになっている²⁴⁾。これに対して C₁₈ 結合層/水界面への分配係数は、図 11 からわかるようにそれとはまったく異なる。このため、両固定相の相対的な大きさの違いによって、ODS カラムとして市販されているカラムどうしても分離選択性が異なる²⁵⁾。

次号では、これらの結果に基づいて、アルキル基の鎖長や移動相中の有機溶媒濃度、そして修飾基の種類を変えると RPLC における溶質の保持挙動がどのように変化すると予測されるのかを述べる。また、ピークの広がりや決定する要因や、化学反応を利用した選択的分離法についても解説する。

文 献

- 1) P. Žuvela, M. Skoczylas, J. J. Liu, T. Bączek, R. Kaliszan, M. W. Wong, B. Buszewski : *Chem. Rev.*, **119**, 3674 (2019).
- 2) J. H. Knox : “*High Performance Liquid Chromatography*”, (1978), (Edinburgh University Press, Edinburgh).
- 3) 伊藤正人, 加地弘典:クロマトグラフィー, **32**, 9 (2011).
- 4) 三上博久, 早川禎宏:クロマトグラフィー, **32**, 17 (2011).
- 5) 坊之下雅夫, 鹿又健:クロマトグラフィー, **32**, 23 (2011).

- 6) F. Gritti : *Anal. Chem.*, **93**, 5653 (2021).
- 7) M. Shibukawa, H. Okutsu, S. Saito : *ACS Omega*, **7**, 15158 (2022).
- 8) M. Shibukawa : *Anal. Sci.*, in press.
- 9) 木村 宏, 池上 亨, 田中信男:ぶんせき, **2004**, 576.
- 10) M. Pursch, L. C. Sander, K. Albert : *Anal. Chem.*, **71**, 733A (1999).
- 11) R. K. Lindsey, J. L. Rafferty, B. L. Eggimann, J. I. Siepmann, M. R. Schure : *J. Chromatogr. A.*, **1287**, 60 (2013).
- 12) J. Rybka, A. Hölzel, A. Steinhoff, U. Tallarek : *J. Phys. Chem. C*, **123**, 3672 (2019).
- 13) M. Shibukawa, N. Ohta : *Chromatographia*, **25**, 288 (1988).
- 14) M. Shibukawa, Y. Kondo, Y. Ogiyama, K. Osuga, S. Saito : *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **13**, 15925 (2011).
- 15) 渋川雅美:ぶんせき, **2012**, 21.
- 16) B. Malfait, A. Moréac, A. Jani, R. Lefort, P. Huber, M. Fröba, D. Morineau : *J. Phys. Chem. C*, **126**, 3520 (2022).
- 17) T. L. Tarbuck, S. T. Ota, G. L. Richmond : *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 14519 (2006).
- 18) S. Gopalakrishnan, D. Liu, H. C. Allen : *Chem. Rev.*, **106**, 1155 (2006).
- 19) J. Lützenkirchen, T. Preocanin, N. Kallay : *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **10**, 4946 (2008).
- 20) C. Horváth, W. Melander, I. Molnár : *J. Chromatogr.*, **125**, 129 (1976).
- 21) J. G. Dorsey, K. A. Dill : *Chem. Rev.*, **89**, 331 (1989).
- 22) J. Rybka, A. Hölzel, U. Tallarek : *J. Phys. Chem. C*, **121**, 17907 (2017).
- 23) J. Rybka, A. Hölzel, N. Trebel, U. Tallarek : *J. Phys. Chem. C*, **123**, 21617 (2019).
- 24) K. Nakamura, H. Nakamura, S. Saito, M. Shibukawa : *Anal. Chem.*, **87**, 1180 (2015).
- 25) K. Nakamura, S. Saito, M. Shibukawa : *J. Phys. Chem. C*, **122**, 4409 (2018).
- 26) K. Nakamura, R. Ubukata, H. Mizuno, S. Saito, M. Shibukawa : *J. Phys. Chem. C*, **122**, 28674 (2018).
- 27) K. Nakamura, S. Saito, M. Shibukawa : *J. Chromatogr. A*, **1628**, 461450 (2020).
- 28) A. R. Schure, J. L. Rafferty, L. Zhang, J. L. Siepmann : *LCGC North America*, **31**, 613 (2013).



渋川 雅美 (Masami SHIBUKAWA)
 埼玉大学 (〒338-8570 さいたま市桜区下大久保 255). 東京都立大学大学院理学研究科博士課程化学専攻. 理学博士. 《現在の研究テーマ》SBMLC による気体および VOC の分離, 疎水界面水の構造解析. 《主な著書》“分析化学改訂版”. (裳華房). 《趣味》ジョギング.
 E-mail : sibukawa@mail.saitama-u.ac.jp