

■緒言

高速液体クロマトグラフィー（HPLC）は溶液成分の分離による分析・分取に利用され、特にオクタデシル基結合型カラム（ODSカラム）による逆相条件分析は最も広範に用いられる。しかしODSカラムでは分離困難な分析対象も存在し、分離を改善する場合には固定相に芳香環が結合した**フェニル系カラム**が用いられることが多い。

市販のフェニル系カラムでは**アルキルフェニル基**のほか**ナフチルエチル**、**ピレニルエチル**、**ビフェニル基**等が用いられているが（Table. 1）、これらの結合相の構造が保持や選択性にどのような影響を及ぼすかについては十分に知られていない。本研究ではこれら固定相の**π相互作用**の差異を評価した。

■フェニル系カラムのπ相互作用による保持の比較

移動相にn-Hexaneを用いてπ相互作用による保持の強さを測定した。

●アルキルベンゼンの保持 Fig. 1(a)

側鎖炭素数を増やしても保持が増大せず、疎水性相互作用の十分な減弱を確認した。

●縮合芳香族化合物の保持 Fig. 1(b)

π-π相互作用により疎水性移動相中でも保持を形成し、**固定相の表面π電子密度が大きいカラムほど強い保持を示した。**

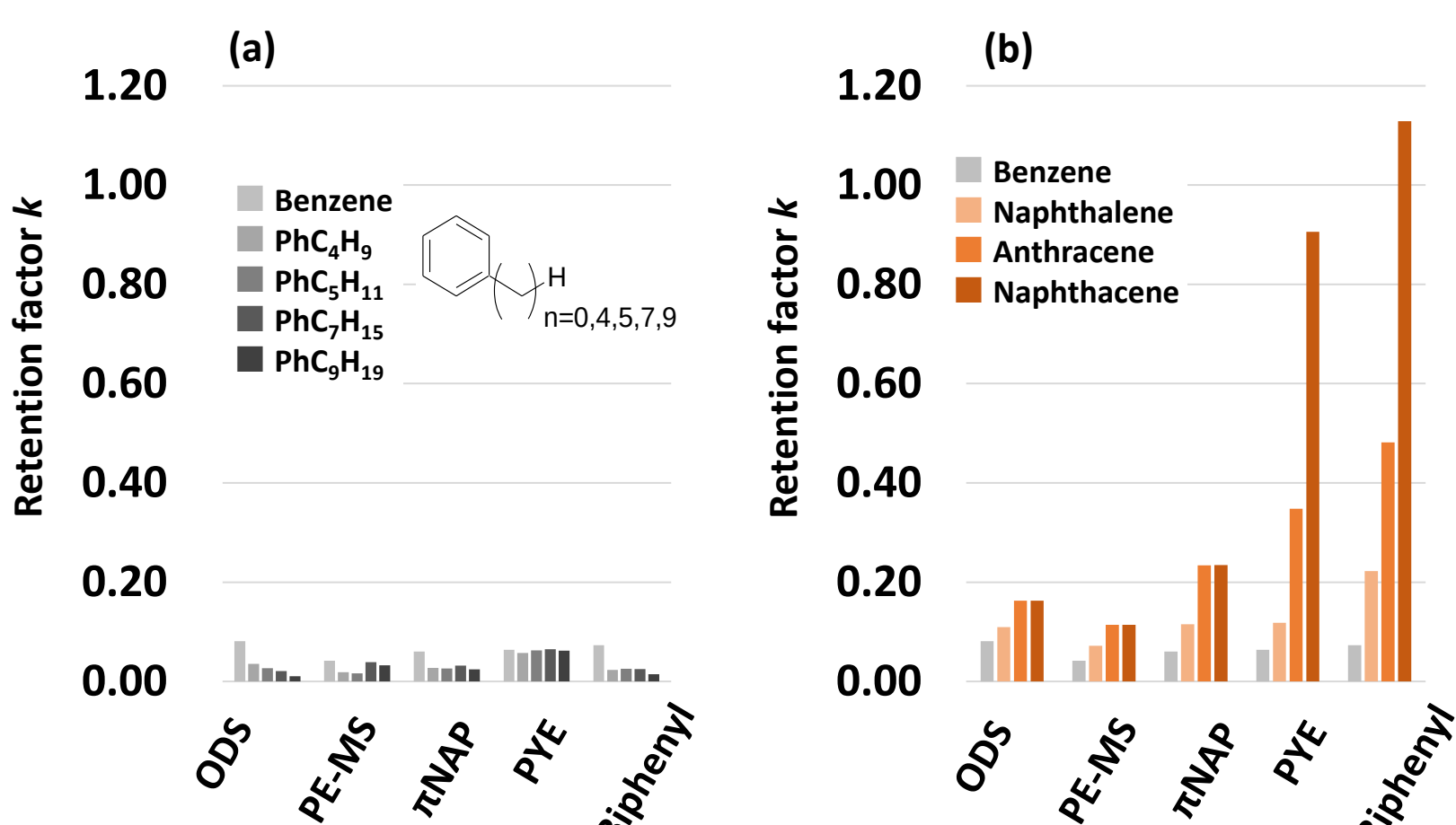


Fig.1. 各カラムにおける保持係数 (a)アルキルベンゼン類 (b)縮合芳香族化合物
Mobile phase: n-Hexane, Flow rate: 1.0 mL/min, Temperature: 30°C, Detection: UV 254 nm, t₀ marker: 1,4-di-tert-butylbenzene.

●フェロセンの保持 Fig. 2(a)

PE-MS, πNAP, PYEについては表面π電子密度が大きいほどフェロセンを保持した。**一方、Biphenylの保持はPYEの保持を下回り、従来の傾向に反した。**

●フラーレン類の保持 Fig. 2(b)

トルエン移動相によるフラーレン類の保持は、フェロセンと同様の傾向を示した。これは同条件で測定した縮合芳香族化合物の保持傾向とは大きく異なった。

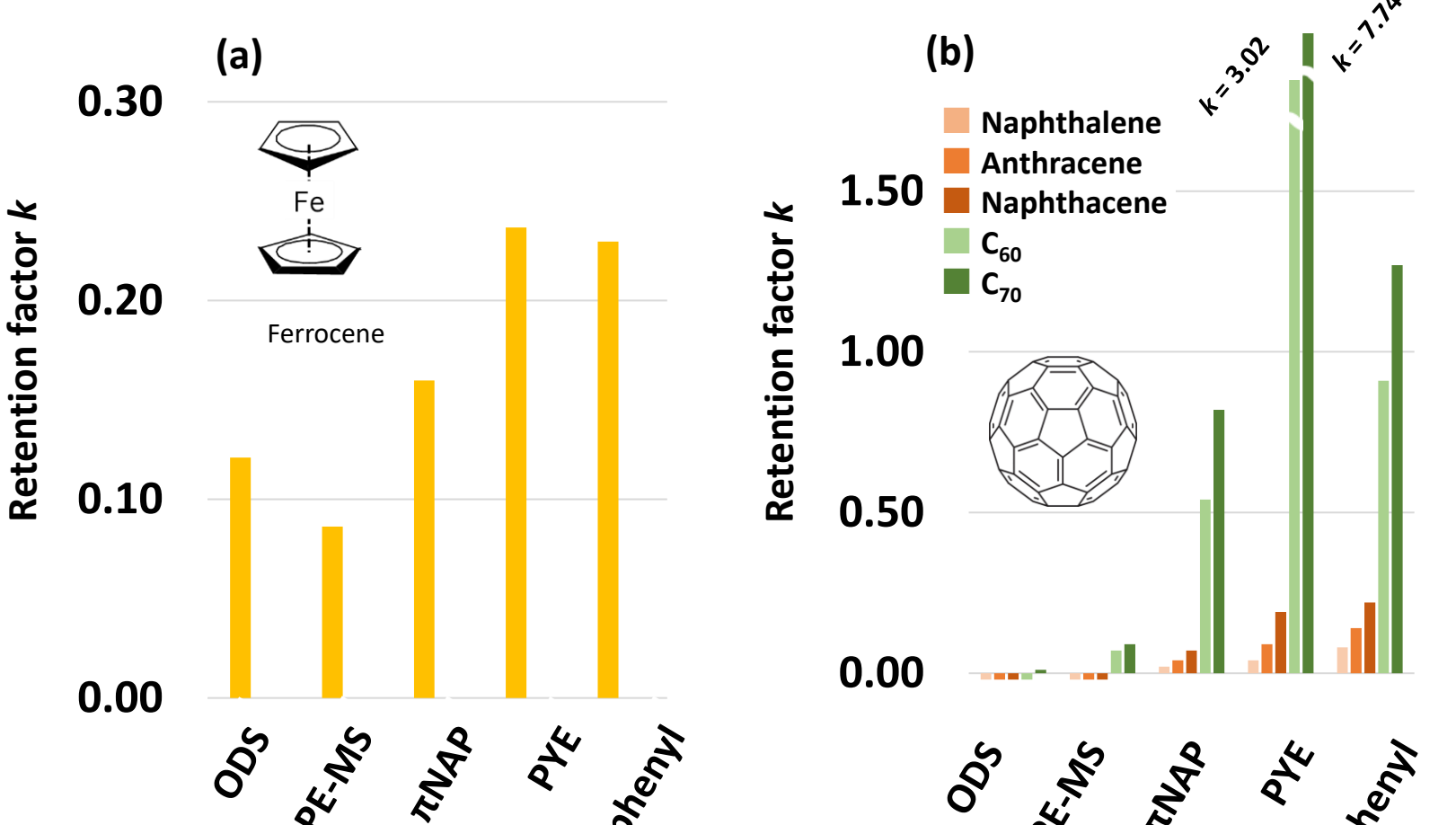


Fig.2. 各カラムにおける保持係数 (a)フェロセン, 分析条件はFig. 1と同じ。
(b)フラーレン類: Mobile phase: Toluene/n-Hexane = 50/50, Flow rate: 1.0 mL/min, Temperature: 30°C, Detection: UV 285 nm, t₀ marker: p-Xylene.

●多置換プロモベンゼンの保持 Fig. 3

置換数1, 2: 縮合芳香族化合物と同様、カラムの表面π電子密度の大きさに伴って保持も大きくなった。

置換数3, 6: **フェロセンやフラーレン同様、Biphenylの保持はPYEやπNAPの保持を下回った。**

同様の傾向は多置換クロロベンゼンでも見られた。先行研究[1]によると、多置換ハロベンゼンは他のπ系分子と相互作用する際、置換数が少ないとπ-π相互作用の寄与が、置換数が多いとX-π相互作用の寄与が大きくなる。**X-π相互作用の寄与が強いほどBiphenylの保持が相対的に減弱することが示された。**

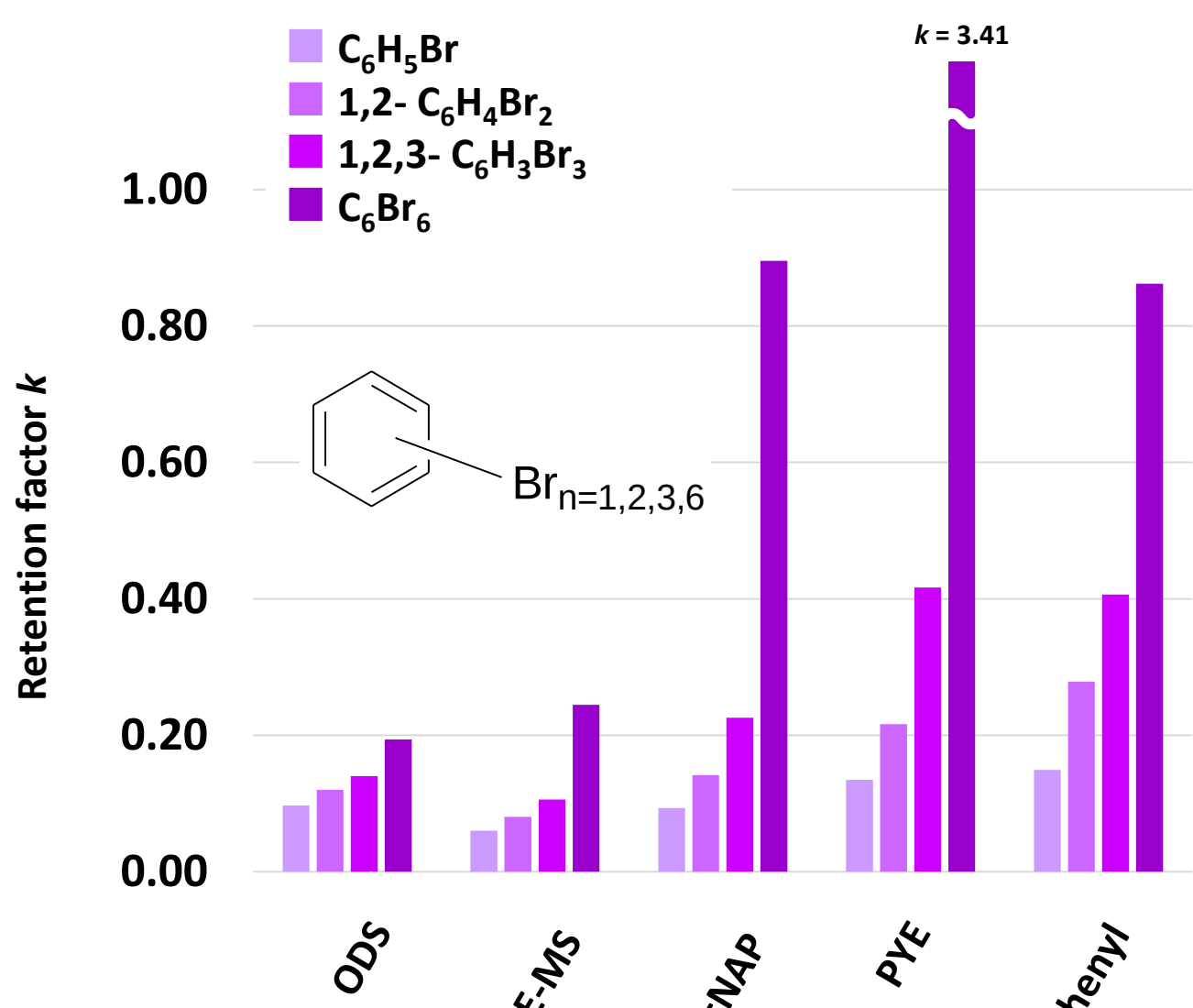


Fig. 3. 各カラムにおける多置換プロモベンゼンの保持係数。
分析条件はFig. 1と同じ。

[1] E. Kanao *et al.*, *Chem. Sci.*, 2020, 11, 409.

■フェニル系カラムの選択性の比較

Fig. 5 (a)(b)(c)に、上で示した保持係数から算出した代表的なサンプルの選択性を示した。どれもPYEで最もよい選択性を示した。

逆にビフェニルカラムでのみ高選択性を示した例をFig.5 (d)に示した。コハク酸(S)とクエン酸(C)の選択性α(S/C)はビフェニルカラムで最も高い選択性を示し、同様の測定をおこなった先行研究[2]の結果と整合した。一方、先行研究ではα(S/C)の値を「π選択性指標」と提案していたが、PYEの選択性がPE-MSと同程度に低いという結果はこの提案を支持しない。むしろ、α(S/C)はフェニル系カラムの平面性/非平面性を反映する指標に思われる。

フェニル系カラムごとに分離の得手・不得手が存在し、分析ターゲットに応じてこれらを使い分ける必要があることが示された。

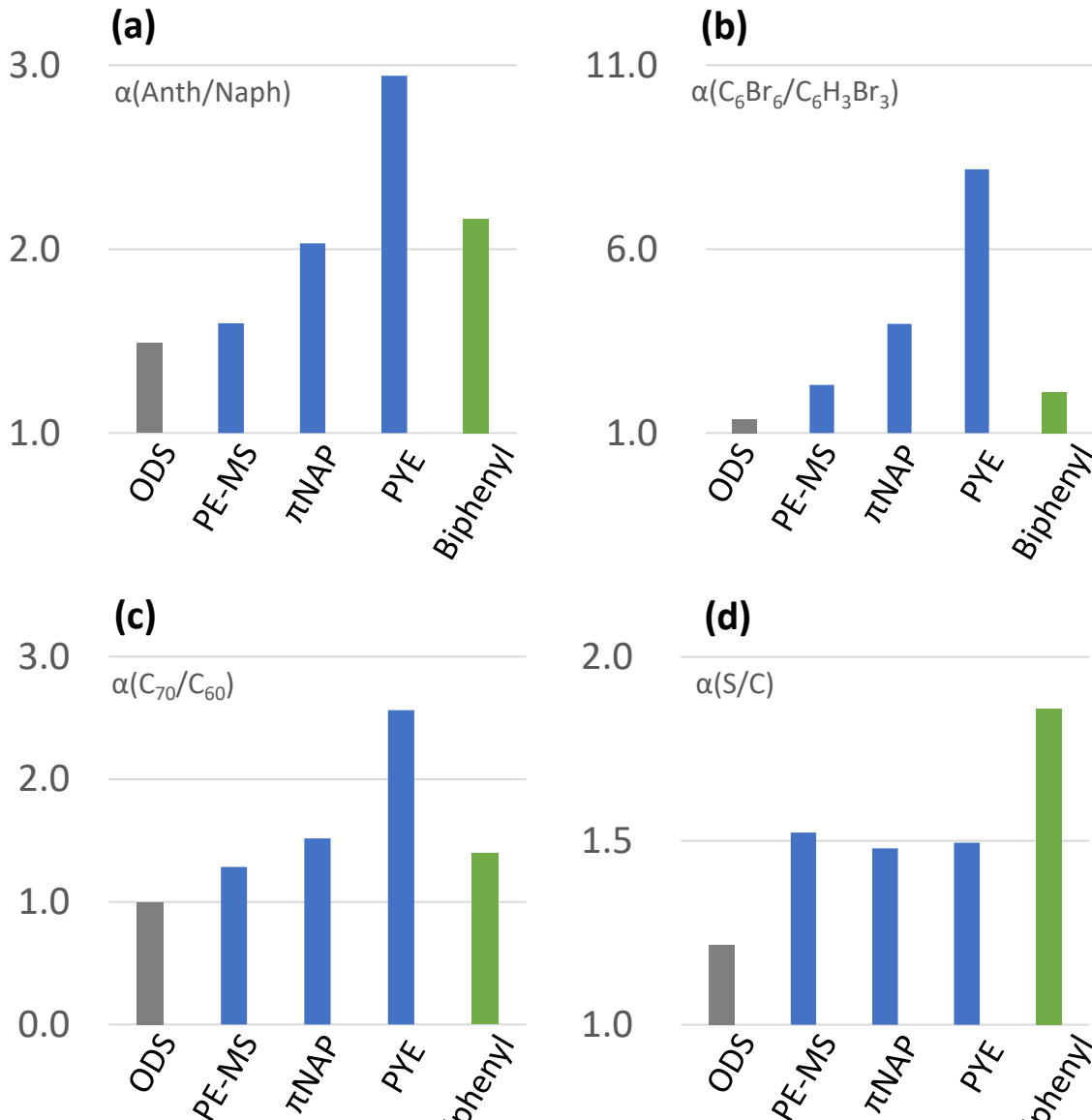
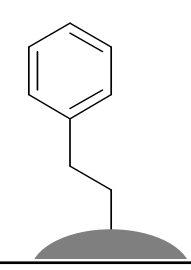
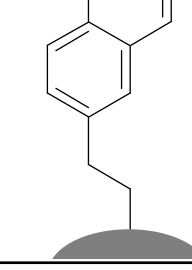
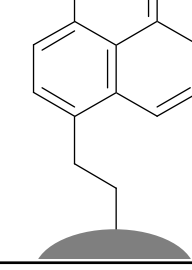
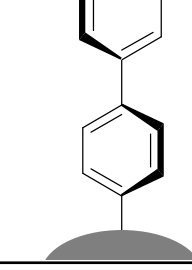


Fig. 5. 各測定における選択性。(a)(b)(c)の測定条件は先述と同じ。
(d)の測定条件: Mobile phase: Methanol/0.1% Phosphoric acid = 40/60, Flow rate: 1.0 mL/min, Temperature: 40°C, Detection: UV 210 nm, t₀ marker: Oxalic acid.

[2] 小山隆次 *et al.*, 第31回クロマトグラフィーシンポジウム (2024/6/5-7) ポスター

■結論

- 固定相の表面π電子密度が大きいほど、平面的な縮合芳香族化合物のπ相互作用による保持も大きくなった。
- 一方、フェロセン等のz軸方向に嵩高いサンプルはBiphenylカラムで顕著に弱い保持を示した。ビフェニル基の環捻れによる立体障害の可能性が示唆された。
- フェニル系カラムのπ選択性はPYEカラムが最も大きく、z軸方向に嵩高い分子ではBiphenylカラムの選択性は顕著に低かった。

Table.1 フェニル系カラムの構造および各数値				
	COSMOSIL PE-MS	COSMOSIL π NAP	COSMOSIL PYE	A2t Biphenyl
結合相の構造				
サイズ mm I.D. × mm	4.6 × 150			
エンドキャッピング	あり			
粒子径 μm	5	3	5	5
細孔径 Å		120		60
炭素含有率%	10.0	10.8	17.4	23.0
比表面積 m ² /g		300		450
官能基密度 μmol/m ²	3.19	2.48	3.05	4.27
面積あたりπ電子数 μmol/m ²	19.2	24.8	48.8	51.2

固定相表面の官能基密度は炭素含有率と比表面積から算出した。また、官能基密度と官能基ひとつあたりのπ電子数から「面積あたりπ電子数」（以下、**表面π電子密度**）を算出した。

■固定相に臭素を含むカラムによるビフェニルの保持

Biphenylの保持特性が結合相官能基以外の要因（官能基密度、エンドキャッピングなど）によるものでないことを確認するため、市販のペンタブロモフェニル基結合型カラム（COSMOSIL PBr）を用いて芳香族化合物の保持を測定した（Fig.4）。

●PBrによる平面性の低い化合物の保持

ビフェニル、ターフェニル（橙色）はπ電子が同数の縮合芳香族（青色）より顕著に小さい保持を示した。**Biphenylカラムの保持特性はビフェニル基の分子形状に基づくことが強く示唆された。**

またスチルベン（緑色）について、cis体がtrans体より小さい保持を示した。

ビフェニル、ターフェニル、cis-スチルベンは共通して分子の平面性が低いこと、芳香環平面の周辺が水素原子で混み合っている点が共通している。これらの構造的特徴によりX-π相互作用が弱まっていると推察される。

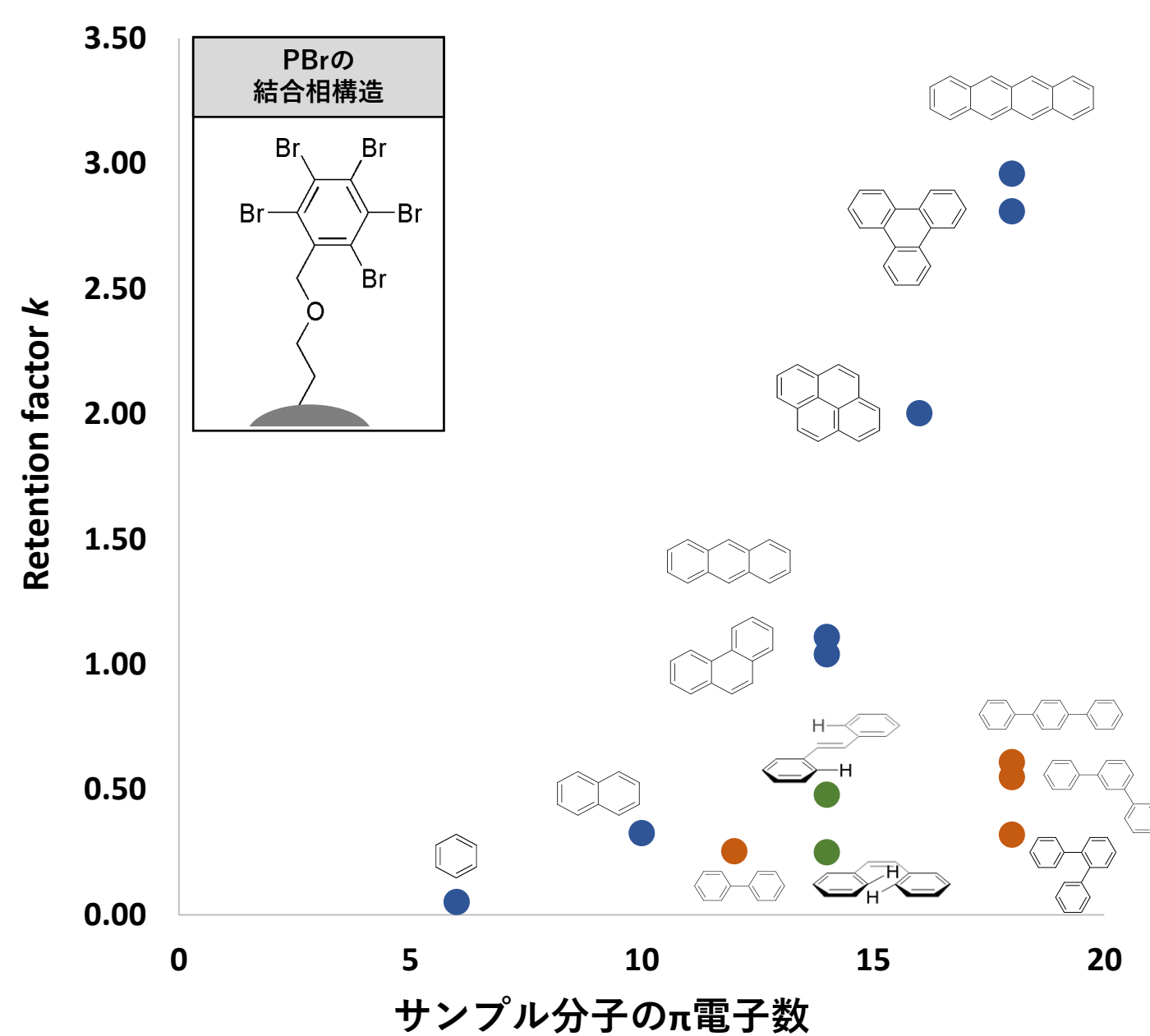
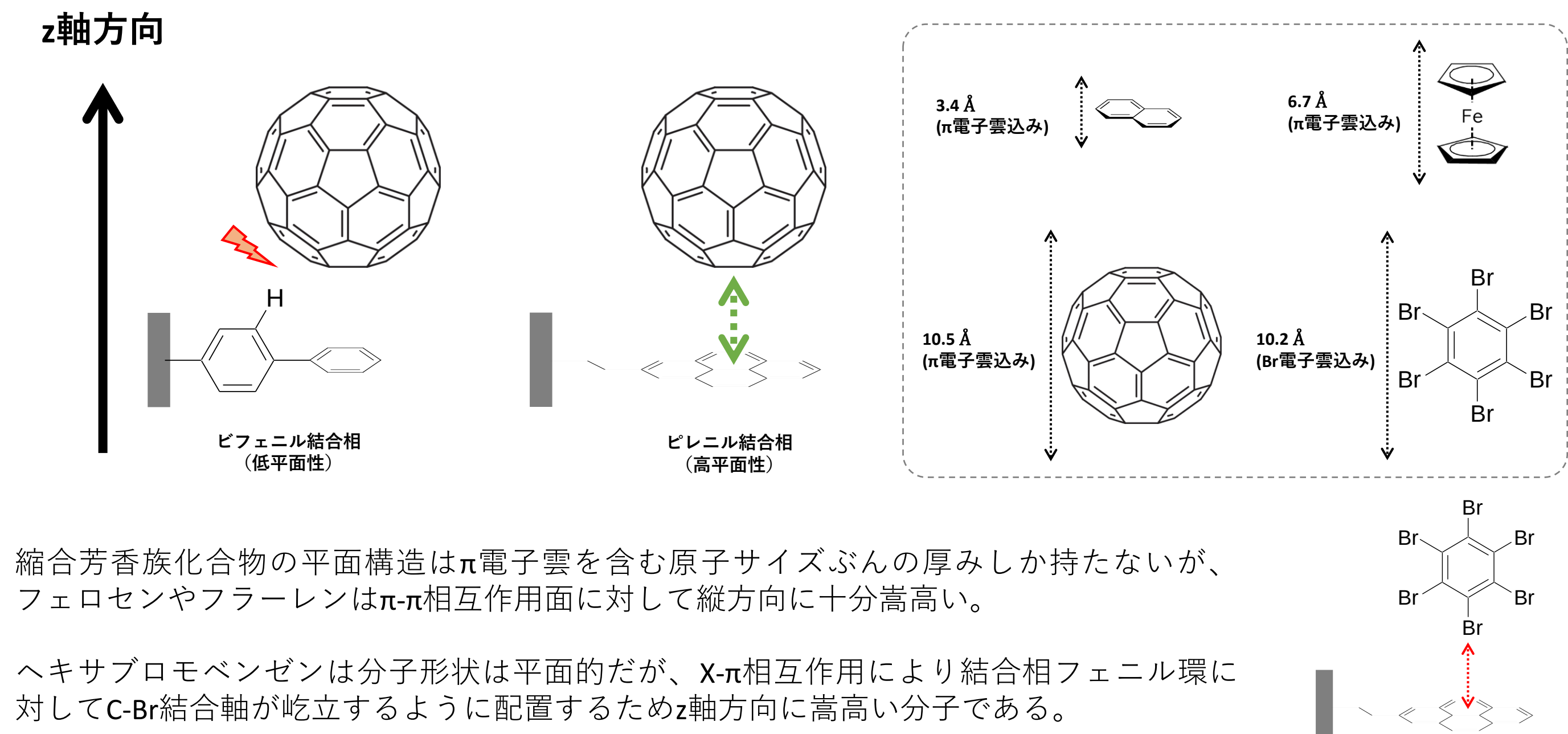


Fig. 4. PBrカラムにおける芳香族化合物の保持係数。測定条件はFig. 1と同じ。

■考察

これまでに示した保持挙動から、**Biphenyl結合相ではその分子形状に由来して、「結合相フェニル環のπ平面に対して垂直な方向（z軸方向）に嵩高い分子」の保持が相対的に減弱している**と理解できる。相互作用する結合相π平面の周囲にある水素原子により立体障害が生じて保持が減弱するものと思われる。

逆に、平面性の高いπNAPやPYEではフェニル環の周辺の立体障害が小さいため保持が減弱せず、固定相の表面π電子密度を反映した強さの保持を示す。z方向に嵩高い分子の分析では、フェニル系カラムの結合相の差異を鑑みたカラムチョイスが求められることが示唆された。



実際の分析で用いられる水メタノール系移動相を用いた場合でも、高い表面π電子密度と平面性を有するπNAPやPYEが良好な分離を示す場合が見られた。

副腎皮質ホルモンはπ共役系平面に対してz軸方向に嵩高く、πNAP、PYEでのみ十分な分離が達成されたことは上述の結果と整合する。本研究の知見は、実際の分析でのフェニル系カラムのカラムチョイスに応用できる可能性がある。

