

12 COSMOSIL シリーズ / 逆相クロマトグラフィー用充填剤の相互作用

1) 逆相クロマトグラフィー用充填剤の相互作用の違いによる分離への効果

はじめに

逆相クロマトグラフィーは優れた分離能、高理論段数、使いやすさなどの理由により広範囲の化合物の分離に用いられています。逆相クロマトグラフィーに使用するカラムとしては、オクタデシル基結合型 (C₁₈、ODS) 充填剤を用いたカラムが最も使用されています。しかし、C₁₈ カラムはアルキル基由来の疎水性相互作用によってサンプルの疎水性の違いを識別するために、疎水性の類似したサンプルに対する分離能が低いという問題点があります。近年、LC-MS の発達によりカラムでの高度な分離が必ずしも必要でない場合もありますが、分子量が同じ異性体は MS での識別は不可能であり、カラムでの分離が必要であると考えられます。

カラムによって疎水性が類似する化合物の高分離を達成するには、何らかの工夫が必要となります。例えば、移動相を変える、カラム長を長くする、分析温度を変えるなどがありますが、疎水性以外の相互作用をもつ充填剤を使用して分離パターンを変えることは最も有効な解決手段であると考えられます。

コスモシル逆相クロマトグラフィー用充填剤は、表 1 に示すようなさまざまな相互作用を持つ充填剤を取りそろえています。サンプルの保持は、相互作用の総和によって決定されるため、それぞれの相互作用を理解することは、サンプルに適したカラムを選択するために有用です。この資料ではサンプルの官能基からそれぞれの相互作用について紹介します。

表 1. 充填剤の固定相構造と主な相互作用

充填剤名称	C ₁₈ -MS-II	C ₁₈ -AR-II	Cholester	PYE	π NAP	PE-MS	NPE	PBr	PFP	C ₈ -MS
シリカゲル	全多孔性球状シリカゲル									
平均粒子径	5 μ m (p. 65 ~ p. 70 のデータで使用する粒子径)									
平均細孔径	約 12 nm									
比表面積	約 300 m ² /g									
固定相構造										
化学結合基	オクタデシル基	オクタデシル基	コレステリル基	ピレニルエチル基	ナフチルエチル基	フェニルエチル基	ニトロフェニル基	ペンタブロモベンジル基	ペンタフルオロフェニルプロピル基	オクチル基
結合形式	モノメリック型	ポリメリック型	モノメリック型	モノメリック型	モノメリック型	モノメリック型	モノメリック型	モノメリック型	モノメリック型	モノメリック型
主な相互作用	疎水性	疎水性	疎水性 分子形状認識能	疎水性 π - π 分散力 分子形状認識能	疎水性 π - π	疎水性 π - π	疎水性 π - π 双極子*	疎水性 分散力	疎水性 π - π 双極子*	疎水性
エンドキャッピング	あり									

* 双極子—双極子相互作用

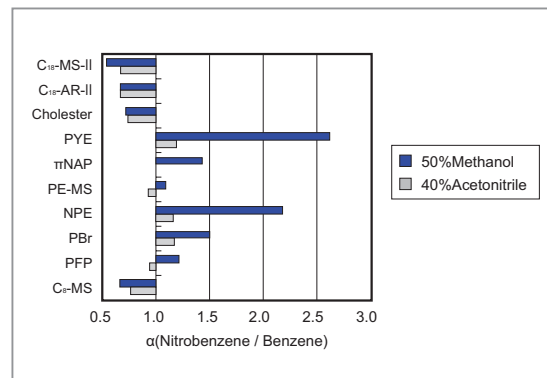
2) 極性基に対する選択性

選択性評価

ベンゼンとベンゼン環に極性基であるニトロ基あるいはメトキシ基が結合した分子構造をもつサンプルを分析し、極性基に対する選択性を評価した図とクロマトグラムの一部を示しました。C₁₈ では疎水性の高さの順にサンプルが溶出しますので、極性基であるニトロ基やメトキシ基は保持を小さくする効果があります。

一方、芳香環を固定相にもつ充填剤では、サンプルと固定相の間に π - π 相互作用が働くため、ニトロ基やメトキシ基は、保持を大きくする効果があり、C₁₈ とは溶出順が逆転します。 π - π 相互作用の大きさは芳香環の数が多いPYE や、ニトロ基を持つNPE で大きくなりました。

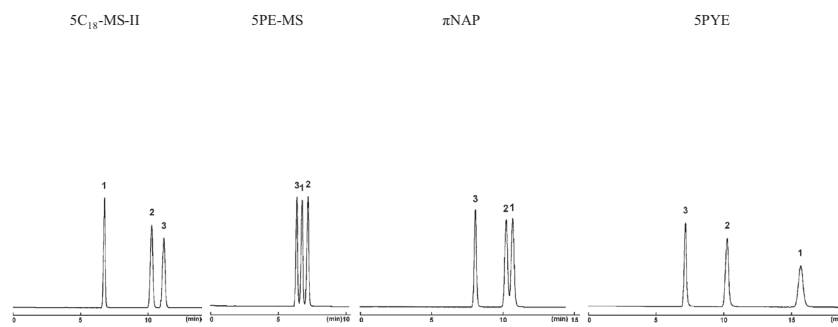
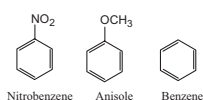
移動相については、アセトニトリルは π 電子を多く持つため、サンプルと固定相との π - π 相互作用を阻害します。そのため、 π - π 相互作用を利用する場合にはメタノール系の移動相の方がより有利だと考えられます。



極性基に対する選択性

Column: 4.6mm I.D. x 150mm
Mobile phase: Methanol / H₂O = 50/50
Flow rate: 1.0 ml/min
Temperature: 30°C
Detection: UV254nm

Sample: 1; Nitrobenzene (0.13μg)
2; Anisole (1.5μg)
3; Benzene (4.0μg)



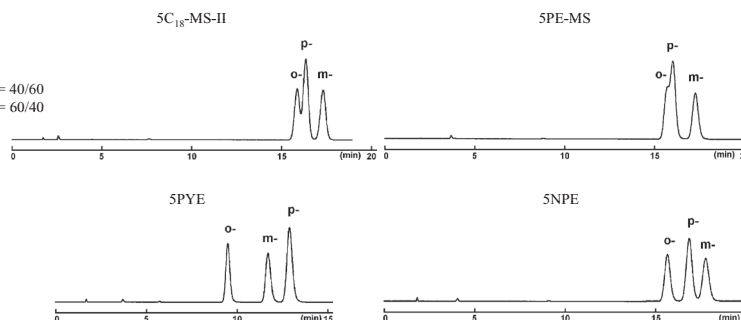
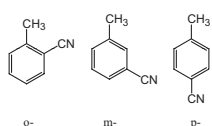
分析例

● トルニトリルの位置異性体の分離

トルニトリルは、ベンゼン環に極性基であるニトリル基と、疎水性基であるメチル基をもつ化合物であり、3種の位置異性体が存在します。C₁₈ や、 π - π 相互作用の小さいPE-MS では、オルト位とパラ位の分離が不十分でした。一方、強い π - π 相互作用を示すPYE やNPE では3種が完全に分離できました。そしてPYEは、NPEと異なりメタ位とパラ位の溶出順が逆転しました。

Column: 4.6mm I.D. x 150mm
Mobile phase: 5C₁₈-MS-II, 5PE-MS, 5NPE
Flow rate: 1.0 ml/min
Temperature: 30°C
Detection: UV254nm

Sample: o-Tolunitrile (2.0μg)
m-Tolunitrile (2.0μg)
p-Tolunitrile (1.0μg)



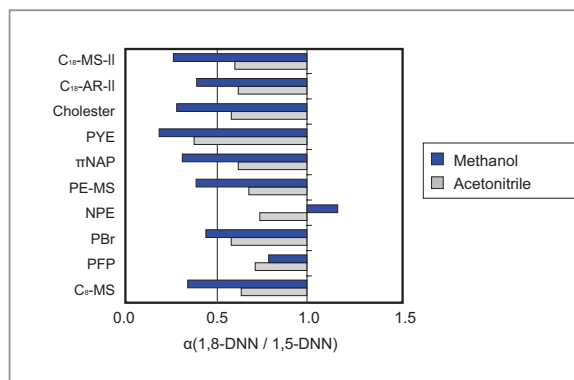
3) 双極子に対する選択性

選択性評価

ナフタレンとナフタレン環に、メチル基やニトロ基が結合した分子構造をもつサンプルを分析し、双極子に対する選択性を評価した図とクロマトグラムの一部を示しました。

C₁₈ では、ニトロ基は保持を小さくし、メチル基は保持を大きくする効果がありました。芳香環を持つ充填剤では、 π - π 相互作用によりニトロ基は保持を大きくする効果があり、C₁₈ とは溶出順が逆転しました。

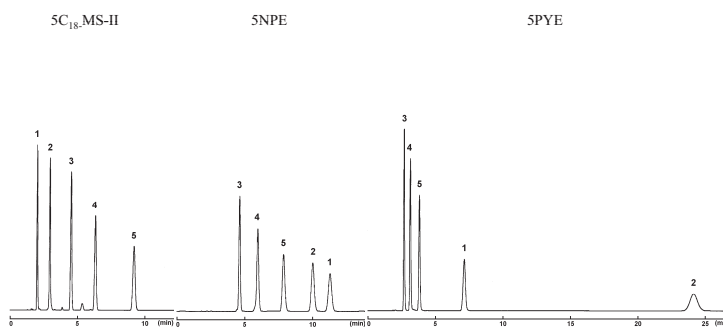
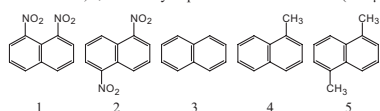
次に、ジニトロナフタレンの溶出順序について、C₁₈ や PYE などは、1,5- ジニトロナフタレンを長く保持するのに対して、NPE だけは 1,8- ジニトロナフタレンを長く保持しました。ニトロ基は電子吸引性基であり、ニトロ基が片側に偏っている分子構造をもつ 1,8- ジニトロナフタレンでは、大きな双極子が生じます。NPE の固定相であるニトロフェニル基にも双極子が生じており、双極子-双極子相互作用により 1,8- ジニトロナフタレンを長く保持したと考えられます。



双極子に対する選択性

Column size: 4.6mm I.D.-150mm
 Mobile phase: C₁₈-MS-II Methanol / H₂O = 80/20
 NPE Methanol / H₂O = 70/30
 PYE Methanol / H₂O = 90/10
 Flow rate: 1.0 ml/min
 Temperature: 30°C
 Detection: UV254nm

Sample:
 1; 1,8-Dinitronaphthalene (I,8-DNN) (0.21μg)
 2; 1,5-Dinitronaphthalene (I,5-DNN) (0.11μg)
 3; Naphthalene (0.25μg)
 4; 1-Methylnaphthalene (0.35μg)
 5; 1,5-Dimethylnaphthalene (0.42μg)



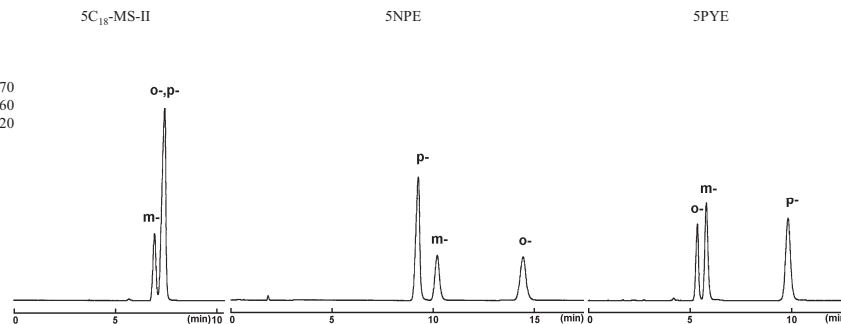
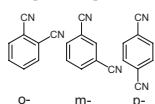
分析例

● フタロニトリルの位置異性体の分離

フタロニトリルは、ベンゼン環に電子吸引性基であるニトリル基が 2 個結合した化合物であり、3 種の位置異性体が存在します。C₁₈ では、分離が不十分ですが、NPE や PYE では π - π 相互作用により分離ができています。また、NPE では、大きな双極子をもつオルト位を強く保持しています。

Column: 5C₁₈-MS-II
 Column size: 4.6mm I.D.-150mm
 Mobile phase: 5C₁₈-MS-II Methanol / H₂O = 30/70
 5NPE Methanol / H₂O = 40/60
 5PYE Methanol / H₂O = 80/20
 Flow rate: 1.0 ml/min
 Temperature: 30°C
 Detection: UV254nm

Sample:
 o-; Phthalonitrile (0.3μg)
 m-; Isophthalonitrile (3.0μg)
 p-; Terephthalonitrile (0.15μg)

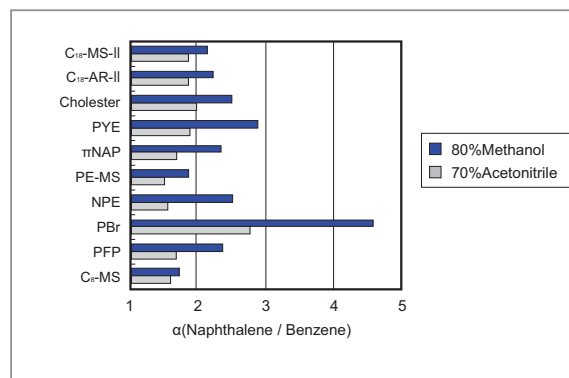


4) 多環芳香族化合物に対する選択性

選択性評価

ベンゼン環の構成数が異なるベンゼン、ナフタレン、アントラセンを分析し、ベンゼン環に対する選択性を評価した図とクロマトグラムの一部を示しました。

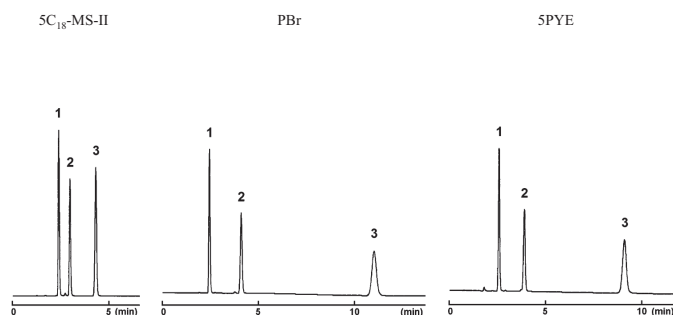
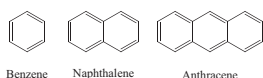
ベンゼン環の構成数が増加するにつれて疎水性が高くなるため、全てのカラムで保持が増加しましたが、特に PBr、PYE での保持の増加が顕著でした。PBr は、疎水性相互作用の他にも、固定相の 5 個の臭素原子によって大きな分散力を示すため、電子が動きやすく大きな分散力をもつ多環芳香族をより強く保持し、高い選択性を示したと考えられます。また、PYE では疎水性、分散力に加え、 π - π 相互作用が働いていると考えられます。



多環芳香族化合物に対する選択性

Column: 4.6mm I.D. - 150mm
 Mobile phase: 5C₁₈-MS-II Methanol/H₂O = 90/10
 PBr Methanol/H₂O = 90/10
 5PYE Methanol/H₂O = 80/20
 Flow rate: 1.0 ml/min
 Temperature: 30°C
 Detection: UV254nm

Sample: 1; Benzene (1.67 µg)
 2; Naphthalene (0.11 µg)
 3; Anthracene (0.0063 µg)



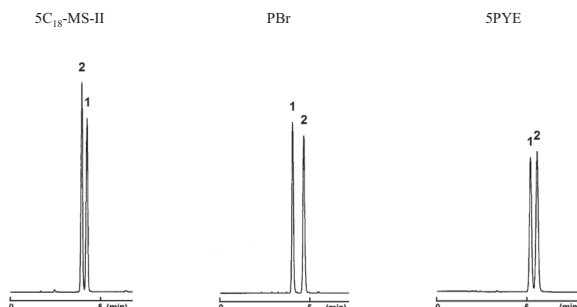
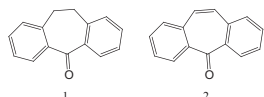
分析例

● ジベンゾスベロン、ジベンゾスベレノンの分離

2 個のフェニル基がビニレン基で結合した分子構造をもつジベンゾスベレノンと、メチレン基で結合した分子構造をもつジベンゾスベロンとの分離を行いました。C₁₈ はジベンゾスベロンを長く保持しましたが、PBr と PYE は、共役した分子構造をもつジベンゾスベレノンをより長く保持しました。

Column: 4.6mm I.D. - 150mm
 Mobile phase: 5C₁₈-MS-II Methanol/H₂O = 80/20
 PBr Methanol
 5PYE Methanol/H₂O = 90/10
 Flow rate: 1.0 ml/min
 Temperature: 30°C
 Detection: UV254nm

Sample: 1; Dibenzosuberone (0.1 µg)
 2; Dibenzosuberone (0.025 µg)

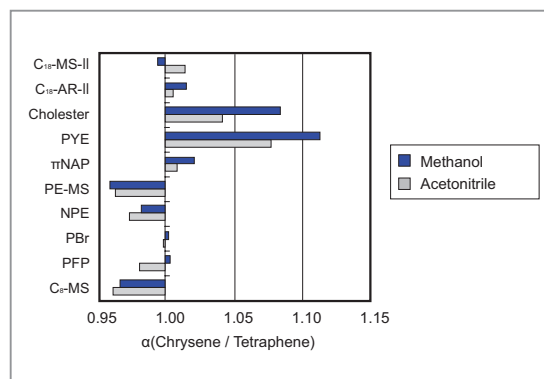


5) 分子形状認識能

選択性評価

4つのベンゼン環より構成され、結合位置の違う多環芳香族の異性体の分析を行いました。これらの化合物は、疎水性や芳香性がほぼ同じで分離が困難ですが、分子形状の違いを識別できるカラムでは、分離が可能となります。分子形状に対する選択性を評価した図とクロマトグラムの一部を示しました。

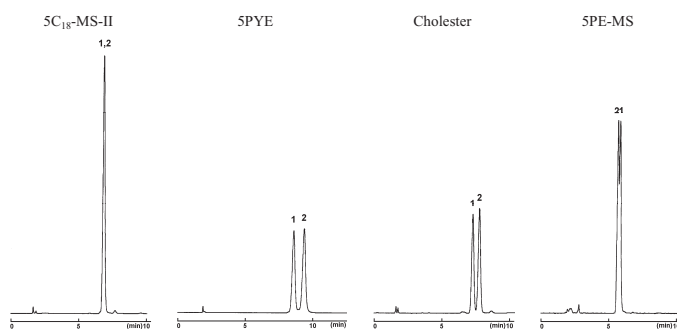
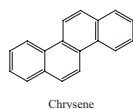
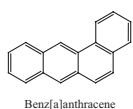
C₁₈ では低い選択性しか示しませんでした、PYE や Cholesterol は、高い選択性を示し分離することができました。



分子形状認識能

Column: 4.6mm I.D. - 150mm
 Mobile phase: 5C₁₈-MS-II, 5PYE
 Cholesterol
 5PE-MS
 Flow rate: 1.0 ml/min
 Temperature: 30°C
 Detection: UV254nm

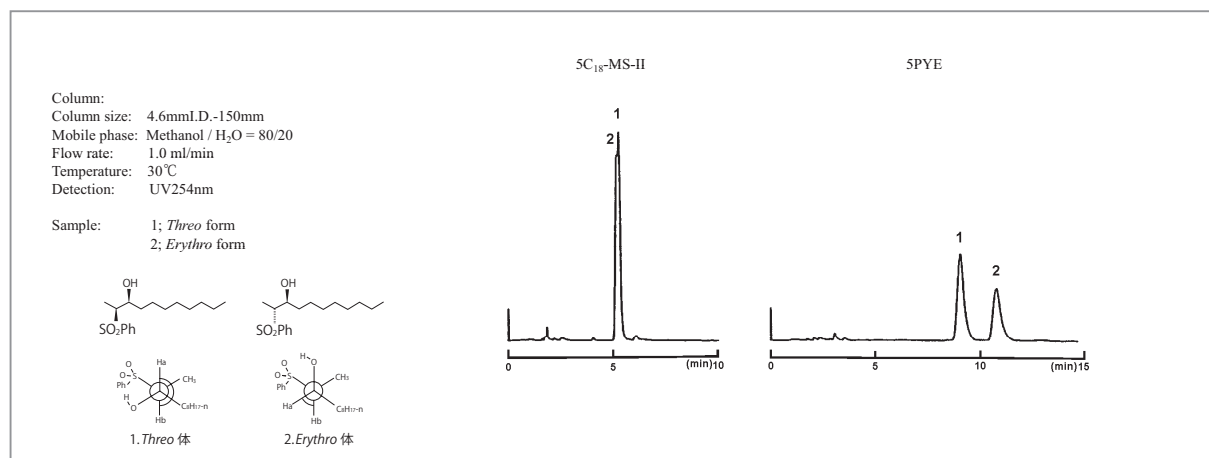
Sample: 1; Tetraphene [Benz[a]anthracene] (0.04μg)
 2; Chrysene (0.04μg)



分析例

● ジアステレオマー (*threo* 体、*erythro* 体) の分離

C₁₈ ではほとんど分離できていませんが、PYE ではかさ高い分子構造をもつ *threo* 体よりも、平面な分子構造をもつ *erythro* 体をより強く保持するため、完全分離が達成できました。

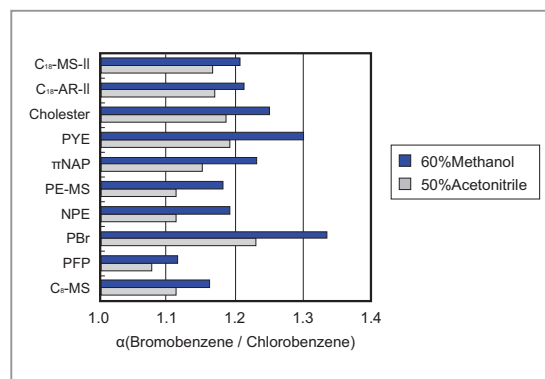


6) ハロゲン化物に対する選択性

選択性評価

ベンゼン環にメチル基、塩素、臭素が結合した分子構造をもつサンプルを分析し、ハロゲン化物に対する選択性を評価した図とクロマトグラムの一部を示しました。

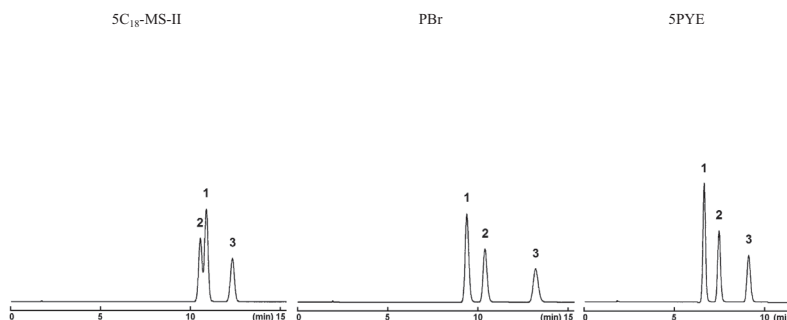
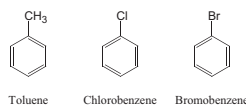
PBr は 5 個の臭素原子に基づく分散力によって、電子が動きやすく大きな分散力をもつクロロ基やブロモ基に対して高い選択性を示しました。また、PYE も PBr より小さいながらピレン環に基づく分散力が働いていると考えられます。



ハロゲン化物に対する選択性

Column:
Column size: 4.6mm I.D.-150mm
Mobile phase: Methanol/ H₂O = 60/40
Flow rate: 1.0 ml/min
Temperature: 30°C
Detection: UV254nm

Sample: 1; Toluene (3.3μg)
2; Chlorobenzene (3.3μg)
3; Bromobenzene (3.3μg)



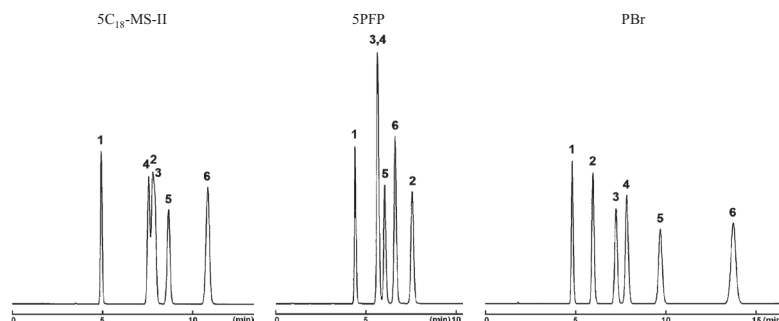
分析例

● ハロゲン化ベンゼンの分離

PBr は、分子量の大きいハロゲンをより強く保持する特性があるため、C₁₈ では分離できないハロゲン化合物を分離することができます。

Column:
Column size: 4.6mm I.D.-150mm
Mobile phase: Methanol/ H₂O = 65/35
Flow rate: 1.0 ml/min
Temperature: 30°C
Detection: UV254nm

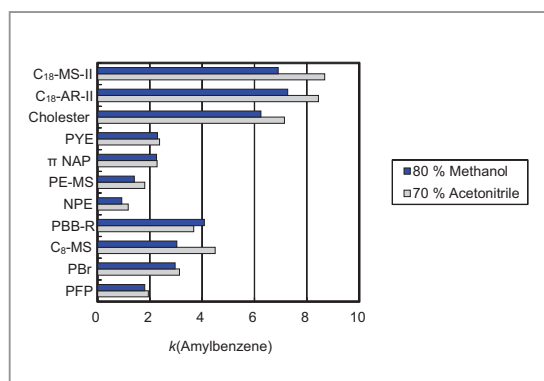
Sample: 1; Fluorobenzene (1.0mg/ml)
2; α,α,α-Trifluorotoluene (0.25mg/ml)
[Benzotrifluoride]
3; Toluene (2.5mg/ml)
4; Chlorobenzene (5.0mg/ml)
5; Bromobenzene (5.0mg/ml)
6; Iodobenzene (2.0mg/ml)
Inj. Vol.: 1.0μl



7) 疎水性に対する選択性

選択性評価

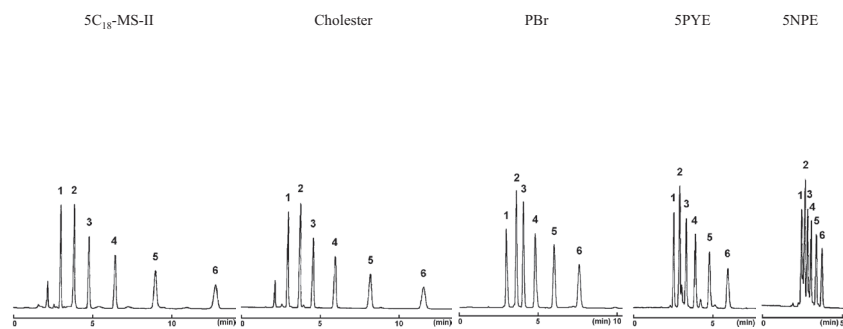
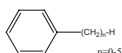
アルキル鎖長の異なるアルキルベンゼンを分析し、疎水性の高さを示す図と、クロマトグラムの一部を示しました。
シリカゲルとの結合形式が異なる2種のC₁₈とCholesterは、ほぼ同程度の疎水性の高さを示しました。ほかのカラムは、C₁₈と比較して小さな疎水性相互作用を示しました。



疎水性に対する選択性

Column: 4.6mm I.D.-150mm
Mobile phase: Methanol/H₂O = 80/20
Flow rate: 1.0 ml/min
Temperature: 30°C
Detection: UV254nm

Sample: 1; Benzene (1.67μg)
2; Toluene (1.67μg)
3; Ethylbenzene (1.67μg)
4; Propylbenzene (1.67μg)
5; Butylbenzene (1.67μg)
6; Amylbenzene (1.67μg)

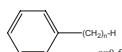


逆相クロマトグラフィーでは、移動相の有機溶媒濃度を下げると保持は大きくなります。今回評価したカラムの中で最も疎水性相互作用の小さいNPEでは、メタノール濃度を20%下げるとC₁₈と同程度の保持時間になりました。

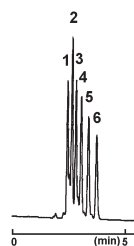
保持時間の調整

Column: 5NPE
Column size: 4.6mm I.D.-150mm
Mobile phase: Methanol/H₂O = 80/20
Flow rate: 1.0 ml/min
Temperature: 30°C
Detection: UV254nm

Sample: 1; Benzene (1.67μg)
2; Toluene (1.67μg)
3; Ethylbenzene (1.67μg)
4; Propylbenzene (1.67μg)
5; Butylbenzene (1.67μg)
6; Amylbenzene (1.67μg)



Methanol/H₂O = 80/20



Methanol/H₂O = 60/40

