

HPLC における測定のばらつきから見る逆相カラムの保持機構

Retention mechanism onto the reversed-phase columns in HPLC from measurement of precision

新田 有¹⁾²⁾

指導教員 上本 道久²⁾

1) 明治大学大学院 理工学研究科 応用化学専攻

2) 明星大学大学院 理工学研究科

キーワード：HPLC, ばらつき, 定量分析, 逆相カラム, 界面液相

1. 緒言

私達の身の回りには数多くの数値が存在している。モノの重量、含まれている成分の量、液体の体積など枚挙にいとまがない。これらの値が正しいことを前提として社会は営まれている。分析値もその例外ではない。

定量分析において分析値の信頼性は不可欠であり、分析値には定量値（平均値）とそのばらつき（不確かさ）を記す必要がある。これは、実験計測は必ずばらつき、その度合いは実験毎に異なるためである。

高速液体クロマトグラフィー（HPLC）は代表的な分離分析手法であり、医薬品分野や食品分野、環境分野など幅広い領域で使用されている。HPLC は一定の流量にて送液される移動相に試料を注入し、カラムと呼ばれる分離部によって試料が分離され、紫外可視分光検出器などで検出されることによって測定を行う。カラムでは試料との間で疎水性相互作用や静電的相互作用など様々な相互作用が発生する。このため試料成分ごとに保持される時間が異なってくることにより、成分の分離が達成される。

しかし、HPLC は生じる相互作用の複雑さから、ばらつきの変動について実態が不明な点がある。本実験では、HPLC のばらつきの発現特性及び定量性を調べる目的で、濃度と繰り返し測定の際の

RSD を両対数でプロットした¹⁾。測定条件を変更、比較することによりばらつきが HPLC での測定においてどのように影響を受けるのか検討を行った。

2. 実験

2.1 試薬

試料用として、酢酸(和光)、安息香酸(関東化学)、カフェイン(和光純薬)を用いた。

移動相溶液調製には、塩酸(関東化学)、塩化カリウム(和光)、二水素リン酸カリウム(関東化学)、水酸化ナトリウム(和光)、アセトニトリル(関東化学、HPLC 用)、メタノール(関東化学)を用いた。アセトニトリル以外は全て特級試薬を使用した。

2.2 装置

マニュアルインジェクション式の HPLC(島津, Prominence 20A シリーズ, 送液ユニット, カラムオープン, UV-VIS 検出器, システムコントローラー)を使用した。カラムは GL Sciences の InertSustain C18(内径 4.6 mm, 長さ 150 mm, 粒径 5 μm) を使用した。

2.3 実験方法

試料(安息香酸, カフェイン)を個別に超純水にて 7 段階の濃度の溶液として調製した。HPLC の測定パラメーターである移動相の pH(2-7)、移動相の混合比、移動相として使用する有機溶媒の種類などの条件を変更させて各濃度の試料ごとに 10 回の繰り返し測定を行った。得られたピークの面積強

度から信号強度値の平均値及びRSDを算出し、RSDを測定濃度に対して両対数プロットした。

3. 結果

図1に安息香酸について各pHにおける濃度とRSDの関係を示し、図2に試料をカフェインとしたときの同様の検討について結果を示す。図1より安息香酸はpH2とpH7では濃度とRSDの関係が明確に異なるのに対し、図2に示すカフェインではpHを変更させたときに濃度とRSDの関係はほとんど変化していなかった。これはそれぞれの解離状態によるカラムとの分配、脱離吸着の違いが影響していると考えられる。なお本実験で使用したC18カラムとはシリカゲルを基材とし、官能基として炭素が18個つながったオクタデシル基(C18基)が結合したものである。カラム充填剤がC18基などで構成される疎水性の逆相系カラムは移動相と理想的には平衡状態が達成される。このとき、充填剤のC18基と移動相の間に界面液相と呼ばれる、移動相よりも有機溶媒成分に富んだ相が形成されることが報告されている²⁾。この時のカラム充填剤表面の模式図を図3に示す。逆相系カラムにおいてこの界面液相が試料を分離、保持する場として大きな役割を果たす。

安息香酸はpKaが4.2程度でありpHを2及び7に変化させるとそれぞれ非解離状態と解離状態の化学種が主体となる。非解離状態である安息香酸は界面液相とC18基での分配及び脱離吸着により保持される。解離状態である安息香酸は界面液相と移動相での分配により保持される。それぞれの保持機構が異なるため、RSDと濃度の関係が変化したと考えられる。一方でカフェインはpH2, 7どちらにおいてもほぼ非解離状態であり、界面液相とC18基での分配及び脱離吸着による保持機構が変化しないため、図2のように濃度とRSDの関係も変動しなかったと考えられる。

このように試料の界面液相やアルキル基での分配、脱離吸着は試料の保持に大きく関わることに加えて、測定のばらつきにも与えている可能性がある。移動相の有機溶媒の種類や移動相の混合比を変化させたときも形成される界面液相の厚さが

異なることが報告されており²⁾、これらを変化させた条件でもばらつきに影響を与えていることが示唆されている。

また、カラム充填剤の官能基が炭素数8のもの(C8)を使用時は、安息香酸や酢酸の濃度とRSDの関係が同じpHにて変化した。一方でカフェインを試料として使用した時の同様の条件ではRSDの変化は乏しく、試料中の特定の官能基が両者のカラムで別の相互作用をしている可能性が考えられる。

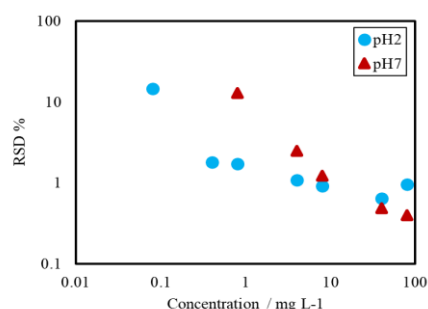


図1 各pHにおける安息香酸の濃度とRSDの関係

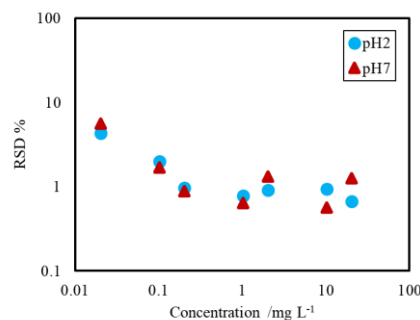


図2 各pHにおけるカフェインの濃度とRSDの関係

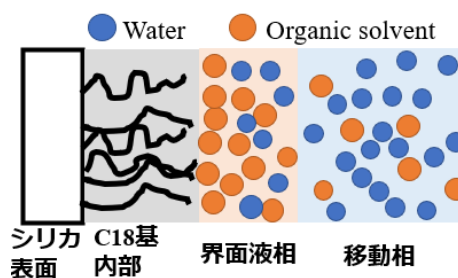


図3 カラム充填剤表面の模式図

4. 参考文献

- 1) 新田有, 上本道久: 第72年会日本分析化学年会講演要旨集, 3A3-006 (2023).
- 2) 渋川雅美: ぶんせき (*Bunseki*), 4, 135 (2023).