

高温水を移動相とした液体クロマトグラフィーにおけるイオン性化合物の保持挙動

日大生産工 (院) ○鈴木 悠介 日大生産工 齊藤 和憲
産総研計測標準 鎗田 孝 日大生産工 渋川 雅美

【緒言】高速液体クロマトグラフィー(HPLC)は、現在最も多用されている分離分析法の一つであるが、その移動相として汎用されている有機溶媒は、環境や人体への悪影響が懸念されており、あらゆる分析法においてその削減が求められている。一方、環境適合型の分離分析法として、高温高压状態の水、いわゆる超高温水を移動相としたHPLCである、超高温水クロマトグラフィー(Superheated Water Chromatography, SWC)が近年注目を集めている。SWCは、水の物性が温度に依存して変化することを利用した溶出力の制御、および移動相の温度上昇によるカラム効率の向上を目的としている^{1,2)}。

本研究では、SWCの適用範囲を広げることが目的とした。これまでSWCにおいては、主に逆相系固定相が用いられ、試料化合物との疎水性相互作用により分離が行われている場合が多い。したがって、イオン性化合物の分離をSWCによって行った報告例はほとんど無い。そこで、本研究ではイオン性化合物の分離へのSWCの適用を目的とし、逆相系および陰イオン交換系におけるイオン性化合物の保持挙動を移動相として高温水を用いて検討した。

【実験】本研究で使用したSWCシステムをFig.1に示す。溶離液には、NaClおよびNaClO₄水溶液、または所定のpHに調整した各種緩衝溶液を用いた。試料化合物には、数種の無機陰

イオンとL- α -アミノ酸を用いた。カラムオーブンはGC用のものを用い、オーブン内にはプレヒートコイル(ハステロイ製、0.5 mm i.d.×3 m)およびLCカラムを設置した。カラム充填剤としては、ポリスチレン-ジビニルベンゼン(PSDVB)樹脂(HAMILTON製、PRP-1)および、Cl⁻形強塩基性陰イオン交換樹脂(三菱化学製、DIAION CDR10、イオン交換容量: 0.3 meq/ml)

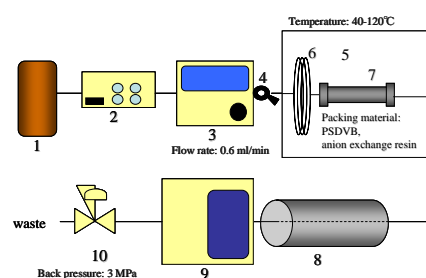


Fig.1 Schematic diagram of SWC system

1:eluent, 2:degasser, 3:pump, 4:injector, 5:oven, 6:preheating coil, 7:column, 8:cooling unit, 9:photo-diode array detector, 10:back pressure regulator

を用いた。

【結果および考察】

1. 逆相系 SWC における無機陰イオンおよびアミノ酸の保持挙動

まず、すでに高温高压水に対して耐久性があることが示されている PSDVBカラム³⁾における無機陰イオンおよびアミノ酸の保持挙動を検討した。無機陰イオンの保持は、温度を上げることにより減少した。また、理論段数は増加し、カラム効率の向上が示唆された。しかし、いずれの温度においても無機陰イオンの保持

Retention Behavior of Ionic Compounds in Liquid Chromatography Using Superheated Water as the Mobile Phase

Yusuke SUZUKI, Kazunori SAITOH, Takashi YARITA and Masami SHIBUKAWA

は非常に小さく、また互いに近接しており、分離することは困難であった。

次に、pH 6.0 リン酸緩衝液を移動相として用いたときに得られた各種アミノ酸の保持係数を Fig.2 に示す。大部分のアミノ酸はほとんど保持されずに溶出したのに対して、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン等の芳香族アミノ酸は大きな保持を示した。これは固定相との疎水性相互作用に起因するものと考えられる。これらのアミノ酸の保持時間と移動相の pH との関係性を調べたところ、中性領域での保持が非常に小さくなった。この結果は、両性イオンとして存在する pH 範囲では、アミノ酸の逆相系固定相への保持が小さくなることを示している (Fig.3)。

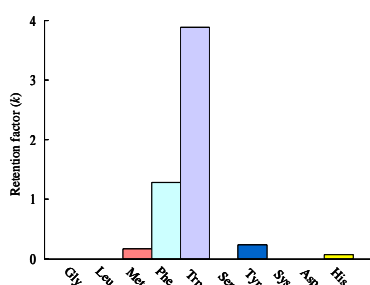


Fig.2 Retention factors of amino acids obtained in the system where phosphate buffer (pH6.0) was used as the mobile phase

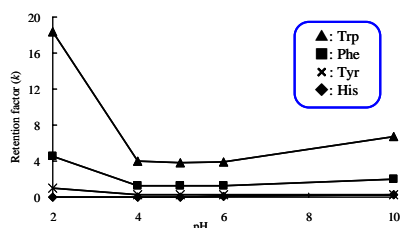


Fig.3 Dependence of retention factors of amino acids on the pH of the mobile phase

Eluent: pH 2.0: 10 mM NaClO₄/HClO₄, pH 6.0: 10 mM phosphate buffer solution, pH 10.0: 10 mM NaOH/Na₂B₄O₇, Sample concentration: 0.1 mM, Temperature: 40°C

2. 陰イオン交換系 SWC における無機陰イオンの保持挙動

これまで、イオン交換樹脂は耐熱性に乏しいとされ、高温高压条件下において使用されたことは、ほとんどなかった。しかし、Tiihonenらは、イオン交換樹脂が 150°C の高温に耐えることを示した⁴⁾。そこで本研究では、固定相として陰イオン交換樹脂を SWC に導入することとした。50 mM NaClO₄ 水溶液を移動相として

用いたとき、SCN⁻を除いた陰イオンは、温度の上昇に伴い保持が大きくなった。次に、50 mM NaCl 水溶液を用いたとき、IO₃⁻は、温度が上昇すると保持が大きくなったのに対して Br⁻と NO₃⁻については、保持が減少した (Fig.4)。また、NaClO₄ 水溶液を移動相としたとき Br⁻と NO₃⁻については、いずれの温度においても保持が非常に近接しており、分離が困難であったのに対し、NaCl 水溶液を用いたときについては、両者を良好に分離することができた。これらの結果から、温度と溶離電解質を変えることによって、陰イオンの保持を選択的に制御することがわかった。

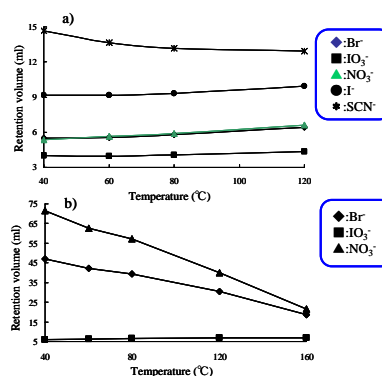


Fig.4 Dependence of retention volumes of inorganic anions on temperature
a): Eluent: 50 mM NaClO₄ solution, b): Eluent: 50 mM NaCl solution

一方、I⁻と SCN⁻については、温度の上昇に伴いピーク面積の減少が見られた。そこで、移動相に還元剤である Na₂SO₃ を添加した。その結果、ピーク面積の減少は抑制された。これは、高温条件下で試料の一部が酸化されてしまったことによるものと推測される。

【参考文献】

- 1) R. M. Smith, R. J. Burgess, *J. Chromatogr. A*, **785** (1997) 49
- 2) C. Zhu, M. David, A. C. Stephen, *LCGC ASIA PACIFIC*, **8** (2005) 48
- 3) T. Yarita, R. Nakajima, M. Shibukawa, *Anal. Sci.*, **19** (2003) 269
- 4) J. Tiihonen, E. V. Peuha, M. Latva-Kokko, S. Silander, E. Paatero, *Sep. Purif. Technol.*, **44** (2005) 166