

移動相に深共晶溶媒を添加した 逆相高速液体クロマトグラフィーにおける保持挙動

日大生産工（院）○篠部 亮 日大生産工 伊東 良晴, 中釜 達朗

1. まえがき

高速液体クロマトグラフィー（HPLC）は、医薬品や食品など様々な分野で使用されている分離分析法である。水溶性物質を分析対象とする逆相HPLCでは水を主溶媒とした移動相が用いられ、溶出力調整等の理由から移動相にメタノールやアセトニトリル（AN）などの有機溶媒を添加することが多い。しかしながら、共に医薬品外劇物であるために実験者への健康への影響が懸念され、保管や管理が煩雑である。加えて、ANはABS樹脂の原料であるアクリロニトリルの副産物として生産されるために入手困難になる場合がある。

一方、近年、環境に優しい溶媒として深共晶溶媒（DES）が注目されている。DESとは、水素結合受容体（HBA）と水素結合供与体（HBD）による水素結合を形成する2種以上の固体もしくは液体から構成された物質である。各成分単体が室温において固体であっても、得られたDESの共晶点が室温より低い場合、室温以下で液体となる。毒性の少ない成分を選択して調製できることから、環境調和型HPLCのための移動相添加溶媒としての可能性を有している。

本発表では、ANに代わる逆相系移動相用添加溶媒として、調製が簡便かつ短時間で可能であり、透明な液体であるグルコース（HBA）とクエン酸（HBD）から構成されるDES（G-C/DES）に着目した。AN含有移動相が汎用されるキサンチン系薬剤のHPLCでの保持挙動を比較することにより、ANの代替溶媒として使用できるかどうかを検討した。

2. 実験

2-1 深共晶溶媒の調製

G-C/DESは、原料であるグルコースとクエン酸をモル比1:1で混合して水を15（w/w）%加えた後、70℃で2時間攪拌することにより調

製したり。図1に原料およびDESの室温における外観を示す。

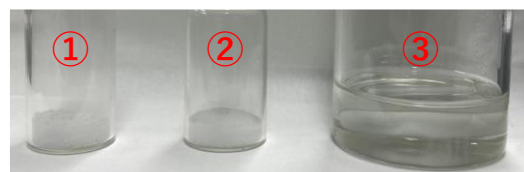


図1 グルコース(①)、クエン酸(②)およびG-C/DES (③)の室温での外観

2-2 HPLC条件

実験で用いたHPLC装置は移動相ボトル、HPLC用ポンプ、インジェクター（導入量：5 μ L）、オクタデシルシリル（ODS）化シリカゲル充填カラム（内径：4.6 mm、長さ：50 mm）、カラム恒温槽および紫外可視分光検出器で構成した。移動相流量は0.50 mL/min、試料導入量は5 μ L、検出波長は240 nmとし、カラム温度は40℃に設定した。

移動相には①水：AN=97：3（v/v）、②水：G-C/DES=97：3（v/v）、③水：グルコース=97：3（v/v）および④水：クエン酸=97：3（v/v）の4種類用いた。測定対象物質は親水/疎水性の指標であるlog P値（水-1-オクタノール間の分配係数）の違いを考慮して7種のキサンチン系薬剤（グアニン(G)、ヒポキサンチン(HX)、キサンチン(X)、テオブロミン(TB)、テオフィリン(TP)、ジプロフィリン(DP)およびカフェイン(CF))を選択した。ホールドアップ時間(t_0)測定用物質として硝酸ナトリウムを用いた。共に各移動相に溶解させて1 mMになるように調製してHPLC測定に供した。

3. 結果および考察

3-1 カフェインの保持に及ぼす移動相組成の影響

Retention behavior in reversed-phase high-performance liquid chromatography
using a mobile phase containing a deep eutectic solvent

Ryo SHINOBE, Yoshiharu ITO and Tatsuro NAKAGAMA

予備検討において、7種の測定対象物質のうち、最も保持時間が長かった（保持が強かった）カフェインを用いて、4種の移動相をそれぞれ用いたときの保持比較を行った。クロマトグラムを図2に示す。

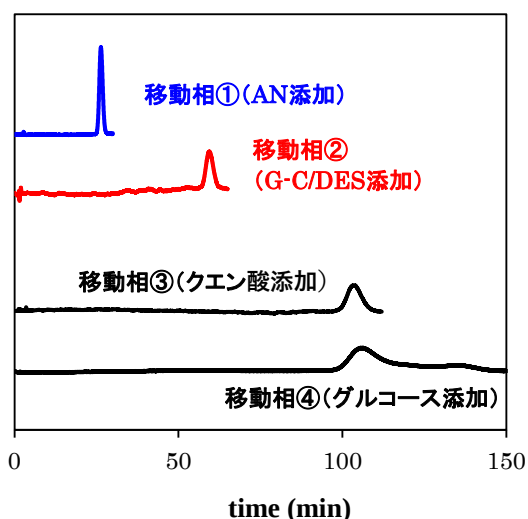


図2 各移動相におけるカフェインのクロマトグラム

検討の結果、AN含有移動相である移動相①よりもG-C/DES含有移動相である移動相②の方が保持時間(t)は長かった。DESを構成するグルコースおよびクエン酸をそれぞれ含有する移動相③および④はさらに保持時間が長くなった。

保持の指標となる保持係数(k)は、以下の式で計算される。

$$k = \frac{t - t_0}{t_0}$$

図2の場合、 k はそれぞれ21.5（移動相①）、42.3（同②）、78.6（同③）および104.8（同④）であった。この結果から、同体積比で混合した移動相を使用した場合には、カフェインに対してG-C/DESは構成物質であるクエン酸あるいはグルコースと比較して、クエン酸の約1/4倍、グルコースの約1/5倍の保持係数であった。これは、G-C/DES含有移動相ではその構成物質であるグルコースやクエン酸がそれぞれ単独で保持に寄与しているのではなく、DESとして寄与していることが示唆している。一方、ANに対しては2倍ほどの保持係数となった。

3-2 キサンチン系薬剤のHPLCにおけるG-C/DES含有移動相とAN含有移動相との比較

G-C/DES含有移動相（移動相②）およびAN含有移動相（同①）を用いた時の各測定対象物質の k の対数値（ $\log k_{G-C/DES}$ および $\log k_{AN}$ ）との相関を図3に示す。

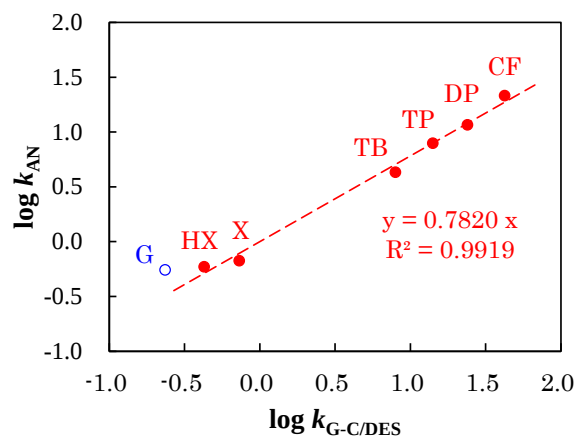


図3 キサンチン系薬剤のHPLCにおけるG-C/DES含有移動相とAN含有移動相との保持係数(k)比較

図3より、グアニン(G)を除いた6種のキサンチン系薬剤について、良好な直線関係が得られることがわかった。この結果は、キサンチン系薬剤のHPLCにおいては両移動相の分離能に差がないことを示しており、ANの代替溶媒としてG-C/DESが使用できることを示唆している。

4. まとめ

キサンチン系薬剤の逆相HPLCにおいて、G-C/DESがANに代わる移動相用添加溶媒として使用できる可能性があることを示した。

今後はカラム温度を変更して保持に対する温度応答性を比較するとともに、多変量解析により保持に寄与する相互作用を考察し、G-C/DES含有移動相がAN含有移動相に代替できるかについて議論する。

参考文献

- 1) M. B. Özmatara, *Rec Agric Food Chem.*, 1, 12-18, 2021