

# 吸着クロマトグラフィーにおける移動相の影響

佐々木 正 明  
 岩 枝 俊 直  
 橋 本 勉

## Effect of Mobile Phase in Adsorption Chromatography

Masaaki SASAKI  
 Toshinao IWAEDA  
 Tsutomu HASHIMOTO

The effect of mobile phase in adsorption chromatography was investigated using porous silica gel (average particle size, 5  $\mu$ ; specific surface area, 430  $\text{m}^2/\text{g}$ ) as adsorbent, and *n*-hexane/ethanol or *n*-hexane/chloroform as eluent. The activity of the adsorbent was found to vary to a considerable extent depending on the amount of adsorptive, e. g. ethanol, present in the eluting solvents, thus making it difficult to predict the capacity factor of solutes quantitatively from the solvent strength of the mobile phase.

### 1. はじめに

近年、高速液体クロマトグラフィーは、急速に発展した。これは、ガスクロマトグラフィーで測定できない、高沸点、固体、および高温で分解する成分等を従来の液体クロマトグラフィーで測定すると分離能が悪かったり、測定時間が長くかかるなどの理由で、進歩がなかった。しかし、最近、装置では、高圧、高流速ポンプおよび高感度検出器等の開発、充填剤では、小粒子径高分離能担体が開発され、これらの問題を一挙に解決したことによって液体クロマトグラフィーは、急速に伸びた。

液体クロマトグラフィーの一分野である吸着クロマトグラフィーについては、Snyder<sup>1)</sup>の成書にくわしく述べられている。この吸着クロマトグラフィーにおける一般的な充填剤は、シリカ、アルミナであるが、シリカについては、最近、5  $\mu$ 程度の高分離能多孔性シリカゲルが開発された。

我々は、このような小粒子径シリカゲルを用いて、試料を分離する時、一般に行なわれている移動相の極性を変えた時、移動相の極性が、分離にどのような影響を与えるか検討した。吸着クロマトグラフィーにおける移動相についての研究は、Snyderの総説<sup>1)</sup>、吸着剤にアルミナを用いて、二次吸着効果の検討<sup>2)</sup>および、各々の溶質について、一定の分配係数を得るに必要な溶媒強度を求める方法<sup>3)</sup>などがあるが、これらは、種々の特殊な移動

相を用いられている。*n*-ヘキサン-エタノール *n*-ヘキサン-クロロホルムなど、一般に使用されている移動相での吸着クロマトグラフィーは、試行錯誤的に移動相の組成を変えて、溶質の溶出位置を求めているのが、現状である。そこで我々は、これらの系で、それぞれ官能基の異なるベンゼン置換体について Snyderの理論式から、溶媒強度を変えた時の溶質の溶出位置を予測することを試みた。

### 2. 実 験

#### 〔1〕装置および試薬

装置：東洋曹達工業製、HLC-802 U 高速液体クロマトグラフィー (UV 254 nm)

試料はマイクロシリンジによりセプタム注入方式

充填剤：TSK-GEL LS 310(P5)

この充填剤は、表面積 430  $\text{m}^2/\text{g}$

平均ポア径 60 Å, 平均粒径 5  $\mu$ の多孔性シリカゲルである。

カラム：4 mm (I. D.), 30 cm ステンレスカラム

このカラムに 5  $\mu$ のシリカゲルを *n*-ヘキサンで湿式充填した。

試薬：*n*-ヘキサン(液体クロマトグラフィー用)

エタノール(試薬特級)

クロロホルム(試薬特級)

試料は UV 254 nm で検出できるベンゼン置換体の試薬を使用した。

[2] 移動相の調整

吸着剤にアルミナを用いた場合の純溶媒の溶媒強度( $\epsilon^\circ$ )は報告されている<sup>1)</sup>。また、アルミナ吸着剤とシリカ吸着剤の間には、次の関係が提案されている<sup>4)</sup>。

$$\epsilon^\circ(\text{シリカ}) \approx 0.77 \epsilon^\circ(\text{アルミナ})$$

したがって、アルミナ吸着剤での  $\epsilon^\circ$  からシリカ吸着剤での  $\epsilon^\circ$  が推定できる。しかし、一般に吸着クロマトグラフィーの測定に使用する移動相は単一溶媒で使用するとはほとんどなく、*n*-ヘキサンとアルコール(エタノール、イソプロパノールなど)、ジクロロメタン、クロロホルムおよび水などのように非極性溶媒と極性溶媒の二成分または三成分の混合溶媒が用いられる。

したがって、混合溶媒系の溶媒強度が必要となるが、二成分系の混合溶媒の溶媒強度( $\epsilon^\circ_{ab}$ )に関して、Snyder は次式を導入している<sup>1)</sup>。

$$\epsilon^\circ_{ab} = \epsilon^\circ_a + \frac{\log(N_b 10^{\alpha n_b (\epsilon^\circ_b - \epsilon^\circ_a)} + 1 - N_b)}{\alpha n_b} \dots\dots(1)$$

ここで  $\epsilon^\circ_a$  は、溶媒強度の小さい A 溶媒の溶媒強度、 $\alpha$  は吸着剤の活性度、 $n_b$  は B 溶媒分子の占める面積、そして  $N_b$  は B 溶媒のモル分率を示す。

我々は、この(1)式を用いて、*n*-ヘキサン-エタノール、*n*-ヘキサン-クロロホルム系で、溶媒混合比を変え、溶媒強度の異なる移動相を調整し、測定に使用した。ここで使用した *n*-ヘキサン-エタノール、*n*-ヘキサン-クロロホルム系移動相の溶媒の組成比と計算した  $\epsilon^\circ_{ab}$  の

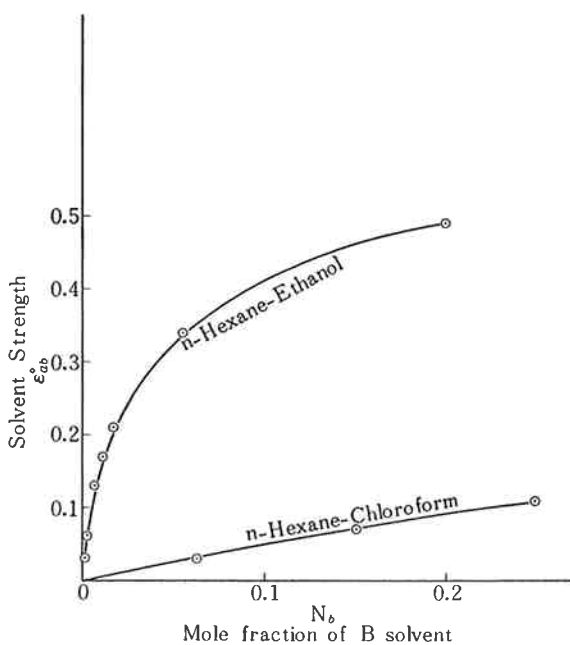


Fig. 1 Binary solvent  $\epsilon^\circ$  values versus solvent composition

値を Fig. 1 に示す。

3. 結果と考察

[1] 溶質の分配係数と溶媒強度

吸着クロマトグラフィーにおける溶質の分配係数( $K^\circ$ )は、次の式で表わされる<sup>1)</sup>。

$$\log K^\circ = \log V_a + \alpha(S^\circ - A_s \epsilon^\circ) + \Delta eas \dots\dots(2)$$

ここで  $V_a$  は、吸着剤の単位容積あたり、単分子膜として吸着されている溶離液の容積、 $S^\circ$  は、溶質の吸着エネルギー、 $A_s$  は、溶質分子の占める面積、そして、 $\Delta eas$  は、二次吸着効果を示す。

シリカゲル吸着剤における  $S^\circ$  および  $A_s$  の値は、計算から求められている<sup>1)</sup>。測定した溶質の  $S^\circ$  および  $A_s$  の値を Table 1 に示す。

Table 1  $S^\circ$  and  $A_s$  values of solute

Solute	$S^\circ$	$A_s$
<chem>c1ccccc1F</chem>	-0.15	6.4
<chem>c1ccccc1Cl</chem>	-0.20	6.7
<chem>c1ccccc1Br</chem>	-0.17	7.0
<chem>c1ccccc1I</chem>	-0.15	7.3
<chem>c1ccccc1C</chem>	0.11	6.8
<chem>c1ccccc1OC</chem>	1.83	10.6
<chem>c1ccccc1[N+](=O)[O-]</chem>	2.77	13.5
<chem>c1ccccc1#N</chem>	3.33	14.4
<chem>c1ccccc1C(=O)OC</chem>	3.45	14.1
<chem>c1ccccc1C=O</chem>	3.48	14.3
<chem>c1ccccc1O</chem>	4.20	13.6
<chem>c1ccccc1C(=O)C</chem>	4.69	15.2
<chem>c1ccccc1N</chem>	5.10	14.7
<chem>c1ccccc1C(=O)N</chem>	6.60	15.4

溶質の分配係数とキャパシティ・ファクター( $k'$ )の間には次の関係がある。

$$k' = K \cdot K^\circ$$

ここで  $K$  は定数であるから(2)式は(3)式で表わされる。

$$\log k' = \log V_a + \alpha(S^\circ - A_s \epsilon^\circ) + \Delta eas + \log K \dots\dots(3)$$

そこで我々は、この理論式のキャパシティ・ファクターと溶媒強度の関係について検討した。

まず、2-[2]で調整した溶媒強度の異なる *n*-ヘキサン-エタノール、*n*-ヘキサン-クロロホルム系移動相を用いてベンゼン置換体について、それぞれの溶媒強度におけるキャパシティ・ファクターを求めた。

キャパシティ・ファクターは次式から簡単に求められる。

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

$t_R$  は、溶質の保持時間、 $t_0$  は、非保持物質の溶出時間。

Table 2 Capacity factors of solute for various solvent strength

Solute $\epsilon^\circ$	$k'$							
	0.49	0.34	0.21	0.17	0.13	0.06	0.03	0.006
<chem>c1ccc(C)cc1</chem>	0.09	0.10	0.12	0.12	0.14	0.15	0.19	0.22
<chem>c1ccccc1</chem>	0.10	0.12	0.13	0.14	0.16	0.18	0.21	0.22
<chem>c1ccc(Cl)cc1</chem>	0.12	0.14	0.16	0.17	0.18	0.17	0.23	0.25
<chem>c1ccc(OC)cc1</chem>	0.18	0.17	0.18	0.21	0.24	0.27	0.41	0.63
<chem>c1ccc(COC)cc1</chem>	0.25	0.27	0.35	0.37	0.44	0.66	1.62	3.19
<chem>c1ccc([N+](=O)[O-])cc1</chem>	0.39	0.41	0.50	0.53	0.58	0.70	1.02	1.93
<chem>c1ccc(C=O)cc1</chem>	0.40	0.46	0.60	0.62	0.74	1.05	2.42	5.19
<chem>c1ccc(C#N)cc1</chem>	0.51	0.59	0.72	0.75	0.91	1.33	2.54	5.55
<chem>c1ccc(COC)cc1</chem>	0.42	0.49	0.69	0.76	0.94	2.07	4.36	9.98
<chem>c1ccc(N)cc1</chem>	1.02	1.80	2.90	3.35	4.36	7.10	10.32	—
<chem>c1ccc(O)cc1</chem>	0.99	2.48	8.93	12.29	20.59	63.83	—	—

\* Mobile phase: n-Hexane-Ethanol

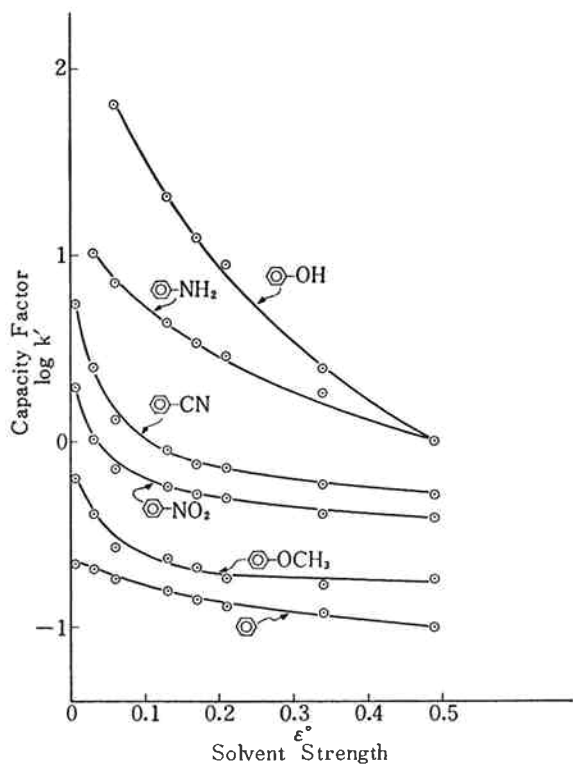


Fig. 2 Capacity factor of various solute versus solvent strength

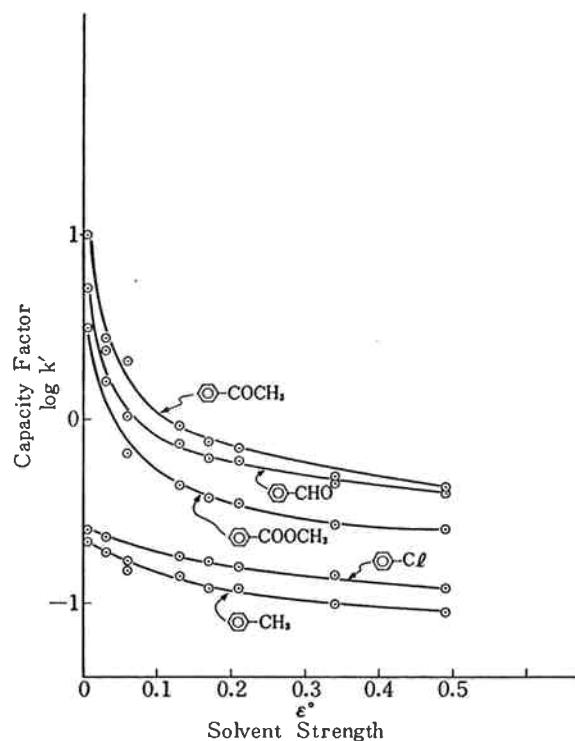


Fig. 3 Capacity factor of various solute versus solvent strength

ここで求めたそれぞれの溶媒強度における溶質のキャパシティ・ファクターを Table 2 に示す。

Table 2 の値をプロットしたものが Fig. 2 および Fig. 3 である。ここで(3)式についてもう一度検討すると、第一項の  $V_a$  は与えられた吸着剤では一定であり、 $S^\circ$  および  $A_s$  も同一溶質ならば一定である。そこで第三項の  $\Delta e_{as}$  を無視すると仮定すれば、 $\log k'$  と  $\epsilon^\circ$  は直線にならなければならない。しかし、Fig. 2 および Fig. 3 に示すように直線にならなかった。これは、 $\epsilon^\circ$  と共に吸着剤の活性度 ( $\alpha$ ) が変化していることを示す。

$\alpha$  値の変動は、 $\epsilon^\circ < 0.1$  で著しく、*n*-ヘキサン-クロロホルム系移動相においても同じ傾向が観察された。 $\alpha$  値はエタノール量の多い組成 ( $\epsilon^\circ > 0.1$ ) では、0.03~0.07と極端に小さい。また、エタノール量の少ない組成 ( $\epsilon^\circ < 0.1$ ) では  $\alpha$  値がしだいに大きくなり、吸着剤の活性度が復活していることがわかる。

この結果より、 $\alpha$  値変動の原因は、移動相中のエタノール量が寄与していると考えられる。( *n*-ヘキサン-クロロホルム系の場合、試薬のクロロホルムに安定剤として少量のエタノールが存在する。)フェノールおよびアニリンは、吸着性が強い (キャパシティ・ファクターが大きい) ため、エタノールの影響をあまり受けていないと

思われる。

移動相の溶媒強度を変えた時のキャパシティ・ファクターを予測する方法として Snyder<sup>1)</sup> は次の式を提案している。

$$\log k'_1 - \log k'_2 = \alpha A_s (\epsilon^{\circ 2} - \epsilon^{\circ 1}) \dots\dots\dots(4)$$

ここで  $k'_1$  は  $\epsilon^{\circ 1}$  でのキャパシティ・ファクター、 $k'_2$  は  $\epsilon^{\circ 2}$  でのキャパシティ・ファクターを示す。

また, Saunders<sup>3)</sup> は, 溶質を一定の  $k'$  に溶出させるために必要な溶媒強度を求める(5)式を提案している。

$$\epsilon^{\circ} = \frac{S^{\circ} - (\log k' - c)/d}{A_s} \dots\dots\dots(5)$$

ここで  $C$  は(3)式の  $\log V_a$ ,  $d$  は  $\alpha$  にそれぞれ相当する。彼らは, 吸着剤の活性度( $\alpha$ ) が溶媒強度によって変化しないと仮定しているため,  $n$ -ヘキサン-エタノール,  $n$ -ヘキサン-クロロホルム系のような  $\alpha$  値が変動する移動相では, 彼らの(4)および(5)式が適用できなかった。

もしエタノールなどの不活性化溶媒以外の溶媒を用いた場合には, (4)および(5)式が成立する可能性があるが, この点については, 今後実験的に確かめる必要がある。

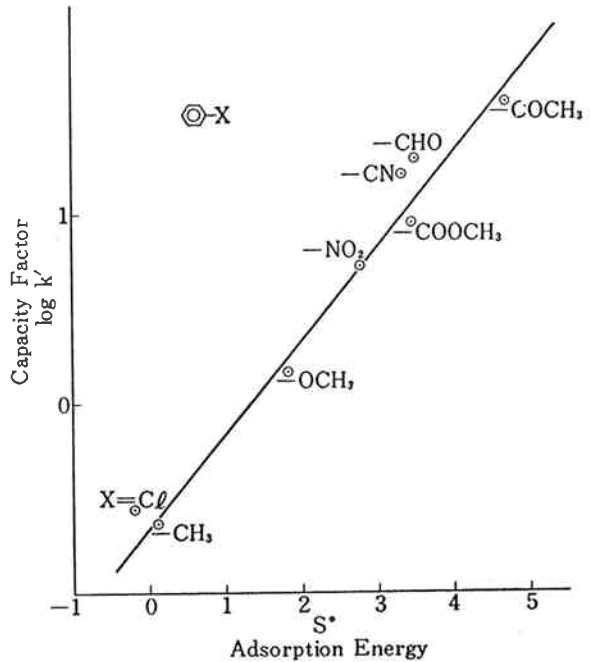


Fig. 4 Relationship of capacity factor and adsorption energy



Fig. 5  $\epsilon^{\circ} = 0.49$

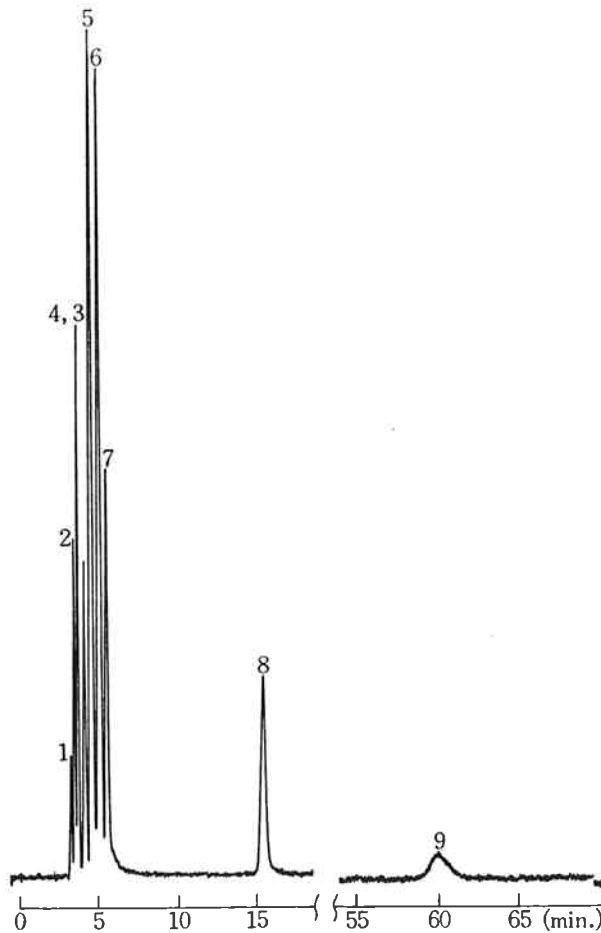


Fig. 6  $\epsilon^{\circ} = 0.11$

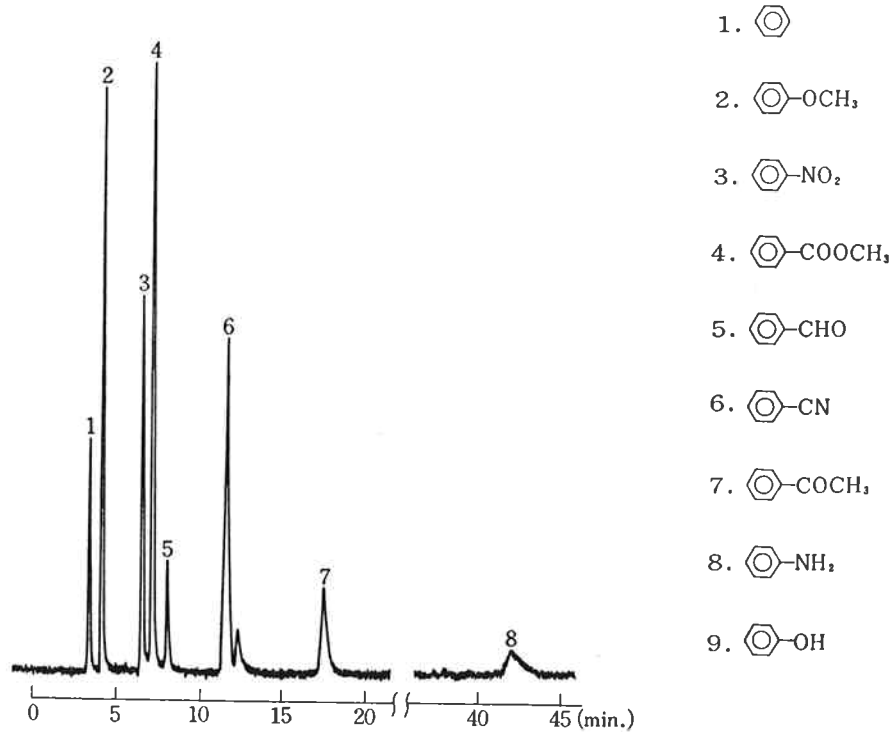
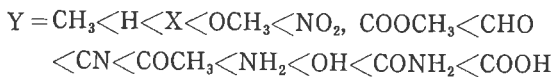
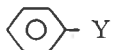


Fig. 7  $\epsilon^\circ = 0.06$

〔2〕 溶出順序

吸着クロマトグラフィーにおける溶質の溶出順序は、Fig. 4 に示したように、フェノール、安息香酸などの水素結合性が強いと思われる物質を除いてある程度溶質の吸着エネルギーに依存する。

*n*-ヘキサン-エタノール、*n*-ヘキサン-クロロホルム系移動相でのベンゼン置換体の溶出順序は、ほぼ次の通りである。この順序は Saunder<sup>3)</sup> の結果とほぼ一致する。



X ; ハロゲン

(この順序は、条件によって、一部逆転することもある。)

これらの官能基で、水素結合性の強いと思われる官能基を含む物質程遅れる傾向があるため、吸着クロマトグラフィーでは水素結合性が大きく寄与しているものと思われる。また、このような官能基を多く含む物質程吸着されやすいと考えられる。

4. 測定例

Fig. 5, 6 および Fig. 7 は、*n*-ヘキサン-エタノール系移動相を用いて溶媒強度をそれぞれ0.49, 0.11, および0.06と変えた時のクロマトグラムを示す。

この測定に使用したカラムは、 $\epsilon^\circ = 0.49$  でベンゼンのピークから計算した総理論段数は、7,700 段であった。 $\epsilon^\circ = 0.49, 0.11$  および  $0.06$  での圧力損失と流速はそれぞれ 38 kg/cm<sup>2</sup>, 1.01 ml/min, 32 kg/cm<sup>2</sup>, 1.01 ml/min および 32 kg/cm<sup>2</sup>, 1.03 ml/min であった。

5. む す び

我々は、吸着クロマトグラフィーで一般に用いられている *n*-ヘキサン-エタノール、*n*-ヘキサン-クロロホルム系移動相で、溶媒強度を変えた時、その溶媒強度における溶質のキャパシティ・ファクター値を予測することを試みたが、これらの系においては、溶離液中のエタノールおよび試薬安定剤のエタノールがシリカゲルの活性度を変化させるため、Snyder らの式にしたがわなかった。したがって、このような不活性化溶媒が共存する場合には、キャパシティ・ファクターの順位は推測できるが、定量的予測は困難であった。

文 献

- 1) L. R. Snyder; *Principles of Adsorption Chromatography*, Marcel Dekker, (1968).
- 2) L. R. Snyder; *J. Chromatogr.*, **63**, 15 (1971).
- 3) D. L. Saunders; *Anal. Chem.*, **46**, 470 (1974).
- 4) L. R. Snyder; *J. Chromatogr.*, **25**, 274 (1966).