

キャピラリー超臨界流体クロマトグラフィーによる 極性化合物の分析

田口 正^{®*}, 戸田 昭三^{**}

(1988 年 12 月 3 日受理)

キャピラリー超臨界流体クロマトグラフィーを極性化合物分析へ応用した。移動相には高純度 CO₂, カラムにはポリジメチルシロキサンを固定相とした溶融シリカキャピラリーを用いた。カラム温度は 100°C, 水素フレイムイオン化検出器(FID)の温度は 350°C, そしてカラム圧力を 150 から 400 気圧に変化させ条件設定を行った。ポリエチレングリコールアルキルフェニルエーテル(Triton X-100)について昇圧条件を一定にし, カラム温度を変化させると, 保持時間が溶媒と試料とで相反した挙動を示し, 試料のピーク形状も大きく変化することが分かった。Triton X-100 について 5 回測定したときの測定精度を相対標準偏差で表すと, 保持時間が 0.5% 以下, ピーク高さが 6.3% となり良い再現性が得られた。極性物質であるメタクレゾールノボラックオリゴマーについてトリメチルケイ素化剤を用いて誘導体化を行い超臨界流体クロマトグラフ分析したところ, 誘導体化前に見られたピークは更に幾つかに分離し, 分子の立体構造を推定するうえで貴重なデータが得られた。

1 緒 言

超臨界流体クロマトグラフィー(SFC)では移動相として臨界温度が 100°C 以下の物質が利用でき, 又超臨界流体は液体と同程度の溶解力があるため^{1)~3)}, 熱不安定な物質や, 高沸点化合物の分析に有効な手法であり, 石油精製物, 農薬, 染料, 有機酸, 界面活性剤, ポリマー, 医薬などの分析に応用されている^{4)~13)}。

一方 SFC 分析における移動相には比較的極性の小さい CO₂ が無害で安価なため多く用いられている。しかし超臨界状態の CO₂ は極性の大きい物質に対して十分な溶解力を持っていない。このため極性物質の分析には CO₂ に極性有機溶媒, 例えばメタノールなどを加えたり, 又はアンモニアなど極性の大きい移動相を用いるなどして対処している。しかしこれらの方法ははん用検出器である水素フレイムイオン化検出器(FID)が使用できなかったり, 装置の腐食, カラムの劣化などの問題が生じる。そこで本研究ではキャピラリー SFC による極性化合物の簡便かつ迅速な分析を主な目的とし, 最初に Triton X-100 を用い分析基礎条件の検討を行い, 次に試料として SFC でも分析が困難とされている熱不安定

で熱硬化を起こしやすいメタクレゾールノボラックオリゴマーを, トリメチルケイ素化剤で誘導体化し比較的低温条件で SFC 分析した結果について報告する。

2 実 験

2.1 試 薬

ジクロロメタン, テトラヒドロフラン(THF)は和光純薬工業製, 他の有機溶媒には, 関東化学工業製の特級試薬を用いた。トリメチルケイ素化剤としては, 東京化成工業の TMS-HT キット(T-690)を用いた。

2.2 試 料

Triton X-100 は関東化学工業製, 又クレゾールノボラックオリゴマーは東京応化工業よりの提供品である。

2.3 装 置

SFC 分析装置には Lee Scientific 製 501 β を用いた。電界脱離型質量分析装置(FD-MS)には日本電子製(JMS-D303)を用いた。

2.4 試料の前処理

分析の基礎条件の検討のために非イオン系界面活性剤 Triton X-100(平均分子量 670)を THF あるいはジクロロメタンで適当な濃度に希釈して用いた。

* 安部商事(株)アプリケーション開発室: 210 東京都文京区白山 2-30-5

** 東京大学農学部: 113 東京都文京区弥生 1-1-1

誘導体化に当たってはメタクレゾールノボラックオリゴマー十数ミリグラムをピリジン 0.2 ml に溶かし、TMS-HT キット(1 ml) の容器に注入した。時々振り混ぜ室温で 20 分間放置後、上澄み液を分析試料とした。

2・5 SFC 測定

試料溶液は、マイクロシリンジでループ容量が 0.2 μ l のインジェクター部に注入し、インジェクションローターバルブを高速回転させキャピラリーカラムに導入した。実際にカラム内に入る量はスプリットを行っているため、その約 10~20% である。キャピラリーカラムは Lee Scientific 製の SB メチル-100(長さ 3 m と 6.5 m, 内径 50 μ m, 膜厚 0.25 μ m) を用いた。カラムの出口にはカラム内の圧力を臨界圧力以上に保つためにフリット型リストリクター(Lee Scientific 製, 内径 50 μ m, 長さ 30 cm) が接続されている。リストリクター先端 2 cm は多孔質セラミックスでできている。この部分が FID のノズルに導入されている(以下この部分の温度を FID

温度と記す)。フリット先端はノズル出口より約 2 mm 下に位置している。

移動相にはノイズを少なくするため高純度二酸化炭素(99.999%)を用い、これをシリンドー部分を 5°C に冷却したシリンジ型ポンプを用いカラムへ導入した。本装置では圧力プログラミング法が実行できるので、試料に応じて圧力を 150 気圧から 400 気圧まで変化させ測定した。

2・6 FD-MS の測定

ピリジンに溶かしたクレゾールノボラックオリゴマーをカーボンエミッター上にマイクロシリンジで塗布し測定した。測定条件はイオン源温度 50°C, 分解能 1000, 磁場掃引スピード m/z 100~1350/7.4 s, 加速電圧 2.0 kV, カソード電圧 5.5 kV である。

3 結果と考察

3・1 測定条件の検討

3・1・1 検出器の温度変化の影響 検出器である

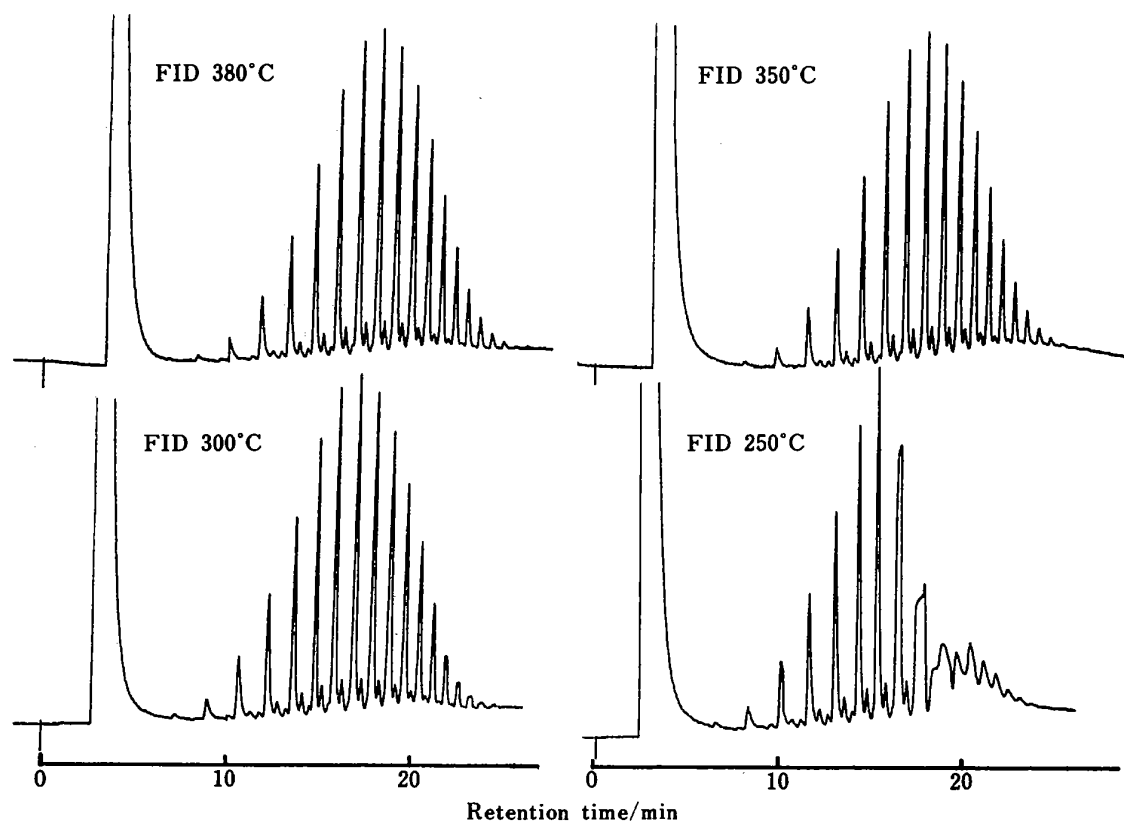


Fig. 1 Capillary supercritical fluid chromatograms of Triton X-100 at different detector temperatures by pressure programming

Pressure programmed from 200 atm to 400 atm at the rate of 5 atm/min after 5 min holding at 200 atm. The sample was dissolved in dichloromethane 10.7%. Detector (FID) temperature was adjusted from 250°C up to 380°C. Fluid: CO₂; Oven temp.: 100°C; Column: SB-Methyl-100 (6.5 m $\times$ 50 μ m i.d.)

FID 温度の最適条件を求めるために FID 温度を変化させピークのプロファイルと保持時間を調べた。試料には Triton X-100 を用い、FID 温度を 250~380°C まで変化させたときの結果を Fig. 1 に示す。350°C 以上ではシャープなピークが得られた。しかし 300°C 以下では重合度の大きいピークが出現しなかった。これは FID 温度が低いと試料は、フリットやノズル内部に吸着してしまい、フレーム中に送り込まれないからと考えられる。そこで本実験では FID 温度を 350°C に設定した。溶媒と試料成分の保持時間は FID 温度を上げると長くなっている。これはリストリクター内では移動相の動粘性率(粘性率/密度)が上がるため質量流速が減少するためと考えられる。

3・1・2 カラム温度を変化させたときの保持時間の挙動 カラム温度を変化させると、移動相の溶解力が変化し保持挙動が異なってくる。そこでこれらの挙動を詳細に検討するため Triton X-100 について、測定圧力条件を一定にして、カラム温度を変化させ実験を行った。圧力プログラミング法を用い初期圧力を 200 気圧に設定し、5 分間保持した後、1 分間当たり 5 気圧ずつ昇圧

させた。分析結果を Fig. 2 に示す。溶媒であるジクロロメタンの保持時間は温度の上昇と共に短くなる傾向が見られる。ここではリストリクターのフリット部分の温度が 350°C と一定なので質量流量は同じであること、及びカラム温度を上昇させると移動相密度は減少することのため、線速度が大きくなるのでジクロロメタンのようなカラムに保持されにくい物質は早く溶出されるからと推定した。しかし、カラムに保持されやすい試料成分の保持時間は溶媒ピークの結果とは異なり、カラム温度の上昇と共に長くなる傾向が認められた。ここでも移動相の密度変化が大きく寄与しているものと考えられる。例えばカラム内の圧力が 200 気圧の場合、カラム温度が 60°C ではその密度は約 0.7 g/cm³, 150°C では約 0.4 g/cm³ となる。

試料成分の中で重合度の低い物質は 100°C を超えると保持時間が短くなる。このように試料の保持挙動の差が顕著であるのは、移動相と固定相とへの溶解度が試料の蒸気圧などの特性によって異なるからと考えられる。

Takeuchi ら¹⁴⁾ は、多環芳香族炭化水素などについて、充填カラムでカラム温度を変化させ、移動相(CO₂)が液体から超臨界流体へと変化する際の保持容量の変化を検討しており、カラム温度と共に保持時間が増加し、ある温度以上では再び減少する傾向があることを報告している。Proot ら¹⁵⁾ もトリグリセリドを用いた実験で同様な結果を得ている。更に、Taguchi ら¹³⁾ は移動相の密度を一定にしカラム温度を上げると保持時間が短くなり、試料の蒸気圧が保持に影響を及ぼしていることを報告している。

以上の実験結果からカラム温度の選定に当たっては分離、保持時間を考慮し試料に応じて適切な温度範囲を決めなければならないことが分かった。カラム温度は、今回の試料では約 100°C が実用的であると考え以後の実験に用いた。

3・1・3 再現性の検討 ジメチルポリシロキサンカラムを用いて測定の再現性を調べた。試料には Triton X-100 を用いた。5 回の注入時において、溶媒(THF)と試料の各ピークの保持時間の相対標準偏差はそれぞれ 0.5% 以下であった。試料ピークのうち最も高いピークについて、そのピーク高さの相対標準偏差は 6.3% となった。又 Taguchi ら¹³⁾ は同 SFC 装置を用いてシアノプロピルメチルポリシロキサンカラムで標準物質であるテトラエチレングリコールのピーク高さの再現性を調べ 3.5% と報告している。実試料を用いた今回の結果では 5% を超えたがほぼ満足できる再現性が得られた。

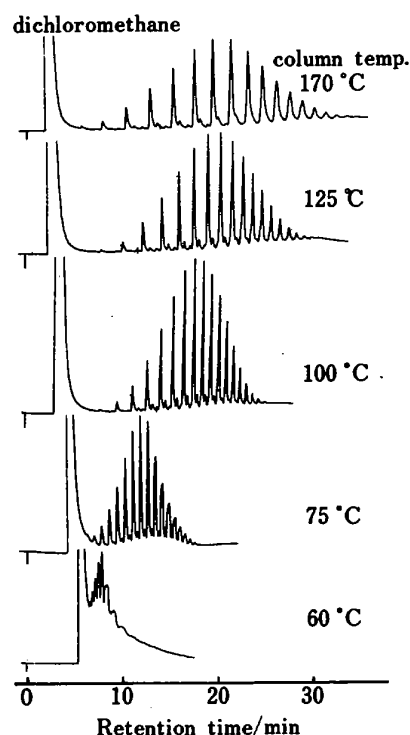


Fig. 2 Capillary supercritical fluid chromatograms of Triton X-100 at different oven temperatures by pressure programming

Column temperature was adjusted stepwise from 60°C up to 170°C. Other conditions are as in Fig. 1.

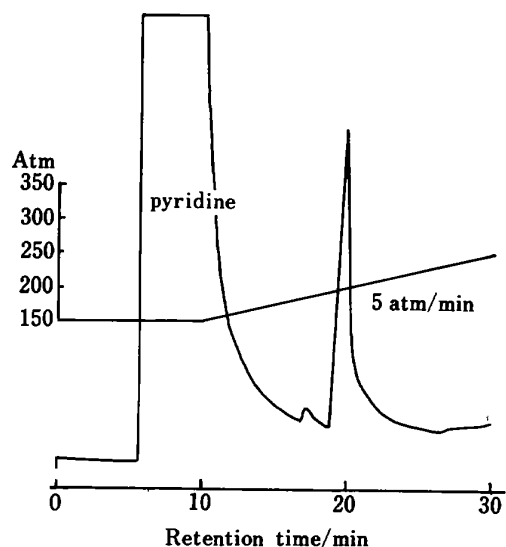


Fig. 3 Capillary supercritical fluid chromatograms of *m*-cresol novolak oligomer

Pressure programmed from 150 to 400 atm at the rate of 5 atm/min after 10 min holding at 150 atm. The sample is dissolved in pyridine. Column: SB-Methyl-100 (3 m×50 μm i.d.). Other conditions are the same as in Fig. 1.

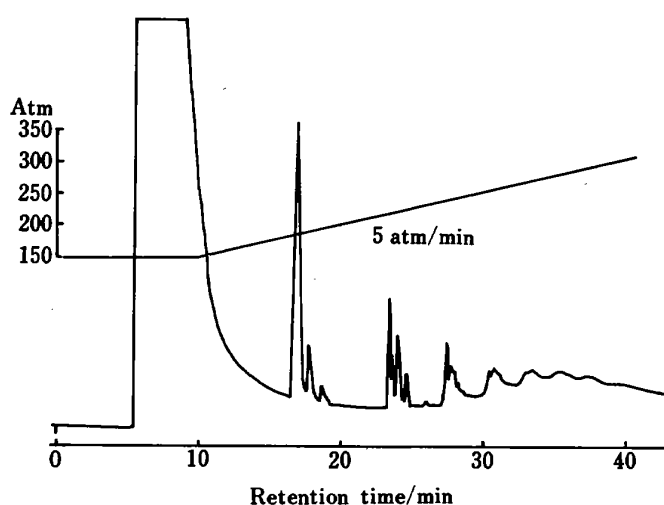


Fig. 4 Capillary supercritical fluid chromatograms of trimethylsilylated cresol novolak oligomer

Other conditions are the same as in Fig. 3.

3・2 極性化合物への応用分析

極性化合物の一例としてメタクレゾールノボラックオリゴマーの分析を行った。試料をピリジンに溶かし、昇圧プログラミング法を用い直接 SFC で測定した。結果を Fig. 3 に示す。次に試料を TMS 処理により誘導体化し測定した。結果を Fig. 4 に示す。Fig. 3 では二量体と思われるピークのみ出現し重合度のより大きいオリ

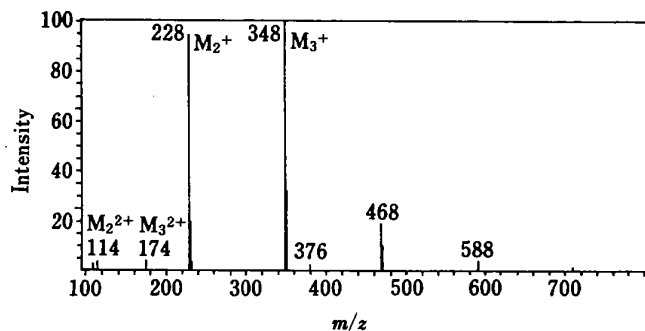


Fig. 5 FD spectrum of *m*-cresol novolak oligomers

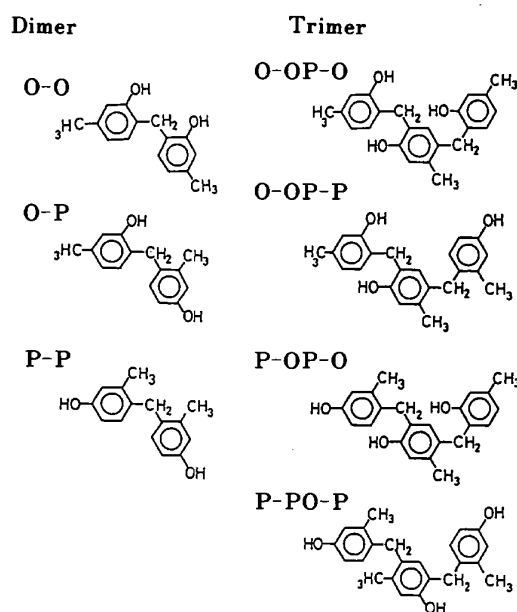


Fig. 6 Chemical structures of isomerides of *m*-cresol novolak oligomers

ゴマーは溶出しなかった。しかし試料を誘導体化することによってこのピークは更に分離し、重合度の大きい部分のピークも観測された。このことは極性官能基を多数有する試料に対しては誘導体化が極めて有効であることを示している。

更にこれらのオリゴマーの分子量を推定するためにクレゾールノボラックを FD-MS を用いて分析を行った。結果を Fig. 5 に示す。分子量 228 と 348 に出ているピークは親ピーク、114 と 174 のピークはそれぞれのダブルチャージピークである。ここで分子量 228 は二量体、分子量 348 は三量体、分子量 468 は四量体、588 は五量体と考えられる。この結果を Fig. 4 と照らし合わせると、質量スペクトル上の各質量数に対応して SFC のクロマトグラム上には二量体、三量体などの

ピーク群が見られた。

次にこれらの化学構造を考えてみると Fig. 6 に示したようになる。二量体では 3 種, 三量体は 4 種の異性体が考えられる。しかし四量体では 9 種以上の異性体が存在し, これらの異性体の分離は不十分となっている。

このように極性物質を誘導体化後 SFC 分析した報告は少ない。Chester ら¹⁶⁾ はオリゴ糖を TMS 処理し, SFC 分析し良好な結果を得ている。オリゴマーを用いた今回の研究からも明らかなように, SFC は誘導体化法を用いることにより極性物質に十分適用できることが分かった。

以上 SFC による極性オリゴマーの分析において, 検出器の温度, カラム温度と保持時間の関係について最適化を図り精度良く, 更により極性のあるオリゴマーには誘導体化法を用いることにより簡便, 迅速に測定することができた。今後種々の極性の異なった試料について, 各種のキャピラリーカラム, 移動相などを用いる SFC による分析を行いたいと考えている。

終わりに, 分析試料を提供して頂いた東京応化工業(株)の浅海慎五氏, 質量分析に御協力頂いた同社西田正隆氏, そして多くの御助言をいただいた豊橋技術科学大学の平田幸夫助教授, 名古屋大学工学部合成化学科第五講座の皆様

(1987 年 10 月, 日本分析化学会 36 年会)
(及び 1988 年 9 月, 日本分析化学会 37 年会において一部発表)

文 献

- 1) T. H. Gouw, R. E. Jentoft : *J. Chromatogr.*, **68**, 303 (1972).
- 2) P. A. Peaden, M. L. Lee : *J. Chromatogr.*, **259**, 1 (1983).
- 3) C. M. White, R. K. Houck : *HRC & CC*, **9**, 3 (1986).
- 4) S. M. Fields, M. L. Lee : *J. Chromatogr.*, **349**, 305 (1985).
- 5) B. W. Write, R. D. Smith : *HRC & CC*, **8**, 8 (1985).
- 6) W. M. P. Jackson, D. W. Later : *HRC & CC*, **9**, 175 (1986).
- 7) T. L. Chester : *J. Chromatogr.*, **299**, 424 (1984).
- 8) J. C. Fjeldsted, W. P. Jackson, P. A. Peaden, M. R. Andersen, M. L. Lee : *J. Chromatogr. Sci.*, **21**, 222 (1983).
- 9) Y. Hirata : *J. Chromatogr.*, **315**, 39 (1984).
- 10) D. W. Later, B. E. Richter, D. E. Knowles, M. R. Anderson : *J. Chromatogr. Sci.*, **24**, 249 (1986).

- 11) K. Sugiyama, M. Saito, M. Honda, M. Senda : *J. Chromatogr.*, **332**, 107 (1985).
- 12) K. E. Markides, M. L. Lee (Ed) : *SFC Applications*, The 1988 Workshop on SFC in Park City, Utah, p. 335 (1988).
- 13) M. Taguchi, S. Nagata, K. Matsumoto, S. Tsuge, Y. Hirata, S. Toda : *Proceedings of the International Symposium on Supercritical Fluids*, Tome 1, 485 (1988).
- 14) T. Takeuchi, Y. Hashimoto, D. Ishii : *J. Chromatogr.*, **402**, 328 (1987).
- 15) M. Proot, P. Sandra, E. Geeraert : *HRC & CC*, **9**, 189 (1986).
- 16) T. L. Chester, D. P. Innis : *HRC & CC*, **9**, 209 (1986).

☆

Polar oligomeric polymer analysis by capillary super-critical fluid chromatography. Masashi TAGUCHI* and Shozo TODA** (*Application & Development Laboratory, ABE Trading Co., Ltd., 2-30-5, Hakusan, Bunkyo-ku, Tokyo 113; **Faculty of Agriculture, The University of Tokyo, 1-1-1, Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113)

The analysis of the polar oligomers by capillary supercritical fluid chromatography coupled with a flame ionization detector (FID) is described. The mobile phase was CO₂. Column temperature was increased stepwise from 60~170°C. A fused silica capillary column treated with polydimethyl siloxane (3 m, 6.5 m × 50 μm i.d.) was connected to a frit restrictor (25 cm × 50 μm i.d.). Samples were successfully chromatographed using pressure programming. Pressure was changed from 150 atm up to 400 atm at the FID temperature of 350°C. A surfactant such as polyethylene glycol alkylphenyl ether (Triton X-100) was analyzed at different column temperatures. It was found that the retention time of dichloromethane and sample peaks moved toward different directions as the temperature went up. The relative standard deviation (R.S.D.) for retention time of THF and Triton X-100 (14.3%) were within 0.5%. The R.S.D. for peak height of the highest peak of Triton X-100 was 6.3%. We obtained good results for polar oligomers such as *m*-cresol novolak resin by trimethylsilyl derivatization. The several peaks corresponding to the stereoisomers, as dimer, trimer, etc. inferred from FD-MS, were observed separately in SFC.

(Received December 3, 1988)

Keyword phrases

capillary supercritical fluid chromatography; oligomer analysis; MS; derivatization.