

技術論文

水 100% 移動相を用いた高速液体クロマトグラフィー逆相固定相の保持挙動

長江 徳和^{®*}, 榎並 敏行^{*}Retention behavior of reversed-phase for HPLC using
a 100% aqueous mobile phaseNorikazu NAGAE and Toshiyuki ENAMI^{*}^{*}Nomura Chemical Co., Ltd., 851, Anada-cho, Seto-shi, Aichi 489-0003

(Received 29 June 2000, Accepted 9 August 2000)

The retention behavior of the reversed-phase was evaluated under 100% aqueous conditions. It is commonly said that reversed-phases, such as ODS (C₁₈) and C₈, show a decrease in the retention time under 100% aqueous conditions. The mechanism of the decrease in retention was found to be that the 100% aqueous mobile phase was pulled out of the pore of the packing materials, so that the stationary phase in contact with the mobile phase decreased. Some parameters, such as the pore size, length of the alkyl group of the stationary phase, temperature and buffer in the mobile phase, were shown to influence the decrease in retention. The C₃₀ phase didn't show any decrease of retention. Furthermore, ODS, which had a larger pore, didn't show any decrease in the retention time, but showed high reproducibility in retention. In contrast, TMS (C₁), which had a smaller pore, showed a decrease of retention, although it was known that TMS, which had 10 nm of a pore, didn't show a decrease in retention. The reversed-phase could be used under 100% aqueous conditions, and showed high reproducibility in retention when it was filled with some terms.

Keywords : reversed-phase; 100% aqueous mobile phase; retention behavior; HPLC.

1 緒 言

水 100% 移動相, 塩・酸などを含む緩衝液移動相 (以下水 100% 移動相の表現には緩衝液も含む), もしくはこれら 100% 水系溶媒に有機溶媒を数パーセント混合した移動相を一般的なアルキル基結合型逆相固定相に用いた場合, 試料の保持時間が一定せず, 時間の経過とともに保持が減少し, 実質的には使用不可能であると考えられている. これはアルキル基の寝込み現象により引き起こされ, この寝込みにより固定相の選択性までも変化すると報告¹⁾されている. この問題点を解決するために, 極性の高いアミド基^{2)~6)}やカルバメート基⁷⁾を含むアルキル基をシリカ担体に結合した固定相や, ステアリル基 (C₁₈) 結合後シリカ担体に残る残存シラノール基を減少させるために行うエン

ドキャッピング処理に極性基を結合した固定相など, 固定相内に極性基を含んだもの, もしくはアルキル基の結合密度を下げることで固定相の疎水性を低くしたもの⁸⁾が充填剤として用いられている. また, 別の解決方法として, 従来用いられていた炭素数 1 から 22 までのアルキル基以外の長鎖アルキル基^{9)~11)}を用いることにより, 水 100% 移動相を使用可能にしている固定相も提唱されている. しかし, 極性基を含む固定相はこれら極性基の影響により分離に対する選択性が変化する, また固定相の疎水性がこれらの極性基により減少するため保持が減少する又は耐久性が低下するなど, 今までの逆相固定相とは異なる分離性能を示す. 分離が改善される場合もあるが, 逆に保持が小さくなることなどにより, 分離できなくなるなどの問題点も有している.

本報¹²⁾は水 100% 移動相を用いた場合, 通常の逆相固定^{*} 野村化学株式会社: 489-0003 愛知県瀬戸市穴田町 851

相に起こる保持の減少について、その過程を明らかにし、前述したような極性基を含まない逆相固定相、つまり従来水 100% 移動相が使用不可能であると考えられていた逆相固定相でも、ある一定の条件を満たした固定相を用いる又は使用条件を変更することにより、水 100% 移動相を用いても十分な保持の再現性が得られることを見いだしたので報告する。

2 実験

2.1 装置

HPLC システムは日本分光製 PU-980 送液ポンプ、UV-970 検出器、レオダイン製 7125 インジェクター、システムインスツルメンツ製 480 データ処理装置を用いた。カラム恒温槽には水浴を用い、オリオン機械製 RKS-500-B 冷却器及びヒーターによりオムロン製 E5C3 温度コントローラーで温度制御した。物性値はベックマンコールター製 SA3100 及びヤナコ製 CN コーダーを用いて測定した。

2.2 試薬

水は水道水を 2 回蒸留し、ODS カラムに一度通液したものを用いた。リン酸ナトリウム、核酸塩基、亜硝酸ナトリウムは和光純薬製を用いた。カラムは野村化学製 Develosil ODS-UG-5, 300ODS-HG-5, C30-UG-5, TMS-UG-5, 60TMS-UG-5, 30TMS-UG-5 のサイズ 15cm × 4.6 mm i.d.を用いた。各充填剤の物性値を Table 1 に示す。結合密度の値からこれらの充填剤は結合密度の高い部類に属する。以下充填剤の表示は Table 1 の固定相名で示す。

3 結果と考察

3.1 水 100% 移動相を用いた場合の保持の減少

Fig. 1 には平均細孔径 10.4 nm の ODS(10) (オクタデシルシリル基) 固定相の 40℃ でのチミンと亜硝酸ナトリウムの保持の変化を示す。70 時間連続通液の場合、1 時間後から 19 時間後までにチミンの保持時間は約 16% 減少している。また、72 時間以降の通液停止後は更に 58% もチミンの保持時間は減少した。一方カラムを素通りし固定相に全く保持していないと考えられる亜硝酸ナトリウムについても、同様に溶出時間の変化を示した。固定相に保持しない試料は、充填剤粒子間の間隙及び充填剤内の細孔の容積分の溶出時間を示す。数十パーセントの有機溶媒を含む移動相ではウラシルが、また水 90% 以上の移動相では亜硝酸ナトリウムが、固定相と全く相互作用しない保持値 0 の試料として用いられることが多い。Fig. 1 の亜硝酸ナトリウムの初期の溶出時間は 1.61 分であり、流量 1.0 ml/min で通液しているためカラム内の充填剤粒子間隙、充填剤の細孔容積、インジェクターとカラム入り口までの配管等の容積、及びカラム出口から検出器フローセル

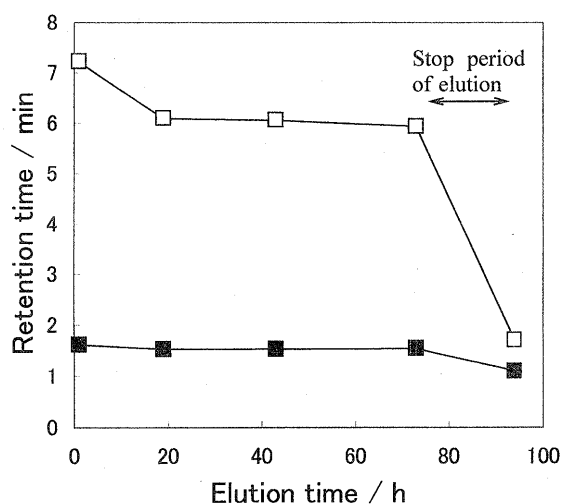


Fig. 1 Retention behavior of ODS(10) under 100% aqueous conditions

Conditions: stationary phase, ODS(10); column size, 150 × 4.6 mm i.d.; mobile phase, 10 mM sodium phosphate (pH 7.0); flow rate, 1.0 ml/min; column temperature, 40℃; wave length of UV detection, 254 nm; sample, thymine (□) and sodium nitrite (■)

までの配管等の容積の総和が 1.61 ml であり、移動相が 1.61 ml 存在していることになる。ポンプ停止後は溶出時間が 1.1 分まで減少しており、移動相が存在する充填剤粒子間隙と充填剤の細孔容積の和が 0.51 ml 減少したことになる。充填剤の平均粒子径が 5 μm の場合、粒子間隙は約 1 μm となり、充填剤の平均細孔径 10.4 nm に比べ約 100 倍であり、粒子間隙きのほうが細孔径よりはるかに大きいため、この移動相の減少分は径の小さい充填剤細孔内の容積が減少したと考えられる。つまり水 100% 移動相は初期には充填剤細孔内に入り込んだ状態で通液されるが、最終的には充填剤細孔内の大部分には移動相が入り込んでいないことになる。水 100% 移動相に切り替え、1 時間通液後のカラムをポンプ停止後直ちに密栓をし測定したカラム重量と比べ、最終的に保持が大きく減少した後と同様に測定したカラム重量は、亜硝酸ナトリウムの溶出時間の差の分だけ減少しており、保持の減少後にはカラム内に水 100% 移動相が満たされていない部分が存在することが以下のように確認された。アセトニトリル-水 (70 : 30) 移動相で ODS(10) カラムを平衡にした後、Fig. 1 と同じ条件で 1 時間通液後、送液ポンプを停止し、圧力表示が 0 MPa になると同時にカラムを外し密栓をし、カラム重量を測定した。カラムを外し密栓をするまでには約 7 秒の時間がかかった。次に再度アセトニトリル-水 (70 : 30) 移動相で ODS(10) カラムを平衡にした後、同様な操作を行い、送液ポンプ停止し 19 時間経過後密栓をし、カラム重量を測定した。カラム重量はそれぞれ 62.3 と 61.8

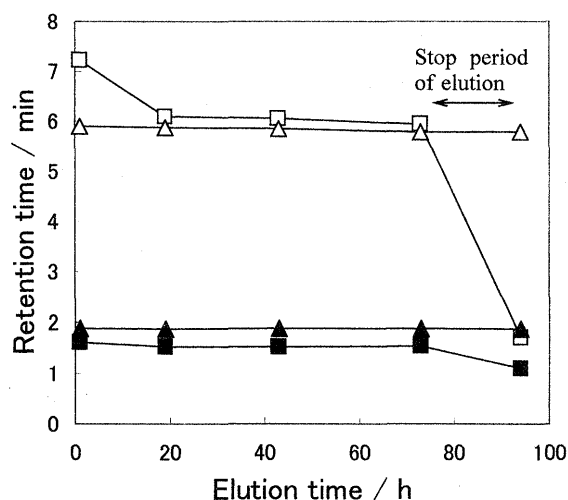


Fig. 2 Retention behavior of ODS(10) and ODS(22) under 100% aqueous conditions

Conditions: stationary phase, ODS(10) and ODS(22); other conditions as in Fig. 1. □: ODS(10) and thymine; ■: ODS(10) and sodium nitrite; △: ODS(22) and thymine; ▲: ODS(22) and sodium nitrite

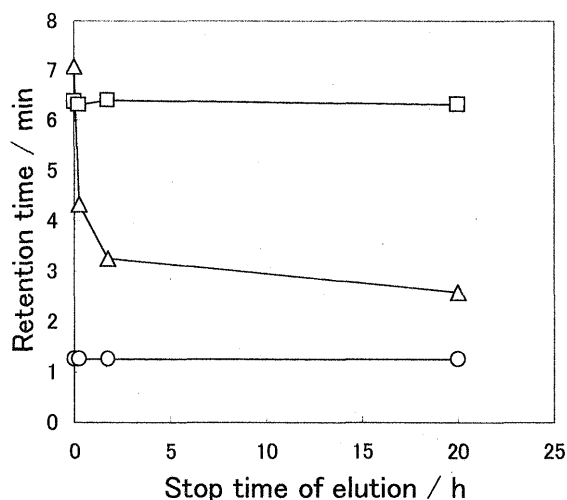


Fig. 3 Retention behavior of TMS(13), TMS(6) and TMS(3) under 100% aqueous conditions

Conditions: stationary phase, TMS(13), TMS(6) and TMS(3); sample, thymine; other conditions as in Fig. 1. □: TMS(13); △: TMS(6); and thymine; ○: TMS(3)

gであり、0.5 gの重量差であった。また後半の操作において送液ポンプ停止後圧力表示が0 MPaになってから、検出器フローセル出口より溶出する移動相をメスシリンダーを用いて測定した。この溶出量は0.5 mlであった。これらの結果はまさに充填剤細孔内から移動相が亜硝酸ナトリウムの溶出時間の減少分だけ抜け出していることを示唆している。更に後述するカラム温度も考慮に入れ以下のような結果も得られた。アセトニトリル-水 (70 : 30) 移動相で ODS(10) カラムを平衡にした後、カラム温度を10℃に設定し、カラム温度以外は Fig. 1 と同じ条件で1時間通液し、送液ポンプ停止後カラム入り口のみに密栓をし19時間放置した。その後カラム温度を40℃まで上昇させ、カラム出口より溶出する移動相をメスシリンダーを用いて測定した。その結果、温度上昇により溶出した移動相は約0.4 mlであった。この実験条件では10℃から40℃の温度変化のみであり、カラム内は大気圧である。水の温度による体積膨張を考慮に入れても、0.4 ml 近くの空間がカラム内に発生したことになる。この約0.4 mlの容積はそれぞれの温度での最も短くなった亜硝酸ナトリウムの溶出時間の差に相当する。以後同様に水100%移動相を用いた保持の減少は、すべて亜硝酸ナトリウムの溶出時間が減少している。水100%移動相通液前には有機溶媒を含む移動相を用いているため、水100%移動相に切り換える前は充填剤細孔内には移動相は満たされている。切り換え直後は細孔内のほとんどは水100%移動相に置換されており、時間の経過とともに細孔外へ抜け始めると考えられる。

3.2 細孔径の影響

Fig. 2 と 3 には細孔径の異なる ODS と TMS(トリメチルシリル基) の保持の変化を比較した。Fig. 2 より 10.4 nm の細孔径の ODS(10) は保持時間が減少しているが、21.9 nm の細孔径の ODS(22) は一定の保持時間を示した。ODS(10) では大きく保持時間が減少している通液停止後も、ODS(22) は全く保持時間は変化していない。通常の低分子分析用には10 nm 前後の細孔径の ODS(10) 充填剤が一般的に用いられ、20 nm 以上の細孔径を有する ODS(22) 充填剤は、タンパク質などの巨大分子分析用に用いられている。後者 ODS は細孔径が大きいため、比表面積が小さくなり、低分子試料は比表面積に保持がほぼ比例することから、比表面積が小さい低分子試料の保持が減少するなど不利な点が多く、低分子分析用に用いられることはほとんどない。しかし水100%移動相を用いた場合は、この ODS(22) は細孔径が大きいため、移動相が時間の経過とともに抜け出ることがなく、亜硝酸ナトリウムもチミンも溶出時間及び保持時間が一定である。Fig. 3 は TMS の比較例であり、通液停止後の保持時間の大きく変化する条件での保持時間の変化をプロットしている。1時間通液後15分間通液停止し、その後再度通液開始し30分通液後の保持時間を測定した。次に1.75時間通液停止し合計2時間通液停止後の保持時間を同様に測定し、最後に合計20時間後を測定した。TMS(13) は保持時間が一定であるが、TMS(6) は大きく減少している。また、TMS(3) については、チミンの保持時間が水100%移動相に切り換え直後から1.25分であり、Fig. 3 には示していない。

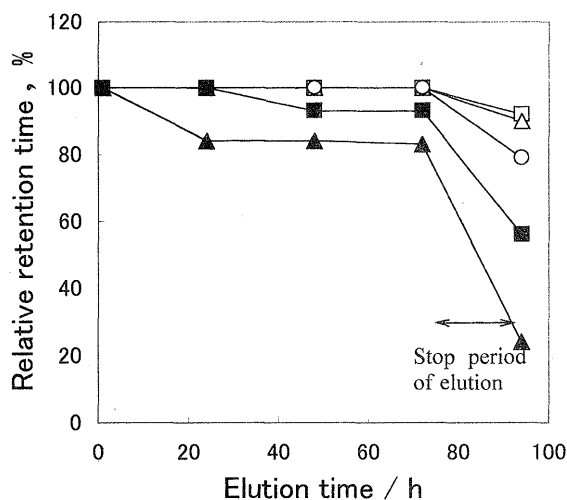


Fig. 4 Retention behavior of ODS(10) at several temperatures under 100% aqueous conditions

Conditions: stationary phase, ODS(10); other conditions as in Fig. 3. $\square$: 5°C; $\triangle$: 10°C; $\circ$: 20°C; $\blacksquare$: 30°C; $\blacktriangle$: 40°C

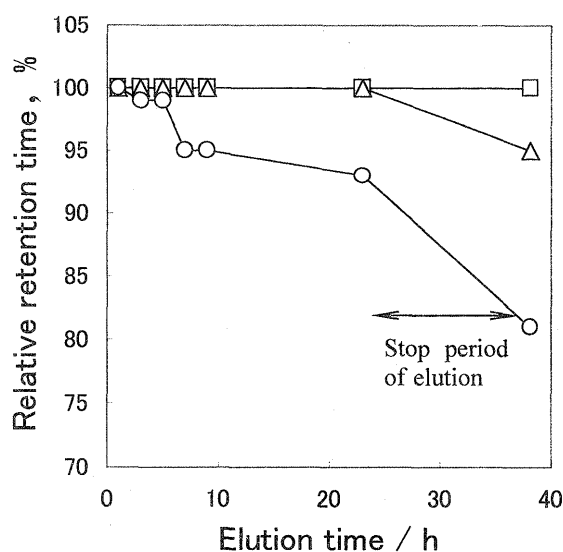


Fig. 5 Retention behavior of C₃₀(10) at several temperatures under 100% aqueous conditions

Conditions: stationary phase, C₃₀(10); other conditions as in Fig. 4. $\square$: 30°C; $\triangle$: 40°C; $\circ$: 80°C

が亜硝酸ナトリウムの溶出時間が初期から 1.20 分であることを考慮すると、3 nm の小さな細孔径では水 100% 移動相切り換え直後から、細孔内には移動相が満たされておらず、細孔内での試料と固定相の相互作用は起こっていないと結論づけられる。この 3 nm の細孔径の TMS(3) でも、アセトニトリル-水 (70 : 30) のような十分に有機溶媒濃度の高い移動相では、TMS(6) よりも高い保持を示し、細孔内に移動相は満たされていることが確認されている。

これらの結果から、水 100% 移動相を用いた場合の保持時間の再現性は、細孔径により大きな差が生じ、細孔径の大きな充填剤を用いれば、水 100% 移動相でも保持時間が一定の分析が可能となることが示された。また、低分子用分析用として用いられる細孔径のさほど大きくない TMS(13) でも、水 100% 移動相で保持の変化がなく高い再現性が得られていることから、固定相の種類、例えばアルキル鎖長により、水 100% 移動相は抜け出る細孔径の大きさは異なることが示された。TMS は ODS に比べ疎水性が低いいため、より小さな細孔径の充填剤でも水 100% 移動相で保持の変化がないと考えられる。

3.3 温度の影響

Fig. 4 と 5 には ODS(10) 及び C₃₀(10) (トリアコンチル基)を用いた場合のそれぞれの温度での保持の変化を示す。ODS(10) は 30°C と 40°C で通液中にも保持時間は減少しているが、20°C、10°C 及び 5°C では通液中には保持時間の変化はなく、通液停止後のみ保持時間は減少している。また、温度が低ければ低いほど保持時間の減少度合いは低く、10°C 以下では通液停止後でも 10% 以下の保持時間の

減少であり、事実上使用可能であると考えられる。また、カラム温度を 30°C 未満に設定し水 100% 移動相に切り換えた後、連続通液して用いれば、今まで使用不可能と考えられていた結合密度の高い ODS(10) でも水 100% 移動相条件下で、再現性の高い分析が可能である。C₃₀(10) は 40°C で連続通液した場合 150 時間以上保持の変化がないことが確認されているが、通液停止後は Fig. 5 に示すように 5% 保持が減少している。C₃₀(10) は ODS(10) と比較すると、Table 1 から細孔径及び炭素含有量がほぼ同じであることから疎水性も同程度である。しかしそれにもかかわらず、C₃₀(10) は 40°C のカラム温度で高い保持の再現性が得られる。このことは同じ細孔径であっても固定相が異なると、細孔内からの水 100% 移動相の抜け出し方が異なることを示している。C₃₀(10) の 80°C の保持時間の変化は ODS(10) の 40°C の場合に、また C₃₀(10) の 40°C の保持時間の変化は ODS(10) の 5°C の場合に非常によく似ており、C₃₀(10) は ODS(10) より約 40°C 高い温度で同様な保持挙動をしている。炭素数 30 の炭化水素であるトリアコンタン (C₃₀H₆₂) と炭素数 18 のオクタデカン (C₁₈H₃₈) の融点は、それぞれ 68~69°C と 29~30°C であり、約 40°C の差がある。固定相としてシリカ担体にアルキル基が結合している場合は、これらの融点の値がそのまま適用できないと考えられるが、アルキル基がシリカ担体に結合し融点がずれた後も、同様に 40°C の差は存在すると考えられる。この 40°C の温度差つまり融点の差、言い換えればアルキル基の自由度の差が、保持時間の挙動に関係していると推察される。固定相は融点前後で液相と固相に変化する。

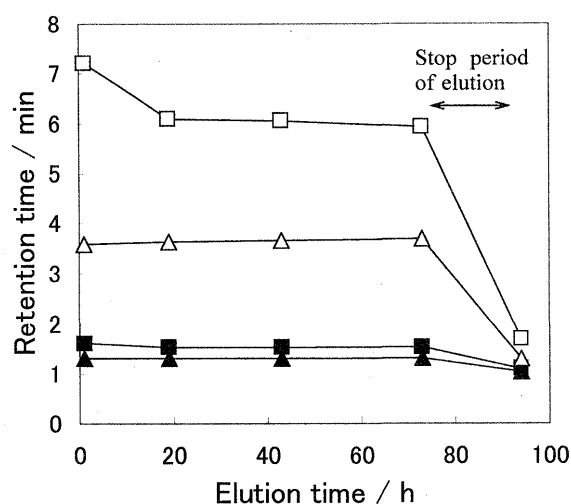


Fig. 6 Retention behavior of ODS(10) under both water and phosphate buffer conditions

Conditions: mobile phase, water and 10 mM sodium phosphate (pH 7.0); other conditions as in Fig. 1.
 □: 10 mM sodium phosphate (pH 7.0) and thymine;
 ■: 10 mM sodium phosphate (pH 7.0) and sodium nitrite; △: water and thymine; ▲: water and sodium nitrite

Fig. 4 の結果から, 水 100% 移動相が細孔内から抜け出すためには, 固定相が液相であるほうが容易であると推測される。したがって, 融点の高い C_{30} は細孔内から移動相が抜け出しにくく, 保持時間の再現性が高くなる。

3・4 移動相の影響

Fig. 6 には 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) と水のみを, それぞれ移動相として用いた場合の ODS (10) による保持の変化を示す。10 mM リン酸ナトリウム緩衝液に比べ水のみ移動相の場合は, チミンと亜硝酸ナトリウム両試料共通液開始時点からそれぞれ保持時間と溶出時間が短く, 水のみ移動相は移動相置換直後より細孔内に移動相が十分に入り込んでいないことを示唆している。また, 通液停止後は両移動相とも同様に大きく保持が減少した。この緩衝液と水との差はそれぞれの表面張力の差に起因していると考えられる。リン酸緩衝液は水より低い表面張力を示す。この表面張力が低い分リン酸緩衝液は疎水性の固定相表面になじみやすく, そのため水のみよりもこのリン酸緩衝液は充填剤細孔内に入りやすいと推測される。液体クロマトグラフィーでは水のみ移動相以外にリン酸塩などの塩, 酸又はアルカリなどを添加することがあるが, これらの添加物により, 水 100% 移動相を用いたときの保持の変化は影響を受ける。再現性の高い分析を行うためには水のみ移動相より, 表面張力の低い緩衝液を用いたほうが有利である。

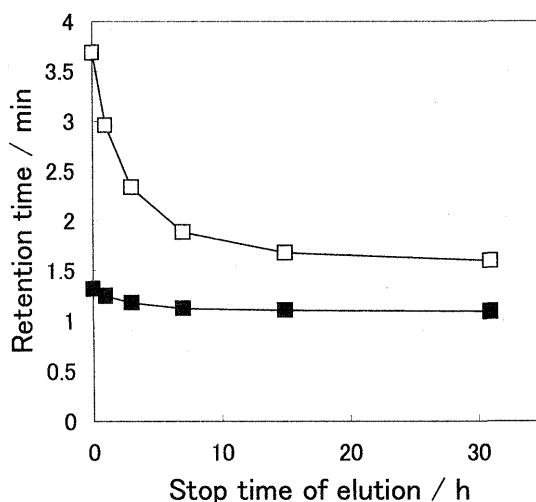


Fig. 7 Retention behavior of ODS(10) under water conditions: effect of stop of elution

Conditions: mobile phase, water; other conditions as in Fig. 1.

3・5 通液停止による影響

Fig. 7 には通液停止後の保持時間の変化を示す。水 100% 移動相に置換後, 通液自体を停止することにより保持時間が大きく減少する。Fig. 7 に示されているように数分間の停止時間で保持は半分以下になった。Fig. 3 の TMS(6) も同様な結果を示しており, TMS と ODS, 水とリン酸緩衝液の差はあるが, 15 分前後で半分以下の保持になっている。通液中はカラム内に 5 MPa 前後の圧力がかかっているが, 通液停止後は大気圧までカラム圧は低下する。Fig. 4 に示されているように温度 30℃ 未満で通液中に保持が変化しないのは, 細孔内から水が抜け出ようとする力よりも, 通液中の充填剤まわりの圧力のほうが高いためであり, 反対に通液停止後に大気圧まで下がると, 細孔内から抜け出ようとする力のほうが勝つため数分間で抜け出してしまうと考えられる。また, 細孔径の大きな充填剤については, 大きな細孔ほど細孔内から水が抜け出そうとする力が弱く, 大気圧のほうが勝っているため, 細孔内から抜け出ないと考えられる。一度保持が低下してしまうと, 再度高流量で 20 MPa 以上の圧力をカラムにかけても保持が戻ることはなく, 細孔内から一度水が抜け出すと容易には再び細孔内へ入り込めないことが示された。10 時間以上の通液停止後はほぼ定常状態になり, その後更に保持が減少することがないため, 例えば Table 1 の ODS (10) を用いてカラム温度を 10℃ 以下に設定すれば, 初期の保持時間の 90% 以上の保持時間を保っているため, 事実上水 100% 移動相がかなり高い再現性を保ちながら使用可能である。

以上述べてきたように, 逆相固定相による水 100% 移動

Table 1 Properties of stationary phases

Stationary phase name	Packings	Specific surface area/ $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$	Pore volume/ ml g^{-1}	Pore diameter/ nm	Carbon content, %	Ligand density/ $\mu\text{mol m}^{-2}$
ODS(10)	Develosil ODS-UG-5	163	0.58	10.4	18.4	3.2
ODS(22)	Develosil 300ODS-HG-5	113	0.80	21.9	11.4	3.4
C ₃₀ (10)	Develosil C30-UG-5	176	0.60	10.4	18.0	1.8
TMS(13)	Develosil TMS-UG-5	223	0.93	12.9	4.7	4.8
TMS(6)	Develosil 60TMS-UG-5	331	0.65	6.5	6.3	4.1
TMS(3)	Develosil 30TMS-UG-5	367	0.31	3.5	8.8	4.1

相を用いたときの保持の再現性は、充填剤細孔径、固定相の種類、温度及び移動相の添加物の種類などにより影響され、それぞれの要因が複雑にかかわっている。従来言われていたアルキル基の寝込みによる固定相の変化は、水 100% 移動相を用いたときの保持の減少とは直接的には関係がないと考えられる。TMS 固定相のように炭素数 1 でアルキル基の寝込みは起き得ないと考えられる固定相でも、平均細孔径が小さい場合は ODS 固定相と同様に保持の減少が観察された。また、10% 有機溶媒量の移動相を用い分析後、水 100% でカラム洗浄し、再度元の移動相に戻す操作をする場合、水 100% 移動相によりアルキル基が寝込んでいるときには、速やかに復元させるために 50% 以上の有機溶媒量の移動相の通液が必要で、10% 前後の有機溶媒量の移動相で復元させるには、非常に長い通液時間がかかると報告¹⁾されている。しかし平均細孔径 21.9 nm の ODS(22) を用いた場合、水 100% 移動相条件でも高い保持の再現性があり、その後メタノール-水 (10 : 90) の移動相に切り換えても、20 カラム容量程度の移動相の通液により、その移動相での平衡は簡単に達成され、水移動相を通液する前の状態に速やかに戻る。この ODS(22) においても、水 100% 移動相においてはアルキル基の寝込み現象は起こっている可能性が高いと考えられるが、アルキル基が寝込んだ状態で、有機溶媒量の低い移動相に切り換えたときでも、固定相と移動相の平衡は比較的速やかに達成される。つまり従来言われていた、アルキル基の寝込みにより水 100% 移動相条件で保持が減少するのではなく、充填剤細孔径内から移動相が抜け出し、移動相と固定相の接触している分離の場が減少するため、その結果として保持が小さくなると考えられる。また、この考え方のほうが実験結果によく当てはまる。

今まで示した図には連続通液時間が 72 時間前後であるが、120 時間に連続通液時間を延長しても、72 時間以降の保持時間はほぼ同じであった。また、実際の分析中には移動相や試料中に含まれる極微量の不純物が、水の多い移動相ほど固定相に吸着しやすくなるため、信頼性の高い分析を行うためには 24 時間ごとから、長くても 72 時間ごとの洗浄が必要になる。したがって、実用的には 72 時間

の再現性を有していれば、十分信頼性の高い分析ができることになる。

3・6 逆相固定相の水 100% 移動相使用に関する検討

逆相固定相はメチル基からオクチル基、オクタデシル基と疎水性の高い結合相を有していることを特徴としている。これら固定相の疎水性表面上には、水のような極性の高い溶媒は表面張力などの物性が関与し、反発しあい接触面積が小さくなるように作用する。したがって、固定相内に極性基を含み固定相そのものの疎水性が低くなったもの、又はアルキル基の結合密度を下げ固定相の疎水性を下げたものは、この反発作用が低下し、水になじみやすくなったと考えられる。また、充填剤の細孔径も逆相固定相表面上と水とのなじみやすさ、又は逆の反発作用に関与し、細孔径が大きいほど水とのなじみやすさが増大する。更に固定相の種類により水とのなじみやすさは変化し、アルキル基が短く疎水性の比較的低い TMS 固定相は、アルキル基が長く疎水性の高い ODS 固定相に比べ、より小さな細孔径において水となじみやすくなる。また、逆に C₃₀ のような長いアルキル基の固定相は、融点が高く固定相が固相として働くため、ODS 固定相よりも水になじみやすくなると考えられる。

従来水 100% 移動相では再現性の問題から使用できないと考えられていた C₈、ODS 固定相でも、細孔径の大きな充填剤を用いれば再現性の高い分離が可能である。この場合比表面積も下がるため、大きな保持は期待できない。また、固定相の融点の考察から、ODS 固定相でも設定温度を下げれば、また 40℃ 前後でも融点の高い C₃₀ 固定相を用いれば、大きな保持を保ったままで再現性の高い分離が可能となる。

文 献

- 1) R. G. Wolcott, J. W. Dolan: *LC-GC*, **17**, 316 (1999).
- 2) B. Buszewski, J. Schmid, K. Albert, E. Bayer: *J. Chromatogr.*, **552**, 451 (1991).
- 3) P. Kasturi, B. Buszewski, M. Jaronec, R. K. Gilpin: *J. Chromatogr.*, **659**, 261 (1994).
- 4) T. Czajkowaka, I. Hrabovsky, B. Buszewski, R. K.

- Gilpin, M. Jaroniec: *J. Chromatogr. A*, **691**, 217 (1995).
- 5) T. L. Ascah, K. M. R. Kallury, C. A. Szafranski, S. D. Corman, F. Liu: *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, **19** (17&18), 3049 (1996).
- 6) T. Czajkowaka, M. Jaroniec: *J. Chromatogr. A*, **762**, 147 (1997).
- 7) J. E. O'Gara, B. A. Alden, T. H. Walter, J. S. Petersen, C. L. Niederlander, U. D. Neue: *Anal. Chem.*, **67**, 3809 (1995).
- 8) 榎並敏行, 長江徳和: *Chromatography*, **19**, 380 (1998).
- 9) 長江徳和, 竹内豊英, 石井大道: *Chromatography*, **14**, 19R (1993).
- 10) 野村化学: 日本特許公開公報, 特願平 10-367043 号 (1998).
- 11) H. Moriwaki: *Anal. Sci.*, **16**, 105 (2000).
- 12) 野村化学: 日本特許出願中, 特願 2000-193336 号.

要 旨

水 100% 移動相を用いた場合の逆相固定相の保持挙動を評価した。水 100% 移動相をカラムに通液すると核酸塩基などの試料の保持は時間の経過とともに、また一度通液を停止した後に保持時間が短くなり、このときのカラムの重量差から水が充填剤から抜け出していることが示された。水 100% 移動相を用いた場合の保持の減少は充填剤の細孔から移動相が抜け出し、その結果移動相と固定相の接触している分離の場が減少することにより起こることが推察された。細孔径、固定相のアルキル鎖長、カラム温度又は緩衝剤などにより保持挙動は大きく変化し、22 nm 以上の細孔径の大きな固定相であれば、水 100% 移動相条件でも再現性の高い保持が得られた。また、長いアルキル鎖長の C₃₀ 固定相は 10 nm の細孔径でも同様に再現性の高い保持が得られた。固定相や移動相の様々な条件を変えることにより、一般的な逆相固定相でも水 100% 移動相条件下で再現性の高い分離が可能であることが示された。