逆相クロマトグラフィーにおける基材と保持機構

(1985年11月21日受理)

和田啓男*・牧野圭祐・尾崎広明・武内民男・波多野博行**

ODS カラムを用いた逆相液体クロマトグラフィー (RPLC) において, 親水性のより高いヌクレオシドが対応する核酸塩基よりも遅れて溶出すること, ならびに, イオン化合物である環状 AMP がアデニンおよびアデノシンよりも遅く溶出することが, これら溶質のオクタデシル鎖に対する特殊な相互作用によるものか, あるいは基材であるシリカゲルとの特異的な相互作用に起因するものかが明らかにされていなかった。本研究においては, 基材のビニルアルコールコポリマーゲル (VA) とシリカゲルのそれぞれにオクタデシル鎖を結合した充填剤を用い, RPLC の条件下での上記化合物の溶出挙動を調べ, 得られた結果をソルボホビク理論により解析した。その結果, オクタデシル鎖をつけたビニルアルコールコポリマーゲル (VA-C18) 上での溶出挙動は, すべてこの理論によって説明することができ, さきに述べた特異的な ODS シリカゲル上での挙動が, 担体であるシリカゲルと溶質の特異的な相互作用によるものであることを明らかにした。なお比較として, 他の親水性ポリマーゲルについても同様の研究を行ない, 担体がカラムの溶質に対する保持に大きな影響をもつことを明らかにした。

1 緒 言

ここ 10 年間, 高速液体クロマトグラフィーは, 生化学分野の発展にともない, 生理学的に重要な物質のもっとも有効な分離・分析および精製法の一つとして認められるようになった^{1)~5)}。その中で, もっとも広く使用されている高速液体クロマトグラフィーのモードは, 逆相液体クロマトグラフィー (以下 RPLC と略記する) である。これには, オクチル鎖やオクタデシル鎖などを有したアルキルシランを基材であるシリカゲルに化学結合して調製した充填剤がよく用いられる。その分離機構は, 「溶質の疎水性の部分が水系より炭化水素固定相へと排除される」ことによって誘起される, 溶質-固定相間の疎水部分同志の相互作用を基本としたソルボホビク理論⁶⁾⁷⁾によって説明される。しかし, 一般に疎水性な充填剤上で分離が行なわれることが起因して RPLC による分離と解釈されている例の中にも, 上記の理論では説明で

きないものがある。核酸塩基と, 同一塩基を有するヌクレオシド (たとえば, アデニンとアデノシンのような組み合わせ) の溶出順序の逆転は, その一例である。ヌクレオシドは, 疎水基である核酸塩基に強い親水性の糖 (チミジンの糖がデオキシリボースである以外はリボース) がグリコシド結合を介して結合しており, もしこれらの化合物の RPLC のカラムでの分離がソルボホビク理論にしたがうとすれば, 水への溶解度が増した分だけ対応する核酸塩基よりも速く溶出しなければならない。しかし, シリカゲルを基材としたオクタデシルシラン (以下 ODS と略記する) カラムを用いた分離では, この順序が逆転することが報告されている^{8)~10)}。

よって, このような異常な ODS 充填剤上の挙動の原因を詳細に解析することは, より理想的な RPLC のカラムの開発に貢献する。さらに, この結果は核酸関連化合物の, より高精度の分離を可能ならしめる。

本研究では, シリカゲルに代わる RPLC の充填剤の基材として, 親水性のポリマーを選び, これにアルキル鎖をグラフトして得られたカラムの RPLC 条件下での挙動について検討を行なった。水系で使用できる親水性充填剤として, ビニルアルコールコポリマー (以下 VA と略記する) 系のものがある。市販されている一連の VA カラムは, 水溶性高分子化合物のサイズ排除による分離を目的としている¹¹⁾。しかし, VA 上では, 測定する化合物によっては, RPLC が主分離機構になることがすでに報告されて

京都工芸繊維大学繊維学部高分子学科, 606 京都市左京区松ヶ崎

** 京都大学理学部化学学科, 606 京都市左京区北白川

1) B. L. Karger, R. W. Giese, *Anal. Chem.*, **50**, 1048 A (1978).

2) P. J. M. Van Haastert, *J. Chromatogr.*, **210**, 229 (1981).

3) M. Zakaria, P. R. Brown, *ibid.*, **255**, 151(1983).

4) S. Garcia, J. P. Liautard, *J. Chromatogr. Sci.*, **21**, 398 (1983).

5) H. Schott, H. D. Meyer, E. Bayer, *J. Chromatogr.*, **280**, 297(1983).

6) Cs. Horváth, W. R. Melander, I. Molnár, *ibid.*, **125**, 129(1976).

7) Cs. Horváth, W. R. Melander, I. Molnár, *Anal. Chem.*, **49**, 142(1977).

8) M. Zakaria, P. R. Brown, E. Grushka, *Anal. Chem.*, **55**, 457(1983).

9) P. R. Brown, E. Grushka, *ibid.*, **52**, 1210(1980).

10) R. A. Hartwick, P. R. Brown, *J. Chromatogr.*, **126**, 679(1976).

11) H. Wada, *ibid.*, **320**, 369(1985).

いる¹²⁾¹³⁾。この場合, VA 上では, ヌクレオシドおよびその塩基が, すでに報告されている ODS 上での溶出と逆の順で溶出した。また, このカラムでのこれら化合物の保持機構は, ソルボホビック理論で説明できたことから, 理想的な RPLC であると考えられる。

よって, 本研究は, 前に述べた ODS シリカゲル上での核酸塩基およびヌクレオシドの異常な保持挙動が, 化学結合されたオクタデシル鎖によるものか, あるいはオクタデシル鎖でおおわれた基材の性質によるものかを明らかにすることを目的として行なった。ここで用いた充填剤は, 基材として保持機構がすでに説明されている VA にオクタデシル基をグラフトしたものである (以下 VA-C 18 と略記する)。このカラムを用い, 核酸塩基, ヌクレオシドの保持比を種々の pH で測定し, その結果を, ODS シリカゲルを用いて得られた結果と比較した。さらに, より詳細な検討を加えるため VA 以外の親水性ポリマー系充填剤 (東洋曹達工業 (株) 製 G 4000 PW) にオクタデシル基を結合した充填剤 (以下 4 PW-C 18 と略記する) 上での 同じ 試料の保持比の測定もあわせて行なった。

2 実 験

測定に用いた核酸塩基, ヌクレオシド, ヌクレオチドは, 與人 (株) (東京), ヤマサ醤油 (株) (千葉) から, そのほかの試薬は半井化学薬品 (株) (京都) から購入した。水は MILLI R/Q 純水精製装置で精製し, これを用いて溶離液および試料溶液を調製した。使用した高速液体クロマトグラフは, 東洋曹達工業 (株) 製 UV-8 model II spectrometer を具備した同社製 HLC-803 A 型である。VA-C 18 は, 基材として旭化成工業 (株) 製の GS-320 を用い, これに同社で常法によりエステル結合を介してオクタデシル基をグラフトしたものを使用した。この試作充填剤を, 内径 7.5 mm, 長さ 10 cm のステンレススチールカラムに通常のスラリー法で充填した。また 4 PW-C 18 カラム (内径 4.6 mm, 長さ 15 cm) は G 4000 PW 充填剤にオクタデシル基をエーテル結合を介して導入した東洋曹達製の試作ゲルである。シリカゲルを基材とした RPLC 用カラムとしては, 東洋曹達製 ODS-120 T (内径 4.6 mm, 長さ 25 cm) を用いた。測定条件はつぎのとおりで, 本研究の測定はすべてこの条件下で行なわれた。移動相, 0.2 mol・dm⁻³ リン酸緩衝液; 流速, 5×10⁻⁴ dm³/min; 試料注入量, 2×10⁻⁵ dm³; 検出波長, 260 nm; 測定温度, 室温。

3 結果と考察

核酸塩基およびヌクレオシドの各種 RPLC カラムでの保持について比較検討するために, 溶離液の pH を 2.5, 5.0, 7.0 と変えて測定を行ない, 3 種の充填剤上での個々の試料の保持比 (k') を求めた。 k' 決定のための基準としては, ウォーターディップを空隙容量 V_0 として用いた。VA-C 18, 4 PW-C 18 および ODS-120 T 上で得られた k' 値を表 1~3 に示した。同一測定条件下では, 表中明らかなように, カラム間の格差が観察された。なお, 以後溶質は表 1, 4 の脚注に示した略号によって記述する。

溶離液の pH が 2.5 の場合, 3 種のカラム上でつぎの溶出順

Table 1 Capacity factors of nucleosides and their bases obtained on VA-C 18 at pH 2.5, 5.0 and 7.0

Compound	k'		
	pH 2.5	pH 5.0	pH 7.0
Cyt	0.27	0.70	0.72
Ura	0.93	0.98	1.00
Thy	1.67	1.75	1.83
Gua	0.86	2.95	2.63
Ade	0.62	4.91	5.27
Cyd	0.27	0.63	0.66
Urd	0.73	0.82	0.83
Thd	1.59	1.78	1.86
Guo	1.61	2.26	1.97
Ado	0.67	4.43	4.43

Cyt : Cytosine, Cyd : Cytidine

Ura : Uracil, Urd : Uridine

Thy : Thymine, Thd : Thymidine

Gua : Guanine, Guo : Guanosine

Ade : Adenine, Ado : Adenosine

Table 2 Capacity factors of nucleosides and their bases obtained on 4 PW-C 18 at pH 2.5, 5.0, and 7.0

Compound	k'		
	pH 2.5	pH 5.0	pH 7.0
Cyt	0.05	0.16	0.21
Ura	0.38	0.42	0.37
Thy	0.76	0.80	0.78
Gua	0.24	0.89	0.79
Ade	0.16	1.77	2.14
Cyd	0.12	0.19	0.20
Urd	0.38	0.37	0.35
Thd	1.18	1.21	1.16
Guo	0.81	1.08	0.86
Ado	0.37	2.77	2.79

Table 3 Capacity factors of nucleosides and their bases obtained on ODS-120 T at pH 2.5, 5.0, and 7.0

Compound	k'		
	pH 2.5	pH 5.0	pH 7.0
Cyt	0.39	0.66	0.79
Ura	1.42	1.44	1.30
Thy	5.03	5.73	2.63
Gua	1.69	3.62	2.90
Ade	1.72	3.71	10.14
Cyd	2.03	2.54	2.42
Urd	4.47	4.64	3.17
Thd	3.93	8.96	4.25
Guo	4.00	4.22	5.95
Ado	2.72	22.69	

序が得られた。核酸塩基については (不等号は溶出の速い方へ開くことにする) :

VA-C 18 ; Cyt>Ade>Gua>Ura>Thy, 4 PW-C 18 ; Cyt>Ade>Gua>Ura>Thy, ODS-120 T ; Cyt>Ura>Gua>Ade>Thy。

一方, ヌクレオシドについては :

VA-C 18 ; Cyd>Ado>Urd>Thd>Guo, 4 PW-C 18 ; Cyd>

12) H. Wada, H. Ozaki, K. Makino, T. Takeuchi, H. Hatanano, *Anal. Lett.*, 16(B 19), 1537(1983).

13) H. Wada, *Chromatographia*, 18, 550(1984).

Ado>Urd>Guo>Thd, ODS-120 T; Cyt>Ado>Thd>Guo>Urd。

VA-C 18 および 4PW-C 18 上では、核酸塩基の溶出順序は同じであり、またヌクレオシドの溶出順序も両カラムで同じであった。また、ヌクレオシドの溶出順序が対応する塩基の順にしたがっているかについても検討したが、Guo についてヌクレオシドで少し k' が大きくなる以外にはその塩基の溶出順序と同じであった。一方、ODS-120 T では、両方の試料ともポリマー基材カラムでの溶出順序と異なった。またヌクレオシドの溶出順序は対応する塩基の溶出順序と大きく異なった。各 RPLC のカラムでの保持が疎水性相互作用のみによって行なわれていると仮定すれば、上記の結果から、つぎの点が示唆される。ポリマー基材カラムでの保持機構は、溶質の塩基部位と固定相との疎水性相互作用に強く依存しているのにくらべ、シリカ基材上では、親水性の糖が保持機構に関与し、ヌクレオシドと核酸塩基の k' 序列との間に変化が生じた。親水性の糖の保持機構への関与は、疎水性相互作用による保持と相乗効果を発現しており、糖による溶質の溶解度の増加による保持の減少を引き起こしていない(表3)。すなわち、これは溶質とシリカゲル担体との相互作用を示唆している。一方、核酸塩基と対応するヌクレオシドの組み合わせについて検討を加えると、この pH では、表1, 2 および表3に示したように、すべてのカラムで、プリン化合物については、核酸塩基の方が対応するヌクレオシドよりも速く溶出した。一方、ピリミジン化合物については、4PW-C 18 のカラムでは、核酸塩基の方が速く溶出したのに対し、ほかの二つのカラムでは、ヌクレオシドの方が速く溶出した。これらの試料の pH 2.5 での保持は、ソルボホビク理論を用いた場合、つぎのように説明できる。この理論によれば、疎水性の強い化合物ほど溶離液から排除され、逆相固定相の方へ押し込まれ、その結果、溶質は強く保持される。逆にイオン性物質など、水への溶解度の高い化合物は溶離液中に留まる傾向をもち、保持は弱い。これらの溶質-固定相間の相互作用の強さは、溶質の pK_a 値と密接な関係にある。pH 2.5 において、Guo ($pK_a = 1.9$) の塩基は中性型で存在しているが、一方、Gua ($pK_a = 3.0$) ではプリン環の 7-位の窒素がすでに水素イオン付加しており、正の電荷をもつ。よって電荷を有した Gua の方が速く溶出する。Ade ($pK_a = 4.2$) と Ado ($pK_a = 3.6$) の組み合わせの場合、pH 2.5 ではともに 1-位の窒素に水素イオン付加が起こるが、 pK_a 値の高い Ade の方がより多くのイオン型をとるため、Ado よりも速く溶出する。これはすべてのカラム上での結果と一致する。ピリミジン化合物に対しても同様の解釈がなされる。Cyt ($pK_a = 4.6$) と Cyt ($pK_a = 4.1$) の組み合わせでは、アデニンに対する解釈と同様に、 pK_a 値の高い Cyt の方がより多くのイオン型をもつため Cyt よりもさきに溶出するが、各イオン型の pK_a 値の差は小さく、同じ k' となることもある。酸性 pH 域では、水素イオン付加を受けることのない Thy と Thd, Ura と Urd の組み合わせでは、親水性の糖部分を有するヌクレオシドの方が保持は小さくなる。よって pH 2.5 での測定結果から、4PW-C 18 上でのピリミジン化合物の保持が説明できなかったが、VA-C 18 および ODS-120 T を用いて得られた結果についてはソルボホビク理論で説明できた。さきの核酸塩基別およびヌクレオシド別の溶出順序に対する結果とあわせて考えると、すべて VA-C 18 上での結果が理論的に説明できるのに対して、ほかの二つのカラムで

は、純粋に疎水性相互作用が行なわれていないことが明らかになった。また、VA-C 18 上では、糖による溶質の溶解度の増加はイオンによるそれとくらべて、溶質とオクタデシル鎖との間の相互作用の強さには影響をおよぼさないことがわかった。一方、pH 5.0 および pH 7.0 においても、同試料の保持挙動は、VA-C 18, ODS-120 T および 4PW-C 18 上で異なった。これらの pH では、すべての試料はイオン化しておらず、試料分子の疎水性の程度に溶出順序は支配される。すなわち、RPLC においては、核酸塩基の保持は、対応するヌクレオシドよりも強い。VA-C 18 カラムでは、表1に示したように、Thy と Thd の k' が同一であった以外は、理論通りすべての組み合わせで核酸塩基の溶出がヌクレオシドのそれより遅れた。一方、ODS-120 T を用いた場合には、逆に核酸塩基の方がヌクレオシドよりも速く溶出した。Brown らは核酸塩基よりもヌクレオシドの方が自己会合の傾向が大きく、溶質同志の垂直方向のスタッキングの結果、疎水性が大きくなり、この結果、ヌクレオシドは核酸塩基よりも強く保持されると説明した⁹⁾。もしそうであるとして、このスタッキングが溶質とオクタデシル基との疎水性相互作用の強さを増加して溶出容量を増しているのであれば、もし担体を変えても、オクタデシル基がグラフトされるかぎり、同様の効果が発現するはずである。しかし、これは上に述べた VA-C 18 上での結果から否定されるべきであり、むしろ、すでに本研究で明らかにされたように、ODS シリカゲル上での理論的に説明できない保持挙動は基材シリカゲルと溶質との特有の相互作用と帰すべきであろう。一方、4PW-C 18 カラムを用いた場合、pH 5.0 では、Ura と Urd の組み合わせを除いて、核酸塩基が対応するヌクレオシドよりも速く溶出した。また、pH 7.0 では Ura と Urd および Cyt と Cyt の組み合わせを除いて核酸塩基の方がヌクレオシドよりも速く溶出した。4PW-C 18 上での、pH 5.0 および pH 7.0 における核酸塩基、ヌクレオシドの溶出順序については、ODS-120 T のカラムの場合に述べたと同じ理由で、ソルボホビク理論で説明できない。このように VA-C 18 カラムでの核酸塩基およびヌクレオシドの保持の強さは、シリカゲルを基材として用いた ODS カラムのとは逆転しており、すでに論文で報告したように、VA-C 18 の基材である VA(GS-320) での結果と同様、溶質と充填剤との疎水性相互作用に強く依存した保持を示した。pH 5 以上の領域では、基材シリカゲルのシラノール基、VA ゲルの解離基は解離し負の電荷をもつことがすでに報告されており¹⁴⁾¹⁵⁾、正電荷をもった試料とはイオン間相互作用を行なう可能性があるが、本研究で用いた試料の場合は、pH 5 以上では正の電荷を有しないので、イオン相互作用はすべてのカラム上での保持には関係していないと考える。よって本研究で観察された、異なった基材にオクタデシル基を異なった方法で化学結合したゲル上での異なった保持挙動に対しては、化学結合したオクタデシル鎖の試料との相互作用だけではなく、基材自身のもつ性質が保持に関与しており、この特異的基材の保持への影響は、今後の大きな研究課題であると考えられる。

ヌクレオシドの糖部分のヒドロキシル基にリン酸がエステル結合したヌクレオチドは、リン酸基がイオン化するため、移動相へ

14) L. H. Allen, E. Matjević, *J. Colloid Interface Sci.*, **33**, 420(1970).

15) H. Wada, *J. Chromatogr.*, **322**, 255(1985).

の溶解度はより大きく、理論的には対応するヌクレオシドよりも速く溶出する。しかしながら、リン酸基がリボースの 3'-位と 5'-位に環状エステル結合をしている環状ヌクレオチドも、シリカゲルを基材とする ODS 上では異常な保持挙動を示すことが報告されている。Anderson らは、アデノシン、イノシンおよびグアノシンの環状ヌクレオチドを同じ塩基をもった化合物とともに、ODS カラムで測定した。この結果、pH 6.0 のとき、ヌクレオチド、核酸塩基、ヌクレオシド、環状ヌクレオチドの順に溶出すると報告している¹⁶⁾。核酸塩基、ヌクレオシドの溶出順序については、すでに前に述べ、説明した。彼らは、環状アデノシン-リン酸 (以下 cAMP と略記する) は、pH 6.0 では、リン酸基は解離しているが、環状構造がリン酸基の極性を最小にするために、疎水性が大きくなり、Ade よりも遅く溶出すると説明している。これに対して、前に述べて解析したように、溶出順序が溶質の疎水性とオクタデシル鎖の疎水性相互作用の強さに依存すると考えれば、基材が変わっても同様の溶出順序を示すはずである。よって本研究においては、前出の 3 種のカラムを用い、同一条件下で、cAMP の保持挙動を測定した。なお溶離液の pH は、アデニンのイミダゾール環の解離定数が 4 付近に、またリン酸基の第二解離は 6 付近で生じることから、その近傍での溶質のイオン化の程度に起因するこれら溶質の保持挙動の変化を詳細に検討するため、2.5, 5.0 および 7.0 を選んだ。表 4 (A) に見られるように、VA-C18 カラム上では、AMP が一番速く溶出し、つづいて cAMP, Ado, Ade の順に溶出した。AMP が cAMP より速く溶出するのは、リン酸基の陰イオンの数が AMP が 2, cAMP が 1 をとり得るという事実と、構造上の違いによる疎水性相互作用の強さの違いから説明できる。すなわち、cAMP のリン酸基はアデノシンの 3'-および 5'-位にエステル結合して環状構造をとり運動性は乏しく、このため、AMP にくらべてアデニン環には近接

して存在し得ない。よって、この化合物の疎水性の強い部分であるアデニン環のオクタデシル鎖との相互作用には大きな変化は生じない。一方、AMP ではリン酸基は 5'-位のヒドロキシル基とエステルを形成しており、自由回転可能である。このためリン酸基はアデニン環に近接することが可能であり、親水性のリン酸基がオクタデシル鎖とアデニン環との疎水性相互作用を妨害する。その結果、AMP はゲルとの相互作用が弱くなり、cAMP よりも速く溶出すると解釈される¹⁵⁾。このため溶質の総電荷数も溶出順序に関与する。pH 2.5 では AMP のリン酸基は第一解離を行っており、-1 の負電荷を有し、さらに pH 6.3 では第二解離が起こり -2 の負電荷を有する。cAMP は pK_a 値が約 2 であり¹⁷⁾、リン酸基がリボースに二つのエステル結合によって結合されているため、実験を行なったすべての pH では第一解離のみを生じる。また、pH 2.5 では、AMP および cAMP のアデニン環は 1-位の窒素への水素イオン付加が生じ、正電荷 1 を有する。したがって、この pH では、前に述べたように、リン酸基のアデニン環への近接の難易によって保持の大きさが決定され、アデニン環がオクタデシル鎖と近接し難い cAMP の方が AMP よりも強く保持される。よって、VA-C18 カラムを用いた場合、pH 2.5 では、cAMP は AMP より遅れて溶出した。一方、pH 5.0 では、AMP, cAMP のアデニン環は中性型の構造をとる。このため、正電荷が減少しただけ、それぞれ pH 2.5 での保持よりも強く保持される。しかしながら、溶出順序は前に述べた説明どおりであり、AMP がさきに溶出した。pH 7.0 では、AMP のリン酸基は第二解離も行なう。このため AMP の移動相への溶解度が増し、保持は減少する。一方、cAMP は、この pH においても第一解離のみが起こっており、電荷数は、pH 5.0 でのそれと同じであり、このため保持容量に変化を生じない。また VA は、すでに報告したように、pH 4~5 以上では負電荷を有する。よって pH 7.0 では VA 上に pH 5.0 よりも、より多くの負電荷が形成され、このためリン酸基の負電荷が反発し、保持は減少したと解釈される。また、Ade, Ado はアデニン環以外に解離する部位をもっておらず、このため cAMP および AMP より遅く溶出した。このように ODS シリカゲル上で説明できない保持挙動をすると報告されている cAMP についても VA-C18 カラム上ではソルボホビク理論で説明可能であった。一方、4 PW-C18 上での保持については、表 4 (B) に見られるように、各 pH において、AMP, Ade, Ado そして cAMP の順に溶出した。また、ODS-120 T では、pH 2.5 では、Ade, AMP, cAMP, Ado の順に溶出した。一方、pH 7.0 では、AMP, Ade, の順に溶出したが、Ado および cAMP は、強く固定相に保持されて、測定可能なピーク高さが得られなかった (表 4 (C))。4 PW-C18 および ODS-120 T カラム上での、これら試料の保持挙動は、VA-C18 カラム上でのそれがソルボホビク理論で予想されるとおりであったのに対し、溶質と固定相の疎水性相互作用では説明できないものであった。以上の結果から、RPLC では、基材に化学結合されたオクチル鎖やオクタデシル鎖などと溶質との相互作用よりも、担体自身の有する性質がその保持に関与する場合があることが確認された。それゆえ、今後より高精度の RPLC のカラムを設計していくためには、ゲル基材自身の性質を詳細に研究し、解析を行なうことが重要である。

Table 4. Capacity factors of Ade, Ado, AMP, and cAMP obtained on VA-C18(A), 4 PW-C18 (B), and ODS-120 T (C) at pH 2.5, 5.0, and 7.0

Column	Compound	k'		
		pH 2.5	pH 5.0	pH 7.0
(A)	Ade	0.62	4.91	5.27
	Ado	0.67	4.43	4.43
	AMP	0.19	0.38	0.11
	cAMP	0.50	1.50	1.49
(B)	Ade	0.16	1.77	2.14
	Ado	0.37	2.77	2.79
	AMP	0.11	0.50	0.19
	cAMP	0.62	3.70	3.95
(C)	Ade	1.72	3.71	10.14
	Ado	2.72	22.69	a)
	AMP	2.46	7.18	2.61
	cAMP	4.35	17.50	a)

Ade: Adenine, Ado: Adenosine

AMP: Adenosine 5'-phosphate

cAMP: Adenosine 3',5'-cyclic phosphate

a) Too broad to detect.

16) F. S. Anderson, R. C. Murphy, *J. Chromatogr.*, **121**, 251(1976).

17) J. H. Knox, J. Jurand, *J. Chromatogr.*, **203**, 85(1981).

**Special Articles on
Modern Chemical Separation**

**Effect of Packed Materials of Column on the Retention Mechanism
in Reversed Phase Liquid Chromatography**

HIROO WADA*, Keisuke MAKINO, Hiroaki OZAKI, Tamio TAKEUCHI
and Hiroyuki HATANO**

*Department of Polymer Science and Engineering, Faculty of Textile Science, Kyoto
Institute of Technology; Matsugasaki, Sakyo-ku, Kyoto-shi 606 Japan*

*** Department of Chemistry, Faculty of Science, Kyoto University; Kitashirakawa,
Sakyo-ku, Kyoto-shi 606 Japan*

Reversed phase liquid chromatography (RPLC), the most widely used mode in high-performance liquid chromatography, commonly uses silica gel as a support material for columns, on which octadecyl chain is chemically grafted. In RPLC, the solvophobic theory has been used to explain the retention mechanisms of hydrophobic or partly hydrophobic solutes on RPLC columns, but we have still some problems that can not be explained by the theory. An example is the fact that nucleosides having a hydrophilic ribose ring show more preferential retention on silica-based RPLC columns (ODS columns) than their corresponding bases which are highly hydrophobic. Two possible factors for this unusual retention are the unusual hydrophobic interaction between solutes and octadecyl chains and the specific interaction of solutes with silica gel. In order to elucidate this fact, vinyl alcohol copolymer gel, whose retention mechanism for such solutes has been explained by the solvophobic theory, was taken as a support material and the retention of nucleosides and their bases were investigated on a column packed with octadecyl chain-grafted vinyl alcohol copolymer gel. It was revealed that the retention of all samples on the packing was well explained by the solvophobic theory and such samples were adsorbed on an ODS silica gel with unusual retention behavior. The extraordinary long retention of adenosine 3',5'-cyclic phosphate on ODS silica columns was determined to be due to the similar interaction between silica gel and the solutes.